

Bioteknologi

| Bioteknologi | vol. 13 | no. 1 | pp. 1-41 | Mei 2016 |
| ISSN: 0216-6887 | EISSN: 2301-8658 |



EDITORIAL BOARD:

Editor-in-Chief:

Suranto

Managing Editor:

Ahmad Dwi Setyawan

Editorial Advisory Board:

Ahmad Yunus- Fakultas Pertanian UNS Surakarta
Ambar Mudigdo- Fakultas Kedokteran UNS Surakarta
Antonius Suwanto - Jurusan Biologi FMIPA IPB Bogor
Edi Purwanto - Fakultas Pertanian UNS Surakarta
Ghulam Nabi - Khyber Pukhtunkhwa University Pakistan
Harijono Kariosentono - Fakultas Kedokteran UNS Surakarta
Sajidan - Ps. Pend. Biologi PMIPA FKIP UNS Surakarta
Sutarno - Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta
Sugiyarto - Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta
Widya Asmara - Fakultas Kedokteran Hewan UGM Yogyakarta
Adi Prayitno - Fakultas Kedokteran UNS Surakarta
Paramasari Dirgahayu - Fakultas Kedokteran UNS Surakarta
Ruben Darmawan - Fakultas Kedokteran UNS Surakarta

PUBLISHER:

Universitas Sebelas Maret

FIRST PUBLISHED: 2004

ADDRESS:

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas SebelasMaret
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126. Tel. & Fax.: +62-271-663375. Email: unsjournals@gmail.com

ONLINE:

biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm



Universitas Sebelas Maret Surakarta



Pengaruh asam absisat terhadap viabilitas biji sintesis *Grammatophyllum scriptum* (Orchidaceae) selama masa penyimpanan kering

EVITA MULIAWATI, ENDANG ANGGARWULAN, ARI PITOYO*

Muliawati E, Anggarwulan E, Pitoyo A. 2015. Effects of abscisic acid on viability of synthetic seed of *Grammatophyllum scriptum* (Orchidaceae) during dried storage periods. *Bioteknologi* 13: 1-8. This research was aimed to extend the self-life of plbs of Tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum*) by the development of desiccated synthetic seed, a hydrogel bead of calcium-alginate that embedded the plb inside them. The length of the self-life is achieved by the application of Abscisic Acid (ABA), a plant growth retardant. The experiment was prepared by completely randomized designed with 5 treatments of ABA concentrations (0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L) and 5 replication each treatment. The successful of the treatments would be presented by the ability of the synthetic seed to postpone their germination during storage periods and can redraw to germinate after rehydration. The result shows that, desiccation treatments during storage can inhibit the germination of synthetic seed. ABA application in low concentration, 5 mg/L, can protect the viability of plbs during storage periods and germinate them after rehydration.

♥Alamat korespondensi:

Program Studi Peternakan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Central Java, Indonesia. Tel.: +62-271-637457. *email: aripitoyo@mipa.uns.ac.id

Manuskrip diterima: 5 November 2014. Revisi disetujui: 17 Januari 2016.

Keywords: *Grammatophyllum scriptum*, desiccation, ABA, synthetic seed, plb viability

Muliawati E, Anggarwulan E, Pitoyo A. 2015. Pengaruh asam absisat terhadap viabilitas biji sintesis *Grammatophyllum scriptum* (Orchidaceae) selama masa penyimpanan kering. *Bioteknologi* 13: 1-8. Penelitian ini bertujuan untuk memperpanjang masa simpan biji sintesis *Grammatophyllum scriptum* (Orchidaceae), berupa suatu selubung hidrogel kalsium alginat yang membungkus dan melindungi eksplan plb *G. scriptum* di dalamnya. Pemanjangan masa simpan diperoleh melalui pendekatan hormonal berupa aplikasi Asam Absisat (ABA) pada matrik enkapsulasi. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 perlakuan variasi konsentrasi ABA (0 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L) dengan 5 ulangan. Keberhasilan masa simpan diwujudkan dalam penundaan perkecambahan selama periode penyimpanan, dan kemampuan perkecambahan setelah rehidrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan kering dapat menunda perkecambahan biji sintesis untuk meningkatkan masa simpan. Pemberian ABA pada konsentrasi rendah, 5 mg/L menunjukkan kemampuan dalam menjaga viabilitas plb *G. scriptum* selama mengalami masa simpan kering.

Kata kunci: *Grammatophyllum scriptum*, pengeringan, ABA, biji sintesis, viabilitas plb

PENDAHULUAN

Sifat biologi reproduksi anggrek seperti kebutuhan serangga sebagai sumber polinasi dan ketergantungan hidup pada cendawan menjadikan kelompok tumbuhan ini sangat rentan terhadap koleksi yang berlebihan ataupun kerusakan habitat. Untuk itu, usaha konservasi

melalui perbanyakan perlu dilaksanakan. Salah satu jenis anggrek yang berpotensi sebagai tanaman hias karena ciri khas bunganya adalah *Grammatophyllum scriptum*.

Sejak keberhasilan perkecambahan biji anggrek secara asimbiotik melalui kultur di media dan lingkungan steril (Knudson 1922), kultur *in vitro* telah sering digunakan sebagai teknologi

pilihan yang sangat menjanjikan untuk pemenuhan kebutuhan bibit tanaman yang akan dieksploitasi dan dimanfaatkan secara luas, khususnya anggrek (Arditti dan Ernst, 1993). Akan tetapi teknologi ini memiliki keterbatasan yaitu anakan tidak bisa langsung ditanam pada media aseptik karena perbedaan lingkungan yang ekstrem di dalam dan di luar botol kultur seperti keadaan steril yang bebas virus dan ketersediaan air dan nutrisi yang terjamin.

Keterbatasan ini memunculkan ide pengembangan teknik enkapsulasi atau penyelubungan untuk membantu produk hasil kultur *in vitro* agar dapat ditanam langsung pada lahan tanam atau untuk penyimpanan jangka panjang. Teknik enkapsulasi juga dikenal sebagai biji sintetis karena kemiripan bentuk fisiknya yang menyerupai biji zigotik. Pengembangan biji sintetis pertama kali berhasil dilakukan oleh Redenbaugh *et al.* (1985) menggunakan bahan selubung hidrogel natrium alginat untuk enkapsulasi embrio somatik alfalfa (*Medicago sativa*).

Pemanfaatan biji sintetis cocok untuk tanaman yang memiliki biji tetapi tidak memiliki cukup cadangan makanan (endospermae) seperti pada anggrek (Benzing, 1981). Pengemasan dengan biji sintetis dapat juga digunakan untuk menekan pertumbuhan eksplan semaksimal mungkin (Lestari *et al.* 2000), sehingga dapat dimanfaatkan untuk tujuan penyimpanan plasma nutfah.

Perpaduan antara teknik enkapsulasi seperti pembuatan biji sintetis dan pemberian hormon yang mampu mengatasi cekaman kekeringan merupakan upaya memperpanjang waktu simpan guna pemenuhan bibit dalam jangka waktu tertentu. Penyimpanan dengan pertumbuhan minimal dapat menghemat tenaga serta biaya karena dengan menghambat pertumbuhan biakan, maka frekuensi pembaruan dapat ditekan serendah mungkin. Apabila diperlukan, biakan dapat diperbanyak secara cepat (Lestari dan Purnamaningsih, 2005). Penyimpanan pertumbuhan minimal dapat dilakukan menggunakan beberapa cara, yaitu perlakuan suhu rendah atau kriopreservasi (Khoddamzadeh *et al.* 2011), penambahan senyawa osmotik, dan pemberian hormon anti stres lingkungan berupa asam absisat (Aridha *et al.* 2009; Lloyd dan Jackson, 1986).

Untuk menekan pertumbuhan biji sintetis dilakukan perlakuan awal berupa desikasi untuk mengurangi kadar air pada biji sintetis, sehingga perlu ditambahkan senyawa yang sejalan

fungsinya terhadap kondisi cekaman. Dengan demikian penambahan asam absisat (ABA) pada teknik enkapsulasi diharapkan dapat mempertahankan biji sintetis anggrek dalam kondisi viabilitas yang baik meskipun disimpan dalam waktu tertentu sebagai metode alternatif untuk penyimpanan jangka panjang. ABA telah diketahui dapat mencegah kehilangan air secara berlebihan pada embrio somatik dan meningkatkan angka survival saat diregenerasi membentuk individu lengkap (Aguilar *et al.* 2000; Danso dan Llyold, 2008).

Berdasarkan uraian di atas, penelitian untuk mengetahui pengaruh ABA pada kapsul hidrogel kalsium alginat terhadap pertumbuhan dan perkembangan biji sintetis hasil enkapsulasi *plb* pada anggrek macan (*G. scriptum*) setelah mengalami masa simpan kering perlu dilakukan.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman

Bahan yang digunakan adalah *protocorm like body (plb)* anggrek *Grammatophyllum scriptum* koleksi Laboratorium Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Nutrisi dasar dan matriks enkapsulasi

Nutrisi dasar yang digunakan untuk pembuatan kapsul biji sintetis adalah garam Murashige & Skoog (MS) dari Caisson Lab. Larutan MS konsentrasi penuh dibuat dengan cara melarutkan 34,40 g serbuk MS pada akuades hingga volume 1L. Stok larutan nutrisi dasar ini kemudian digunakan sebagai pelarut untuk membuat matriks enkapsulasi.

Matriks pembuat kapsul hidrogel kalsium alginat dipersiapkan dalam dua larutan terpisah, yaitu 3% larutan alginat dan 75mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, masing-masing larutan menggunakan pelarut media dasar yang telah dibuat stok. Perlakuan variasi ABA pada matriks enkapsulasi dipersiapkan dengan cara menambahkan beberapa volume ABA pada larutan stok 3% hingga didapatkan seri konsentrasi 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L.

Pembuatan kapsul kalsium alginat (biji sintetis)

Kapsul biji sintetis dibuat dengan cara merendam eksplan *plb G. scriptum* hasil kultur *in vitro* pada larutan 3% alginat yang telah diperkaya dengan ABA (sesuai dengan rancangan perlakuan). Setelah 1 menit, setiap *plb* diambil dengan menggunakan pipet tetes

kemudian dimasukkan dalam larutan 75mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ hingga terbentuk suatu bulatan hidrogel biji sintetis. Setelah 30 menit biji sintetis ditiriskan dan dikeringkan hingga volumenya menyusut sekitar 50% dari bobot awal. Selanjutnya dilakukan penyimpanan kering steril (*in vitro*) selama 2 minggu. Sebagai pembandingan diberikan kontrol berupa biji sintetis tanpa pengeringan. Semua kegiatan pembuatan ini dilakukan di *laminar air flow*.

Perkecambahan biji sintetis

Setelah mengalami masa simpan selama 2 minggu, biji sintetis kering direhidrasi dengan cara merendam kapsul biji sintetis pada air hangat (50°C) hingga volumenya kembali ke volume sebelum pengeringan. Biji sintetis kemudian disimpan kembali dalam botol (*in vitro*) untuk diamati kemampuan perkecambahannya.

Pengamatan perkecambahan dan pertumbuhan

Pengamatan dilakukan terhadap parameter fisik dan pertumbuhan *plb* *G. scriptum* yang meliputi perkecambahan, pertumbuhan dan anatomi *plb*. Data perkecambahan meliputi persentase perkecambahan, kemunculan tunas dan akar, dan jumlah tunas yang terbentuk. Data pertumbuhan direpresentasikan oleh tinggi tunas.

Pengamatan anatomi *plb*

Pengamatan anatomi *plb* dilakukan dengan membuat preparat sayatan mikro paraffin kemudian diamati di bawah mikroskop. *Plb* difiksasi dengan larutan FAA (alkohol 70%: 90 bagian, asam asetat glacial: 5 bagian, formalin: 5 bagian), didehidrasi dengan alkohol bertingkat (20%, 40%, 60%, 70%, 80%, 95%, 100%), kemudian dilakukan *clearing* menggunakan xilol, dan diinfiltrasi serta dipadatkan pada parafin. Selanjutnya dilakukan pemotongan dengan ketebalan 10 μM menggunakan mikrotom, dan diwarnai dengan safranin 1 dalam alkohol 70%. Pengamatan dan dokumentasi dilakukan menggunakan mikroskop yang dilengkapi kamera digital (Nikon).

Analisis data

Data kualitatif berupa sediaan anatomi dianalisis secara deskriptif. Data kuantitatif berupa kemunculan tunas dan tinggi tunas dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA), jika ada perbedaan nyata dilanjutkan dengan DMRT taraf 5%.



Gambar 1. Biji sintetis anggrek *G. scriptum*

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sifat fisik biji sintetis

Biji sintetis pada penelitian kali ini adalah suatu bulatan-bulatan *hydrogel* kalsium alginat yang dibentuk menyerupai biji yang di dalamnya ditanam *plb* hasil kultur *in vitro* anggrek *G. scriptum* (Gambar 1).

Pada penelitian ini digunakan konsentrasi natrium alginat 3% dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mM karena pada konsentrasi tersebut akan menghasilkan struktur biji yang terbaik. Hal ini sesuai dengan yang dijelaskan oleh Ballester *et al.* (1997) bahwa konsentrasi natrium alginat 3% merupakan konsentrasi optimum yang digunakan dalam pembentukan kapsul untuk eksplan. Menurut Saiprasad dan Polisetty (2003), konsentrasi natrium alginat 3% dan $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mM adalah konsentrasi terbaik untuk pembentukan enkapsulasi *plbs* *Dendrobium* 'Sonia'. Sementara menurut Larkin *et al.* (1988), konsentrasi natrium yang lebih rendah (2%) akan menghasilkan tekstur biji yang terlalu lunak, sulit ditangani sehingga akan mempersulit proses penanaman, sedangkan jika konsentrasi alginat tinggi (6-8%) dapat menyebabkan biji terlalu keras sehingga dapat menghambat proses perkecambahan.

Biji yang telah dikering-anginkan selama 5 jam mengalami susut kadar air kurang lebih sebanyak 45%. Selain penyusutan bobot, setelah penyimpanan kering juga terjadi perbedaan sifat fisik kapsul hidrogel kalsium alginat yang disajikan pada Tabel 1. Sebelum dikeringkan, biji sintetis tampak segar, berwarna bening, berbentuk bulat dengan *plb* berwarna hijau segar di dalamnya. Setelah dikeringkan, kapsul hidrogel kalsium alginat mengalami perubahan yaitu tampak lebih pucat, terdapat kerutan di bagian luar kapsul, dengan *plb* yang masih berwarna hijau. Biji sintetis setelah direhidrasi

tampak lebih segar, warna bening mengkilap dengan ukuran yang lebih besar atau menggebug, serta *plb* yang berwarna hijau segar.

Perubahan sifat fisik kapsul hidrogel setelah penyimpanan kering terjadi karena pengaruh perbedaan ketersediaan air di dalam biji sintetis ataupun di lingkungan luar kapsul. Biji sintetis sebelum dikeringkan tampak segar karena masih memiliki kadar air yang banyak pada selubung kapsulnya. Pada kapsul biji sintetis yang telah dikeringkan selama 2 minggu tampak adanya kerutan yang dimungkinkan terjadi karena keluarnya air dari kapsul pada keadaan lingkungan yang miskin air. Keluarnya air dari dalam biji sintetis menyebabkan perubahan pada sifat biji dengan munculnya kerutan dan warna menjadi pucat kering meski *plb* masih tampak hijau. Sementara itu, keadaan biji sintetis yang berubah setelah mengalami rehidrasi terjadi karena proses imbibisi yang cepat dari kondisi minim air menuju ketersediaan air yang memadai. Proses masuknya air ke dalam biji sintetis ditandai dengan pengembangan pada kapsul hidrogel kalsium alginat berupa warna mengkilap pada biji sintetisnya.

Perkecambahan biji sintetis selama penyimpanan

Biji sintetis selama penyimpanan diharapkan tidak mengalami perkecambahan. Perkecambahan yang dimaksudkan dalam penelitian ini adalah kemampuan *plb* untuk beregenerasi menembus kapsul hidrogel membentuk tunas atau akar. Pada penelitian ini perkecambahan

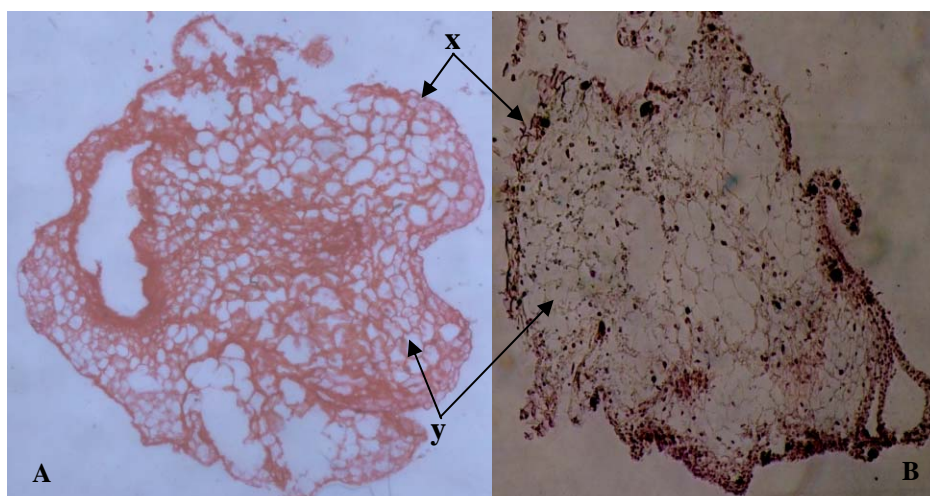
dilakukan untuk mengetahui keterkaitan antara penyimpanan kering dengan penambahan variasi konsentrasi ABA terhadap kemampuan perkecambahan biji sintetis. Proses tersebut akan menyebabkan kapsul hidrogel pada biji sintetis kehilangan air sehingga kebutuhan penyerapan air oleh *plb* menjadi terhambat.

Pengamatan anatomi

Pengamatan anatomi yang dilakukan terhadap *plb* biji sintetis sebelum dan sesudah pengeringan menunjukkan adanya perbedaan. Berdasarkan Gambar 2 tampak bagian tepi terdapat bagian sel yang tersusun rapat, pipih, membungkus bagian dalam sel dan tersusun memanjang, yaitu epidermis; sementara bagian tengah adalah parenkim. Pada kedua gambar tersebut tampak bahwa *plb* yang telah disimpan kering selama 2 minggu sel-selnya tampak mengkerut pada bagian tepinya. Hal itu kemungkinan karena kekurangan air pada saat proses penyimpanan kering.

Tabel 1. Sifat fisik kapsul hidrogel kalsium alginat sebelum dan setelah pengeringan, dan setelah rehidrasi

Parameter	Sebelum pengeringan	Setelah pengeringan	Rehidrasi
Kesegaran	Segar	Pucat kering	Segar
Warna	Putih bening	Putih pucat	Bening mengkilap
Bentuk	Bulat	Mengkerut	Bulat menggebug



Gambar 2. Penampang membujur *plb* anggrek *G. scriptum* sebelum (A) dan setelah (B) dikeringkan; x: epidermis dan y: parenkim

Pengaruh pengeringan terhadap perkecambahan selama penyimpanan

Pembuatan biji sintetis pada kondisi tanpa pengeringan menyebabkan biji sintetis tersebut sudah menunjukkan aktivitas pertumbuhan dan perkembangan pada usia penyimpanan satu minggu. Pertumbuhan dan perkembangan tersebut ditandai dengan munculnya tonjolan pada bagian *plb* yang ada di dalam kapsul hidrogel namun belum bisa menembus kapsul hidrogel. Aktivitas pertumbuhan dan perkembangan pada *plb* biji sintetis terus berlanjut hingga usia dua minggu, menghasilkan perkecambahan seperti pada Gambar 3.A,B.

Berdasarkan Gambar 3.A,B, biji sintetis tanpa pengeringan tampak tumbuh dengan baik dalam umur 2 minggu setelah penanaman pada media kapas basah dan sudah memiliki daun yang jelas. Pada kondisi normal dengan kondisi ketersediaan air dan nutrisi yang mencukupi, biji sintetis akan dapat langsung berkecambah dan berkembang menjadi individu baru dalam waktu yang cepat. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Kusumawati (2013), menyebutkan bahwa biji sintetis mengalami persentase perkecambahan sebesar 100% pada usia dua minggu setelah pengkapsulan. Pada kondisi lingkungan yang baik, pembuatan matriks enkapsulasi berpotensi sebagai reservoir nutrisi yang dapat membantu kelangsungan hidup dan mempercepat pertumbuhan (Redenbaugh *et al.* 1985).

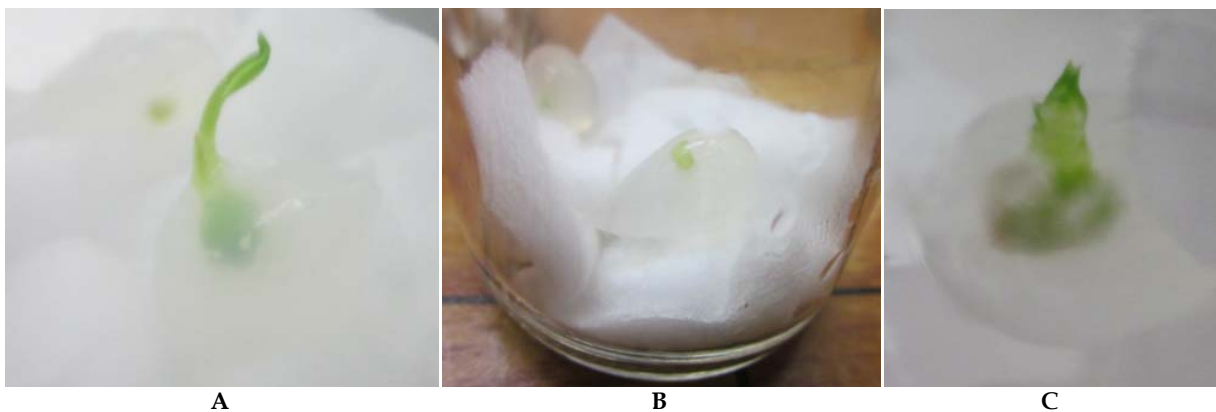
Sebaliknya, biji sintetis yang telah dikeringkan sebelumnya tidak menunjukkan adanya aktivitas pertumbuhan dan perkembangan yang ditandai dengan tidak adanya

perubahan pada bentuk atau ukuran *plb* yang ada di dalam biji sintetis tersebut. Penyimpanan kering akan mengakibatkan biji kehilangan air dalam jumlah banyak karena tidak ada asupan air dari lingkungan yang dapat diserap oleh biji sintetis untuk melakukan aktivitas pertumbuhan atau perkembangan. Keadaan ini menjadi satu keuntungan, karena proses perkecambahan yang tertunda akan dapat memperpanjang masa simpan biji sintetis. Keadaan tersebut juga menimbulkan satu kekurangan, yaitu biji sintetis yang disimpan dalam jangka waktu lama dengan keadaan air yang tidak mencukupi akan mengalami kerusakan pada viabilitas *plb* yang ada di dalamnya.

Biji sintetis pasca rehidrasi

Biji sintetis yang telah mengalami masa simpan kering dihidrasi untuk mengetahui viabilitas *plb* setelah memperoleh cekaman kekeringan selama periode tersebut. Biji sintetis yang disimpan dalam waktu 2 minggu pasca rehidrasi menunjukkan kemampuan melakukan perkecambahan ditandai dengan munculnya tunas yang menembus kapsul hidrogel.

