

# Biofarmasi

**Journal of Natural Products Biochemistry**

**VOLUME 5  
NOMOR 1  
FEBRUARI 2007  
ISSN: 1693-2242**

**PENERBIT:**

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

**ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:**

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta  
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126  
Tel. & Fax. +62-271-663375  
E-mail: unsjournals@yahoo.com  
Online: www.unsjournals.com

**TERBIT PERTAMA TAHUN:**

2003

**ISSN:**

1693-2242

**PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:**

S u t a r n o

**SEKRETARIS REDAKSI:**

Ahmad Dwi Setyawan

**PENYUNTING PELAKSANA:**

Djoko Santoso  
Ratna Setyaningsih  
Solichatun  
Suratman  
Tetri Widiyani

**PENYUNTING AHLI:**

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang  
Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta  
Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung  
Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta  
Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor  
Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta  
Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

***Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry***

mempublikasikan tulisan ilmiah, baik hasil penelitian asli maupun telaah pustaka (*review*) dalam lingkup ilmu-ilmu farmasi dan biologi, dengan tema khusus biokimia bahan alam (*natural product biochemistry*). Setiap naskah yang dikirimkan akan ditelaah oleh redaktur pelaksana, redaktur ahli, dan redaktur tamu yang diundang secara khusus sesuai bidangnya. Dalam rangka menyongsong pasar bebas, penulis sangat dianjurkan menuliskan karyanya dalam Bahasa Inggris, meskipun tulisan dalam Bahasa Indonesia yang baik dan benar tetap sangat dihargai. Hingga nomor ini, jurnal dikirimkan kepada institusi-institusi yang meminta tanpa biaya pengganti, sebagai bentuk pertukaran pustaka demi mendorong penelitian, pengembangan, dan pemanfaatan bahan alam. Jurnal ini terbit dua kali setahun, setiap bulan Pebruari dan Agustus.

# Fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik dengan variasi jenis dan konsentrasi inokulum

## Sugarcane juice fermentation for making probiotic beverage with variations of type and concentration of inoculum

DWI KRISTANTI, RATNA SETYANINGSIH, ARI SUSILOWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 13 Desember 2006. Revisi disetujui: 15 Februari 2007.

**Abstract.** Kristanti D, Setyaningsih R, Susilowati A. 2006. Sugarcane juice fermentation for making probiotic beverage with variations of type and concentration of inoculum. *Biofarmasi* 5: 1-7. The exact type and concentration of inoculum in the manufacture of probiotic beverage is expected to produce a probiotic beverage that can meet the standard. The aims of this research were to determine the type of inoculum, the concentration of inoculum, and the combination of type and concentration of inoculum that meet the standard that reviewed from the number of viable bacterial cells, reduction sugar content, acid total, the value of pH and organoleptic test. The research was conducted by using a factorial completely randomized design consisted of two factors: (i) the type of inoculum consisted of three levels, namely *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* and *L. plantarum*; (ii) the concentration of inoculum consisted of three levels, i.e. 1%, 2% and 3%. The experiment was conducted with three replications. The media of fermentation including sugarcane juice, skim milk 10% and gelatin 0.3% fermented with each inoculum for 96 hours. The parameters measured included the number of viable bacterial cells, acid total, pH value, reduction sugar content and organoleptic test. Data obtained were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) and continued with DMRT test at the significance level of 5%. The organoleptic test was analyzed by using a hedonic method. The results of research showed that all types and the concentration of inoculum tested could be used in the fermentation of sugarcane juice for making probiotic beverage. The number of viable bacterial cells and the pH value met the standards of probiotic beverage in all treatments. The total of acid met the standards of probiotic beverage, except in the treatment of *L. casei* dan *L. plantarum* 1%. The result of organoleptic test showed that the preference of panelist in the scale of dislike to rather likes.

**Keywords:** Concentration of inoculum, fermentation, *Lactobacillus*, probiotic beverage, sugarcane juice

### PENDAHULUAN

Peningkatan standar kesehatan masyarakat saat ini turut meningkatkan standar kualitas makanan yang dikonsumsi. Hasil studi pasar menunjukkan adanya kenaikan permintaan terhadap makanan fungsional yang mengandung kultur probiotik (Gardiner et al. 1999). Makanan fungsional adalah makanan yang mempunyai karakteristik sensori, bergizi, dan bermanfaat bagi kesehatan. Untuk memenuhi permintaan yang meningkat, produksi makanan probiotik saat ini sedang dikembangkan (Stanton et al. 1998).

Menurut Havenaar and Jos (1992), probiotik didefinisikan sebagai mikrobia hidup dalam jumlah tertentu dalam pencernaan serta mempunyai manfaat kesehatan bagi inangnya dengan cara menjaga keseimbangan mikroflora usus. Saluran pencernaan manusia termasuk ekosistem mikrobia yang kompleks yang mengandung lebih dari 400 spesies bakteri yang berbeda (Bruno et al. 2002).

Syarat utama dikategorikan sebagai bakteri probiotik diantaranya dapat bertahan hidup sejak dikonsumsi hingga mencapai saluran pencernaan. Beberapa bakteri asam laktat

yang termasuk dalam bakteri probiotik antara lain *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. jonsonii*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. salvarius*, dan spesies dari *Bifidobacterium* (Ray 1996; Shortt and Salminen 2001), sedangkan *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *Streptococcus cremoris*, *S. thermophilus*, dan *S. diacetylactis* merupakan bakteri asam laktat yang tidak dapat mencapai usus manusia dalam kondisi hidup (Purwandhani 1998). *Lactobacillus casei* merupakan bakteri asam laktat yang umum dipergunakan dalam minuman probiotik (Kuswardani dan Nugrahani 1998). Menurut Gilliland (1985), *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* merupakan bakteri asam laktat homofermentatif yang dapat menghasilkan asam lebih dari 85%.

Bakteri asam laktat yang digunakan dalam produk minuman fermentasi mempunyai beberapa fungsi yang menguntungkan, terutama terhadap kesehatan saluran pencernaan. Bakteri asam laktat yang masih hidup dalam saluran pencernaan akan menetap, memperbanyak diri, dan memproduksi komponen metabolit, seperti asam laktat yang dapat membunuh bakteri patogen (Gardiner et al. 1999). Dengan demikian, peranan bakteri probiotik menjadi penting bagi kesehatan manusia.

Bahan-bahan makanan yang mengalami fermentasi biasanya mempunyai nilai gizi yang lebih tinggi daripada asalnya. Hal ini disebabkan karena mikrobia bersifat katabolik atau mampu memecah komponen-komponen kompleks menjadi zat-zat yang lebih sederhana sehingga lebih mudah dicerna, selain itu mikrobia juga dapat mensintesis beberapa vitamin (Winarno et al. 1980).

Tanaman tebu terdiri dari 12,5% serat dan 7,5% cairan yang disebut nira (Supriyadi 1992). Nira tebu mempunyai potensi yang baik untuk dibuat minuman fermentasi karena kandungan nutrisinya yang cukup lengkap. Nira mengandung sekitar 15% sukrosa, 0,5% gula reduksi, sejumlah nitrogen, dan garam-garam mineral yang cukup untuk pertumbuhan mikrobia (Tilbury 1975).

Pengolahan nira tebu menjadi minuman probiotik memerlukan penambahan sumber nitrogen, karena kandungan nitrogen dalam nira tebu rendah. Penambahan susu skim sebagai sumber nitrogen diharapkan dapat meningkatkan kandungan nitrogen dan memberi aroma pada minuman probiotik. Selain itu, kandungan laktosa dalam susu skim dapat memacu pertumbuhan bakteri asam laktat. Penambahan gelatin dapat membantu meningkatkan homogenitas dari minuman probiotik (Kuswardani dan Nugerahani 1998).

Selama ini, pemanfaatan nira tebu terutama diolah menjadi gula. Sebagai upaya diversifikasi produk olahan tebu, salah satunya dapat dilakukan dengan membuat nira tebu menjadi minuman probiotik. Dari penelitian sebelumnya, nira siwalan telah digunakan sebagai bahan pembuatan minuman probiotik. Hasil penelitian menunjukkan penerimaan yang baik oleh panelis (Kuswardani dan Nugerahani 1998). Nira tebu mempunyai kandungan nutrisi yang hampir sama dengan nira siwalan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang pembuatan minuman probiotik dari nira tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis inokulum, konsentrasi inokulum, serta kombinasi antara jenis dan konsentrasi inokulum yang dapat menghasilkan minuman probiotik dari nira tebu yang memenuhi standar ditinjau dari jumlah sel bakteri viabel, kadar gula reduksi, total asam, nilai pH, dan uji organoleptik.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta pada bulan Agustus-Desember 2004.

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan untuk pembuatan *starter* meliputi bakteri *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi UGM, sedangkan medium yang digunakan meliputi MRS *broth*, susu skim, akuades, dan glukosa. Bahan yang digunakan untuk pembuatan minuman probiotik meliputi nira tebu, *starter*, susu skim, dan gelatin. Sementara itu, alat penelitian yang digunakan meliputi inkubator, *magnetic stirrer*, *autoclave*, timbangan

analitik, pH-meter, vorteks, penangas, refrigerator, *colony counter*, spektrofotometer, *aluminium foil*, kapas, jarum inokulasi, dan peralatan gelas.

### Rancangan penelitian

Percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor sebagai berikut. Faktor pertama adalah jenis bakteri, terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu:  $B_1 = L. casei$ ,  $B_2 = L. acidophilus$ , dan  $B_3 = L. plantarum$ . Faktor kedua adalah konsentrasi inokulum, terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu:  $K_1 =$  konsentrasi 1%,  $K_2 =$  konsentrasi 2%, dan  $K_3 =$  konsentrasi 3%. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan 3 ulangan. Dari kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan sebagai berikut:

$B_1K_1$	$B_1K_2$	$B_1K_3$
$B_2K_1$	$B_2K_2$	$B_2K_3$
$B_3K_1$	$B_3K_2$	$B_3K_3$

Keterangan:

$B_1K_1 = L. casei$  dengan konsentrasi inokulum 1%

$B_1K_2 = L. casei$  dengan konsentrasi inokulum 2%

$B_1K_3 = L. casei$  dengan konsentrasi inokulum 3%

$B_2K_1 = L. acidophilus$  dengan konsentrasi inokulum 1%

$B_2K_2 = L. acidophilus$  dengan konsentrasi inokulum 2%

$B_2K_3 = L. acidophilus$  dengan konsentrasi inokulum 3%

$B_3K_1 = L. plantarum$  dengan konsentrasi inokulum 1%

$B_3K_2 = L. plantarum$  dengan konsentrasi inokulum 2%

$B_3K_3 = L. plantarum$  dengan konsentrasi inokulum 3%

### Cara kerja

#### Pembuatan kultur kerja

Masing-masing kultur murni bakteri *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* diperbanyak dengan cara satu ose kultur murni diinokulasikan ke medium MRS *broth* agar miring, diinkubasikan pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam, dan siap digunakan untuk pembuatan *starter*. Kultur ini selanjutnya disebut kultur kerja.

#### Pembuatan starter

Sebanyak 5 mL MRS *broth* steril diinokulasi dengan satu ose kultur kerja lalu diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam sehingga diperoleh kultur cair dari masing-masing bakteri. Masing-masing kultur cair tersebut diinokulasikan sebanyak 1% ke dalam larutan susu skim 10% (v/v) steril kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 48 jam sehingga diperoleh *starter* induk. *Starter* siap pakai dibuat dengan cara 1% *starter* induk diinokulasikan pada larutan susu skim 10% (v/v) dan glukosa 3% (b/v) selama 24 jam pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum*, serta dihitung dengan metode *standart plate count* dengan standar  $10^8$  bakteri/mL (Hadiwiyoto 1994).

### Pembuatan minuman probiotik

Nira tebu diencerkan dengan akuades hingga kadar gula 4%, kemudian diambil 100 mL, ditambah dengan 10% susu skim dan 0,3% gelatin, dimasukkan ke dalam botol, dipanaskan pada suhu 85°C selama 30 menit, dan diinokulasi *starter* siap pakai dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3%, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C untuk *L. casei* dan *L. acidophilus*, dan 30°C untuk *L. plantarum* selama 96 jam.

### Analisis jumlah sel bakteri viabel

Penghitungan jumlah sel bakteri viabel dilakukan dengan menggunakan metode *standart plate count*. Jumlah bakteri harus mencapai standar  $10^8$  bakteri/mL. Cara penghitungan jumlah sel bakteri viabel dilakukan menurut Hadiwiyoto (1994).

### Analisis total asam dengan metode titrasi

Sebanyak 10 mL sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditetes dengan 3-4 tetes indikator PP 1%. Setelah itu, sampel dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berwarna kemerahan (Hadiwiyoto 1994). Penghitungan total asam dapat dilakukan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total asam laktat} = \frac{\text{volume NaOH} \times N \times 0,09}{\text{volume contoh}} \times 100\%$$

Rumus ini berdasarkan pada 1 mL NaOH 0,1 N dapat menetralkan 0,09/1 mL asam laktat.

### Analisis konsentrasi gula reduksi

Analisis konsentrasi gula reduksi dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi. Konsentrasi gula reduksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Gula reduksi diukur sebelum dan sesudah inokulasi *starter*. Cara penentuan konsentrasi gula reduksi dilakukan menurut metode Sudarmadji et al. (1984).

### Pengukuran nilai pH

Sensor pada pH-meter dibilas dengan akuades kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. pH-meter dikalibrasi dengan menggunakan larutan penyangga (buffer) I (pH=4), kemudian larutan *buffer* II (pH=6,99). Setelah itu, sensor pada pH-meter dibilas kembali dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas tisu. Sampel diukur pH-nya, kemudian sensor pH-meter dibersihkan kembali dengan akuades dan dibiarkan terendam dalam akuades. Pengukuran nilai pH dilakukan pada saat sebelum dan sesudah dilakukan inokulasi *starter* (Hadiwiyoto 1994).

### Uji organoleptik menurut metode hedonik

Uji organoleptik dilakukan dengan berdasarkan tiga penilaian yaitu keasaman, rasa, dan bau. Pengujian dilakukan terhadap 25 panelis. Skala penilaian yang digunakan dalam uji organoleptik ini antara 1-7, yaitu: 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = biasa, 5 = agak suka, 6 = suka, 7 = sangat suka (Kartika et al. 1998).

### Analisis data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, data yang diperoleh dianalisis dengan Analisis Varians (ANOVA). Untuk mengetahui beda nyata antar perlakuan akibat pengaruh perlakuan dilakukan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf signifikansi 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tentang pembuatan minuman probiotik dengan bahan baku nira tebu dilakukan sebagai upaya penganeekaragaman produk olahan tebu. Produk yang dihasilkan diharapkan mampu memenuhi kriteria minuman probiotik yang baik. Dalam penelitian ini, parameter yang diukur meliputi jumlah sel bakteri viabel, total asam, kadar gula reduksi, nilai pH, dan uji organoleptik.

### Jumlah sel bakteri viabel

Berdasarkan kriteria, minuman probiotik harus mengandung paling sedikit  $10^8$  bakteri asam laktat per mL (Kuswardhani dan Nugrahani 1998). Dalam pembuatan minuman probiotik dilakukan penghitungan jumlah sel bakteri viabel pada *starter* siap pakai terlebih dahulu. Hasil penghitungan jumlah sel bakteri pada *starter* siap pakai untuk *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* berturut-turut adalah  $2,46 \times 10^9$  bakteri/mL,  $2,24 \times 10^9$  bakteri/mL, dan  $2,10 \times 10^9$  bakteri/mL, sehingga jumlah *L. casei* dalam media fermentasi pada awal fermentasi dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah  $2,46 \times 10^7$  bakteri/mL,  $4,92 \times 10^7$  bakteri/mL, dan  $7,38 \times 10^7$  bakteri/mL. Jumlah *L. acidophilus* dengan konsentarsi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah  $2,24 \times 10^7$  bakteri/mL,  $4,48 \times 10^7$  bakteri/mL, dan  $6,72 \times 10^7$  bakteri/mL, sedangkan jumlah *L. plantarum* dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 3% berturut-turut adalah  $2,10 \times 10^7$  bakteri/mL,  $4,20 \times 10^7$  bakteri/mL, dan  $6,30 \times 10^7$  bakteri/mL. Setelah fermentasi selama 96 jam, terjadi peningkatan jumlah sel bakteri viabel dari masing-masing jenis bakteri. Peningkatan tersebut dikarenakan media fermentasi yang digunakan mengandung nutrisi yang sesuai, sehingga bakteri mampu tumbuh secara optimum.

Hasil Analisis Varians menunjukkan bahwa jenis dan konsentrasi inokulum memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel bakteri viabel. Demikian juga dengan kombinasi kedua jenis perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, memberikan perbedaan yang nyata terhadap jumlah sel bakteri viabel, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa jumlah sel bakteri viabel rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan jumlah sel bakteri viable yang dihasilkan oleh perbedaan konsentrasi inokulum yaitu 1%, 2%, dan 3%. Jumlah bakteri terendah adalah  $2,19 \times 10^9$  bakteri/mL dengan inokulum *L. plantarum* pada konsentrasi 1%, sedangkan jumlah bakteri tertinggi dicapai oleh *L. casei* dan *L. acidophilus* pada konsentrasi 2% yaitu berturut-turut

sebesar  $3,76 \times 10^9$  bakteri/mL dan  $3,69 \times 10^9$  bakteri/mL, seperti terlihat pada Tabel 1. Jumlah ini masih memenuhi standar jumlah sel bakteri viabel pada minuman probiotik yaitu minimal  $10^8$  bakteri/mL. Hal ini menunjukkan bahwa jenis inokulum yaitu *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* dengan konsentrasi inokulum sebesar 1% sudah dapat dipakai dalam pembuatan minuman probiotik jika dilihat dari jumlah bakteri.

Jumlah sel bakteri viabel tertinggi untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Jumlah sel bakteri viabel pada konsentrasi 2% mencapai maksimum, sehingga jumlah sel bakteri viabel pada konsentrasi 3% mengalami penurunan. Hal ini diduga disebabkan adanya persaingan antar bakteri dalam mendapatkan nutrisi untuk pertumbuhannya, serta dipengaruhi oleh banyaknya asam yang terbentuk selama fermentasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada akhir fermentasi, jumlah sel bakteri viabel mampu mencapai  $10^9$ , sesuai dengan standar minuman probiotik, yaitu minimal  $10^8$  bakteri/mL. Menurut Ray (1996), jumlah sel bakteri probiotik yang tinggi ( $10^6$ - $10^7$  bakteri/mL atau lebih) dalam saluran pencernaan manusia memungkinkan bakteri asam laktat mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen.

#### Total asam

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan total asam yang disebabkan oleh perbedaan jenis dan konsentrasi inokulum pada minuman probiotik setelah fermentasi selama 96 jam. Berdasarkan hasil Analisis Varians, variasi jenis inokulum, yaitu *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, memberikan perbedaan yang nyata terhadap total asam yang dihasilkan. Variasi konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%, juga memberikan perbedaan yang nyata terhadap total asam minuman probiotik. Untuk kombinasi perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, juga memberikan perbedaan yang nyata. Hal ini dapat dilihat dari tingkat signifikansi yang kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa total asam rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan total asam rata-rata yang dihasilkan antara konsentrasi inokulum 1%, 2%, dan 3%, seperti yang terlihat pada Tabel 2. Menurut Fardiaz et al. (1996), hal ini disebabkan oleh kemampuan bakteri dalam memecah gula menjadi asam laktat untuk masing-masing jenis *Lactobacillus* berbeda-beda.

Total asam terbesar yang dihasilkan terdapat pada hasil fermentasi dengan inokulum *L. casei* pada konsentrasi 2% yaitu sebesar 1,035%, sedangkan total asam terkecil terdapat pada hasil fermentasi dengan inokulum *L. casei* dan *L. plantarum* pada konsentrasi 1% yaitu masing-masing sebesar 0,819% dan 0,801%. Nilai total asam yang dihasilkan oleh *L. casei* dan *L. plantarum* dengan konsentrasi 1% belum memenuhi standar total asam minuman probiotik yang baik, yaitu minimal 0,85%. Hal ini menunjukkan bahwa kemampuan *L. acidophilus* dalam memecah gula yang ada dalam media yang digunakan lebih baik dibandingkan dengan *L. casei* dan *L. plantarum*.

Total asam terbesar untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Hal ini sesuai dengan jumlah sel bakteri viabel yang mencapai jumlah terbanyak pada konsentrasi 2%. Jumlah sel bakteri viabel yang tinggi mempunyai kemampuan yang tinggi juga dalam memetabolisme gula dari media fermentasi untuk mendapatkan energi dan menghasilkan asam. Hal ini disebabkan jumlah enzim yang dihasilkan oleh bakteri juga semakin meningkat.

Total asam dinyatakan sebagai persentase asam laktat karena ketiga inokulum merupakan golongan bakteri asam laktat homofermentatif yang menghasilkan asam laktat sebagai produk utama fermentasi. Menurut Meade and Spencer (1963), media fermentasi dari nira tebu mengandung gula berupa sukrosa, glukosa, dan fruktosa yang dapat digunakan oleh *Lactobacillus* sebagai sumber energi dan menghasilkan asam. Penambahan susu skim merupakan sumber laktosa dalam media fermentasi. Laktosa merupakan disakarida yang terdiri dari glukosa dan galaktosa yang dapat dijadikan sebagai sumber energi dan menghasilkan asam laktat oleh masing-masing jenis inokulum. Gilliland (1985) menyebutkan bahwa laktosa dapat dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa oleh  $\beta$ -D galaktosidase. Pada proses selanjutnya, metabolisme melalui proses glikolisis, glukosa diubah menjadi asam piruvat yang selanjutnya menjadi asam laktat oleh aktivitas enzim laktat dehidrogenase, sedangkan galaktosa harus diubah terlebih dahulu menjadi glukosa sebelum memasuki jalur glikolisis, sehingga prosesnya menjadi lebih panjang.

#### Nilai pH

Hasil pengukuran pH menunjukkan terjadinya penurunan pH pada minuman probiotik setelah terjadi fermentasi selama 96 jam, dibandingkan dengan pH awal sebelum fermentasi yaitu sebesar 6,35. Berdasarkan hasil Analisis Varians, nilai pH masing-masing jenis dan konsentrasi inokulum menunjukkan perbedaan yang nyata, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05. Demikian juga untuk kombinasi perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap nilai pH minuman probiotik, dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05.

Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa nilai pH rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga nilai pH rata-rata yang dihasilkan antara konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%, seperti yang terlihat pada Tabel 3. Nilai pH masing-masing perlakuan seluruhnya memenuhi standar minuman probiotik yaitu maksimal 4,5. Nilai pH yang rendah dalam minuman probiotik sangat diharapkan agar mikroba patogen tidak dapat tumbuh.

Nilai pH terendah untuk masing-masing inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Perbedaan nilai pH sebelum fermentasi dan sesudah fermentasi terjadi akibat aktivitas bakteri asam laktat sehingga menghasilkan asam. Hal ini menyebabkan penurunan nilai pH pada media fermentasi setelah fermentasi selama 96 jam. Purwandhani dan Suladra (2003) menyebutkan bahwa bakteri asam laktat menghasilkan metabolit berupa asam sebagai akibat metabolisme glukosa selama proses fermentasi. Asam yang

dihasilkan semakin meningkat yang ditandai dengan penurunan nilai pH atau peningkatan keasaman.

Menurut Lehninger (1997), besar kecilnya nilai pH dipengaruhi oleh konsentrasi ion  $H^+$ . Asam laktat ( $CH_3CHOHCOOH$ ) yang dihasilkan selama proses fermentasi merupakan asam yang mudah terdisosiasi menjadi ion  $H^+$  dan ion  $CH_3CHOHCOO^-$ . Wibowo (1989) menyebutkan bahwa konsentrasi ion  $H^+$  yang tinggi akan menurunkan nilai pH, sehingga minuman probiotik setelah fermentasi menjadi asam.

### Gula reduksi

Kadar gula reduksi dalam pembuatan minuman probiotik dari nira tebu diukur dengan menggunakan metode Nelson-Somagi. Dalam metode ini, gula reduksi ditandai dengan adanya gugus pereduksi C=O. Gugus ini mereduksi ion kupri ( $Cu^{2+}$ ) di dalam larutan Fehling menjadi cuprooksida ( $Cu_2O$ ) sehingga diidentifikasi sebagai gula pereduksi (Lehninger 1997). Gula reduksi dalam penelitian ini diukur sebelum dan sesudah fermentasi untuk mengetahui kandungan gula reduksi yang tersisa pada minuman probiotik.

Hasil Analisis Varians menunjukkan bahwa kadar gula reduksi masing-masing jenis dan konsentrasi inokulum menunjukkan perbedaan yang nyata dengan tingkat signifikansi kurang dari 0,05. Demikian juga dengan kombinasi kedua macam perlakuan, yaitu jenis dan konsentrasi inokulum, menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kadar gula reduksi minuman probiotik dari nira tebu. Hal ini dapat dilihat pada tingkat signifikansi yang kurang dari 0,05.

**Tabel 1.** Jumlah sel bakteri viabel ( $\times 10^9$  bakteri/mL) minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	2,77 <sup>c</sup>	3,76 <sup>g</sup>	3,08 <sup>e</sup>	3,20 Z
<i>L. acidophilus</i>	2,55 <sup>b</sup>	3,69 <sup>g</sup>	2,93 <sup>d</sup>	3,06 Y
<i>L. plantarum</i>	2,19 <sup>a</sup>	3,40 <sup>f</sup>	2,81 <sup>c</sup>	2,80 X
Rata-rata	2,51 A	3,62 C	2,94 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

**Tabel 5.** Uji organoleptik warna, rasa, dan bau minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Warna		Rasa		Bau	
Minuman probiotik	Nilai kesukaan	Minuman probiotik	Nilai kesukaan	Minuman probiotik	Nilai kesukaan
<i>L. plantarum</i> 2%	5,12	<i>L. plantarum</i> 2%	3,52	<i>L. plantarum</i> 2%	4,60
<i>L. plantarum</i> 3%	4,86	<i>L. casei</i> 1%	3,16	<i>L. plantarum</i> 1%	4,40
<i>L. plantarum</i> 1%	4,84	<i>L. plantarum</i> 3%	3,12	<i>L. plantarum</i> 3%	3,96
<i>L. acidophilus</i> 1%	3,60	<i>L. plantarum</i> 1%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 1%	2,92
<i>L. acidophilus</i> 2%	3,56	<i>L. casei</i> 3%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 3%	2,76
<i>L. acidophilus</i> 3%	3,20	<i>L. casei</i> 2%	3,04	<i>L. acidophilus</i> 2%	2,60
<i>L. casei</i> 3%	3,20	<i>L. acidophilus</i> 3%	2,52	<i>L. casei</i> 1%	2,44
<i>L. casei</i> 2%	3,12	<i>L. acidophilus</i> 2%	2,44	<i>L. casei</i> 2%	2,44
<i>L. casei</i> 1%	2,76	<i>L. acidophilus</i> 1%	2,40	<i>L. casei</i> 3%	1,88

Keterangan: 1 = Sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = biasa, 5 = agak suka, 6 = suka, 7 = sangat suka

**Tabel 2.** Total asam (%) minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	0,819 <sup>a</sup>	1,035 <sup>e</sup>	0,954 <sup>c</sup>	0,936 Y
<i>L. acidophilus</i>	0,900 <sup>b</sup>	1,002 <sup>d</sup>	0,972 <sup>c</sup>	0,958 Z
<i>L. plantarum</i>	0,801 <sup>a</sup>	0,945 <sup>e</sup>	0,894 <sup>b</sup>	0,880 X
Rata-rata	0,840 A	0,994 C	0,940 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

**Tabel 3.** Nilai pH minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	4,10 <sup>g</sup>	3,49 <sup>a</sup>	3,66 <sup>c</sup>	3,75 Y
<i>L. acidophilus</i>	3,78 <sup>e</sup>	3,63 <sup>b</sup>	3,70 <sup>d</sup>	3,71 X
<i>L. plantarum</i>	4,11 <sup>g</sup>	3,80 <sup>e</sup>	3,94 <sup>f</sup>	3,95 Z
Rata-rata	4,00 C	3,64 A	3,77 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

**Tabel 4.** Kadar gula reduksi minuman probiotik dari nira tebu setelah fermentasi selama 96 jam dengan inokulum *L. casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*.

Jenis bakteri	Konsentrasi inokulum (%)			Rata-rata
	1	2	3	
<i>L. casei</i>	0,4960 <sup>f</sup>	0,3065 <sup>a</sup>	0,4292 <sup>c</sup>	0,4106 X
<i>L. acidophilus</i>	0,5092 <sup>g</sup>	0,3712 <sup>b</sup>	0,3967 <sup>cd</sup>	0,4257 Y
<i>L. plantarum</i>	0,5322 <sup>h</sup>	0,3924 <sup>c</sup>	0,4040 <sup>d</sup>	0,4429 Z
Rata-rata	0,5125 C	0,3567 A	0,4101 B	

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT dengan taraf signifikansi 5%.

Hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan kadar gula reduksi yang disebabkan adanya perbedaan jenis dan konsentrasi inokulum setelah fermentasi selama 96 jam, seperti yang terlihat pada Tabel 4. Hasil uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa kadar gula reduksi rata-rata yang dihasilkan berbeda nyata antara *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum*, demikian juga dengan kadar gula reduksi rata-rata yang dihasilkan antar konsentrasi inokulum, yaitu 1%, 2%, dan 3%.

Kadar gula reduksi terendah untuk masing-masing jenis inokulum diperoleh pada konsentrasi 2%. Hasil yang diperoleh dari pengukuran gula reduksi dengan menggunakan standar glukosa murni memperlihatkan bahwa setelah fermentasi selama 96 jam terjadi penurunan. Kadar gula reduksi awal sebelum fermentasi sebesar 0,6825%. Semakin tinggi jumlah sel bakteri viabel dalam minuman probiotik maka gula reduksi yang dikonsumsi oleh bakteri juga semakin banyak, sehingga kadar gula reduksi semakin menurun dan asam yang dihasilkan semakin meningkat. Perbedaan kadar gula reduksi pada akhir fermentasi untuk masing-masing jenis inokulum disebabkan oleh perbedaan kemampuan dalam memecah gula menjadi asam laktat. Hal ini sesuai dengan jumlah total asam yang terbentuk bahwa semakin sedikit gula reduksi yang tersisa maka total asam yang dihasilkan semakin banyak. Kadar gula reduksi yang lebih rendah pada akhir fermentasi menunjukkan bahwa proses fermentasi lebih optimum dibandingkan dengan kadar gula reduksi yang lebih tinggi.

Gula yang terdapat dalam media fermentasi merupakan sumber nutrisi bagi pertumbuhan bakteri dan dipakai untuk diubah menjadi asam laktat. Nira tebu mengandung gula reduksi berupa glukosa dan fruktosa yang dapat digunakan sebagai sumber energi dan nutrisi. Penambahan susu skim ke dalam media fermentasi merupakan sumber laktosa yang dapat dihidrolisis menjadi glukosa dan galaktosa oleh  $\beta$ -D-galaktosidase.

#### Uji organoleptik

Uji organoleptik yang dipakai dalam penelitian ini merupakan uji kesukaan. Pada dasarnya, uji kesukaan merupakan pengujian pada panelis untuk mengemukakan respons berupa tingkat kesukaan terhadap sifat bahan yang diuji. Pada pengujian ini digunakan panelis yang belum terlatih tanpa membandingkan bahan uji dengan sampel standar (Kartika et al. 1998). Parameter yang diuji pada penelitian ini meliputi warna, rasa, dan bau dari minuman probiotik. Uji kesukaan dilakukan terhadap 25 orang panelis (Tabel 5).

Panelis disajikan sampel satu per satu kemudian panelis diminta menilai sampel tersebut berdasarkan tingkat kesukaan menurut skala nilai yang telah disediakan. Skala tingkat kesukaan yang disediakan berkisar dari nilai 1-7 yaitu: (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) agak tidak suka, (4) biasa, (5) agak suka, (6) suka, dan (7) sangat suka.

Minuman probiotik berwarna putih kekeklatan. Warna minuman probiotik yang terlalu pucat tidak disukai oleh panelis. Aroma pada minuman probiotik disebabkan oleh

adanya komponen pemberi aroma (*flavor*), seperti asetaldehid dan aseton, yang diproduksi oleh bakteri asam laktat dengan memfermentasikan komponen-komponen karbohidrat di dalam medium. Aroma yang terlalu asam tidak disukai oleh panelis. Hasil pemeringkatan secara keseluruhan menunjukkan bahwa minuman probiotik dari nira tebu dengan inokulum *L. plantarum* paling disukai oleh panelis, sedangkan yang paling tidak disukai oleh panelis adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. casei* untuk parameter warna dan bau. Namun untuk tingkat kesukaan terhadap rasa (keasaman), sampel yang paling tidak disukai adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. acidophilus*. Minuman probiotik dari nira tebu yang paling disukai adalah minuman probiotik dengan inokulum *L. plantarum* pada konsentrasi 2% dengan penilaian terhadap warna, rasa, dan bau masing-masing sebesar 5,12; 3,52; dan 4,6. Minuman probiotik ini mempunyai jumlah sel bakteri viabel sebesar  $3,40 \times 10^9$  bakteri/mL, total asam sebesar 0,945%, nilai pH sebesar 3,8, dan kadar gula reduksi sebesar 0,3924% dengan warna kekeklatan, serta rasa dan bau yang tidak terlalu asam. Kurangnya tingkat kesukaan panelis terhadap produk minuman probiotik dari nira tebu disebabkan tidak terbiasanya panelis mengkonsumsi susu asam. Produk-produk susu asam memang kurang disukai oleh konsumen karena rasanya yang kurang enak. Selain itu, hal ini juga disebabkan oleh rasa yang kurang manis akibat pengenceran nira tebu pada awal pembuatan minuman probiotik.

#### KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, dan *L. plantarum* dapat digunakan sebagai inokulum dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik. Konsentrasi inokulum antara 1-3% dapat digunakan dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik, kecuali total asam pada konsentrasi 1% dengan inokulum *L. casei* dan *L. plantarum*. Kombinasi antara jenis dan konsentrasi inokulum pada semua perlakuan dapat digunakan dalam fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik yang memenuhi standar minuman probiotik, kecuali pada *L. casei* 1% dan *L. plantarum* 1%.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bruno FA, Lankaputhra WEV, Shah NP. 2002. Growth, viability, and activity of *Bifidobacterium* spp. in skim milk containing prebiotics. *J Food Sci* 67: 2740-2744.
- Fardiaz S, Nuraini ED, Kusumaningrum H. 1996. Pemanfaatan air kelapa untuk produksi minuman sehat anti-diare melalui proses fermentasi laktat. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan* 7 (2): 47-53.
- Gardiner G, Stanton C, PB Lynch, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1999. Evaluation of cheddar cheese as a food carrier for delivery of a probiotic strain to the gastrointestinal tract. *J Dairy Sci* 82: 1379-1387.
- Gilliland SE. 1985. *Bacterial Starter Culture of Foods*. CRC Press Inc. USA.

- Hadiwiyoto S. 1994. Teori dan Prosedur: Pengujian Mutu Susu dan Hasil Olahannya. Edisi Kedua. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Havenaar R, Veld JHJH. 1992. Probiotic: A general view. In: Wood BJB (ed). The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Chapman and Hall, London.
- Kartika B, Hastuti P, Wahyu S. 1998. Pedoman Uji Inderawi Bahan Makanan. PAU Pangan dan Gizi, Yogyakarta.
- Kuswardani I, Nugrahani I. 1998. Minuman probiotik dari nira siwalan (*Borassus sundaicus*): Kajian penambahan susu skim. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Pangan dan Gizi.
- Lehninger A. 1997. Dasar-dasar Biokimia Jilid I. Diterjemahkan oleh: M. Thenawidjaja. Erlangga, Jakarta.
- Meade GP, Spencer EF. 1963. Cane Sugar Handbook. New York: John Willey and Sons, Inc.
- Purwandhani SN, Suladra M. 2003. Optimasi produksi biomassa bakteri asam laktat *Lactobacillus acidophilus* SNP 2 pada media air kelapa dengan berbagai konsentrasi ekstrak tauge. Prosiding Seminar Nasional PATPI.
- Purwandhani. 1998. Isolasi dan Seleksi *Lactobacillus* yang Berpotensi sebagai Agensia Probiotik. [Tesis]. Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Ray B. 1996. Fundamental Food Microbiology. CRC Press, Inc. Florida.
- Shortt C, Salminen S. 2001. Probiotic bacteria in human health: An overview. In: Ransley JK, Donnelly JK, Read NW (eds.). Food and Nutritional Supplements: Their Role in Health and Disease. Springer-Verlag, Berlin.
- Stanton C, Gardiner G, Lynch PB, Collins JK, Fitzgerald G, Ross RP. 1998. Probiotic cheese. Int Dairy J 8: 491-496.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 1984. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Penerbit Liberty, Yogyakarta.
- Supriyadi A. 1992. Rendemen Tebu: Liku-liku Permasalahannya. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Tilbury RH. 1975. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. In: Carr JG (ed). Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press, Inc., London.
- Wibowo D. 1989. Mikrobiologi Industri. PAU UGM, Yogyakarta.
- Winarno FG, Fardiaz S, Fardiaz D. 1980. Pengantar Teknologi Pangan. Penerbit Gramedia, Jakarta.

# Efek diuretik kopi susu pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan variasi jenis susu

## Diuretic effect of milk coffee on white rat (*Rattus norvegicus*) with variation of milk types

DINA ANGELIA BISTANI, SHANTI LISTYAWATI, AHMAD DWI SETYAWAN

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 18 Oktober 2006. Revisi disetujui: 4 Februari 2007.

**Abstract.** *Bistani DA, Listyawati S, Setyawan AD. 2007. Diuretic effect of milk coffee on white rat (*Rattus norvegicus*) with variation of milk types. Biofarmasi 5: 8-15.* Caffeine content in coffee is a mild diuretic which increase glomerule filtration and reduce natrium reabsorbtion in renal tubule. Some people mix milk into the coffee because they do not like the bitter taste from caffeine. Milk contains glucose which can cause osmotic diuretic and increase urine excretion. The aim of this research was to find out the diuretic effects of orally intakes of coffee-milk on white male rats (*Rattus norvegicus*) with a variation of milk kind. This research was done in Biology Sub Laboratory, Central Laboratory of MIPA UNS, Surakarta, Central Java. A Completely Randomized Design with five groups and four replications to each group was used in this study. The treatments applied for those groups were: (i) aquadest (group I), (ii) coffee solution (group II), (iii) coffee + sweetened condensed milk solution (group III), (iv) coffee + soymilk solution (group IV), and (v) coffee + skim milk solution (group V). The parameters used for the physical characteristics of urine were volume, colour, clearness, pH value and density. The parameters used for the chemical characteristics were the glucose analysis by Benedict test for qualitative and spectrophotometry for quantitative, and the analysis of NaCl content by Fantus method. The data were analyzed by using the analysis of variance (Anova) and continued with Duncan Multiple Range Test (DMRT) at a significance level of 5%. The results showed that a variation of milk kind was not effect on volume, colour, clearness, pH value, density, and glucose content after 4 hours of treatments, but effect on NaCl content after 4 hours of treatments.

**Keywords:** Coffee milk, diuretic, urine, variation of milk kinds

### PENDAHULUAN

Kafein secara medis dikenal sebagai trimetilsantin dan sangat berguna sebagai pemicu jantung, pemicu respirasi, dan senyawa diuresis (Erowid 2005). Bagi masyarakat umum, kafein digunakan sebagai sumber energi, meningkatkan kewaspadaan, dan memicu tubuh agar terjaga lebih lama, terutama bagi pilot, supir truk, petugas jaga, tim SAR, serta pelajar, termasuk mahasiswa yang ingin terjaga lebih lama di malam hari. Banyak juga orang merasa bahwa mereka tidak dapat bekerja di pagi hari tanpa minum secangkir kopi sebagai sumber kafein yang dapat membuat mereka lebih berkonsentrasi dalam beraktivitas.

Kafein umumnya dikonsumsi dalam bentuk teh, minuman ringan, dan terutama kopi. Ada berbagai macam cara penyajian kopi sebagai minuman yang dikenal masyarakat, diantaranya: (i) kopi tumbuk murni, (ii) kopi instan tanpa campuran, atau dikenal sebagai kopi *original* (kopi "O"), (iii) kopi "2 in 1" dengan penambahan gula, (iv) kopi "3 in 1" dengan penambahan gula dan susu, (v) *espresso*, dan (vi) kopi dengan krim. Jenis kopi yang paling banyak disukai adalah kopi "3 in 1", *espresso*, dan kopi dengan krim, karena rasanya tidak pahit seperti kopi tumbuk atau kopi instan *original*, serta lebih enak, sehingga anak-anak pun seringkali mau meminumnya.

Kafein dapat menimbulkan beberapa efek jangka pendek seperti peningkatan denyut jantung, peningkatan respirasi, kecepatan metabolisme basal, refleksi gastrointestinal, dan produksi asam lambung serta urine (Erowid 2005), sehingga setelah meminum kopi, seseorang cenderung lebih sering ingin buang air. Perubahan ini bervariasi bagi setiap orang dan bergantung pada sensitivitas individu terhadap obat, metabolisme, dan sering atau tidaknya mengonsumsi kafein. Lama efek kafein dipengaruhi oleh status hormonal seseorang, kebiasaan merokok, sedang menjalani pengobatan, atau memiliki penyakit yang merusak fungsi hati (Erowid 2005).

Menurut Mutschler (1991), kafein dalam kopi dapat menyebabkan diuretika lemah karena kafein dapat meningkatkan filtrasi glomerulus dan penurunan reabsorpsi natrium di tubulus ginjal. Meskipun efek diuresis kafein tidak cukup untuk digunakan sebagai terapi, pengaruhnya cukup mengganggu terutama bagi mereka yang karena tugasnya, kesempatan ke kamar kecil relatif terbatas, seperti pilot, petugas jaga, atau supir truk yang harus mengemudi jarak jauh.

Beberapa orang sengaja mencampurkan susu ke dalam kopi karena tidak menyukai rasa pahit yang ditimbulkan kafein. Jenis susu yang sering digunakan sebagai tambahan dalam pembuatan minuman kopi adalah susu kental manis, susu nabati atau susu kedelai, dan susu skim. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui

perbandingan pengaruh ketiga jenis susu tersebut terhadap efek diuretik yang disebabkan oleh kopi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek diuretik kopi susu pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan adanya variasi jenis susu.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juni-Juli 2006 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta.

### Alat dan bahan

#### Hewan percobaan

Dalam penelitian ini digunakan 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 175-250 gram yang diperoleh dari PAU UGM Yogyakarta.

#### Bahan diuretik

Kopi instan merek “Nescafe Classic”, susu kental manis cap “Bendera”, susu kedelai, dan susu skim merek “Tropicana Slim” yang diperoleh dari pasar swalayan “Hero” di Surakarta. Sebagai pelarut digunakan air biasa yang direbus terlebih dahulu.

#### Bahan untuk analisis fisika dan kimia urine

Bahan yang digunakan meliputi akuades, reagen Benedict, reagen Nelson, larutan arsenomolibdat, larutan glukosa standar, larutan kalium kromat 20%, dan larutan perak nitrat 2,9%.

#### Alat untuk pembuatan larutan percobaan

Alat-alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, gelas ukur, pipet ukur, *hotplate*, gelas beaker, dan batang pengaduk.

#### Alat perlakuan diuretik

Alat-alat yang digunakan adalah kandang perlakuan, gelas ukur, *canule*, dan timbangan.

#### Alat untuk analisis fisik dan kimia urine

Alat-alat yang diperlukan meliputi tabung reaksi, nampan, gelas ukur, kertas lakmus, mikropipet, pipet tetes, *hotplate*, gelas beaker, kuvet, dan spektrofotometer.

### Cara kerja

#### Rancangan percobaan

Dalam penelitian ini digunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 kelompok perlakuan dengan empat kali ulangan pada masing-masing perlakuan.

#### Persiapan hewan percobaan

Sebelum diberikan perlakuan, tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan diaklimatisasikan terlebih dahulu selama 14 hari dalam kandang perlakuan pada suhu ruang. Pada hari ke-8, tikus putih yang akan diberikan perlakuan

dengan susu diberi susu per oral sesuai jenis susu yang akan diberikan pada saat perlakuan, sedangkan tikus putih yang tidak mendapatkan perlakuan dengan susu, diberi akuades per oral.

#### Pembuatan larutan percobaan

Larutan kopi dibuat dengan dosis 0,06 g/200 g BB hasil konversi dari dosis 2 g/70 kg BB manusia, dan dilarutkan dalam air 0,42 ml/200 g BB hasil konversi dari 150 ml/70 kg untuk masing-masing perlakuan. Larutan susu kental manis dibuat dengan dosis 0,128 g/200 g BB hasil konversi dari 45 g/70 kg BB manusia, dan dilarutkan dalam air 0,42 ml/200 g BB. Larutan susu skim dibuat dengan dosis 0,071 g/200 g BB hasil konversi dari 25 g/70 kg BB, dan dilarutkan dalam air 0,42 ml/200 g BB. Susu kedelai sudah dalam bentuk larutan dan disediakan dengan dosis 0,58 ml/200 g BB hasil konversi dari 200 ml/70 kg BB manusia.

#### Perlakuan terhadap hewan percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus putih jantan sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 4 tikus. Hewan percobaan dipuasakan terlebih dahulu selama 18 jam sebelum perlakuan dengan tetap diberikan minum secara *ad libitum*, kemudian setiap kelompok diberikan perlakuan per oral dengan bantuan *canule* sebagai berikut: (i) Kelompok I: diberikan akuades 1 ml/200 g BB, (ii) Kelompok II : diberikan larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,58 ml, (iii) Kelompok III: diberikan larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + larutan susu kental manis 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,16 ml, (iv) Kelompok IV: diberikan larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + susu kedelai 0,58 ml/200 g BB, (v) Kelompok V: diberikan larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + larutan susu skim 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,16 ml

#### Pengumpulan sampel urine

Sampel urine dikumpulkan setiap 1 jam sekali hingga 4 kali pengambilan, yaitu pada jam ke-1, 2, 3, dan 4. Sampel urine kemudian ditampung dalam gelas ukur dan dianalisis sifat fisik dan kimianya.

### Analisis sifat fisik urine

#### Volume urine

Urine ditampung dengan nampan di bawah kandang, kemudian dipindahkan ke dalam gelas ukur untuk mengetahui volumenya.

#### Warna

Urine dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilihat dengan cahaya dalam sikap serong (Tahono 1999). Warna urine dinyatakan dengan: tidak berwarna, kuning muda, kuning, kuning tua, kuning bercampur merah, merah bercampur kuning, merah cokelat, kuning bercampur hijau, putih serupa putih susu, dan lain-lain (Gandasoebrata 1992).

#### Tingkat kejernihan

Tingkat kejernihan diukur dengan menguji warna urine dan dinyatakan dengan: jernih, agak keruh, atau sangat keruh (Gandasoebrata 1992).

### Nilai pH (derajat keasaman)

Penetapan pH urine dilakukan dengan menggunakan kertas lakmus.

### Berat jenis

Berat jenis urine diukur dengan membandingkan berat urine yang ditimbang dengan volume urine yang diukur karena sampel urine yang sedikit (Dawiesah 1989). Mula-mula gelas ukur kosong ditimbang dan dicatat beratnya. Urine yang telah diketahui volumenya dipipet ke dalam gelas ukur dan ditimbang kembali beratnya. Berat jenis urine diperoleh dengan membandingkan berat urine yang ditimbang dengan volume urine yang telah dimasukkan ke dalam gelas ukur.

### Analisis sifat kimia urine

Analisis sifat kimia urine yang dilakukan meliputi analisis glukosa dan analisis kandungan NaCl dalam urine yang dilakukan pada akhir percobaan.

### Analisis glukosa

Analisis glukosa dilakukan dengan dua uji, yaitu uji kualitatif dan uji kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya glukosa dalam urine. Pada penelitian ini, uji yang digunakan adalah uji Benedict. Reagen Benedict sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 8 tetes urine. Kemudian tabung reaksi dipanaskan dalam air mendidih di atas *hotplate* selama 5 menit. Reaksi dikatakan positif apabila terbentuk warna hijau, merah, oranye, atau merah bata dan endapan merah bata (Sudarmanto et al. 1992).

Sementara itu, uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui kadar glukosa dalam urine dengan menggunakan pengukuran kadar gula reduksi dengan spektrofotometer (metode Nelson-Somogyi) yang tercantum dalam Sudarmanto et al. (1992).

Sebelum kadar gula reduksi urine diukur, terlebih dahulu dilakukan pembuatan larutan glukosa standar. Pembuatan larutan glukosa standar dilakukan dengan melarutkan 10 mg glukosa anhidrat dalam 1 dl akuades, selanjutnya dilakukan pengenceran seperti yang disajikan pada Tabel 1, kemudian dibuat kurva standar glukosa dengan spektrofotometri.

Pengukuran kadar gula reduksi dalam urine dilakukan dengan memasukkan urine sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml reagen Nelson. Tabung reaksi berisi larutan dipanaskan dalam air mendidih di atas *hotplate* selama 20 menit, kemudian didinginkan dalam air hingga terbentuk endapan. Setelah tabung reaksi dingin ditambahkan 1 ml reagen arsenomolibdat kemudian larutan digojok hingga endapan hilang. Selanjutnya ditambahkan 7 ml akuades ke dalam larutan dan larutan kembali digojok sampai homogen. Selanjutnya, larutan dimasukkan ke dalam kuvet sampai terisi kurang lebih 2/3-nya lalu dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Setelah itu, daya absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kadar gula reduksi ditentukan berdasarkan daya absorbansi larutan dan kurva standar larutan glukosa (Sudarmanto et al. 1992).

**Tabel 1.** Pengenceran larutan glukosa standar.

Larutan	Volume pada Nomor Tabung ke-				
	1	2	3	4	5
Larutan standar (dl)	0,0000	0,0005	0,0010	0,0015	0,0020
Akuades (dl)	0,0100	0,0095	0,0090	0,0085	0,0080
Kadar gula (mg/dl)	0,0000	0,5000	1,0000	1,5000	2,0000

### Analisis kandungan NaCl

Penetapan jumlah natrium dan klorida dalam bentuk NaCl dilakukan dengan metode Fantus (Gandasoebrata 1992). Cara ini dilakukan melalui titrasi perak nitrat dengan ion kromat sebagai indikatornya. Sepuluh tetes urine dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet tetes, kemudian pipet yang dipakai tersebut dicuci beberapa kali dengan akuades. Satu tetes kalium kromat 20% ditambahkan ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet yang sama dan selanjutnya pipet tersebut dicuci kembali dengan akuades. Larutan perak nitrat 2,9% ditambahkan ke dalam tabung reaksi sambil terus-menerus dikocok sampai terbentuk warna merah yang tetap. Perhitungan kandungan NaCl (g/L) = jumlah tetes perak nitrat untuk titrasi.

### Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji Anova (*Analysis of Variance*) yang dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*) dengan taraf signifikansi 5% apabila hasil Anova berbeda nyata.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Analisis fisik urine

#### Volume urine

Salah satu parameter yang digunakan untuk mengetahui efek dari senyawa diuretik terhadap urine adalah volume urine. Senyawa diuretik dapat menyebabkan terjadinya proses diuresis, yang menurut Sunaryo (1995) antara lain dapat ditunjukkan melalui penambahan volume urine yang diproduksi. Hal ini dapat terjadi karena efek utama diuretik secara umum adalah mengurangi reabsorpsi air pada tubulus ginjal.

Rerata hasil pengukuran volume urine tikus putih setelah 4 jam pengamatan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2 dan hasil analisis sidik ragam menunjukkan tidak ada perbedaan pengaruh di antara kelompok perlakuan. Padahal secara teori, volume urine yang dihasilkan oleh kelompok perlakuan II seharusnya lebih tinggi daripada kontrol, karena kelompok perlakuan II diberi kopi yang mengandung  $\pm 2,9\%$  kafein.

Rendahnya volume urine pada kelompok perlakuan II diduga terjadi karena kafein yang diberikan pada tikus putih tidak meningkatkan laju filtrasi glomerulus dan/atau tidak menurunkan reabsorpsi natrium di dalam ginjal, sehingga tidak menimbulkan efek diuretik. Laju filtrasi glomerulus yang tidak meningkat menurut Wulangi (1993) dan Guyton (1997) dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu: 1) terjadi penurunan tekanan hidrostatik darah dalam pembuluh darah dan glomerulus, yang dapat terjadi akibat

perubahan tekanan darah sistemik, konstiksi pembuluh nadi aferen dan pembuluh nadi eferen; 2) terjadi peningkatan tekanan osmotik koloid plasma darah yang dapat terjadi saat tubuh mengalami dehidrasi dan hipoproteinuria; 3) terganggunya fungsi ginjal akibat adanya penyakit pada ginjal. Pada penelitian ini diduga terjadi peningkatan tekanan osmotik koloid plasma darah karena tikus putih hanya minum sedikit, sehingga tikus putih mengalami dehidrasi. Tikus putih sedikit minum karena mengalami stres akibat perlakuan, atau akibat tidak mendapatkan pakan. Selama pengamatan yang dilakukan saat proses aklimatisasi diketahui bahwa tikus putih biasa minum setelah makan dan jarang minum pada waktu yang lain. Tidak terjadinya penurunan reabsorpsi natrium di dalam ginjal dapat terjadi karena tubuh tikus putih masih membutuhkan reabsorpsi natrium secara maksimal, karena tikus putih menjalani puasa selama 18 jam sebelum perlakuan dan 4 jam setelah perlakuan, padahal sumber natrium bagi tikus putih berasal dari pakan yang dimakan. Tidak adanya perbedaan pengaruh yang nyata antar perlakuan, atau dapat dikatakan pengaruh dari masing-masing perlakuan terhadap volume urine tikus putih relatif sama, dapat terjadi karena jenis dan kadar diuretik yang digunakan, yaitu glukosa pada susu, tidak cukup kuat untuk menimbulkan diuresis pada tikus putih.

Glukosa merupakan salah satu senyawa diuretik osmotik yang dapat meningkatkan pengeluaran air melalui urine karena aktivitasnya dalam menghambat reabsorpsi air oleh tubulus ginjal. Menurut Wulangi (1993), apabila terdapat sejumlah zat terlarut, misalnya glukosa, di dalam lumen tubulus ginjal, air akan diretensi di dalamnya sebagai akibat pengaruh osmotik zat terlarut tersebut, akibatnya air yang diekskresi juga lebih banyak. Semakin banyak jumlah zat terlarut di dalam lumen tubulus ginjal, semakin banyak air yang diekskresikan.

Pada penelitian ini, glukosa dalam susu tidak menimbulkan perbedaan pengaruh yang nyata terhadap volume urine antar kelompok perlakuan meskipun hasil

analisis sidik ragam terhadap kandungan glukosa dalam larutan perlakuan, yaitu kopi, kopi dengan penambahan susu kental manis, kopi dengan penambahan susu kedelai, dan kopi dengan penambahan susu skim menunjukkan adanya perbedaan yang nyata. Hasil uji DMRT dengan taraf signifikansi 5% juga menunjukkan adanya perbedaan nyata antara masing-masing jenis larutan perlakuan (Tabel 3), tetapi larutan kopi dengan penambahan susu skim dan kopi dengan penambahan susu kedelai tidak berbeda nyata. Perbedaan sangat nyata tampak antara larutan kopi dan kopi dengan penambahan susu kental manis. Perbedaan nyata pada kadar glukosa antar tiap-tiap larutan perlakuan ini tidak menimbulkan perbedaan nyata pada volume urine dari tiap-tiap kelompok perlakuan, karena rerata kadar glukosa tertinggi pada larutan perlakuan kopi dengan penambahan susu kental manis sebesar 295,349 mg/dl, tidak cukup tinggi untuk menimbulkan diuretik osmotik. Pada kadar tersebut, glukosa yang masuk ke dalam tubuh tikus putih belum melebihi kapasitas tubulus ginjal, sehingga seluruhnya akan direabsorpsi menuju pembuluh darah sebelum menimbulkan pengaruh osmotik yang kuat pada tubulus ginjal.

Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa volume urine tikus putih 4 jam setelah perlakuan paling tinggi hanya sebesar 2,6 ml, padahal menurut Haim et al. (1987), volume urine tikus putih berkisar antara 3,3-4,2 ml/100 g BB atau sekitar 6,6-8,4 ml/200 g BB. Volume urine yang rendah ini dapat terjadi karena penelitian dilakukan pada musim kemarau dan jarang turun hujan, sehingga penguapan pada tubuh tikus putih banyak terjadi dan untuk mengurangi kehilangan terlalu banyak cairan tubuh, tikus putih hanya mengeluarkan sedikit urine. Selain itu, volume urine yang sedikit dapat juga disebabkan oleh adanya sekresi hormon antidiuretik (*Antidiuretic Hormone/ADH*) yang dioptimalkan untuk mencegah diuresis dan meminimalkan kehilangan air saat jumlah air yang masuk dalam tubuh sedikit.

**Tabel 2.** Rerata hasil pengukuran beberapa parameter urine tikus putih (*Rattus norvegicus*) 4 jam setelah perlakuan.

Parameter	Kelompok				
	I	II	III	IV	V
Volume urin (ml)	1,725	1,350	1,475	2,130	1,600
Nilai pH urin	8,37	8,12	8,25	8,13	8,25
Berat jenis urin (g/ml)	0,908	1,001	0,912	0,935	0,867
Kadar glukosa urine (mg/dl)	25,655	33,966	28,191	28,350	30,878
Kadar NaCl urin (g/L)	4,0 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a,b</sup>	4,2 <sup>a</sup>	2,6 <sup>a,b</sup>	6,0 <sup>b</sup>

Keterangan: I = diberi akuades 1 ml/200 g BB, II = diberi larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,58 ml, III = diberi larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + larutan susu kental manis 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,16 ml, IV = diberi larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + larutan susu kedelai 0,58 ml/200 g BB, V = diberi larutan kopi 0,42 ml/200 g BB + larutan susu skim 0,42 ml/200 g BB + akuades 0,16 ml.

**Tabel 3.** Rerata kadar glukosa (mg/dl) dalam larutan perlakuan

Kelompok	A	B	C	D
Kadar glukosa (mg/dl)	139,278 <sup>a</sup>	295,349 <sup>b</sup>	197,878 <sup>c</sup>	227,359 <sup>c</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada satu kolom tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%. A. Larutan kopi 0,6 g/200 g BB, B. Kopi 0,6 g/200 g BB + susu kental manis 0,128 g/200 g BB, C. Kopi 0,6 g/200 g BB + susu kedelai 0,58 ml/200 g BB, D. Kopi 0,6 g/200 g BB + susu skim 0,071 g/200 g BB

Menurut Ganong (1998), ADH dapat meningkatkan reabsorpsi air dari tubulus koligentes dan sedikit meningkatkan reabsorpsi dalam bagian akhir tubulus distal, sehingga volume urine menurun. Hormon ini dikendalikan oleh mekanisme umpan balik dan sering dirangsang oleh peningkatan tekanan osmotik plasma dan dihambat oleh penurunan tekanan osmotik plasma. Aktivitas minum menimbulkan penurunan yang rendah dalam sekresi ADH sebelum air diabsorpsi, tetapi sebagian besar penghambatan disebabkan oleh penurunan dalam osmolalitas plasma setelah air diabsorpsi. Oleh karena itu, saat tikus putih hanya minum sedikit air, aktivitas sekresi ADH tidak terhambat karena tidak terjadi penurunan tekanan osmotik plasma, sehingga fungsinya dalam menghambat ekskresi air dapat berlangsung optimal. Glukosa dalam larutan perlakuan yang diberikan juga tidak menurunkan tekanan osmotik plasma sehingga tidak menghambat sekresi ADH.

#### Warna urine

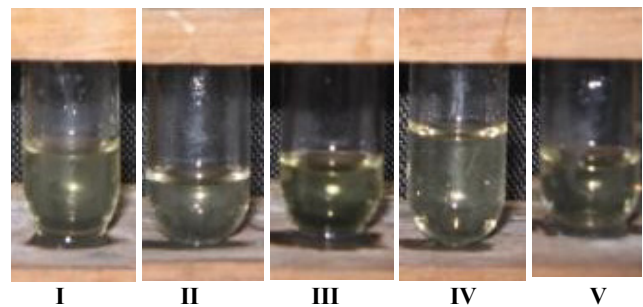
Warna urine normal berkisar antara kuning tua hingga kuning muda yang disebabkan oleh adanya zat warna, terutama urokrom dan urobilin. Warna urine juga disebabkan oleh pigmen yang terlarut di dalamnya dan dapat ditimbulkan oleh partikel-partikel pemberi warna (kromogen) yang berubah menjadi bahan-bahan berwarna setelah terjadi oksidasi, antara lain dengan pengaruh cahaya dan udara (Dawiesah 1989).

Perubahan warna urine berhubungan dengan volume urine dan efek penurunan berat jenis urine. Menurut Gandasoebarta (1992), semakin besar volume urine maka semakin rendah berat jenisnya dan semakin terang/muda warnanya. Hal ini terjadi karena semakin besar volume urine maka semakin besar pengenceran yang terjadi terhadap urine yang diekskresikan.

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa warna urine tikus putih setelah perlakuan cenderung normal dengan warna kuning. Warna urine yang tidak berbeda nyata antar perlakuan menunjukkan tidak adanya perbedaan yang nyata pada masing-masing perlakuan terhadap warna urine dan diuresis, karena diuresis dapat juga ditunjukkan oleh semakin terang/mudanya warna urine. Hal ini disebabkan kandungan zat terlarut dalam urine setelah perlakuan tidak cukup untuk menimbulkan perubahan warna yang berarti pada urine tikus putih dan bahan diuretik yang diberikan pada tikus putih ternyata mampu difiltrasi dan direabsorpsi oleh tubulus ginjal, sehingga tidak diekskresikan bersama urine.

#### Tingkat kejernihan

Seperti halnya warna urine, tingkat kejernihan urine berhubungan dengan diuresis, volume urine, berat jenis urine, dan kadar zat terlarut dalam urine. Semakin besar diuresis maka semakin besar volume urine, semakin rendah berat jenis urine, semakin rendah kadar zat terlarut dalam urine, dan semakin jernih urine. Menurut Dawiesah (1989), urine normal segar terlihat jernih dan tembus terang penuh.



**Gambar 1.** Warna dan tingkat kejernihan urine tikus putih setelah 4 jam perlakuan. I = Kelompok perlakuan I (kontrol), II = kelompok perlakuan II (kopi), III = kelompok perlakuan III (kopi + susu kental manis), IV = kelompok perlakuan IV (kopi + susu kedelai), dan V = kelompok perlakuan V (kopi + susu skim).

Berdasarkan hasil pengamatan pada **Gambar 1** dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan nyata antar perlakuan terhadap tingkat kejernihan urine. Urine yang dihasilkan pada setiap kelompok perlakuan berwarna jernih normal yang menunjukkan tidak ada perubahan pada tingkat kejernihan urine setelah diberikan perlakuan, sehingga dapat disimpulkan bahwa berdasarkan tingkat kejernihan urine dari masing-masing perlakuan tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap diuresis.

#### Nilai pH urine

Derajat keasaman (pH) menyatakan konsentrasi ion hidrogen ( $H^+$ ) yang sebenarnya berhubungan dengan pengaturan keseimbangan asam dan basa di dalam cairan tubuh. Guyton (1997) mengemukakan bahwa pengaturan keseimbangan asam-basa berhubungan dengan pengaturan konsentrasi ion  $H^+$  di dalam cairan tubuh. Ginjal akan mengatur konsentrasi ion  $H^+$  terutama dengan meningkatkan atau menurunkan konsentrasi ion  $HCO_3^-$  di dalam filtrat glomerulus. Sel epitel pada tubulus proksimalis, tubulus distalis, dan tubulus koligentes mensekresikan ion  $H^+$  ke dalam cairan tubulus. Proses sekresi ion  $H^+$  dimulai dengan karbon dioksida ( $CO_2$ ) di dalam sel epitel tubulus dan  $CO_2$  di bawah pengaruh enzim karbonat anhidrase akan bergabung dengan air ( $H_2O$ ) membentuk asam karbonat ( $H_2CO_3$ ) yang kemudian berdisosiasi menjadi ion  $HCO_3^-$  dan ion  $H^+$ . Ion  $H^+$  ini kemudian disekresikan melalui transport aktif menuju ke dalam lumen tubulus ginjal.

Reaksi kimia untuk sekresi ion  $H^+$  harus dimulai dengan  $CO_2$ , sehingga semakin besar konsentrasi  $CO_2$  di dalam plasma maka semakin cepat proses tersebut berlangsung dan semakin besar kecepatan sekresi ion  $H^+$ . Hal ini berhubungan dengan kemampuan ginjal sebagai sistem pengatur asam-basa yang paling kuat dan hanya memerlukan waktu beberapa jam untuk menyesuaikan kembali konsentrasi ion  $H^+$ . Apabila konsentrasi  $H^+$  berubah dari normal maka ginjal akan mengekskresikan urin yang bersifat asam/basa, dengan demikian juga dapat membantu menyesuaikan konsentrasi ion  $H^+$  dalam cairan tubuh kembali normal (Guyton 1997).

Rerata hasil pengukuran pH urin tikus putih pada 4 jam waktu pengamatan yang diperlihatkan pada Tabel 2 dan hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa semua perlakuan memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata terhadap perubahan pH urin tikus putih selama waktu pengamatan. Berdasarkan hasil pengukuran pH urin tikus putih setelah pemberian perlakuan ternyata relatif normal, yaitu berkisar antara 8,0-9,0. Menurut Gandasoebrota (1992), batas-batas normal pH urin berkisar antara 4,6-8,5, tetapi urin normal umumnya bersifat asam dengan pH sekitar 6. Nilai pH urin hasil pengukuran yang cenderung basa dapat disebabkan urin menjadi bersifat lebih alkali setelah dibiarkan selama 4 jam karena urea berubah menjadi amonia dan kehilangan CO<sub>2</sub>.

#### *Berat jenis urin*

Pengukuran berat jenis urine sangatlah penting dilakukan dalam proses analisis urin, karena seperti yang dikatakan Dawiesah (1989) bahwa tanpa diketahui berat jenisnya maka sulit untuk menaksir jumlah bahan yang diekskresi serta untuk menyimpulkan besarnya kelainan dan taksiran jumlah bahan tersebut. Perubahan berat jenis urine lebih banyak berkaitan dengan perubahan volume urine yang terkait dengan aktivitas reabsorpsi air beserta zat terlarut di dalamnya pada tubulus ginjal.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan perbedaan yang tidak nyata di antara kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang nyata pada jenis dan jumlah bahan yang diekskresi bersama urine pada tiap-tiap kelompok perlakuan, yang berarti juga tidak ada perbedaan yang berarti pada aktivitas reabsorpsi tubulus ginjal pada masing-masing perlakuan. Berat jenis urine normal berkisar antara 1,003-1,030, tetapi sangat bergantung pada besar kecilnya diuresis. Berat jenis hasil pengukuran ternyata lebih rendah dari rata-rata yang menunjukkan bahwa tingkat kepekatan urine lebih rendah. Hal ini dapat terjadi, karena pada tikus putih zat-zat yang diberikan selama perlakuan sebagian besar direabsorpsi dalam tubulus ginjal dan sangat sedikit zat-zat yang ikut diekskresikan bersama urine, sehingga tidak banyak zat terlarut yang terkandung dalam urine. Selain itu, tikus putih tidak memperoleh pakan selama 18 jam sebelum perlakuan dan 4 jam sesudah perlakuan, sehingga kadar zat terlarut dalam urine yang biasa diperoleh melalui pakan juga lebih kecil.

#### **Analisis Kimia Urin**

##### *Kadar glukosa*

Zat-zat yang penting bagi tubuh dan secara aktif direabsorpsi antara lain protein, asam amino, glukosa, asam asetoasetat, dan vitamin. Glukosa dan asam asetoasetat merupakan sumber energi, sedangkan protein dan asam amino merupakan bahan pengganti sel yang sudah tua atau sel yang rusak. Pada umumnya, berbagai zat tersebut hampir seluruhnya diabsorpsi secara aktif di tubulus proksimal, sehingga tidak ada zat yang tampak di ansa Henle (Wulangi 1993).

Glukosa bersama manitol, urea, sukrosa, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NaCl hipertonik, dan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hipertonik

merupakan jenis-jenis senyawa diuretik yang umum karena dapat menimbulkan diuretik osmotik. Diuresis yang timbul karena diuretik osmotik merupakan akibat pengaruh osmosis zat terlarut yang ada di dalam lumen tubulus ginjal. Apabila terdapat sejumlah zat terlarut di dalam lumen tubulus ginjal, air akan diretensi di dalamnya sebagai pengaruh dari zat terlarut tersebut, akibatnya air yang diekskresi juga lebih banyak. Semakin banyak zat terlarut terdapat di dalam lumen tubulus ginjal maka semakin banyak jumlah air yang diekskresikan. Diuresis dapat ditimbulkan oleh terhambatnya reabsorpsi zat tertentu, misalnya glukosa (Wulangi 1993). Menurut Guyton (1997), adanya glukosa sebagai diuretik osmotik dapat meningkatkan pengeluaran air melalui urine karena aktivitasnya dalam menghambat reabsorpsi air oleh tubulus ginjal, tetapi zat-zat tersebut juga dapat terlarut dan diekskresikan bersama urine, sehingga keberadaan glukosa dalam urine juga dapat digunakan sebagai indikator terjadinya proses diuretik osmotik.

Berdasarkan hasil pengukuran kadar glukosa terhadap larutan perlakuan, yaitu kopi, kopi dengan penambahan susu kental manis, kopi dengan penambahan susu kedelai, dan kopi dengan penambahan susu skim dapat diketahui bahwa rata-rata kadar glukosa larutan kopi dengan penambahan susu kental manis lebih tinggi apabila dibandingkan dengan larutan perlakuan lainnya, dan rata-rata kadar glukosa larutan kopi yang tidak diberi tambahan susu lebih rendah dibandingkan larutan perlakuan lainnya. Namun, rerata hasil pengukuran kadar glukosa urine dari masing-masing perlakuan yang diperlihatkan pada **Tabel 2** dan hasil analisis sidik ragam menunjukkan tidak ada perbedaan nyata antara pengaruh dari masing-masing perlakuan terhadap kadar glukosa urine tikus putih jantan.

Perbedaan nyata pada kadar glukosa antar tiap-tiap larutan perlakuan ternyata tidak menimbulkan perbedaan nyata pada kadar glukosa urine dari tiap-tiap kelompok perlakuan, karena rerata kadar glukosa tertinggi yang tampak pada larutan perlakuan kopi dengan penambahan susu kental manis sebesar 295,349 mg/dl tidak cukup tinggi untuk menimbulkan diuretik osmotik. Pada kadar ini, glukosa yang masuk ke dalam tubuh tikus putih belum melebihi kapasitas tubulus ginjal, sehingga seluruhnya akan direabsorpsi menuju pembuluh darah untuk dijadikan sebagai sumber energi sebelum menimbulkan pengaruh osmotik yang kuat pada tubulus ginjal. Hal ini juga dapat diketahui berdasarkan hasil uji kualitatif dengan uji Benedict yang seluruhnya menunjukkan hasil negatif, karena kadar glukosa dalam urine yang diuji tidak dapat menyentuh sensitivitas reagen Benedict yang termasuk tinggi untuk uji kualitatif glukosa.

Meskipun uji kualitatif memberikan hasil negatif, uji kuantitatif tetap dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya kandungan glukosa dalam urine tikus setelah perlakuan, karena glukosa merupakan zat abnormal yang jarang ditemukan dalam urine. Hasil yang diperoleh menunjukkan pada tiap-tiap kelompok perlakuan ditemukan glukosa meskipun jumlahnya relatif kecil, dengan rerata kadar glukosa tertinggi sebesar 33,966 mg/dl pada kelompok perlakuan II yang diberi larutan kopi, dan terendah sebesar

25,655 mg/dl pada kelompok kontrol, tetapi selisih antar perlakuan tidak berbeda jauh.

Keberadaan glukosa di dalam urine meskipun tidak terjadi proses diuresis dapat disebabkan oleh terjadinya renal glukosuria yang menurut Murdani (1998) diasumsikan bahwa kadar glukosa darah normal, tetapi nilai ambang ren terhadap glukosa turun, sehingga meskipun kadar glukosa tidak meningkat, tetapi karena nilai ambang menurun maka terjadilah glukosuria. Hal ini dapat juga terjadi karena tikus mengalami ketegangan saat diberi perlakuan per oral dan glukosuria, dimana menurut Murdani (1998) hal ini dapat terjadi saat seseorang, atau dalam hal ini tikus putih, mengalami ketegangan, misalnya takut atau terkejut.

#### Kadar NaCl

Dari hasil penelitian Wulangi (1993), tubulus proksimal, ansa Henle, dan tubulus distal terlibat dalam proses reabsorpsi aktif. Pada umumnya, zat yang berperan penting untuk metabolisme, seperti protein, asam amino, glukosa, asam asetoasetat, dan vitamin, direabsorpsi di tubulus proksimal. Ion  $\text{Na}^+$  secara aktif direabsorpsi oleh tubulus proksimal. Transpor aktif ion  $\text{Na}^+$  terjadi dari tubulus proksimal menuju kapiler peritubuler. Transpor aktif ion  $\text{Na}^+$  hanya terjadi pada sel-sel di sisi tubulus yang berdekatan dengan kapiler peritubuler saja, sedangkan pada sisi tubulus yang berdekatan dengan lumen tubulus renalis terjadi difusi ion  $\text{Na}^+$  yang arahnya dari lumen ke sel-sel tubulus. Adanya perpindahan aktif ion  $\text{Na}^+$  dari sel-sel tubulus ke kapiler peritubuler menyebabkan menurunnya kadar ion  $\text{Na}^+$  di sel-sel tubulus renalis, sehingga difusi ion  $\text{Na}^+$  terjadi dari lumen tubulus renalis.

Ganong (1998) menyebutkan bahwa  $\text{Na}^+$  difiltrasi dalam jumlah besar, tetapi selanjutnya mengalami transpor secara aktif di semua bagian nefron, kecuali pada bagian ansa Henle yang tipis. Dalam kondisi normal, 96-99%  $\text{Na}^+$  yang difiltrasi akan direabsorpsi. Sebagian besar  $\text{Na}^+$  akan direabsorpsi bersama-sama dengan  $\text{Cl}^-$ , tetapi sejumlah kecil  $\text{Na}^+$  akan direabsorpsi secara aktif dalam hubungannya dengan sekresi  $\text{K}^+$ . Klorida ( $\text{Cl}^-$ ) dikeluarkan dalam bentuk NaCl dan hampir seluruhnya berasal dari NaCl makanan, pengeluarannya bergantung pada banyaknya NaCl yang masuk.

Perbedaan rerata kadar NaCl pada urine tikus putih jantan setelah pemberian perlakuan dengan akuades, kopi, kopi dengan penambahan susu kental manis, kopi dengan penambahan susu kedelai, dan kopi dengan penambahan susu skim ditunjukkan pada Tabel 2. Analisis sidik ragam kandungan NaCl urine menunjukkan perbedaan nyata di antara kelompok perlakuan II, IV, dan V, dan perbedaan yang tidak nyata di antara kelompok perlakuan II dan IV serta I dan III. Pada hasil pengukuran kelompok I (kontrol dengan akuades) dan III (kopi dengan penambahan susu kental manis) tidak menunjukkan perbedaan nyata dengan kelompok perlakuan lainnya pada rerata hasil pengukuran kadar NaCl, yaitu 4,000 g/L untuk kelompok I dan 4,250 g/L untuk kelompok III, sedangkan kelompok II (kopi) menunjukkan rerata hasil pengukuran kadar NaCl sebesar 3,750 g/L yang berbeda nyata dengan rerata hasil pengukuran kadar NaCl pada kelompok V sebesar 6,000

g/L, tetapi tidak berbeda nyata dengan kelompok IV dengan rerata hasil pengukuran kadar NaCl sebesar 2,667 g/L.

Perbedaan kadar NaCl lebih banyak dipengaruhi oleh aktivitas penghambatan reabsorpsi  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$  pada tubulus ginjal. Pemberian akuades pada kelompok I hanya akan menyebabkan terjadinya pengenceran cairan plasma beserta zat-zat yang terlarut di dalamnya, termasuk  $\text{Na}^+$  dan  $\text{Cl}^-$ , sehingga hanya terjadi sedikit ekskresi zat terlarut NaCl bersama urine, tetapi pada umumnya tidak terjadi penghambatan reabsorpsi  $\text{Na}^+$  maupun  $\text{Cl}^-$  yang berarti pada masing-masing perlakuan. Pada kelompok II, III, dan IV, pemberian zat seperti kopi maupun susu kental manis dan susu kedelai tidak menimbulkan diuresis, padahal menurut Katzung (1995), senyawa diuretik dapat menghambat reabsorpsi NaCl secara selektif pada bagian tebal ansa Henle *pars ascendens*, sehingga jumlah NaCl yang diekskresikan bersama urine tidak jauh berbeda dengan kontrol. Pada kelompok V, ekskresi NaCl lebih banyak daripada kelompok perlakuan lainnya meskipun kopi dan susu skim yang diberikan tidak menyebabkan diuresis. Hal ini dapat terjadi karena adanya penurunan sekresi hormon aldosteron, sehingga reabsorpsi  $\text{Na}^+$  dari urine berkurang.

Menurut Ganong (1998), aldosteron dapat meningkatkan reabsorpsi  $\text{Na}^+$  dari urine ke dalam sel epitel tubulus di sekitarnya dan secara aktif dipindahkan menuju cairan intestinum. Pada ginjal, hormon ini terutama bekerja pada sel-sel epitel duktus koligentes pada bagian korteks. Aldosteron akan berikatan dengan reseptor mineralokortikoid intrasel dan terjadi pengikatan DNA yang selanjutnya mendorong pembentukan mRNA dan dapat meningkatkan pembentukan protein baru, termasuk molekul  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATP-ase, sehingga lebih banyak tersedia pompa  $\text{Na}^+$ .

Sekresi aldosteron diatur melalui sistem renin-angiotensin dalam suatu mekanisme umpan balik. Penurunan volume cairan ekstrasel dapat menyebabkan terjadinya peningkatan pelepasan muatan saraf renalis secara refleks dan penurunan tekanan arteri renalis. Kedua perubahan ini dapat meningkatkan sekresi renin, dan angiotensin II yang terbentuk oleh kerja renin dapat meningkatkan sekresi aldosteron. Aldosteron dapat menyebabkan penurunan ekskresi  $\text{Na}^+$  dan air, serta meningkatkan volume cairan ekstrasel.

## KESIMPULAN

Pemberian variasi jenis susu, yaitu susu kental manis, susu kedelai, dan susu skim ke dalam kopi susu tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada volume, warna, kejernihan, pH, dan berat jenis urine tikus putih (*Rattus norvegicus*) antar perlakuan setelah 4 jam perlakuan per oral. Pemberian variasi jenis susu, yaitu susu kental manis, susu kedelai, dan susu skim ke dalam kopi susu tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada kadar glukosa urine tikus putih antar perlakuan setelah 4 jam perlakuan per oral. Pemberian variasi jenis susu, yaitu susu kental manis, susu kedelai, dan susu skim ke dalam kopi susu memberikan pengaruh yang berbeda nyata pada kadar NaCl urin tikus putih antar perlakuan. Pemberian susu skim ke dalam kopi

susu menyebabkan kadar NaCl yang diekskresikan bersama urine tikus putih tertinggi dalam penelitian ini yaitu sebesar 6 g/L.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Dawiesah. 1989. Petunjuk laboratorium: Penentuan nutrien dalam jaringan dan plasma tubuh. Pangan dan Gizi. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Erowid. 2005. Caffeine effects. [www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine.htm](http://www.erowid.org/chemicals/caffeine/caffeine.htm). [22 Desember 2005].
- Gandasoebata. 1992. Penuntun laboratorium klinik. PT. Dian Rakyat, Jakarta.
- Ganong WF. 1998. Fisiologi kedokteran, Edisi ke-16. Diterjemahkan oleh: Widjajakusuma MD. EGC, Jakarta.
- Guyton AC. 1997. Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit III. Diterjemahkan oleh: Andrianto P. EGC, Jakarta.
- Haim A, van der Straeten E, Cooreman WM. 1987. Urine analysis of European moles *Talpa europaea* and white rats *Rattus norvegicus* kept on carnivore's diet. *Comp Biochem Physiol A* 88(2): 179-181.
- Katzung BG. 1995. Basic and clinical pharmacology, A lange medical book. Prentice Hall International, New York.
- Murdani MHP. 1998. Biokimia ginjal dan urin. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan UNS, Surakarta.
- Mutschler E. 1991. Buku ajar Farmakologi dan Toksikologi. Penerbit ITB, Bandung.
- Sudarmanto, Suhardi, Santoso U. 1992. Petunjuk laboratorium analisa karbohidrat. PAU Pangan dan Gizi UGM, Yogyakarta.
- Sunaryo. 1995. Diuretik dan antidiuretik. Farmakologi dan Terapi. Gaya Baru, Jakarta.
- Wulangi KS. 1993. Prinsip-prinsip fisiologi hewan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Perguruan Tinggi, Jakarta.

## Pengaruh penurunan konsentrasi fosfor dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus dan produksi reserpin pule pandak *Rauvolfia verticillata* secara *in vitro*

### The effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak *Rauvolfia verticillata* in vitro

SUPATMI, SOLICHAUN, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 9 Februari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

**Abstract.** Supatmi, Solichatun, Anggarwulan E. 2007. *The effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak Rauvolfia verticillata in vitro.* Biofarmasi 5: 16-25. The objectives of this research were to determine the effects of low phosphorus concentration in MS medium on callus growth and reserpine production of pule pandak [*Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon]. This research frame based on the potency of *R. verticillata* as antihypertention. The phosphorus concentration on medium of callus growth would inhibit the callus growth. It also had effects on the synthesis of tryptophan amino acid. Tryptophan would produce tryptamine as strictosidine synthase substrat. Strictosidine synthase was an enzyme which activated the reserpine production. The research used a completely randomized design with one factor, phosphorus concentration ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in 5 replicates, i.e. 0, 42.5, 85, 127.5 and 170 (control) mg/L. The parameters of this research included callus growth (fresh weight and dry weight), morphology (texture and color) callus, and the content of reserpine (mg/gram) in *R. verticillata* callus. Quantitative data (fresh weight, dry weight and reserpine content) were analyzed by using analysis of variance (ANOVA) followed by DMRT at the confidence level of 5%. The result of this research indicated that the low phosphorus concentration ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in MS medium had effect on callus growth and reserpine production of *R. verticillata*. The highest fresh weight and dry weight of callus *R. verticillata* were obtained on replicate 85 mg/L phosphorus concentration, whereas the lowest fresh weight was obtained on 0 mg/L and the lowest dry weight on 42.5 mg/L. The reserpine production under the phosphorus standard of MS medium produced the highest reserpine on *R. verticillata* callus. The highest reserpine production was obtained on replicate 127.5 mg/L phosphorus concentration, whereas the lowest reserpine production was obtained on 42.5 mg/L.

**Keywords:** Callus growth, phosphorus, *Rauvolfia verticillata*, reserpine

### PENDAHULUAN

Penggunaan obat alami saat ini terus mengalami peningkatan seiring dengan tingginya kesadaran masyarakat akan pentingnya kesehatan. Minat untuk memanfaatkan obat alami tersebut juga timbul sebagai akibat banyaknya dijumpai efek samping yang tidak dikehendaki dari penggunaan obat kimia murni, selain itu adanya anggapan masyarakat bahwa obat tradisional merupakan obat yang baik, aman, dan mudah didapat (Ediati 1997; Hargono 1997). Banyaknya kecenderungan masyarakat untuk menggunakan bahan alam menyebabkan kebutuhan bahan untuk obat alami semakin meningkat dari waktu ke waktu.

WHO melaporkan bahwa sekitar 80% dari penduduk dunia menggantungkan pengobatannya pada obat tradisional, dan sebagian besar dari pengobatan tradisional tersebut ternyata menggunakan ekstrak tanaman atau senyawa metabolit sekundernya (Soemantri 1993). Salah satu senyawa metabolit sekunder yang banyak dibutuhkan adalah reserpin. Reserpin merupakan golongan alkaloid indol monoterpenoid yang berpotensi sebagai antihipertensi dan memiliki efek sedatif (Singh et al. 2004). Menurut

Kulkarni dan Ravinda (1988), sebanyak 3500 kg reserpin dan ajmalisin per tahun diisolasi dari *Rauvolfia* atau *Catharanthus roseus* oleh perusahaan farmasi dunia untuk pengobatan penyakit antihipertensi dan sirkulasi darah.

Anggota dari genus *Rauvolfia* umumnya banyak mengandung alkaloid, khususnya reserpin (de Padua et al. 1999). Rowe (1989) menyatakan kandungan reserpin tidak hanya terdapat pada *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon yang kini dalam kondisi mengkhawatirkan, bahkan terancam punah, namun juga terdapat pada spesies *Rauvolfia* lainnya. Salah satu spesies *Rauvolfia* yang potensial adalah *R. verticillata*. Di Indonesia, *R. verticillata* lebih dikenal dengan nama pule atau salung-salung. Tanaman *R. verticillata* selain mengandung alkaloid juga mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol (de Padua et al. 1999).

Teknik kultur in vitro sangat menguntungkan, selain untuk perbanyakan dan pemuliaan tanaman, juga sering dimanfaatkan untuk memproduksi metabolit sekunder (Wattimena 1992). Senyawa yang diinginkan dapat ditingkatkan jumlahnya dengan cara memanipulasi media, penambahan prekursor, maupun optimasi faktor lingkungan. Pengetahuan yang baik tentang kebutuhan hara

sel dan jaringan yang dikulturkan dapat meningkatkan keberhasilan dalam memperoleh metabolit sekunder. Hara meliputi garam mineral, sumber karbon (gula), vitamin, zat pengatur tumbuh, dan komponen tambahan lain yang berpengaruh terhadap ketahanan dan perbanyakan sel (Wetter dan Constabel 1991).

Fosfor dalam tanaman berfungsi sebagai penyusun protoplasma sel dan sangat dibutuhkan dalam proses fotosintesis, yaitu dalam pembentukan ATP pada fotofosforilasi dan fosforilasi oksidatif (Jumin 1992). Fosfor berperan penting dalam menentukan total energi metabolisme dengan mengubah ester fosfat (C-P) seperti glukosa 6 fosfat yang kaya energi pada proses glikolisis, fosforilasi oksidatif, atau fotosintesis. Menurut Taiz dan Zeiger (1998), *phosphoenolpyruvic acid* pada proses glikolisis dan *D-erythrose-4-phosphate* pada jalur pentosa fosfat merupakan turunan dari prekursor karbohidrat yang mampu mensintesis asam amino aromatik, salah satunya adalah triptofan yang merupakan prekursor dari alkaloid indol monoterpenoid (reserpin).

Fosfor merupakan hara makro (hara yang dibutuhkan dalam jumlah besar) yang tersedia pada media *Murashige Skoog* (MS) dalam bentuk  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Wattimena 1992). Ramawat (1999a) menyatakan fosfat yang rendah pada media dapat meningkatkan biosintesis metabolit sekunder. Hasil penelitian dari Estime et al. (2001) menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor yang tinggi dalam media Gamborgs (B5) mampu meningkatkan berat basah dari kultur kalus *Typha latifolia*, namun menurunkan kandungan metabolit sekundernya. Wilson dan Marron (2006) juga melaporkan bahwa pengurangan konsentrasi fosfor pada level 11  $\mu\text{g/ml}$  pada kultur suspensi *Galium mollugo* L. dapat menurunkan pertumbuhan kalus, namun meningkatkan biosintesis anthraquinon.

Penelitian ini bertujuan untuk: (i) mengetahui pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus *R. verticillata*, dan (ii) mengetahui pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS terhadap produksi reserpin kultur kalus *R. verticillata*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai dengan November 2006 di Sub Laboratorium Biologi, Lab. Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan meliputi sumber eksplan berupa daun *R. verticillata* yang berasal dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO), Tawangmangu, Karanganyar, akuades, larutan *bleach* (mengandung  $\text{NaClO}$  5,25%), media MS (*Murashige Skoog*), bahan pematid berupa agar 7.000 mg/L, HCl 1 N, KOH 1 N, akuades, NAA 2 mg/L, kinetin 2 mg/L, fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) pada media MS dengan konsentrasi: 0 mg/L (kontrol), 42,5 mg/L, 85 mg/L, 127,5 mg/L, dan 170 mg/L, etanol p.a (pro analysis), senyawa reserpin murni, *double distilled water* (ddH<sub>2</sub>O), sodium nitrit, dan asam sulfamat.

**Tabel 1.** Konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dalam media perlakuan.

Bahan Kimia	Konsentrasi (mg/L)				
	P <sub>1</sub> *	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub> **
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0	42,5	85	127,5	170

Keterangan: \* = Tanpa  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (kontrol), \*\* = konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sesuai standar baku media MS.

Sementara itu, alat-alat yang digunakan meliputi *autoclave* untuk sterilisasi alat dan media yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pipet tetes, spatula, pH-meter, botol kultur, gelas ukur, neraca analitik, erlenmeyer, gelas beker, pipet ukur, kertas *aluminium foil* (*total wrap heavy duty*), botol kultur, cawan petri, pinset, alat diseksi, *laminar air low cabinet* (LAF), lampu Bunsen, spektrofotometer UV-Vis, *vortex*, pipet ukur, tabung reaksi, mortar, *waterbath*, *cuvet*, kertas saring, inkubator, dan gelas ukur.

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan, yaitu 5 variasi konsentrasi sumber fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diberikan pada media perlakuan secara in vitro (**Tabel 1**). Tiap-tiap perlakuan terdiri atas 5 ulangan.

### Cara kerja

#### Sterilisasi alat

Alat-alat gelas (erlenmeyer, botol kultur, gelas ukur, gelas beker, cawan petri, spatula, pipet tetes, pipet ukur) dicuci dengan detergen, dibilas dengan air mengalir, kemudian dikeringkan. Alat-alat diseksi (skalpel, pinset, gunting, dan *cutter*) dicuci dengan detergen dan dikeringkan dengan kertas tisu. Botol kultur dan gelas ukur yang telah kering ditutup dengan kertas *aluminium foil*. Alat-alat diseksi, pipet tetes, dan pipet ukur yang telah kering dibungkus dengan kertas. Erlenmeyer diisi dengan akuades sebanyak  $\frac{3}{4}$  volume dan ditutup dengan kertas *aluminium foil*. Semua alat tersebut disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 60 menit. Setelah selesai sterilisasi, semua peralatan dikeluarkan dari *autoclave* dan disimpan dalam oven.

#### Pembuatan media inisiasi (induksi kalus)

Larutan stok dibuat dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino. Agar ditimbang sebanyak 7 g dan sukrosa 30 g. *Magnetic stirrer* dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan akuades sebanyak kurang lebih 400 ml. Gelas beker diletakkan di atas *hot plate*. Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino dan sukrosa dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker sesuai dengan komposisi untuk pembuatan media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L ke dalam larutan. Akuades ditambahkan sampai volume 900 ml. Nilai pH larutan dibuat 5,75 dengan cara menambahkan KOH 1 N untuk menaikkan pH dan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Akuades ditambahkan sampai volume 1 L. Agar ditambahkan sebanyak 7 gram. Larutan dipanaskan

di atas *hot plate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak seperlima bagian. Botol kultur yang telah berisi media ditutup rapat dengan menggunakan kertas *aluminium foil*. Botol kultur diatur dalam keranjang *autoclave* dan dimasukkan ke dalam *autoclave*, kemudian disterilisasi selama 30 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 1,5 atm. Setelah selesai disterilisasi, media dibiarkan dingin dan disimpan dalam rak kultur sampai saatnya digunakan untuk menanam eksplan.

#### *Pembuatan media perlakuan*

Larutan stok dibuat dari makronutrien, mikronutrien, vitamin, dan asam amino. Agar ditimbang sebanyak 7 g dan sukrosa 30 g. *Magnetic stirrer* dimasukkan ke dalam gelas beker dan ditambahkan akuades sebanyak kurang lebih 400 ml. Gelas beker diletakkan di atas *hot plate*. Larutan makronutrien, mikronutrien, vitamin, asam amino dan sukrosa dimasukkan satu per satu ke dalam gelas beker sesuai dengan komposisi untuk pembuatan media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L ke dalam larutan. Media perlakuan dibuat dengan cara sebagai berikut. Kelompok P<sub>1</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 0 mg/L (kontrol), kelompok P<sub>2</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 42,5 mg/L, kelompok P<sub>3</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 85 mg/L, kelompok P<sub>4</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 127,5 mg/L, kelompok P<sub>5</sub> dibuat dengan penambahan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sebanyak 170 mg/L sesuai standar baku konsentrasi media MS. Selanjutnya pada masing-masing media perlakuan ditambahkan akuades sampai volume 900 ml. Nilai pH larutan dibuat 5,75 dengan cara menambahkan KOH 1 N untuk menaikkan pH dan HCl 1 N untuk menurunkan pH. Akuades ditambahkan sampai volume 1 L. Agar ditambahkan sebanyak 7 gram. Larutan dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna. Larutan dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak seperlima bagian. Botol kultur yang telah berisi media ditutup rapat dengan menggunakan kertas *aluminium foil*. Botol kultur diatur dalam keranjang *autoclave* dan dimasukkan ke dalam *autoclave*, kemudian disterilisasi selama 30 menit pada temperatur 121°C dan tekanan 1,5 atm. Setelah selesai disterilisasi, media dibiarkan dingin dan disimpan dalam rak kultur sampai saatnya digunakan untuk menanam eksplan. Botol kultur diberi label dengan menggunakan pensil sesuai dengan nama kelompok perlakuan.

#### *Sterilisasi eksplan*

Daun *R. verticillata* direndam dalam larutan encer detergen selama 3 menit lalu dibilas dengan air mengalir. Eksplan selanjutnya direndam dalam larutan *bleach* 45-50% selama 3 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan *Dethan* 50% selama 5 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan *Agrape* 50% selama 5 menit dan direndam dalam akuades steril selama 5 menit. Eksplan direndam dalam larutan alkohol 70% selama 10 detik dan direndam dalam akuades steril 3 kali masing-masing selama 5 menit.

#### *Induksi pembentukan kalus*

Eksplan daun yang telah steril ditanam dalam media inisiasi kalus. Media yang digunakan berupa media MS yang ditambah dengan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L.

#### *Penanaman kalus pada media perlakuan*

Kalus yang diperoleh pada media inisiasi kalus dipindahkan (disubkultur) ke dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset steril pada hari ke-31 (Aryati et al. 2005). Botol kultur selanjutnya ditutup dengan kertas *aluminium foil* dan diletakkan pada rak kultur. Botol kultur diinkubasi pada suhu kamar 25-27°C dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 watt di dalam ruang kultur.

#### *Pengamatan pertumbuhan*

Pertumbuhan dan morfologi kalus diamati. Pengamatan tersebut meliputi warna kalus, tekstur kalus, dan berat basah kalus. Pemanenan kalus dilakukan pada hari ke-15 dari awal penanaman kalus pada media perlakuan dan dilakukan pengukuran berat basah akhir kalus, berat kering kalus, serta analisis kandungan reserpin.

Pengukuran berat basah kalus dilakukan dengan menimbang berat basah kalus awal (W<sub>1</sub>) dan berat basah kalus akhir (W<sub>2</sub>). Berat basah kalus awal diperoleh dengan menimbang kalus beserta botol kultur, media, dan *aluminium foil* pada hari ke-0 kemudian hasilnya dikurangi dengan berat botol, media, dan *aluminium foil* sebelum dilakukan penanaman. Berat basah kalus akhir diperoleh dengan menimbang kalus secara langsung pada akhir pengamatan yaitu pada hari ke-15 pada media perlakuan. Sementara itu, pengukuran berat kering kalus dilakukan dengan menimbang kalus segar yang telah dikeringkan di dalam inkubator pada suhu 38°C hingga beratnya konstan.

#### *Uji kandungan alkaloid reserpin*

Kalus segar dikeringkan dalam inkubator pada suhu 38°C selama 48 jam. Kalus yang sudah kering digerus dengan mortar, kemudian sebanyak 100 mg serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 ml etanol p.a. dan divorteks sampai larutan homogen. Setelah larutan homogen, ddH<sub>2</sub>O dimasukkan ke dalam tabung reaksi sampai volume menjadi 100 ml. Ke dalam larutan ditambahkan 1 ml 0,3% sodium nitrit lalu divorteks sampai larutan homogen. Larutan dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu 55°C selama 30 menit. Setelah dingin, larutan ditambah dengan 0,5 ml 5% larutan asam sulfamat.

#### **Teknik pengumpulan data**

Data yang diamati dalam penelitian ini meliputi pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid reserpin yang terkandung dalam kalus tanaman *R. verticillata* pada setiap perlakuan yang diberikan. Pengamatan pertumbuhan kalus meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan morfologi kalus (warna dan tekstur kalus), sedangkan pengambilan data untuk mengetahui produksi reserpin dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

### Analisis data

Analisis kuantitatif dilakukan pada pengamatan parameter pertumbuhan kalus yang meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan kandungan reserpin pada tiap perlakuan. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan Analisis Varians (ANOVA) dilanjutkan dengan uji lanjut DMRT pada taraf 5%. Sementara itu, analisis kualitatif digunakan dalam pengamatan morfologi kalus yang meliputi warna dan tekstur kalus yang disajikan secara deskriptif.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Induksi pembentukan kalus

Induksi kalus merupakan tahap awal yang harus dilakukan dalam kultur *in vitro*. Pada penelitian ini, eksplan yang digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus diambil dari daun muda (daun ke-2 atau ke-3 dari atas) tanaman *R. verticillata*. Umur fisiologis eksplan sangat penting dalam keberhasilan kultur *in vitro*, karena eksplan yang berasal dari jaringan muda (*juvenile*) masih aktif melakukan pembelahan sel untuk membentuk jaringan kalus dan inilah yang dibutuhkan sebagai eksplan dalam induksi kalus.

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media MS dengan penambahan NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L. Penggunaan NAA dan kinetin dengan konsentrasi yang seimbang mampu menginduksi terbentuknya kalus. Hal ini sesuai dengan pendapat George dan Sherington dalam Wattimena (1992) bahwa keseimbangan auksin dan sitokinin dalam kultur *in vitro* akan memacu terbentuknya kalus. Sitokinin memacu pembelahan sel dan auksin mempunyai efek membesarkan sel (Santoso dan Nursandi 2002).

Eksplan daun *R. verticillata* mulai menunjukkan pertumbuhan kalus pada hari ke-7 setelah penanaman pada media induksi kalus. Pembentukan kalus dimulai dengan pembengkakan eksplan dan terbentuknya struktur berwarna putih mengilat pada daerah-daerah bekas pelukaan. Bagian eksplan yang terinisiasi membentuk kalus, menurut Suryowinoto (1996), terjadi karena sel-sel yang kontak dengan media terutama pada bagian yang terluka terdorong menjadi bersifat meristematis dan aktif mengadakan pembelahan seperti jaringan penutup luka.

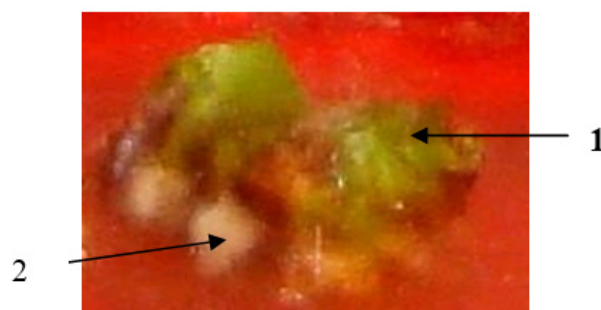
Tekstur kalus dari awal (hari ke-7) sampai akhir pengamatan (hari ke-31) adalah kompak (Gambar 1-2). Menurut Street (1973), tekstur kalus yang kompak mempunyai susunan sel-sel kalus yang rapat, padat, dan sel-selnya sulit untuk dipisahkan atau pecah menjadi klon sel tunggal. Warna kalus pada hari ke-7 relatif sama yaitu berwarna putih hijau kekuningan (Gambar 1), namun pada hari ke-31 terdapat kalus yang berubah warna menjadi kuning, kuning keputihan, coklat keputihan, dan kuning kecokelatan (Gambar 2). Menurut Giuliano et al. (1993) dalam Santoso dan Nursandi (2002), perubahan warna yang terjadi pada eksplan yang semula berwarna hijau lalu membentuk kalus berwarna putih atau putih kecokelatan

terjadi akibat proses dekomposisi klorofil yang secara biokimia dapat melalui: (i) hilangnya rantai *phyton* karena enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin/klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah; (ii) klorofilid dapat didekomposisi lebih lanjut menjadi *pheophorbides* (berwarna coklat) dan klorin (tidak berwarna); (iii) dapat terjadi karena fotooksidasi, sehingga  $Mg^{2+}$  hilang dan terbentuk *pheophytin* berwarna coklat dan hijau olive (keputihan). Kemungkinan yang lain dapat disebabkan oleh sumber eksplan yang tidak sama. Menurut Wattimena (1992), sel-sel yang berasal dari permukaan daun yang berbeda kadang-kadang memiliki daya regenerasi yang berbeda, sehingga kemampuan sel membentuk kloroplas juga berbeda. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), warna kalus yang bermacam-macam juga dapat disebabkan oleh adanya pigmentasi dari cahaya dan asal eksplan. Kalus yang dihasilkan dari daun biasanya lebih halus dan berwarna kecokelatan dan setelah lama di dalam media, kalus akan mati (Bajaj 1996).

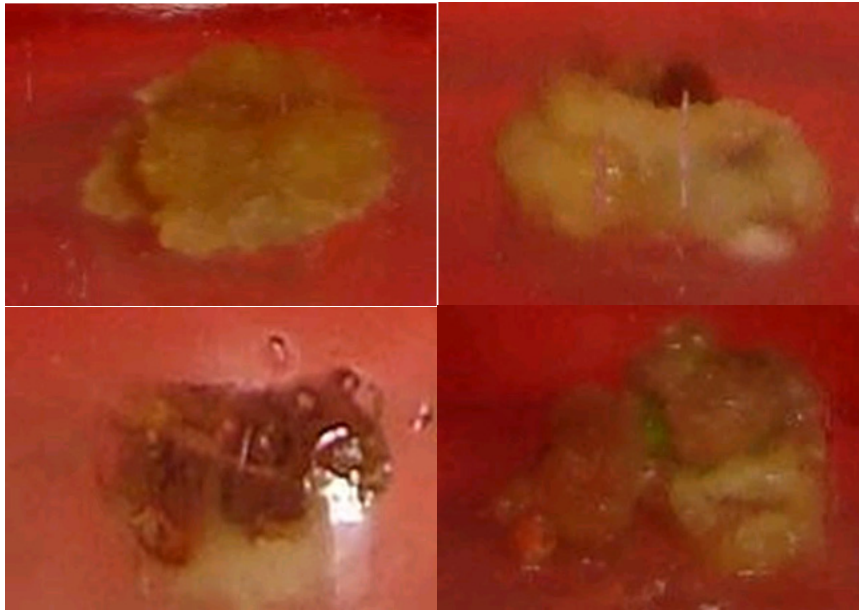
### Pertumbuhan kalus pada media perlakuan

Penanaman kalus pada media perlakuan merupakan tahap kedua yang harus dilakukan setelah induksi kalus. Kalus yang dipanen (setelah 31 hari) dari tahap induksi kalus langsung dipindah ke media perlakuan. Pengamatan pertumbuhan kalus pada media perlakuan meliputi morfologi, berat basah, berat kering, serta kandungan reserpin dalam kalus *R. verticillata*.

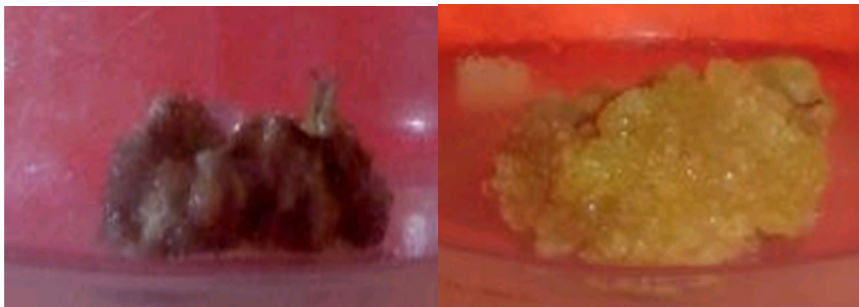
Tekstur kalus pada media perlakuan dari hari ke-0 sampai hari ke-15 tetap kompak, sedangkan warna kalus mengalami perubahan (Tabel 2). Warna kalus yang semula kuning kehijauan menjadi kuning kecokelatan, coklat muda menjadi coklat tua keputihan. Umumnya pada akhir perlakuan (hari ke-15) kalus berubah warna menjadi kecokelatan. Warna coklat pada kalus diduga karena kalus mengalami penuaan. Menurut Abdullah et al. (1998), sel-sel muda yang sehat akan menunjukkan warna kuning bening, namun akan berubah warna menjadi coklat seiring dengan pertumbuhan kalus yang semakin tua. Santoso dan Nursandi (2002) juga menyatakan bahwa peristiwa pencokelatan merupakan gejala alamiah dari proses penuaan.



**Gambar 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 7 hari pada media inisiasi. Warna = putih, hijau kekuningan. 1= Eksplan berupa daun yang belum membentuk kalus, 2 = eksplan yang mulai membentuk kalus.



**Gambar 2.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 31 hari pada media inisiasi. A = Kuning, B = kuning keputihan, C = cokelat keputihan, D = kuning kecokelatan.



**Gambar 3.** Eksplan yang mengalami pencokelatan (*browning*), (A) dan eksplan yang tidak mengalami proses pencokelatan setelah 15 hari dalam media perlakuan (B).

Peristiwa pencokelatan juga dapat disebabkan karena sintesis senyawa fenolik. Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), perubahan warna pada kalus menjadi cokelat disebabkan adanya sintesis senyawa fenolik oleh kalus. Senyawa fenolik tersebut oleh pengaruh cahaya menyebabkan teroksidasinya fenol menjadi kuinon fenolik. Sintesis senyawa fenolik menurut Vickery-Vickery dalam Fitriani et al. (1999) terjadi karena adanya kondisi cekaman yang disebabkan oleh adanya luka dan media. Hal ini terlihat dari kalus umur-31 hari yang berasal dari media inisiasi sebagian besar sudah berwarna kecokelatan sebelum dipindahkan ke media perlakuan (umur 0 hari). Gambaran eksplan yang mengalami pencokelatan dan mampu terhindar dari proses pencokelatan setelah 15 hari dalam media perlakuan disajikan pada Gambar 3.

Santoso dan Nursandi (2002) menyatakan proses perubahan warna pada kalus merupakan peristiwa alamiah yang biasa terjadi pada sistem biologi sebagai suatu proses perubahan adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik atau biokimia (memar, pengupasan, pemotongan,

serangan penyakit, atau kondisi lain yang tidak normal) yang menyebabkan stress pada jaringan. Pada penelitian ini, media perlakuan yang digunakan berupa media MS dengan konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diturunkan konsentrasinya menjadi 0 (kontrol),  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , dan  $\frac{3}{4}$  dari standar baku media MS. Kondisi media tersebut merupakan salah satu kondisi tidak normal (stres) yang diduga menyebabkan terjadinya proses perubahan warna kalus.

Fosfor merupakan komponen struktural dari sejumlah senyawa penting yaitu molekul pentransfer energi ADP dan ATP, NAD, NADPH, dan senyawa sistem informasi genetik DNA dan RNA (Gardner et al. 1999; Hopkins 1999). Menurut Dwijoseputro (1994), fosfor dan nitrogen mempunyai pengaruh timbal balik. Jika fosfat yang tersedia tidak cukup banyak maka nitrogen juga berkurang. Berdasarkan pernyataan tersebut dapat dinyatakan bahwa metabolisme nitrogen dalam sel tanaman melibatkan peran fosfor. Menurut Loveless (1991), reduksi nitrogen dalam proses metabolisme nitrogen berbentuk nitrat yang semuanya bersifat endergonik tidak hanya membutuhkan

donor electron, tetapi juga sumber ATP. ATP diperoleh melalui proses respirasi yang melibatkan fosfor inorganik dalam pembentukannya. Demikian juga dengan proses sintesis asam glutamat yang menduduki posisi penting dalam metabolisme nitrogen sekaligus sebagai penghasil asam  $\delta$ -aminolevulinat yang merupakan prekursor dari klorofil (Lea 1993). Menurut Loveless (1991), pembentukan asam glutamat membutuhkan donor hidrogen dari NADH atau NADPH pada proses respirasi maupun fotosintesis yang melibatkan fosfor dalam pembentukannya.

Defisiensi fosfor menyebabkan proses metabolisme nitrogen tidak berjalan lancar yang berakibat pada

menurunnya jumlah asam  $\delta$ -aminolevulinat yang merupakan prekursor klorofil, sehingga terjadi reduksi pembentukan klorofil. Reduksi pembentukan klorofil menyebabkan reduksi warna hijau pada kalus. Hal ini terlihat dari kalus pada perlakuan 0, 42,5, 85, dan 127,5 mg/L fosfor yang menunjukkan tidak adanya dominansi warna hijau. Kalus pada konsentrasi fosfor 170 mg/L (standar baku  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dalam media MS) seharusnya didominasi warna hijau yang menunjukkan cukup tersedianya fosfor, namun kenyataannya tidak. Hal ini diduga karena terjadinya degradasi klorofil sejak kalus berumur 31 hari pada media inisiasi, sehingga pada media perlakuan warna hijau kalus semakin berkurang.

**Tabel 2.** Warna dan tekstur kalus *R. verticillata* pada awal dan akhir perlakuan

Perlakuan	Ulangan	Tekstur kalus		Warna kalus	
		Hari ke-0	Hari ke-15	Hari ke-0	Hari ke-15
P1	1	Kompak	Kompak	Cokelat keputihan	Cokelat tua kehijauan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	3	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat keputihan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	5	Kompak	Kompak	Hijau muda	Cokelat kekuningan
P2	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Putih kekuningan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning keputihan
	3	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning keputihan
	5	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat keputihan
P3	1	Kompak	Kompak	Cokelat muda	Cokelat keputihan
	2	Kompak	Kompak	Cokelat muda	Cokelat keputihan
	3	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	5	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
P4	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kehijauan
	2	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat kehijauan
	3	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Cokelat kekuningan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Cokelat
	5	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
P5	1	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	2	Kompak	Kompak	Cokelat muda keputihan	Cokelat tua keputihan
	3	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Kuning kehijauan
	4	Kompak	Kompak	Kuning kehijauan	Kuning kecokelatan
	5	Kompak	Kompak	Kuning keputihan	Kuning kecokelatan

Keterangan: P = Konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , P<sub>1</sub> = 0 mg/L (kontrol), P<sub>2</sub> = 42,5 mg/L, P<sub>3</sub> = 85 mg/L, P<sub>4</sub> = 127,5 mg/L, P<sub>5</sub> = 170 mg/L (standar baku media MS).

**Tabel 3.** Rata-rata berat basah, berat kering dan kadar reserpin kalus *R. verticillata* setelah 15 hari pada media perlakuan

	Perlakuan Variasi Konsentrasi Fosfor				
	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
Rata-rata berat basah (gram)	0,1777 <sup>a</sup>	0,288 <sup>a</sup>	0,921 <sup>b</sup>	0,4954 <sup>ab</sup>	0,456 <sup>ab</sup>
Rata-rata berat kering (gram)	0,067 <sup>ab</sup>	0,0614 <sup>a</sup>	0,1188 <sup>b</sup>	0,0822 <sup>ab</sup>	0,0674 <sup>ab</sup>
Rata-rata kadar reserpin (mg/g)	0,22494 <sup>b</sup>	0,13278 <sup>a</sup>	0,24882 <sup>bc</sup>	0,3279 <sup>c</sup>	0,07002 <sup>a</sup>

Keterangan: P = Konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , P<sub>1</sub> = 0 mg/L (kontrol), P<sub>2</sub> = 42,5 mg/L, P<sub>3</sub> = 85 mg/L, P<sub>4</sub> = 127,5 mg/L, P<sub>5</sub> = 170 mg/L (standar baku media MS). Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji 5%.

### Berat basah kalus

Berat basah kalus diperoleh dengan cara menimbang kalus pada awal dan akhir perlakuan. Berat basah dapat digunakan untuk mengukur pertumbuhan kalus, namun tidak dapat dijadikan standar karena berat basah dipengaruhi oleh status air yang berada di dalam sel, metabolisme tanaman, dan kondisi kelembapan tanaman (Sitompul dan Guritno 1995). Dodds dan Robert (1995) juga menyatakan bahwa penambahan berat basah kalus tidak dapat digunakan dalam memperkirakan rata-rata jumlah sel dan pembelahan sel yang terjadi, namun dapat dijadikan sebagai parameter pertumbuhan karena merupakan metode tercepat untuk mengikuti pertumbuhan massa jaringan dan menunjukkan aktivitas metabolisme dalam kalus.

Hasil analisis varians dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  yang diberikan pada tiap perlakuan berpengaruh nyata terhadap berat basah kalus. Rata-rata berat basah kalus tertinggi diperoleh pada media  $P_3$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L), sedangkan rata-rata berat basah terendah diperoleh pada media  $P_1$  (kontrol) (Tabel 3). Media  $P_1$  merupakan media perlakuan tanpa penambahan fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Hal ini serupa dengan penelitian Estime et al. (2001) tentang pengaruh konsentrasi fosfor dalam media Gamborg pada *Typha latifolia* yang menunjukkan bahwa pada media perlakuan tanpa fosfor terjadi penurunan berat basah kalus sebesar 42% dari standar baku media Gamborg. Secara umum, terjadi peningkatan berat basah kalus mulai dari awal perlakuan sampai akhir perlakuan meskipun peningkatan berat basah dari masing-masing perlakuan tidak sama. Perbedaan tinggi rendahnya berat basah kalus pada tiap perlakuan diduga disebabkan oleh kemampuan jaringan dalam menyimpan air dan unsur hara yang berbeda-beda.

Berat basah kalus dipengaruhi oleh kemampuan sel dalam melakukan proses difusi, osmosis, dan tekanan turgor (Sriyanti 2000). Menurut Abidin (1990), sel-sel yang berada pada lapisan luar dan kontak dengan media lebih mudah untuk menyerap air daripada sel yang berada pada lapisan dalam. Dalam penelitian ini, struktur kalus yang diperoleh tidak rata, sehingga tidak semua sel mampu menyentuh media. Hal ini terlihat pada perlakuan  $P_5$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170 mg/L) yang merupakan standar baku media MS dan ternyata berat basah yang diperoleh lebih rendah daripada  $P_3$  dan  $P_4$ . Menurut Wattimena (1992), pengaruh fosfor bekerja sama dengan ion  $\text{K}^+$ .

Berat basah kalus dipengaruhi oleh jumlah air dalam kalus dan masuknya air ke dalam sel dipengaruhi oleh ion  $\text{K}^+$ . Kalium (K) merupakan penentu utama potensial osmotik sel dan tekanan turgor sel (Salisbury dan Ross 1995). Pengambilan  $\text{K}^+$  mengurangi potensial air di dalam sel, akibatnya air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar. Ion  $\text{K}^+$  dalam  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  berperan dalam pengambilan air oleh sel kalus, sehingga pengurangan konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) dalam media diduga dapat mengurangi masuknya air ke dalam sel-sel kalus.

Sumber eksplan dari tanaman yang berbeda diduga juga turut mempengaruhi berat basah kalus meskipun sama-

sama berasal dari daun ke-2 dan ke-3. Kedudukan bagian tanaman yang berbeda diduga memiliki jumlah auksin endogen yang tidak sama antara daun satu dengan daun lainnya. Auksin dapat meningkatkan permeabilitas sel terhadap air, sehingga kandungan auksin endogen yang tidak sama dapat menyebabkan permeabilitas sel terhadap air yang juga berbeda.

### Berat kering kalus

Berat kering merupakan parameter pertumbuhan yang dapat digunakan sebagai ukuran global pertumbuhan tanaman dengan segala peristiwa yang dialaminya. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), bahan kering merupakan manifestasi dari semua proses dan peristiwa yang terjadi dalam pertumbuhan tanaman. Berat kering kalus didapatkan dengan pengurangan kadar air dan penghentian aktivitas metabolisme hingga mencapai berat konstan.

Hasil analisis varians dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) yang diberikan pada tiap perlakuan menunjukkan perbedaan yang tidak nyata terhadap berat kering kalus. Rata-rata berat kering kalus tertinggi diperoleh pada media  $P_3$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  85 mg/L) dan berat kering terendah diperoleh pada media  $P_2$  (konsentrasi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  42,5 mg/L) (Tabel 3). Secara umum, terjadi fluktuasi berat kering dengan kisaran yang tidak terlalu jauh pada tiap-tiap perlakuan ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ). Besarnya berat kering berhubungan dengan proses fotosintesis dan respirasi. Penurunan berat kering disebabkan oleh rendahnya laju fotosintesis dan meningkatnya respirasi untuk menyediakan prekursor dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder. Menurut Gardner et al. (1991), hasil berat kering tanaman merupakan keseimbangan antara fotosintesis dan respirasi. Fotosintesis mengakibatkan peningkatan berat kering tanaman karena pengambilan karbon dioksida, sedangkan respirasi mengakibatkan penurunan berat kering karena pengeluaran karbon dioksida. Hopkins (1999) menyatakan proses fotosintesis dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah suplai nutrisi dalam tanaman. Fosfor sangat dibutuhkan dalam proses fotosintesis dan respirasi, terutama dalam pembentukan ATP pada fotofosforilasi dan fosforilasi oksidatif (Jumin 1992). Pengurangan fosfor dalam media menyebabkan terhambatnya laju fotosintesis dan respirasi sehingga mempengaruhi berat kering kalus.

Fosfor juga mempunyai pengaruh timbal balik dengan nitrogen. Menurut Prawiranata et al. (1995), asimilasi nitrogen dalam tanaman mempengaruhi penggunaan karbohidrat yang dihasilkan dari proses fotosintesis, sehingga jumlah karbohidrat yang telah ada atau karbohidrat yang akan dibentuk menjadi berkurang. Dalam proses asimilasi nitrogen, dibutuhkan energi pereduksi yang berasal dari proses respirasi berupa NADH untuk mereduksi nitrat menjadi asam amino. Pembentukan NADPH dan NADH dalam proses respirasi membutuhkan peran fosfor, sehingga konsentrasi fosfor dalam tanaman secara tidak langsung mempengaruhi asimilasi nitrogen untuk menghasilkan asam amino.

### Analisis alkaloid reserpin dalam kalus *R. verticillata*

Hasil analisis varian dan uji DMRT pada taraf signifikansi 5% juga menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor berpengaruh nyata terhadap produksi reserpin dalam kalus *R. verticillata*. Rata-rata kadar reserpin tertinggi diperoleh pada media P<sub>4</sub> (konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 127,5 mg/L) (Tabel 3). Menurut Wattimena (1992), ekspresi senyawa metabolit sekunder tidak hanya tergantung pada diferensiasi sel-sel yang aktif membelah, dapat menyebabkan kenaikan biomassa jaringan dalam pertumbuhan kalus, melainkan juga tergantung pada aktivitas enzim. Jumlah enzim yang aktif dalam metabolisme sekunder merupakan resultan dari sintesis dan degradasi enzim yang terjadi selama proses metabolisme. Peningkatan jumlah enzim yang terlibat dalam metabolisme sekunder akan meningkatkan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan. Ramawat (1999b) juga menyatakan bahwa jalur metabolisme sekunder pada sel eukariotik dan prokariotik dihambat oleh level Pi (fosfor inorganik) yang mampu mengoptimalkan pertumbuhan. Konsentrasi Pi yang rendah menguntungkan dalam proses pembentukan metabolit sekunder.

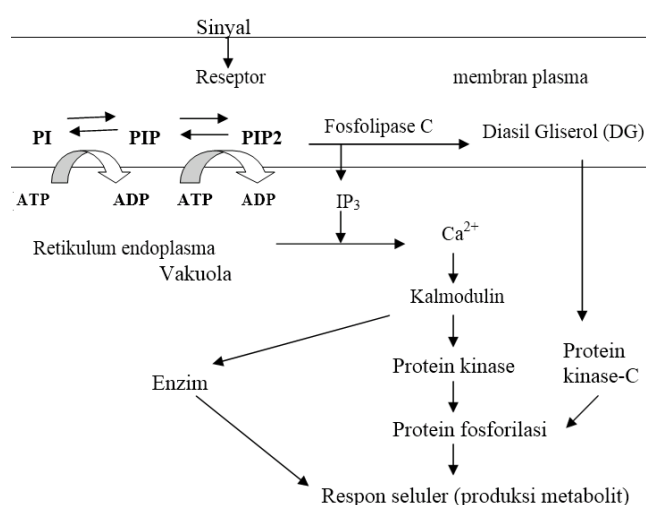
Pada media P<sub>2</sub> dengan konsentrasi KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 42,5 mg/L, hasil yang diperoleh menunjukkan produksi reserpin yang lebih rendah dibandingkan dengan P<sub>1</sub> dan P<sub>3</sub>. Menurut Luckner (1980) dalam Toruan et al. (1990), produksi metabolisme sekunder di dalam sel pada dasarnya dikontrol oleh serangkaian faktor, salah satunya adalah lokalisasi serangkaian enzim yang diperlukan untuk sintesis. Shank et al. (1998) dan Ruyter et al. (1990) juga menyatakan bahwa cara yang optimal dalam meningkatkan metabolit sekunder adalah dengan melakukan identifikasi, isolasi, dan karakterisasi enzim-enzim yang terlibat dalam jalur biosintesis metabolit sekunder. Enzim spesifik dalam sintesis reserpin selama ini belum diketahui dengan pasti, sehingga optimalisasi produksi reserpin belum dapat dilakukan secara spesifik dengan mengarahkan perlakuan atau manipulasi media langsung pada pengaktifan enzim yang memproduksi reserpin. Hasil penelitian Shank et al. (1998) pada kultur rambut akar *Catharanthus roseus* dalam media Gamborg yang ditumbuhkan dalam kondisi gelap, suhu 26°C dan penambahan sukrosa 3% mampu meningkatkan produksi *lechnericine*, namun menurunkan produksi tabersonin. Rendahnya kadar reserpin pada P<sub>2</sub> diduga terjadi karena konsentrasi fosfor 42,5 mg/L kurang efektif dalam mengaktifkan enzim yang berperan dalam sintesis reserpin, namun mengaktifkan enzim alkaloid indol monoterpeneoid lain yang juga terdapat pada kalus *R. verticillata*. Perbedaan kepekaan sel diduga juga turut berpengaruh terhadap metabolit sekunder dan pertumbuhan kalus. Toruan et al. (1990) melaporkan radiasi dengan dosis 2500 rad dapat meningkatkan kandungan diosgenin kalus *Costus speciosus* lebih tinggi dari eksplan asalnya.

Secara umum, konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS menyebabkan terjadinya peningkatan reserpin. Kandungan reserpin dipengaruhi oleh besarnya sumber fosfor yang ditambahkan ke dalam media. Menurut Ramawat (1999b), pengurangan nutrisi dalam media menyebabkan terjadinya stres pada jaringan yang menyebabkan pertumbuhan kalus memasuki fase stasioner.

Pada fase stasioner, metabolit primer diubah menjadi metabolit sekunder. Menurut Salisbury dan Ross (1995), sel mengalami tahap resistensi atau masa adaptasi terhadap faktor cekaman (konsentrasi fosfor). Pada tahap adaptasi, sel berusaha mempertahankan diri dengan cara mensintesis metabolit sekunder.

Defisiensi fosfor dalam media berpengaruh terhadap kandungan reserpin. Wilson dan Marron (2006) yang meneliti tentang produksi anthraquinon pada kultur suspensi *Galium mollugo* L. menyatakan bahwa produksi anthraquinon dipengaruhi oleh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media kultur. Dougal dan Weyrarch dalam Wattimena (1992) juga menyatakan bahwa produksi antosianin pada kultur suspensi sel wortel dikontrol oleh konsentrasi fosfat dalam media.

Ketersediaan sumber fosfor dalam media mempengaruhi proses sintesis metabolit sekunder. Martin (2004) menyatakan bahwa fosfat mampu mengontrol sinyal dalam biosintesis antibiotik. Kontrol fosfat terhadap metabolit sekunder (sintesis antibiotik) tersebut terjadi pada proses transkripsi dan sesudah transkripsi. Fosfor berperan sangat penting dalam proses fotosintesis, terutama dalam pembentukan karbohidrat (sukrosa) (Gardner et al. 1991; Jumin 1992). Menurut Wattimena (1992), pengaruh fosfor dalam membentuk metabolit sekunder diduga bekerja sama dengan sukrosa. Menurut Jang dan Sheen dalam Merillon dan Ramawat (1999), gula selain sebagai sumber energi dan komponen struktural, juga mampu bertindak dalam pengaturan sinyal yang berpengaruh terhadap ekspresi gen pada beberapa proses penting dalam sel, salah satunya adalah sintesis metabolit sekunder. Sel tanaman menggunakan heksokinase sebagai sensor gula dan fosfatase protein serta protein kinase dipengaruhi oleh sinyal tersebut. Mekanisme penghantaran sinyal ditunjukkan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Mekanisme penghantaran sinyal ekstraseluler pada membran plasma (Srivastava dan Gupta 1996)

Sinyal dari luar (stres fosfor) ditangkap oleh reseptor yang terdapat pada membran plasma. Fosfatidilinositol (PI) yang merupakan *second messenger* difosforilasi menjadi fosfatidil inositol bifosfat (PIP) oleh kinase. Fosfoinositid didegradasi menjadi inositol trifosfat (IP<sub>3</sub>) dan diasilgliserol oleh fosfolipase-C dan IP<sub>3</sub> dapat mengeluarkan kalsium dari retikulum endoplasma atau vakuola masuk ke sitosol. Naiknya Ca<sup>2+</sup> di sitosol akan mengaktifkan beberapa enzim tertentu, termasuk protein kinase. Protein kinase memfosforilasi protein/enzim yang mengatur berbagai tahap metabolisme, termasuk produksi metabolit sekunder (Merillon dan Ramawat 1999).

Hasil dan pembahasan pada penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi fosfor berpengaruh terhadap pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Rata-rata berat basah dan kering kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi fosfor 85 mg/L, sedangkan berat basah kalus terendah diperoleh pada konsentrasi 0 mg/L (kontrol) dan berat kering kalus terendah pada 42,5 mg/L. Kadar fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) di bawah standar media MS menghasilkan kadar reserpin yang lebih tinggi, semakin rendah kadar fosfor pada media MS maka kadar reserpin semakin rendah. Kadar reserpin tertinggi dihasilkan oleh kalus *R. verticillata* pada kadar fosfor 127,5 mg/L, sedangkan kadar reserpin terendah diperoleh pada kadar fosfor 42,5 mg/L.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan dan pembahasan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut. Konsentrasi fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) yang rendah dalam media MS menghambat pertumbuhan kalus. Rata-rata berat basah dan kering kalus tertinggi diperoleh pada konsentrasi fosfor 85 mg/L, sedangkan berat basah kalus terendah diperoleh pada konsentrasi 0 mg/L dan berat kering kalus terendah pada konsentrasi 42,5 mg/L. Sementara itu, kadar fosfor (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) di bawah standar media MS menghasilkan kadar reserpin yang lebih tinggi, semakin rendah kadar fosfor pada media MS maka kadar reserpin semakin rendah. Kadar reserpin tertinggi dihasilkan oleh kalus *R. verticillata* pada kadar fosfor 127,5 mg/L, sedangkan kadar reserpin terendah diperoleh pada kadar fosfor 42,5 mg/L. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh konsentrasi fosfor yang rendah dalam media MS pada rentang konsentrasi antara 0 mg/L dan 42,5 mg/L, sehingga didapatkan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan produksi reserpin kalus *R. verticillata* dengan kultur kalus atau kultur suspensi sel.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah MA, Marziah M, Lajis NH et al. 1998. Establishment of cell suspension cultures of *M. elliptica* for the production of anthraquinones. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 54: 173-182.
- Abidin Z. 1994. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Aryati H, Solichatun, Anggarwulan E. 2005. Pengaruh penambahan DL triptophan terhadap pertumbuhan kalus dan produksi alkaloid-reserpin pule pandak [*Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex. Kruz]. *Biofarmasi* 3(2): 52-56.
- Bajaj YPS. 1986. *Biotechnology in agriculture and forestry, Volume 37. Medicinal and Aromatic Plants IX*. Springer-Verlag, Berlin.
- De Padua LS, Bunyapraphatsara N, Lemmens RHMJ. 1999. *Pule pandak. PROSEA: Plant Resources of South-East Asia*, Bogor.
- Dodds JH, Roberts LW. 1995. *Experiments in plants tissue culture*. Cambridge University Press, New York.
- Dwijoseputro AR. 1994. *Pengantar fisiologi tumbuhan*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ediati. 1997. Kelarutan batu ginjal, kolesterol, asam urat, dan kalsium dalam ekstrak buah kejobeling dan tempuyung in vitro. *Majalah Farmasi Indonesia* 8(2): 9-11.
- Estime L, O'Shea M, Borst M. 2001. Effect of phosphorus concentration on the growth of cattail callus cells. *Environmental Protection Agency* 3: 290.
- Fitriani A, Siregar A, Esyanti RR. 1999. Pengaruh pemberian homogenat *Phythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. terhadap kandungan ajmalisin dalam kultur kalus tapak dara. *Hayati* 6(3): 65-69.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RI. 1991. *Fisiologi tanaman budidaya*. (Diterjemahkan oleh: Susilo H). UI Press, Jakarta.
- Hargono DJ. 1997. Obat tradisional dalam zaman teknologi. *Majalah Kesehatan Masyarakat* 56: 3-6.
- Hendaryono DPS, Wijayani A. 1994. *Teknik kultur jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Hopkins WG. 1999. *Introduction to plant physiology*. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Jumin HB. 1992. *Ekologi tanaman, suatu pendekatan fisiologis*. Rajawali Pers, Jakarta.
- Kulkarni RN, Ravinda NS. 1988. Resistance to *Phythium aphanidermatum* in diploids and induced autotetraploids of *Catharanthus roseus*. *Planta Med* 54(4): 356-359.
- Lea JP. 1993. Nitrogen metabolism. In: Lea JP, Leegood RC (eds). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Loveless AR. 1991. *Prinsip-prinsip biologi tumbuhan untuk daerah tropik 1*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Martin JF. 2004. Phosphate control of the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites is mediated by the PhoR-PhoP system: An unfinished story. *J Bacteriol* 186(16): 5197-5201.
- Merillon JM, Ramawat KG. 1999. Mechanism and control. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Prawiranata W, Harran S, Tjondronegoro P. 1995. *Dasar-dasar fisiologi tumbuhan*. Jilid ke-2. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Ramawat KG. 1999a. Production in culture optimization. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Ramawat KG. 1999b. Secondary plant product in nature. In: Ramawat KG, Merillon JM (eds). *Biotechnology Secondary Metabolites*. Science Publishers, New Hampshire.
- Rowe JW. 1989. *Natural products of woody plants I*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Ruyter CM, Akram M, Illahi I et al. 1990. Investigation of the alkaloid content of *Rauwolfia serpentina* roots from regenerated plants. *Planta Med* 62: 350-355.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. *Fisiologi tumbuhan*. (Diterjemahkan oleh: Padmawinata K). Penerbit ITB, Bandung.
- Santoso U, Nursandi F. 2002. *Kultur jaringan tanaman*. Penerbit UMM Press, Malang.
- Shanks JV, Bhadra R, Morgan J et al. 1998. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implication for metabolic engineering. *Biotechnol Bioeng* 58: 333-338.
- Singh KD, Sahu A, Srivastava B. 2004. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloid: Estimation of reserpine in pharmaceuticals. *Analytical Sciences*. The Japan Society for Analytical Chemistry 20, Japan.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. *Analisis pertumbuhan tanaman*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Soemantri. 1993. *Masalah Pengembangan Teknologi Sediaan Fitofarmaka*. Warta Tumbuhan Obat Indonesia.
- Srivastava PC, Gupta UC. 1996. *Trace elements in crop production*. Science Publishers Inc., New Delhi.
- Sriyanti DP. 2000. Pelestarian tanaman nilam (*Pogostemon heyneanus* Benth.) melalui kultur mikrostek. *Biosmart* 2 (2): 19-22.
- Street HE. 1973. *Plant tissue and cell culture*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Suryowinoto M. 1996. *Pemuliaan tanaman secara in vitro*. Kanisius, Yogyakarta.
- Taiz L, Zeiger E. 1998. *Plant physiology*. Sineur Asosiates, Inc. Publishers, Massachusetts.

- Toruan N, Solahuddin S, Winata L et al. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol dan radiasi Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan *Costus speciosus*. Forum Pascasarjana 13(1): 1-14.
- Wattimena GA. 1992. Bioteknologi tanaman. Penerbit ITB, Bandung.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Plant cell suspension culture and their biosynthetic potential. Metode Kultur Jaringan Tanaman. (Diterjemahkan oleh: Widiyanto MB). Penerbit ITB, Bandung.
- Wilson G, Marron P. 2006. Growth and anthraquinone biosynthesis by *Galium molluga* L. cells in batch and chemostat culture. Department of Botany, University College, Dublin, Ireland. [www.anthraquinonei.co.id](http://www.anthraquinonei.co.id). [25 Juni 2006].

# Pengaruh ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) terhadap kadar metil merkuri darah dan karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida

## The effect of *sambung nyawa* (*Gynura procumbens*) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and characteristics of erythrocyte of rat after exposed by methyl mercury chloride

WIWIK WIDYAWATI, WIRYANTO, SHANTI LISTYAWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 5 Februari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

**Abstract.** Widyawati W, Wiryanto, Listyawati S. 2007. The effect of *sambung nyawa* (*Gynura procumbens*) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and characteristics of erythrocyte of rat after exposed by methyl mercury chloride. *Biofarmasi* 5: 26-37. Methyl mercury is the most toxic of the kind of mercury which used society in various levels since a long ago. Naturally, methyl mercury is produced from methylation process of anorganic mercury by methanogenic bacteria on aquatic sediment. The over existency of methyl mercury in distric area will be toxic if entry the organisms body. The aims of the research were to study the effect of *sambung nyawa* (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) leaves extract to methyl mercury concentration in blood and the characteristics of erythrocyte of rat (*Rattus norvegicus* L.) after exposed by methyl mercury chloride, and to study the most effective dose of *sambung nyawa* (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) leaves extract to reduce the concentration of methyl mercury in blood and to repair the characteristics of erythrocyte after exposed by methyl mercury chloride. The research used a Completely Random Design with six groups, each group consisted of 4 repetitions. The treatments of each group were aquadest 2.5 ml (placebo), methyl mercury chloride 2.99 mg/kg BW (negative control), L-Cystein 5.4 mg/kg BW (positive control), and the extract of *sambung nyawa* leaves 1.945, 3.889, and 5.834 g/kg BW. The observation included the concentration of methyl mercury in blood, hemoglobin concentration, erythrocyte number, and Packed Cell Volume (PCV), which analyzed by Analysis of Variance (Anova) and continued with Duncan Multiple Range Test (DMRT) at significance level of 5%. The morphology of erythrocyte observation was analyzed qualitatively. The result of research showed that the extract of *sambung nyawa* leaves at doses of 1.945, 3.889, and 5.834 g/kg BW affected to reduce the concentration of methyl mercury in blood significantly and to repair the characteristics of erythrocyte. The extract of *sambung nyawa* leaves that had the highest effectiveness to reduce the methyl mercury concentration in blood and to repair the characteristics of erythrocyte was on a dose of 5.834 mg/kg BW.

**Keywords:** Erythrocyte, *Gynura procumbens*, methyl mercury chloride, *sambung nyawa*

### PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari, manusia terancam oleh zat kimia berbahaya yang terpapar secara langsung maupun tidak langsung. Sedikitnya 50.000 jenis zat kimia saat ini telah digunakan oleh manusia dan oleh karena tidak terhindarkan maka manusia harus menyadari bahaya yang ditimbulkannya (Darmansjah 1995).

Merkuri (Hg) merupakan logam berat yang umumnya bersifat toksik dan cukup berperan pada polusi lingkungan. Toksisitas merkuri tergantung pada bentuk senyawa kimia dan tempat pemaparannya (Beim dan Groshva 1991). Dari hasil pengujian toksisitas diketahui bahwa merkuri organik, khususnya metil merkuri, lebih toksik dibanding jenis merkuri yang lain (Oda dan Ingle 1981; Beayens 1992). Metil merkuri bersifat lipofilik sehingga dapat dengan mudah melintasi sawar darah-otak dan menyebabkan kerusakan pada sistem saraf pusat (Athena et al. 1992; Darmono 1995; Lu 1995; Katzung 1997;

Hodgson dan Levi 2000). Gejala-gejala saraf terjadi pada tikus yang diberi perlakuan metil merkuri selama 10-90 hari dengan dosis kumulatif 100 mg/kg BB (Buck dan Osweiler 1976).

Metil merkuri merupakan salah satu pencemar makanan utama. *Intake* harian metil merkuri diperkirakan 4 µg/hari, terutama melalui konsumsi ikan (*US Public Health Service* 1988). Merkuri yang diserap oleh dalam tubuh akan didistribusikan dan ditimbun dalam jaringan tubuh (Fujiki 1973). Metil merkuri akan berikatan dengan eritrosit dalam bentuk Hg<sup>2+</sup> (Buck dan Osweiler 1976). Di dalam eritrosit, Hg<sup>2+</sup> dengan cepat akan membentuk senyawa kompleks bersama senyawa organik (Taras et al. 1971).

Berbagai zat toksik dapat menyebabkan perubahan pada eritrosit, *Packed Cell Volume*, dan hemoglobin (Hariono 1994). *Lethal Dose 50* (LD50) metil merkuri yang diberikan pada tikus per oral adalah 29,9 mg/kg BB

dan toksisitas akutnya meliputi efek neurologi, yaitu perubahan tingkah laku dan kematian sel otak.

Sambung nyawa (*Gynura procumbens* (Lour) Merr.) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang daunnya banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional (Sudarto 1990). Dari hasil isolasi flavonoid daun sambung nyawa didapatkan 2 macam senyawa flavonoid, yaitu kaempferol (suatu flavonol), flavonol, dan auron (Sugiyanto et al. 1994). Kemampuan daun sambung nyawa dalam mengkelat/mengikat ion logam berat merkuri diduga karena keberadaan flavonoid (Afana's et al. 1989; Bors et al. 2000; Szymusiak dan Zielinski 2000).

Daun sambung nyawa sering digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, namun penelitian lebih lanjut mengenai khasiat tanaman ini masih harus dilakukan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian secara eksperimental tentang khasiat ekstrak daun sambung nyawa terhadap kadar metil merkuri dalam darah dan karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral, meliputi jumlah dan morfologi eritrosit, hematokrit/*Packed Cell Volume*, serta kadar hemoglobin.

Tujuan Penelitian ini adalah: (1) mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun sambung nyawa (*G. procumbens*) terhadap kadar metil merkuri dalam darah dan karakteristik eritrosit tikus putih (*R. norvegicus* L. strain Wistar) pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral, serta (2) mengetahui dosis ekstrak daun sambung nyawa yang efektif untuk menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida per oral.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan April sampai dengan Juli 2006 yang meliputi pembuatan ekstrak, pemberian perlakuan pada hewan percobaan, pengukuran kadar metil merkuri dan kadar hemoglobin dalam darah, penghitungan jumlah eritrosit, pengukuran hematokrit/*Packed Cell Volume*, pembuatan preparat apus darah, serta pengamatan hasil penelitian.

Daun sambung nyawa yang digunakan dalam penelitian berasal dari Balai Penelitian Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu, Karanganyar, Surakarta. Pembuatan ekstrak daun sambung nyawa dilakukan di Laboratorium Pusat MIPA Sub Laboratorium Biologi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan pada tikus dilakukan di Layanan Penelitian Pratiklinik dan Pengembangan Hewan Percobaan, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LP3HP-LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengukuran kadar metil merkuri dalam darah tikus uji dilakukan di Laboratorium Balai Penyelidikan Penyakit Veteriner (BPPV) Wates, Yogyakarta. Sementara itu, pengukuran kadar hemoglobin dalam darah, penghitungan jumlah eritrosit, pengukuran hematokrit/*Packed Cell Volume*, pembuatan preparat apus darah, dan pemotretan preparat apus darah dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### Bahan dan alat

Alat yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun sambung nyawa meliputi blender, alat potong, pipet ukur, *magnetic stirrer*, *hot plate*, neraca analitik, kertas saring, Erlenmeyer ukuran 500 ml, batang pengaduk, *rotary evaporator*, corong, oven, pipet ukur, pipet volume, dan desikator. Alat yang digunakan untuk perlakuan terhadap hewan uji meliputi *disposable syringe* 2,5 ml, *canule*, kandang untuk pemeliharaan tikus, dan tempat air minum. Alat yang digunakan untuk pengambilan sampel darah yaitu kapiler hematokrit/mikrohematokrit, cangkir porselin ukuran 100 ml, timbangan elektrik, pipet, dan tabung Eppendorf. Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar metil merkuri dalam darah meliputi oven merek Fisher Scientific, lumpang porselin, neraca analitik, pipet, labu ukur, Erlenmeyer, corong, kertas saring Whatman No.42, alat Gorsuch dengan modifikasi, spektrometer, serapan atom perkin Elmer 3110 dengan panjang gelombang 253,6 nm yang dilengkapi dengan sistem uap dingin/MHS-10. Alat yang digunakan untuk pengukuran kadar hemoglobin yaitu *Kit Hb Merck* 3317. Alat yang digunakan untuk penghitungan jumlah eritrosit yaitu hematokrit, pipet volumetrik 0,5 ml, 2 ml, dan 4 ml, kamar hitung *Double Improved Neubauer*, kaca penutup, dan mikroskop. Alat yang digunakan untuk penghitungan hematokrit/*Packed Cell Volume* yaitu mikrohematokrit, *microcapillary reader*, dan sentrifus. Alat yang digunakan untuk pembuatan dan pengamatan preparat apus darah yaitu kaca objek ukuran 25x75 mm<sup>2</sup>, rak kaca objek, kapas, kertas label, dan mikroskop cahaya yang terhubung dengan kamera Nikon Eclipse E 400.

Sementara itu, bahan yang diperlukan untuk pembuatan ekstrak yaitu daun sambung nyawa yang besar dan sehat (nomor 3 dari pucuk), etanol 95%, dan akuades. Bahan untuk perlakuan yaitu tikus putih jantan (*R. norvegicus*) strain Wistar umur 2 bulan dengan berat rata-rata 200 g sebanyak 24 tikus, Par G pelet sebagai pakan tikus, akuades, air minum, dan L-sistein. Bahan untuk pengambilan sampel darah adalah NaEDTA 1%. Bahan untuk pengukuran kadar metil merkuri dalam darah yaitu sampel darah tikus uji, air bebas mineral, CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup> 10 g/L dalam metanol yang berasal dari CH<sub>3</sub>HgCl, HCl 1 M, NaBH<sub>4</sub> 2,5% (b/v), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. 96%, HNO<sub>3</sub> p.a. 65%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a. 30%, KMnO<sub>4</sub> 5%, NaOH 1% (b/v), dan HNO<sub>3</sub> 1,5% (v/v). Bahan untuk pengukuran kadar hemoglobin yaitu larutan Drabkin yang terdiri atas natrium bikarbonat 1 g, kalium sianida 50 mg, kalium ferrisianida 200 mg, dan akuades 1000 ml. Bahan untuk penghitungan jumlah eritrosit adalah larutan Hayem. Bahan untuk pembuatan preparat apus darah meliputi metanol, air mengalir, dan zat warna Giemsa (1 gram dalam 10 ml metanol).

### Rancangan percobaan

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan uji dibagi dalam 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 4 ulangan.

## Cara kerja

### Persiapan hewan uji

Sebelum perlakuan, tikus putih jantan berumur 2 bulan dengan berat badan rata-rata 200 g diadaptasikan terlebih dahulu pada kondisi laboratorium selama 1 minggu dengan diberi makan dan minum secara *ad libitum*. Tikus-tikus tersebut dipelihara di dalam kandang perlakuan yang masing-masing terdiri dari 4 tikus (total perlakuan 24 tikus putih jantan).

### Penimbangan berat badan tikus

Sebelum pemberian bahan uji per oral, tikus uji ditimbang berat badannya lebih dahulu untuk mengetahui berat awal. Penimbangan berat badan dilakukan 2 hari sekali untuk mengetahui perubahan berat badan.

### Pembuatan ekstrak daun sambung nyawa

Daun yang telah dibersihkan dari kotoran dicuci dengan akuades lalu dikeringanginkan selama satu malam, selanjutnya daun dimasukkan ke dalam oven bersuhu 37-40°C sampai daun menjadi kering. Daun yang telah kering lalu dipotong kecil-kecil dan diblender. Serbuk daun yang diperoleh dari hasil pembenderan lalu dimaserasi dengan larutan etanol 95% selama 24 jam. Setelah itu, filtrat diperoleh dengan menyaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu maksimal 60°C dengan kecepatan putar 150 per menit. Ekstrak lembek yang diperoleh kemudian dikeringkan dalam desikator hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering tersebut kemudian digunakan untuk perlakuan kepada hewan uji (Sudarto 1990).

### Penentuan dosis

**Penentuan dosis Metil Merkuri Klorida/MMK ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ).** Berdasarkan nilai  $\text{LD}_{50}$  metil merkuri yang diberikan pada tikus per oral sebesar 29,9 mg/kg BB (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 1989) maka batas aman yang digunakan adalah 10% dari  $\text{LD}_{50}$ , yaitu 2,99 mg/kg BB. Dosis ini sebelum diberikan pada tikus harus dilarutkan terlebih dahulu dengan akuades.

**Penentuan dosis ekstrak daun sambung nyawa.** *Lethal Dose 50* ( $\text{LD}_{50}$ ) untuk ekstrak daun sambung nyawa yang terlarut dalam etanol per oral pada mencit adalah sebesar 5,556 g/kg BB (Eva et al. 1993). Dosis yang digunakan sebesar 0,556 g/kg BB yang diperoleh dari 10%  $\text{LD}_{50}$  ekstrak daun sambung nyawa. Dosis tersebut adalah dosis untuk mencit. Berdasarkan tabel konversi didapatkan faktor konversi dari mencit (20 g) ke tikus (200 g) adalah 7 (Lourence dan Bacharach 1964), sehingga didapatkan dosis terapi untuk tikus sebesar 3,889 g/kg BB yang diperoleh dari hasil perhitungan ( $0,556 \text{ g/kg BB} \times 7$ ). Ekstrak daun sambung nyawa tersebut dilarutkan dalam akuades terlebih dahulu sebelum diberikan pada tikus. Dosis yang diperoleh kemudian divariasikan menjadi 0,5; 1,0; dan 1,5 kali lipatnya. Jadi, dosis yang digunakan dalam perlakuan adalah 1,945; 3,889; dan 5,834 g/kg BB.

**Penentuan dosis L-sistein.** Terapi untuk mengatasi keracunan merkuri organik adalah dengan memberikan L-sistein dosis 300 mg per hari (Mutschler 1991) per oral selama 10 hari (Chadhq 1995). Dosis tersebut adalah dosis untuk manusia. Berdasarkan tabel konversi didapatkan

faktor konversi dari manusia (70 kg) ke tikus (200 g) adalah 0,018 (Lourence dan Bacharach 1964), sehingga didapatkan dosis terapi untuk tikus sebesar 5,4 mg/kg BB yang diperoleh dari hasil perhitungan ( $300 \text{ mg} \times 0,018$ ).

### Perlakuan hewan uji

Dua puluh empat ekor tikus jantan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan dengan masing-masing kelompok sebanyak 4 tikus. Tikus uji diberi pakan Par G pelet dan minum secara *ad libitum*. Tiap kelompok diperlakukan selama 20 hari dengan masing-masing kelompok sebagai berikut:

- 1) Kelompok I (plasebo): 2,5 ml akuades selama 20 hari.
- 2) Kelompok II (kontrol negatif): metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan 2,5 ml akuades selama 10 hari.
- 3) Kelompok III (kontrol positif): metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan L-sistein 5,4 mg/kg BB/hari selama 10 hari.
- 4) Kelompok IV: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB/hari selama 10 hari.
- 5) Kelompok V: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB/hari selama 10 hari.
- 6) Kelompok VI: metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB/hari selama 10 hari dan dilanjutkan ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB/hari selama 10 hari.

Metil merkuri klorida diberikan selama 10 hari (hari ke-1 sampai hari ke-10) untuk menimbulkan akumulasi metil merkuri klorida dalam darah tikus pada kelompok perlakuan II, III, IV, V, dan VI. L-sistein diberikan selama 10 hari, yaitu hari ke-11 sampai hari ke-20 (Chadhq 1995) setelah tikus uji (kelompok perlakuan III) dipapari metil merkuri klorida per oral selama 10 hari.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa dilakukan per oral menggunakan *disposable syringe* 2,5 cc yang ujungnya telah diganti dengan *canule* dan dimasukkan melalui mulut tikus yang telah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari, yaitu pada kelompok perlakuan IV, V, dan VI, setiap hari selama 10 hari (hari ke-11 sampai hari ke-20).

Pengamatan gejala klinis tentang kondisi fisik dan berat badan tikus dilakukan setiap 2 hari sekali selama 20 hari berturut-turut. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-21. Darah diambil melalui vena orbitalis di *canthus medialis* mata dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf yang sudah diisi dengan NaEDTA 1%.

### Penanaman kalus pada media perlakuan

Kalus yang diperoleh pada media inisiasi kalus dipindahkan (subkultur) ke dalam media perlakuan dengan menggunakan pinset steril (pemindahan dilakukan pada hari ke-31). Botol kultur ditutup dengan kertas *aluminium foil* dan diletakkan pada rak kultur. Botol kultur diinkubasi pada suhu kamar (25-27°C) dan diberi cahaya berupa lampu neon 10 watt di dalam ruang kultur.

#### *Penghitungan kadar metil merkuri dalam darah dengan spektrometri serapan atom uap dingin sistem batch*

Larutan induk merkuri dibuat dengan cara menimbang 1,3539 g HgCl<sub>2</sub> anhidrat, lalu dilarutkan dalam HCl 1 M dan diencerkan hingga volume 1 liter. Larutan standar dibuat dengan cara larutan induk merkuri diencerkan dengan air bebas mineral menjadi larutan standar 10 ppb, 25 ppb, 50 ppb, 100 ppb dan 150 ppb. Pembuatan larutan reduktor dilakukan dengan melarutkan natrium borohidrid (NaBH<sub>4</sub>) 0,75 g dalam NaOH 1% (b/v), lalu diencerkan hingga 100 ml dengan NaOH 1% (b/v).

Destruksi sampel dilakukan dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Sampel darah NaEDTA diambil sebanyak 0,2 ml dan dimasukkan ke dalam cangkir porselen yang sudah ditimbang terlebih dahulu, lalu dikeringkan dalam oven sampai benar-benar kering dengan metode kering beku (*dry ice*). Sampel kering yang berbentuk serbuk ditimbang sebanyak 5 g, dimasukkan ke dalam labu leher tiga. Sampel ditambah dengan HNO<sub>3</sub> p.a. 65% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. 96% masing-masing sebanyak 5 ml. Sampel dalam labu alas bulat dihubungkan dengan alat Gorsuch termodifikasi, kemudian dipanaskan pada suhu 60°C selama 30 menit, setelah itu ditambah dengan HNO<sub>3</sub> 5 ml ke dalam sampel. Suhu dinaikkan menjadi 120°C lalu 150°C, pemanasan dilakukan dalam mantel pemanas yang dilengkapi termometer. Jika sampel berubah warna menjadi hitam maka ditambahkan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a. 30% tetes demi tetes sampai sampel berwarna jernih. Setelah dingin, sampel disaring dengan kertas saring, lalu diencerkan sampai volume 50 ml dengan air bebas mineral.

Analisis merkuri dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut. Setelah *Atomic Absorption Spectrofotometri* (AAS) dihidupkan, larutan-larutan standar yang telah disiapkan dengan konsentrasi yang bervariasi, masing-masing diambil 5 ml dan ditambah dengan 5 tetes HNO<sub>3</sub> 1,5% (v/v) dan KMNO<sub>4</sub> 45%, lalu dimasukkan ke dalam botol reaksi pada alat MHS-10 yang terhubung pada AAS Perkin Elmer 3110, lalu diukur absorbansinya dengan 4 kali pengulangan. Untuk larutan sampel dengan cara yang sama seperti pada larutan standar dan diukur absorbansinya.

#### *Pengukuran kadar hemoglobin*

Pengukuran kadar hemoglobin dilakukan dengan metode sianmethemoglobin. Sampel darah NaEDTA diambil sebanyak 20 µl, dimasukkan ke dalam larutan Drabkin 5 ml menggunakan mikropipet, dicampur dengan cara dibalik beberapa kali agar hemoglobin lepas, lalu setiap bentuk hemoglobin diubah menjadi bentuk stabil. Setelah 3 menit, absorbansi larutan darah diukur pada gelombang 540 nm, sebagai blanko digunakan larutan Drabkin. Kadar hemoglobin ditentukan dari perbandingan absorbansinya dengan absorbansi standar sianmethemoglobin yaitu: Kadar hemoglobin = absorbansi yang teramati x 36,8 Hb/dl (Gandasoebrata 1992; Tjokronegoro 2000).

#### *Penghitungan jumlah eritrosit*

Sampel darah NaEDTA diisap dengan pipet eritrosit sampai tanda garis 1,0 dan larutan pengencer sampai tanda garis 101. Larutan pengencer yang digunakan adalah

larutan Hayem dengan perbandingan 1:200. Sampel darah dicampur selama 1 menit dan dibiarkan selama 3 menit agar eritrosit mengendap. Eritrosit dihitung di dalam kamar hitung *Double Improve Neubauer* pada kelima bidang berukuran sedang yang masing-masing dibagi menjadi 16 bidang kecil, sehingga didapatkan faktor jumlah eritrosit per µl darah menjadi 5000E (E adalah jumlah eritrosit) (Gandasoebrata 1992; Tjokronegoro 2000). Eritrosit diamati dengan mikroskop pada perbesaran 100x.

#### *Pengukuran kadar hematokrit/Packed Cell Volume*

Sampel darah NaEDTA diisap menggunakan pipa hematokrit. Tabung ditutup dengan bahan penutup jika volume darah mencapai  $\frac{3}{4}$  bagian pipa. Pipa kapiler berisi darah disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Pengukuran dilakukan dengan membandingkan bagian darah yang mengendap dengan seluruh bagian darah yang berada di tabung mikrohematokrit (Benjamin 1987).

#### *Pembuatan preparat apus darah tikus uji*

Pembuatan sediaan preparat apus darah dilakukan di atas kaca objek yang telah dibersihkan dengan sedikit metanol, sehingga bebas lemak dan kotoran. Darah ditetaskan pada jarak kurang lebih 2-3 mm dari ujung kaca objek, kemudian dibuat film apusan darah tipis dan rata dengan cara menggeser kaca penghapus secepat mungkin. Kaca penghapus sebelumnya telah diletakkan di depan tetesan darah dengan sudut 30-45°. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan cat warna Giemsa tanpa melakukan fiksasi terlebih dahulu, karena zat warna Giemsa sudah mengandung metanol. Zat warna ditetaskan pada sediaan sebanyak 20 tetes dan dibiarkan 5-12 menit. Zat warna yang berlebihan dibersihkan dengan air suling secara perlahan-lahan, kemudian dikeringkan dalam posisi vertikal.

#### **Analisis data**

Analisis yang digunakan berupa analisis kuantitatif dan kualitatif menggunakan program SPSS 12. Analisis kuantitatif digunakan dalam pengamatan data primer, yaitu kadar metil merkuri dan kadar hemoglobin dalam darah, hematokrit/*Packed Cell Volume*, serta jumlah eritrosit. Hasil percobaan dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dan apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf signifikansi 5%. Data yang diperoleh dari pengamatan preparat apus darah tikus uji dianalisis secara deskriptif. Data kualitatif yang lainnya berupa kondisi fisik dan berat badan tikus uji dijadikan sebagai data pendukung.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

Metil merkuri sejak lama telah dimanfaatkan dalam berbagai bidang, di antaranya industri pertanian memanfaatkan senyawa merkuri organik untuk perlindungan benih (Katzung 1997) dan pestisida tanaman (Estes et al. 1973), industri pulp dan kertas menggunakan senyawa fenil merkuri asetat untuk mencegah pembentukan kapur pada pulp dan kertas basah selama proses

penyimpanan, sebagai desinfektan benda mati (Clarke et al. 1981), antiseptik (Modell et al. 1976), dan untuk penelitian di laboratorium (Hunter 1969). Penggunaan secara berlebihan dan terus-menerus dapat menyebabkan akumulasi metil merkuri di alam dan masuk ke rantai makanan. Metil merkuri merupakan bahan berbahaya jika masuk ke dalam tubuh. Efek toksiknya tidak hanya didasarkan pada suatu mekanisme reaksi saja, tetapi juga dapat terjadi di berbagai tempat kerja.

Suatu jenis zat kimia dapat menimbulkan efek berbahaya jika kadarnya dalam jumlah cukup besar bersentuhan dengan mekanisme biologi tertentu. Faktor penting yang mempengaruhi potensi aman tidaknya suatu zat kimia adalah hubungan antara dosis (kadar) zat kimia dengan efek yang ditimbulkan (Loomis 1978). Sifat toksik zat kimia tersebut dapat ditunjukkan dengan adanya perubahan fungsional, biokimiawi, atau struktural. Zat kimia dapat masuk ke dalam tubuh melalui berbagai cara. Pada penelitian ini, metil merkuri klorida diberikan pada tikus uji per oral, sehingga zat tersebut akan melalui saluran cerna, masuk ke sistem sirkulasi darah, kemudian ke dalam sel. Dalam kondisi normal, tubuh mampu mengeliminasi xenobiotik melalui proses detoksifikasi, namun jika dosis xenobiotik tersebut melampaui ambang batas maka tubuh tidak dapat melakukan detoksifikasi, sehingga terjadi toksisitas dari xenobiotik tersebut (Schunack et al. 1990; Murray et al. 1999).

#### Kadar metil merkuri dalam darah

Secara kuantitatif, kadar metil merkuri dapat ditentukan dengan menginterpolasi nilai absorbansi sampel ke dalam kurva larutan standar merkuri atau dengan memasukkan nilai absorbansi sampel ke dalam persamaan garis regresi linier dari kurva larutan standar merkuri ( $y = 0,0018x + 0,0897$ ). Rata-rata kadar metil merkuri dalam darah tikus putih setelah 20 hari diberi perlakuan berkadar lebih tinggi dibandingkan tikus kontrol. Kelompok plasebo memiliki rata-rata kadar metil merkuri darah 0 ppm.

Kelompok perlakuan yang hanya diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB menunjukkan kenaikan kadar metil merkuri yang berarti sebesar 1,923 ppm (Tabel 1). Kenaikan kadar metil merkuri dalam darah disebabkan adanya absorpsi metil merkuri klorida di saluran pencernaan yang kemudian ditransportasikan ke eritrosit dan protein plasma. Metil merkuri klorida bersifat lipofil, dapat dengan mudah menembus membran sel tubuh dan terdistribusi di dalam tubuh dengan konsentrasi tertinggi di sistem saraf pusat (lebih dari 10% dari total dosis), yaitu berada dalam bentuk senyawa organik, tetapi di jaringan tubuh yang lain metil merkuri akan diubah dan disimpan dalam bentuk merkuri anorganik dengan konsentrasi tertinggi di hati dan ginjal (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry* 1997). Dengan reaksi oksidasi-reduksi, bentuk merkuri anorganik akan memasuki eritrosit, paru-paru, dan hati dalam bentuk kation divalen ( $Hg^{2+}$ ). Pemberian metil merkuri klorida selama 10 hari menyebabkan akumulasi metil merkuri dalam tubuh karena adanya pengikatan metil merkuri klorida dengan protein, polisakarida, dan asam amino. Selain itu, metil merkuri klorida mempunyai waktu paruh yang lama sekitar 70 hari

dan sangat sedikit diekskresikan (Berlin 1973; Fujiki 1973).

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB menunjukkan penurunan kadar metil merkuri yang berarti yaitu sebesar 1,015 ppm. Dari hasil uji DMRT 5% dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II (Tabel 2). L-sistein merupakan asam amino yang mempunyai gugus karboksil dan amino yang digunakan untuk mengatasi keracunan merkuri organik (Mutshler 1991). Prinsip kerja L-sistein dengan cara berinteraksi langsung dengan ion logam  $Hg^{2+}$  dalam darah serta jaringan dan mereaktivasi enzim selular yang mengandung gugus sulfidril (Katzung 1997). Senyawa ini mengandung lebih dari 2 gugus elektronegatif yang dapat membentuk ikatan kovalen-koordinat stabil dengan atom logam kation. Kompleks yang terbentuk akan diekskresikan oleh tubuh (Ariens et al. 1994; Katzung 1997). Adapun kompleks yang terbentuk dari reaksi antara L-sistein dengan ion  $Hg^{2+}$  dapat dilihat pada Gambar 1.

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa dosis 1,945; 3,889; dan 5,834 mg/kg BB memiliki rata-rata kadar metil merkuri berturut-turut sebesar 1,301; 1,136; dan 1,027 ppm. Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari menunjukkan penurunan kadar metil merkuri yang berarti (Tabel 2).

Dari hasil uji DMRT 5% diketahui bahwa kelompok perlakuan tersebut berbeda nyata dengan kelompok perlakuan II (kontrol negatif) yang hanya dipapari dengan metil merkuri klorida tanpa dilanjutkan dengan pemberian

**Tabel 1.** Kelompok perlakuan pada hewan uji

Perlakuan hari ke-	Kelompok Perlakuan					
	I	II	III	IV	V	VI
1	x	v	v	v	v	v
2	x	v	v	v	v	v
3	x	v	v	v	v	v
4	x	v	v	v	v	v
5	x	v	v	v	v	v
6	x	v	v	v	v	v
7	x	v	v	v	v	v
8	x	v	v	v	v	v
9	x	v	v	v	v	v
10	x	v	v	v	v	v
11	x	-	●	*	**	***
12	x	-	●	*	**	***
13	x	-	●	*	**	***
14	x	-	●	*	**	***
15	x	-	●	*	**	***
16	x	-	●	*	**	***
17	x	-	●	*	**	***
18	x	-	●	*	**	***
19	x	-	●	*	**	***
20	x	-	●	*	**	***

Keterangan: x = Pemberian akuades 2,5 ml, v = pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, ● = pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, \* = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, \*\* = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, \*\*\* = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades.

**Tabel 2.** Rata-rata kadar metil merkuri, nilai hematokrit, hemoglobin dan jumlah eritrosit dalam darah tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian perlakuan.

Kelompok Perlakuan	Kadar Metil Merkuri Darah (ppm)	Nilai Hematokrit (%)	Kadar Hg (g/dl)	Jumlah Eritrosit ( $10^6/\text{mm}^3$ darah)
I	0 <sup>a</sup>	45,50 <sup>a</sup>	13,128 <sup>a</sup>	8,480 <sup>a</sup>
II	1,923 <sup>b</sup>	41,67 <sup>a</sup>	8,123 <sup>b</sup>	4,230 <sup>b</sup>
III	1,015 <sup>c</sup>	44,50 <sup>a</sup>	10,763 <sup>c</sup>	6,067 <sup>c</sup>
IV	1,301 <sup>c</sup>	43,00 <sup>a</sup>	8,770 <sup>d</sup>	5,720 <sup>c</sup>
V	1,136 <sup>c</sup>	43,00 <sup>a</sup>	9,320 <sup>e</sup>	6,080 <sup>c</sup>
VI	1,027 <sup>c</sup>	43,50 <sup>a</sup>	10,195 <sup>f</sup>	6,697 <sup>c</sup>

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama dalam satu kolom menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan. I = Pemberian akuades 2,5 ml, II = pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, III = pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB dalam 2,5 ml akuades, IV = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, V = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades, VI = pemberian ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg BB dalam 2,5 ml akuades.

suatu antidotum, sehingga kadar metal merkuri dalam darah jauh lebih besar karena tidak ada senyawa aktif penurun kadar metil merkuri dalam darah, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan III (kontrol positif) yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein yang merupakan senyawa aktif penurun kadar metil merkuri, sehingga terjadi penurunan kadar metil merkuri yang hampir sama dengan kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan hampir sama dengan L-sistein. Dosis paling efektif untuk menurunkan kadar metil merkuri dalam darah adalah 5,834 g/kg BB. Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar mengandung senyawa aktif penurun kadar metil merkuri yang semakin besar juga.

Dari hasil isolasi flavonoid ekstrak daun sambung nyawa, Sudarto (1990) melaporkan keberadaan 2 macam senyawa flavonoid, yaitu kaempferol (suatu flavonol), flavonol, dan auron. Kemampuan ekstrak daun sambung nyawa dalam menurunkan kadar metil merkuri darah karena keberadaan flavonoid-flavonoid di dalamnya. Flavonoid-flavonoid tersebut mengandung gugus fungsi hidroksil sebagai donor elektron, sedangkan ion  $\text{Hg}^{2+}$  merupakan penerima elektron yang kuat. Adanya cincin aromatik yang sangat elektronegatif pada flavonoid akan menarik ion logam  $\text{Hg}^{2+}$  yang sangat elektropositif, sehingga ikatan antara ion logam  $\text{Hg}^{2+}$  dengan flavonoid dapat berupa ikatan kovalen yang disebut dengan kelat. