

# Bioteknologi

| Bioteknologi | vol. 13 | no. 2 | pp. 43-90 | November 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](http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm)





## Penggunaan BA dan NAA untuk merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan*) secara in vitro

TANJUNG DEWI ANNIASARI, RETNO BANDRIYATI ARNI PUTRI ♡, ENDANG SETIA MULIAWATI

♡Alamat korespondensi:

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

Manuskrip diterima: 1 April 2016.  
Revisi disetujui: 27 Juli 2016.

*Anniasari TD, Putri RBA, Muliawati ES. 2016. The use of BA and NAA to stimulate shoot formation of longan (Dimocarpus longan) by in vitro. Bioteknologi 13: 43-53. Indonesia is a place which is rich in tropical fruit plants. One of them is longan. The domestic needs of this fruit is more and more increase. This condition force the emergence of the import longan to fulfill the needs of the longan fruit in large quantities. Therefore, the efforts to increase the longan production are needed. There is an obstruction in the propagation of longan, is the expensive of seed price. To fulfill the demand of longan seed, could be done by effort of multiplication using tissue culture method. In multiplication method of longan with tissue culture need the plant growing regulator. This research was aimed to find out the combination of the exact concentration from the plant growing regulator on stimulating the shoot formation of longan. This research used Completely Randomize Design which consisted of two factors were arranged by factorial. First factor was the BA concentration consisted of: without BA, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, and 3 ppm. Second factor was the NAA concentrations which consisted of four levels: without NAA, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, and 3 ppm. Then, the data was analyzed descriptively. The result showed that the combination of BA concentration 2 ppm concentration and NAA concentration 1 ppm gave the best result at the callus texture, callus color, and callus size. All treatments have not been able to stimulate the shoot formation of longan (*Dimocarpus longan* Lour).*

**Keywords:** BA, *Dimocarpus longan*, in vitro, longan, NAA

*Anniasari TD, Putri RBA, Muliawati ES. 2016. Penggunaan BA dan NAA untuk merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah (Dimocarpus longan) secara in vitro. Bioteknologi 13: 43-53. Indonesia merupakan Negara yang kaya akan tanaman buah-buahan tropis, salah satunya yaitu lengkung. Kebutuhan dalam negeri akan buah lengkung ini semakin meningkat sehingga sebagian besar kebutuhan dipenuhi oleh buah lengkung impor. Oleh karena itu diperlukan upaya peningkatan produksi lengkung. Terdapat kendala dalam pengembangan tanaman lengkung, yaitu harga bibit yang mahal. Untuk memenuhi kebutuhan bibit lengkung dapat dilakukan suatu usaha perbanyakan dengan metode kultur jaringan. Dalam metode perbanyakan lengkung dengan kultur jaringan diperlukan zat pengatur tumbuh. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kombinasi konsentrasi zat pengatur tumbuh yang tepat dalam merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri dari dua faktor perlakuan yang disusun secara faktorial. Faktor perlakuan pertama adalah konsentrasi BA yang terdiri dari empat taraf perlakuan yaitu tanpa BA, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm. Faktor perlakuan kedua adalah konsentrasi NAA yang terdiri dari empat taraf perlakuan yaitu tanpa NAA, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, dan 3 ppm. Data kemudian dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi konsentrasi BA 2 ppm dan NAA 1 ppm memberikan hasil terbaik pada variabel tekstur kalus, warna kalus, dan ukuran kalus. Semua kombinasi perlakuan belum mampu merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour).*

**Kata kunci:** BA, *Dimocarpus longan*, in vitro, longan, NAA

## PENDAHULUAN

Tanaman lengkung (*Dimocarpus longan* Lour) merupakan jenis tanaman buah subtropis yang digemari masyarakat. Permintaan pasar dalam negeri terhadap buah lengkung terus meningkat sehingga prospek komoditas ini cukup cerah untuk dikembangkan secara komersial. Lengkung biasa diperbanyak dengan cara generatif maupun vegetatif. Secara generatif, lengkung dapat diperoleh dengan mengecambahkan biji, sedangkan dengan vegetatif banyak cara yang dilakukan, antara lain dengan sambung pucuk, sambung masuk seperti pelana, tempel mata tunas atau okulasi, dan penyusuan. Untuk perbanyak lengkung secara vegetatif diperlukan batang atas yang mempunyai sifat unggul dari segi kualitas dan produksi buah, dan batang bawah yang sistem perakarannya baik dan dalam serta tahan terhadap keadaan tanah yang kurang menguntungkan, termasuk hama dan penyakit yang ada dalam tanah. Batang bawah umumnya menggunakan varietas lokal (Sunanto 1990).

Kini kebutuhan lengkung nasional sekitar 21 ribu ton per tahun, kira-kira 90 persen diantaranya diperoleh melalui impor dari Thailand dan Cina (Mulyana 2009). Oleh karena itu untuk mengembangkan potensi dan peluang pasar buah lengkung tersebut perlu dilakukan usaha percepatan penyediaan bibit.

Perbanyak cepat melalui teknik kultur jaringan diharapkan dapat menjadi solusi untuk memperoleh bibit yang bersifat sama dengan induknya dalam jumlah yang banyak, tidak merusak pohon induk, dan murah harganya.

Menurut Santoso dan Nursandi (2004) kultur jaringan akan berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang dibutuhkan dapat terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi beberapa hal sebagai berikut: pemilihan eksplan/bahan tanam, penggunaan media yang cocok, keadaan yang aseptik, dan pengaturan udara yang baik.

Menurut Yusnita (2004), salah satu komponen media yang menentukan keberhasilan kultur jaringan adalah jenis dan konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) yang digunakan. Jenis dan konsentrasi ZPT tergantung pada tujuan dan tahap dalam pengulturan. *Benzil Adenin* (BA) termasuk golongan sitokinin yang penting sebagai pemacu pertumbuhan dan morfogenesis dalam kultur jaringan. *Naphthalene Acetic Acide* (NAA) adalah zat pengatur tumbuh golongan auksin, yang berpengaruh terhadap perkembangan sel melalui peningkatan sintesis

protein (Sriyanti dan Wijayani 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi konsentrasi BA dan NAA dalam merangsang pembentukan tunas lengkung (*Dimocarpus longan* Lour) secara in vitro.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Oktober 2009 sampai Januari 2010 di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

### Bahan dan alat penelitian

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah buku tunggal (satu buku) tanaman lengkung dataran rendah. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini meliputi media *Woody Plant Media* (WPM), zat pengatur tumbuh BA dan NAA, sterilan, akuades, bayclin, fungisida, bakterisida, spirtus, alkohol, dan sabun cuci.

Alat yang digunakan adalah botol kultur, bunsen, *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), petridish, pinset, scalpel, timbangan analitik, plastik PP 0,4, plastik clip, tisu, karet, *magnetik stirer*, *hot plate*, beker glass, gelas ukur, erlenmeyer, pH meter, botol-botol kultur, autoklaf, *hand sprayer*, pipet ukur, aluminium foil, kertas label, dan rak kultur.

### Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan lingkungan RAL (Rancangan Acak Lengkap) yang disusun secara faktorial terdiri atas dua faktor perlakuan sebagai berikut. Faktor pertama adalah konsentrasi BA dengan lima taraf konsentrasi, yaitu B0 (perlakuan tanpa BA), B1(perlakuan dengan penambahan konsentrasi BA 0,5 ppm), B2(perlakuan dengan penambahan konsentrasi BA 1,0 ppm), B3 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi BA 2,0 ppm), B4 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi BA 3,0 ppm). Faktor kedua adalah konsentrasi NAA dengan lima taraf konsentrasi, yaitu N0 (perlakuan tanpa NAA), N1 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi NAA 0,5 ppm), N2 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi NAA 1,0 ppm), N3 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi NAA 2,0 ppm), N4 (perlakuan dengan penambahan konsentrasi NAA 3,0 ppm). Dengan demikian diperoleh 25

kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak 3 kali.

### **Pelaksanaan penelitian**

#### *Penyiapan media*

Media yang digunakan adalah media WPM. Bahan-bahan kimia, hara makro, hara mikro sesuai komposisi media WPM dibuat larutan stoknya. Penambahan ZPT pada pembuatan media WPM dengan cara mencampurkan larutan stok dengan takaran tertentu dan ZPT yaitu BA dengan konsentrasi 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm dan 3 ppm serta penambahan NAA dengan konsentrasi 0 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm dan 3 ppm ke dalam labu takar kemudian menambahkan akuades hingga volume 250 ml. Larutan dipindahkan ke dalam *beker glass*, kemudian diaduk sambil menambahkan gula ke dalam larutan sebanyak 7,5 g. Setelah homogen, pH larutan diukur dengan pH meter hingga tingkat pH 5,7-6,3. Apabila pH terlalu rendah ditambahkan NaOH dan apabila pH terlalu tinggi ditambahkan HCl. Setelah pH sesuai, ditambahkan agar sebanyak 2 g kemudian dipanaskan hingga mendidih.

#### *Sterilisasi dan penanaman eksplan*

Eksplan disterilisasi dengan cara direndam dalam campuran larutan Agrept dan Dithane selama 12 jam yang dikocok terus menerus di atas *shaker* kemudian dibilas dengan akuades steril. Penanaman eksplan dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC).

#### *Subkultur*

Subkultur dilakukan pada saat eksplan berumur 12 MST. Media subkultur yang digunakan adalah media WPM dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP dengan konsentrasi 2 ppm.

### **Variabel pengamatan**

#### *Kemunculan kalus*

Pengamatan kalus dilakukan pada akhir penelitian (12 MST), dilakukan dengan mengamati secara visual terbentuk atau tidak terbentuknya kalus pada eksplan yang ditanam.

#### *Tekstur kalus*

Tekstur kalus diamati pada akhir penelitian (12 MST) dan ditentukan dengan sistem penilaian. Kategori penilaian tekstur adalah sebagai berikut: kalus tumbuh dengan tekstur kalus kompak, kalus tumbuh dengan tekstur kalus sedang (*intermediate*), kalus tumbuh

dengan tekstur kalus remah (*friable*) (Turhan 2004).

#### *Warna kalus*

Pengamatan variabel warna kalus dilakukan pada akhir penelitian (12 MST), dilakukan dengan mengamati secara visual dengan sistem penilaian. Kategori penilaian warna kalus adalah: kalus tumbuh berwarna coklat, kalus tumbuh berwarna putih hingga kecoklatan, kalus tumbuh berwarna putih, dan kalus tumbuh berwarna hijau keputihan, hijau kekuningan hingga hijau tua.

#### *Ukuran kalus*

Pengamatan variabel ukuran kalus dilakukan pada akhir penelitian (12 MST) dan ditentukan dengan sistem penilaian. Kategori penilaian ukuran kalus adalah: kecil, sedang, agak besar, besar.

#### *Kemunculan tunas*

Kemunculan tunas diamati dengan melihat dan mendata macam kombinasi perlakuan yang bisa memunculkan tunas.

#### *Subkultur*

Subkultur diamati dengan melihat adanya perubahan yang terjadi pada eksplan setelah dilakukan subkultur. Pengamatan dilakukan pada saat 12 MST (setelah subkultur).

### **Analisis data**

Data hasil penelitian untuk semua variabel penelitian dianalisis secara deskriptif.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Kemunculan kalus**

Data kemunculan kalus dapat dilihat pada Tabel 1. Hampir pada semua kombinasi perlakuan yang diberikan mampu memunculkan kalus (Tabel 1). Kalus yang terbentuk merupakan respons eksplan yang ditanam terhadap penambahan zat pengatur tumbuh, dalam hal ini yaitu BA dan NAA. Munculnya kalus ditandai dengan adanya tonjolan-tonjolan pada bagian permukaan eksplan, baik di pangkal, di tengah, maupun di ujung eksplan. Hanya pada perlakuan tanpa penambahan BA dan NAA (B0N0) dan perlakuan dengan penambahan BA 2 ppm dan NAA 0,5 ppm (B3N1) saja yang tidak mampu memunculkan kalus.

**Tabel 1.** Kemunculan kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan Lour*) pada berbagai variasi konsentrasi BA dan NAA

NAA (ppm)	BA (ppm)				
	0	0,5	1	2	3
0	-	+	+	+	+
0,5	+	+	+	-	+
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+

Keterangan: -: tidak muncul kalus; +: muncul kalus

Pada perlakuan tanpa penambahan BA dan NAA tidak muncul kalus diduga karena hormon endogen pada tanaman lengkung belum mampu untuk menginduksi terbentuknya kalus. Menurut Sriyanti (2000) walaupun di dalam jaringan sudah terkandung zat pengatur tumbuh endogen yang disebut hormon, khususnya IAA, namun hormon eksogen perlu ditambahkan, karena kerja hormon endogen kurang efektif apabila tidak dilengkapi dengan hormon eksogen. Auksin umumnya ditambahkan ke dalam nutrisi media untuk menginduksi kalus dari eksplan (George dan Sherrington 1984). Selain itu, sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan Fitriani (2008), hal tersebut dapat pula diakibatkan karena auksin endogen dalam keadaan suboptimal untuk pembentukan kalus.

Pada perlakuan penambahan BA 2 ppm dan NAA 0,5 ppm (B3N1) juga tidak memunculkan kalus, hal ini diduga karena konsentrasi sitokinin BA 2 ppm dan auksin 0,5 ppm yang ditambahkan tidak seimbang sehingga belum mampu memunculkan kalus. Hal ini sesuai dengan pernyataan Bhojwani dan Razdan (1983) bahwa jika sitokinin dan auksin dalam jumlah yang seimbang akan mendorong pembentukan kalus. Menurut Stepan dan Sarkissian (1990)

morfogenesis jaringan yang dibudidayakan dipengaruhi oleh interaksi serta keseimbangan antara zat pengatur tumbuh yang ditambahkan dari luar (eksogen) dan hormon tumbuh yang dihasilkan sel itu sendiri.

Kalus dapat berdeferensiasi menjadi tunas, tunas yang terbentuk dari kalus merupakan tunas adventif. Tunas lengkung yang diharapkan yaitu tunas yang terbentuk dari sel-sel generatif. Tunas yang terbentuk merupakan tunas-tunas aksilar yang tumbuh pada ketiak eksplan pucuk akibat penekanan pertumbuhan tunas lateral. Menurut Bhojwani dan Razdan (1983) proliferasi tunas aksilar diperlukan dalam kultur jaringan karena sel-selnya bersifat seragam dan resisten terhadap perubahan-perubahan genotip. Tunas aksilar ini dapat dipacu dengan media yang mengandung sitokinin pada konsentrasi tepat, baik dengan atau tanpa auksin. Ditambahkan oleh Wattimena (2000) bahwa proliferasi tunas aksilar hanya memerlukan sitokinin dalam konsentrasi tinggi tanpa auksin atau auksin dalam konsentrasi yang rendah sekali.

#### Tekstur kalus

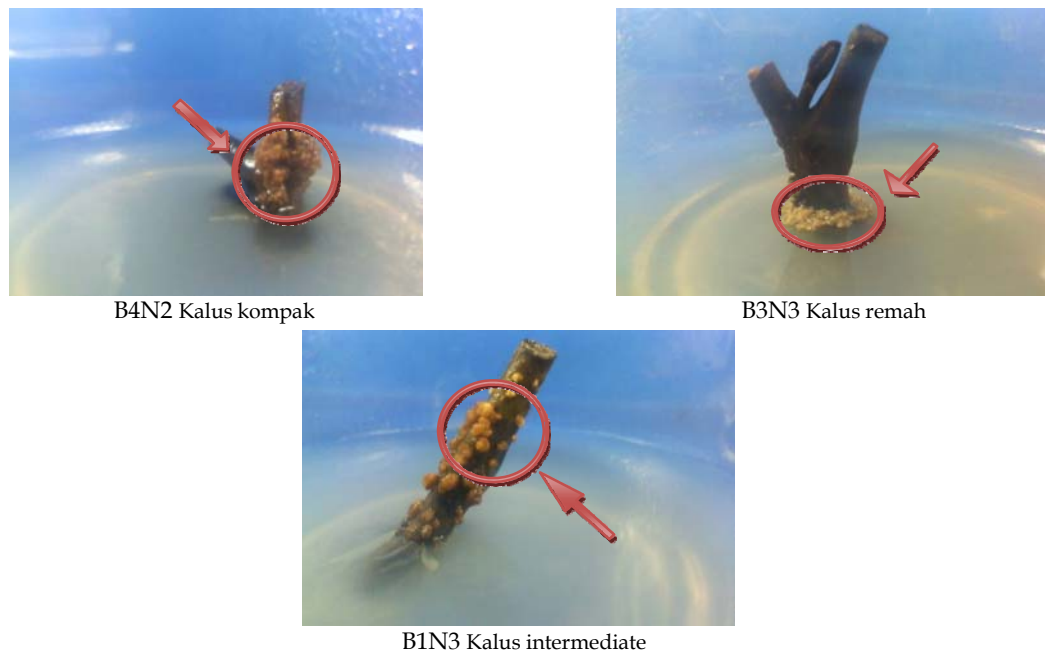
Tekstur kalus dapat dibedakan menjadi tiga, yaitu: kompak, intermediate dan remah (Turhan 2004). Tekstur kalus merupakan salah satu penanda yang dipergunakan untuk menilai kualitas suatu kalus. Struktur dan penampakan kalus dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Secara visual, kalus yang terbentuk pada eksplan *Dimocarpus longan Lour* sebagian besar bertekstur kompak, ikatan antar selnya tampak kuat. Kalus yang kompak juga mempunyai tekstur yang sulit untuk dipisahkan dan terlihat padat. Beberapa kalus mengalami pembentukan lignifikasi sehingga kalus tersebut mempunyai tekstur yang keras dan kompak.

**Tabel 2.** Tekstur kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan Lour*) yang terbentuk pada berbagai variasi konsentrasi BA dan NAA

NAA (ppm)	BA (ppm)				
	0	0,5	1	2	3
0	-	Intermediate	Remah	Kompak	Kompak
0,5	Kompak	Intermediate	Kompak	-	Kompak
1	Kompak	Kompak	Intermediate	Intermediate	Kompak
2	Kompak	Intermediate	Kompak	Remah	Intermediate
3	Intermediate	Kompak	Kompak	Intermediate	Kompak

Keterangan: -: tidak muncul kalus



**Gambar 1.** Tekstur kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour) yang terbentuk karena pengaruh penambahan BA dan NAA pada media kultur WPM. Keterangan: B4N2 = penambahan BA 3 ppm + NAA 1 ppm, B3N3 = penambahan BA 2 ppm + NAA 2 ppm, dan B1N3 = penambahan BA 0,5 ppm + NAA 2 ppm

Menurut Wiedenfeld (1997), struktur kalus yang kompak dan terjadi perubahan warna kekuningan atau kehijauan, mengindikasikan terjadinya diferensiasi sel. Laju pertumbuhan juga dipengaruhi oleh kemampuan jaringan untuk menyerap zat-zat hara yang tersedia, hal ini banyak dipengaruhi oleh aerasi dan tekstur kalus. Kalus yang terlalu padat dan kompak mempunyai kemampuan menyerap zat hara lebih rendah daripada tekstur kalus yang tidak terlalu padat.

#### Warna kalus

Salah satu variabel yang penting untuk diteliti yaitu warna kalus. Berdasarkan pengamatan warna kalus dapat diketahui kondisi kesehatan kultur. Warna kalus merupakan salah satu variabel yang cukup sering diamati dalam berbagai percobaan atau penelitian yang berkaitan dengan induksi kalus. Berdasarkan warna kalus juga dapat diketahui

apakah suatu kalus masih memiliki sel-sel yang aktif membelah atau masih hidup ataukah telah mati.

Biasanya pertumbuhan yang cepat dan warna kalus yang cenderung terang mengindikasikan bahwa kondisi kesehatan kultur tersebut cukup baik. Sedangkan warna coklat hingga hitam secara umum menunjukkan keadaan kalus yang sel-selnya telah mati. Kalus akan menunjukkan warna kuning bening dan akan berubah menjadi kecoklatan seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua (Abdullah et al. 1998).

Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2 yang menunjukkan bahwa warna yang terlihat pada kalus-kalus tanaman lengkung dataran memiliki rentang mulai dari coklat hingga hijau. Warna kalus dapat bermacam-macam tergantung dari jenis sumber eksplan itu diambil, seperti warna kekuningan, putih, hijau, atau kuning kejingga-jinggaan.

**Tabel 3.** Warna kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour) yang terbentuk karena pengaruh penambahan BA dan NAA pada media kultur WPM

NAA (ppm)	BA (ppm)				
	0	0,5	1	2	3
0	-	Coklat, Kekuningan	Kecoklatan, putih	Coklat	Coklat
0,5	Kecoklatan	Coklat, putih	Coklat	-	Coklat
1	Coklat, hijau	Coklat, kekuningan, hijau	Coklat	Coklat, Kecoklatan, putih, hijau	Kecoklatan
2	Coklat	Kecoklatan, kekuningan	Coklat	Putih, Kecoklatan	Kecoklatan
3	Coklat, putih	Coklat, Kecoklat-an	Coklat	Kecoklat-an, Kekuningan	Coklat



B1N2 Kekuningan hijau



B2N0 Putih



B4N3 Kecoklatan



B4N1 Coklat

**Gambar 2.** Warna kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour) yang terbentuk karena pengaruh penambahan BA dan NAA pada media kultur WPM. Keterangan: B1N2= penambahan BA 0,5 ppm dan NAA 1 ppm, B2N0= hanya dengan penambahan BA 1 ppm, B4N3= penambahan BA 3 ppm dan NAA 2 ppm, dan B4N1= penambahan BA 3 ppm dan NAA 0,5 ppm

Pada perlakuan penambahan 1 ppm NAA saja, maupun yang dikombinasikan masing-masing dengan BA 0,5 ppm dan BA 2 ppm (B0N2, B1N2, dan B3N2) terdapat warna kalus hijau. Hal ini berarti kalus yang terbentuk masih dalam keadaan baik. Pada perlakuan penambahan 1 ppm NAA yang dikombinasikan masing-masing dengan BA 0,5 ppm dan BA 2 ppm (B1N2, dan B3N2) terdapat tonjolan hijau, diduga sebagai awal terbentuknya tunas, hal ini dimungkinkan karena kombinasi konsentrasi BA dan NAA telah sesuai kebutuhan eksplan. Warna hijau pada kalus merupakan klorofil yang diduga terbentuk akibat pengaruh sitokinin yang ditambahkan pada media, yaitu berasal dari air kelapa sebagaimana diungkapkan Santoso dan Nursandi (2004), sitokinin dapat mendorong pembentukan klorofil.

Kalus yang berwarna kuning bening merupakan kalus yang belum mengalami penuaan. Proses penuaan pada kalus seharusnya dihambat oleh BA yang diberikan dalam media. Tetapi dari hasil penelitian diperoleh hasil bahwa sebagian besar kalus berwarna coklat, hal ini berlawanan dengan pernyataan bahwa

benziladenin (BA) merupakan salah satu jenis sitokinin yang berperan dalam memperlambat proses senescensi sel dengan menghambat perombakan butir-butir klorofil dan protein dalam sel (Wattimena, 1988). Selain akibat proses penuaan, warna coklat pada kalus juga dapat disebabkan karena adanya sintesis senyawa fenol dalam kalus.

Seperti yang juga telah dijelaskan oleh Leon, et al. (2001), pada saat terjadi perlukaan, tumbuhan akan segera memproduksi jenis oksigen reaktif (*reactive oksigen species*), termasuk di dalamnya anion superoksida pada jaringan yang rusak, dan hidrogen peroksida pada skala lokal maupun sistemik. Produksi maksimal superoksida akan terjadi beberapa menit pasca perlukaan, sedangkan hidrogen peroksida akan diproduksi maksimal setelah 4–6 jam. Hidrogen peroksida diketahui sebagai respons adanya sistemin. Adapun sistemin berpotensi menyebabkan terjadinya ledakan proses oksidasi (*oxydative burst*). Jadi wajar jika terjadi pencoklatan secara cepat pada awal pertumbuhan kalus maupun sel.

### Ukuran kalus

Ukuran kalus merupakan salah satu variabel yang cukup penting untuk diamati. Ukuran kalus yang terbentuk dapat dipergunakan untuk mengetahui apakah konsentrasi auksin eksogen yang ditambahkan tersebut efektif atau tidak dalam menstimulasi pembelahan sel-sel pada eksplan (Dwiyono 2009).

Kombinasi antara BA dan NAA yang diberikan pada media akan memacu pembesaran sel apabila komposisinya sesuai. Sebagaimana pernyataan bahwa komposisi media dengan menggunakan kombinasi ZPT dari golongan auksin dan sitokinin dalam jumlah yang seimbang dapat menginisiasi pembesaran sel (Marlina 2009).

Ukuran kalus menunjukkan banyaknya sel *amorphous* yang terbentuk dari sel-sel jaringan awal yang membelah diri secara terus-menerus. Semakin besar ukuran kalus menunjukkan semakin tinggi aktifitas dan jumlah sel-sel jaringan awal yang membelah diri.

Ukuran kalus pada tiap perlakuan yang diberikan memunculkan hasil yang berbeda-beda (Gambar 3 dan Tabel 4). Hal ini diduga

karena masing-masing kalus memiliki kepekaan dan daya serap terhadap media yang berbeda serta adanya pengaruh dari zat pengatur tumbuh yang diberikan (Trimulyono, et al. 2004). Sebagaimana pula pernyataan bahwa kemampuan jaringan dalam menyimpan air dan unsur hara berbeda-beda (dalam hal ini meliputi kemampuan mengadakan difusi, osmosis dan pengaturan tekanan turgor sel) (Sriyanti 2000).

Pada kultur jaringan, morfogenesis dari eksplan selalu tergantung dari interaksi dari auksin dan sitokinin (Wattimena et al., 1992). Apabila interaksi antara sitokinin dan auksin yang diberikan sudah sesuai dengan kebutuhan eksplan maka proses pembelahan yang terjadi akan semakin cepat, hal ini tentu saja akan meningkatkan pertambahan ukuran kalus. Proses ini juga sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh eksogen yang diberikan, dalam hal ini BA dan NAA. Menurut Wattimena, et al. (1992) eksplan merupakan jaringan atau sel tanaman yang diisolasi dari tanaman, apabila dikulturkan memerlukan auksin dan sitokinin eksogen untuk tumbuh dan berkembang.



B2N3 Ukuran kalus kecil



B0N4 Ukuran kalus sedang



B4N3 Ukuran kalus agak besar



B4N2 Ukuran kalus besar

**Gambar 3.** Ukuran kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour) yang terbentuk karena pengaruh penambahan BA dan NAA pada media kultur WPM. Keterangan: B2N3 = penambahan BA 1 ppm dan NAA 2 ppm, B0N4 = tanpa penambahan BA dan dengan penambahan NAA 3 ppm, B4N3 = penambahan BA 3 ppm dan NAA 2 ppm, dan B4N2 = penambahan BA 3 ppm dan NAA 1 ppm

**Tabel 4.** Ukuran kalus eksplan lengkung dataran rendah (*Dimocarpus longan* Lour) yang terbentuk pada berbagai variasi konsentrasi BA dan NAA pada media kultur WPM

NAA (ppm)	BA (ppm)				
	0	0,5	1	2	3
0	-	Besar	Sedang	Besar	agak besar
0,5	Agak besar	Besar	Kecil	-	Sedang
1	Agak besar	Besar	Sedang	Besar	Besar
2	Agak besar	Besar	Kecil	sedang	Sedang
3	Agak besar	Besar	Sedang	Besar	Kecil

Keterangan: -): tidak muncul kalus

Berdasarkan Tabel 4 dapat diketahui bahwa respons tiap eksplan berbeda-beda, tidak sejalan dengan penurunan atau peningkatan konsentrasi BA maupun NAA. Respons masing-masing eksplan yang menunjukkan perbedaan, diduga disebabkan oleh kondisi biologis eksplan yang berbeda walau secara fisik sudah relatif diseragamkan. Bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus, disebabkan sel-sel yang kontak dengan media terdorong menjadi meristematik dan selanjutnya aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka. Waering dan Philips (1981) menyatakan bahwa kebutuhan nutrisi dan zat pengatur tumbuh untuk memacu proses morfogenesis pada kultur in vitro akan berbeda untuk setiap jenis tanaman dan eksplan yang digunakan.

Pada perlakuan pemberian BA dengan konsentrasi 3 ppm dan NAA dengan konsentrasi 3 ppm (B4N4) dihasilkan kalus yang berukuran kecil. Hal ini diduga karena konsentrasi auksin, dalam hal ini NAA yang diberikan terlalu tinggi. Hendaryono dan Wijayani (1994) menyatakan bahwa pada kadar yang tinggi, auksin lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan. Wijono dalam Prahardini dan Sudaryono (1992) membuktikan bahwa penambahan 3 mg/L NAA dan 2 mg/L BA efektif untuk induksi kalus pepaya.

Pada semua perlakuan penambahan BA dengan 0,5 ppm yang dikombinasikan dengan masing-masing konsentrasi NAA diperoleh hasil ukuran kalus yang besar. Hal ini juga terjadi pada perlakuan penambahan BA 2 ppm saja (B3N0), penambahan BA 2 ppm dan NAA 1 ppm (B3N2), penambahan BA 2 ppm dan NAA 3 ppm (B3N4), dan penambahan BA 3 ppm dan NAA 1 ppm (B4N2). Hal ini diduga karena terjadi keseimbangan antara BA dan NAA dalam proses pembentukan kalus. Hal ini karena adanya NAA yang berperan dalam pembesaran dan pemanjangan sel (peningkatan ukuran sel) dan BA yang berperan dalam pembelahan sel

(peningkatan jumlah sel). Menurut Jona dan Menini (1987), jika kandungan hormon dalam media berimbang atau sesuai dengan kebutuhan eksplan maka jaringan meristem atau parenkim akan membelah terus menerus menghasilkan kalus.

Dari hasil pengamatan juga ditemukan adanya pencoklatan (*browning*). Pencoklatan ini dikarenakan terjadinya akumulasi senyawa fenol yang dapat menghambat peningkatan ukuran kalus. Menurut Wattimena (2000), senyawa-senyawa fenol dapat menghambat pembelahan sel, pembesaran sel dan pertumbuhan.

#### Kemunculan tunas

Terbentuknya tunas merupakan salah satu hal penting pada kultur jaringan tanaman. Keberhasilan regenerasi eksplan yang diinokulasi pada media kultur dapat ditunjukkan oleh adanya pembentukan tunas. Tunas berfungsi untuk melangsungkan keturunan pada tanaman, karena tunas dapat menjadi sarana dalam pembentukan energi dari proses yang berlangsung pada daun. Keberhasilan pembentukan tunas adventif tergantung dari genotip eksplan, suplai nutrisi dalam media kultur, zat pengatur tumbuh, kondisi fisik media, dan tingkat perkembangan eksplan.

Pada penelitian ini digunakan media WPM yang diberi zat pengatur tumbuh BA dan NAA. Hal ini diharapkan agar dapat merangsang pembentukan tunas pada eksplan lengkung dataran rendah yang ditanam. Sesuai yang telah dilakukan oleh Wakasa et al. (1978) yaitu pada penggunaan kombinasi BA dan NAA untuk regenerasi tanaman nenas dengan menggunakan eksplan tunas samping.

Kalus yang dihasilkan dari tanaman lengkung dataran rendah pada penelitian ini tidak menunjukkan adanya pembentukan tunas pada semua kombinasi perlakuan. Komposisi dan keseimbangan konsentrasi zat pengatur

tumbuh dalam hal ini auksin dan sitokinin, berperan dalam mengarahkan eksplan membentuk kalus. Namun kemampuan multiplikasi pada setiap jenis tanaman sangat bervariasi, terutama pada tanaman berkayu. Pada tabat barito (Kristina 2009), dilakukan subkultur kembali pada media yang sama untuk mendapatkan data terbaik. Ternyata daya multiplikasi tunas, baik pada media MS + BA 1,0 mg/L + NAA 0,1 mg/L ataupun MS + BA 1,0 mg/L + NAA 0,5 mg/L memperlihatkan hasil yang sama baik.

Tidak terbentuknya tunas diduga karena adanya penambahan zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin dengan perbandingan yang tidak sesuai dengan kebutuhan eksplan dalam pembentukan tunas. Abidin (1994) menyebutkan bahwa auksin dan sitokinin pada perbandingan tertentu, akan menghasilkan pertumbuhan yang berbeda. Pada tanaman *Ceropegia bulbosa* (Asclepiaceae) komposisi BA 3 mg/L ditambahkan NAA dengan konsentrasi rendah yakni 0,05 mg/L mampu membentuk tunas 10/eksplan tanpa kalus (Britto et al. 2003).

Seperti diketahui, bahwa pembentukan tunas atau akar saja atau keduanya secara bersamaan akan terjadi apabila terdapat auksin serta sitokinin dalam nisbah tertentu. Nisbah auksin dan sitokinin yang rendah, cenderung akan mendorong pertumbuhan tunas dan daun. Sebaliknya, apabila nisbah auksin dan sitokinin tinggi, maka akan menumbuhkan akar, sedangkan nisbah auksin dan sitokinin yang seimbang akan mendukung bagi pertumbuhan tunas/daun dan akar yang berimbang pula (Abidin 1989). Keberhasilan organogenesis juga dipengaruhi oleh keseimbangan antara auksin dan sitokinin baik di dalam maupun di luar jaringan (Thorpe dan Patel, 1984). Pada tanaman pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.), kombinasi sitokinin dan auksin pada media MS dapat memacu proliferasi tunas dari eksplan pucuk dan jaringan kotiledon. Komposisi untuk masing-masing jaringan berbeda, yaitu MS + 1,5 mg/L BA + 0,25 mg/L NAA; sementara untuk eksplan dari jaringan kotiledon menggunakan media MS + 0,75 mg/L BA + 0,05 mg/L NAA (Siregar 2007). Perlakuan penggunaan BAP 0.5 ppm tanpa IBA pada media WPM merupakan konsentrasi yang paling optimal dalam pembentukan jumlah tunas terbanyak 3 buah dan panjang tunas tertinggi 8 mm (Widyarso 2010).

Setiap genotipa atau jaringan mempunyai respons yang berbeda dalam penyerapan zat

pengatur tumbuh dalam medium dan memiliki kandungan zat pengatur tumbuh endogen yang berbeda. Sebagaimana diungkapkan oleh Soepardi (1983), respons tanaman yang optimal akan dicapai bila unsur-unsur hara tersebut dalam keadaan seimbang. Oleh karena itu kadangkala hanya dibutuhkan auksin, sitokinin secara sendiri-sendiri atau campuran auksin dan sitokinin (Oktavia et al. 2003). Umumnya penambahan BA menyebabkan kalus akan tumbuh mengarah menjadi tunas bila konsentrasi sitokinin endogen di dalam jaringan tanaman lebih tinggi dibandingkan konsentrasi auksin (Kristina 2009).

Daisy dan Wijayani (1994), kadar auksin yang tinggi lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan. Komposisi auksin dan sitokinin dalam media kultur in vitro mempunyai peranan penting dalam induksi dan regenerasi kalus menjadi tunas. Interaksi antara sitokinin dan auksin merupakan hal yang sangat penting dalam mengatur proses pertumbuhan dan perkembangan dalam kultur in vitro. Perbandingan antara sitokinin dan auksin yang akan menentukan apakah kalus akan beregenerasi membentuk tunas, akar atau tunas dan akar.

Konsentrasi zat pengatur tumbuh auksin atau sitokinin untuk pertumbuhan tunas pada setiap tanaman tidak selalu sama. Jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh untuk memacu pertumbuhan tunas tergantung beberapa faktor, antara lain jenis tanaman, jaringan atau organ yang digunakan, keadaan fisiologi eksplan, serta kandungan sitokinin dan auksin endogen di dalam jaringan (Lestari dan Purnamaningsih 2001). Regenerasi tunas dari eksplan kalus merupakan proses yang kompleks, karena dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya faktor genotipe, tipe eksplan dan keseimbangan zat pengatur tumbuh, dalam hal ini auksin dan sitokinin serta kondisi fisiologi kalus.

### Subkultur

Pada penelitian ini dalam upaya merangsang pembentukan tunas maka dilakukan subkultur beberapa eksplan lengkung pada media WPM dengan penambahan BAP 2 ppm. Subkultur adalah proses pemindahan eksplan dari media lama ke media baru. Menurut Pennel (1987) faktor multiplikasi dari satu eksplan sangat ditentukan oleh media kultur, jenis tanaman, dan frekuensi subkultur. Beberapa spesies menunjukkan peningkatan keragaman dengan bertambahnya subkultur (Yang et al. 2000).



A



B

Gambar 4. Respons eksplan pada perlakuan penambahan NAA 1 ppm sebelum dilakukan subkultur (A), respons eksplan setelah dilakukan subkultur dengan penambahan BAP 2 ppm (B)



A



B

Gambar 5. Respons eksplan pada perlakuan penambahan BA 2 ppm dan NAA 1 ppm sebelum dilakukan subkultur (A), respons eksplan setelah dilakukan subkultur dengan penambahan BAP 2 ppm (B)

Pada hasil penelitian, subkultur yang dilakukan terlihat dapat meningkatkan laju pertumbuhan jaringan pada tanaman lengkung (Gambar 4 dan Gambar 5). Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya tunas. Pada media subkultur tersebut, BAP 2 ppm dapat memacu terbentuknya tunas yang berasal dari satu mata tunas eksplan lengkung. Zat pengatur tumbuh tersebut telah banyak digunakan pada berbagai spesies tanaman karena dapat meningkatkan multiplikasi tunas secara langsung maupun tidak langsung.

## KESIMPULAN

Eksplan lengkung dataran rendah *Dimocarpus longan* Lour hanya mampu menghasilkan kalus. Kombinasi perlakuan penambahan BA dengan konsentrasi 2 ppm dan NAA dengan konsentrasi 1 ppm memberikan hasil terbaik pada tekstur kalus intermediate, warna kalus hijau, dan ukuran kalus besar. Perlakuan subkultur pada

media WPM dengan penambahan zat pengatur tumbuh BAP 2 ppm mampu merangsang pembentukan tunas lengkung dataran rendah *Dimocarpus longan* Lour.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah MA, Ali M, Marziah NH, Arrif AB. 1998. Establishment of cell suspension cultures of morinda elliptica for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54: 173-182.
- Abidin Z. 1994. *Dasar-Dasar Pengetahuan Tentang Zat Pengatur Tumbuh*. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Britto SJ, Natajara E, Arockiasamy DI. 2003. In vitro flowering and multiplication from nodal explants of *Ceropegia bulbosa* Roxb. var *ulbosa*. *Taiwania* 48 (2): 106 - 111.
- Daisy P, Wijayani A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Dwiyono E. 2009. *Induksi Kalus Tanaman Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) dengan Perlakuan Kondisi Gelap dan 2,4-D*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Hendaryono DPS, Wijayanti A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Kristina NN. 2009. *Induksi Tunas Tabat Barito (Ficus deltoidea*

- Jack) secara in vitro menggunakan Benzil Adenin (BA) dan Naphthalene Acetic Acid (NAA). *Jurnal Littri* 15(1).
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serano JJ. 2001. Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52 (34): 1 – 9
- Lestari E G, Purnamaningsih R. 2001. Mikropropagasi *Gynura pseudochina*. *Biosmart* 3 (2): 18-22.
- Marlin. 2005. Regenerasi in vitro planlet jahe bebas penyakit layu bakteri pada beberapa taraf konsentrasi BAP dan NAA. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia* 7 (1): 8-14.
- Marlina N. 2009. Teknik perbanyakan lili dengan kultur jaringan. *Buletin Teknik Pertanian* 14 (1): 6-8.
- Mulyana C. 2009. Budidaya Lengkeng Dimulai. [www.jurnalbogor.com](http://www.jurnalbogor.com). Diakses pada tanggal 7 Februari 2010.
- Oktavia F, Siswanto, Budiani MA, Sudarsono. 2003. Embriogenesis somatic langsung dan regenerasi planlet kopi arabika (*Coffea arabica*) dari berbagai eksplan. *Menara Perkebunan* 71 (2): 44-45.
- Pennel D. 1987. *Micropropagation in Horticulture*. Grower Books, London.
- Prahardini PER, Sudaryono T. 1992. Pengaruh kombinasi asam neftalen asetat dan benzyladenin terhadap kultur pepaya kultivar dampit secara in vitro. *J Hort* 2 (4): 6-11.
- Santoso U, Nursandi F. 2004. *Kultur Jaringan Tanaman*. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Siregar LAM. 2007. Organogenesis Pucuk Mikro *Eurycoma longifolia* Jack. *Prosiding Seminar Nasional dan Pameran Perkembangan Teknologi Tanaman Obat dan Aromatik*, Bogor.
- Soepardi G. 1983. *Sifat dan Ciri Tanah*. IPB, Bogor.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Kanisius, Yogyakarta.
- Sriyanti DP. 2000. Pelestarian tanaman nilam (*Pogostemon heyneanus* Benth.) melalui kultur mikrostek. *Biosmart* 2 (2): 19-22.
- Sunanto H. 1990. *Budidaya Lengkeng dan Aspek Ekonominya*. Kanisius, Yogyakarta.
- Suryowinoto M. 2000. *Pemuliaan Tanaman secara in vitro*. Kanisius, Yogyakarta.
- Thorpe TA, Patel KR. 1984. Clonal propagation adventitious buds. In: Vasil IK (ed.) *Cell Culture and Somatic Cell Genetic of Plants Vol I. Laboratory Practical and Their Application*. Academic Press Inc., London.
- Trimulyono G, Solichatun, Marlina SD. 2004. Perlakuan NAA dan kinetin terhadap kalus dan minyak atsiri *Pogostemon cablin*. *Biofarmasi* 2 (1): 9-14.
- Wakasa K, Yoshiaki K, Masaaki K. 1978. Differentiation from in vitro Cultures of *Ananas comosus*. In: Deberg PC, Zimmerman RH (eds.). *Micropropagation, Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wattimena GA. 2000. *Penggunaan Pengatur Tumbuh Tumbuhan pada Perbanyakan Propagul Tanaman*. PAU IPB, Bogor.
- Wattimena GA, Gunawan LW, Mattjik MA, Syamsudin E, Wiendi NMA, Ernawati A. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Bogor.
- Wattimena GA. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Widyarso M. 2010. *Kajian Penggunaan BAP dan IBA untuk Merangsang Pembentukan Tunas Lengkeng (Dimocarpus longan Lour) Varietas Pingpong secara in vitro*. [Skripsi] Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.
- Yang JL, Gui YL, Guo ZC. 2000. Studies on differentiation potential and chromosome stability of embryogenic callus in sub cultures of *Picea meyeri* Rehd et Wils. *Acta Bot Boreal Occident Sin* 20: 44-47.
- Yusnita. 2004. *Kultur jaringan Cara Memperbanyak Tanaman secara Efisien*. Agro Media Pustaka, Jakarta.
- Fitriani H. 2008. *Kajian Konsentrasi BAP dan NAA Terhadap Multiplikasi Tanaman Artemisia annua L. Secara In vitro*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Turhan H. 2004. Callus Induction and Growth in Transgenic Potato Genotypes. *African J Biotechnol* 3 (8): 375-378.
- Bhojwani SS, Razdan MK. 1983. *Plant Tissue Culture: Theory and Practice*. Elsevier, Amsterdam.
- Stepan-Sarkissian G. 1990. Selection of media for tissue and cell culture. *Methods Mol Biol* 6: 1-12.
- Waering PF, Phillips IDJ. 1981. *Growth and differentiation in plants*. 3rd ed. Pergamon Press Ltd, Oxford.
- Jona R, Menini UG. 1987. *Tissue culture of selected tropical fruit plants: a handbook on the application of tissue culture to plant propagation*. FAO, Rome.



## Kadar asam fitat dan protein tempe koro babi (*Vicia faba*) dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi

SEPTIANA NUR FITRIANI, SRI HANDAJANI, DIAN RACHMAWANTI AFFANDI\*

*Fitriani SN, Handajani S, Affandi DR. 2016. The phytic acid and protein contents on faba beans (Vicia faba) tempeh production with variation of size reduction and fermentation. Bioteknologi 13: 54-62.* The aims of this research is to know the effect of size reduction variation and fermentation time variation of faba beans tempeh production to phytic acid and soluble protein contents. This research use factorial experiment that arranged in Randomized Complete Design (RCD) with two experimental factors including size reduction (chopped and sliced) and time of fermentation (0, 30, 36, 42, and 48 hour). The result showed phytic acid contents at fermentation 0, 30, 36, 42, and 48 hour on faba beans tempeh of chopped seeds are 1.003%; 0.228%; 0.165%; 0.160%; and 0.087% respectively. Then on faba beans tempeh of sliced seeds are 1.003%; 0.389%; 0.233%; 0.173%; and 0.101% respectively. Contents of soluble protein on faba beans tempeh of chopped seeds are 2.794%; 3.850%; 4.139%; 4.310; and 5.450% respectively. Then faba beans tempeh of sliced seeds are 2.794%; 3.528%; 4.114%; 4.261%; and 5.392% respectively. Fermentation time and size of faba beans seeds affect on phytic acid and soluble protein contents of faba beans tempeh. The longer fermentation time of faba beans tempeh caused lower phytic acid content and higher soluble protein content. The smaller size of faba beans seeds on tempeh caused lower phytic acid content and higher soluble protein content. Faba beans tempeh of chopped seeds with 48 hour fermentation had the lowest of phytic acid content and the highest of soluble protein contents of all the sample with variation of reducing size and duration of fermentation.

▼Alamat korespondensi:

Program Studi Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a Surakarta 57126, Jawa Tengah, Indonesia. Tel./Fax.: +92-271- 637457.

Manuskrip diterima: 22 Januari 2016.  
Revisi disetujui: 7 Agustus 2016.

Keywords: Faba beans, phytic acid, soluble protein, fermentation, size reduction

*Fitriani SN, Handajani S, Affandi DR. 2016. Kadar asam fitat dan protein tempe koro babi (Vicia faba) dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi. Bioteknologi 13: 54-62.* Tempe merupakan salah satu sumber protein nabati yang sering dikonsumsi dan pada umumnya berbahan baku kedelai. Untuk mengangkat koro-koroan lokal non-kedelai pada penelitian ini digunakan koro babi (*Vicia faba*) sebagai bahan baku tempe. Koro babi (*Vicia faba*) merupakan salah satu *Leguminosae* lokal yang mengandung asam fitat. Asam fitat memiliki kelebihan yaitu sebagai anti oksidan, namun asam fitat juga memiliki kelemahan yaitu sifatnya sebagai nir-gizi. Dalam penelitian ini dikaji asam fitat sebagai nir-gizi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pengecilan ukuran biji koro babi (*Vicia faba*) dan lama fermentasi terhadap kadar asam fitat dan kadar protein terlarut pada pembuatan tempe koro babi (*Vicia faba*). Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu variasi pengecilan ukuran (cacah dan rajang) serta variasi lama fermentasi (0,30,36,42 dan 48 jam). Hasil penelitian menunjukkan kadar asam fitat pada fermentasi 0, 30, 36, 42, dan 48 jam biji koro babi cacah berturut-turut adalah 1,003%; 0,228%; 0,165%; 0,160%; dan 0,087%, sedangkan untuk koro babi rajang adalah 1,003%; 0,389%; 0,233%; 0,173%; dan 0,101%. Kemudian untuk kadar protein terlarut biji koro babi cacah berturut-turut adalah 2,794%; 3,850%; 4,139%; 4,310; dan 5,450% dan untuk biji koro babi rajang adalah 2,794%; 3,528%; 4,114%; 4,261%; dan 5,392%. Berdasar hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa lama fermentasi dan ukuran biji koro babi berpengaruh pada kadar asam fitat dan kadar protein terlarut pada tempe koro babi. Semakin lama fermentasi tempe koro babi maka kadar asam fitat semakin rendah dan kadar protein terlarut semakin tinggi. Semakin kecil ukuran biji tempe koro babi, maka kadar asam fitat semakin rendah dan kadar protein terlarutnya semakin tinggi. Tempe koro babi biji cacah fermentasi 48 jam memiliki kadar asam fitat terendah dan kadar protein terlarut tertinggi dari semua sampel dengan variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran.

Kata kunci: Koro babi, asam fitat, protein terlarut, fermentasi, pengecilan

## PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu sumber protein nabati yang sering dikonsumsi dan pada umumnya berbahan baku kedelai. Untuk tempe non-kedelai sebenarnya bukan hal baru bagi masyarakat Indonesia. Ada beberapa jenis Leguminosae/koro-koroan lokal yang potensial untuk produksi tempe yaitu koro tunggak (*Vigna unguiculata*), koro gude (*Cajanus cajan*), koro babi (*Vicia faba*), dan koro bengkok (*Mucuna pruriens*). Di samping itu beberapa jenis koro-koroan lainnya juga diketahui dapat digunakan sebagai bahan baku tempe, misalnya kacang kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*), kara pedang (*Canavalia ensiformis*), kacang lupin (*Lupinus angustifolius*), kacang merah (*Phaseolus vulgaris*), kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), kara wedus/bengkok (*Lablab purpureus*), dan kara kratok (*Phaseolus lunatus*). Penelitian tempe berbahan koro-koroan masih perlu ditingkatkan lagi, untuk meningkatkan mutu dan kandungan gizinya sehingga dapat menggali potensi koro-koroan lokal asli Indonesia (Syatief et al. 1999; Litbang Deptan 2008).

Koro babi (*Vicia faba*) merupakan salah satu jenis Leguminosae yang dapat digunakan sebagai alternatif bahan baku sumber protein non-kedelai yang dapat diolah menjadi tempe. koro babi memiliki kandungan protein yang cukup tinggi yaitu 22% (NutritionFacts 2009) hingga 26,12% (USDA 2016). Selain itu koro babi merupakan komoditas lokal jadi tidak terpengaruh oleh biaya masuk impor.

Seperti jenis leguminosa lainnya, koro babi mengandung senyawa asam fitat. Asam fitat memiliki keuntungan sebagai antioksidan, akan tetapi juga memiliki kelemahan karena sifatnya sebagai nir-gizi/antigizi. Tingginya kadar asam fitat yang dapat berikatan dengan logam dan protein membentuk kompleks senyawa tidak larut dapat menyebabkan turunnya ketersediaan mineral dan protein bagi tubuh, sehingga menurunkan nilai gizi produk pangan yang bersangkutan. Kadar asam fitat dapat diturunkan salah satu caranya dengan fermentasi seperti pada pembuatan tempe (Sudarmadji 1975; Muchtadi 1989; Sutardi et al. 1993).

Besarnya ukuran biji koro babi juga merupakan kekurangan yang harus diatasi dalam pembuatan tempe koro babi. Oleh karena itu diperlukan suatu proses yang tepat untuk menghasilkan produk tempe koro babi yaitu dengan melakukan pengecilan ukuran.

Dengan variasi ukuran (perajangan dan pencacahan) dan variasi lama fermentasi diharapkan akan didapatkan perlakuan yang tepat untuk mendapatkan tempe koro babi yang terbaik yaitu dengan kandungan protein terbesar dan kandungan asam fitat terkecil. Diduga perbedaan ukuran biji dan lama fermentasi tempe koro babi akan berpengaruh pada kadar asam fitat dan protein terlarutnya.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh variasi pengecilan ukuran biji koro babi (*Vicia faba*) dan lama fermentasi terhadap kadar asam fitat pada tempe koro babi; serta mengetahui pengaruh variasi pengecilan ukuran biji koro babi dan lama fermentasi terhadap kadar protein pada tempe koro babi.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret Surakarta dan Lab. CV. Chem-Mix Pratama, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan pada April - September 2009.

### Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan tempe adalah koro babi yang dibeli dari pasar Wonosobo, ragi tempe merk "Raprima" produksi Bandung yang diperoleh dari Koperasi "Makmur" Mojosongo Surakarta, air PAM, daun pisang dan kertas koran. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis asam fitat adalah: HNO<sub>3</sub> 0,5 M, HNO<sub>3</sub> 0,5 N FeCl<sub>3</sub>, amil alkohol, amonium tiosianat, natrium fitat (Na-fitat), dan aquadest. Untuk uji protein terlarut digunakan larutan lowry A (larutan folin ciocalteau dan aquadest, 1:1), lowry B (campuran larutan 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> dalam NaOH 1N dengan CUSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O dan Na-K-tartrat 2%) dan larutan standar BSA atau kasein.

### Alat

Alat yang digunakan, yaitu oven (merk Memmert UNM 400), spektrofotometer (merk Thermo electron corporation), Sentrifuse (merk Centifuge PLC Series), waterbath (merk Memmert), hot plate (merk Heidolph Mr 3001K), tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, pipet ukur, pipet tetes, tabung reaksi, botol timbang, pengaduk, magnetic stirrer, blender, baskom,

timbangan mekanik, dan kertas saring. Alat untuk pembuatan tempe: kompor, panci, alat perajang, baskom dan timbangan mekanik.

### Rancangan percobaan

Penelitian ini adalah penelitian hubungan fungsional melalui suatu eksperimen dengan memakai sampel tempe koro babi dan rancangan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari dua factor, yaitu variasi pengecilan ukuran (2 macam) serta variasi lama fermentasi (5 macam) (Tabel 1).

### Pengamatan parameter/peubah

Peubah yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut. Variabel bebas, yaitu lama fermentasi dan pengecilan ukuran pada tempe koro babi (*Vicia faba*). Variabel terikat utama, yaitu kadar protein dan kadar asam fitat pada tempe koro babi.

### Tata laksana penelitian

#### Pembuatan tempe koro babi

Koro babi (*Vicia faba*) disortasi dari cemaran fisik kemudian ditimbang, Lalu dicuci terlebih dahulu sebelum ke tahap berikutnya. koro babi direbus sampai mendidih. Perbandingan air dan koro babi adalah 4:1. Setelah mendidih buang airnya ganti dengan air dingin dan rebus kembali sampai mendidih. Setelah dingin, kulitnya dikelupas. koro babi yang telah dikelupas direndam kembali dengan air. Perbandingan air dan koro babi adalah 4:1 selama 6 x 12 jam. Tiap 12 jam air diganti. Selanjutnya dilakukan pengukusan selama 20 menit dengan api kecil, lalu ditiriskan menggunakan saringan dan didinginkan dalam suhu kamar dan udara terbuka.

#### Perlakuan pengecilan ukuran

Koro babi (*Vicia faba*) dibagi 2 bagian sama banyak, 1 bagian dirajang (1 lembaga dibelah vertikal menjadi 3) dimensi  $\pm 2,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm, dan 1 bagian dicacah (1 lembaga dibelah vertikal menjadi 3, kemudian dibelah horizontal 5-7) dimensi  $\pm 0,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm.

Setelah perlakuan pengecilan ukuran, koro babi diinokulasi menggunakan ragi tempe dengan perbandingan 2gr ragi tempe dalam 1kg koro babi, dicampur hingga homogen, lalu dibungkus dengan daun pisang. Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan menempatkan daun yang sudah diisi sampel, dengan menata di rak pada suhu kamar selama 30 jam, 36 jam, 42 jam dan 48 jam.

Tabel 1. Rancangan Percobaan

Lama fermentasi	Koro rajang	Koro cacah
0 jam	0R	0C
30 jam	30R	30C
36 jam	36R	36C
42 jam	42R	42C
48 jam	48R	48C

### Analisis kimia

#### Uji kadar asam fitat

Uji kadar asam fitat merupakan pengujian untuk mengetahui kadar asam fitat dalam tempe koro babi. Pengujian kadar asam fitat menggunakan metode Davies dan Reid (1979). Prinsip metode ini adalah ion ferri yang telah membentuk kompleks dengan fitat tidak lagi dapat bereaksi dengan ion-ion tiosianat untuk membentuk kompleks warna merah. Dengan adanya amil alkohol, densitas optik larutan yang diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan  $\lambda$  465 nm berbanding terbalik dengan konsentrasi fitat. Semakin banyak jumlah fitat pada bahan, absorbansinya akan semakin rendah (Davies dan Reid 1979; Khokhar dan Fenwick 1994).

Sebelum dianalisis, tempe tiap perlakuan dikecilkan ukuran kemudian dikeringkan dalam *cabinet dryer* pada suhu 40 °C selama 24 jam. Setelah itu bahan dihaluskan dengan menggunakan blender hingga melewati ayakan 80 mesh. Semua bahan yang telah halus disimpan dalam botol kering, ditutup rapat untuk selanjutnya dianalisis kadar asam fitatnya.

#### Uji kadar protein terlarut

Uji kadar protein dengan menggunakan metode Lowry. Cara Lowry digunakan untuk menganalisis kadar protein terlarut dalam bahan makanan. Prinsip dari uji lowry ini yaitu adanya reaksi antara  $\text{Cu}^{2+}$  dengan ikatan peptida dan reduksi asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat oleh tirosin dan triptofan (merupakan residu protein) akan menghasilkan warna biru. Kadar protein terlarut ditentukan dengan menggunakan persamaan kurva standar (Apriyantono et al. 1989).

Penentuan kadar protein pada setiap tahap pembuatan tempe koro babi dilakukan dengan menggunakan kurva standar BSA (Bovine Serum Albumin). Hasil pembuatan kurva baku memberikan persamaan garis regresi  $y=a+bx$ ; y

adalah absorbansi dan  $x$  adalah kadar protein (mg/mL).

#### Analisis data

Pengujian statistik untuk parameter asam fitat dan protein terlarut dianalisis menggunakan software SPSS 13.0 menggunakan analisis variansi (ANOVA) pada  $\alpha$  5% dilanjutkan dengan pengujian *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Asam fitat

Ketidaklarutan asam fitat pada beberapa keadaan merupakan salah satu faktor yang secara nutrisi dianggap tidak menguntungkan, karena dengan demikian menjadi sukar diserap tubuh. Dengan adanya perlakuan panas, pH, atau perubahan kekuatan ionik selama pengolahan dapat mengakibatkan terbentuknya garam fitat yang sukar larut. Muchtadi (1989) menyebutkan bahwa fermentasi dapat mengurangi, bahkan menghilangkan asam fitat, sehingga tempe dan kecap tidak lagi mengandung senyawa tersebut. Tangenjaya (1979) juga melaporkan bahwa pemanasan pada suhu 100 °C, pH 2 selama 2 jam dapat mengurangi kadar fitat sampai dengan 70%. Kadar asam fitat pada tempe koro babi dengan

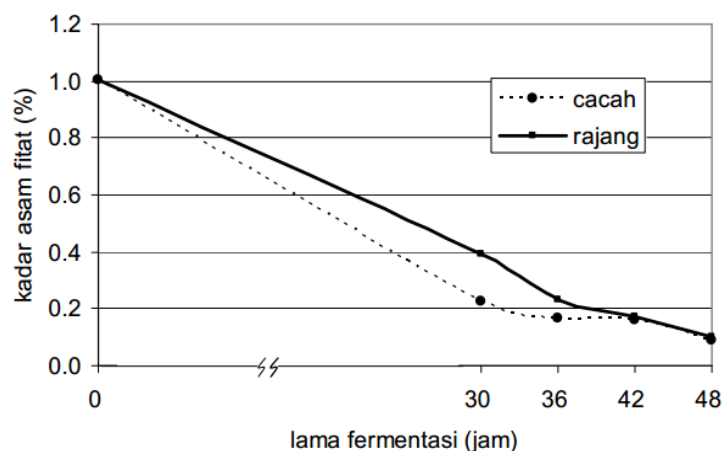
variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran dapat dilihat pada Tabel 2. dan Gambar 1.

Kadar asam fitat sebelum terjadi fermentasi (fermentasi 0 jam) tempe koro babi cacah (1,003%) tidak beda nyata dengan rajang (1,003%), ini disebabkan karena proses perlakuan pada kedua tempe tersebut sama, proses yang sama, yaitu dimulai dari sortasi, perebusan, perendaman selama 6x12 jam, pengecilan ukuran biji, pengukusan, penirisan, pendinginan dan inokulasi. Jika dibandingkan dengan kandungan asam fitat koro babi mentah menurut Reddy and Sathe (2002) and Reddy et al. (1982) sebesar 0,511-1,77% dan Shi et al. (2004) sebesar 0,98% tidak berbeda jauh dengan kandungan asam fitat koro babi fermentasi 0 jam. Meskipun panas yang dihasilkan selama proses pengukusan dapat menurunkan kadar asam fitat namun ini bukan cara efektif untuk mereduksi asam fitat (Muchtadi 1998).

**Tabel 2.** Kadar asam fitat (% berat kering) tempe koro babi dengan berbagai perlakuan

Lama fermentasi (jam)	Pengecilan ukuran	
	Cacah	Rajang
0	1,003 <sup>e</sup>	1,003 <sup>e</sup>
30	0,228 <sup>c</sup>	0,389 <sup>a</sup>
36	0,165 <sup>b</sup>	0,233 <sup>c</sup>
42	0,160 <sup>b</sup>	0,173 <sup>b</sup>
48	0,087 <sup>a</sup>	0,101 <sup>a</sup>

Keterangan: \*) superskrip yang berbeda menunjukkan beda nyata ( $p < 0,05$ )



**Gambar 1.** Kadar asam fitat terhadap lamanya waktu fermentasi

Fermentasi 30 dan 36 jam memberi pengaruh pada kadar asam fitat tempe koro babi rajang dan cacah. Kadar asam fitat fermentasi 30 jam tempe koro babi cacah (0,390%) lebih rendah dibanding rajang (0,228%). Ini menunjukkan enzim fitase yang berasal dari *Rhizopus Oligosporus* mudah menghidrolisis asam fitat pada biji koro yang berukuran lebih kecil karena hifa kapang lebih mudah menembus biji koro berukuran kecil. Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Apriadji (2008) bahwa pada pembuatan tempe kedelai pecah, kapang akan lebih mudah menembus kedelai. Kapang terdiri dari benang yang disebut hifa, kumpulan hifa ini dikenal sebagai miselium. Kapang tumbuh dengan cara memperpanjang hifa (Buckle et al. 1985). Semakin kecil ukuran biji koro pada tempe koro babi, maka semakin mudah hifa menembus kotiledon dan semakin banyak asam fitat yang diuraikan oleh fitase yang dihasilkan oleh kapang. Diduga kecepatan kapang dalam menghidrolisis asam fitat lebih cepat pada biji koro babi cacah dibanding rajang.

Pada tahap fermentasi 0 jam kapang telah melakukan aktivitas metabolisme dan enzim fitase yang dihasilkan telah menghidrolisis asam fitat yang dapat menurunkan kadar asam fitat. Sesuai dengan pernyataan dari Sudarmadji (1975); Muchtadi (1989); dan Sutardi et al. (1993), bahwa fermentasi dapat mengurangi asam fitat. Sudarmadji (1975) menyebutkan bahwa perlakuan paling efektif untuk mengeliminasi kandungan asam fitat hingga sepertiganya adalah dengan cara fermentasi.

Menurut Sutardi et al. (1993), kadar asam fitat yang merupakan *chelating agent* senyawa protein dapat diturunkan kadarnya dengan pembuatan tempe. Pada proses pembuatan tempe bengkuk seluruh tahapan prosesnya, mulai perendaman sampai fermentasi, dapat menurunkan kadar asam fitat dengan total penurunan mencapai 53%. Namun asam fitat sangat tahan terhadap pemanasan selama pengolahan, hasil penelitian menunjukkan bahwa produk olahan kedelai tanpa fermentasi tetap mengandung asam fitat. Tahap fermentasi dapat mengurangi, bahkan menghilangkan asam fitat (Muchtadi 1989). Tangenjaya (1979) juga melaporkan bahwa pemanasan pada suhu 100 °C, pH 2 selama 2 jam dapat mengurangi kadar asam fitat sampai dengan 70%. Ini disebabkan karena keberadaan mikroorganisme pada inokulum mempunyai peranan yang penting khususnya dalam membantu menurunkan kadar asam fitat tersebut. *Rhizopus oligosporus*

menghasilkan enzim fitase yang merupakan salah satu enzim yang dapat menghidrolisis asam fitat menjadi inositol dan orthofosfat (Pangastuti dan Triwibowo 1996).

Turunnya kadar asam fitat selama fermentasi selain disebabkan oleh ragi tempe (kapang), diperkirakan juga disebabkan oleh aktivitas bakteri yang tumbuh dengan baik setelah kapang pada tempe menurun pertumbuhannya (Sudarmadji 1975). Menurut Sarwono (2010), setidaknya terdapat tiga spesies kapang pada ragi dari genus *Rhizopus*, yaitu *R. oligosporus*, *R. oryzae*, dan *R. stolonifer*.

Sudarmadji dan Markakis (1977) mengamati pertumbuhan *Bacillus licheniformis* dan *Bacillus cereus* pada tempe setelah fermentasi 24 jam sampai 36 jam merupakan bakteri jenis *Bacillus* sp. yang terdapat pada tempe yang mulai busuk. Powar dan Jaganathan (1967) melaporkan adanya aktivitas fitase pada bakteri *Bacillus subtilis*. Dengan demikian turunnya kadar asam fitat selama fermentasi tidak hanya disebabkan adanya jamur (*Rhizopus oligosporus*), tetapi juga disebabkan tumbuhnya bakteri selama pembuatan tempe.

Kadar asam fitat pada fermentasi 36 jam mengalami penurunan secara nyata antar perlakuan dan dengan fermentasi sebelumnya. Semakin lama waktu fermentasi, miselium kapang semakin tebal karena pertumbuhan kapang yang semakin meningkat dibandingkan pada fermentasi sebelumnya. Dengan pertumbuhan kapang dan semakin tebalnya miselium kapang maka enzim fitase yang diproduksi semakin meningkat yang ditunjukkan dengan semakin menurunnya kadar asam fitat.

Kadar asam fitat pada fermentasi 42 jam tidak menunjukkan beda nyata antara tempe koro babi cacah dan rajang, yaitu berturut-turut 0,160% dan 0,173%. Kadar asam fitat tempe koro babi pada fermentasi 48 jam juga tidak menunjukkan beda nyata antara tempe dengan perlakuan cacah dan rajang, berturut-turut yaitu 0,087% dan 0,101%. Diduga pada fermentasi 42 jam, mikroorganisme yang tumbuh yaitu kapang dan bakteri dalam tempe koro babi telah berada dalam fase stasioner. Fase stasioner pada kapang dimungkinkan dimulai lebih cepat dibandingkan bakteri. Pada fase stasioner ini, miselia yang diproduksi oleh kapang yang tumbuh menembus biji koro telah sama banyaknya antara sampel cacah dan sampel rajang. Jadi kadar asam fitat keduanya menunjukkan hasil yang tidak beda nyata.

Kadar asam fitat pada fermentasi 48 jam terjadi penurunan secara nyata dari fermentasi 42 jam untuk kedua variasi pengecilan ukuran. Penurunan ini diduga karena pada fase stasioner, kapang yang memproduksi enzim fitase untuk mereduksi asam fitat tetap tumbuh. Semakin lama fermentasi maka kadar asam fitat semakin turun. Untuk tempe koro babi cacah pada awal fermentasi kadarnya 1,003% dan mengalami penurunan sebesar 91,6% pada akhir fermentasi menjadi 0,0868%. Pada tempe koro babi rajang juga turun 90,16% yang awal fermentasi kadarnya 1,003% menjadi 0,101% pada akhir fermentasi. Kadar asam fitat semua ukuran biji koro babi berbeda nyata pada awal dengan akhir fermentasi. Hal ini berarti, lama fermentasi berpengaruh menurunkan kadar asam fitat.

Berdasarkan Gambar 1. dapat dilihat bahwa variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar asam fitat selama fermentasi tempe koro babi. Kadar asam fitat paling rendah ditemukan pada tempe koro babi cacah dengan lama fermentasi 48 jam sebesar 0,0868%.

### Protein terlarut

Asam amino dihitung sebagai protein terlarut dengan pengujian metode Lowry. Ini karena interaksi antara protein dan air salah satunya terjadi melalui rantai cabang (gugus R) asam amino-asam amino (interaksi melalui ionisasi, polar dan nonpolar) selain melalui ikatan peptida dalam rantai polipeptida (interaksi melalui dipole-dipole) (Marseno 1998). Namun jika fermentasi terlalu lama, tempe akan menghasilkan amoniak yang menyebabkan bau menyengat yang lama-kelamaan akan busuk.

Perombakan menjadi asam amino berpengaruh terhadap aroma khas tempe yang dihasilkan.

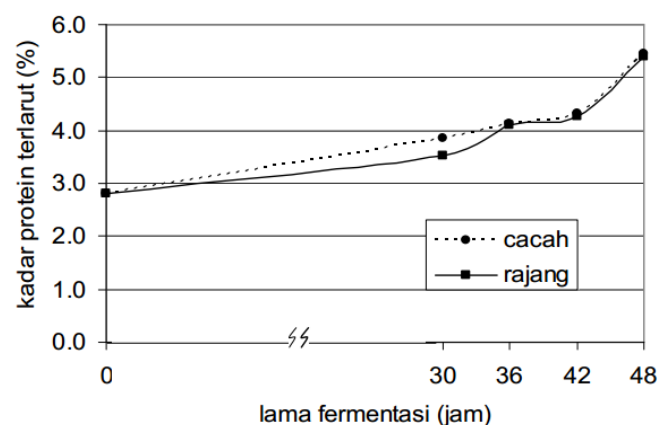
Protein merupakan komponen utama dalam tempe. Tempe kedelai memiliki kelebihan jika dibandingkan kedelai mentah. Secara kimiawi hal ini bisa dilihat dari kadar padatan terlarut, nitrogen terlarut, asam amino bebas, nilai cerna, nilai efisiensi protein serta skor proteinnya (Mulyani 2013). Koro babi merupakan salah satu jenis leguminosa lokal yang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi sehingga baik untuk dijadikan tempe. Pada penelitian pembuatan tempe dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi ini dilakukan pengukuran kadar protein terlarut (kadar asam amino bebasnya). Data kadar protein terlarut pada tempe koro babi dengan variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran dapat dilihat pada Tabel 3. dan Gambar 2.

Rata-rata kadar protein dalam setiap tahap pembuatan tempe koro babi terlihat pada Tabel 3. Berdasar Tabel 3. secara keseluruhan kadar protein terlarut tempe koro babi cacah tidak beda nyata dengan koro babi rajang, kecuali pada lama fermentasi 30 jam, dan ternyata kadar protein terlarutnya lebih tinggi pada sampel cacah.

**Tabel 3.** Kadar Protein Terlarut (% berat kering) Tempe koro babi dengan Berbagai Perlakuan

Lama fermentasi (Jam)	Pengecilan ukuran	
	Cacah	Rajang
0	2,794 <sup>a</sup>	2,794 <sup>a</sup>
30	3,850 <sup>c</sup>	3,528 <sup>b</sup>
36	4,139 <sup>u</sup>	4,114 <sup>u</sup>
42	4,310 <sup>e</sup>	4,261 <sup>u,e</sup>
48	5,450 <sup>t</sup>	5,392 <sup>t</sup>

Keterangan: \*)superskrip yang berbeda menunjukkan beda nyata ( $p < 0,05$ )



**Gambar 2.** Kadar protein terhadap lama fermentasi tempe koro babi rajang dan cacah

Sebelum terjadi fermentasi (fermentasi 0 jam) kadar protein terlarut pada tempe koro babi cacah (2,794%) tidak beda nyata dengan tempe koro babi rajang (2,794%), ini dikarenakan perlakuan pada kedua tempe tersebut mengalami proses yang sama, yaitu dimulai dari sortasi, perebusan, perendaman selama 6x12 jam, pengecilan ukuran biji, pengukusan, penirisan, pendinginan sampai inokulasi.

Setelah fermentasi selama 30 jam, tempe koro babi cacah (3,850%) memiliki kandungan protein yang lebih tinggi dibanding tempe koro babi rajang (3,528%). Protein tempe koro babi cacah lebih mudah didegradasi oleh kapang karena ukuran biji koronya lebih kecil dibandingkan tempe koro babi rajang. Biji koro babi pada tempe koro babi cacah ukurannya lebih kecil karena mengalami pengecilan ukuran dengan cara dicacah (dimensi ukuran  $\pm 0,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm) dibandingkan dengan cara dirajang (dimensi ukuran  $\pm 2,5 \times 0,5 \times 0,5$  cm). Dengan demikian miselia kapang akan lebih mudah menembus biji koro sampai ke bagian tengah atau bagian dalam koro sehingga protein terlarutnya lebih besar pada tempe koro babi cacah.

Jika dibandingkan pada awal fermentasi (0 jam), kadar protein terlarut pada fermentasi 30 jam mengalami kenaikan secara drastis, baik pada sampel koro babi cacah maupun rajang. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kapang telah melakukan metabolismenya dan menghasilkan enzim protease sehingga protein terpecah menjadi komponen lebih sederhana, yaitu asam amino bebas (protein terlarut).

Pada fermentasi 36 jam, 42 jam dan 48 jam kadar protein terlarut tempe koro babi antara perlakuan cacah dan rajang tidak beda nyata. Ini diduga karena pada fermentasi 36 jam, kapang penghasil enzim protease telah berada dalam fase stasioner. Pada fase stasioner, miselia yang tumbuh menembus biji koro sudah sama banyaknya antara sampel cacah dan sampel rajang. Jadi kadar protein antara keduanya menunjukkan hasil yang tidak beda nyata lagi.

Kadar protein terlarut tempe koro babi pada sampel cacah mengalami kenaikan secara nyata dari sebelum fermentasi (0 jam) sampai lama fermentasi 48 jam. Kemudian untuk sampel rajang juga terjadi kenaikan secara nyata, kecuali untuk pada lama fermentasi 36 jam sampai 42 jam.

Kadar protein terlarut jika dilihat dari waktu fermentasi 0 sampai 48 jam mengalami kenaikan sebesar 195% untuk tempe koro babi cacah dan sebesar 192% untuk tempe koro babi rajang. Ini

sesuai dengan pernyataan Astuti et al. (2000) yang menyebutkan bahwa kandungan nitrogen terlarut kedelai sebesar 3,5 mg/g, sedangkan pada tempe mengalami kenaikan 248% menjadi 8,7 mg/g.

Enzim protease pada tempe dihasilkan oleh kapang *Rhizopus oligosporus*. Perombakan senyawa kompleks protein menjadi senyawa-senyawa yang lebih sederhana adalah penting dan merupakan salah satu faktor penentu kualitas tempe sebagai sumber nabati yang memiliki nilai cerna yang tinggi. Kandungan protein yang dinyatakan sebagai kadar total nitrogen memang tidak berubah selama fermentasi. Perubahan terjadi atas kadar protein terlarut dan kadar asam amino bebas (Astuti et al. 2000). Menurut Ferlina (2009), jumlah nitrogen terlarut dalam tempe meningkat 0,5-2,5% dan jumlah asam amino bebasnya setelah fermentasi meningkat 1-85 kali lipat dibanding dengan saat masih berupa kedelai. Melihat dari susunan aminonya, tempe mempunyai kadar lisin yang tinggi, tetapi metionin-sisteinnya rendah.

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa lama fermentasi dan pengecilan ukuran berpengaruh terhadap kadar protein terlarut. Selama proses fermentasi pada tempe, terjadi perombakan senyawa molekul kompleks menjadi komponen yang lebih sederhana. Semakin lama waktu fermentasi dan semakin kecil ukuran biji maka jumlah protein yang terdegradasi oleh enzim protease menjadi asam amino semakin besar.

#### **Kadar asam fitat dan protein terlarut**

Kadar protein dalam biji koro babi mempunyai hubungan dengan kadar asam fitat. Dalam biji koro babi mentah sejumlah protein berikatan dengan asam fitat yang menyebabkan kelarutannya rendah setelah melalui tahap proses pembuatan tempe. Sesuai dengan penelitian dari Carnovale et al. (1988) yang mempelajari tentang ketersediaan protein dengan fitat pada koro babi, fitat secara tidak langsung dapat membentuk kompleks dengan grup bermuatan negatif dari protein oleh ion kalsium. Pernyataan ini mendukung hipotesis, bahwa interaksi antara fitat-protein mengurangi ketersediaan protein.

Dari hasil penelitian dapat dibuktikan bahwa asam fitat efektif direduksi dengan proses fermentasi. Terjadi hubungan yang berkebalikan antara kadar asam fitat yang turun dengan kadar protein terlarut yang terjadi peningkatan, ini berarti protein yang berikatan dengan asam fitat

semakin berkurang yang mengakibatkan kadar protein semakin naik selama fermentasi berlangsung. Hubungan kadar asam fitat dan kadar protein pada tempe koro babi dengan variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran dapat dilihat pada Gambar 3.

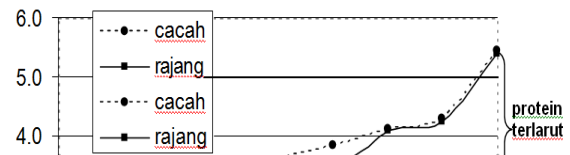
Berdasarkan Gambar 3. dapat dilihat bahwa koro babi cacah memiliki kadar asam fitat lebih rendah, berkebalikan dengan kadar proteinnya yang lebih tinggi dibandingkan pada koro babi rajang. Hal ini disebabkan miselium kapang lebih mudah menembus biji yang berukuran lebih kecil. Semakin mudah biji ditembus oleh miselium maka semakin mudah dan banyak enzim fitase yang dihasilkan oleh ragi dalam menghidrolisis asam fitat menjadi mioinositol dan ortofosfat dan semakin banyak pula protein yang diuraikan enzim protease yang dihasilkan oleh kapang menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu asam amino bebas.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini disimpulkan bahwa variasi ukuran dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar asam fitat dan kadar protein terlarut selama fermentasi tempe koro babi. Semakin lama waktu fermentasi dan semakin kecil ukuran biji maka kadar asam fitatnya semakin kecil dan protein terlarutnya semakin besar. Tempe koro babi yang paling diinginkan yaitu tempe koro babi yang memiliki kadar kadar asam fitat paling rendah tetapi kadar protein terlarutnya paling tinggi, terdapat pada perlakuan tempe koro babi cacah dengan lama fermentasi 48 jam sebesar 0,087% dan 5,450%.

Pada fermentasi 0, 30, 36, 42, dan 48 jam kadar asam fitat biji koro babi cacah berturut-turut adalah 1,003%; 0,228%; 0,165%; 0,160%; dan 0,087%, sedangkan untuk koro babi rajang adalah 1,003%; 0,389%; 0,233%; 0,173%; dan 0,101%. Pada fermentasi 0, 30, 36, 42, dan 48 jam kadar protein terlarut biji koro babi cacah berturut-turut adalah 2,794%; 3,850%; 4,139%; 4,310%; dan 5,450% dan untuk biji koro babi rajang adalah 2,794%; 3,528%; 4,114%; 4,261%; dan 5,392%.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa anti-gizi lain selain asam fitat baik pada biji maupun pada tempe koro babi. Selain itu perlu juga penelitian terhadap kadar asam fitat dan protein terlarut pada tempe koro-koroan selain koro babi dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi.



**Gambar 3.** Hubungan Kadar Asam Fitat dan Kadar Protein Terlarut Selama Fermentasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Apriadi H. 2008. Kedele dan Tempe Masih Dianggap Sepele. [www.docudesk.com](http://www.docudesk.com). Diakses 29 Juli 2008 Jam 20.45 WIB
- Apriyantono A, Fardiaz D, Puspitasari NL, Yasni S, Budijanto S. 1989. Petunjuk Laboratorium Analisis Pangan. IPB Press. Bogor
- Astuti M, Meliala A, Dalais FS, Wahlqvist ML. 2000. Tempe a nutritious and healthy food from Indonesia. *Asia Pacific J Clin Nutr* 9(4): 322-325.
- Buckle, K. A, Edwards, H, Fleet, G.H, & Wooton, M. 1985. *Ilmu Pangan*. UI Press. Jakarta.
- Carnovale E, Lugaro E, Lombardi-Boccia G. 1988. Phytic acid in faba bean and pea: Effect on protein availability. *Cereal Chem.* 65(2):114-117.
- Davies NT, Reid H. 1979. An evaluation of phytate, zinc, copper, iron and availability from soy based textured vegetable protein meat substitutes or meat extruders. *Br. J. Nutr.*, 41: 579
- Ferlina S. 2009. *Tempe*. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Khokhar S, Fenwick GR. 1994. Phytate content of Indian foods and intakes by vegetarian Indians of Hisar Region, Haryana State. *J Agric Food Chem* 42 (11): 2440-2444.
- Litbang Deptan. Litbang Deptan 2008a. *Alternatif Kacang-kacangan Non Kedelai untuk Tahu dan Tempe*. Litbang, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Marseno DW. 1998. *Hand Out Kimia Hasil Pertanian Materi Air, Protein dan Enzim*. Jurusan TPHP FTP UGM.
- Muchtadi D. 1989 *Aspek Biokimia dan Gizi Kimia dalam Keamanan Pangan*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat antar Universitas Pangan Gizi. IPB. Bogor.
- Muchtadi, D. 1998. Kajian Gizi Produk Olahan Kedelai. *Prosiding Seminar Pengembangan Pengolahan dan Penggunaan Kedelai Selain Tempe*. Kerjasama Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB dengan American Soybean Association.
- Mulyani S. 2013. Karakterisasi Tepung Tempe dari Empat Varietas Kedelai Impor dan Aplikasinya Menjadi Minuman [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor
- Nutrition Facts. 2009. Beans, fava in pod, raw. <http://www.nutritionfacts.com>. Didownload pada tanggal 2 Februari 2009, pukul 16.15 WIB.
- Pangastuti HP, Triwibowo S. 1996. Penelitian Proses Pembuatan Tempe Kedelai II. Pengaruh lama fermentasi terhadap kandungan asam fitat dalam tempe kedelai. *Cermin Kedokteran* 108: 31-36.
- Powar VK, Jagannathan V. 1967. Phytase from *Bacillus subtilis*. *Indian J Biochem* 4 (3):184-185.
- Reddy NR, Sathe SK, Salunkhe DK. 1982. Phytate in legumes and cereals. *Adv Food Res* 28: 1-92.
- Reddy NR, Sathe SK. 2002. *Food Phytate*. CRC Press, Florida.
- Sarwono B. 2010. *Usaha Membuat Tempe dan Oncom*. Penebar Swadaya, Jakarta.

- Shi J, Arunasalam K, Yeung D, Kakuda Y, Mittal G. 2004. Phytate from edible beans: chemistry, processing and health benefits. *Food Agric Environ* 2 (1) : 49-58.
- Sudarmadji S, Markakis P. 1977. The Phytate and phytase of soybean tempeh. *J Sci Food Agric* 28: 381-384.
- Sudarmadji, 1975. Certain Chemical and Nutritional Aspect of Soybean tempeh. Michigan State University, Michigan.
- Sutardi, Tranggono, Hartuti. 1993. Aktivitas fitase pada tahap-tahap pembuatan tempe kara bengkuk, kara putih dan gude menggunakan inokulum *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. *Agritech* 13 (3):1-5.
- Suyitno, Haryadi, Supriyanto, Susmadji B, Haryanto G, Guritno ADj, Supartono W. 1989. Petunjuk Laboratorium Rekayasa Pangan. PAU Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Syarief R, Hermianto J, Hariyadi P, Wiriadmadja S. 1999. Wacana Tempe Indonesia. Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Surabaya.
- Tangendjaja B. 1979. Studies on the Dephosphorilation of Phytic Acid in Rice Bran. University of New South Wales, Sydney.
- USDA. 2016. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28 slightly revised May, 2016. Software developed by the National Agricultural Library v.3.8.6.1 2017-07-28. <https://ndb.nal.usda.gov/>



## Pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana*) secara *in vitro*

EKA NURSETIADI, ENDANG YUNIASTUTI\*,  
RETNA BANDRIYATI ARNI PUTRI

▼Alamat korespondensi:

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

Manuskrip diterima: 20 Oktober 2015.  
Revisi disetujui: 31 Agustus 2016.

Nursetiadi E, Yuniastuti E, Putri RBA. 2016. The effect of variety of medium and BAP concentration to the multiplication of mangosteen (*Garcinia mangostana*) by *in vitro*. *Bioteknologi* 13: 63-72. Mangosteen has a high price on world market. But each fruit only has 1-2 grain which can be used as seed, and Mangosteen's grain was rekalsitran, so that seed can't go along way. Therefore, one way to solve the problem is a tissue culture method. The exact use of variety of medium and hormone on the exact concentration is the success key of tissue culture. This research was aimed to find out the effect of variety of medium and the concentration of BAP to the multiplication of Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) by *in vitro* manner. This research used the descriptive analysis method with two treatment factors and three repetition. The first factor was the variety of medium, namely MS medium (M1), WPM medium (M2), and B5 medium (M3). The second factor was the concentration of BAP, including: 0 ppm (B0), 1 ppm (B1), 2 ppm (B2), and 3 ppm (B3). On each combination of treatments, 0,5 ppm IBA was added. The monitoring variables were the time of shoot's growth, the quantity of shoots, the length of shoots, the number of leaf, and the length of leaf. The research shows that the optimum medium was WPM medium. MS, WPM and B5 medium shows the same inclination. The 2 ppm BAP treatment plus IBA 0,5 ppm was the best average of the number and the length of the leaf, while the 0 ppm BAP treatment plus IBA 0,5 ppm tended to show the best average of the yield on the length of the leaf. The fastest time of shoot's growth appeared on the 1 ppm concentration of BAP plus IBA 0,5 ppm.

Keywords: BAP, *Garcinia mangostana*, *in vitro*, mangosteen, medium

Nursetiadi E, Yuniastuti E, Putri RBA. Pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana*) secara *in vitro*. *Bioteknologi* 13: 63-72. Buah manggis memiliki nilai jual yang tinggi di pasaran dunia. Namun setiap satu buah manggis hanya terdapat 1-2 biji yang dapat dijadikan benih, serta biji manggis yang bersifat rekalsitran sehingga biji tidak dapat bertahan lama. Oleh karena itu, salah satu cara untuk mengatasinya dengan metode kultur jaringan. Penggunaan jenis media dan zat pengatur tumbuh pada konsentrasi yang tepat merupakan salah satu kunci keberhasilan dalam kultur jaringan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.) secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode analisis deskriptif 2 faktor perlakuan dengan 3 pengulangan. Faktor pertama adalah macam media, yaitu media MS (M1), media WPM (M2), dan media B5 (M3). Faktor kedua adalah taraf konsentrasi BAP, yaitu: 0 ppm (B0), 1 ppm (B1), 2 ppm (B2), dan 3 ppm (B3). Pada setiap kombinasi perlakuan ditambahkan IBA sebanyak 0,5 ppm. Variabel pengamatan meliputi saat muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, jumlah daun serta panjang daun. Hasil penelitian menunjukkan bahwa media yang memberikan hasil yang paling optimal adalah media WPM. Pada media MS, WPM dan B5 memberikan kecenderungan jumlah tunas yang sama. Konsentrasi BAP 2 ppm + IBA 0,5 ppm merupakan konsentrasi yang memberikan hasil yang paling optimal pada panjang tunas dan jumlah daun. Dengan konsentrasi BAP 0 ppm + IBA 0,5 ppm cenderung memberikan hasil yang paling optimal pada panjang daun. Saat muncul tunas tercepat terdapat pada konsentrasi BAP 1 ppm + IBA 0,5 ppm.

Kata kunci: BAP, *Garcinia mangostana*, *in vitro*, macam media, manggis

## PENDAHULUAN

Indonesia terkenal dengan keanekaragaman jenis buah-buahnya. Salah satunya adalah buah manggis (*Garcinia mangostana* L.). Manggis memiliki perpaduan warna yang indah dan citarasa yang khas, yakni perpaduan rasa manis, asam dan sepet yang tidak dimiliki oleh buah-buahan lainnya. Oleh karena itu, buah manggis sering disebut sebagai buah "eksotik". Selain itu, buah manggis juga mendapat sebutan "*Finest fruit of the Tropics*", dan "*Queen of fruits*". Tanaman manggis merupakan tanaman tropis dari Asia Tenggara, tepatnya semenanjung Malaya. Daerah pertumbuhannya sudah menyebar ke beberapa negara seperti Indonesia, Filipina, Myanmar dan Thailand. Di Indonesia, tanaman manggis banyak di temukan di daerah Kalimantan Tengah dan Kalimantan Selatan. Di daerah tersebut tanaman manggis masih banyak ditemukan di hutan-hutan dan belum banyak dimanfaatkan secara ekonomis (Juanda dan Bambang 2000).

Tanaman manggis sudah dikenal berabad-abad yang lalu, namun masih banyak yang belum membudidayakannya. Hal ini disebabkan karena pertumbuhannya yang lambat, selain itu biji manggis hanya tersedia pada musim tertentu ketika musim berbuah (1-2 kali setahun). Setiap buah hanya menghasilkan 1-2 biji yang berukuran besar dan yang layak untuk dijadikan benih. Menurut Ashari dan Sunarsih (2006) bahwa secara alami tanaman manggis berbuah setelah berumur 12-15 tahun. Pertumbuhan tanaman manggis yang lambat berkaitan erat dengan sistem perakaran. Tanaman manggis mempunyai akar tunggang yang panjang dan kuat, tetapi percabangan akarnya sangat sedikit. Demikian pula dengan bulu-bulu akarnya. Hal ini menimbulkan masalah serius pada proses penyerapan air dan unsur hara dari dalam tanah (Reza et al. 1994).

Tanaman manggis dapat diperbanyak secara generatif (dengan biji) namun kurang menguntungkan karena biji tanaman manggis bersifat rekalsitran, yang berarti bijinya harus segera ditanam karena biji rekalsitran tidak memiliki masa dormansi. Oleh karena itu, perbanyakkan secara generatif masih memiliki kendala dalam memperoleh biji tanaman. Perbanyakkan tanaman secara kultur jaringan (*in vitro*) merupakan salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut. Diharapkan dengan metode kultur jaringan akan diperoleh bibit

dalam jumlah yang banyak, cepat, dan seragam (Juanda dan Bambang 2000).

Menurut Santoso dan Fatimah (2003) kultur jaringan akan berhasil dengan baik apabila syarat-syarat yang dibutuhkan dapat terpenuhi. Syarat-syarat tersebut meliputi, pemilihan eksplan/bahan tanam, penggunaan media yang cocok dan keadaan yang aseptik.

Kultur jaringan akan lebih besar persentase keberhasilannya bila menggunakan jaringan meristem. Salah satu bagian jaringan meristem pada tanaman terdapat pada bagian tunas. Eksplan berupa tunas pucuk merupakan eksplan yang paling tinggi persentasenya dalam menghasilkan planlet, terutama jika ditumbuhkan pada media tanpa auksin (Irawati 2000). Menurut Dinyunita (1999) tunas yang akan dijadikan eksplan harus berasal dari pohon induk yang fisiknya sehat.

Beberapa media dasar yang banyak digunakan dalam kultur jaringan antara lain media dasar Murashige dan Skoog (1962) yang dapat digunakan untuk hampir semua jenis kultur, media dasar B5 untuk kultur sel kedelai dan legume lainnya, media dasar White (1934) sangat cocok untuk kultur akar tanaman tomat, media dasar Vacin dan Went (1949) digunakan untuk kultur jaringan anggrek, media dasar Nitsch dan Nitsch (1969) digunakan dalam kultur tepung sari (*pollen*) dan kultur sel, media dasar Schenk dan Hildebrandt (1972) untuk kultur jaringan tanaman monokotil, media dasar WPM (Woody Plant Medium of Lloyd and McCown 1981) khusus untuk tanaman berkayu. Dari sekian banyak media dasar di atas, yang paling banyak digunakan adalah media Murashige dan Skoog (MS) (Widyastuti 2002).

Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah senyawa organik bukan nutrisi yang dalam konsentrasi rendah mampu mendorong, menghambat atau secara kualitatif mengubah pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Moore 1989). Hal serupa dikemukakan oleh Hendaryono dan Wijayanti (2004), zat pengatur tumbuh (ZPT) pada tanaman adalah senyawa organik bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat dan dapat mengubah proses fisiologis tumbuhan.

Zat pengatur tumbuh (ZPT) mempengaruhi pertumbuhan dan morfogenesis kultur sel, organ, dan jaringan. Jika konsentrasi auksin lebih besar daripada sitokinin maka kalus akan tumbuh, dan bila konsentrasi sitokinin lebih

besar dibanding auksin maka tunas akan tumbuh (Sudarmadji 2003).

Salah satu jenis ZPT dari golongan sitokinin yang sering dipakai dalam kultur jaringan adalah BAP (*6-benzylaminopurine*). Menurut George dan Sherrington (1984), *6-Benzilaminopurine* (BAP) merupakan salah satu sitokinin sintetik yang aktif dan daya merangsangnya lebih lama karena tidak mudah dirombak oleh enzim dalam tanaman. Sedangkan menurut Noggle dan Fritz (1983), BAP memiliki struktur yang mirip dengan kinetin dan juga aktif dalam pertumbuhan dan proliferasi kalus. Dengan demikian BAP merupakan sitokinin yang paling aktif.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.) secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi dan Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah. Penelitian ini berlangsung pada bulan Februari-Juli 2008.

### Bahan dan alat penelitian

Bahan penelitian meliputi eksplan manggis berupa tunas pucuk, Media *Murashige dan Skoog* (MS), Media *Woody Plant Medium* (WPM), Media Gamborg (B5), Clorox (sunclin), larutan stok ZPT BAP, ZPT IBA 0,5 ppm. Alat penelitian yang penting meliputi *Laminar Air Flow Cabinet* (LAF) dan autoklaf.

### Rancangan penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan lingkungan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua faktor perlakuan, yaitu macam media dan konsentrasi BAP. Macam media meliputi media MS (M1), media WPM (M2) dan media B5 (M3). Konsentrasi BAP meliputi konsentrasi 0 ppm (B0), konsentrasi 1 ppm (B1), konsentrasi 2 ppm (B2), dan konsentrasi 3 ppm (B3). Sehingga diperoleh 12 kombinasi perlakuan dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali. Semua kombinasi perlakuan ditambahkan IBA sebanyak 0,5 ppm.

## Pelaksanaan penelitian

### Penyiapan media

Untuk memudahkan membuat media, masing-masing media dibuat larutan stoknya. Dalam pembuatan media MS, dibuat  $\frac{1}{4}$  liter (250 mL), untuk 10 botol kultur. Pembuatannya dengan cara mencampurkan larutan stok dengan gula 7,5g kemudian dilarutkan dengan akuades sampai 250 mL. Larutan dikondisikan pada pH 5,8-6,3. Larutan ditambah agar-agar 2 gram, kemudian diaduk dengan *magnetic stirrer* dan dipanaskan hingga mendidih. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur  $\pm$  25 mL/botol, kemudian ditutup dengan plastik PP 0,03 mm dan diikat dengan karet. Hal serupa dilakukan untuk penyiapan media B5 dan WPM. Media dimasukkan ke dalam autoklaf untuk disterilisasi dengan tekanan 1,5 psi ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), pada suhu 120°C selama 45 menit. Botol-botol kultur berisi media selanjutnya disimpan pada rak-rak kultur.

### Sterilisasi botol dan alat

Alat-alat yang harus disterilkan, yaitu botol kultur, petridish, skapel, pinset dan pisau pemis. Alat-alat tersebut dicuci sampai bersih dengan sabun cuci kemudian dikeringkan. Setelah kering, disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 1,5 psi ( $\text{kg}/\text{cm}^2$ ), pada suhu 120 °C selama 45 menit.

### Sterilisasi eksplan

Eksplan yang digunakan berasal dari bagian tunas pucuk tanaman manggis (*Garcinia mangostana* L.). Sterilisasi eksplan menggunakan dithane, agrept, alkohol 70%, dan clorox 5,25%.

### Penanaman eksplan

Penanaman eksplan dilakukan dalam LAF. Botol kultur yang berisi media dipanasi terlebih dahulu pada bagian mulut botol untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Tutup botol dibuka dengan hati-hati kemudian eksplan ditanam dengan menggunakan pinset steril. Untuk menjaga sterilisasi dari alat, maka pinset selalu dipanaskan sebelum digunakan. Eksplan kemudian dilewatkan pada api sebelum dilakukan penanaman. Sebelum ditutup, mulut botol dan tutup botol dipanaskan kembali. kemudian ditutup dengan menggunakan *aluminium foil* dan plastik. Botol yang telah berisi eksplan diberi label perlakuan dan tanggal penanaman.

### Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan dengan cara menyemprotkan spirtus ke botol-botol kultur setiap 2 hari sekali.

### Variabel pengamatan

Variabel pengamatan sebagai berikut. Saat muncul tunas, pengamatan dilakukan setiap dua hari sekali untuk mengetahui kapan saat muncul tunas lalu dicatat waktunya. Waktu muncul tunas ditentukan dalam HST (Hari Setelah Tanam). Jumlah tunas, pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah tunas yang terbentuk pada eksplan, dilakukan pada akhir pengamatan (60 HST). Panjang tunas, ditentukan pada akhir pengamatan (60 HST) dengan mengukur panjang tunas terpanjang (dalam mm). Jumlah daun, penghitungan jumlah daun dilakukan pada akhir pengamatan (60 HST) dengan menghitung jumlah daun yang muncul pada eksplan. Panjang daun, ditentukan pada akhir pengamatan (60 HST) dengan mengukur panjang daun terpanjang (dalam mm).

### Analisis data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Saat muncul tunas

Saat muncul tunas merupakan salah satu faktor penting dalam perbanyak tanaman dengan metode kultur jaringan. Semakin cepat muncul tunas maka semakin cepat dihasilkan bahan untuk perbanyak tanaman. Tunas yang terbentuk merupakan hasil diferensiasi dari eksplan. Rata-rata saat muncul tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Saat muncul tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP (HST)

Macam media	Konsentrasi BAP (ppm)			
	0	1	2	3
MS	17,67	13,5	18	-
WPM	10	10	14,5	-
B5	-	10	11	12

Keterangan: - = eksplan tidak tumbuh/terkontaminasi, HST= hari setelah tanam

Berdasarkan Tabel 1. bila dilihat dari rata-rata ulangan tiap perlakuan, dari ketiga macam media yang digunakan ternyata kecenderungan saat muncul tunas tercepat pada media WPM (*Woody Plant Medium*) dengan konsentrasi BAP yang tidak terlalu tinggi, yaitu 0 ppm dan 1 ppm. Hal ini diduga kandungan nutrisi yang terdapat pada media WPM mampu dioptimalkan oleh eksplan untuk pembentukan tunas. Selain itu, media WPM merupakan media yang biasa digunakan dalam kultur jaringan pada berbagai jenis tanaman berkayu. Menurut Pardal et al. (2004) media WPM banyak digunakan pada berbagai spesies tanaman berkayu, karena memiliki kandungan total ion yang rendah, tetapi kandungan sulfatnya tinggi. Unsur makro yang terdapat pada media WPM seperti unsur magnesium yang tinggi sangat mendukung dalam pertumbuhan jaringan tanaman. Selain itu menurut Wetherell (1982) di dalam media harus terkandung mineral, gula, vitamin dan hormon dengan perbandingan yang dibutuhkan secara tepat. Diduga media WPM mempunyai kandungan nutrisi yang cukup untuk mendukung pembentukan tunas.

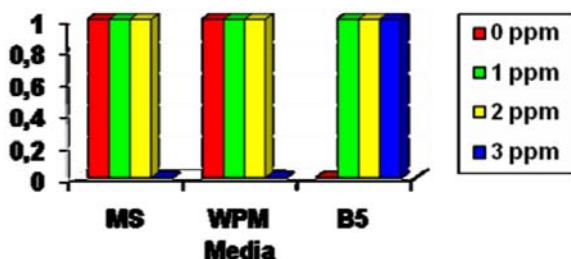
Apabila dilihat dari konsentrasi BAP 0 ppm dan 1 ppm pada media WPM, diduga sitokinin endogen yang terdapat pada eksplan telah mampu mendorong pembentukan tunas, sehingga hanya membutuhkan sitokinin yang tidak terlalu tinggi, hal ini berkaitan juga dengan keseimbangan antara auksin dengan sitokinin yang terkandung pada eksplan. Sedangkan untuk media yang paling lambat kemunculan tunasnya yaitu pada media MS dengan konsentrasi BAP 2 ppm. Diduga hal ini terjadi karena pada media MS terkandung unsur makro seperti unsur P dan K yang cukup tinggi, sehingga dapat mengganggu penyerapan unsur lain terutama unsur mikro seperti besi (Fe), tembaga (Cu), seng (Zn), kalsium (Ca) dan magnesium (Mg). Meskipun unsur hara makro diperlukan tanaman dalam jumlah banyak namun tidak berarti jumlah yang diberikan tidak terbatas, ada ambang tertentu yang dapat ditoleransi oleh tanaman. Setiap jenis tanaman memerlukan jumlah unsur yang berbeda. BAP merupakan salah satu zat pengatur tumbuh yang banyak digunakan untuk memacu pembentukan tunas dengan daya aktivitas yang kuat, mendorong proses pembelahan sel (George dan Sherrington 1984). Apabila dilihat dari konsentrasi BAP, diduga pemberian BAP 2 ppm terlalu tinggi bagi eksplan, hal ini kemungkinan telah adanya sitokinin endogen pada eksplan

tanaman dan kandungannya sudah cukup untuk memacu pembentukan tunas, sehingga tidak memerlukan zat pengatur tumbuh dengan taraf konsentrasi yang lebih tinggi. Keadaan tersebut sesuai dengan yang diungkapkan oleh George dan Sherrington (1984) bahwa sitokinin alami yang terkandung di dalam tubuh eksplan dapat merangsang eksplan untuk membentuk tunas. Selain itu dimungkinkan juga karena perbandingan antara auksin dengan sitokinin yang rendah, yakni sitokinin lebih tinggi daripada auksin, sehingga terjadi ketidakseimbangan pada eksplan dan menyebabkan terhambatnya pembentukan tunas.

Pada penelitian ini seluruh kombinasi perlakuan diberikan zat pengatur tumbuh dari golongan auksin, yaitu IBA sebanyak 0,5 ppm. Pemberian IBA dimaksudkan untuk memacu pembentukan akar, namun pada setiap perlakuan tidak muncul akar. Hal ini diduga auksin yang diberikan tidak terlalu tinggi sehingga terjadi ketidakseimbangan antara sitokinin dengan auksin dalam eksplan tanaman. Menurut Pardal et al. (2004) jika perbandingan antara auksin dengan sitokinin rendah, sitokinin akan memacu ke arah tunas dan sebaliknya bila perbandingan antara auksin dengan sitokinin tinggi, auksin akan memacu ke arah akar.

### Jumlah tunas

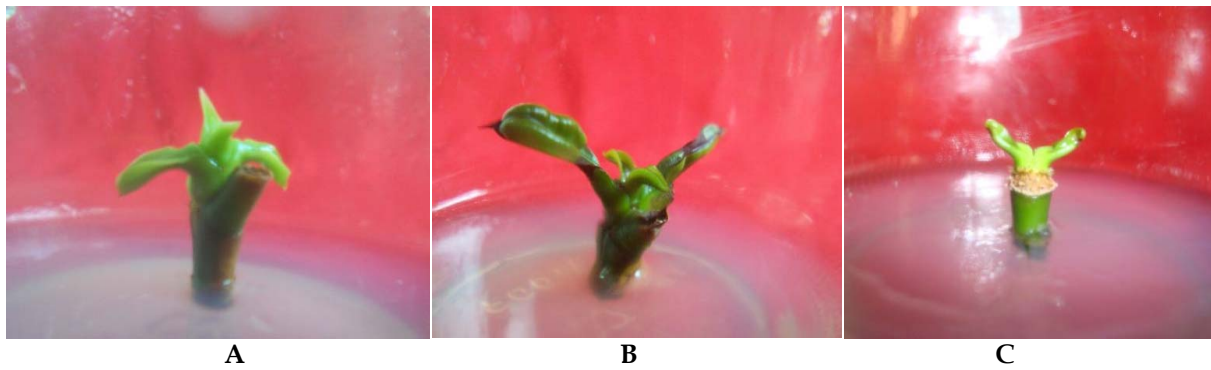
Dalam penelitian ini, jumlah tunas diamati pada akhir penelitian yaitu 60 HST (hari setelah tanam). Dalam kultur jaringan jumlah tunas dapat diindikasikan sebagai keberhasilan dalam multiplikasi. Semakin banyak tunas yang terbentuk maka semakin tinggi tingkat multiplikasinya. Rata-rata jumlah tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP disajikan pada Gambar 1.



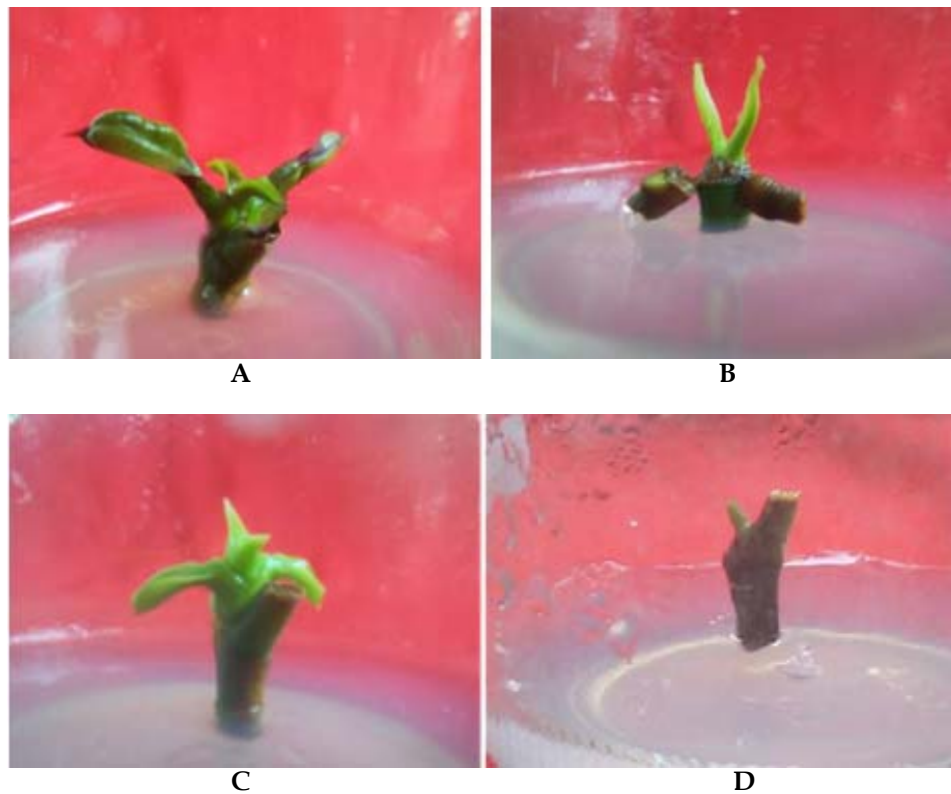
**Gambar 1.** Pengaruh macam media dan beberapa konsentrasi BAP terhadap jumlah tunas eksplan tanaman manggis.

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa rata-rata jumlah tunas pada seluruh perlakuan hanya memunculkan satu tunas. Macam media maupun beberapa konsentrasi BAP yang diberikan pada penelitian ini ternyata belum mampu menumbuhkan jumlah tunas lebih dari satu. Hingga akhir penelitian yaitu 60 HST jumlah tunas yang terbentuk hanya satu (ketampakan tunas dapat dilihat pada Gambar 2 dan Gambar 3). Hal ini diduga bahwa sifat eksplan dari tanaman manggis yang diambil pucuknya mempunyai kecenderungan memunculkan bakal tunas satu. Tunas yang terbentuk berasal dari hasil pemanjangan tunas pucuk batang tanaman. Selain itu konsentrasi BAP yang diberikan pada setiap media, yaitu 1 sampai 3 ppm cenderung memberikan hasil yang sama, meskipun taraf konsentrasi BAP telah dinaikkan sampai 3 ppm namun belum ada perubahan, hal ini kemungkinan dalam pemberian sitokinin dengan konsentrasi BAP 3 ppm belum mampu memacu multiplikasi tunas. Menurut George dan Sherrington (1984) bahwa konsentrasi sitokinin yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi auksin akan memacu multiplikasi tunas.

Berdasarkan Gambar 1, dari ketiga macam media yang digunakan ternyata hanya media B5 dengan 0 ppm (tanpa pemberian BAP) yang tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan eksplan. Pada semua variabel yang diamati yaitu, saat muncul tunas, jumlah tunas, panjang tunas, panjang daun dan jumlah daun, ternyata pada penggunaan media B5 tanpa pemberian BAP tidak memungkinkan pertumbuhan tunas, tetapi dengan penambahan konsentrasi BAP sampai dengan 3 ppm sudah mampu untuk membentuk tunas. Hal ini diduga unsur Zn yang terkandung dalam media B5 masih rendah. Kekurangan unsur Zn pada eksplan memungkinkan terjadi kelambatan tunas di pucuk karena pembelahan sel meristem tidak sempurna. Meskipun menurut Wetter dan Constabel (1991) media B5 mempunyai kadar nutrisi yang tinggi terutama kadar nitrogen, namun kekurangan pada salah satu unsur mikro dapat menghambat pertumbuhan tanaman. Nitrogen merupakan salah satu unsur hara makro penyusun asam amino yang penting dalam proses metabolisme untuk pertumbuhan suatu tanaman (Widiastoety dan Kartikaningrum 2003). Diduga tidak semua tanaman membutuhkan unsur hara dengan jumlah yang relatif besar, meskipun unsur itu dari golongan unsur makro.



**Gambar 2.** Tunas yang berasal dari eksplan pucuk tanaman manggis pada beberapa macam media (a) Media MS (b) Media WPM (c) Media B5



**Gambar 3.** Tunas yang berasal dari eksplan pucuk tanaman manggis pada beberapa konsentrasi sitokinin. A. BAP 0 ppm, B. BAP 1 ppm, C. BAP 2 ppm, D. BAP 3 ppm

**Tabel 2.** Panjang tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP (mm)

Macam media	BAP (ppm)			
	0	1	2	3
MS	1	1	5	-
WPM	5	1,5	3	-
B5	-	1	2	1

Keterangan: - = eksplan tidak tumbuh/terkontaminasi, ppm = part per million (mg/L), mm = milimeter

Bila dilihat dari konsentrasi BAP pada tiap media kecuali media B5, BAP dengan konsentrasi 3 ppm sebagian besar eksplan tidak mengalami pertumbuhan. Hal ini diduga pemberian sitokinin yang terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Selain itu, diduga perbandingan rasio antara auksin dan sitokinin yang terdapat pada eksplan tidak berimbang sehingga eksplan tidak mengalami pertumbuhan.

### Panjang tunas

Dalam penelitian ini, panjang tunas diamati pada akhir penelitian, yaitu 60 HST (hari setelah tanam). Hasilnya, tidak semua perlakuan terbentuk tunas. Hal ini diduga tidak adanya zat pengatur tumbuh BAP pada media B5. Meskipun dalam eksplan telah terdapat senyawa endogen namun senyawa yang terdapat dalam eksplan belum mampu membentuk tunas. Rata-rata panjang tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP disajikan pada Tabel 2.

Berdasarkan Tabel 2 apabila dilihat dari rata-rata ulangan tiap perlakuan, dari ketiga macam media yang digunakan ternyata kecenderungan panjang tunas tertinggi pada media WPM tanpa pemberian BAP (0 ppm). Meskipun pada media MS dengan pemberian BAP 2 ppm memberikan hasil yang sama, namun pada media WPM tanpa pemberian BAP rata-rata ulangan tiap perlakuannya memberikan hasil yang lebih tinggi dibandingkan media MS. Hal ini diduga unsur Ca yang terkandung dalam media WPM cukup tinggi dibandingkan dengan media MS dan B5, dimana unsur Ca berperan dalam pertumbuhan sel tanaman. Meskipun tanpa pemberian BAP namun diduga selain kandungan Ca yang terkandung dalam media WPM, sitokinin endogen yang berada dalam eksplan pun telah mampu mendorong pertumbuhan tunas. Selain itu, media WPM merupakan media yang biasa digunakan dalam kultur jaringan pada berbagai jenis tanaman berkayu.

Panjang tunas terendah ternyata lebih cenderung pada media B5 dengan rata-rata ulangan tiap perlakuan yang lebih rendah diantara media WPM dan media MS. Hal ini dimungkinkan unsur Ca yang terkandung dalam media B5 jumlahnya kurang sehingga pertumbuhan sel tanaman menjadi terhambat. Menurut Hoesen (1998) keberhasilan kultur *in vitro* ditentukan oleh zat pengatur tumbuh dan media dasar yang digunakan.

Pada setiap media yaitu MS, WPM dan B5, ternyata BAP dengan konsentrasi 1-2 ppm mengalami peningkatan. BAP dengan konsentrasi 2 ppm cenderung memberikan hasil yang paling optimal bagi eksplan untuk mendorong pertumbuhan tunas, namun dari konsentrasi 2-3 ppm cenderung mengalami penurunan. Diduga pemberian sitokinin yang terlalu tinggi menghambat pertumbuhan tunas. Selain itu, perbandingan antara auksin dengan sitokinin yang rendah, yakni sitokinin lebih

tinggi daripada auksin, menyebabkan ketidakseimbangan pada eksplan sehingga pertumbuhan tunas terhambat.

Tunas yang terbentuk pada tiap media panjangnya berbeda-beda. Hal ini diduga terkait dengan kandungan hara yang terdapat pada setiap media yang berbeda-beda. Meskipun pada BAP dengan konsentrasi 2 ppm pada saat muncul tunas paling lambat namun untuk pertumbuhan tunas konsentrasi 2 ppm memiliki rata-rata panjang tunas tertinggi. Hal ini diduga pertumbuhan tanaman yang pada awalnya cepat kemudian melambat demikian pun sebaliknya, awalnya lambat kemudian berlangsung cepat.

### Jumlah daun

Dalam penelitian ini, jumlah daun diamati pada akhir penelitian, yaitu 60 HST (hari setelah tanam). Daun merupakan organ vegetatif, pertumbuhannya dipengaruhi oleh kandungan nitrogen dalam media. Selain itu daun merupakan organ yang penting dalam pertumbuhan tanaman karena daun sebagai tempat terjadinya fotosintesis. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik (Acima 2006). Rata-rata jumlah daun eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, dari ketiga macam media yang digunakan ternyata kecenderungan jumlah daun terbanyak pada media WPM (*Woody Plant Medium*) tanpa pemberian BAP (0 ppm). Hal ini diduga kandungan nutrisi yang terdapat pada media WPM mampu dioptimalkan oleh eksplan untuk pembentukan daun. Unsur magnesium yang terkandung dalam media WPM diduga jumlahnya cukup untuk pembentukan daun. Peran magnesium sendiri dalam tanaman cukup penting karena berkaitan dengan proses fotosintesis. Meskipun tanpa pemberian BAP kemungkinan kandungan hara yang terdapat pada media WPM sudah cukup dalam pembentukan daun. Pada media B5 tanpa pemberian BAP tidak terjadi pembentukan daun. Hal ini Diduga kandungan hara yang terdapat pada media B5 seperti unsur magnesium lebih sedikit dibandingkan dengan media WPM dan MS. Menurut Hendaryono dan Wijayanti (1994) unsur magnesium dapat meningkatkan kandungan fosfat dalam tanaman. Fosfat merupakan bahan mentah untuk pembentukan sejumlah protein. Dengan terbentuknya protein maka pertumbuhan daun pun akan baik.

**Tabel 3.** Jumlah daun eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP (helai).

Macam media	Konsentrasi BAP (ppm)			
	0	1	2	3
MS	2	2	4	-
WPM	4	2	2	-
B5	-	2	2	2

Keterangan: - = eksplan tidak tumbuh/terkontaminasi, ppm = part per million (mg/L)

**Tabel 4.** Panjang daun eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP (mm).

Macam media	Konsentrasi BAP (ppm)			
	0	1	2	3
MS	5	6	7	-
WPM	18	5	7,5	-
B5	-	3	4,5	2

Keterangan: - = eksplan tidak tumbuh/terkontaminasi, ppm = part per million (mg/L), mm = milimeter

Berdasarkan data pada Tabel 3, diketahui eksplan dengan pemberian zat pengatur tumbuh BAP konsentrasi 1, 2 dan 3 ppm pada media B5 menunjukkan rata-rata jumlah daun yang sama, yaitu 2 helai. Diduga waktu yang dibutuhkan eksplan untuk memunculkan daun kurang lama. Hal ini kemungkinan kandungan nutrisi media B5 yang belum mampu memacu pertumbuhan daun meskipun telah diberikan penambahan BAP dengan konsentrasi 1 ppm, 2 ppm dan 3 ppm.

Dengan penambahan sitokinin (BAP) pada media dapat mendorong sel-sel meristem pada eksplan untuk membelah dan mempengaruhi sel lainnya untuk berkembang menjadi tunas dan membentuk daun. Berdasarkan Tabel 3, rata-rata jumlah daun dari konsentrasi 2 ppm ke 3 ppm mengalami penurunan. Menurut Harminingsih (2007) dengan semakin meningkatnya konsentrasi BAP, semakin menurun jumlah daun yang terbentuk. Hal ini dikarenakan eksplan yang diberi BAP sebagian besar tidak memunculkan akar, sehingga tidak terjadi sintesis sitokinin di ujung akar dan tidak terjadi pengangkutan nutrisi melalui xylem ke seluruh bagian tanaman. Menurut Yelnitis et al. (1999) penambahan sitokinin dapat mendorong meningkatnya jumlah dan ukuran daun. Namun, penyerapan sitokinin dari media dipengaruhi keberadaan akar. Tanpa akar, penyerapan

sitokinin dari media dan pengangkutan ke bagian tanaman menjadi terhambat. Hal ini akan mengakibatkan jumlah daun menurun dan ukuran daun mengecil (Waloyaningsih 2004).

Pada penelitian ini rata-rata jumlah daun terbanyak pada perlakuan pemberian BAP 2 ppm. Meskipun pada konsentrasi 0 ppm terdapat rata-rata jumlah daun yang sama namun pada konsentrasi 2 ppm rata-rata jumlah daun pada tiap perlakuan lebih banyak. Sedangkan jumlah daun yang sedikit terjadi pada perlakuan pemberian BAP 3 ppm. Hal ini diduga dengan pemberian BAP 2 ppm telah mampu merangsang pertumbuhan daun tanpa mengesampingkan kandungan hara yang terkandung dalam setiap media perlakuan.

Daun yang terbentuk pada penelitian ini kebanyakan dari semua perlakuan setelah 60 HST masih pada kecil dan tidak terlalu panjang. Diduga hal ini dikarenakan fungsi daun sebagai tempat fotosintesis masih belum dapat berproses secara optimal dan waktu untuk daun terbuka butuh lebih dari 60 HST. Disamping itu kemungkinan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro*, perkembangan organ-organnya tidak senormal apabila ditanam di luar botol.

#### Panjang daun

Dalam penelitian ini, panjang daun diamati pada akhir penelitian, yaitu 60 HST. Daun merupakan bagian faktor penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman, karena proses fotosintesis yang terjadi terdapat pada daun. Semakin banyak daun maka semakin banyak suplai karbohidrat yang diproduksi. Rata-rata panjang tunas eksplan tanaman manggis pada berbagai macam media dan konsentrasi BAP disajikan pada Tabel 4.

Berdasarkan Tabel 4, dari ketiga media yang digunakan ternyata rata-rata panjang daun tertinggi pada media WPM tanpa pemberian BAP. Hal ini diduga pada media WPM terkandung unsur magnesium. Unsur magnesium yang terkandung dalam media WPM diduga jumlahnya cukup untuk pertumbuhan daun. Selain itu terdapat unsur kalsium nitrat, unsur ini tidak terdapat pada media MS dan B5. Meskipun unsur ini terdapat pada daun namun dengan tambahan dari media maka pertumbuhan daun dapat berjalan lebih optimal. Sehingga diduga unsur magnesium dan kalsium yang terkandung dalam media WPM dapat dimanfaatkan secara optimal oleh eksplan untuk pembentukan dan pertumbuhan daun. Tanda paling awal akan adanya perkembangan daun

menurut Salisbury dan Ross (1995) adalah pembelahan poliklinal sel terluar yang diikuti dengan pertumbuhan sel anak yang menyebabkan timbulnya tonjolan yaitu primordia daun. Panjang daun terendah terdapat pada media B5. Hal ini diduga kandungan hara yang terdapat pada media B5 seperti unsur magnesium lebih sedikit dibandingkan dengan media WPM dan MS. Menurut Hendaryono dan Wijayanti (1994) unsur Mg dapat meningkatkan kandungan fosfat dalam tanaman. Fosfat merupakan bahan mentah untuk pembentukan sejumlah protein. Dengan terbentuknya protein maka pertumbuhan daun pun akan baik.

Pada media MS konsentrasi BAP cenderung mengalami peningkatan dari konsentrasi BAP 0-2 ppm dan mengalami penurunan pada konsentrasi 3 ppm. Hal ini diduga pemberian sitokinin terlalu tinggi dapat menghambat pertumbuhan daun. Berdasarkan Tabel 4, panjang daun terendah terdapat pada media B5 dengan konsentrasi BAP 3 ppm. Hal ini diduga pemberian BAP dengan konsentrasi 3 ppm cukup tinggi bagi eksplan, karena respon tanaman berbeda-beda terhadap sitokinin yang cukup tinggi. Menurut Yelnititis et al. (1999) penambahan sitokinin dapat mendorong meningkatnya jumlah dan ukuran daun. Namun, penyerapan sitokinin dari media dipengaruhi keberadaan akar. Tanpa akar, penyerapan sitokinin dari media dan pengangkutan ke bagian tanaman menjadi terhambat. Hal ini akan mengakibatkan pertumbuhan daun terhambat.

## KESIMPULAN

Media WPM merupakan media yang paling baik untuk perbanyakan tanaman manggis secara *in vitro*. Konsentrasi BAP 2 ppm merupakan konsentrasi yang paling optimal pada panjang tunas dan jumlah daun. Sedangkan konsentrasi BAP yang rendah memberikan hasil yang optimal pada saat muncul tunas dengan media WPM. Jumlah tunas yang terbentuk pada eksplan pucuk batang tanaman manggis sampai akhir penelitian (60 HST) sebanyak 1 tunas untuk semua taraf perlakuan konsentrasi BAP.

## DAFTAR PUSTAKA

Acima. 2006. Pengaruh jenis media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi adenium (*Adenium obesum*) secara *in vitro*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian UNS, Surakarta.

- Ashari, Sunarsih. 2006. Manggis komoditas unggulan Tasikmalaya. Warta Penelitian dan Pengembangan Pertanian 28 (1): 27-28.
- Dinyunita. 1999. Kultur Jaringan. Diakses dari [www.indobiogen.or.id](http://www.indobiogen.or.id). Tanggal 15 Juli 2007.
- George EF, Sherrington PD.. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture. Exegetics Limited. England.
- Harminingsih I. 2007. Pengaruh Konsentrasi BAP Terhadap Multiplikasi Tunas Anthurium (*Anthurium andraeanum* Linden) Pada Beberapa Media Dasar Secara *In Vitro*. Skripsi S1 Fakultas Pertanian UNS.
- Hendaryono DPS, Wijayanti A.. 1994. Teknik Kultur Jaringan. Kanisius. Yogyakarta.
- Hoeseen DSH. 1998. Kultur Jaringan Kunir Putih (*Kaempferia rotunda* L). Berita Biologi 4 (4): 175-181.
- Irawati. 2000. Diferensiasi berbagai macam eksplan pada perbanyakan *Philodendron goeldii* (Araceae) secara *in-vitro*. Berita Biologi. 5 (1): 69-75.
- Juanda D, Bambang C. 2000. Budidaya dan Analisis Usaha Tani Manggis. Kanisius. Yogyakarta.
- Lloyd G, McCown B. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc Intl Plant Propagator Soc 30: 421-427.
- Moore TS. 1989. Biochemistry and physiology of plant 2nd edn. Springer-Verlag Inc., New York.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Nitsch C, Nitsch JP. 1969. Floral induction in a short-day plant, *Plumbago indica* L, by 2-Chloroethanephosphonic Acid. Plant Physiol 44 (12): 1747-1748.
- Noggle GR, Fritz GJ. 1983. Introductory Plant Physiology: Second Edition. Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Pardal SJ, Mariska I, EG. Lestari, Slamet. 2004. Regenerasi Tanaman dan Transformasi Genetik Salak Pondoh untuk Rekayasa Buah partenokarpi. J Bioteknologi Pertanian 9 (2): 49-55.
- Reza M, Wijaya, Enggis T. 1994. Pembibitan dan Pembudidayaan Manggis. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. Fisiologi Tumbuhan Jilid III. Penerbit ITB. Bandung.
- Santoso U, Fatimah N. 2003. Kultur Jaringan Tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang Press. Malang.
- Schenk RU, Hildebrandt AC. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50: 199-204.
- Sudarmadji. 2003. Penggunaan benzil amino purine pada pertumbuhan kalus kapas secara *in vitro*. Buletin Teknik Pertanian 8 (1): 8-10.
- Vacin E, Went F. 1949. Some pH changes in nutrient solution. Botanic Gardens Conserv News 110: 605-613.
- Waloyaningsih D. 2004. Pengaruh Konsentrasi IAA dan BAP pada Medium MS terhadap Tingkat Multiplikasi Tunas Bawang Putih (*Allium sativum* L) secara *in vitro*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian UNS. Surakarta.
- Wetherell DF. 1982. Pengantar Propagasi Tanaman secara *In Vitro* Seri Kultur Jaringan Tanaman. Avery Publishing Group, Inc. Wayne, New Jersey.
- Wetter LR, F. Constabel. 1991. Metode Kultur Jaringan Tanaman. ITB. Bandung.
- White PR. 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol 9: 585-600.
- Widiastoety D, S. Kartikaningrum. 2003. Pemanfaatan ekstrak ragi dalam kultur *in vitro* plantlet media anggrek. J Hort 13 (2): 82-86.

- Widyastuti N. 2002. Inovasi Memperbanyak Bibit Tanaman. Diakses dari [www.sinarharapan.co.id/berita/0202/13/ipt02.htm](http://www.sinarharapan.co.id/berita/0202/13/ipt02.htm). Tanggal 15 Juli 2007.
- Yelnitis, Bermawie N, Syafaruddin. 1999. Perbanyak klon lada varietas panyur secara in vitro. Jurnal penelitian Tanaman Industri 5 (3): 109-114.



## Efek antihelmintik infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap *Ascaris suum* secara in vitro

RANI TIYAS BUDIYANTI, MURKATI\*, ISNA QADRIJATI

Budiyanti RT, Murkati, Qadrijati I. 2016. Antihelmintic effect of sambiloto herb infusa (*Andrographis paniculata*) to *Ascaris suum* in vitro. *Bioteknologi* 13: 73-82. Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) contains of saponin, tannin, and andrographolide that has antihelmintic activities. The aim of this research is knowing the existence of antihelmintic effect from infusa of sambiloto herb at *Ascaris suum* in vitro. The type of this research is experimental research with "the post test only group control design" method. Animal trial that was used is *Ascaris suum*. To get the number of each group, it used quote sampling technique. This research was done in three step that used infusa of sambiloto herb concentracy 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, aquadest (negative control), and pyrantel pamoate 0,236%. The antihelmintic effect was determined based on LC50, while the effectiveness of antihelmintic was determined based on LT50 that was compared with LT50 pyrantel pamoate, the drug of choice ascariasis disease. Obtained data was tested statistically by Kolmogorov-Smirnov to show the normality of data. Then, Pearson Test was used to show the correlation between sambiloto herb and the mortality of *Ascaris suum*. Probit Analysis was used to get LC50 and LT50. Result of Kolmogorov-Smirnov test shows the normality data ( $p=0,2$  or  $p>0,05$ ). Pearson Test shows that there are significant result ( $p=0,00$  or  $p<0,05$ ) and has the strong relation ( $r= 0,999$ ). Probit Analysis shows that the LC50 infusa of sambiloto herb is 61,13% and its LT50 is 6 hours 34 minutes. While the LT50 of pyrantel pamoate is 4 hours 16 minutes. Infusa of Sambiloto herb (*Andrographis paniculata*, Nees.) has antihelmintic effect with the LC50 is 61,13% although that effectiveness less than pyrantel pamoate.

▼Alamat korespondensi:

Fakultas Kedokteran, Universitas  
Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami36a  
Surakarta 57126, Jawa Tengah,  
Indonesia. Tel./Fax.: +92-271- 632490.

Manuskripditerima: 20 Oktober 2015.  
Revisi disetujui: 31 Agustus 2016.

Keywords: Antihelmintic, *Ascaris suum*, sambiloto, saponin, tannin

Budiyanti RT, Murkati, Qadrijati I. 2016. Efek antihelmintik infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap *Ascaris suum* secara in vitro. *Bioteknologi* 13: 73-82. Sambiloto mengandung saponin, tannin, dan andrografolid yang memiliki aktivitas antihelmintik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antihelmintik infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap *Ascaris suum* secara in vitro. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni dengan metode *the post test only control group design*. Hewan uji yang digunakan adalah cacing *Ascaris suum*. Penentuan jumlah sampel tiap-tiap kelompok menggunakan teknik *quota sampling*. Penelitian dilakukan dalam 3 tahap menggunakan infusa herba sambiloto konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%, aquades (kontrol negatif), dan pirantel pamoate 0,236%. Efek antihelmintik ditentukan dengan menghitung LC50 infusa herba sambiloto, sedangkan keefektifitasan infusa herba sambiloto ditentukan berdasarkan perbandingan LT50 nya dengan LT50 pirantel pamoate sebagai "drug of choice" penyakit askariasis. Data yang diperoleh diuji statistik dengan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui normalitas distribusinya, Uji Korelasi Pearson untuk mengetahui korelasi antara konsentrasi infusa herba sambiloto dengan jumlah kematian cacing, dan Analisis Probit untuk mencari LC50 dan LT50. Hasil uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa sebaran data normal ( $p=0.2$  atau  $p>0.05$ ), hasil Uji Korelasi Pearson menunjukkan hasil yang signifikan ( $p=0.00$  atau  $p<0.05$ ) dan menunjukkan korelasi yang kuat ( $r = 0,999$ ). Hasil Analisis Probit menunjukkan bahwa LC50 infusa herba sambiloto adalah 61.13% dan LT50 nya adalah 6 jam 34 menit. Sedangkan LT50 pirantel pamoate adalah 4 jam 16 menit. Simpulan dari penelitian ini adalah infusa herba sambiloto memiliki efek antihelmintik dengan LC50 61,13% walaupun efektifitasnya lebih rendah daripada pirantel pamoate.

Kata kunci: antihelmintik, *Ascaris suum*, sambiloto, saponin, tannin

## PENDAHULUAN

Askariasis merupakan penyakit cacing yang sering terjadi di negara tropis dan berkembang. Prevalensi penyakit yang disebabkan oleh cacing gelang (*Ascaris lumbricoides*) ini mencapai 25% atau 0,8–1,22 milyar orang dari total populasi dunia (Berthony et al. 2006; Kazura 2007). Di Indonesia, askariasis merupakan penyakit yang kosmopolit. Di Kalimantan Barat, 84% anak usia 1-9 tahun ditemukan terinfeksi *A. lumbricoides* (Waris 2008). Sedangkan di Jakarta Pusat, terdapat 66,67% murid sekolah dasar yang terinfeksi (Mardiana dan Djarismawati 2008). Faktor higienitas yang buruk, keadaan sosial ekonomi yang rendah, dan usia merupakan faktor predisposisi berkembangnya penyakit ini. Walaupun dapat menginfeksi semua level umur, askariasis lebih sering terjadi pada balita dan anak-anak usia sekolah dasar karena kesadaran akan kebersihan diri yang masih rendah (Carneiro et al. 2002). Penyakit ini merupakan salah satu *Soil Transmitted Disease* karena memerlukan tanah sebagai media perkembangan telur menjadi bentuk infeksi (Sudoyo et al. 2006).

Cacing *A. lumbricoides* dapat membahayakan tubuh manusia. Dalam jumlah yang besar, cacing ini dapat menyebabkan obstruksi usus, berkurangnya nafsu makan, diare, konstipasi, gangguan penyerapan nutrisi, dan gangguan perkembangan anak, sedangkan dalam jumlah kecil cacing ini jarang menunjukkan gejala dan baru diketahui setelah cacing keluar dari tubuh penderita atau ditemukannya telur dalam tinja (Kazura 2007). Pada kasus yang menunjukkan gejala klinis, keluhan yang sering dirasakan adalah sakit perut yang tidak jelas. Selama migrasi larva ke paru, larva dapat menimbulkan manifestasi alergi seperti infiltrasi paru, asma, dan sembam pada bibir. Pada pemeriksaan darah tepi sering menunjukkan peningkatan eosinofil (Sakai et al. 2006).

Pada stadium larva, cacing ini juga dapat menyebabkan kerusakan organ tubuh. Melalui migrasinya ke berbagai jaringan, larva tersebut dapat menyebabkan peradangan ringan di hati (Yoshihara 2008) dan *sindroma Loeffler* pada paru (Sakai et al. 2006).

Beberapa antihelmintik seperti pirantel pamoate dan mebendazol digunakan sebagai *drug of choice* penyakit askariasis, bahkan telah dijual bebas di pasaran tanpa harus menggunakan resep dokter (Syarif dan Elysaabeth 2007). Namun, antihelmintik sintetis ini kadang

menimbulkan efek samping yang mengganggu penderita. Pirantel pamoate yang bekerja dengan mengakibatkan depolarisasi pada cacing dapat menyebabkan mual, muntah, dan diare (Urbani dan Albónico 2003). Sedangkan mebendazole dapat menyebabkan efek samping yang lebih berat seperti *erratic migration* (Albonico et al. 2008). Penggunaan obat ini juga terbatas. Penderita askariasis yang memiliki kelainan hati ataupun ginjal tidak dapat menggunakannya karena antihelmintik ini dimetabolisme dalam hati dan diekskresikan melalui ginjal (Katzung 2004). Masyarakat pedesaan yang menjadi sasaran utama penyakit askariasis pun enggan menggunakan obat ini dikarenakan faktor ekonomi dan kesulitan untuk mendapatkan obat tersebut, sebagian besar dari mereka lebih suka menggunakan obat-obat tradisional yang diresepkan secara turun temurun walaupun manfaatnya belum dapat dibuktikan secara ilmiah (Manoj et al. 2008).

Salah satu jenis tanaman yang biasa digunakan untuk obat tradisional adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Tanaman yang dijuluki "*king of bitter*" ini mempunyai berbagai khasiat seperti antiinflamasi, antiseptik, antidiabetik, dan hepatoprotektor. Selain itu, sambiloto diyakini mempunyai potensi sebagai antihelmintik. Pada beberapa penelitian, sambiloto dapat membunuh *Brugia malayi* (Sari dan Astari 2008), cacing tanah *Pheretima posthuma* (Siddhartha et al. 2010), dan nematoda *Pratylenchus vulnus* (Ferris dan Zheng 1999).

Sambiloto berpotensi sebagai antihelmintik karena mengandung saponin, tannin, dan andrografolid (Raj 1975). Saponin merupakan zat toksik alamiah yang banyak terdapat di tumbuhan. Zat ini bersifat toksik terhadap *Ascaris* sp. karena dapat menurunkan tegangan permukaan membran dinding sel serta menghambat enzim asetilkolinesterase sehingga dapat menimbulkan paralisis pada cacing (Satriawan 2009). Walaupun demikian, saponin tidak berbahaya bagi manusia dikarenakan berat molekulnya terlalu besar untuk diabsorpsi usus manusia. Tannin yang merupakan zat utama dalam teh, juga dapat ditemukan dalam sambiloto dalam jumlah yang kecil. Zat ini akan menggumpalkan protein pada dinding *Ascaris* sp. sehingga menyebabkan gangguan metabolisme dan homeostasis cacing.

Zat yang paling banyak terdapat dalam sambiloto adalah andrografolid (Duke 2009)

yang berfungsi sebagai hepatoprotektor, anti kanker, antiviral (Kadar 2009), antiinflamasi (Hidalgo et al. 2005), obat infeksi traktus respiratorius bagian atas (Caceres et al.1997), antimalaria, antidiare, antiarterosklerosis (Wang et al. 1997), anti diabetika (Borhanuddin et al. 1994), bakteriostatik, anti jamur (Susilo et al. 1995), dan renoprotektor (Singh et al. 2009). Walaupun mekanisme pengaruhnya terhadap cacing belum diketahui secara jelas, zat pahit ini merupakan antioksidan yang dapat menangkal berbagai macam antigen dan radikal bebas (Kumoro dan Hasan 2006). Zat ini juga menciptakan suasana basa, sehingga kurang menguntungkan bagi kehidupan cacing di dalam usus.

Dibandingkan dengan obat sintesis, sambiloto mempunyai berbagai kelebihan. Herba liar ini tumbuh secara kosmopolit pada berbagai ketinggian sehingga mudah dan murah untuk didapat serta dibudayakan. Herba ini juga mengandung andrografolid yang merupakan hepatoprotektif dan renoprotektif dalam jumlah yang berlimpah sehingga herba ini aman dikonsumsi oleh pasien yang mempunyai kelainan hati serta ginjal (Singh et al. 2009).

Dalam kenyataan klinis, *Ascaris lumbricoides* sukar didapat dikarenakan cacing tersebut jarang keluar secara spontan dari dalam tubuh penderita. Selain itu, para peneliti juga belum menemukan metode yang sesuai untuk dapat membiakkan telur *Ascaris lumbricoides* secara *in vitro*. Mengingat prevalensi askariasis yang cukup besar dan akibat yang ditimbulkan cukup berbahaya, maka penelitian ini menggunakan sampel pengganti yang mempunyai kesamaan morfologi dan cara infeksi dengan *Ascaris lumbricoides* yaitu cacing *Ascaris suum*. *Ascaris suum* merupakan kerabat terdekat *Ascaris lumbricoides*, bahkan cacing ini sering disebut dengan *Ascaris lumbricoides suum* (Okulewicz dan Lonc 2001).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antihelmintik infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) terhadap *Ascaris suum* secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan menggunakan rancangan penelitian *the post test only controlled group design* (Hajar 1996).

### Lokasi penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

### Subjek penelitian

Subjek penelitian adalah *Ascaris suum* yang masih hidup ditandai dengan gerak aktif. Cacing ini diperoleh dari usus babi di tempat penyembelihan hewan "Radjakaja", Kota Surakarta, Jawa Tengah dan "Baben", Kartasura, Sukoharjo, Jawa Tengah.

### Metode pengambilan sampel

Penelitian ini menggunakan teknik *quota sampling* yaitu mengambil sampel berdasarkan jumlah minimal yang ditetapkan dengan menggunakan rumus Federer yaitu  $(n-1) (t-1) \geq 15$  dimana  $n$  adalah jumlah sampel minimal yang dibutuhkan dan  $t$  adalah jumlah kelompok perlakuan (Federer 1955).

### Pelaksanaan penelitian

#### *Determinasi tanaman dan pembuatan infusa herba sambiloto*

Tanaman sambiloto didapat dari BBPPTO, Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Infusa herba sambiloto merupakan sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit. Simplisia yang digunakan merupakan simplisia herba yaitu menggunakan semua bagian tanaman mulai dari akar, batang, daun, dan bunga. Pada awalnya, herba dikeringkan menjadi bentuk simplisia. Kemudian simplisia dihaluskan menjadi bentuk serbuk dan ditimbang sampai 100 gram. Serbuk tersebut ditambah 100 mL air dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 90°C sambil sesekali diaduk. Infusa diserukai sewaktu masih panas dengan kain flanel. Jika volume akhir belum mencapai 100 mL, maka ditambahkan air mendidih melalui ampasnya. 100 gram serbuk yang dilarutkan dalam 100 mL air akan menghasilkan infusa dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya, infusa 100% diencerkan dengan menggunakan akuades untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan (Hargono et al. 1986).

Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian adalah 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%. Konsentrasi minimal adalah 20% yang didapat dari penelitian terdahulu. Ferris dan Zheng (1999) menggunakan infusa herba sambiloto sebagai antihelmintik nematode *Pratylenchus*

*vulnus*. Konsentrasi efektif yang digunakan adalah 10%. Luas permukaan cacing *Ascaris suum* lebih luas dibanding *Pratylenchus vulnus*. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan konsentrasi minimal yang lebih besar dari 10% yaitu 20%. Untuk mendapatkan konsentrasi yang akan digunakan yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% infusa konsentrasi 100% diencerkan dengan akuades:

Konsentrasi I: 20 mL infusa herba sambiloto 100% + 80 mL akuades. Larutan infusa herba sambiloto 20%.

Konsentrasi II: 40 mL infusa herba sambiloto 100% + 60 mL aquadest. Larutan infusa herba sambiloto 40%.

Konsentrasi III: 60 mL infusa herba sambiloto 100% + 40 mL akuades. Larutan infusa herba sambiloto 60%.

Konsentrasi IV: 80 mL infusa herba sambiloto 100% + 20 mL akuades. Larutan infusa herba sambiloto 80%.

Konsentrasi V: 100 mL infusa herba sambiloto 100%. Larutan infusa herba sambiloto 100%.

#### Pengambilan sampel

Sampel yang dipakai adalah *Ascaris suum* yang berasal dari usus halus babi. Untuk mengambil cacing, usus babi yang baru disembelih dipotong membujur. Kemudian isinya ditampung dalam ember. Mukosa usus dikerok untuk melepas cacing yang mungkin melekat pada mukosa. Isi usus kemudian disaring dan satu persatu cacing mulai diambil kemudian dimasukkan ke dalam toples. Untuk menjaga ketahanan hidup cacing secara *in vitro*, cacing direndam dalam larutan isotonis NaCl 0,9%. Berdasarkan pengalaman penulis, cacing tersebut mampu bertahan hingga 1 minggu jika NaCl 0,9% yang digunakan sering diganti sehingga rendaman tetap jernih dan tidak berbau busuk.

#### Uji Tahap I

Uji tahap I merupakan penelitian pendahuluan untuk mengetahui serial konsentrasi yang akan digunakan pada Uji tahap II. Enam buah cawan petri disiapkan, dan masing-masing diisi dengan 100 mL infusa herba sambiloto dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% dan akuades. Kemudian dihangatkan pada suhu 37°C dalam inkubator selama kurang lebih 15 menit. Sepuluh ekor cacing *Ascaris suum* dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri kemudian inkubasi pada suhu 37°C.

Pengamatan pada kelompok perlakuan dan pembandingan dilakukan tiap jam dan dihentikan sampai terdapat kelompok yang mengalami kematian 100%.

Jumlah cacing yang mati dihitung. Waktu kematian cacing dihitung untuk menentukan rentang waktu pengamatan pada penelitian selanjutnya.

#### Uji Tahap II

Uji Tahap II dilakukan untuk mencari LC50 infusa herba sambiloto. Pada uji tahap II, digunakan infusa herba sambiloto konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100%. Hal ini dikarenakan pada uji tahap I, serial konsentrasi yang dapat membunuh cacing adalah 40-100%.

Lima buah cawan petri disiapkan, dan masing-masing diisi dengan 50 mL infusa herba sambiloto dengan konsentrasi 40%, 60%, 80%, 100% dan akuades. Kemudian dihangatkan pada suhu 37°C dalam inkubator selama kurang lebih 15 menit. Lima ekor cacing *Ascaris suum* dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri kemudian inkubasi pada suhu 37°C. Jumlah sampel yang digunakan dihitung berdasarkan dari rumus Federer (1955).

Pengamatan pada kelompok perlakuan dan pembandingan dilakukan tiap jam selama 7 jam. Waktu 7 jam didapat dari hasil uji tahap I. Dalam uji tahap I, kelompok infusa 100% dapat membunuh 100% cacing dalam waktu 7 jam.

Penelitian direplikasi sebanyak 3 kali (Astuti 1996). Jumlah cacing yang mati dihitung. Analisis menggunakan analisis probit untuk mencari LC50 infusa herba sambiloto.

#### Uji Tahap III

Uji Tahap III bertujuan untuk membandingkan efektifitas infusa herba sambiloto dengan pirantel pamoate dengan mencari LT50 keduanya. Pada tahap ini akan dibandingkan LC50 infusa herba sambiloto dan LC50 pirantel pamoate. Berdasarkan uji tahap I dan II, LC50 infusa herba sambiloto adalah 61,13%. Sedangkan LC50 pirantel pamoate adalah 0,236% (Astuti 1996; Kuntari 2008).

Tiga buah cawan petri disiapkan, dan masing-masing diisi dengan 10 mL infusa herba sambiloto dengan konsentrasi 61,13%, aquades, dan pirantel pamoate 0,236%, lalu dihangatkan pada suhu 37°C dalam inkubator selama kurang lebih 15 menit. Sepuluh ekor cacing *Ascaris suum* dan diinkubasi dalam suhu 37°C. Pengamatan dilakukan tiap jam selama 7 jam. Penelitian direplikasi sebanyak 3 kali (Astuti 1996).

Jumlah kematian cacing pada tiap-tiap kelompok dihitung dan dicari LT50 untuk membandingkan efektifitas keduanya.

#### Analisis data

Rancangan penelitian ini termasuk dalam experimental murni dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design*. Pada penelitian ini digunakan analisis probit untuk mencari LC50 dan LT50 dari infusa herba sambiloto. Syarat dari uji probit adalah distribusinya normal (Dahlan 2008). Untuk mengetahui distribusi data normal atau tidak dapat digunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji ini lebih akurat dibandingkan dengan uji Shapiro-Wilk jika jumlah sampel lebih dari 50.

Kemudian untuk mengetahui hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan banyaknya cacing yang mati dilakukan Uji Korelasi Pearson (untuk sebaran data normal) dan uji korelasi Spearman (untuk sebaran data tidak normal atau nonparametrik). Selanjutnya data dianalisis dengan analisis probit untuk mencari LC50 dan LT50. Analisis statistik diolah menggunakan program SPSS 16.0 for Windows Evaluation Version.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji Tahap I

Uji tahap I dilakukan dengan mengamati jumlah cacing *Ascaris suum* yang mati pada perendaman dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dalam infusa herba sambiloto. Hasil uji tahap 1 disajikan pada Tabel 1.

### Uji Tahap II

Uji Tahap II dilakukan untuk mencari LC50 infusa herba sambiloto. Pada uji *Ascaris suum* direndam dalam infusa herba sambiloto konsentrasi 40%, 60%, 80%, dan 100%. Hasil uji tahap II disajikan lengkap pada Tabel 2.

### Uji Tahap III

Pada uji ini diperbandingkan efektifitas LC50 infusa herba sambiloto dengan LC50 pirantel pamoate dengan cara mencari LT50 nya. *Ascaris suum* direndam dalam infusa herba sambiloto konsentrasi 61,13% dan pirantel pamoate konsentrasi 0,236% (Kuntari 2008). Hasil Uji III disajikan lengkap pada Tabel 3.

**Tabel 1.** Jumlah kematian cacing *Ascaris suum* dalam infusa herba sambiloto setelah 7 jam perendaman\*)

Konsentrasi sambiloto (%)	Waktu (jam)							Cacing yang mati	
	1	2	3	4	5	6	7	Jumlah	%
20%	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40%	0	0	1	1	1	2	2	2	20
60%	0	1	2	2	3	3	4	4	40
80%	0	1	2	3	5	6	7	7	70
100%	0	2	5	7	8	9	10	10	100
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: \*) Jumlah sampel tiap-tiap kelompok adalah 10 ekor

**Tabel 2.** Jumlah kematian cacing *Ascaris suum* dalam berbagai konsentrasi infusa herba sambiloto selama 7 jam perendaman\*)

Konsentrasi sambiloto (%)	Replikasi			Cacing yang mati	
	1	2	3	Jumlah	(%)
40%	1	1	1	3	20
60%	3	2	2	7	46,67
80%	4	4	3	11	73,33
100%	5	5	5	15	100
Kontrol	0	0	0	0	0

Keterangan: \*) Jumlah sampel tiap-tiap kelompok adalah 5 ekor

**Tabel 3.** Jumlah kematian cacing *Ascaris suum* infusa herba sambiloto 61,13% dan pirantel pamoat 0,236% selama 7 jam perendaman\*)

Kelompok	Replikasi	Waktu (jam)						
		1	2	3	4	5	6	7
Sambiloto 61,13%	1	0	1	2	3	4	5	5
	2	0	1	1	2	3	4	5
	3	0	1	2	3	3	4	5
	Rata-rata	0	1	1,67	2,67	3,33	4,33	5
Pirantel Pamoate 0,236%	1	1	3	4	5	6	6	7
	2	2	3	5	5	6	7	8
	3	1	2	4	5	6	6	7
	Rata-rata	1,67	2,67	4,33	5	6	6,33	7,33
Kontrol (aquades)	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	Rata-rata	0	0	0	0	0	0	0

Keterangan: \*) Jumlah cacing tiap kelompok adalah 10 ekor

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap. Pada uji tahap I hasil dapat dilihat pada Tabel 1. Dari uji tahap I didapatkan serial konsentrasi yang dapat menyebabkan kematian cacing kira-kira 40-100%, sehingga pada penelitian tahap II ditentukan serial konsentrasi dengan konsentrasi terendah 40% dan konsentrasi tertinggi 100%. Pada tahap ini diketahui bahwa dalam waktu 7 jam konsentrasi infusa herba sambiloto 100% sudah dapat membunuh 100% cacing. Waktu ini menjadi patokan lamanya penelitian pada uji tahap II dan tahap III.

Uji Tahap II dilakukan untuk mencari LC50 infusa herba sambiloto. Hasil uji tahap II disajikan lengkap pada Tabel 2. Kematian pada kelompok kontrol adalah 0% sehingga tidak perlu dikoreksi dengan formula Abbot (Astuti 1996). Data yang diperoleh dianalisis dengan uji Kolmogorov-Smirnov pada program SP.SS 16.0 for Windows Evaluation Version untuk mengetahui normalitas datanya. Dari hasil analisis diketahui bahwa sebaran data normal ( $p=0,2$  atau  $p>0,05$ ). Kemudian data dianalisis dengan menggunakan Uji Korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan peningkatan konsentrasi dengan jumlah cacing yang mati. Hasil analisis menunjukkan hasil yang signifikan ( $p=0.000$  atau  $p<0.05$ ) dan mempunyai korelasi yang kuat ( $r=0,999$ ) (Dahlan 2008). Karena distribusi data normal, maka dapat dilanjutkan dengan analisis probit untuk mengetahui LC50 infusa herba sambiloto. Dari hasil analisis probit didapatkan LC50 infusa herba sambiloto adalah 61,13%. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 4.

Pada uji tahap III diperbandingkan efektivitas LC50 infusa herba sambiloto dengan LC50 pirantel pamoate dengan cara mencari LT50 nya. *Ascaris suum* direndam dalam infusa herba sambiloto konsentrasi 61,13% dan pirantel pamoate konsentrasi 0, 236% (Kuntari 2008). Hasil Uji tahap III dapat dilihat pada Tabel 3.

Kematian pada kelompok kontrol adalah 0% sehingga tidak perlu dikoreksi dengan formula Abbot (Astuti 1996). Data dianalisis dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui sebaran datanya. Didapat data yang normal pada kelompok infusa herba sambiloto ( $p=0.2$  atau  $p>0.05$ ) maupun pada kelompok pirantel pamoate ( $p=0.2$  atau  $p>0.05$ ). Kemudian data dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk mengetahui LT50 infusa herba sambiloto dan LT50 pirantel pamoate. Hasil analisis dapat dilihat pada Tabel 5.

Dari analisis probit, didapatkan bahwa LT50 infusa herba sambiloto 61,13% adalah 6,58 jam atau 6 jam 34 menit sedangkan LT50 pirantel pamoate dalam percobaan ini adalah 4,27 jam atau 4 jam 16 menit.

**Tabel 4.** Hasil analisis probit untuk menentukan lc50 infusa herba sambiloto

Persentase kematian (%)	Konsentrasi infusa herba sambiloto (%)
10	32.79
30	49.54
50	61.13
70	72.73
90	89.47

**Tabel 5.** Hasil analisis probit untuk menentukan Lt50 infusa herba sambiloto 61,13% dan Lt50 pirantel pamoate 0,236%

Persentase kematian (%)	Letal Time infusa herba sambiloto 61,13%	Letal Time pirantel pamoate 0,236%
10	2 jam 17 menit	49 menit
30	4 jam 49 menit	2 jam 10 menit
50	6 jam 34 menit	4 jam 16 menit
70	8 jam 18 menit	6 jam 22 menit
90	10 jam 48 menit	9 jam 23 menit

## Pembahasan

Untuk mengetahui efek antihelmintik infusa herba sambiloto terhadap cacing *Ascaris suum* secara *in vitro*, penelitian dilakukan dalam tiga tahap. Tahap pertama bertujuan untuk mengetahui apakah infusa herba sambiloto dapat membunuh *Ascaris suum* secara *in vitro* dan untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimal. Tahap kedua bertujuan untuk mencari LC50 atau toksisitas akut. LC50 merupakan konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 50% jumlah cacing pada waktu tertentu. Sedangkan tahap ketiga bertujuan untuk membandingkan infusa herba sambiloto dengan pirantel pamoate yang merupakan *drug of choice* penyakit askariasis.

Pada tahap pertama, dilakukan perendaman cacing *Ascaris suum* dalam infusa herba sambiloto konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% untuk mengetahui serial konsentrasi yang dapat membunuh cacing. Sebagai kontrol, digunakan akuades untuk membuktikan bahwa cacing mati bukan karena aquadesnya melainkan karena herba sambilotonya. Hasil pada uji tahap I yang dapat dilihat pada Tabel 1 menunjukkan bahwa infusa herba sambiloto mempunyai efek antihelmintik dan dapat membunuh cacing *Ascaris suum* secara *in vitro* mulai konsentrasi 40%.

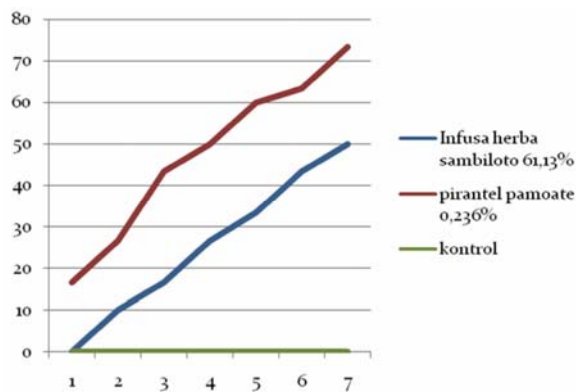
Pada uji tahap kedua, cacing *Ascaris suum* direndam pada serial infusa herba sambiloto yang diperoleh pada uji tahap I. Hasil uji tahap II ini digunakan untuk mengetahui LC50 infusa herba sambiloto. Dengan analisis Probit diperoleh hasil bahwa LC50 infusa herba sambiloto adalah 61,13%. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 61,13%, infusa herba sambiloto dapat membunuh 50% cacing uji dalam waktu yang telah ditentukan. Dalam penelitian ini, waktu yang digunakan adalah 7 jam. Karena dalam waktu 7 jam infusa herba

sambiloto 100% dapat membunuh 100% cacing yang diujikan.

Pada uji tahap III, infusa herba sambiloto 61,13% dibandingkan dengan pirantel pamoate 0,236% (Kuntari 2008) dengan cara mencari LT50. Dari hasil analisis ditemukan bahwa LT50 infusa herba sambiloto pada konsentrasi 61,13% adalah 6 jam 34 menit sedangkan LT50 pirantel pamoate 0,236% adalah 4 jam 16 menit. Hal ini menunjukkan bahwa efektivitas infusa herba sambiloto sebagai antihelmintik lebih rendah daripada efektivitas pirantel pamoate yang memang obat pilihan untuk infeksi cacing *Ascaris* sp. Dalam waktu yang sama pirantel pamoate akan membunuh lebih banyak cacing dibandingkan infusa herba sambiloto. Untuk lebih jelas, perbedaan antara keduanya dapat dilihat pada Gambar 1.

Meskipun efek antihelmintik infusa herba sambiloto lebih rendah dibandingkan pirantel pamoate, bukan berarti infusa herba sambiloto tidak efektif untuk digunakan sebagai obat cacing. Hal ini dikarenakan bahan uji yang digunakan disini adalah infusa dan bukan ekstrak. Bahan ini masih mengandung bahan lain di samping bahan aktif antihelmintik dan kadar antihelmintiknya tentu lebih rendah jika dibandingkan dalam bentuk ekstrak. Jika bahan aktif antihelmintik bisa dipisahkan, kemungkinan daya antihelmintiknya akan lebih besar.

Kemampuan infusa herba sambiloto untuk membunuh cacing *Ascaris suum* disebabkan karena adanya senyawa aktif tertentu yang terkandung di dalamnya. Herba sambiloto diketahui mengandung saponin, tannin, dan andrografolid. Saponin dapat berpotensi sebagai antihelmintik karena bekerja dengan cara menghambat enzim asetilkolinesterase, sehingga cacing akan mengalami paralisis otot dan berujung pada kematian (Kuntari 2008). Alkaloid tannin mempunyai efek antihelmintik dengan cara menggumpalkan protein tubuh cacing. Aktivitas ini dapat mengganggu metabolisme dan homeostasis pada tubuh cacing, sehingga cacing akan mati. Sedangkan andrografolid yang merupakan zat pahit pada herba sambiloto dapat membunuh cacing dengan menimbulkan suasana basa pada usus sehingga menimbulkan kondisi yang tidak nyaman bagi kehidupan cacing (Duke 2009). Selain itu, andrografolid juga berperan sebagai imunomodulator dan antioksidan.



**Gambar 1.** Perbandingan efektivitas infusa herba sambiloto 61,13% dengan pirantel pamoate 0,236%

Potensi sambiloto sebagai antihelmintik terhadap *Ascaris suum* lebih rendah dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Astuti (1996) dengan menggunakan infusa akar melati (*Tabernaemontana divaricata*). Waktu yang diperlukan infusa akar melati untuk membunuh 50% jumlah cacing uji (LT50) lebih cepat dibandingkan dengan sambiloto yaitu 4 jam 49 menit. Akan tetapi, masih diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai perbandingan efektivitas kedua infusa tersebut dikarenakan dalam hal ini sampel yang digunakan berasal dari tempat yang berbeda.

Selain dapat digunakan sebagai antihelmintik pada *Ascaris* sp., herba sambiloto juga dapat digunakan sebagai antihelmintik pada cacing yang lain. Infusa herba sambiloto 10% dapat membunuh cacing akar kelapa (*Pratylenchus vulnus*) dalam beberapa menit (Ferris dan Zheng 1999). Efek antihelmintiknya sangat kuat dan lebih poten jika dibandingkan dengan infusa bawang putih 10% (*Allium sativum*) serta lidah buaya (*Aloe vera*).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Sari dan Astari (2008) didapatkan data bahwa ekstrak sambiloto dapat membunuh cacing *Brugia malayi* pada konsentrasi 35%. Efek antihelmintik herba sambiloto ini lebih kuat dibandingkan dengan *Dietil Carbamin* (DEC) yang merupakan "drug of choice" filariasis. Cacing yang mempunyai panjang 55-100 mm ini akan mati tanpa mengalami *recovery*.

Herba sambiloto juga mampu membunuh cacing tanah *Pheretima posthuma*. Dengan dosis 20 mg/mL, ekstrak alkohol sambiloto mampu membunuh *Pheretima posthuma* dalam waktu 5,33 menit, sedangkan ekstrak alkohol sambiloto 40

mg/mL mampu membunuh cacing tersebut dalam waktu 3,33 menit. Efek antihelmintik ini lebih tinggi dibandingkan dengan piperazine (Siddhartha 2010).

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees) mempunyai efek antihelmintik terhadap *Ascaris suum* secara *in vitro* dengan LC50 61,13% walaupun efektifitasnya sebagai antihelmintik lebih rendah daripada pirantel pamoate.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albonico M, Allen H, Chitsulo L, Engels D, Gabrielli AF, et al. 2008. Controlling soil-transmitted helminthiasis in pre-school-age children through preventive chemotherapy. *PLoS Negl Trop Dis* 2 (3): e126. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000126
- Astuti. 1996. Daya Antihelmintika Infusa akar *Tabernaemontana divaricata* terhadap *Ascaris* sp. Secara *in Vitro*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet* 367 (9521): 1521-32.
- Borhanuddin M, Shamsuzzoha M, Hussain AH. 1994. Hypoglycaemic effects of *Andrographis paniculata* Nees on non-diabetic rabbits. *Bangladesh Med Res Counc Bull* 20: 24-26.
- Caceres DD, Hancke JL, Burgos RA, Wikman GK. 1997. Prevention of common colds with *Andrographis paniculata* dried extract: A pilot double-blind trial. *Phytomedicine* 4: 101-104.
- Carneiro FF, Cifuentes E, Tellez RMM, Romeiu I. 2002. The risk of *Ascaris lumbricoides* infection in children as an environmental health indicator to guide preventive activities in Caparaó and Alto Caparaó, Brazil. *Bulletin of the World Health Organization* 80: 40-46.
- Dahlan MS. 2008. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta : Salemba Medika
- Duke J. 2009. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases - Andrographolide <http://sun.ars-gri.gov:8080/ngspub/xsql/duke/chemical=ANDROGRAPHOLIDE>.
- Federer WT. 1955. *Experimental Design*. MacMillan, New York.
- Ferris H, Zheng L. 1999. Plant Sources of Chinese Herbal Remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. *J Nematol* 31 (3): 241-263
- Ganiswara S.G. (eds). 2007. *Farmakologi dan Terapi*. 5th ed. Gaya Baru, Jakarta.
- Hajar I. 1996. *Dasar-dasar Metodologi Penelitian Kuantitatif dalam Pendidikan*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Hargono D, Farouq, Sutarno S, Pramono S, Rahayu TR, Tanuatmadja US, Sumarsono. 1986. *Sediaan Galenik*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Hidalgo, MA, Romero A, Figueroa J, Cortes P, Concha II, Hancke JL, Burgos RA. 2005. Andrographolide interferes with binding of nuclear factor- $\kappa$ B to DNA in HL-60-

- derived neutrophilic cells. *Br J Pharmacol* 144: 680-686
- Kadar VR. 2009. Peningkatan Kadar Andrografolid dari Kultur Sel *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex Ness Melalui Teknik Amobilisasi Sel Dalam Bioreaktor. [Tesis]. Program Studi Magister Bioteknologi SITH, Bandung.
- Katzung B.G. 2004. Farmakologi dasar dan Klinik. Salemba Empat, Jakarta.
- Kazura JW. 2007. Nematode infections. In: Goldman L, Ausiello D (eds.) Cecil Medicine. 23rd ed. W.A. Saunders, Philadelphia, PA.
- Kumoro AC, Hasan M. 2006. Modelling of andrographolide extraction from *Andrographis paniculata* leaves in a Soxhlet extractor. Proceedings of the 1st International Conference on Natural Resources Engineering dan Technology 2006 24-25th July 2006; Putrajaya, Kuala Lumpur, Malaysia, 664-670.
- Kuntari T. 2008. Daya Antihelmintik Air Rebusan Daun Ketepeng (*Cassia alata* L) Terhadap Cacing Tambang Anjing *in vitro*. [Skripsi]. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Manoj A, Urmila A, Bhagyashri W, Meenakshi V, Akshaya W, Gujar N, Kishore. 2008. Anthelmintic activity of *Ficus benghalensis*. *Indian J Green Pharmacy* 2 (3): 170-172.
- Mardiana, Djarismawati. 2008. Prevalensi Cacing Usus Pada Murid Sekolah Dasar Wajib Belajar Pelayanan Gerakan Terpadu Pengentasan Kemiskinan Daerah Kumuh di Wilayah DKI Jakarta. Puslitbang Ekologi dan Status Kesehatan, Bandung.
- Okulewicz A, Lonc E. 2001. New/old opinions on the systematics and phylogenesis of the nematodes, with the special regard to Ascaridida, Ascaridoidea. *Wiad Parazytol* 47 (3): 263-268.
- Raj RK. 1975. Screening of indigenous plants for anthelmintic action against human *Ascaris lumbricoides*: Part-II. *Indian J Physiol Pharmacol* 19 (1): -(unknown).
- Sakai S, Shida Y, Takahashi N, Yabuuchi H, Soeda H, Okafuji T, Hatakenaka M, Honda H. 2006. Pulmonary lesions associated with visceral larva migrans due to *Ascaris suum* or *Toxocara canis*: Imaging of six cases. *AJR Am J Roentgenol* 186 (6): 1697-702.
- Sari, Astari P. 2008. Uji Makrofiliasidal Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Cacing Dewasa *Brugia malayi* Secara *in vitro*. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran UGM, Yogyakarta.
- Satriawan AH. 2009. Pengaruh Ekstrak Daun Dewa (*Gynura Pseudochina*) Terhadap Kematian Cacing *Ascaris suum* Secara *in vitro*. [Skripsi]. Universitas Islam Sultan Agung, Semarang.
- Siddhartha S, Archana M, Jinu J, Pradeep M. 2010. Anthelmintic Potential of *Andrographis paniculata*, *Cajanus cajan* and *Silybum marianum*. *Pharm Journal* 2 (6): 71-73.
- Singh P, Srivastava MM, Khemani LD. 2009. Renoprotective effects of *Andrographis paniculata* Nees in rats. *Upsala J Med Sci* 114: 136-139.
- Sudoyo WA, Setyohadi B, Alwi I, Setiati S (eds). 2006. Ilmu Penyakit Dalam. Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Susilo J, Hanani E, Soemiati A,, Hamzah L. 1995. Bagian Parasitologi FKUI dan Jurusan Farmasi FMIPA UI Warta Perhipba Warta Perhipba No.FIII, Jan-Maret
- Syarif, A, Elysabeth. 2007. Antelmintik. Dalam: Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik, Fakultas Kedokteran Indonesia, Jakarta.
- Urbani C, Albonico M. 2003. Anthelmintic drug safety and drug administration in the control of soil-transmitted helminthiasis in community campaigns. *Acta Trop* 86: 215-222.
- Wang HW, Zhao HZ, Xiang SQ. 1997. Effects of *Andrographis paniculata* component on nitric oxide, endothelin, and lipid peroxidation in experimental arteriosclerotic rabbits. *Zhong-guo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 17: 547-549 [Chinese]
- Waris L. 2008. Distribusi Parasit Pencernaan Pada Masyarakat Beberapa Daerah dengan Ekosistem yang Berbeda di Propinsi Kalimantan Selatan. [Laporan Akhir Penelitian] Pemprov Kalimantan Selatan & Depkes RI, Jakarta
- Yoshihara S. 2008. Hepatic lesions caused by migrating larvae of *Ascaris suum* in chickens. *J Vet Med Sci* 70 (10): 1129-1131.





## Pengaruh pemberian ekstrak herba anting-anting (*Acalypha indica*) terhadap kadar malondialdehyde (MDA) pada mencit Balb/C induksi streptozotocin

YESSI PERLITASARI, DIDING HERI PRASETYO\*, MARTINI

*Perlitasari Y, Prasetyo DH, Martini. 2016. The effect of anting-anting (Acalypha indica) extract with malondialdehyde (MDA) levels of Balb/C mice induced streptozotocin. Bioteknologi 13: 83-90. The objective of the research was to examine the effect of anting-anting (Acalypha indica Linn) extract with malondialdehyde levels of Balb/C mice induced streptozotocin. This study was a laboratory experimental post test only control group design. Diabetes was induced by intraperitoneal streptozotocin doses of 65 mg/kg body weight dissolved in 0,02 M citrate saline buffer. The subjects used were 32 male mice divided into 4 groups: (i) Non-diabetic control group; (ii) Diabetic group; (iii) Treated-diabetic group with metformin doses of 1,3 mg/mice/day; and (iv) Treated-diabetic group with anting-anting extract dose 1000 mg/kg body weight/day. After 2 weeks, malondialdehyde level was measured. Blood was collected in clean centrifuge tube with EDTA from orbitalis sinus and centrifuged (15 minutes at 3000 rpm, 37°C). The serum used for MDA assay in Biochemistry Laboratory, Faculty of Medicine Gadjah Mada University. The data obtained were statistic analyzed by Anova using SPSS Programme for Microsoft Windows release 16.0. Significance was set at  $p < 0,05$ . MDA levels of non-diabetic control group  $0,211 \pm 0,145$   $\mu\text{mol/L}$ , diabetic group  $0,363 \pm 0,208$   $\mu\text{mol/L}$ , treated-diabetic group with metformin  $0,389 \pm 0,187$   $\mu\text{mol/L}$  and treated-diabetic group with anting-anting extract  $0,309 \pm 0,145$   $\mu\text{mol/L}$ . Statistical analyses with Anova showed that the result was not significance ( $p = 0,199$ ). The experiment result showed that anting-anting (*Acalypha indica* Linn) extract doses 1000 mg/kg body weight/day can reduce the MDA levels in Balb/C mice induced streptozotocin but statistically insignificance ( $p = 0,538$ ).*

▼Alamat korespondensi:

Fakultas Kedokteran, Universitas  
Sebelas Maret, Jl. Ir. Sutami 36a  
Surakarta 57126, Jawa Tengah,  
Indonesia. Tel./Fax.: +62-271-632490.

Manuskrip diterima: 20 Juli 2016.  
Revisi disetujui: 4 September 2016.

Keywords: anting-anting, malondialdehyde, streptozotocin, diabetes mellitus

*Perlitasari Y, Prasetyo DH, Martini. 2016. Pengaruh pemberian ekstrak herba anting-anting (Acalypha indica) terhadap kadar malondialdehyde (MDA) pada mencit Balb/C induksi streptozotocin. Bioteknologi 13: 83-90. Pengaruh Pemberian Ekstrak Herba Anting-anting (Acalypha indica Linn) terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) pada Mencit Balb/C Induksi Streptozotocin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak herba anting-anting terhadap kadar MDA pada Mencit Balb/C dengan induksi streptozotocin. Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorik post test only group design. Induksi diabetes menggunakan streptozotocin dosis 65 mg/kgBB dalam 0,02 M larutan buffer salin sitrat yang diberikan secara intra peritoneal. Hewan uji yang digunakan adalah 32 ekor mencit jantan yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan: (i) Kelompok kontrol non diabetes; (ii) Kelompok diabetes; (iii) Kelompok diabetes yang diberi metformin dosis 1,3 mg/mencit/hari dan (iv) Kelompok diabetes yang diberi ekstrak anting-anting dosis 1000mg/kgBB/hari. Penelitian ini berjalan selama 2 minggu dan berakhir dengan pengambilan darah melalui sinus orbitalis mencit. Sample darah kemudian diberi EDTA, disentrifuge (15 menit, 3000 rpm, 37°C) untuk selanjutnya diambil serum dan dilakukan pemeriksaan MDA di Laboratorium Biokimia FK UGM, Yogyakarta. Data yang diperoleh diolah secara statistik dengan uji Anova menggunakan SPSS for Windows release 16.0. Signifikansi yang digunakan adalah  $p < 0,05$ . Kadar MDA kelompok kontrol  $0,211 \pm 0,145$   $\mu\text{mol/L}$ , kelompok DM  $0,363 \pm 0,208$   $\mu\text{mol/L}$ , kelompok DM dengan metformin  $0,389 \pm 0,187$   $\mu\text{mol/L}$  dan kelompok DM dengan herba anting-anting  $0,309 \pm 0,145$   $\mu\text{mol/L}$ . Analisis menggunakan uji Anova menunjukkan hasil yang tidak signifikan ( $p = 0,199$ ). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak herba anting-anting mampu menurunkan kadar MDA Mencit Balb/C induksi streptozotocin namun tidak bermakna secara statistik ( $p = 0,538$ ).*

Kata kunci: anting-anting, malondialdehyde, streptozotocin, diabetes mellitus

## PENDAHULUAN

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang morbiditasnya akan terus meningkat di masa mendatang. *American Diabetes Association* meramalkan peningkatan prevalensi penderita DM mencapai 2.8% pada 2000 dan akan terus meningkat menjadi 4.4% pada 2030. Jumlah total penderita DM di dunia diperkirakan mendekati 171 juta orang pada tahun 2000 dan 366 juta pada 2030 (Wild 2004).

Menurut *World Health Organization* (WHO), DM menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi, terutama karena komplikasi vaskularnya. Luasnya komplikasi pada DM tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah sehingga glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan (Rahbani-Nobar 1999). Fenomena ini dapat disebabkan oleh kemampuan hiperglikemia secara *in vivo* dalam modifikasi oksidatif berbagai substrat. Selain itu, hiperglikemia juga terlibat dalam proses pembentukan radikal bebas (Droge 2002). Hiperglikemia yang terjadi pada DM menyebabkan autooksidasi glukosa, glikasi protein, dan aktivasi jalur metabolisme poliol yang selanjutnya mempercepat pembentukan senyawa oksigen reaktif. Pembentukan senyawa oksigen reaktif tersebut dapat meningkatkan modifikasi lipid, *deoxyribonucleic acid* (DNA), dan protein pada berbagai jaringan (Ueno 2002). Senyawa oksigen reaktif yang berinteraksi dengan *lipid bilayer* pada membran sel akan menghasilkan peroksidase lipid dan akan membentuk produk akhir yang stabil berupa *malondialdehyde* (MDA) (Mahreen 2010). Modifikasi molekuler pada berbagai jaringan tersebut akan mengakibatkan ketidakseimbangan antara antioksidan protektif (pertahanan antioksidan) dan peningkatan produksi radikal bebas yang berakhir pada kerusakan oksidatif.

Untuk meredakan kerusakan oksidatif tersebut diperlukan antioksidan. Secara umum, antioksidan dapat dibedakan menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan enzimatis dan nonenzimatis. Antioksidan enzimatis yang disebut juga antioksidan pencegah terdiri atas *superoxide dismutase*, *catalase* dan *glutathione peroxidase*. Sedangkan antioksidan nonenzimatis yang disebut juga antioksidan pemutus rantai meliputi vitamin C, vitamin E

dan beta karoten (Chevion et al. 2003). Selain vitamin E dan vitamin C, beberapa flavonoid yang terdapat pada tumbuh-tumbuhan terbukti berkhasiat sebagai antioksidan. Peningkatan *in take* antioksidan yang disertai penurunan kadar glukosa darah dapat digunakan sebagai salah satu terapi hiperglikemia dan akan membantu pencegahan komplikasi klinis DM.

Obat-obat antidiabetik oral biasanya tergolong obat yang mahal dan harus terus-menerus digunakan, sehingga bagi yang tidak mampu, sulit untuk memperolehnya. Oleh karena itu pengobatan herbal yang efektif dan ekonomis mulai berkembang di beberapa negara, termasuk Indonesia. Anting-anting atau *Acalypha indica* Linn merupakan salah satu tanaman obat yang potensial dikembangkan. Daunnya yang berkhasiat obat sering digunakan untuk obat pencahar (cuci perut), peluruh batu ginjal, diabetes melitus (Nandhakumar 2009), serta antibiotik. Anting-anting mengandung beberapa senyawa kimia antara lain flavonoid, saponin, tanin, dan minyak atsiri (Hutapea 1993). Dari beberapa senyawa kimia tersebut, flavonoid diduga mempunyai peranan yang penting sebagai antioksidan. Selain flavonoid, kandungan lain berupa  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside juga telah terbukti memiliki efek hipoglikemik (Duke 2010).

Berdasarkan kandungan bahan aktif yang terdapat di dalamnya, maka penulis akan meneliti pengaruh pemberian ekstrak anting-anting terhadap kadar MDA.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak herba anting-anting terhadap kadar MDA pada Mencit Balb/C dengan induksi streptozotocin.

## BAHAN DAN METODE

### Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat penelitian eksperimental laboratorium *post test only group designs*.

### Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Uji, Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

**Subjek penelitian**

Penelitian ini menggunakan hewan uji berupa Mencit Balb/C jantan dengan usia kurang lebih 4-6 minggu dengan berat badan 20-30 g Mencit Balb/C diperoleh dari UD. Wistar, Bantul, Yogyakarta.

**Teknik sampling**

Penelitian ini menggunakan *purposive sampling* yang dilanjutkan dengan *simple random sampling* untuk membagi subjek penelitian menjadi empat kelompok, yaitu : (i) Kelompok I: Kelompok mencit normal (kontrol), (ii) Kelompok II: Kelompok mencit dengan DM, (iii) Kelompok III: Kelompok mencit dengan DM yang diberi metformin dosis 1,3 mg mencit hari, (iv) Kelompok IV: Kelompok mencit dengan DM yang diberi ekstrak anting-anting dosis 1000 mg/kgBB/hari.

**Penentuan dosis**

*Induksi streptozotocin*

Umumnya induksi diabetes dilakukan dengan pemberian streptozotocin dalam 0.15 M NaCl dan 100 mM buffer sitrat pH 4.5 secara intraperitoneal (Nakhaee 2009). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Arora et al. (2009) dosis tunggal streptozotocin 180 mg/kgBB dapat menginduksi DM tipe I dan dosis streptozotocin 40 mg/kgBB yang diberikan selama 5 hari berturut-turut dapat menyebabkan DM tipe II. Pada penelitian lain juga digunakan dosis tunggal streptozotocin 240 mg/kgBB dapat menginduksi DM tipe I (Nacci et al. 2009).

Pada penelitian ini digunakan streptozotocin sebanyak 500 mg yang dilarutkan dalam 50 mL buffer sitrat 0,02M, sehingga 1 mL larutan mengandung 10 mg streptozotocin. Dosis streptozotocin yang digunakan tidak mengacu pada penelitian yang telah ada, namun peneliti menggunakan dosis 65 mg/kgBB yang diberikan dua kali dengan selang waktu 5 hari. Bila berat mencit rata-rata adalah 30 gram, maka dibutuhkan 1,95 mg streptozotocin untuk setiap ekor mencit. Jika 1 mL larutan mengandung 10 mg streptozotocin, maka induksi secara intraperitoneal memerlukan 0,195 mL larutan.

*Ekstrak anting-anting*

Dosis ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah 1000 mg/kgBB/hari. Bila setiap mencit mempunyai berat 30 g, maka:

$$\text{Dosis 1 ekor mencit} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ gram BB}} \times 30 \text{ gram BB} = 30 \text{ mg}$$

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada mencit adalah 1 mL/20 gramBB (Ngatidjan 1991). Jadi dalam memperkirakan dosis anting-anting yang akan di uji tidak boleh melebihi 1 mL/20 gramBB. Oleh karena itu dilakukan pengenceran ekstrak, dengan rincian 60 gram ekstrak dilarutkan dalam 300 mL akuades.

$$\begin{aligned} \text{Pengenceran ekstrak} &= \frac{60 \text{ gr ekstrak}}{300 \text{ mL akuades}} - \frac{60.000 \text{ mg ekstrak}}{300 \text{ mL akuades}} \\ &= 200 \text{ mg ekstrak dalam 1 mL larutan} \end{aligned}$$

Atau dengan kata lain 1 mL larutan mengandung 200 mg ekstrak. Bila dosis tiap mencit adalah 30 mg maka volume ekstrak yang diberikan adalah 0,15 mL tiap mencit setiap hari.

*Metformin*

Berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis untuk berbagai hewan uji dari berbagai spesies dan manusia, maka konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg pada mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026 (Ngatidjan 1991). Dosis metformin yang digunakan untuk orang dewasa adalah 500 mg/hari, dengan demikian dosis untuk mencit 20 gram = (500 mg x 0,0026) = 1,3 mg/mencit/hari. Karena pemberian metformin dilakukan secara peroral, maka perlu dilakukan pelarutan dalam akuades dengan rincian 26 mg metformin dilarutkan dalam 2 mL aquades. Bila dosis tiap mencit adalah 1,3 mg maka volume metformin yang diberikan adalah 0,1 mL tiap mencit setiap hari.

**Alur penelitian**

Mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu. Mencit dikelompokkan secara *simple random sampling* menjadi 4 kelompok, masing-masing 8 ekor dengan perlakuan sebagai berikut. (i) Kelompok I: hanya diberi diet standar, sebagai kontrol. (ii) Kelompok II: diinduksi streptozotocin 65 mg/kgBB diulang dengan dosis yang sama 4-5 hari kemudian, diberi diet standar, sebagai kontrol negatif (kelompok DM). (iii) Kelompok III: diinduksi streptozotocin 65 mg/kgBB diulang dengan dosis yang sama 4-5 hari

kemudian, diberi diet standar dan metformin dosis 1,3 mg/mencit/hari secara peroral setiap hari. (iv) Kelompok IV: diinduksi streptozotocin 65 mg/kgBB diulang dengan dosis yang sama 4-5 hari kemudian, diberi diet standar dan ekstrak anting-anting dosis 1000 mg/kgBB/hari secara peroral setiap hari.

Pemeriksaan glukosa darah dilakukan 2 hari setelah induksi streptozotocin, dan pada akhir paparan (minggu ke-2) dilakukan pemeriksaan MDA plasma mencit.

### Analisis statistik

Penelitian ini menggunakan uji statistik parametrik karena variabel diambil secara random dengan *simple random sampling* dan skala pengukuran numerik (Bhisma 2006). Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan uji Anova dilanjutkan dengan Post Hoc Test menggunakan *SPSS for Windows Release 16.0* dan  $p < 0,05$  dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya. Dipilih uji *one-way* Anova karena penelitian ini menggunakan lebih dari 2 kelompok untuk menguji kemampuan generalisasi sehingga data sampel dianggap mewakili populasi. Adapun syarat yang harus dipenuhi pada uji *one-way* Anova antara lain data numerik pada kelompok kategorik sampel kelompok independen dan diambil secara random. Diasumsikan varians populasi homogeny. Data berdistribusi normal atau mendekati normal.

Apabila syarat uji *one-way* Anova terpenuhi maka dapat dilanjutkan dengan *Least Significant Difference (LSD) Post Hoc Test* untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok.

apabila syarat uji *one-way* Anova tidak terpenuhi maka harus dilakukan transformasi data agar data diperoleh varian sama. Bila tidak diperoleh varian yang sama maka digunakan pengujian alternatif berupa uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dan dilanjutkan dengan *Post Hoc Test (Uji Mann Whitney)* (Sopiyudin 2008).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

Pada penelitian hubungan pemberian ekstrak anting-anting (*Acalypha indica* Linn) terhadap kadar *malondialdehyde* Mencit Balb/c induksi streptozotocin didapatkan kadar GDS untuk mencit kontrol  $147,75 \pm 14,21$  mg/dl (Ocktarini 2010) dengan kadar MDA  $0,211 \pm$

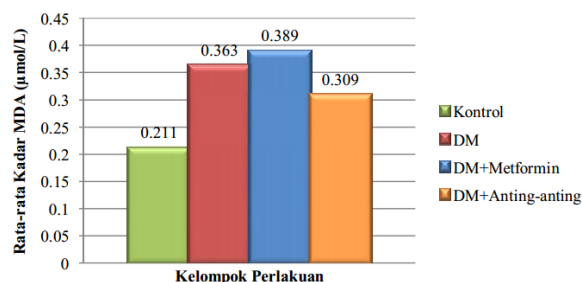
$0,145$   $\mu\text{mol/L}$ . Pemberian STZ dosis 65 mg/kgBB yang diberikan dua kali dalam selang waktu 5 hari menunjukkan peningkatan kadar GDS menjadi  $226,78 \pm 49,28$  mg/dl (Ocktarini 2010) yang diiringi dengan peningkatan kadar MDA mencit model diabetes menjadi  $0,363 \pm 0,208$   $\mu\text{mol/L}$ . Pemberian ekstrak herba anting-anting pada hewan uji menunjukkan adanya penurunan kadar MDA menjadi  $0,309 \pm 0,145$   $\mu\text{mol/L}$ , namun tidak demikian pada pemberian metformin. Pada pemberian metformin terjadi peningkatan kadar MDA menjadi  $0,389 \pm 0,187$   $\mu\text{mol/L}$ . Data selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Apabila digambarkan dalam diagram akan terlihat seperti Gambar 1.

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik dengan uji *Anova* menggunakan program *SPSS for Windows Release 16.0* dan  $p < 0,05$  dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya.

Untuk melakukan uji Anova, data harus terdistribusi normal. Berdasarkan uji normalitas *Shapiro-Wilk* (karena jumlah sampel kurang dari 50) didapatkan nilai signifikansi untuk semua kelompok  $p > 0,05$  sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa distribusi kelompok tersebut adalah normal. Berikut ini hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk*.

**Tabel 1.** Rata-rata kadar *malondialdehyde* mencit Balb/c ( $\mu\text{mol/L}$ )

Kelompok perlakuan	Rata-rata $\pm$ SD
Kontrol	0,211 $\pm$ 0,145
DM	0,363 $\pm$ 0,208
DM + Metformin	0,389 $\pm$ 0,187
DM + Herba Anting-anting	0,309 $\pm$ 0,145



**Gambar 1.** Diagram batang rata-rata MDA mencit sesudah perlakuan

**Tabel 2.** Hasil uji *Shapiro-Wilk* pada kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	<i>p</i>
Kontrol	0,623
DM	0,629
DM + Metformin	0,524
DM + Herba Anting-anting	0,525

**Tabel 3.** Hasil Uji Statistik dengan Uji *Anova*

*Test of Homogeneity of Variance*  
Kadar MDA

Levene statistic	df1	df2	Sig.
0,445	3	28	0,723

*ANOVA:*  
Kadar MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0,150	3	0,050	1.655	0,199
Within Groups	0,846	28	0,030		
Total	0,996	31			

Oleh karena nilai  $p > 0,05$ , maka dapat ditarik kesimpulan bahwa syarat uji *Anova* terpenuhi sehingga uji *Anova* dapat dilakukan. Hasil uji *Anova* ditunjukkan dalam Tabel 3.

Dari hasil *Significancy Test Homogeneity of Variances* didapatkan angka 0,723 ( $p > 0,05$ ) sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa tidak ada perbedaan varian antara kelompok data yang dibandingkan atau dengan kata lain varian data normal. Karena varian data sama, maka hasil uji *Anova* pada tabel adalah valid. Berdasarkan uji *Anova* didapatkan nilai signifikansi  $p = 0,199$  sehingga untuk masing-masing kelompok tidak terdapat perbedaan kadar MDA secara bermakna. Oleh karena itu tidak dilanjutkan dengan *Post Hoc Test*.

**Pembahasan**

Streptozotocin secara luas telah digunakan untuk menginduksi DM, baik *insulin-dependent* dan *non-insulin-dependent diabetes mellitus* pada hewan coba. Pemberian dosis streptozotocin yang tepat dapat memulai proses autoimun yang mengarah pada kerusakan sel  $\beta$  pankreas dan efek toksik DM eksperimental ini akan terlihat dalam 2-4 hari (Akbarzadeh 2007). Hal ini terlihat dari hasil penelitian Ocktarini

(2010), mencit yang diinduksi STZ dosis 65 mg/kgBB dalam 0,02 M larutan buffer sitrat secara biokimiawi menunjukkan tanda-tanda diabetes yang diperlihatkan dengan peningkatan kadar GDS dari kontrol  $147,75 \pm 14.21$  mg/dl menjadi  $226,78 \pm 49,28$  mg/dl.

STZ telah diketahui dapat meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS), yang memberikan kontribusi terhadap fragmentasi DNA dan memicu perubahan dalam sel. STZ secara selektif terakumulasi pada sel  $\beta$  pankreas melalui *low-affinity GLUT2 glucose transporter* pada membran plasma (Elsner 2000). Masuknya gugus metil (alkilasi) dari streptozotocin kedalam molekul DNA akan menyebabkan kerusakan pada fragmen DNA. Kerusakan DNA tersebut nantinya akan mengaktifkan *poly adenosine diphosphate* (ADP)-*ribosylation*. Proses ini akan mengakibatkan penghabisan *nicotinamide adenine dinucleotide* (NAD<sup>+</sup>) seluler, lebih lanjut akan terjadi pengurangan *adenosine triphosphate* (ATP) (Szkudelski 2001). Peningkatan *ATP dephosphorylation* ini akan memberikan substrat untuk *xanthine oxidase* sehingga akan mempercepat reaksi yang menghasilkan anion superoksida sebagai produk akhirnya. Akibat dari pembentukan anion superoksida ini, maka akan terjadi aktivasi dari hidrogen peroksidase dan radikal-radikal hidroksil lainnya.

Analisis MDA dengan menggunakan metode *thiobarbituric acid* (TBA) secara luas digunakan beberapa tahun terakhir untuk mengetahui level peroksidasi lipid serta radikal bebas (Tukozykan 2006). Hiperglikemia diketahui sebagai salah satu penyebab meningkatnya jumlah radikal bebas. Produksi radikal bebas yang disebabkan oleh hiperglikemia dapat terjadi melalui beberapa jalur, antara lain peningkatan glikolisis, peningkatan produksi *Advanced Glycation End products* (AGEs), aktivasi protein kinase C (PKC), aktivasi jalur sorbitol (poliol) dan autooksidasi glukosa. Tingginya hiperglikemia ini dapat menyebabkan peningkatan stress oksidatif yang memicu kerusakan sel  $\beta$  pankreas, menyebabkan degranulasi dan penurunan sekresi insulin yang turut meningkatkan komplikasi vaskular diabetik. Baik non-radikal maupun radikal oksidan dapat menyebabkan peroksidasi lipid terutama pada lipoprotein yang mengandung *unsaturated fatty acids* (Ahmed 2005). Peningkatan peroksidasi lipid ini akan

berimbang pada peningkatan MDA serum. Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan kadar MDA kontrol  $0,211 \pm 0,145 \mu\text{mol/L}$  menjadi  $0,363 \pm 0,208 \mu\text{mol/L}$  pada kelompok DM.

Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) banyak tersebar di daerah tropis seperti India, Filipina, dan Indonesia. Di Indonesia, tanaman ini banyak digunakan sebagai antiradang, antibiotik, diuretik, pencahar dan penghenti perdarahan (hemostatis) dalam bentuk segar atau yang telah dikeringkan (Dalimartha 1999). Penelitian Nahrstedt (2006) menunjukkan bahwa anting-anting mengandung tanin, *acalyphin*, *acalyphamide*, *aurantiamide*, *succinimide*, dan *pyranoquinolinone alkaloid flindersin*. Selain itu anting-anting juga mengandung  $\beta$ -sitosterol- $\beta$ -D-glucoside, asam askorbat dan fiber. Kandungan kimia tersebut memiliki beberapa efek farmakologis antara lain efek hipoglikemia, antidiabetik dan antioksidan (Duke 2010). Pada penelitian Mahdi (2003) telah terbukti bahwa pemberian dosis 500 mg/kgBB ekstrak *A. indica* dapat menurunkan kadar GDS serta kadar MDA tikus putih model diabetes induksi streptozotocin. Selain itu *A. indica* menunjukkan sedikitnya 81,6% aktivitas antioksidan (Marwah 2007).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak herba anting-anting dosis 1000 mg/kgBB/hari dapat menurunkan kadar GDS rata-rata mencit  $144.62 \pm 60.48 \text{ mg/dl}$ . Hal ini diiringi dengan penurunan kadar MDA kelompok anting-anting menjadi  $0,309 \pm 0,145 \mu\text{mol/L}$  dibandingkan dengan kelompok DM yang berkisar  $0,363 \pm 0,208 \mu\text{mol/L}$ . Berdasarkan hasil analisis data diketahui bahwa ekstrak anting-anting mampu menurunkan kadar MDA namun bila dibandingkan antarkelompok perlakuan tidak terdapat perbedaan secara bermakna. Hal ini mungkin dikarenakan durasi pemberian ekstrak yang singkat (2 minggu) dibandingkan pada penelitian Mahdi (2003) yang lamanya perlakuan adalah 30 hari, dengan pemberian ekstrak anting-anting 500 mg/kgBB/hari, atau karena kadar antioksidan dan flavonoid dalam ekstrak terlalu kecil sehingga pemberian dosis 1000 mg/kgBB/hari selama 2 minggu belum mampu menurunkan kadar MDA secara bermakna.

Pada pemberian metformin dosis 500 mg/kgBB/hari juga terlihat penurunan kadar GDS rata-rata mencit  $145.87 \pm 50.22 \text{ mg/dl}$ . Namun justru sebaliknya pada kelompok ini

terjadi peningkatan kadar MDA menjadi  $0,389 \pm 0,187 \mu\text{mol/L}$  dibandingkan dengan kelompok DM yang berkisar  $0,363 \pm 0,208 \mu\text{mol/L}$ . Metformin adalah obat hipoglikemik oral (OHO) yang mekanisme kerjanya menurunkan produksi glukosa di hepar dan meningkatkan sensitivitas jaringan otot dan adipose (Suherman 2007). Secara *in vivo*, metformin juga memiliki aktivitas antioksidan dan mampu menurunkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Bonfont-Rousselot 2003). Namun, penelitian terbaru menunjukkan bahwa metformin, dalam dosis farmakologis, dapat memodulasi produksi ROS intraseluler (Faure 2008). Pada beberapa penelitian tidak didapatkan penurunan kadar MDA yang signifikan pada DM tipe 2 yang diterapi dengan metformin, bahkan didapatkan peningkatan kadar MDA. Metformin dianggap tidak efektif dibandingkan dengan OHO lain dalam menurunkan hiperlipidemia maupun kadar MDA (Iida et al. 2003; Aviles-Santa 1999; Tessier 1999).

Pada penelitian ini terdapat banyak kekurangan, antara lain sebagai berikut. Waktu pelaksanaan yang telampau singkat (2 minggu) sehingga efek yang ingin diketahui oleh peneliti belum jelas terlihat. Penggunaan dosis tunggal herba anting-anting sehingga tidak diketahui efek minimal dan maksimalnya dalam berbagai dosis.

## KESIMPULAN

Dari penelitian ini didapatkan simpulan bahwa pemberian ekstrak anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dosis 1000 mg/kgBB dapat menurunkan kadar MDA Mencit Balb/C namun tidak bermakna secara statistik ( $p=0,538$ ).

## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed RG. 2005. The physiological and biochemical effects on the balance between oxidative stress and antioxidant defense system. *Medical J Islamic World Acad Sci* 15: 1, 31-42.
- Akbarzadeh A, Norouziyan, Mehrabi MR. 2007. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Chem Biochem* 22 (2): 60-64.
- Arora S, Ojha SK, Vohora D. 2009. Characterisation of streptozotocin induced diabetes mellitus in swiss albino mice. *Global J. Pharmacol* 3 (2): 81-84.

- Aviles-Santa L, Sinding J, Raskin P. 1999. Effects of metformin in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 131: 182-188.
- Bhisma M. 2006. Desain dan Ukuran Sampel Untuk Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif di Bidang Kesehatan. GajahMada University Press, Yogyakarta.
- Bonnefont-Rousselot D, Raji B, Walrand S. 2003. An intracellular modulation of free radical production could contribute to the beneficial effects of metformin towards oxidative stress. *Metabolism* 54: 586-589.
- Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. 2003. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5119-5123.
- Dalimartha S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Jilid II. Trubus Agri Widya, Jakarta.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95.
- Duke JA. 2010. *list of chemical of Acalypha indica* Linn. in: phytochemical and ethnobotanical databases. [http://sun.arsgrin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/pl\\_act.xsql?taxon=16](http://sun.arsgrin.gov:8080/npgspub/xsql/duke/pl_act.xsql?taxon=16). (20 Februari 2010)
- Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 43: 1528-1533.
- Faure P, Wiernspenger N, Polge C, Faviers A, Halimi S. 2008. Impairment of the antioxidant properties of serum albumin in patients with diabetes: protective effects of metformin. *ClinSci* 114: 251-256.
- Hutapea JR, 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia III*. Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Depkes RI Badan, Jakarta.
- Iida KT, Kawakami Y, Suzuki M, Shimani H, Toyoshima H, Sone H, et al. 2003. Effect of thiazolidinediones and metformin on LDL oxidation and aortic endothelium relaxation in diabetic gk rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: 125-130.
- Mahdi AA, Chandra A, Singh RJ, Shukia A, Mishra LC, Ahmad S. 2003. Effect of herbal hypoglycemic agent on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. *Indian J Clin Biochem* 18 (2): 8-15.
- Mahreen R, Mohsin M, Nasreen Z. 2010. Significantly increased levels of serum malondialdehyde in type 2 diabetic with myocardial infarction. *Int J Diab Ctries* 30 (1): 49-51.
- Marwah RG, Fatope MO, Al Mahrooqi RS, Varma GB, Al Abasi H, Al-Burtamani KS. 2007. Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman. *Food Chem* 101: 465-70.
- Nacci C, Tarquinio M, De Benedictis L, Mauro A, Zigrino A, Carratu` MR, Quon MJ. 2009. Endothelial dysfunction in mice with Streptozotocin-induced Type 1 diabetes is opposed by compensatory overexpression of Cyclooxygenase-2 in the vasculature. *Endocrinology* 150 (2): 849-861.
- Nahrstedt A, Hungeling M, Peterit F. 2006. phytochemical communication flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia* 77 : 484-486.
- Nakhaee A, Bokaeian M, Savarani M. 2009. Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. *Indian J Clin Biochem* 24 (4): 419-425.
- Nandhakumar M, Tamil IG, Senthilkumar M, Dinesh KB, Mitra A. 2009. In vitro assay of alpha amylase inhibitory activity of Indian Medicinal Herb *Acalypha indica*. *J Clin Diagnos Res* 3: 1475-1478.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk Laboratorium Metode Laboratorium dalam Toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Ocktarini R. 2010. Pengaruh Pemberian Ekstrak Herba Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) terhadap Kadar Glukosa Darah Mencit Induksi Streptozotocin. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Rahbani-Nobar M, Adi-Beig F, Mirhashemi SM. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Med J Islamic Acad Sci* 12 (4): 109-14.
- Sopiyudin MD. 2008. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: PT. ARKANS Entertainment & Education in Harmony.
- Suherman SK. 2007. Insulin dan Antidiabetik Oral. Dalam: Gunawan SG, Setiabudy R, Nafrialdi (eds). *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 5. Pusat Penerbitan Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Szkudelski T. 2001. The Mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546.
- Tessier D, Maheux P, Khalil A,, Fulop T. 1999. Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metabolism* 48: 897-903.
- Tukozkan N, Erdamar H, Seven I. 2006. Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by High-Performance Liquid Chromatography and thiobarbituric acid assay. *Firat Tıp Dergisi* 11 (2): 88-92.
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, and Osawa T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr* 32: 897-900.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global Prevalence of Diabetes, Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabet Care* 27 (5): 1047-53.



## 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](mailto: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 mm<sup>2</sup>) 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<sup>-2</sup>, L<sup>-1</sup>, h<sup>-1</sup>) 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](http://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*. 50<sup>th</sup> 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](http://www.molecularsystemsbiology.com)

- 
- Penggunaan BA dan NAA untuk merangsang pembentukan tunas  
lengkeng dataran rendah (*Dimocarpus longan*) secara in vitro** 43-53  
TANJUNG DEWI ANNIASARI, RETNO BANDRIYATI ARNI  
PUTRI, ENDANG SETIA MULIAWATI
- Kadar asam fitat dan kadar protein pada tempe koro babi (*Vicia faba*)  
dengan variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi** 54-62  
SEPTIANA NUR FITRIANI, SRI HANDAJANI,  
DIAN RACHMAWANTI AFFANDI
- Pengaruh macam media dan konsentrasi BAP terhadap multiplikasi  
tanaman manggis (*Garcinia mangostana*) secara in vitro** 63-72  
EKA NURSETIADI, ENDANG YUNIASTUTI, RETNA BANDRIYATI ARNI PUTRI
- Efek antihelmintik infusa herba sambiloto (*Andrographis paniculata*)  
terhadap *Ascaris suum* secara in vitro** 73-82  
RANI TIYAS BUDIYANTI, MURKATI, ISNA QADRIJATI
- Pengaruh pemberian ekstrak herba anting-anting (*Acalypha indica*)  
terhadap kadar malondialdehyde (MDA) pada mencit Balb/C induksi  
streptozotocin** 83-90  
YESSI PERLITASARI, DIDING HERI PRASETYO, MARTINI