Berdasarkan Gambar 3.C, biji sintetis yang telah disimpan selama 2 minggu pasca rehidrasi menunjukkan aktivitas perkecambahan ditandai dengan munculnya tonjolan yang menembus kapsul hidrogel. Menurut Machii (1992), perkecambahan pada biji sintetis adalah kemampuan *plb* untuk beregenerasi membentuk tunas atau akar dan menembus matriks enkapsulasi.



Gambar 3. Perkecambahan biji sintetis saat penyimpanan kering. A. tanpa pengeringan; B. dengan pengeringan; C. Biji sintetis setelah rehidrasi

Perbedaan pertumbuhan pada biji sintetis tanpa pengeringan, dengan pengeringan, dan setelah mengalami rehidrasi disebabkan karena faktor ketersediaan air. Biji sintetis tanpa pengeringan menunjukkan pertumbuhan dalam waktu cepat karena proses penyerapan air untuk kegiatan metabolisme berjalan dengan lancar dengan ketersediaan air yang cukup.

Respons pertumbuhan dan perkecambahan biji sintetis *plb* anggrek *G. scriptum* dengan adanya pemberian variasi konsentrasi ABA terjadi dalam waktu yang bervariasi. Hal itu dapat dilihat pada Gambar 4 untuk waktu perkecambahan biji sintetis dalam masing-masing perlakuan.

Berdasarkan Gambar 4 dapat diketahui bahwa pada minggu ke-2 pasca rehidrasi hampir semua biji sintetis dengan variasi pemberian ABA yaitu A1, A2, dan A3 sudah berkecambah kecuali A4. Setelah dilakukan pengamatan selama 8 minggu terjadi variasi persentase perkecambahan untuk masing-masing perlakuan. A1, A2, dan A3 mengalami persentase sebesar 100% sementara pada A3 dan A4 hanya 60%. Hal ini kemungkinan terjadi karena perbedaan kemampuan masing-masing biji sintetis untuk menembus kapsul terkait konsentrasi ABA yang diberikan. Biji sintetis yang berkecambah setelah rehidrasi adalah biji sintetis dengan penambahan ABA konsentrasi 5 mg/L.

Pemberian ABA yang diharapkan menjadi alat pertahanan biji sintetis pada masa pengeringan untuk mempertahankan keadaan biji agar tidak rusak menunjukkan hasil yang baik pada akhir pengamatan. Hal itu ditunjukkan oleh keadaan *plb* di dalam kapsul hidrogel pada akhir pengamatan yang masih tampak segar dan hijau bahkan tampak mengalami pertumbuhan berupa munculnya *plb* baru meski tidak berkecambah menembus kapsul (Gambar 5).

Berdasarkan Gambar 5, biji sintetis dengan penambahan ABA konsentrasi 15 mg/L *plb* anggrek tetap dapat mengalami perkembangan berupa munculnya struktur baru pada *plb*. Hal itu menunjukkan bahwa ABA berhasil dalam mempertahankan viabilitas *plb* setelah penyimpanan kering, meskipun pemberian ABA konsentrasi tinggi dapat menghambat perkecambahan tetapi tidak sampai mematikan sel. Menurut Salisbury dan Ross (1992), ABA berpengaruh dalam menghambat sintesis protein dan mengaktifkan serta menonaktifkan gen tertentu secara khas (efek transkripsi). Akibatnya

secara tidak langsung ABA dapat menghambat perkecambahan dan pertumbuhan tunas. Hal itulah yang kemungkinan menyebabkan persentase perkecambahan biji sintetis dengan penambahan ABA tinggi pada A3 dan A4 tidak mencapai 100%.

Jumlah tunas yang muncul

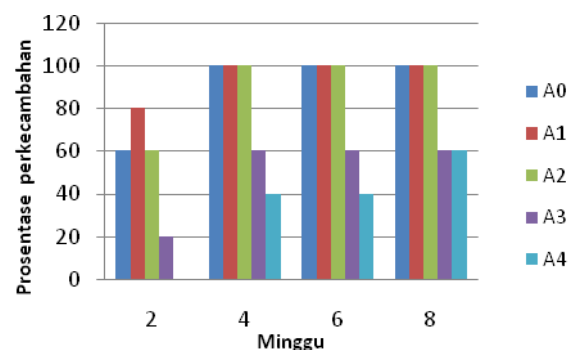
Pada penelitian ini perkecambahan biji sintetis ditandai dengan adanya perkembangan pada *plb* di dalam kapsul hidrogel, yaitu tumbuhnya satu atau dua tunas. Kemunculan tunas pada biji sintetis yang telah diamati selama 8 minggu ditunjukkan pada Gambar 6.

Berdasarkan pengamatan selama 8 minggu jumlah tunas yang terbentuk pada pemberian ABA untuk masing-masing perlakuan adalah sama. Hanya ada satu tunas pada masing-masing biji sintetis *plb* anggrek *G. scriptum* yang terbentuk. Penambahan konsentrasi ABA yang semakin meningkat tidak memberikan pengaruh terhadap kemunculan tunas pada biji sintetis *plb* anggrek *G. scriptum*. Rata-rata jumlah tunas yang muncul disajikan dalam Tabel 2.

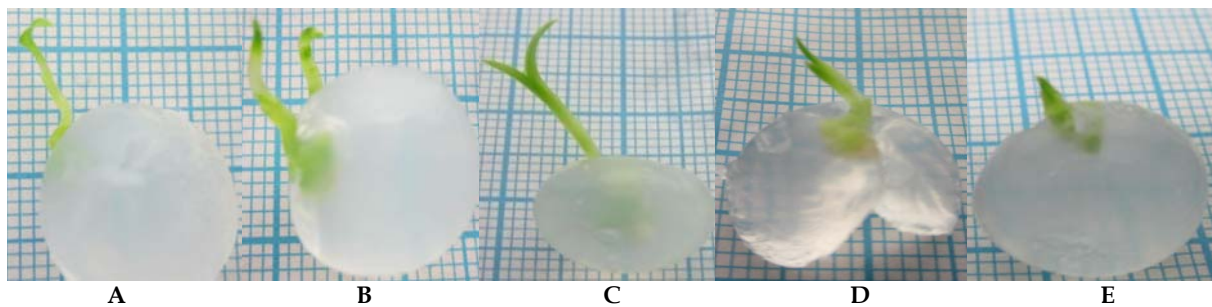
Tabel 2. Rata-rata jumlah tunas biji sintetis *G. scriptum* yang terbentuk pada minggu ke-8

Perbedaan konsentrasi ABA	Rata-rata jumlah tunas minggu ke-8 (mm ± SD)
0mg/L	1,2 ± 0,4 ^a
5mg/L	1,0 ± 0,0 ^a
10mg/L	1,0 ± 0,0 ^a
15mg/L	1,0 ± 0,0 ^a
20mg/L	1,0 ± 0,0 ^a

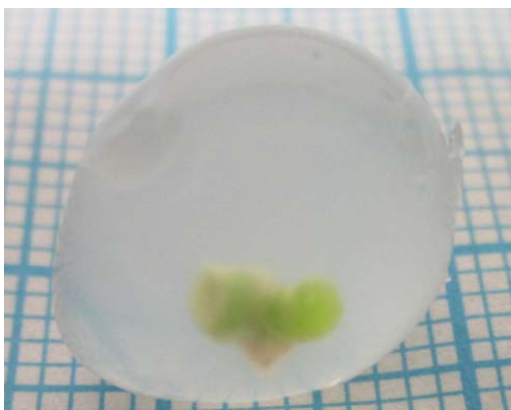
Keterangan: Angka diikuti huruf sama pada kolom tidak berbeda nyata pada DMRT taraf 5%



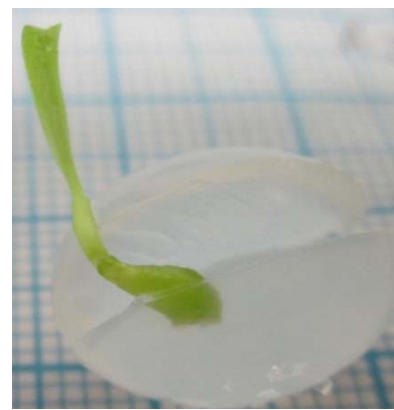
Gambar 4. Waktu perkecambahan biji sintetis dengan variasi ABA setelah penyimpanan kering. Keterangan: A0: tanpa penambahan ABA, A1: konsentrasi ABA 5mg/L, A2: konsentrasi ABA 10mg/L, A3: konsentrasi ABA 15mg/L, A4: konsentrasi ABA 20mg/L



Gambar 6. Jumlah tunas biji sintesis anggrek *G. scriptum* pada minggu ke-8: A. Tanpa penambahan konsentrasi ABA, B. Konsentrasi ABA 5mg/L, C. Konsentrasi ABA 10mg/L, D. Konsentrasi ABA 15mg/L, E. Konsentrasi ABA 20mg/L



Gambar 5. Biji sintesis dengan perkembangan *plb* baru pada akhir pengamatan



Gambar 7. Panjang tunas optimal pada pengamatan minggu ke-8

Tabel 3. Rata-rata panjang tunas biji sintesis *G. scriptum* yang terbentuk pada minggu ke-8. Keterangan: Angka diikuti huruf sama pada kolom berbeda nyata pada DMRT taraf 5%.

Perbedaan konsentrasi ABA	Rata-rata panjang tunas minggu ke-8 (mm ± SD)
0mg/L	10,8 ± 2,3 ^b
5mg/L	12,0 ± 7,6 ^b
10mg/L	9,2 ± 7,8 ^{ab}
15mg/L	3,2 ± 1,8 ^a
20mg/L	2,8 ± 1,1 ^a

Tabel 1 menunjukkan bahwa nilai signifikansi untuk banyak tunas yang muncul adalah 0,431. Ini menunjukkan bahwa nilai signifikansi > 0,05 tidak beda nyata yang artinya pemberian variasi konsentrasi ABA pada biji sintesis tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan jumlah tunas yang muncul pada setiap perlakuan. Dari Tabel 2 diketahui bahwa

biji sintesis tanpa penambahan ABA memiliki pertumbuhan jumlah tunas yang paling banyak yaitu 1,2 mm daripada keempat perlakuan lain yang ditambahkan konsentrasi ABA.

Pertumbuhan tunas

Pengamatan terhadap tinggi tunas dilakukan pada minggu ke-2 setelah penanaman hingga minggu ke-8. Pertumbuhan tunas untuk masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 6. Tampak pada gambar tersebut tunas yang muncul berwarna kehijau-hijauan dengan panjang yang bervariasi pada masing-masing perlakuan yang diberikan. Pemberian ABA konsentrasi rendah pada biji sintesis menghasilkan pertumbuhan tunas yang lebih panjang dibandingkan dengan pemberian ABA pada konsentrasi tinggi. Dari Gambar 7 tampak pula bahwa tunas optimal ditunjukkan oleh A1 dan A2 dengan konsentrasi pemberian ABA 10 mg/L.

Berdasarkan hasil analisis varian dan DMRT menunjukkan bahwa konsentrasi ABA yang diberikan berpengaruh nyata terhadap pertumbuhan panjang tunas. Hasil pengamatan panjang tunas yang terbentuk disajikan pada Tabel 3. Berdasarkan data pada Tabel 3, rata-rata pertumbuhan tunas paling optimal adalah pada konsentrasi pemberian ABA 5 mg/L yaitu sebesar 12,0 mm. Sementara pada pemberian ABA konsentrasi tinggi menyebabkan pertumbuhan tunas terhambat dan menghasilkan tunas dengan rata-rata paling sedikit, yaitu 2,8 mm. Akan tetapi pada biji sintetis yang tidak diberi penambahan ABA menunjukkan rata-rata tinggi tunas yang lebih baik dibandingkan dengan biji sintetis yang diberi ABA dalam konsentrasi tinggi. Hal ini disebabkan karena pada konsentrasi tinggi ABA akan menunjukkan fungsinya sebagai hormon penghambat bagi pertumbuhan tunas biji sintetis. Menurut Lyold dan Jackson (1986), pemberian ABA pada konsentrasi 5-10 mg/L akan meningkatkan pertumbuhan kalus pada tanaman *Cassava* sementara konsentrasi yang tinggi 20 mg/L dapat menyebabkan kematian pada kalusnya.

Pada Tabel 3 nilai signifikansi untuk panjang tunas yang muncul adalah 0,022. Ini menunjukkan bahwa nilai signifikansi < 0,05 yang artinya pemberian variasi konsentrasi ABA berpengaruh terhadap pertumbuhan panjang tunas. Menurut Wattimena (1988), pemberian zat penghambat tumbuh dapat menyebabkan pemendekan batang diikuti ketebalan pada batang.

Dalam penelitian ini dapat disimpulkan bahwa (i) Proses penyimpanan kering mampu menghambat pertumbuhan dan perkembangan *plb* biji sintetis *G. scriptum* selama 2 minggu. (ii) Konsentrasi ABA paling optimal pada kapsul hidrogel kalsium alginat untuk mempertahankan viabilitas *plb* pada biji sintetis *G. scriptum* dan dapat tumbuh dengan baik adalah 5 mg/L.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar ML, Espadas FL, Coello J. 2000. The role of abscisic acid in controlling leaf water loss, survival and growth of micropropagated *Tagetes erecta* plant when transferred directly to the field. *J Exp Bot* 51: 1861-1866.
- Arditti J, Ernst R. 1993. *Micropropagation of Orchid*. John Wiley and Sons, New York.
- Aridha SD, Irfan S, Gustian. 2009. Upaya penyimpanan plasma nutfah planlet pisang buai (*Musa paradisiaca* L.) secara *in vitro* pada berbagai konsentrasi asam absisat dan paclobutrazol. *Jerami* 2 (3): 126-133.
- Ballester A, Janeiro LV, Vieitez AM. 1997. Cold storage of shoot cultures and alginate encapsulation of shoot tips of *Camellia japonica* L. and *Camellia reticulata* Lindley. *Scientia Horticulturae* 71: 67-78.
- Benzing H. 1981. Why is Orchidaceae so large, its seeds so small, and its seedling mycotrophic? *Selbyana* 5 (3/4): 241-242.
- Danso KE, Llyold BVF. 2008. The effect of abscisic acid and sucrose on post-thaw embryogenic competence and subsequent plant recovery from embryogenic calli of cassava. *Amer-Eur J Agric Environ Sci* 3 (4): 663-671.
- Khoddamzadeh AA, Sinniah UR, Lynch P, Kadir MA, Kadzimin SB, Mahmood M. 2011. Cryopreservation of protocorm-like bodies (PLBs) of *Phalaenopsis bellina* (Rchb.f.) Christenson by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107: 471-481.
- Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Bot Gaz* 73 (1): 1-25.
- Larkin PJ, Davies PA, Tanner GJ. 1998. Nurse culture of low number of *Medicago* and *Nicotiana* protoplasts using calcium alginate beads. *Plant Sci* 58: 203-210.
- Lestari EG, Harran S, Mariska I, Megia R. 2000. Penyimpanan tunas nilam hasil variasi somaklonal dengan enkapsulasi. *Prosiding Seminar hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi III*. Cibinong, 7-9 Maret 2000.
- Lestari EG, Purnamaningsih R. 2005. Penyimpanan *in vitro* tanaman obat daun dewa melalui pertumbuhan minimal. *Jurnal AgroBiogen* 2: 68-72.
- Lloyd FB, Jackson M. 1986. *Plant Genetic Resources An Introduction to Their Conservation and Use*. Univ. Bermingham & Edward Arnold, London.
- Machii H. 1992. *In vitro* growth of encapsulated adventitious buds in mulberry (*Morus alba*). *J Breed* 42: 553-559.
- Redenbaugh K, Brian DP, James WN. 1985. Somatic seeds: encapsulation of asexual plant embryos. *Nature Biotechnol* 4: 797-801.
- Saiprasad GVS, Polisetty R. 2003. Propagation of three orchid genera using encapsulated protocorm-like bodies. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 8: 42-47.
- Salisbury FB, Ross CW. 1992. *Plant Physiology*. 4th ed. Wadsworth Publishing Co., Belmont, CA.
- Wattimena GA. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. PAU IPB, Bogor.



Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik

NATALIA WIDYA LESTARI, AGUNG BUDIHARJO, ARTINI PANGASTUTI ♥

♥Alamatkorespondensi:

Jurusan Biologi, Fakultas
Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam, Universitas
Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a
Surakarta 57126, Jawa Tengah,
Indonesia. Tel./Fax.: +92-271-
663375. ♥email: artini_p@staff.uns.ac.id

Manuskrip diterima: 24 Januari 2016.
Revisi disetujui: 4 Maret 2016.

Lestari NW, Budiharjo A, Pangastuti A. 2016. Aerobic heterotrophic bacteria from the digestive tract of eel (*Anguilla bicolor bicolor*) and its potential as probiotics. *Bioteknologi* 13: 9-17. *Anguilla bicolor bicolor*, an eel species found in the waters of Indonesia, is become a potential export commodity for the country. Currently this species began to be cultured, by taking the larvae from the wild and reared in ponds. In aquaculture, the disease caused by bacteria are the main problems that limit production in the culture of eel. Restrictions on the use of anti-microbial substances causing a more environmentally friendly approach is needed to reduce disease outbreak in aquaculture. It is known that bacterial communities associated with animals have an important role for the survival of its modulation of host's microbiota through feed supplements such as probiotics and prebiotics can increase the growth and survival of fish. This research aimed to determine the type of bacteria that can be isolated and characterized from the gastrointestinal tract of *A. bicolor bicolor* and their potential as a probiotic candidates. Bacteria from the gastrointestinal tract of the fish were isolated and characterized. Observations made include the amount of bacteria in the gastrointestinal tract, the morphological characters of each isolate, and the identification of each isolate. The ability of hydrolysis (hemolytic and proteolytic activity) and antagonistic against pathogens in fish (*Aeromonas hydrophila*) were also measured. From the gastrointestinal tract of *A. bicolor bicolor*, 11 isolates were obtained, which were fell into 9 species according to their characters. Two candidates of bacteria which were expected to be used as probiotics for eel were *Citrobacter freundii* and *Bacillus subtilis*.

Keywords: *Anguilla bicolor bicolor*, probiotic, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*

Lestari NW, Budiharjo A, Pangastuti A. 2016. Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (*Anguilla bicolor bicolor*) dan potensinya sebagai probiotik. *Bioteknologi* 13: 9-17. *Anguilla bicolor bicolor*, salah satu spesies ikan sidat yang ditemukan di perairan Indonesia, adalah komoditas ekspor potensial bagi Negara ini. Saat ini spesies tersebut mulai dikulturkan, dengan mengambil benih dari alam dan dibesarkan dalam kolam-kolam pemeliharaan. Dalam akuakultur, penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan masalah utama yang membatasi produksi di pemeliharaan ikan sidat. Pembatasan penggunaan bahan anti mikroba membuat pendekatan yang lebih ramah lingkungan perlu dilakukan untuk mengurangi berjangkitnya penyakit di kolam pemeliharaan. Telah diketahui bahwa komunitas bakteri yang berasosiasi dengan hewan memiliki peran penting bagi kelangsungan hidup inangnya. Pemberian suplemen pakan seperti probiotik dan prebiotik untuk memodulasi komunitas mikroba yang berasosiasi dengan ikan dapat meningkatkan pertumbuhan dan kelangsungan hidup ikan. Penelitian bertujuan mengetahui jenis bakteri yang dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dan potensi bakteri sebagai kandidat probiotik. Saluran pencernaan yakni usus dan lambung diisolasi dan dikarakterisasi jenis bakteri yang didapat. Pengamatan yang dilakukan meliputi jumlah bakteri pada media kultur, karakter morfologi masing-masing isolat, dan identifikasi dari masing-masing isolat. Dari saluran pencernaan ikan sidat *A. bicolor bicolor* diperoleh 11 isolat bakteri yang berdasarkan hasil identifikasi terdiri dari 9 spesies. Dilakukan uji kemampuan hidrolitik (hemolitik dan proteolitik) dan antagonistik terhadap bakteri patogen pada ikan (*Aeromonas hydrophila*) sehingga diperoleh 2 kandidat bakteri yang diperkirakan dapat digunakan sebagai probiotik ikan sidat, yaitu *Citrobacter freundii* dan *Bacillus subtilis*.

Kata kunci: *Anguilla bicolor bicolor*, probiotik, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis*

PENDAHULUAN

Anguilla bicolor bicolor merupakan salah satu spesies ikan sidat yang hidup di perairan Indonesia. Permintaan akan komoditas ikan sidat ini semakin meningkat terutama dari pasar Jepang. Dalam rangka peningkatan produksi untuk memenuhi permintaan ekspor, ikan sidat mulai dibudidayakan, walaupun masih terbatas untuk pembesaran saja sampai mencapai ukuran yang siap dikonsumsi. Permintaan pasar yang tinggi memberikan peluang yang sangat terbuka untuk membudidayakan ikan ini.

Salah satu masalah yang dapat menghambat produksi ikan sidat adalah penurunan produksi akibat penyakit yang berkembang di kolam-kolam pemeliharaan. Dalam akuakultur, penggunaan pakan yang berlebih serta padat tebar yang tinggi menyebabkan lingkungan air pemeliharaan menjadi medium yang baik untuk pertumbuhan bakteri heterotrofik atau oportunistik (Chinabut dan Puttinaowarat 2005). Sebagian besar penyakit pada ikan disebabkan oleh bakteri oportunistik. Penggunaan senyawa kimia seperti desinfektan dan antibiotik tidak terlalu efektif untuk pencegahan maupun pengobatan penyakit ikan (Olafsen 2001). Selain itu, adanya residu antibiotik menyebabkan produk akuakultur tidak memenuhi standar beberapa negara yang menjadi tujuan ekspor. Penggunaan senyawa antimikroba secara berlebihan juga menseleksi strain resisten kemudian bakteri dapat mempertukarkan gen penyandi resistensinya, bahkan antarbakteri yang kekerabatannya cukup jauh. Dari reservoir lingkungan perairan, gen penyandi resistensi dapat menyebar kepada patogen manusia dan kemudian mencapai manusia (Heuer et al. 2009).

Komunitas bakteri (mikrobiota) pada hewan akuatik diduga memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan dan kemampuan bertahan hidup inang. Mikrobiota dapat mempengaruhi sejumlah besar ekspresi gen pada inangnya, terutama gen yang berperan dalam imunitas dan nutrisi (Nayak 2010). Bakteri dapat membantu nutrisi inang dengan produksi enzim atau senyawa esensial (Verschuere et al. 2000) dan dapat mencegah bakteri patogen oportunistik untuk berproliferasi dan mengkolonisasi tubuh inang, terutama pada tahap larva di mana sistem imunitas belum berkembang sempurna (Hansen dan Olafsen 1999). Berbeda dengan hewan terestrial, hewan akuatik berbagi ekosistem yang

sama dengan komunitas bakteri yang berasosiasi dengannya, sehingga komunitas bakteri selalu berubah secara dinamis mengikuti komunitas bakteri di lingkungannya (Cahill 1990). Hal ini memberikan peluang untuk melakukan introduksi bakteri yang menguntungkan ke dalam komunitas bakteri yang telah terbentuk pada inang. Dengan demikian, modulasi komunitas mikroorganisme yang berasosiasi dengan ikan merupakan salah satu cara untuk mencegah penyakit dan meningkatkan produksi secara lebih aman. Yang perlu diperhatikan di sini adalah bakteri dominan pada usus ikan berbeda dengan yang diamati pada mamalia. Bakteri-bakteri ini bersifat oportunistik dan keberadaannya bersifat transitori tergantung kondisi lingkungan. Asosiasi antara mikroba dan inangnya tidak bertahan sepanjang hidupnya. Pada ikan, terdapat variabilitas bakteri intestinal yang dominan antarpeternakan atau *hatchery*. Hal ini mengindikasikan perlunya untuk mengembangkan probiotik dan prebiotik di tiap lokasi berbeda secara unik (Gatesoupe 2005).

Salah satu alternatif pendekatan yang telah sukses dilakukan pada akuakultur adalah dengan mengintroduksi kultur hidup bakteri yang telah diketahui memiliki efek menguntungkan bagi pertumbuhan hewan akuatik, yang dikenal dengan probiotik. Sementara itu, modulasi komunitas bakteri yang berasosiasi dengan ikan juga dapat dilakukan dengan memberikan substrat yang dapat menguntungkan pertumbuhan bakteri-bakteri baik dalam saluran pencernaan, yang dikenal sebagai prebiotik. Akan tetapi, perlakuan prebiotik membutuhkan keberadaan mikroba yang menguntungkan pada mikrobiota ikan. Beberapa penulis (Verschuere et al. 2000; Irianto dan Austin 2002; Burr dan Gaitlin 2005; Gatesoupe 2005; Vine et al. 2006; Yousefian 2009) mengulas perkembangan dalam penggunaan probiotik dan prebiotik untuk hewan kultur akuatik.

Sampai saat ini, penelitian tentang biologi *A. bicolor bicolor* belum banyak dilakukan. Informasi tentang komunitas mikroorganisme yang ada di saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* juga belum pernah dilaporkan sebelumnya. Untuk itu dilakukan penelitian ini, yang bertujuan mengetahui jenis dan karakteristik bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dan potensinya sebagai kandidat probiotik.

BAHAN DAN METODE

Sampling *A. bicolor bicolor*

Ikan sidat *A. bicolor bicolor* dikoleksi dari Karangpandan, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Dari ikan yang sehat diambil 10 ikan sebagai sampel. Masing-masing ikan diambil saluran pencernaannya meliputi lambung dan usus, kemudian disterilisasi dengan menggunakan formalin. Saluran pencernaan dicuci dengan garam fisiologis (0,85% NaCl) steril untuk menghilangkan bakteri yang tidak menempel pada saluran pencernaan, dikeringanginkan, dan selanjutnya diisolasi bakterinya.

Kultur dan penghitungan jumlah bakteri

Sampel saluran pencernaan ikan dihomogenisasi dalam 0,85% NaCl steril kemudian dibuat pengenceran berseri 10-1-10-6. Sebanyak 0,1 mL seri pengenceran 10-3-10-6 disebar pada medium TSA (Oxoid) dengan menggunakan metode cawan sebar dan dilakukan tiga kali sebagai ulangan. Hasil kultur kemudian diinkubasi di suhu 28°C selama 1x24 jam. Pengamatan koloni bakteri yang dilakukan berupa penghitungan jumlah koloni bakteri total tiap cawan dan jumlah masing-masing jenis bakteri yang berbeda menurut penampakan morfologi koloni bakteri. Penghitungan jumlah bakteri menggunakan metode TPC (*total plate count*) dimana cawan yang menghasilkan jumlah koloni 30-300 buah dipilih dan dihitung. Jumlah bakteri dinyatakan sebagai CFU (*colony forming unit*). Koloni dengan penampakan morfologi berbeda kemudian diambil dan dimurnikan pada media baru menggunakan metode cawan gores. Masing-masing isolat disimpan dalam media agar miring pada suhu 4°C dan dalam 15% gliserol pada -20°C untuk penyimpanan.

Identifikasi jenis bakteri

Isolat bakteri murni diidentifikasi berdasarkan karakter morfologi yang meliputi morfologi koloni, morfologi sel, dan uji pewarnaan gram. Pengamatan morfologi koloni dilihat dari bentuk, warna dan tepian koloni bakteri. Pengamatan morfologi sel meliputi bentuk sel dan pengaturan/susunan sel. Selanjutnya masing-masing isolat dikarakterisasi secara biokimia yang meliputi uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa), sulfur, indol, motilitas, dan sitrat.

Uji fermentasi karbohidrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri diinokulasikan ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi medium fermentasi glukosa, laktosa, manitol, maltosa, dan sukrosa, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji fermentasi karbohidrat positif, jika warna merah medium fermentasi karbohidrat berubah menjadi kuning, berarti bakteri tersebut memfermentasi gula dan menghasilkan asam. Apabila dalam tabung Durham terdapat gelembung, berarti fermentasi tersebut juga menghasilkan gas (CO₂).

Uji sulfur, indol, motilitas

Sebanyak satu ose isolat bakteri ditusukkan dalam medium uji SIM (sulfur, indol, motilitas) yang berupa agar semi solid, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Jika pada bagian bawah medium berwarna hitam, maka dalam proses fermentasi tersebut dihasilkan H₂S. Untuk uji motilitas positif ditandai adanya penyebaran koloni di sekitar tusukan. Selanjutnya medium ditetesi dengan pereaksi Kovac. Uji indol positif ditunjukkan dengan terbentuknya cincin merah di permukaan medium.

Uji sitrat

Sebanyak satu ose isolat bakteri digores zig-zag pada permukaan agar miring Simmons-citrate, lalu diinkubasikan dalam suhu kamar selama 18-24 jam. Uji sitrat positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium tersebut dari hijau menjadi biru.

Uji kemampuan proteolitik dan hemolitik

Karakteristik kemampuan hidrolitik dari isolat bakteri meliputi kemampuan proteolitik dan hemolitik. Medium yang digunakan dalam uji adalah *Blood Agar Plate* untuk kemampuan hemolitik dan TSA yang diperkaya dengan susu skim 1% untuk uji kemampuan proteolitik. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya zona bening (*clear zone*) pada medium yang telah berisi isolat bakteri.

Uji aktivitas antagonistik terhadap bakteri

Aeromonas hydrophila

Pengujian aktivitas antagonistik atau konfrontasi dengan bakteri patogen dilakukan dengan metode sumur agar, yang mengacu pada metode menurut Wolf dan Gibbons et al. (1996) dengan modifikasi suhu yang digunakan. Produksi antibakteri dilakukan dengan cara

menginokulasi isolat bakteri sebanyak 0,1 mL ke dalam 10 mL media TSB dan diinkubasi semalam pada suhu 28°C, kemudian disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Filtrat digunakan dalam konfrontasi dengan bakteri patogen uji untuk menentukan dihasilkan atau tidaknya antibakteri.

Bakteri patogen uji yang digunakan adalah bakteri patogen terhadap ikan, yaitu dari strain *A. hydrophila*. Bakteri patogen uji yang telah disegarkan diambil sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan ke dalam media NA dan dicampur hingga homogen. Setelah media yang berisi biakan bakteri patogen memadat diberi *paper disk* yang ditetesi dengan substrat antibakteri (filtrat) sebanyak 0,05 mL. Selanjutnya, cawan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Filtrat yang mengandung substansi antibakteri akan melakukan penghambatan terhadap bakteri patogen yang dibuktikan dengan adanya zona bening di sekitar sumur agar. Besarnya aktivitas antibakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekitar sumur agar.

Analisis data

Data yang telah diperoleh dianalisis secara deskriptif. Identifikasi jenis bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor* dilakukan berdasarkan karakter biokimia sesuai dengan tabel biokimia Soemarmo (2000). Untuk potensi isolat sebagai probiotik dinilai dari kemampuan hidrolitik (hemolitik dan proteolitik) dan uji antagonistik terhadap bakteri patogen pada ikan yakni *A. hydrophila*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari saluran pencernaan ikan Sidat *A. bicolor bicolor* diperoleh 11 isolat bakteri berdasarkan perbedaan morfologi koloni bakteri yang meliputi warna, tepian, dan bentuk koloni. Sebelas koloni bakteri yang berhasil diisolasi tersebut diberi kode TSA-a/9-2011, TSA-b/9-2011, TSA-c/9-2011, TSA-d/9-2011, TSA-e/9-2011, TSA-f/9-2011 (1), TSA-f/9-2011 (2), TSA-g/9-2011, TSA-h/9-2011, TSA-i/9-2011, dan TSA-j/9-2011. Tabel 1 menunjukkan karakter morfologi untuk setiap bakteri. Identifikasi masing-masing isolat tersebut dilakukan berdasarkan uji biokimia dimana hasilnya dapat dilihat dalam Tabel 2. Uji karakter biokimia di antaranya berupa uji fermentasi karbohidrat, uji Sulfur, uji motil, uji indol, uji sitrat.

Total jumlah bakteri yang diperoleh per saluran pencernaan ikan yakni sebesar 3×10^8

CFU. Beberapa peneliti melaporkan jumlah bakteri pada ikan yaitu berkisar antara 102- 106 CFU per cm² pada kulit, 103-105 per gram di dalam insang dan sampai 107 atau lebih per gram di dalam usus (Fardiaz et al. 1992). Komposisi jumlah masing-masing isolat dapat dilihat pada Gambar 1.

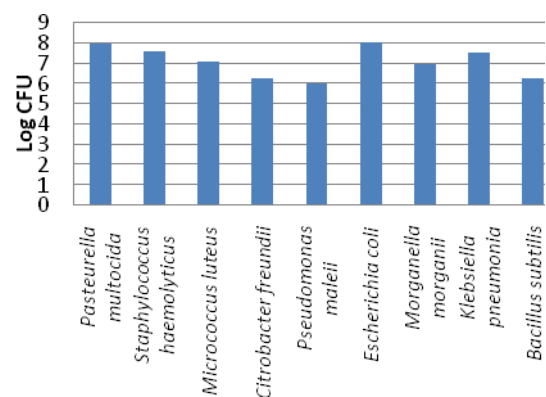
Dari hasil identifikasi, didapati bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan ikan sidat mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas maleii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Bacillus subtilis*. Terdapat 2 isolat yang teridentifikasi sebagai *E. coli* dan 2 isolat teridentifikasi sebagai *M. luteus*. Dari hasil perhitungan jumlah relatifnya, dapat diketahui bahwa jenis bakteri yang dominan adalah *E. coli*. Mikrobiota pada hewan akuatik dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor. Selain pengaruh spesies, air tempat budidaya dan faktor lingkungan abiotik yang berupa intensitas cahaya, pH dan kelembapan tempat pengambilan sampel, selain pengaruh pakan yang juga membawa mikroorganisme ke dalam saluran pencernaan. Pada hewan akuatik, bagian tubuh yang biasa dikolonisasi oleh bakteri adalah saluran pencernaan dan insang. Pada ikan *Rainbow Trout*, penggunaan *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) pada *cryosection* saluran pencernaan menunjukkan bahwa bakteri dominan berada pada lumen, bukan dinding saluran pencernaan (Spanggaard et al. 2000). Sementara itu, kulit ikan merupakan bagian tubuh yang jarang dikolonisasi oleh bakteri, karena bagian ini selalu berhubungan dengan air. Akan tetapi, pernah dilaporkan adanya bakteri pada kulit ikan *Anguilla anguilla*, yang didominasi oleh *Pseudomonas* spp. (17,23%), *Acinetobacter baumannii* (15,51%), *Stenotrophomonas maltophilia* (12,05%), dan bakteri Gram positif (18,93%) (Ugur et al. 2002). Menurut Austin (2002), bakteri yang umum berasosiasi dengan saluran pencernaan ikan air tawar adalah dari genus *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Alteromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Cytophaga/Flexibacter*, *Bacillus*, *Listeria*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, dan *Vibrio*. Studi metagenomik pada mukus ikan sidat Eropa (*A. anguilla*) menunjukkan bahwa mikroorganisme yang dominan adalah filum *gammaproteobacteria*, dan mikrobiota mukus ternyata sangat berbeda dari lingkungan akuatiknya (Carda-Dieiguez et

al. 2014). Genus yang muncul pada semua sampel *A. anguilla* pada studi tersebut adalah *Pseudomonas*. Berbagai literatur tersebut menunjukkan hasil yang tidak jauh berbeda dengan penelitian ini.

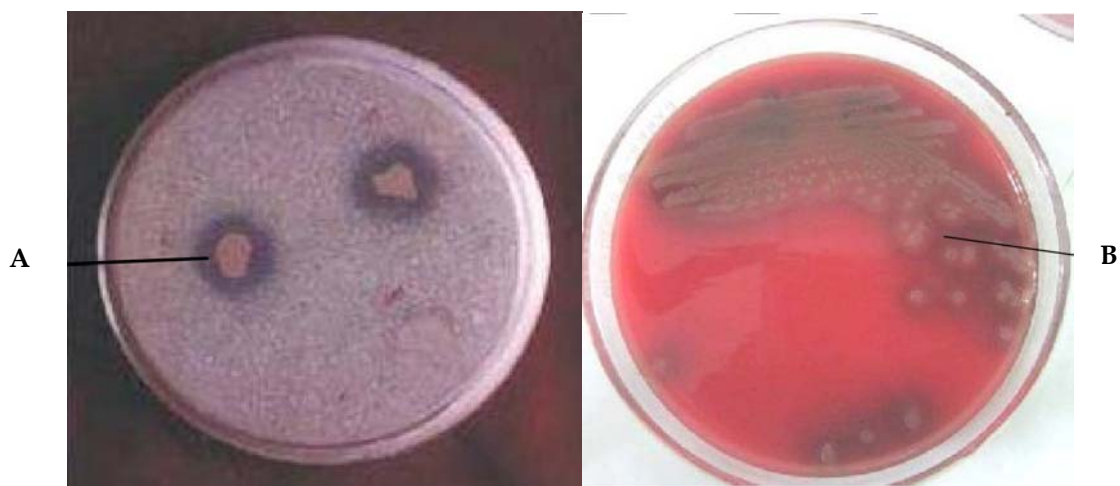
Hasil positif pada uji kemampuan hidrolisis ditandai dengan adanya *clear zone* (daerah bening) di sekitar daerah pertumbuhan bakteri (Gambar 2). Kemampuan hidrolisis yang diuji adalah kemampuan bakteri dalam menghidrolisis protein dan darah. Uji ini digunakan untuk mengetahui bagaimana peranan bakteri dalam saluran pencernaan ikan. Uji kemampuan hidrolisis protein dapat digunakan untuk melihat ada tidaknya kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim proteolitik yang mampu digunakan untuk mendegradasi protein. Sementara itu, uji hidrolisis darah digunakan untuk melihat adanya kemampuan bakteri dalam melisis sel darah. Kemampuan melisis sel darah ini digunakan untuk mengetahui potensi patogenisitas dari suatu bakteri. Sementara itu, degradasi protein dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut berpotensi membantu pencernaan pakan ikan sidat yang terutama berupa protein di saluran pencernaan ikan. Kemampuan hidrolisis isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *Anguilla bicolor-bicolor* disajikan dalam Tabel 3.

Dari 11 isolat yang didapatkan, 6 isolat menunjukkan kemampuan hidrolisis protein. Mikrobiota pada saluran pencernaan ikan dapat membantu pencernaan inangnnya dengan memproduksi enzim hidrolitik untuk mencerna pakan. Hal ini pernah dilaporkan pada ikan oscar, angelfish, dan southern flounder, aktivitas

enzimatik dari isolat bakteri anaerob sangat bervariasi, dan sebagian aktivitas enzimatik tersebut bukan bersifat endogenous bagi inangnnya (Ramirez dan Dixon 2003). Bakteri juga dapat membantu nutrisi inang baik secara langsung maupun tidak langsung dengan memproduksi senyawa esensial seperti poliamin, asam amino dan asam lemak esensial (Sugita et al. 1991; Verschuere et al. 2000). Jenis bakteri pada saluran pencernaan ikan sidat *A. bicolor bicolor* didominasi oleh bakteri proteolitik. Hal ini dapat disebabkan karena *A. bicolor bicolor* merupakan ikan karnivora, yang kandungan utama pakannya adalah protein. Aktivitas proteolitik yang dimiliki bakteri pada saluran pencernaan dapat bersifat menguntungkan karena membantu dalam mendegradasi protein, namun pada bakteri tertentu yang bersifat patogen, aktivitas proteolitik ini juga dapat merupakan faktor virulensi bakteri.



Gambar 1. Jumlah setiap jenis bakteri (Log CFU) dalam saluran pencernaan per ekor *A. bicolor bicolor*



Gambar 2. Daerah bening (*clear zone*) uji kemampuan hidrolisis protein (A) dan darah (B)

Tabel 1. Morfologi isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Koloni			Sel	
	Warna	Tepian	Bentuk	Gram	Susunan
TSA-a/9-2011	Putih keruh	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Diplococcus
TSA-b/9-2011	Putih kekuningan	Licin	Bulat	+	Coccus (anggur)
TSA-c/9-2011	Putih susu kekuningan	Licin	Bulat	+	Coccus (anggur)
TSA-d/9-2011	Bening	Tak beraturan	Bulat kecil	-	Batang
TSA-e/9-2011	Putih keruh	Tak beraturan (keriting)	Melebar	-	Batang
TSA-f/9-2011 (1)	Putih	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Batang
TSA-f/9-2011 (2)	Putih keruh	Tak beraturan	Bulat besar	-	Batang (coccobacili)
TSA-g/9-2011	Kuning	Licin	Bulat	+	Coccus (mikro)
TSA-i/9-2011	Bening	Licin	Bulat kecil-kecil	-	Batang pendek
TSA-j/9-2011	Putih	Tak beraturan	Bulat melebar	-	Batang
TSA-h/9-2011	Putih susu	Licin	Bulat	+	Batang

Tabel 2. Hasil uji biokimia isolat bakteri yang dapat diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Uji Biokimia									Nama bakteri berdasarkan kemiripan sifat biokimia
	G	L	Man	Mal	Suk	Sul	Ind	Mot	SC	
TSA-a/9-2011	+	-	+	-	+	-	+	-	-	<i>Pasteurella multocida</i>
TSA-b/9-2011	-	-	-	+	+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
TSA-c/9-2011	-	-	+	+	+	-	-	-	-	<i>Micrococcus luteus</i>
TSA-d/9-2011	+g	-	+	+	+	+	-	+	+	<i>Citrobacter freundii</i>
TSA-e/9-2011	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>Pseudomonas maleii</i>
TSA-f/9-2011 (1)	+g	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
TSA-f/9-2011 (2)	+g	-	-	+	-	-	+	+	-	<i>Morganella morganii</i>
TSA-g/9-2011	+	+	+	+	+	-	-	-	-	<i>Micrococcus luteus</i>
TSA-i/9-2011	+g	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Klebsiella pneumonia</i>
TSA-j/9-2011	+g	+	+	+	+	+	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
TSA-h/9-2011	+	-	+	+	+	-	-	+	-	<i>Bacillus subtilis</i>

Tabel 3. Kemampuan hidrolisis dan aktivitas antagonistik isolat bakteri yang diisolasi dari saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*

Isolat	Hidrolisis		Diameter zona bening (mm)
	Protein	Darah	
TSA-a/9-2011	+	+	-
TSA-b/9-2011	-	+	-
TSA-c/9-2011	-	-	-
TSA-d/9-2011	+	-	6
TSA-e/9-2011	+	+	3
TSA-f/9-2011 (1)	+	-	-
TSA-f/9-2011 (2)	+	+	8
TSA-g/9-2011	-	-	-
TSA-i/9-2011	+	-	-
TSA-j/9-2011	+	-	-
TSA-h/9-2011	-	-	11

Keterangan: +: dapat menghidrolisis substrat, -: tidak dapat menghidrolisis substrat. α : hemolisis tipe alfa, β : hemolisis tipe beta

Kemampuan hemolisis darah oleh bakteri hemolitik merupakan salah satu faktor virulensi ditunjukkan oleh 4 isolat bakteri asal saluran yang umum dimiliki oleh bakteri patogen. pencernaan *A. bicolor bicolor*. Kemampuan Keberadaan bakteri patogen pada saluran

pencernaan ikan dan atau media budi daya dengan populasi yang tinggi sangat merugikan pada usaha budi daya ikan. Hal ini terjadi karena bakteri patogen dapat menimbulkan penyakit dan bahkan kematian masal bagi organisme budi daya. Hal penting yang diperlukan mikrobiota saluran pencernaan adalah berada dalam keseimbangan, yaitu antara bakteri menguntungkan dan bakteri patogen, serta saling berinteraksi antar-spesies bakteri dalam saluran pencernaan, baik secara antagonistik maupun sinergistik. Interaksi yang terjadi sangat penting dalam mempertahankan keseimbangan mikrobiota saluran pencernaan.

Aktivitas antagonistik isolat bakteri yang didapatkan terhadap bakteri patogen pada ikan yakni *A. hydrophila* ditunjukkan pada Tabel 3. Besarnya daerah bening berbeda-beda berdasarkan tingkat daya hambat bakteri terhadap bakteri uji. Berdasarkan data dalam tabel 3, terdapat 4 isolat bakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* yakni isolat yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Citrobacter freundii* (6 mm), *Pseudomonas maleii* (3 mm), *Morganella morganii* (8 mm), dan *Bacillus subtilis* (11 mm). Keempat isolat tersebut kemungkinan menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain. Senyawa antibakteri yang dihasilkan mikrobiota dapat berupa asam laktat, peroksida, dan bakteriosin. Mikrobiota pada usus memiliki fungsi perlindungan yang penting untuk menekan bakteri patogen dan virus, dengan mekanisme kompetisi sisi penempelan (reseptor), peningkatan produksi lendir atau mukosa usus, dan kompetisi nutrisi (Salminen dan Wright 1993). Mikrobiota juga diketahui mempengaruhi innate immunity dari ikan inangnya (Gomez dan Balcazar 2008). Keberadaan komunitas bakteri yang seimbang komposisinya juga dapat mencegah bakteri patogen oportunistik untuk berproliferasi dan mengkolonisasi tubuh udang, dan ini merupakan mekanisme pertahanan tubuh yang penting pada tahap larva di mana sistem imunitas belum berkembang sempurna (Skjeremo et al. 1997).

Dengan adanya pembatasan penggunaan bahan-bahan antimikroba, dewasa ini modulasi komunitas bakteri yang berasosiasi dengan ikan merupakan solusi yang lebih ramah lingkungan untuk mengatasi masalah penyakit pada kultur ikan. Modulasi komunitas bakteri dapat dilakukan dengan mengintroduksi bakteri yang menguntungkan (probiotik). Bakteri probiotik merupakan bakteri yang aman dan relatif

menguntungkan yang diintroduksi ke inang. Pemilihan probiotik yang diisolasi dari saluran pencernaan ikan diharapkan akan lebih memudahkan probiotik beradaptasi dengan lingkungan saluran pencernaan ikan sehingga mampu hidup dan berkembang membantu proses pencernaan. Hasil penelitian baru-baru ini telah menunjukkan pengaruh mikrobiota pada survival larva ikan sidat (Sorensen et al. 2014). *Anguilla* merupakan ikan *catadromous* yang siklus hidupnya adalah bertelur di laut dan tumbuh besar di perairan tawar. Para peneliti sejauh ini dengan perlakuan hormonal telah mampu menghasilkan telur dan larva pada *A. anguilla*, tetapi tingkat penetasan dan survival larva sangat rendah. Diketahui bahwa pelekatan mikroorganisme pada permukaan telur selama waktu 24 jam inkubasi sangat mempengaruhi kemampuan survival larva selanjutnya, yang menunjukkan potensi untuk interferensi secara mikrobiologis untuk mensukseskan pengembangbiakan ikan sidat di akuakultur.

Dari hasil penelitian ini, potensi untuk kandidat probiotik bagi budidaya *A. bicolor bicolor* berdasarkan kemampuannya untuk menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* ditunjukkan oleh 4 isolat bakteri, namun tidak semua bakteri tersebut dapat dijadikan sebagai probiotik jika ditinjau dari potensi patogenitasnya. *Pseudomonas maleii* dan *Morganella morganii* mempunyai kemampuan dalam melisis darah sehingga diduga bersifat patogen dan tidak dapat digunakan sebagai kandidat probiotik. *Morganella morganii* juga dilaporkan menghasilkan enzim yang toksik terhadap manusia sehingga tidak dapat digunakan sebagai probiotik. Sumner et al. (2004) menyebutkan bahwa *M. morganii* merupakan salah satu bakteri utama penghasil histamine dalam jumlah yang tinggi sehingga bakteri ini akan membahayakan manusia.

Dengan menyisihkan 2 isolat yang bersifat hemolitik, didapatkan dua isolat bakteri yang berpotensi sebagai kandidat probiotik yakni isolat TSA-d/9-2011 yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Citrobacter freundii* dan isolat TSA-h/9-2011 yang mempunyai kemiripan ciri-ciri dengan *Bacillus subtilis*. Meskipun tidak mampu mendegradasi protein, namun *B. subtilis* ini masih memungkinkan untuk menjadi kandidat probiotik dengan kemampuan penghambatan yang besar terhadap *A. hydrophila*. Beberapa strain *Bacillus* telah digunakan sebagai probiotik yang menghambat pertumbuhan patogen pada ikan (Duc et al. 2004;

Moriarty 1998, 1999; Rengpipat et al. 1998; Sugita et al. 1998; Gomez-Gil et al. 2000; Gullian et al. 2004). Penelitian dengan menambahkan *B. subtilis* pada pakan menunjukkan adanya peningkatan bobot dan efisiensi pakan pada ikan rainbow trout (Gatesoupe 1999). Penggunaan *B. pumilus* sebagai probiotik pada ikan nila meningkatkan *survival rate* secara signifikan, yang diduga karena kemampuannya menghasilkan imunoglobulin G antispora, *pro-inflammatory cytokine tumor necrosis*, dan bacteriocin (Aly et al. 2008). Lebih jauh lagi, Moriarty (1998) menyatakan bahwa spesies *Bacillus* tidak berasosiasi dengan patologi pada organisme akuatik

Sementara itu, *C. freundii* pernah dilaporkan diisolasi dari beberapa spesies ikan seperti *Cyprinus carpio*, *Ctenopharyngodon idella*, dan *Oreochromis niloticus* (Sugita et al. 1985), serta *Balanus amphitrite* (Khandeparker et al. 2003). Spesies bakteri ini juga memiliki aktivitas antagonistik terhadap *A. hydrophila* dan diuji penggunaannya sebagai probiotik untuk ikan nila (*O. niloticus*). Chowdhury dan Wakabayashi (1989) menunjukkan bahwa *C. freundii* efektif menurunkan jumlah dan infektivitas dari *Flexibacter columnaris*. Pemberian *C. freundii* dapat memproteksi terhadap *A. hydrophila* sebesar 70% survival setelah infeksi (Aly et al. 2008). Chowdhury dan Wakabayashi (1989) juga mengkonfirmasi bahwa *C. freundii* tidak bersifat patogen pada ikan.

KESIMPULAN

Terdapat 9 jenis bakteri yang berasosiasi dengan saluran pencernaan *A. bicolor bicolor*: *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas maleii*, *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Bacillus subtilis*. Bakteri yang dapat dijadikan sebagai kandidat probiotik bagi *A. bicolor bicolor* berdasarkan uji hidrolisis darah dan antagonis terhadap bakteri patogen yakni isolat TSA-d/9-2011 (mempunyai kemiripan dengan *Citrobacter freundii*) dan isolat TSA-h/9-2011 (mempunyai kemiripan dengan *Bacillus subtilis*).

DAFTAR PUSTAKA

Aly SM, Abd-El-Rahman AM, John G, Mohamed MF. 2008. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277: 1-6.

Burr G, Gaitlin D. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture. *J World Aquacult Soc* 36: 425-436

Cahill MM. 1990. Bacterial flora of the fishes. *Microb Ecol* 19: 21-41.

Carda-Dieguez M, Ghai R, Rodriguez-Valera F, Amaro C. 2014. Metagenomics of the mucosal microbiota of European eels. *Genome Announcement* 2 (6): 1-2.

Chinabut S, Puttinaowarat S. 2005. The choice of disease control strategies to secure international market access for aquaculture product. *Dev Biol* 121: 255-261.

Chowdhury MBR, Wakabayashi H. 1989. Effects of competitive bacteria on the survival and infectivity of *Flexibacter columnaris*. *Fish Pathology* 24 (1): 9-15.

Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. 2004. Characterization of bacillus probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 70 (4): 2161-2171.

Fardiaz S. 1992. Bakteriologi Pengelolaan Pangan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Bogor, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Gatesoupe FJ. 2005. Probiotics and prebiotics for fish culture, at the parting of the ways. *Aqua Feeds: Formulation & Beyond* 2 (3): 3-5.

Gatesoupe FJ. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.

Gomez GD, Balcazar JL. 2008. A review on the interaction between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Microbiol* 152: 145-154.

Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191: 259-270.

Gullian M, Thompson F, Rodriguez J. 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 233: 1-14

Hansen GH, Olafsen JH. 1999. Bacterial interaction in early life stages of marine cold water fish. *Microb Ecol* 38: 1-26.

Heuer OE, Kruse H, Grave K, Colignon P, Karunasagar I, Angulo FJ. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin Infect Dis* 49: 1248-1253.

Irianto A, Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture (review). *J Fish Dis* 25: 633-642.

Khandeparker L, Anil A.C, Raghukumar S. 2003. Barnacle larval destination: piloting possibilities by bacteria and lectin interaction. *J Exp Mar Biol Ecol* 289 (1): 1-13.

Moriarty DJW. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164: 351-358.

Moriarty DJW. 1999. Disease control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. Proc. Eighth Symposium on Microbial Ecology. *Microbial Interactions in Aquaculture*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.

Nayak SK. 2010. Probiotics and Immunity: A Fish Perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29: 2-14.

Olafsen JA. 2001. Interaction Between Fish Larvae and Bacteria in marine Aquaculture. *Aquaculture* 200: 223-243.

Ramirez RF, Dixon BA. 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 227: 417-426.

Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, Menasveta P. 1998. Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture* 167: 301-313.

Salminen S, von-Wright A. 1993. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York.

- Skjeremo J, Salvesen I, Oie G, Olsen Y, Vadstein O. 1997. Microbially matured water: a technique for selection of a non-opportunistic bacterial flora in water that may improve performance of marine larvae. *Aquaculture Int* 5: 13-28.
- Soemarmo. 2000. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik*. Yogyakarta: Akademi Analis
- Sorensen SR, Skov PV, Lausen P, Tomkiewicz J, Bossier P, De Schryver P. 2014. Microbial interference and potential control in culture of European eel (*Anguilla anguilla*) embryos and larvae. *Aquaculture* 426-427: 1-8.
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J, Nielsen T, Appel KF, Gram L. 2000. The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture* 182: 1-15.
- Sugita H, Hirose Y, Matsuo N, Deguchi Y. 1998. Production of the antibacterial substance by bacillus species strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. *Aquaculture* 165: 269-280.
- Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y. 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. *Aquaculture* 92: 267-276.
- Sugita H, Tokuyama K, Deguchi Y. 1985. The intestinal microflora of carp *Cyprinus carpio*, grass carp *Ctenopharyngodon idella* and tilapia *Sarotherodon niloticus*. *Bull Japanese Soc Sci Fish* 51 (8): 1325-1329.
- Sumner J, Ross T, Ababouch L. 2004. *Application of Risk Assessment in the Fish Industry*. FAO, Rome.
- Ugur A, Yilmas F, Nurettin S. 2002. Microflora on The Skin of European Eels (*Anguilla anguilla*) Sampled from Creek Yuvarlakcay Turkey. Field Report.
- Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 655-671.
- Vine NG, Leukes W, Kaiser H. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev* 30: 404-427.
- Wolf CE, Gibbons WR. 1996. Improved method for qualification of bacteriocins. *Appl Bacteriol* 80: 453
- Yosefian M, Amiri MS. 2009. A review of the use of prebiotic in aquaculture for fish and shrimp. *African J Biotech* 8 (25): 7313-7318.



Keragaman ganyong (*Canna edulis* Ker.) di wilayah Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim

SANTI SILFIANA ASHARY, NITA ETIKAWATI*, SURATMAN

♥Alamat korespondensi:

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia. Tel./Fax.: +62-271-663375. ✉email: netikawati@yahoo.com

Manuskrip diterima: 2 Agustus 2015.
Revisi disetujui: 5 April 2016.

Ashary SS, Etikawati N, Suratman. 2016. Diversity of edible canna (*Canna edulis* Ker.) in Surakarta region based on the morphological characters and isozym band pattern. *Bioteknologi* 13: 18-33. The aim of the research is to study the diversity and relationship of edible canna in Surakarta region based on the morphological characters and isozym band pattern. This research included morphological observation of edible canna and electrophoresis of the rhizomes to get isozym band pattern. Edible Canna's fresh rhizomes were extracted with extract buffer and then centrifuged at 13000 rpm during 20 minutes. Supernatant and loading dye were mixed and then electrophoresed with polyacrilamide gel. The morphological characters and isozym band pattern were analysed using Similarity Index (SI) and computed with *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS) program 2.0 version until get the dendrogram. From the research, it can be concluded that there were diversity of edible canna based on the morphological characters and isozym band pattern. The diversity of morphological edible canna included the colour and size of it's organs. The diversity of isozym band pattern included emergence and thickness of band. Based on the morphological characters and isozym band pattern, edible canna from Wonogiri and edible canna from Sukoharjo have the closest relationship with similarity coefficient 48%, whereas the farthest was the relationship of *C. hybrida* with the others at similarity coefficient of 11.57%.

Keywords: Edible canna, morphological characters, isozym band, relationship

Ashary SS, Etikawati N, Suratman. 2016. Keragaman ganyong (*Canna edulis* Ker.) di wilayah Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim. *Bioteknologi* 13: 18-33. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman dan hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim. Penelitian yang dilakukan meliputi pengamatan ciri morfologi dan elektroforesis tunas rimpang ganyong untuk memperoleh pita isozim. Tunas rimpang segar diekstrak dengan cara digerus dan ditambahkan ekstrak buffer kemudian disentrifuse pada kecepatan 13000 rpm selama 20 menit. Supernatant ditambahkan dengan *loading dye* kemudian dielektroforesis pada gel poliakrilamid. Ciri morfologi dan pola pita isozim yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan Indeks Similaritas (IS) dan dikomputasi dengan program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS) versi 2.0 sehingga diperoleh dendrogram hubungan kekerabatan ganyong. Hasil penelitian menunjukkan adanya keragaman ciri morfologi ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta yang meliputi warna dan ukuran organ tanaman. Pola pita isozim yang didapat juga menunjukkan keragaman yang meliputi kemunculan dan tebal tipis pita. Berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim, ganyong Wonogiri dan ganyong Sukoharjo memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan koefisien kemiripan 48%, sedangkan hubungan kekerabatan terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan sampel yang lain pada koefisien kemiripan 11,57%.

Kata kunci: Ciri morfologi, ganyong, pita isozim, hubungan kekerabatan

PENDAHULUAN

Ganyong (*Canna edulis* Ker.) merupakan tanaman herba yang berasal dari Amerika Selatan. Rimpang ganyong bila sudah dewasa dapat dimakan dengan mengolahnya terlebih dahulu, atau untuk diambil patinya sebagai bahan baku tepung sebagai alternatif pengganti terigu (Flach dan Rumawas 1996).

Rimpang ganyong selain sebagai bahan makanan selingan atau bahan baku tepung pengganti tepung terigu, juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan bakar alternatif pengganti minyak tanah dan bensin. Kandungan pati dan gula yang cukup tinggi pada rimpang ganyong memiliki potensi sebagai bahan bioetanol.

Mengingat potensinya sebagai bahan pangan dan bahan baku bioetanol, perlu dilakukan upaya pemuliaan tanaman ganyong agar diperoleh bibit unggul. Salah satu sumber dasar pemuliaan adalah ketersediaan variasi yang tinggi di dalam tanaman tersebut sehingga memungkinkan untuk dilakukan seleksi terhadap bibit yang diinginkan.

Untuk mengidentifikasi variasi genetik dapat dilakukan melalui pendekatan morfologi dan molekuler. Ciri-ciri morfologi dapat digunakan untuk mengkarakterisasi pola diversitas genetik namun sifat yang dapat digambarkan hanya dalam proporsi kecil dari karakter genetik dan cenderung dipengaruhi oleh faktor lingkungan, oleh karena itu diperlukan identifikasi genetik secara molekuler untuk melengkapi keterbatasan tersebut (Hadiati dan Sukmadjaja 2002).

Penggunaan isozim sebagai penanda molekuler memiliki kelebihan karena isozim diatur oleh gen tunggal dan bersifat kodominan dalam pewarisan, merupakan produk langsung dari gen, bersifat stabil karena tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan, cepat dan akurat karena tidak menunggu tanaman sampai berproduksi (Cahyarini et al. 2004). Isozim merupakan enzim yang dapat bereaksi dengan substrat yang sama dan mengubahnya menjadi produk yang sama.

Enzim esterase dan peroksidase mempunyai pola pita yang jelas dan polimorfis, serta telah banyak digunakan untuk mengidentifikasi tanaman seperti kedelai (Cahyarini et al. 2004), gadung liar (Maideliza dan Mansyurdin 2007), jarak pagar (Yunus 2007), dan mentimun (Julisaniah et al. 2008). Selain itu pola isozim juga digunakan untuk identifikasi pada hewan seperti udang putih (Sulistiyono et al. 2005), udang windu (Bhagawati et al. 2008), ikan betutu (Abulias dan Bhagawati 2008), dan lundi putih

(Wardani 2008).

Wilayah Karesidenan Surakarta memiliki tanah bersifat pasiran dengan komposisi mineral muda yang tinggi sebagai akibat aktivitas vulkanik Gunung Merapi di barat dan Gunung Lawu di timur. Komposisi ini, ditambah dengan ketersediaan air yang cukup melimpah karena adanya aliran sungai Bengawan Solo sehingga wilayah ini sangat baik untuk budidaya tanaman pangan, sayuran, dan industri, seperti tembakau dan tebu (Haryo 2009). Studi analisis keragaman ganyong belum banyak dilakukan terutama di wilayah eks-karesidenan Surakarta sehingga penelitian ini perlu untuk dilakukan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keragaman dan hubungan kekerabatan ganyong di wilayah Karesidenan Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman

Bahan tanaman yang digunakan adalah tunas rimpang ganyong segar, dari ganyong kultivar merah di wilayah Karesidenan Surakarta yang meliputi Kotamadya Surakarta, Kabupaten Wonogiri, Klaten, Boyolali, Sukoharjo, Sragen, dan Karanganyar. Selain itu digunakan juga *outgroup* sebagai pembanding, yaitu *C. hybrida* Hort. atau bunga kana hias.

Pengamatan ciri morfologi

Tanaman ganyong tersebut diamati dan dicatat ciri morfologinya meliputi tinggi tanaman; warna sisik rimpang; diameter rimpang; warna batang; diameter batang; bentuk daun; warna daun; panjang dan lebar daun; warna mahkota bunga; warna kelopak bunga; jumlah bagian-bagian bunga; ukuran bunga; bentuk buah, ukuran buah dan jumlah biji dalam buah.

Analisis pola pita isozim

Ekstraksi dan penyiapan sampel

Sampel yang digunakan adalah rimpang ganyong yang ditunaskan selama 7 hari dengan 3 ulangan. Masing-masing mata tunas tersebut ditimbang sebanyak 100 mg lalu ditumbuk hingga hancur menggunakan mortar lalu ditambahkan dengan buffer ekstraksi dengan perbandingan 1:5 untuk pewarnaan peroksidase dan 3:1 untuk pewarnaan esterase kemudian dimasukkan ke dalam tabung effendorf dan

disentrifuse dengan kecepatan 13000 rpm selama 20 menit.

Elektroforesis

Elektroforesis dalam penelitian ini mengacu pada metode yang dilakukan oleh Suranto (2000, 2002). Dalam penelitian ini alat yang digunakan untuk elektroforesis adalah satu set alat elektroforesis BIO-RAD Mini PROTEAN 3 tipe vertikal *made in USA*.

Supernatan diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 7 μL untuk pewarnaan peroksidase dengan ditambahkan 3 μL *loading dye*. Sedangkan untuk pewarnaan esterase, 15 μL supernatan diambil dengan ditambahkan 3 μL *loading dye*. Sampel kemudian dielektroforesis dengan tegangan listrik konstan 85 volt selama kurang lebih 60 menit. Elektroforesis diakhiri apabila penanda warna *bromphenol blue* mencapai sekitar 56 mm dari slot ke arah anoda. Gel yang telah selesai *running* dipindahkan ke cawan pewarnaan untuk diwarnai dengan enzim pewarna.

Pewarnaan

Pewarnaan pada penelitian ini menggunakan dua sistem enzim, yaitu esterase dan peroksidase. Untuk membuat larutan pewarna, komposisi larutan yang digunakan disiapkan menurut Suranto (2000, 2002).

Pewarnaan esterase

Sebanyak 0,0125 g α -naftil asetat dimasukkan dalam cawan pewarnaan dan dilarutkan dengan 2,5 mL aseton, kemudian ditambahkan 50 mL dari 0,2 M buffer fosfat pH 6,5 dan 0,0125 g *fast Blue BB salt*. Gel yang telah dielektroforesis dikeluarkan dan dimasukkan dalam larutan pewarna tersebut. Gel diinkubasi pada suhu kamar selama minimal 120 menit sambil digoyang secara perlahan-lahan setiap 10 menit. Setelah muncul pita-pita, pewarna dibuang dan dibilas dengan akuades, kemudian gel diambil gambarnya dengan kamera digital.

Pewarnaan peroksidase

Dalam cawan pewarnaan, sebanyak 0,0125 g O-dianisidin dilarutkan dalam 2,5 mL aseton lalu ditambahkan 50 mL buffer asetat pH 4,5 dan 2 tetes hidrogen peroksida. Gel yang telah dielektroforesis dimasukkan dalam larutan pewarna dan diinkubasi selama 10 menit sambil digoyang secara perlahan-lahan setiap 2 menit. Setelah muncul pita-pita, pewarna dibuang dan

dibilas dengan akuades, kemudian gel diambil gambarnya dengan kamera digital.

Proses fiksasi gel

Fiksasi dilakukan segera setelah proses pewarnaan gel selesai. Larutan pewarna dibuang dan diganti dengan larutan fiksasi sebanyak 50 mL, dengan tujuan untuk menghentikan aktivitas isozim. Larutan fiksasi yang dipakai tergantung sistem isozim yang digunakan.

Untuk isozim esterase dan peroksidase larutan fiksasi yang digunakan adalah larutan fiksasi B yang dibuat dengan cara mencampurkan 250 mL alkohol; 25 mL aseton; dan 225 mL H_2O . Selanjutnya gel disimpan dalam suhu dingin 4°C selama 24 jam dan ditutup dengan plastik agar larutan fiksasi tidak menguap.

Pengamatan

Ciri morfologi ganyong dianalisis secara deskriptif dan dilakukan pengelompokan berdasarkan kesamaan ciri untuk mengetahui keragaman ganyong. Data yang diperoleh kemudian disajikan dalam bentuk data biner dengan memberikan angka 1 jika sampel yang diamati memiliki ciri morfologi yang ditentukan dan angka 0 jika tidak terdapat ciri morfologi pada sampel tersebut.

Pola pita isozim hasil elektroforesis diamati dan digambar sebagai zimogram. Pola pita isozim hasil elektroforesis dianalisis secara deskriptif. Pola pita isozim pada zimogram diamati keragamannya berdasarkan kemunculan dan tebal tipis pita pada R_f tertentu. Kemudian disajikan dalam bentuk data biner seperti halnya pada data ciri morfologi.

Hubungan kekerabatan dihitung dengan menentukan jarak genetik. Jarak genetik menggambarkan perbedaan genetik antar populasi. Data biner yang telah diperoleh dihitung besarnya indeks similaritas dan kemudian dikomputasikan dalam program *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* versi 2.0 (NTSYS) hingga diperoleh dendrogram hubungan kekerabatan (Rohlf 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi ganyong

Secara umum, ganyong dari ketujuh tempat di wilayah eks-karesidenan Surakarta (Surakarta, Wonogiri, Klaten, Boyolali, Sukoharjo, Sragen, dan Karanganyar) menunjukkan ciri morfologi yang hampir sama dengan adanya beberapa

variasi terutama warna dan ukuran. Berdasarkan pengamatan yang dilakukan di wilayah eks-karesidenan Surakarta, dapat diketahui bahwa tanaman ganyong berupa herba tegak dengan tinggi 69,58-121,2 cm. Batang sejati terdapat dalam tanah berupa rimpang yang juga merupakan cadangan makanan, rimpang memiliki diameter 3,2-6,1 cm. Pada rimpang terdapat sisik yang sebenarnya merupakan daun, berwarna hijau keunguan dalam keadaan segar. Akar serabut keluar dari permukaan rimpang.

Bunga kecil dengan 3 petala berwarna merah hingga merah gelap; panjang petala 5,9-6,8 cm dan lebar 0,6-1,2 cm. Sepala berjumlah 3; berwarna hijau kemerahan dengan panjang 4,3-4,9 cm dan lebar 0,6-1,1 cm. Panjang staminodia 5-5,9 cm; lebar staminodia 0,5-0,8 cm. Putik berbentuk pipih seperti pedang dengan panjang 4,7-5,8 cm dan lebar 0,3-0,6 cm. Panjang anter 0,7-1,3 cm, sedangkan lebar anter 0,1-0,2 cm. Buah beruang 3 dengan permukaan buah berbenjol-benjol; diameter buah 0,64-1,46 cm; jumlah biji dalam buah 14-24. Morfologi ganyong kultivar merah yang diambil dari wilayah eks-karesidenan Surakarta tampak pada Gambar 1.

Ganyong yang diamati di tujuh tempat di wilayah eks-karesidenan Surakarta memiliki ciri morfologi yang hampir sama tetapi terdapat perbedaan dalam warna dan ukuran seperti tampak dalam Tabel 1.

Berdasarkan data ciri morfologi tersebut selanjutnya akan dibahas satu persatu mengenai bagian-bagian atau organ tanaman ganyong tersebut yang meliputi rimpang, batang, daun, serta bunga, buah, dan biji sehingga akan diketahui keragaman ganyong berdasarkan ciri morfologi yang telah diamati.

Rimpang

Rimpang ganyong yang dikoleksi dari wilayah eks-Karesidenan Surakarta seluruhnya memiliki sisik rimpang berwarna hijau keunguan. Ganyong Sragen memiliki diameter yang terbesar (6,1 cm) dengan perbedaan yang mencolok daripada ganyong dari wilayah lain. Ganyong dari wilayah Klaten memiliki diameter terbesar kedua yaitu 4,5 cm. Sedangkan ganyong dari wilayah lainnya (Surakarta, Boyolali, Sukoharjo, Karanganyar) memiliki diameter yang tidak jauh berbeda satu sama lain yaitu antara 3,2-3,7 cm.

Perbedaan ukuran rimpang yang cukup mencolok ini diduga karena perbedaan lingkungan tempat tumbuh seperti yang dikemukakan Nuryadin (2008), bahwa bentuk

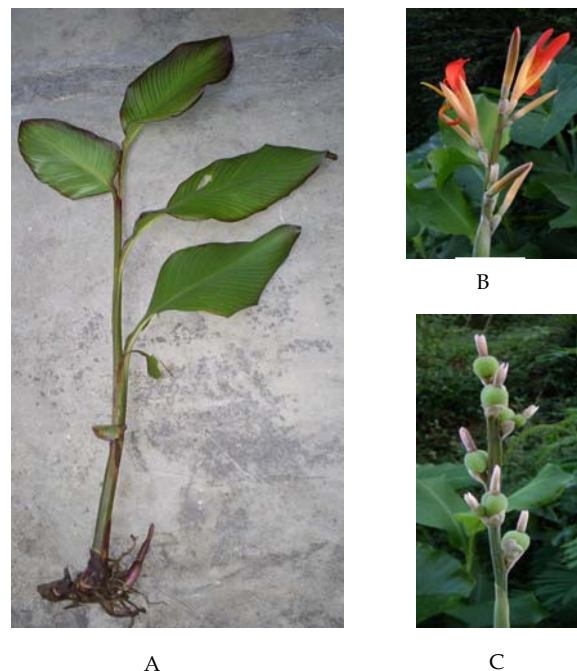
rimpang beraneka ragam begitu juga komposisi kimia dan kandungan gizinya. Perbedaan ini dipengaruhi oleh umur, varietas dan tempat tumbuh tanaman.

Batang

Batang yang dimaksud adalah batang semu yang merupakan gabungan dari pelepah daun yang bertumpuk membentuk bangunan menyerupai batang. Ganyong Wonogiri memiliki diameter batang paling besar yaitu 1,97 cm, bila dibandingkan dengan ganyong dari wilayah lain yaitu Klaten (1,86 cm), Sukoharjo (1,84 cm), Boyolali (1,78 cm), Sragen (1,76 cm), Karanganyar (1,75 cm), sedangkan diameter batang yang terkecil yaitu ganyong Surakarta (1,52 cm).

Tinggi tanaman ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta bervariasi, yang tertinggi yaitu ganyong dari wilayah Klaten (121,2 cm).

Perbedaan tinggi tanaman ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta dipengaruhi oleh faktor lingkungan tempat tumbuhnya. Sitompul dan Guritno (1995) menyatakan bahwa tinggi tanaman merupakan ukuran tanaman yang paling sering diamati baik sebagai indikator pertumbuhan maupun parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan.



Gambar 1. Morfologi ganyong hasil pengamatan: (A) habitus; (B) bunga; (C) buah, telah diamati.

Tabel 1. Ciri morfologi ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

Ciri morfologi	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Warna daun	Hijau	Ungu kehijauan	Hijau keunguan	Ungu kehijauan	Hijau keunguan	Ungu kehijauan	Hijau keunguan	Ungu kehijauan
Warna petala bunga	Jingga bercorak kuning	Merah	Merah	Merah gelap	Merah	Merah	Merah	Merah
Warna sepala bunga	Hijau keputihan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan	Hijau kemerahan
Warna batang	Hijau	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan
Warna sisik rimpang	Hijau kecoklatan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan	Hijau keunguan
Panjang daun (cm)	50,5	43,84	42,53	44,06	37,43	44,26	43,86	37,67
Lebar daun (cm)	13,2	17,1	18,14	19,41	17,69	19,21	19,27	17,34
Rasio panjang: lebar daun	3,83	2,56	2,34	2,27	2,12	2,30	2,28	2,17
Tinggi Tanaman (cm)	170	91,57	77,51	121,2	85,44	91,7	69,58	78,66
Diameter batang (cm)	1,66	1,52	1,97	1,86	1,78	1,84	1,76	1,75
Diameter rimpang (cm)	1,1	3,6	3,2	4,5	3,4	3,2	6,1	3,7
Diameter buah (cm)	1,34	1,27	1,02	1,31	1,23	0,64	1,46	1,30
Jumlah biji dalam buah	22	20	21	24	21	14	20	20
Panjang sepala (cm)	8,5	4,7	4,5	4,5	4,4	4,5	4,9	4,3
Lebar sepala (cm)	1,7	0,6	0,7	1,1	0,8	0,7	1,0	0,7
Panjang petala (cm)	13,5	6	6,2	6,6	6	5,9	6,8	6
Lebar petala (cm)	5,6	0,6	0,8	1	0,7	1	1,2	0,6
Panjang staminodia (cm)	11	5,5	5,5	5,7	5,6	5	5,9	5,5
Lebar staminodia (cm)	3,8	0,7	0,5	0,6	0,5	0,5	0,8	0,7
Panjang putik (cm)	8	5,7	5,4	5,5	5	4,7	5,8	4,9
Lebar putik (cm)	0,9	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,6	0,3
Panjang anter (cm)	0,7	1	0,8	0,9	0,8	0,8	1,3	0,7
Lebar anter (cm)	0,2	0,1	0,1	0,1	0,15	0,1	0,2	0,1
Panjang bunga (cm)	13,5	6	6	6,5	6,2	5,9	7,1	5,8
Diameter pangkal bunga (cm)	0,92	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,6	0,25
Sepala menekuk/tidak menekuk	Menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk	Tidak menekuk

Keterangan: I : *C. hybrida*, III : Wonogiri, II : Surakarta, IV : Klaten, V : Boyolali, VII : Sragen, VI : Sukoharjo, VIII : Karanganyar

Hal ini dilakukan karena tinggi tanaman merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah dilihat. Sebagai parameter pengukur pengaruh lingkungan, tinggi tanaman sensitif terhadap pengaruh lingkungan.

Daun

Ganyong dari wilayah Boyolali dan Karanganyar memiliki daun yang lebih pendek dan sempit dibandingkan dengan ganyong dari wilayah yang lain. Ganyong Boyolali memiliki panjang 37,43 cm dan lebar 17,69 cm sedangkan ganyong Karanganyar memiliki panjang 37,67 cm dan panjang 17,34 cm. Tetapi, ganyong

Surakarta memiliki daun yang paling sempit yaitu panjang 43,84 cm dan lebar 17,1 cm. Sedangkan untuk warna daun, ada dua macam warna yaitu hijau keunguan (Wonogiri, Boyolali, Sragen) dan ungu kehijauan (Surakarta, Klaten, Sukoharjo, Karanganyar).

Perbedaan warna serta ukuran daun pada tanaman ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta tersebut diduga karena adanya pengaruh faktor lingkungan yang berbeda pada masing-masing wilayah sehingga menimbulkan pengaruh yang berbeda pula pada pemunculan fenotip ganyong meskipun perbedaan fenotip yang ditunjukkan tidak mencolok.

Bunga

Warna bunga ganyong kultivar merah di wilayah eks-karesidenan Surakarta adalah merah (*red*) dan merah gelap (*darkred*). Sepala berjumlah tiga buah, petala juga 3 buah yang salah satunya melengkung ke bawah. Benang sari belum sempurna, anter melekat pada staminodia.

Bunga ganyong dari wilayah Klaten memiliki petala berwarna merah gelap (*darkred*) sedangkan untuk wilayah lain (Surakarta, Wonogiri, Boyolali, Sukoharjo, Sragen, Karanganyar) memiliki petala berwarna merah (*red*). Sedangkan untuk sepala bunga semuanya berwarna hijau kemerahan dan lurus (tidak menekuk). Hal ini berbeda dengan sepala *C. hybrida* yang menekuk pada bagian dekat pangkal. Bunga ganyong yang memiliki ukuran paling panjang adalah bunga dari wilayah Sragen (7,1 cm), disusul oleh bunga dari wilayah Klaten (6,5 cm), sedangkan untuk bunga dari wilayah lain memiliki ukuran yang tidak jauh berbeda yaitu antara 5,8-6,2 cm. Keragaman bunga ganyong yang meliputi warna dan ukuran tersebut diduga karena adanya faktor genetik dan lingkungan yang mempengaruhi fenotip dari tanaman ganyong. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), penampilan bentuk tanaman dikendalikan oleh sifat genetik tanaman di bawah pengaruh faktor-faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang diyakini dapat mempengaruhi terjadinya perubahan morfologi tanaman antara lain iklim, suhu, jenis tanah, kondisi tanah, ketinggian tempat, kelembapan.

Buah dan biji

Buah dengan diameter terbesar yaitu buah ganyong dari wilayah Sragen yaitu 1,46 cm, sedangkan buah ganyong yang memiliki diameter paling kecil yaitu buah ganyong dari wilayah Sukoharjo (0,64). Di dalam buah terdapat biji ganyong berbentuk bulat dan berwarna hitam. Apabila buah masih muda, biji ganyong berwarna hijau. Jumlah biji dalam buah bervariasi. Buah ganyong dari wilayah Sukoharjo dengan jumlah biji paling sedikit (14 biji) dan memiliki perbedaan jumlah yang mencolok dengan ganyong dari wilayah lain yang pada umumnya memiliki jumlah biji dalam buah hampir sama (20-24 biji).

Menurut Indriani et al. (2008), keragaman suatu populasi yang berasal dari daerah dengan kisaran geografi yang rendah kemungkinan disebabkan oleh proses adaptasi yang terus-menerus sehingga akan terjadi perubahan-perubahan baik secara biokimia maupun

fisiologisnya, terjadinya interaksi antara genotip dengan lingkungan yang terus-menerus menyebabkan fenotip yang hampir sama.

Pola pita isozim

Hasil analisis elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid pada isozim esterase dapat diketahui pada Gambar 2.

Dari zimogram Gambar 2 dapat diketahui adanya variasi dari molekul pita yang terdeteksi. Pola pita isozim esterase muncul pada lima Rf yaitu 0,22; 0,28; 0,34; 0,38; dan 0,41. Pita isozim esterase yang pertama (Rf 0,22) muncul pada semua sampel dengan ketebalan yang sama. Pita isozim esterase yang kedua (Rf 0,28) muncul pada semua wilayah kecuali ganyong dari wilayah Boyolali (V), dengan pita yang paling tebal muncul pada wilayah Klaten (IV). Hal ini berarti berat molekul pita isozim pada wilayah Klaten merupakan yang paling besar di antara yang lain.

Pita isozim yang ketiga (Rf 0,34) hanya muncul pada wilayah Klaten (IV), Boyolali (V) dan Sragen (VII) dengan ketebalan yang sama. Sedangkan pita isozim yang keempat (Rf 0,38) muncul pada wilayah Wonogiri (III), Sukoharjo (VI), Sragen (VII), dan Karanganyar (VIII) dengan ketebalan yang sama. Pita isozim yang kelima (Rf 0,41) muncul pada semua wilayah kecuali Karanganyar (VIII) dan *C. hybrida* (I). Wilayah Sragen memiliki pita isozim terbanyak (Rf 0,22; 0,28; 0,34; 0,38; 0,41) bila dibandingkan dengan wilayah lain. Adapun ketebalan pita yang dihasilkan terangkum dalam Tabel 2.

Dalam Cahyarini et al. (2004), disebutkan bahwa tebal tipisnya pita yang terbentuk disebabkan karena perbedaan jumlah molekul yang termigrasi, pita yang tebal berarti memiliki berat molekul yang lebih besar dibandingkan dengan pita yang tipis. Pita yang memiliki kekuatan ionik lebih besar akan termigrasi lebih jauh daripada pita yang berkekuatan ionik kecil.

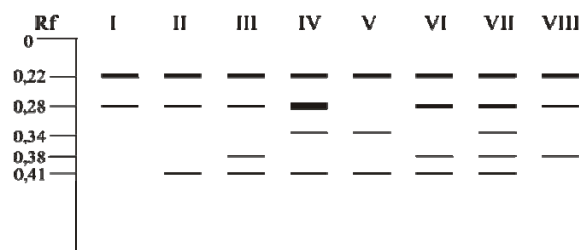
Berdasarkan zimogram hasil elektroforesis pola pita esterase ganyong dari delapan macam sampel dapat diketahui ada tujuh macam pola pita jika dianalisis berdasarkan kemunculan pita yaitu pola pita A yang terdapat pada *C. hybrida* (I), pola pita B yang terdapat pada ganyong dari wilayah Surakarta (II), pola pita C yang terdapat pada ganyong dari wilayah Wonogiri dan Sukoharjo (III, VI), pola pita D yang terdapat pada ganyong dari wilayah Klaten (IV), pola pita E yang terdapat pada ganyong dari wilayah Boyolali (V), pola pita F yang terdapat pada ganyong dari wilayah Sragen (VII), serta pola

pita G yang terdapat pada ganyong dari wilayah Karanganyar (VIII).

Berdasarkan kesamaan pola tersebut, hanya ganyong dari wilayah Wonogiri dan Sukoharjo yang memiliki pola yang sama sedangkan ganyong dari wilayah lain memiliki pola pita yang berbeda-beda. Perbedaan pola pita tersebut dapat dilihat sebagai adanya keragaman pola pita isozim esterase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta. Menurut Purwanto et al. (2002), isozim merupakan produk langsung dari gen dan dapat digunakan untuk mempelajari keragaman genetik individu dalam suatu populasi. Keragaman pola pita isozim yang dihasilkan melalui elektroforesis dan pewarnaan menggambarkan keragaman genetik tanaman tersebut. Adapun hasil analisis elektroforesis dengan menggunakan gel poliakrilamid pada isozim peroksidase dapat diketahui pada Gambar 3.

Berdasarkan zimogram tersebut pita isozim peroksidase muncul pada enam Rf yaitu 0,09; 0,16; 0,22; 0,38; 0,41; dan 0,44. Pita isozim peroksidase yang pertama (Rf 0,09) muncul pada semua wilayah kecuali Sukoharjo (VI), dan pita yang paling tebal yaitu pada wilayah Sragen (VII). Pita isozim yang kedua (Rf 0,16) hanya muncul pada wilayah Sukoharjo (VI). Pita isozim peroksidase yang ketiga (Rf 0,22) muncul pada semua sampel dengan ketebalan yang sama dan merupakan pita yang paling tebal dibandingkan pita pertama (Rf 0,09), pita kedua (Rf 0,16), pita keempat (Rf 0,38), pita kelima (Rf 0,41) dan pita keenam (Rf 0,44). Pita isozim peroksidase yang keempat (Rf 0,38) muncul pada semua wilayah kecuali Surakarta (II) dan *C. hybrida* (I). Pita isozim yang kelima (Rf 0,41) hanya dimiliki oleh *C. hybrida* (I) dan ganyong dari wilayah Surakarta (II). Sedangkan pita isozim peroksidase yang keenam muncul pada semua wilayah kecuali *C. hybrida* (I). Adapun ketebalan pita isozim peroksidase yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan zimogram hasil elektroforesis isozim peroksidase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta, dari delapan macam sampel dapat diketahui ada empat macam pola pita jika dianalisis berdasarkan kemunculan pita yaitu pola pita A yang terdapat pada *C. hybrida* (I), pola pita B yang terdapat pada ganyong dari wilayah Surakarta (II), pola pita C yang terdapat pada ganyong dari wilayah Wonogiri (III), Klaten (IV), Boyolali (V), Sragen (VII), Karanganyar (VIII), serta pola pita D yang terdapat pada ganyong dari wilayah Sukoharjo (VI).

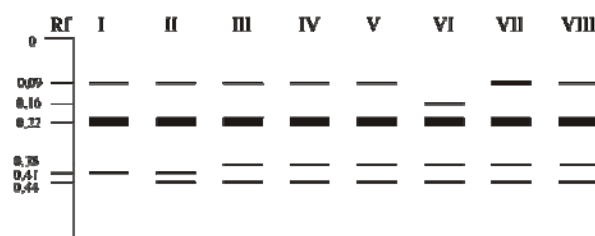


Gambar 2. Zimogram hasil elektroforesis isozim esterase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta. Keterangan: I: *C. hybrida*, II: Surakarta, III: Wonogiri, IV: Klaten, V: Boyolali, VI: Sukoharjo, VII: Sragen, VIII: Karanganyar

Tabel 2. Hasil analisis ketebalan pita isozim esterase ganyong.

Rf	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,22	++	++	++	++	++	++	++	++
0,28	+	+	++++	-	++	++	+	+
0,34	-	-	-	+	+	-	+	-
0,38	-	-	+	-	-	+	+	+
0,41	-	+	+	+	+	+	+	-

Keterangan: + = tipis, ++ = tebal, +++ = sangat teba, - = tidak ada



Gambar 3. Zimogram hasil elektroforesis isozim peroksidase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta. I: *C. hybrida*, II: Surakarta, III: Wonogiri, IV: Klaten, V: Boyolali, VI: Sukoharjo, VII: Sragen, VIII: Karanganyar.

Tabel 3. Hasil analisis ketebalan pita isozim peroksidase ganyong.

Rf	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,09	+	+	+	+	+	-	++	+
0,16	-	-	-	-	-	+	-	-
0,22	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
0,38	-	-	+	+	+	+	+	+
0,41	+	+	-	-	-	-	-	-
0,44	-	+	+	+	-	+	+	+

Keterangan: + = tipis, ++ = tebal, +++ = sangat teba, - = tidak ada

Keragaman pola pita isozim esterase lebih beragam daripada isozim peroksidase yaitu dengan adanya tujuh pola pita sedangkan pada isozim peroksidase diperoleh empat pola pita. Keragaman pola pita pada tiap sampel tersebut secara tidak langsung juga menunjukkan susunan genetik yang berbeda pula pada tiap individu tanaman, karena enzim merupakan produk langsung dari gen dengan asam amino sebagai penyusunnya (Purwanto 2002).

Hubungan kekerabatan

Hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta ditentukan berdasarkan ciri morfologi, pola pita isozim, serta penggabungan ciri morfologi dengan pola pita isozim. Semakin sedikit persamaan yang dimiliki maka semakin jauh hubungan kekerabatannya, dan semakin banyak persamaan yang dimiliki maka semakin dekat hubungan kekerabatannya.

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan ciri morfologi

Hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta dapat ditentukan berdasarkan keragaman dan persamaan-persamaan ciri morfologi dari tanaman ganyong di masing-masing wilayah di eks-karesidenan Surakarta. Perbandingan ciri morfologi ganyong dapat dilihat pada Tabel 4. Dari data tersebut setelah dianalisis dengan menggunakan indeks similaritas (IS) diperoleh dendogram seperti tampak pada Gambar 4.

Berdasarkan dendogram yang diperoleh, dapat diketahui bahwa *C. hybrida* (I) terpisah dari tujuh sampel lain. Hal ini disebabkan karena *C. hybrida* merupakan spesies yang berbeda dari tujuh sampel lain yaitu ganyong (*C. edulis*). Adapun koefisien kemiripan *C. hybrida* (I) dengan ganyong sebesar 7,14%. Ganyong Wonogiri dan ganyong Sukoharjo mengelompok dengan koefisien kemiripan 44% yang merupakan koefisien kemiripan tertinggi, artinya ganyong Wonogiri memiliki hubungan kekerabatan paling dekat dengan ganyong Sukoharjo jika dilihat dari persamaan ciri morfologi yang dimiliki oleh keduanya.

Ganyong Wonogiri (III) dan Sukoharjo (VI) bergabung dengan ganyong Boyolali (V) pada koefisien kemiripan 42,8%. Pada nilai koefisien kemiripan yang sama, ganyong Surakarta (II) mengelompok dengan ganyong Karanganyar (VIII). Kedua kelompok tersebut kemudian bergabung dengan koefisien kemiripan sebesar

39,6%. Pada kelompok yang berbeda, terdapat ganyong Klaten (IV) dan Sragen (VII) dengan koefisien kemiripan sebesar 33,2%. Kelompok ini bergabung dengan kelompok sebelumnya pada koefisien kemiripan 32%.

Hubungan kekerabatan terdekat dimiliki oleh ganyong Wonogiri (III) dan Sukoharjo (VI) pada koefisien kemiripan 44%. Hal ini berarti dikarenakan keduanya lebih banyak memiliki kesamaan ciri morfologi yaitu petala bunga berwarna merah, sepala berwarna hijau kemerahan, batang warna hijau keunguan, warna sisik rimpang hijau keunguan, panjang daun < 50 cm, lebar daun \geq 15 cm, rasio panjang:lebar daun < 3, tinggi tanaman < 100 cm, diameter batang \geq 1,70 cm, diameter rimpang < 3,5 cm, diameter buah \geq 1,25 cm, dan seterusnya (lihat Tabel 1.). Sedangkan hubungan kekerabatan terjauh yaitu antara *C. hybrida* (I) dengan tujuh sampel lainnya pada koefisien kemiripan sebesar 7,14%.

Hal ini disebabkan karena *C. hybrida* memiliki ciri morfologi yang berbeda dengan tujuh sampel lain yang merupakan ganyong (*C. edulis*). *C. hybrida* dan ganyong terdapat dalam taksa yang sama yaitu genus *Canna* yang termasuk famili Cannaceae, dimana famili tersebut hanya memiliki satu genus yaitu *Canna* (Steenis 2008).

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan pola pita isozim

Hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta dapat ditentukan berdasarkan kemunculan pita isozim esterase, peroksidase, serta penggabungan keduanya.

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan pola pita isozim esterase

Kemunculan pita isozim esterase ganyong dapat dilihat pada Tabel 5. Dari data tersebut setelah dianalisis dengan menggunakan indeks similaritas (IS) diperoleh dendogram seperti tampak pada Gambar 5. Berdasarkan dendogram pada Gambar 5 dapat diketahui bahwa ganyong dari wilayah Wonogiri (III) dan Sukoharjo (VI) mengelompok dengan koefisien kemiripan 80%. Pada koefisien kemiripan yang sama ganyong dari wilayah Klaten (IV) dan Sragen (VII) mengelompok pada kelompok yang berbeda dari kelompok yang sebelumnya. Kedua kelompok tersebut bergabung dengan koefisien kemiripan sebesar 70%. Kelompok tersebut kemudian bergabung dengan ganyong dari wilayah Surakarta (II) pada koefisien kemiripan 60% dan

selanjutnya bergabung dengan ganyong dari wilayah Karanganyar (VIII) pada koefisien kemiripan 52,2%, dan kemudian ganyong dari wilayah Boyolali (V) bergabung pada kelompok tersebut dengan koefisien kemiripan sebesar 43,2% serta diikuti oleh *C. hybrida* (I) yang bergabung pada ketujuh sampel yang lain dengan koefisien kemiripan 37,14%.

Tabel 5. Perbandingan kemunculan pita isozim esterase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

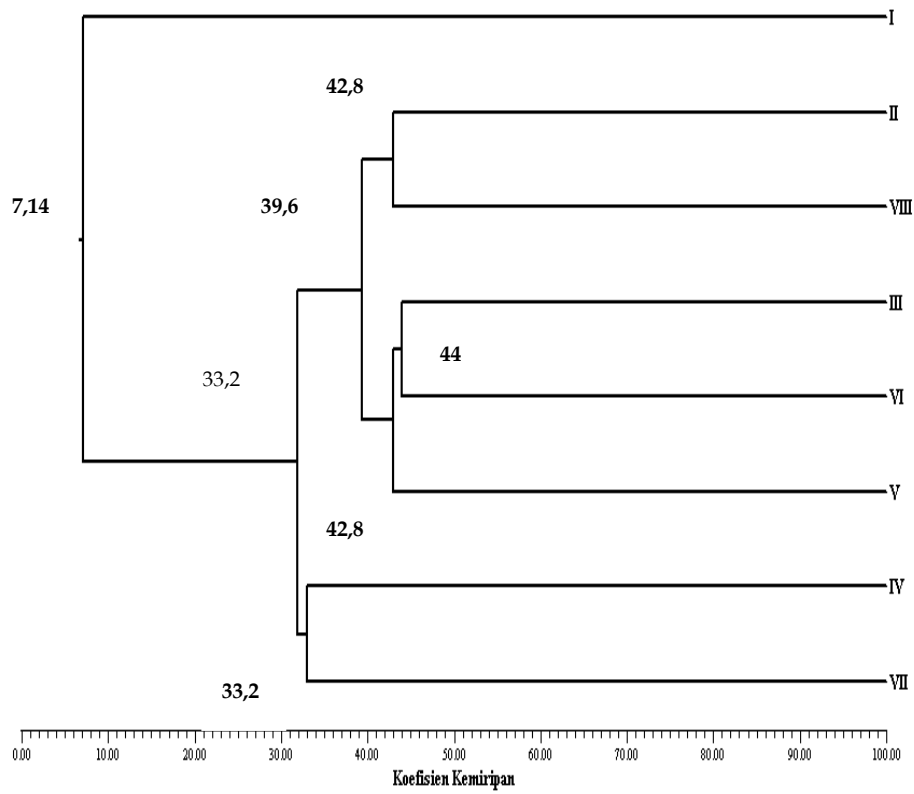
Rf	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
0,28	1	1	1	1	0	1	1	1
0,34	0	0	0	1	1	0	1	0
0,38	0	0	1	0	0	1	1	1
0,41	0	1	1	1	1	1	1	0

Keterangan: I = *C. hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar, 1 = ada, 0 = tidak ada

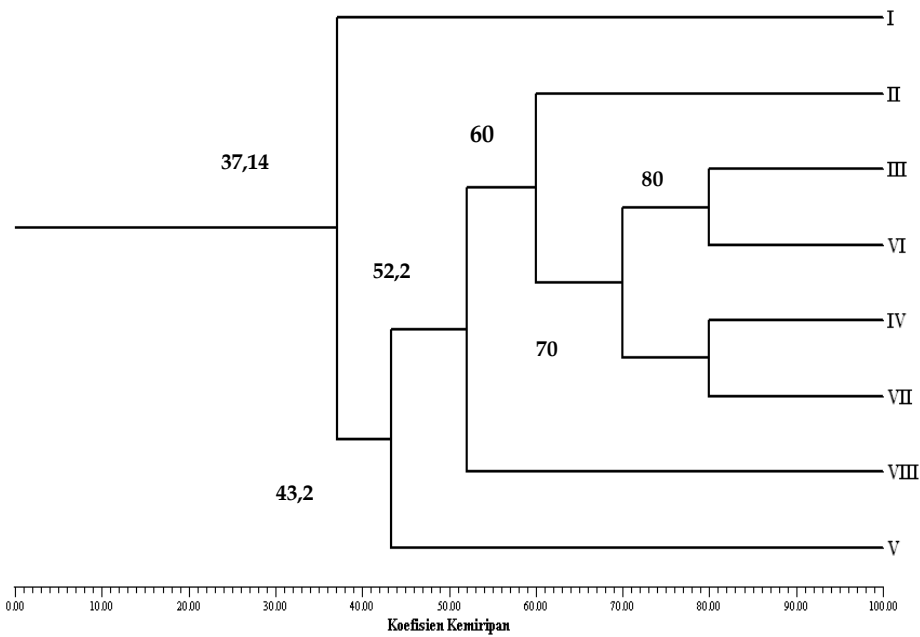
Tabel 4. Perbandingan ciri morfologi ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

Ciri Morfologi	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Daun hijau	1	0	0	0	0	0	0	0
Daun hijau keunguan	0	0	1	0	1	0	1	0
Daun ungu kehijauan	0	1	0	1	0	1	0	1
Petala bunga warna jingga bercorak kuning	1	0	0	0	0	0	0	0
Petala bunga warna merah (<i>red</i>)	0	1	1	0	1	1	1	1
Petala bunga warna merah gelap (<i>darkred</i>)	0	0	0	1	0	0	0	0
Sepala bunga warna hijau keputihan	1	0	0	0	0	0	0	0
Sepala bunga warna hijau kemerahan	0	1	1	1	1	1	1	1
Batang warna hijau	1	0	0	0	0	0	0	0
Batang warna hijau keunguan	0	1	1	1	1	1	1	1
Warna sisik rimpang hijau kecoklatan	1	0	0	0	0	0	0	0
Diameter batang $\geq 1,70$ cm	0	0	1	1	1	1	1	1
Diameter rimpang $< 3,5$ cm	1	0	1	0	1	1	0	0
Diameter rimpang $\geq 3,5$ cm	0	1	0	1	0	0	1	1
Diameter buah $< 1,25$ cm	1	1	0	1	0	0	1	1
Diameter buah $\geq 1,25$ cm	0	0	1	0	1	1	0	0
Jumlah biji dalam buah < 22	0	1	1	0	1	1	1	1
Jumlah biji dalam buah ≥ 22	1	0	0	1	0	0	0	0
Panjang sepala < 5 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang sepala ≥ 5 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar sepala < 1 cm	0	1	1	0	1	1	0	1
Lebar sepala ≥ 1 cm	1	0	0	1	0	0	1	0
Panjang petala < 7 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang petala ≥ 7 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar petala < 1 cm	0	1	1	0	1	0	0	1
Lebar petala ≥ 1 cm	1	0	0	1	0	1	1	0
Panjang staminodia < 6 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang staminodia ≥ 6 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar staminodia < 1 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Lebar staminodia ≥ 1 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Panjang putik < 6 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang putik ≥ 6 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar putik $< 0,5$ cm	0	1	1	1	1	1	0	1
Lebar putik $\geq 0,5$ cm	1	0	0	0	0	0	1	0
Panjang anter < 1 cm	1	0	1	1	1	1	0	1
Panjang anter ≥ 1 cm	0	1	0	0	0	0	1	0
Lebar anter $< 0,15$ cm	0	1	1	1	0	1	0	1
Lebar anter $\geq 0,15$ cm	1	0	0	0	1	0	1	0
Panjang bunga < 7 cm	0	1	1	1	1	1	0	1
Panjang bunga ≥ 7 cm	1	0	0	0	0	0	1	0
Diameter pangkal bunga $< 0,5$ cm	0	1	1	0	1	1	0	1
Diameter pangkal bunga $\geq 0,5$ cm	1	0	0	1	0	0	1	0
Sepala menekuk	1	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: I=*C. hybrida*, II=Surakarta, III=Wonogiri, IV=Klaten, V=Boyolali, VI=Sukoharjo, VII=Sragen, VIII=Karanganyar, 1=ada, 0=tidak ada.



Gambar 4. Dendrogram hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan ciri morfologi. I= *Canna hybrida*, II= Surakarta, III= Wonogiri, IV= Klaten, V= Boyolali, VI= Sukoharjo, VII= Sragen, VIII= Karanganyar.



Gambar 5. Dendrogram hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan pola pita isozim esterase. Keterangan: I = *Canna hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI= Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar

Hubungan kekerabatan terdekat adalah antara ganyong dari wilayah Wonogiri (III) dan Sukoharjo (VI) yang mengelompok dengan koefisien kemiripan 80%. Keduanya memiliki lebih banyak kesamaan pola pita isozim esterase yang muncul setelah dilakukan elektroforesis dan pewarnaan. Selain ganyong dari Wonogiri dan Sukoharjo, ganyong dari wilayah Klaten (IV) dan Sragen (VII) juga memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan koefisien kemiripan sebesar 80%. Sedangkan hubungan kekerabatan terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan ketujuh sampel lain seperti halnya pada dendogram berdasarkan ciri morfologi. Hal ini dikarenakan *C. hybrida* merupakan spesies yang berbeda dari ketujuh sampel yang lain yang merupakan ganyong.

Dendogram berdasarkan pola pita isozim esterase memiliki perbedaan dengan dendogram berdasarkan ciri morfologi sehingga hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta yang ditentukan berdasarkan ciri morfologi akan berbeda apabila dibandingkan dengan hubungan kekerabatan ganyong yang ditentukan berdasarkan pola pita isozim esterase.

Hal tersebut dikarenakan ciri morfologi tidak hanya dipengaruhi oleh faktor genetik tetapi juga dipengaruhi oleh lingkungan. Sitompul dan Guritno (1995) mengatakan bahwa penampilan bentuk tanaman dikendalikan oleh sifat genetik tanaman di bawah pengaruh faktor-faktor lingkungan. Faktor lingkungan yang diyakini dapat mempengaruhi terjadinya perubahan morfologi tanaman antara lain iklim, suhu, jenis tanah, kondisi tanah, ketinggian tempat, kelembapan.

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan pola pita isozim peroksidase

Kemunculan pita isozim peroksidase ganyong dapat dilihat pada Tabel 6. Dari data tersebut setelah dianalisis dengan menggunakan indeks similaritas (IS) diperoleh dendogram seperti tampak pada Gambar 6.

Berdasarkan dendogram tersebut dapat diketahui bahwa ganyong dari wilayah Wonogiri (III), Klaten (IV), Sragen (VII), dan Karanganyar (VIII) mengelompok pada koefisien kemiripan 67%. Ketiganya bergabung dengan ganyong Boyolali (V) pada koefisien kemiripan 50% dan kemudian bergabung dengan ganyong Sukoharjo (VI) pada koefisien kemiripan 46,6%. Sementara

itu *C. hybrida* (I) mengelompok dengan ganyong Surakarta (II) pada koefisien kemiripan 50%. Keduanya bergabung dengan enam sampel yang lain pada koefisien kemiripan sebesar 37,33%.

Hubungan kekerabatan terdekat dimiliki oleh ganyong dari wilayah Wonogiri (III), Klaten (IV), Sragen (VII), dan Karanganyar (VIII) yang mengelompok pada koefisien kemiripan sebesar 67%. Sedangkan hubungan kekerabatan terjauh dengan koefisien kemiripan 37,33% yaitu antara *C. hybrida* dan ganyong Surakarta dengan ganyong dari enam wilayah yang lain.

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan pola pita isozim esterase dan peroksidase

Kemunculan pita isozim esterase dan peroksidase ganyong dapat dilihat pada Tabel 7 di bawah ini. Dari data tersebut setelah dianalisis dengan menggunakan indeks similaritas (IS) diperoleh dendogram seperti tampak pada Gambar 7.

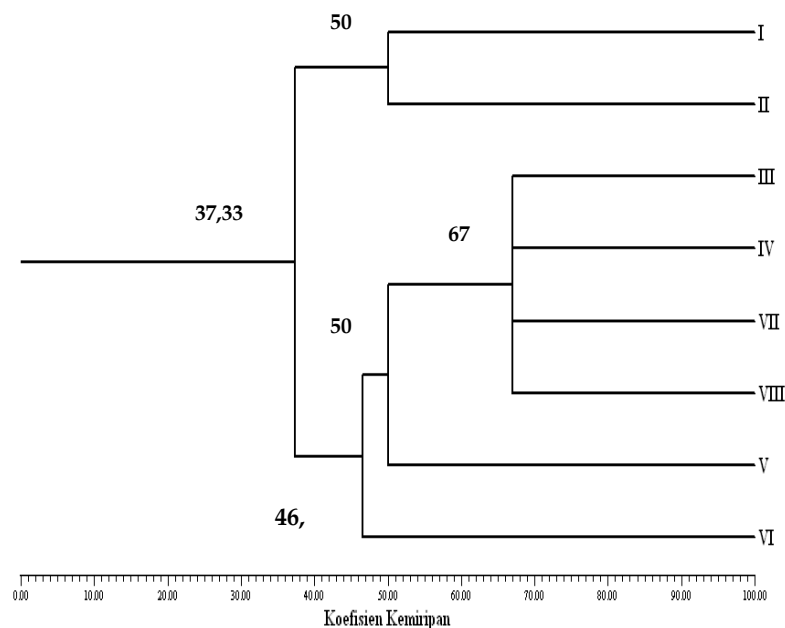
Berdasarkan dendogram tersebut dapat diketahui bahwa hubungan kekerabatan terdekat yaitu ganyong dari Wonogiri dan Sragen yang mengelompok pada koefisien kemiripan sebesar 73%. Keduanya bergabung dengan ganyong Klaten pada koefisien kemiripan 68,4%. Ganyong Sukoharjo mengelompok dengan ganyong Karanganyar pada koefisien kemiripan 64%. Ganyong Wonogiri, Sukoharjo, Klaten kemudian bergabung dengan ganyong Sukoharjo dan Karanganyar pada koefisien kemiripan 61%. Kelimanya kemudian bergabung dengan ganyong Surakarta pada koefisien kemiripan 51% dan kemudian bergabung dengan ganyong Boyolali pada koefisien kemiripan 43,6. Sedangkan pada hubungan kekerabatan terjauh yaitu *C. hybrida* dengan ketujuh sampel lain pada koefisien kemiripan 34,71%.

Hubungan kekerabatan terdekat dimiliki oleh ganyong Wonogiri dan Sragen dengan koefisien kemiripan 73%. Hal ini dikarenakan keduanya paling banyak memiliki kesamaan dalam kemunculan pola pita isozim. Sedangkan hubungan kekerabatan yang terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan sampel yang lain pada koefisien kemiripan 34,71% karena *C. hybrida* merupakan spesies yang berbeda dari sampel lain sehingga secara genetik pun menunjukkan adanya perbedaan yang tampak dari perbedaan pola pita isozim yang dihasilkan.

Tabel 6. Perbandingan kemunculan pita isozim peroksidase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

Rf	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,09	1	1	1	1	1	0	1	1
0,16	0	0	0	0	0	1	0	0
0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
0,38	0	0	1	1	1	1	1	1
0,41	1	1	0	0	0	0	0	0
0,44	0	1	1	1	0	1	1	1

Keterangan: I = *C. hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII= Karanganyar, 1 = ada, 0 = tidak ada



Gambar 6. Dendrogram hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan pola pita isozim peroksidase. I = *Canna hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar

Dendrogram berdasarkan pola pita isozim esterase, peroksidase, dan gabungan esterase dan peroksidase menunjukkan hasil yang berbeda. Hal ini dikarenakan sifat yang digunakan sebagai dasar penentu hubungan kekerabatan masih terbatas sehingga perlu dilakukan penambahan enzim lainnya. Menurut Purnomo (1994) dalam Hadiati dan Sukmadjaja (2002), untuk menelaah perbedaan individu dalam populasi disarankan paling sedikit menggunakan delapan macam enzim.

Hubungan kekerabatan ganyong berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim

Perbandingan ciri morfologi dan pola pita isozim ganyong dapat dilihat pada Tabel 8. Dari data tersebut setelah dianalisis dengan

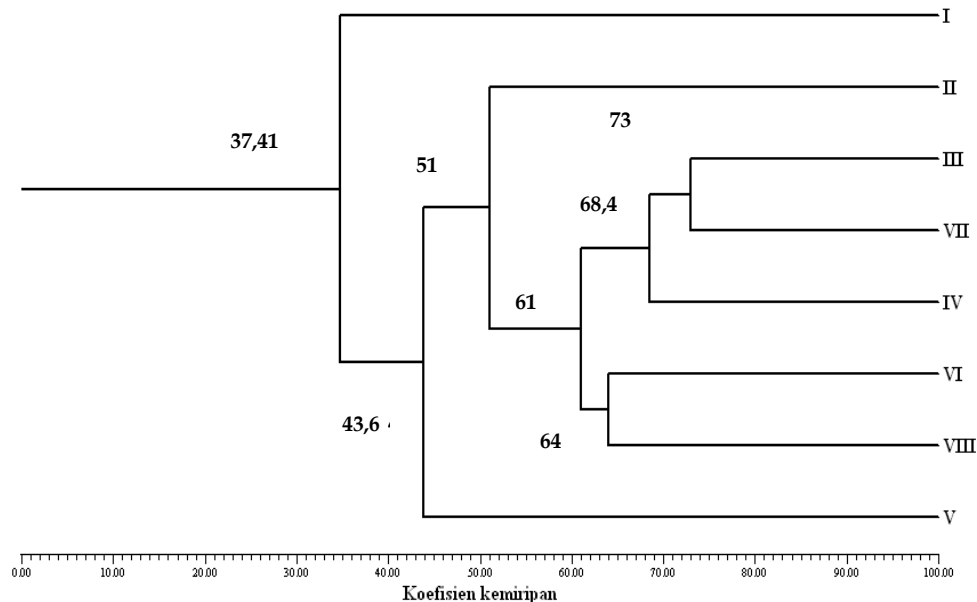
menggunakan indeks similaritas (IS) diperoleh dendrogram seperti tampak pada Gambar 8.

Dari dendrogram yang diperoleh dapat diketahui bahwa berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim, hubungan kekerabatan terdekat yaitu ganyong dari wilayah Wonogiri yang mengelompok dengan ganyong dari wilayah Sukoharjo pada koefisien kemiripan 48%. Ganyong Wonogiri dan ganyong Sukoharjo bergabung dengan ganyong Karanganyar pada koefisien kemiripan 45%. Ganyong Wonogiri, Sukoharjo, dan Karanganyar bergabung dengan ganyong Surakarta pada koefisien kemiripan 41,4%. Ganyong Wonogiri, Sukoharjo, Karanganyar, dan Surakarta bergabung dengan ganyong Boyolali pada koefisien kemiripan 40,4%. Sedangkan ganyong Klaten dan ganyong

Tabel 7. Kemunculan pita isozim esterase dan peroksidase ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

Rf	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
0,28	1	1	1	1	0	1	1	1
0,34	0	0	0	1	1	0	1	0
0,38	0	0	1	0	0	1	1	1
0,41	0	1	1	1	1	1	1	0
0,09	1	1	1	1	1	1	1	1
0,16	0	0	0	0	0	1	0	0
0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
0,38	0	0	1	1	1	1	1	1
0,41	1	1	0	0	0	0	0	0
0,44	0	1	1	1	0	1	1	1

Keterangan: I = *C. hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar, 1 = ada, 0 = tidak ada



Gambar 7. Dendrogram hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan pola pita isozim esterase dan peroksidase. Keterangan: I = *C. hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar

Sragen mengelompok pada koefisien kemiripan 40%. Keduanya bergabung dengan enam sampel sebelumnya pada koefisien kemiripan 36,6%. Sedangkan *C. hybrida* memiliki hubungan kekerabatan terjauh dari sampel yang lain yaitu dengan koefisien kemiripan 11,57%.

Ciri morfologi dan pola pita isozim yang digabung dan digunakan menjadi penentu hubungan kekerabatan memberikan hasil yang berbeda apabila keduanya digunakan tanpa penggabungan. Semakin banyak ciri yang digunakan untuk menentukan hubungan

kekerabatan, semakin besar pula peluang mendapatkan hasil dengan akurasi tinggi.

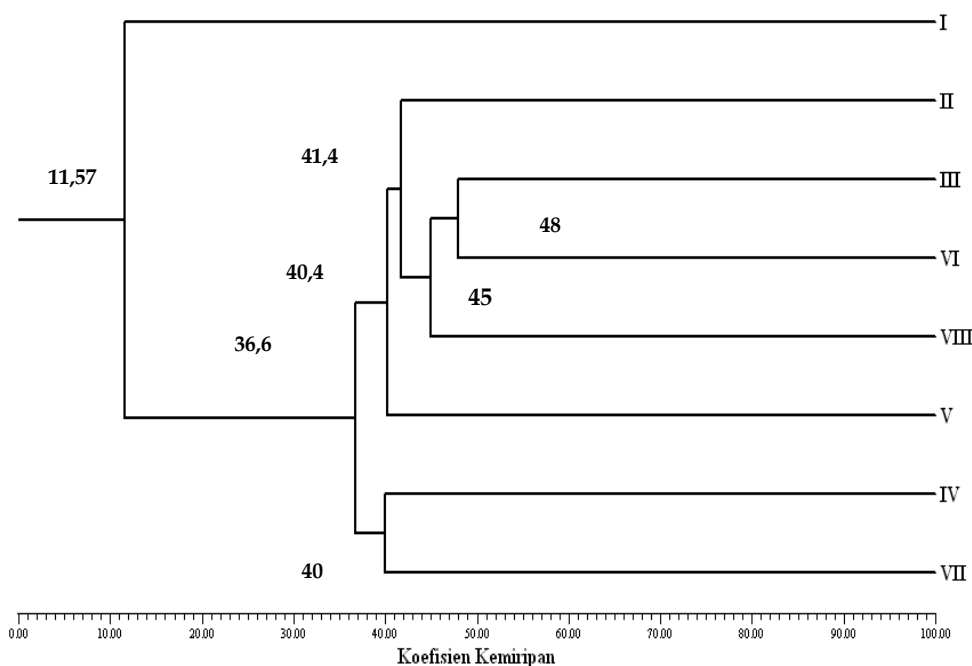
KESIMPULAN

Berdasarkan ciri morfologi, ganyong Wonogiri dan ganyong Sukoharjo memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan koefisien kemiripan 44%, sedangkan hubungan kekerabatan terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan sampel yang lain pada koefisien kemiripan 7,14%. Berdasarkan pola pita isozim,

Tabel 8. Perbandingan ciri morfologi dan pola pita isozim ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta

Parameter	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Daun hijau	1	0	0	0	0	0	0	0
Daun hijau keunguan	0	0	1	0	1	0	1	0
Daun ungu kehijauan	0	1	0	1	0	1	0	1
Petala bunga warna jingga bercorak kuning	1	0	0	0	0	0	0	0
Petala bunga warna merah (<i>red</i>)	0	1	1	0	1	1	1	1
Petala bunga warna merah gelap (<i>darkred</i>)	0	0	0	1	0	0	0	0
Sepala bunga warna hijau keputihan	1	0	0	0	0	0	0	0
Sepala bunga warna hijau kemerahan	0	1	1	1	1	1	1	1
Batang warna hijau	1	0	0	0	0	0	0	0
Batang warna hijau keunguan	0	1	1	1	1	1	1	1
Warna sisik rimpang hijau kecoklatan	1	0	0	0	0	0	0	0
Warna sisik rimpang hijau keunguan	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang daun < 50 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang daun ≥ 50 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar daun < 15 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar daun ≥ 15 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Rasio panjang:lebar daun < 3	0	1	1	1	1	1	1	1
Rasio panjang:lebar daun ≥ 3	1	0	0	0	0	0	0	0
Tinggi tanaman < 100 cm	0	1	1	0	1	1	1	1
Tinggi tanaman ≥ 100 cm	1	0	0	1	0	0	0	0
Diameter batang < 1,70 cm	1	1	0	0	0	0	0	0
Diameter batang ≥ 1,70 cm	0	0	1	1	1	1	1	1
Diameter rimpang < 3,5 cm	1	0	1	0	1	1	0	0
Diameter rimpang ≥ 3,5 cm	0	1	0	1	0	0	1	1
Diameter buah < 1,25 cm	1	1	0	1	0	0	1	1
Diameter buah ≥ 1,25 cm	0	0	1	0	1	1	0	0
Jumlah biji dalam buah < 22	0	1	1	0	1	1	1	1
Jumlah biji dalam buah ≥ 22	1	0	0	1	0	0	0	0
Panjang sepala < 5 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang sepala ≥ 5 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar sepala < 1 cm	0	1	1	0	1	1	0	1
Lebar sepala ≥ 1 cm	1	0	0	1	0	0	1	0
Panjang petala < 7 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang petala ≥ 7 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar petala < 1 cm	0	1	1	0	1	0	0	1
Lebar petala ≥ 1 cm	1	0	0	1	0	1	1	0
Panjang staminodia < 6 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang staminodia ≥ 6 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar staminodia < 1 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Lebar staminodia ≥ 1 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Panjang putik < 6 cm	0	1	1	1	1	1	1	1
Panjang putik ≥ 6 cm	1	0	0	0	0	0	0	0
Lebar putik < 0,5 cm	0	1	1	1	1	1	0	1
Lebar putik ≥ 0,5 cm	1	0	0	0	0	0	1	0
Panjang anter < 1 cm	1	0	1	1	1	1	0	1
Panjang anter ≥ 1 cm	0	1	0	0	0	0	1	0
Lebar anter < 0,15 cm	0	1	1	1	0	1	0	1
Lebar anter ≥ 0,15 cm	1	0	0	0	1	0	1	0
Panjang bunga < 7 cm	0	1	1	1	1	1	0	1
Panjang bunga ≥ 7 cm	1	0	0	0	0	0	1	0
Diameter pangkal bunga < 0,5 cm	0	1	1	0	1	1	0	1
Diameter pangkal bunga ≥ 0,5 cm	1	0	0	1	0	0	1	0
Sepala menekuk	1	0	0	0	0	0	0	0
Sepala tidak menekuk	0	1	1	1	1	1	1	1
Rf 0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
Rf 0,28	1	1	1	1	0	1	1	1
Rf 0,34	0	0	0	1	1	0	1	0
Rf 0,38	0	0	1	0	0	1	1	1
Rf 0,41	0	1	1	1	1	1	1	0
Rf 0,09	1	1	1	1	1	1	1	1
Rf 0,16	0	0	0	0	0	1	0	0
Rf 0,22	1	1	1	1	1	1	1	1
Rf 0,38	0	0	1	1	1	1	1	1
Rf 0,41	1	1	0	0	0	0	0	0
Rf 0,44	0	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan: I = *C. hybrida*, II= Surakarta, III= Wonogiri, IV=Klaten, V= Boyolali, VI= Sukoharjo, VII= Sragen, VIII= Karanganyar



Gambar 8. Dendrogram hubungan kekerabatan ganyong di wilayah eks-karesidenan Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim. Keterangan: I = *C. hybrida*, II = Surakarta, III = Wonogiri, IV = Klaten, V = Boyolali, VI = Sukoharjo, VII = Sragen, VIII = Karanganyar

ganyong Wonogiri dan Sragen memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan koefisien kemiripan 73%, dan hubungan kekerabatan yang terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan sampel yang lain pada koefisien kemiripan 34,71%. Adapun berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim, ganyong Wonogiri dan ganyong Sukoharjo memiliki hubungan kekerabatan terdekat dengan koefisien kemiripan 48%, sedangkan hubungan kekerabatan terjauh yaitu antara *C. hybrida* dengan sampel yang lain pada koefisien kemiripan 11,57%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abulias MN, Bhagawati D. 2008. Studi Awal Keragaman Genetik Ikan Betutu (*Oxyeleotris* sp.) di Waduk Penjalin Menggunakan Lima Macam Isozim. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II. Universitas Lampung, Lampung.
- Bhagawati D, Abulias MN, Susanto AH. 2008. Analisis Kekerabatan Filogenetik Udang Windu Berdasarkan Pola Pita Isozim. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II. Universitas Lampung, Lampung.
- Cahyarini RD, Yunus A, Purwanto E. 2004. Identifikasi keragaman genetik beberapa varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isozim. *Agrosains* 6 (2): 79-83.
- Flach M, Rumawas F. 1996. Plant Resources of South East Asia No. 9. Plants Yielding Non-Seed Carbohydrates. H Backhuys Publishers, Leiden
- Hadiati S, Sukmadjaja D. 2002. Keragaman pola pita beberapa varietas nenas berdasarkan analisis isozim. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* 7 (20): 62-70.
- Haryo. 2009. Info Geografis Surakarta. <http://surakarta.go.id/> [26 Juli 2010].
- Indriani FC, Sudjindro, Sugiharto AN, Soetopo L. 2008. Keragaman genetik plasma nutfah kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dan beberapa spesies yang sekerabat berdasarkan analisis isozim. *Agritek* 6 (9): 1793-1802.
- Julisaniah NI, Sulistyowati L, Sugiharto AN. 2008. Analisis kekerabatan mentimun (*Cucumis sativus* L.) menggunakan metode RAPD-PCR dan isozim. *Biodiversitas* 9 (2): 99-102.
- Maideliza T, Mansyurdin. 2007. Keragaman alel gadung liar (*Dioscorea bulbifera* L.) di Sumatera Barat. *Makara Sains* 11 (1): 23-27.
- Nuryadin A. 2008. Budidaya Ganyong. <http://featikabsinjai.blogspot.com/2008/10/budidaya-ganyong.html> (24 Maret 2011)
- Purwanto E, Sukaya, Setianto A, Santoso H. 2002. Identifikasi berdasarkan penanda isozim terhadap plasma nutfah jeruk besar (*Citrus maxima* Merr.) di Blora, Jawa Tengah. *BioSMART* 4 (2): 44-47.
- Rohlf FJ. 1993. NTSYS-pc. Numerical taxonomical and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, New York, USA.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. Analisis Pertumbuhan Tanaman. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Steenis CGGJ van. 2008. Flora Untuk Sekolah di Indonesia. Cetakan Kedua Belas. (diterjemahkan oleh Moeso Surjowinoto, et al.). Pradnya Paramita, Jakarta.

- Sulistiyono E, Sutarno, Moria SB. 2005. Variasi genetik udang putih (*Penaeus merguensis* de Man) di Juwana dan Banyuwangi berdasarkan data elektroforesis enzim. *Bioteknologi* 2 (1): 1-8.
- Suranto. 2000. Electrophoresis Studies of *Ranunculus triplodontus* populations.
- Suranto. 2002. Cluster analysis of *Ranunculus* species. *Biodiversitas* 3 (1): 201-206.
- Wardani S, Sugiyarto. 2009. Characterization of white grubs (Melolonthidae: Coleoptera) at salak pondoh agroecosystem in Mount Merapi based on isozymic banding patterns. *Nusantara Biosci* 1: 38- 42.
- Yunus A. 2007. Identification of genetic diversity of jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) in Central Java based on isoenzyme marker. *Biodiversitas* 8 (3): 249-252



Perubahan biokimiawi stakiosa dan asam lemak esensial pada tempe kedelai (*Glycine max*) selama proses fermentasi

RULLY TRIWIBOWO, M.A.M. ANDRIANI[✉],
SETYANINGRUM ARIVIANI

Triwibowo R, Andriani M.A.M., Ariviani S. 2016. The stakiosa and essential fatty acids biochemical changes in soybean tempeh (Glycine max) during fermentation process. Bioteknologi 13: 34-41. Soybean tempeh is a food that is known by the people of Indonesia. It is known to have levels of stakiosa which causes flatulensi lower than soybean. It is also known to have levels of essential fatty acids (oleic acid, linoleic, and linolenic), which is higher than soybean. This study aims to determine changes in levels of stakiosa and essential fatty acids (oleic acid, linoleic, and linolenic) during the fermentation process. The determination of stakiosa used High Performance Liquid Chromatography method (AOAC 1999). The determination of essential fatty acids include oleic acid, linoleic, and linolenic used Gas Chromotograpy method (Park and Goins 1994). This research are expected to provide an alternative optimal fermentation time observed from the lowest level of stakiosa and the high level of essential fatty acid. The results showed that stakiosa levels of soybean tempeh decreased over the longer fermentation. The percentage of the highest decrease level of stakiosa found in 24 hours fermentation. While changes in level of oleic acid, linoleic acid, and linolenic acid in soybean tempeh fermentation for 96 hours has the same pattern. The lowest level of essential fatty acids found in 48 hours fermentation time and the highest in 96 hours fermentation.

♥Alamat korespondensi:

Program Studi Teknologi Hasil
Pertanian, Fakultas Pertanian,
Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir.
Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa
Tengah, Indonesia. Tel./Fax.: +62-
271-637457

Manuskrip diterima: 16 Juni 2015.
Revisi disetujui: 7 April 2016.

Keywords: Essential fatty acids, *Glycine max*, soybean, stakiosa, tempeh

Triwibowo R, Andriani M.A.M., Ariviani S. 2016. Perubahan biokimiawi stakiosa dan asam lemak esensial pada tempe kedelai (Glycine max) selama proses fermentasi. Bioteknologi 13: 34-41. Tempe kedelai merupakan makanan yang sangat dikenal oleh masyarakat Indonesia. Tempe kedelai diketahui mempunyai kadar stakiosa penyebab terjadinya flatulensi yang lebih rendah dibanding kedelai. Tempe kedelai juga diketahui mempunyai kadar asam lemak esensial (asam oleat, linoleat, dan linolenat) yang lebih tinggi dibanding kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui perubahan kadar stakiosa dan asam lemak esensial (asam oleat, linoleat dan linolenat) selama proses fermentasi. Penentuan stakiosa menggunakan metode *High Performance Liquid Chromatography* (AOAC 1999). Penentuan kadar asam lemak esensial meliputi asam oleat, linoleat dan linolenat menggunakan metode *Gas Chromotograpy* (Park dan Goins 1994). Melalui penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif waktu fermentasi yang optimal ditinjau dari kadar stakiosa yang paling rendah dan kadar asam lemak esensial yang tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar stakiosa tempe kedelai semakin menurun seiring semakin lama fermentasi. Persentase penurunan kadar stakiosa tertinggi pada 24 jam waktu fermentasi. Sedangkan perubahan kadar asam oleat, asam linoleat maupun asam linolenat tempe kedelai selama 96 jam fermentasi mempunyai pola yang sama. Kadar asam lemak esensial terendah terdapat pada 48 jam waktu fermentasi dan tertinggi pada 96 jam waktu fermentasi.

Kata kunci: Asam lemak esensial, *Glycine max*, kedelai, stakiosa, tempe

PENDAHULUAN

Tempe adalah produk fermentasi yang amat dikenal oleh masyarakat Indonesia dan telah mulai digemari pula oleh berbagai kelompok masyarakat di dunia. Tempe dapat dibuat dari berbagai bahan, tetapi yang biasanya dikenal sebagai tempe ialah tempe yang dibuat dari kedelai (Kasmidjo 1990).

Melalui proses fermentasi, tempe kedelai menjadi lebih enak dan meningkat nilai nutrisinya. Tempe yang masih baru (baik) memiliki rasa dan bau yang spesifik. Fermentasi tempe mampu menghilangkan zat-zat yang tidak diinginkan yang terdapat pada kedelai (Astawan 2004).

Tempe kedelai merupakan makanan berbahan baku kedelai yang dibuat dari proses fermentasi yang pada umumnya menggunakan aktivitas beberapa jenis kapang *Rhizopus*, seperti *Rhizopus oligosporus* dan *Rhizopus oryzae*. Kandungan gizi tempe kedelai tidak kalah dengan pangan lainnya yaitu karbohidrat, lemak dan protein yang cukup tinggi serta mudah dicerna oleh tubuh (Anwar et al. 1994).

Namun begitu, masih ada kandungan pada tempe kedelai yang berpotensi merugikan kesehatan manusia, yaitu adanya oligosakarida (stakiosa dan rafinosa,) yang dapat menyebabkan flatulensi (Astawan 2004).

Dilaporkan bahwa *Rhizopus oryzae*, mensekresi enzim amilase yang dapat mendegradasi senyawa-senyawa karbohidrat dan senyawa-senyawa penyebab flatulen pada tempe. Sementara *Rhizopus oligosporus* menghasilkan enzim α -galaktosidase yang mampu memetabolisasikan senyawa oligosakarida penyebab flatulen tersebut sehingga terdegradasi. Dilaporkan juga bahwa dalam usar (nama umum inokulasi pada tempe yang berupa daun) dari Malang, Jawa Timur dijumpai *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus arrizus* dan *Mucor rouxii* sedangkan dalam starter tempe dari Solo (Surakarta) didapatkan *Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus stolonifer* (Kasmidjo 1990; Rehmz dan Barz 1995, Wiesel et al. 1997; Feng 2006).

Lemak dalam biji kedelai merupakan senyawa cadangan energi yang terdiri dari trigliserida dengan sedikit fosfolipida (termasuk lesitin) dan senyawa senyawa derivat trigliserida seperti zat warna, sterol dan tokoferol (Kasmidjo 1990).

Selama fermentasi tempe terjadi proses degradasi lemak oleh kapang, sehingga akhirnya dapat dibebaskan menjadi asam lemak,

komponen utama asam lemak dari trigliserida tempe kedelai adalah asam lemak tak jenuh yang merupakan asam lemak esensial, yaitu didominasi oleh asam linoleat, asam linolenat dan asam oleat. Asam linoleat berperan dalam pertumbuhan, pemeliharaan membran sel, pengaturan metabolisme kolesterol, menurunkan tekanan darah, menghambat lipogenesis hepatic, transport lipid, precursor dalam sintesis prostaglandin, membentuk arakhidonat dan dalam proses reproduksi (Pudjiadi 1997), sedangkan asam lemak jenuh komponen trigliserida kedelai ialah asam palmitat dan asam stearat.

Dilaporkan bahwa lebih dari sepertiga lemak netral dari kedelai terhidrolisis oleh enzim lipase yang dihasilkan oleh aktivitas *Rhizopus oligosporus* selama fermentasi (Sutedja dan Djakamihardja 1978).

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu adanya penelitian tentang perubahan kadar biokimiawi stakiosa (sumber penyebab terjadinya flatulensi) serta asam lemak esensial yang didominasi oleh asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat akibat aktivitas ragi atau mikrobia pada tempe kedelai selama berbagai periode waktu fermentasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: kedelai kuning (*Glycine max*) asal Amerika (impor) yang diperoleh dari toko Regen, dan ragi tempe merk RAPRIMA dari PT. Aneka Fermentasi Industri (AFI), Bandung Barat, Jawa Barat.

Untuk mengukur kadar oligosakarida digunakan seperangkat HPLC, standar oligosakarida, serta pelarut sampel. Untuk mengukur kadar asam tak jenuh (esensial) digunakan seperangkat GC, standar asam lemak, serta pelarut sampel.

Pembuatan tempe

Metode dasar yang dipakai untuk membuat tempe kedelai pada penelitian ini merujuk pada referensi dari Kasmidjo (1990) dan Cahyadi (2006). Sebelum dibuat tempe, kedelai perlu mendapatkan perlakuan pendahuluan, yakni harus direbus 25 menit, kemudian direndam selama \pm 24 jam. Setelah itu, kedelai ditiriskan dan dicuci dengan air untuk mengupas kulitnya kemudian biji kedelai dibelah dan dicuci

kembali, lalu direbus lagi selama 25 menit, selanjutnya diinokulasi (peragian).

Analisis sampel

Analisis kandungan oligosakarida menggunakan analisis HPLC dan asam lemak menggunakan analisis GC.

Pengujian kadar stakiosa

Kedelai sebagai bahan baku dalam pembuatan tempe kedelai mempunyai senyawa yang merugikan sistem metabolisme dan pencernaan dalam tubuh manusia diantaranya adalah stakiosa. Selama fermentasi oleh mikroorganisme mengalami degradasi membentuk senyawa-senyawa sederhana, sehingga efek negatif tersebut dapat dikurangi atau dihilangkan. Di dalam kedelai terkandung 1,3%-3,8% (total berat kering) senyawa oligosakarida yang terdiri dari stakiosa dan rafinosa. Senyawa tersebut memiliki ikatan α -galaktosidik sehingga tidak tercerna dalam sistem pencernaan manusia dan dapat menyebabkan efek flatulensi (Soetrisno 1995).

Untuk pengujian kadar stakiosa, digunakan alat-alat sebagai berikut.: HPLC, Sentrifuse, Tabung reaksi bertutup, Pipet 5 mL, Vortex, Waterbath. Bahan-bahan yang digunakan: Sampel tempe, Pb Asetat, Aquadest, Standar stakiosa (Sigma).

Penentuan kadar gula dianalisis dengan HPLC (AOAC 1999): 3 g sampel tempe ditambah 5 mL Aquadest lalu dihomogenisasi selanjutnya ditambah Pb Asetat tetes demi tetes hingga jernih kemudian diencerkan hingga 10 mL dan disaring dengan kertas saring Whatman 0,45 μ m. Selanjutnya dimasukkan ke injector HPLC sebanyak 20 μ L. Untuk perhitungan konsentrasi gula yang ada pada bahan, dilakukan pembuatan kromatogram standar. Sedangkan berat standar stakiosa ditimbang sebesar 6 mg/mL dalam perbandingan pengenceran 10: 1.

Kondisi analisis stakiosa dengan HPLC:

SHIMADZU ©

Kolom: C:18

Flow rate: 0,75 mL/menit

Detektor: RID (Reflective Index Detector) 156

Mobile Phase: Aquadest Dmin Bebas Ion; atau Aquabides.

Konsentrasi Pb Asetat 10% C dengan tekanan pompa saat operasi 344 psi°

Suhu: 60° C

Suhu kolom: 60° C

Waktu: 15 menit

Pengujian kadar asam lemak

Untuk pengujian kadar asam lemak alat-alat yang digunakan: Gas Chromatography, sentrifuse, tabung reaksi bertutup, pipet 5 mL, Vortex, Waterbath. Bahan-bahan yang digunakan: sampel tempe, NaOH 0,5N p.a (E. Merck), n Heksan 1 mL, BF₃-methanol, Standar internal (Supelco), Methanol.p.a (E. Merck).

Penentuan komposisi asam lemak (Park dan Goins 1994): setelah sampel tempe dipreparasi, diambil sebanyak 0,5-0,7 g kemudian dilarutkan dalam 4 mL akuades lalu dihomogenisasi. Homogenat diambil sebanyak 100 μ L lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Pada sampel ditambahkan larutan 100 μ L metilen klorida dan 1 mL NaOH 0,5 N dalam metanol. Setelah diberi gas nitrogen dan ditutup, tabung reaksi dipanaskan dalam penangas air suhu 90° C selama 10 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan, ditambahkan BF₃-methanol (14%) sebanyak 1 mL. Setelah diberi gas nitrogen, pemanasan dilanjutkan pada suhu yang sama selama 10 menit. Tabung reaksi kemudian didinginkan pada suhu ruang dan ditambah 1 mL akuades dan 200-500 μ L heksana dan divortex selama 1 menit untuk mengekstrak metil ester asam lemak. Setelah disentrifugasi, lapisan atas siap untuk analisis GC. Sampel siap diinjeksikan 1 μ L sebanyak pada Gas Chromatography. Sedangkan untuk volume inject standar yaitu sebesar 3 μ L.

Kondisi analisis dengan GC (*Gas Chromatography*):

Kolom: DE-65 (Agilent Technologies, USA), 2 m

Carrier gas: Nitrogen dengan tekanan 1,5 kg/cm²

Suhu injector: 250° C

Suhu kolom/oven Terprogram: 150-200° C

Kenaikan suhu: 8° C/minute

Injeksi sebanyak: 1 μ L

Rancangan percobaan dan analisis data

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap satu faktor, yaitu variasi periode waktu fermentasi yang terdiri dari 5 taraf: jam ke 0, 24, 48, 72, 96. Data hasil penelitian dianalisis kemudian dibahas secara deskriptif melalui grafik dengan parameter waktu periode fermentasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar stakiosa

Kedelai sebagai bahan baku dalam pembuatan tempe kedelai mempunyai senyawa yang merugikan sistem metabolisme dan pencernaan dalam tubuh manusia diantaranya adalah stakiosa. Selama fermentasi oleh mikroorganisme, tempe mengalami degradasi membentuk senyawa-senyawa sederhana, sehingga efek negatif tersebut dapat dikurangi atau dihilangkan. Di dalam kedelai terkandung 1,3-3,8% (total berat kering) senyawa oligosakarida yang terdiri dari stakiosa dan rafinosa. Senyawa tersebut memiliki ikatan α -galaktosidik sehingga tidak tercerna dalam sistem pencernaan manusia dan dapat menyebabkan efek flatulensi (Soetrisno 1995).

Berdasarkan hasil penelitian maka diperoleh grafik seperti yang terlihat pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1 diketahui bahwa kadar stakiosa menurun seiring dengan semakin lama waktu fermentasi. Menurut Winarno (1980) selama fermentasi terjadi penurunan kadar stakiosa akibat terdegradasi oleh enzim α -galaktosidase yang disekresikan mikroba (*Rhizopus oligosporus*).

Perlakuan perendaman dan perebusan dapat menyebabkan pengurangan kadar kandungan gula utama pada kedelai yaitu stakiosa, rafinosa dan sukrosa berturut-turut sebesar 51%, 48% dan 41% dari kadar awalnya. Stakiosa akan berkurang lebih lanjut selama fermentasi oleh jamur tempe, menjadi kira-kira 30% kadar stakiosa kedelai mentah (Kasmidjo 1990; Handajani 1992).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka diketahui bahwa persentase penurunan kadar stakiosa tempe kedelai pada berbagai periode waktu fermentasi berbeda-beda. Data selengkapnya disajikan pada Tabel 1.

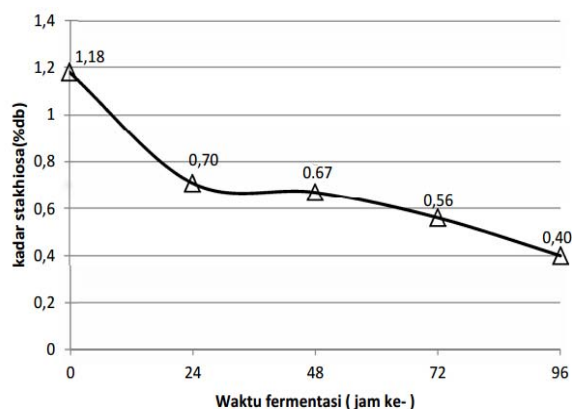
Menurut Hermana (1996), setelah inkubasi 12 jam fermentasi kedelai menjadi tempe, *Rhizopus oligosporus* mensekresi enzim α -galaktosidase yang memiliki kemampuan untuk mendegradasi senyawa-senyawa penyebab flatulen menjadi disakarida dan monosakarida.

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa pada periode waktu fermentasi 24 jam pertama terjadi penurunan persentase kadar stakiosa paling besar dibanding periode waktu fermentasi lainnya. Penurunan kadar stakiosa pada berbagai periode waktu fermentasi berturut turut dari yang terbesar yaitu 40,67% pada 24 jam waktu fermentasi, 28,57% pada 96 jam waktu

fermentasi, 16,41% pada 72 jam waktu fermentasi, dan 4,28% pada 48 jam waktu fermentasi. Persentase penurunan kadar stakiosa dari 0 jam hingga 96 jam waktu fermentasi tempe kedelai sebesar 66,10%. Menurut Kasmidjo (1990), stakiosa dapat didegradasi oleh enzim α -galaktosidase menjadi sukrosa, glukosa dan galaktosa. Persentase penurunan kadar stakiosa terendah terdapat pada 48 jam waktu fermentasi, hal ini dikarenakan bahwa *Rhizopus oligosporus* memanfaatkan monosakarida dan disakarida (hasil degradasi 24 jam fermentasi) dengan baik sebagai pendorong terjadinya pertumbuhan spora *Rhizopus oligosporus*. (Hesseltine 1965).

Kadar asam lemak esensial

Di dalam kedelai terkandung kadar asam lemak esensial sebesar 85% yang terdiri dari asam linoleat (15-64%), asam oleat (11-60%) dan asam linoleat (1-12%) (Bailey 1950; Ketaren 1986).



Gambar 1. Grafik kadar stakiosa tempe kedelai pada berbagai periode waktu fermentasi

Tabel 1. Kadar stakiosa dan persentase penurunan kadar stakiosa tempe kedelai pada berbagai periode waktu fermentasi

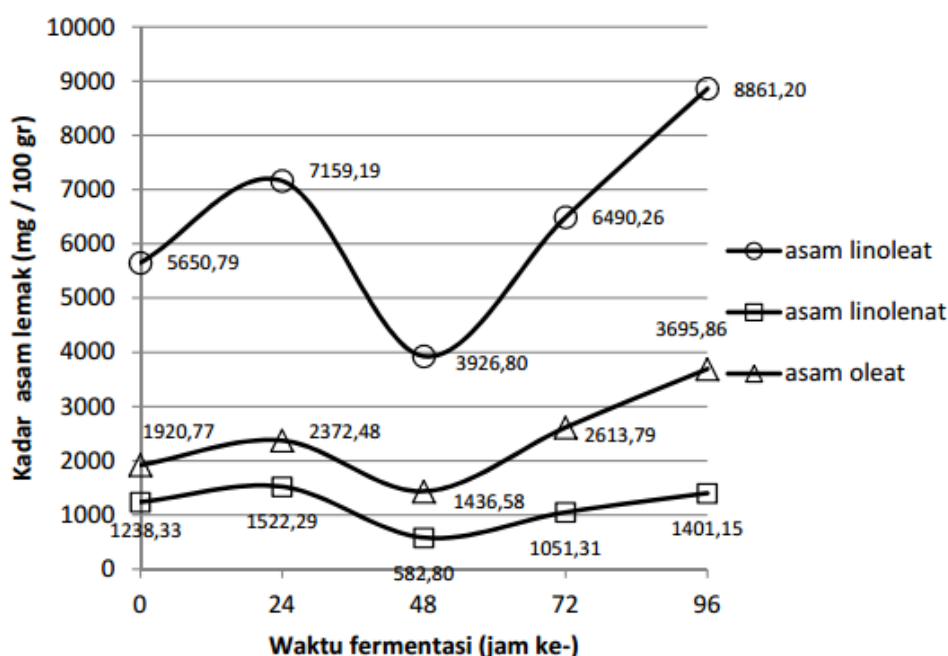
Waktu fermentasi (jam)	Kadar stakiosa (% berat kering)	Penurunan kadar stakiosa
0	1,18%	0
24	0,70%	40,67%
48	0,67%	4,28%
72	0,56%	16,41%
96	0,40%	28,57%

Selama fermentasi tempe kedelai terjadi proses degradasi lemak oleh kapang, sehingga akhirnya dapat dibebaskan menjadi asam lemak. Komponen utama asam lemak dari trigliserida tempe kedelai adalah asam lemak tak jenuh yang merupakan asam lemak esensial, yaitu didominasi oleh asam linoleat, asam linolenat dan asam oleat. Asam.

Menurut Hesseltine (1965) dan Wagenknecht et al. (1961) perubahan asam lemak pada kedelai menjadi tempe terjadi selama fermentasi. Asam lemak netral dalam kacang kedelai mengandung asam palmitat, stearat, oleat, linoleat, dan asam

linolenat, dimana asam linoleat terdapat paling banyak. Dalam penelitian sebelumnya oleh Deliani (2008) dapat dijelaskan bahwa kadar asam miristat, asam stearat, asam palmitoleat, asam arakidat, asam gadoleinat dan asam behenat masing - masing tidak terdapat perbedaan yang nyata. Hal ini disebabkan asam-asam lemak tersebut sedikit sekali terdapat dalam kedelai.

Penentuan kadar asam lemak menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Asam lemak esensial tempe kedelai pada berbagai periode waktu fermentasi disajikan pada Gambar 2 dan Tabel 2.



Gambar 2. Kadar asam lemak esensial tempe kedelai pada berbagai periode waktu fermentasi

Tabel 2. Kadar asam lemak esensial dan persentase perubahan kadar asam lemak esensial tempe kedelai pada berbagai waktu fermentasi

Waktu fermentasi (jam)	Kadar asam lemak esensial (mg / 100 g bahan kering)			Kadar asam lemak esensial (% perubahan)		
	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1	C18:2	C18:3
0	1920,77	5650,79	1238,33	0	0	0
24	2372,48	7159,19	1522,29	+ 23,51%	+26,69%	+ 22,93%
48	1436,58	3926,80	582,80	-39,44%	-45,15%	- 61,71%
72	2613,79	6490,26	1051,31	+ 81,94%	+65,28%	+ 80,38%
96	3695,86	8861,20	1401,15	+ 41,39%	+36,53%	+ 33,27%

Gambar 2 memperlihatkan bahwa selama fermentasi, terjadi pola perubahan kadar asam lemak yang sama, baik untuk asam oleat (C18:1), asam linoleat (C18:2) maupun asam linolenat (C18:3). Pada 24 jam fermentasi terjadi peningkatan kadar asam lemak esensial, setelah 48 jam fermentasi terjadi penurunan asam lemak esensial, selanjutnya terjadi peningkatan kadar asam lemak esensial lagi pada 72 jam fermentasi dan 96 jam fermentasi.

Fermentasi menyebabkan penurunan kandungan lemak kedelai sebesar 0,8%-2,8%. (Wang et al. 1965; Murata et al. 1971). Kadar lemak berkurang selama proses fermentasi akibat hidrolisis lipida menjadi asam lemak- asam lemak bebas dan gliserol oleh aktivitas enzim lipase yang disekresikan oleh mikrobia (*Rhizopus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus*) (Muchtadi 1978; Deliani 2008).

Tempe dan kedelai mengandung banyak asam lemak esensial, terutama asam linoleat (Wagenknecht et al. 1961). Dalam penelitian ini, dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 2 bahwa asam linoleat mempunyai kadar tertinggi dari asam lemak-asam lemak lainnya.

Pola peningkatan kadar asam lemak esensial yang terjadi pada jam ke 24, 72 dan 96 jam waktu periode fermentasi disebabkan karena adanya pertumbuhan jamur tempe yang aktif selama fermentasi dan adanya degradasi lemak oleh enzim lipase, dimana setelah inkubasi 12 jam hingga 24 jam fermentasi kedelai menjadi tempe, *Rhizopus oryzae* mensekresi enzim lipase yang memiliki kemampuan memecah lemak menjadi asam lemak (Hermana 1996). Sedangkan penurunan terjadi pada 48 jam waktu fermentasi disebabkan oleh adanya aktivitas mikrobia, dimana mikroba yang tumbuh pada tempe hampir tetap atau bertambah sedikit, dan terjadi penurunan jumlah asam lemak yang dibebaskan.

Pada 24 jam pertama waktu fermentasi, asam lemak esensial yang terdiri dari asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat mengalami pola kenaikan persentase perubahan masing-masing sebesar 23,51%, 26,69% dan 22,93%. Menurut Hermana (1996) setelah inkubasi 12 jam hingga 24 jam fermentasi kedelai menjadi tempe, *Rhizopus oryzae* tumbuh aktif serta mensekresi enzim lipase yang memiliki kemampuan memecah lemak menjadi senyawa asam lemak.

Pada 24 jam kedua waktu fermentasi yaitu pada 48 jam fermentasi, asam lemak esensial (asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat)

mengalami penurunan persentase perubahan masing-masing sebesar (-39,44%), (-45,15%) dan (-61,71%) dari kadar sebelumnya, hal ini juga sejalan dengan persentase penurunan kadar stakiosa paling kecil terdapat pada waktu 48 jam fermentasi. Pada fase 30-50 jam fermentasi tempe kedelai, terjadi penurunan suhu dan jumlah asam lemak yang dibebaskan dan pertumbuhan jamur hampir tetap atau bertambah sedikit (Sudarmadji 1977). Selain itu diduga adanya kemungkinan, setelah metabolit primer dan sel mikrobia dihasilkan, terjadi proses dimana sel mikrobia merubah metabolit primer menjadi metabolit sekunder untuk mempertahankan tubuh mikrobia tersebut.

Pada 24 jam ketiga waktu fermentasi, asam lemak esensial yang terdiri dari asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat mengalami kenaikan yang cukup pesat dari kadar sebelumnya yaitu masing-masing sebesar 81,94%, 65,28% dan 80,38%. Hal ini dikarenakan kapang tempe *Rhizopus oligosporus* mempunyai aktivitas lipolitik yang kuat serta menghidrolisis sepertiga lemak netral dalam kedelai selama 72 jam fermentasi (Deliani 2008).

Setelah 96 jam waktu fermentasi kadar asam lemak esensial mengalami kenaikan. Asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat masing-masing meningkat menjadi sebesar 41,39%, 36,53% dan 33,27%. Menurut Sudarmadji (1977), pada fase pembusukan atau fermentasi lanjut (90 jam fermentasi) terjadi kenaikan jumlah bakteri dan jumlah asam lemak bebas serta pertumbuhan jamur menurun (menuju fase kematian).

KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut: (i) Kadar stakiosa tempe kedelai semakin menurun seiring semakin lama fermentasi. Persentase penurunan kadar stakiosa tertinggi pada 24 jam waktu fermentasi. (ii) Perubahan kadar asam oleat, asam linoleat maupun asam linolenat tempe kedelai selama 96 jam fermentasi mempunyai pola yang sama. Kadar asam lemak esensial terendah terdapat pada 48 jam waktu fermentasi dan tertinggi pada 96 jam waktu fermentasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar FA, Sulaeman, Kustiyah L. 1994. Petunjuk Praktikum Pengawetan dan Pengolahan Pangan. Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga, Fakultas

- Pertanian, Institusi Pertanian Bogor, Bogor.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis Association of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, D.C.
- Astawan M. 2004. Tetap Sehat dengan Produk Makanan Olahan. Tiga Serangkai, Surakarta.
- Bailey AE. 1950. Industrial Oil and Fat Product. Interscholastic Publishing Inc., New York.
- Cahyadi W. 2006. Kedelai Khasiat dan Teknologi. Bumi Aksara, Bandung.
- Deliani. 2008. Pengaruh lama fermentasi terhadap kadar protein, lemak dan asam lemak pada pembuatan tempe. [Disertasi], Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Feng XM. 2006. Microbial dynamics during barley tempeh fermentation. Acta Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2006: 59.
- Handayani, S. 1992. Pengaruh Larutan Perendam dan Perebus terhadap Kekerasan, Kualitas Tanak dan Kandungan Mineral Biji Kacang-Kacangan. Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Hermana M, Karmini, Karyadi D. 1996. Komposisi dan Nilai Gizi Tempe serta Manfaatnya dalam peningkatan Mutu Gizi Makanan. Dalam: Sapuan, Soetrisno N (eds), Bunga Rampai Tempe Indonesia. Yayasan Tempe Indonesia, Jakarta.
- Hesseltine CW. 1965. Research at Northern Regional Research Laboratory on Fermented Foods. Proc. Conf. Soybean Products for Protein in Human Foods. USDA, Washington DC.
- Kasmidjo RB. 1990. Tempe: Mikrobiologi dan Kimia Pengolahan serta Pemanfaatannya. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Ketaren S. 1986. Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan. UI Press, Jakarta.
- Muchtadi TR. 1978. Teknologi Proses Pengolahan Pangan. IPB Press, Bogor.
- Murata K, Ikehata H, Edani Y, Koyanagi K. 1971. Studies on the nutritional value of tempeh. Part II. Rat feeding test with tempeh, unfermented soybeans, and tempeh supplemented with amino acid. Agr Biol Chem 35 (2): 233-241.
- Park PW, Goins RE. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl ester for analysis of fatty acid composition in food. J Food Sci 59 (6): 1262-1266.
- Pudjiadi. 1997. Ilmu Gizi Klinis Pada Anak, ed. 3, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Rehms H, Barz W. 1995. Degradation of stachyose, raffinose, melibiose and sucrose by different tempe-producing *Rhizopus* fungi. Appl Microbiol Biotechnol 44: 47-52.
- Soetrisno N. 1995. Tinjauan Ekonomi Tempe Indonesia. Prosiding Simposium Nasional: Pengembangan Tempe dalam Industri Pangan Modern, Yogyakarta.
- Sudarmaji S. 1977. Perubahan selama Fermentasi dan Mikroorganisme yang Terlibat. Gramedia, Jakarta
- Sutedja US, Djakamihardja DS. 1978. Budidaya Kedelai. C.V. Pustaka Buana, Bandung
- Wagenknecht AC, Mattick LR, Lewin LM, Hand DB, Steinkraus KH. 1961. Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. J Food Sci 26: 373-376.
- Wang HL, Hesseltine CW. 1965. Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. Can J Microbiol 11 (4): 727-732.
- Wiesel I, Rehm HJ, Bisping B. 1997. Improvement of tempe fermentations by application of mixed cultures consisting of *Rhizopus* sp. and bacterial strains. Appl Microbiol Biotechnol 47: 218-225.
- Winarno FG. 1980. Enzim Pangan. Pusbangtepa/FTDC-IPB. Bogor.

THIS PAGE INTENTIONALLY LEFT BLANK

GUIDANCE FOR AUTHORS

Aims and Scope *Bioteknologi* encourages submission of manuscripts dealing with all aspects of biotechnology that emphasize issues germane to improve human life, including biochemistry, biomedical science, ecology and environmental science, genetics, molecular biology, physiology, and microbiology, plant and animal sciences. Manuscripts with relevance to develop advance in bioscience will be prioritized for publication.

Article types The journal seeks original full-length research papers, reviews, and short communication. Manuscript of original research should be written in no more than 8,000 words (including tables and picture), or proportional with articles in this publication number. Review articles will be accommodated, while, short communication should be written at least 2,000 words, except for pre-study.

Submission The journal only accepts online submission, through email to the editors at unsjournals@gmail.com. Submitted manuscripts should be the original works of the author(s). The manuscript must be accompanied by a cover letter containing the article title, the first name and last name of all the authors, a paragraph describing the claimed novelty of the findings versus current knowledge. Submission of a manuscript implies that the submitted work has not been published before (except as part of a thesis or report, or abstract); and is not being considered for publication elsewhere. When a manuscript written by a group, all authors should read and approve the final version of the submitted manuscript and its revision; and agree the submission of manuscripts for this journal. All authors should have made substantial contributions to the concept and design of the research, acquisition of the data and its analysis; drafting of the manuscript and correcting of the revision. All authors must be responsible for the quality, accuracy, and ethics of the work.

Ethics Author(s) must obedient to the law and/or ethics in treating the object of research and pay attention to the legality of material sources and intellectual property rights.

Copyright If and when the manuscript is accepted for publication, the author(s) still hold the copyright and retain publishing rights without restrictions. Authors or others are allowed to multiply article as long as not for commercial purposes. For the new invention, authors are suggested to manage its patent before published.

Open access The journal is committed to free-open access that does not charge readers or their institutions for access. Readers are entitled to read, download, copy, distribute, print, search, or link to the full texts of articles, as long as not for commercial purposes. The license type is CC-BY-NC-SA.

Acceptance The articles written in English (U.S. English), Bahasa Indonesia, and major local Indonesian languages are accepted for publication. Manuscripts will be reviewed by editors and invited reviewers (double blind review) according to their disciplines. Authors will generally be notified of acceptance, rejection, or need for revision within 1 to 2 months of receipt. The manuscript is rejected if the content does not in line with the journal scope, does not meet the standard quality, inappropriate format, complicated grammar, dishonesty (i.e. plagiarism, duplicate publications, fabrication of data, citations manipulation, etc.), or ignoring correspondence in three months. The primary criteria for publication are scientific quality and biodiversity significance. **Uncorrected proofs** will be sent to the corresponding author by email as *.doc* or *.rtf* files for checking and correcting of typographical errors. To avoid delay in publication, corrected proofs should be returned in 7 days. The accepted papers will be published online in a chronological order at any time, but printed in May and November.

A charge Until now, publishing costs waiver is granted to all authors (foreigners and Indonesian).

Reprints The sample journal reprint is only available by special request. Additional copies may be purchased when ordering by sending back the uncorrected proofs by email.

Manuscript preparation Manuscript is typed on A4 (210x297 mm²) paper size, in a single column, single space, 10-point (10 pt) Times New Roman font. The margin text is 3 cm from the top, 2 cm from the bottom, and 1.8 cm from the left and right. Smaller lettering size can be applied in presenting table and figure (9 pt). Word processing program or additional software can be used, however, it must be PC compatible and Microsoft Word based (*.doc* or *.rtf*; not *.docx*). **Scientific names** of species (incl. subspecies, variety, etc.) should be written in italic, except for italic sentence. Scientific name (genera, species, author), and cultivar or strain should be mentioned completely for the first time mentioning it in the body text, especially for taxonomic manuscripts. Name of genera can be shortened after first mentioning, except generating confusion. Name of the author can be eliminated after first mentioning. For example, *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, hereinafter can be written as *R. oryzae* UICC 524. Using trivial name should be avoided, otherwise generating confusion. **Biochemical and chemical nomenclature** should follow the order of the IUPAC - IUB. For DNA sequence, it is better used Courier New font. Symbols of standard chemical and abbreviation of chemistry name can be applied for common and clear used, for example, completely written butilic hydroxyl toluene (BHT) to be BHT hereinafter. **Metric measurement** use IS denomination, usage other system should follow the value of equivalent with the denomination of IS first mentioning. Abbreviations set of, like g, mg, mL, etc. do not follow by dot. Minus index (m⁻², L⁻¹, h⁻¹) suggested to be used, except in things like "per-plant" or "per-plot". **Equation of mathematics** does not always can be written down in one column with text, in that case can be written separately. **Number**

one to ten are expressed with words, except if it relates to measurement, while values above them written in number, except in early sentence. The fraction should be expressed in decimal. In the text, it should be used "%" rather than "percent". Avoid expressing ideas with complicated sentence and verbiage, and used efficient and effective sentence.

Title of the article should be written in compact, clear, and informative sentence, preferably not more than 20 words. Name of author(s) should be completely written. **Name and institution** address should also be completely written with street name and number (location), postal code, telephone number, facsimile number, and email address. Manuscript written by a group, author for correspondence along with address is required. First page of the manuscript is used for writing above information.

Abstract should not be more than 200 words. **Keywords** is about five words, covering scientific and local name (if any), research theme, and special methods which used; and sorted from A to Z. All important **abbreviations** must be defined at their first mention. **Running title** is about five words. **Introduction** is about 400-600 words, covering the background and aims of the research. **Materials and Methods** should emphasize on the procedures and data analysis. **Results and Discussion** should be written as a series of connecting sentences, however, for manuscript with long discussion should be divided into subtitles. Thorough discussion represents the causal effect mainly explains for why and how the results of the research were taken place, and do not only re-express the mentioned results in the form of sentences. **Concluding** sentence should be given at the end of the discussion. **Acknowledgments** are expressed in a brief; all sources of institutional, private and corporate financial support for the work must be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest are noted.

Figures and Tables of maximum of three pages should be clearly presented. Title of a picture is written down below the picture, while title of a table is written above the table. Colored figures can only be accepted if the information in the manuscript can lose without those images; chart is preferred to use black and white images. Author could consign any picture or photo for the front cover, although it does not print in the manuscript. All images property of others should be mentioned source. **There is no appendix**, all data or data analysis are incorporated into Results and Discussions. For broad data, it can be displayed on the website as a supplement.

References Author-year citations are required. In the text give the authors name followed by the year of publication and arrange from oldest to newest and from A to Z. In citing an article written by two authors, both of them should be mentioned, however, for three and more authors only the first author is mentioned followed by et al., for example: Saharjo and Nurhayati (2006) or (Boonkerd 2003a, b, c; Sugiyarto 2004; El-Bana and Nijs 2005; Balagadde et al. 2008; Webb et al. 2008). Extent citation as shown with word "*cit*" should be avoided. Reference to unpublished data and personal communication should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g., Rifai MA 2007, pers. com. (personal communication); Setyawan AD 2007, unpublished data). In the reference list, the references should be listed in an alphabetical order (better, if only 20 for research papers). Names of journals should be abbreviated. Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the **ISSN List of Title Word Abbreviations** (www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php). The following examples are for guidance.

Journal:

Saharjo BH, Nurhayati AD. 2006. Domination and composition structure change at hemic peat natural regeneration following burning; a case study in Pelalawan, Riau Province. *Biodiversitas*7: 154-158.

Book:

Rai MK, Carpinella C. 2006. Naturally Occurring Bioactive Compounds. Elsevier, Amsterdam.

Chapter in book:

Webb CO, Cannon CH, Davies SJ. 2008. Ecological organization, biogeography, and the phylogenetic structure of rainforest tree communities. In: Carson W, Schnitzer S (eds) *Tropical Forest Community Ecology*. Wiley-Blackwell, New York.

Abstract:

Assaeed AM. 2007. Seed production and dispersal of *Rhazya stricta*. 50th annual symposium of the International Association for Vegetation Science, Swansea, UK, 23-27 July 2007.

Proceeding:

Alikodra HS. 2000. Biodiversity for development of local autonomous government. In: Setyawan AD, Sutarno (eds.) *Toward Mount Lawu National Park; Proceeding of National Seminary and Workshop on Biodiversity Conservation to Protect and Save Germplasm in Java Island*. Sebelas Maret University, Surakarta, 17-20 July 2000. [Indonesian]

Thesis, Dissertation:

Sugiyarto. 2004. Soil Macro-invertebrates Diversity and Inter-Cropping Plants Productivity in Agroforestry System based on Sengon. [Dissertation]. Universitas Brawijaya, Malang. [Indonesian]

Information from internet:

Balagadde FK, Song H, Ozaki J, Collins CH, Barnet M, Arnold FH, Quake SR, You L. 2008. A synthetic *Escherichia coli* predator-prey ecosystem. *Mol Syst Biol* 4: 187. www.molecularsystemsbiology.com

Pengaruh asam absisat terhadap viabilitas biji sintetis <i>Grammatophyllum scriptum</i> (Orchidaceae) selama masa penyimpanan kering EVITA MULIAWATI, ENDANG ANGGARWULAN, ARI PITOYO	1-8
Bakteri heterotrof aerobik asal saluran pencernaan ikan sidat (<i>Anguilla bicolor bicolor</i>) dan potensinya sebagai probiotik NATALIA WIDYA LESTARI, AGUNG BUDIHARJO, ARTINI PANGASTUTI	9-17
Keragaman ganyong (<i>Canna edulis</i> Ker.) di wilayah Surakarta berdasarkan ciri morfologi dan pola pita isozim SANTI SILFIANA ASHARY, NITA ETIKAWATI, SURATMAN	18-33
Perubahan biokimiawi stakiosa dan asam lemak esensial pada tempe kedelai (<i>Glycine max</i>) selama proses fermentasi RULLY TRIWIBOWO, M.A.M. ANDRIANI, SETYANINGRUM ARIVIANI	34-41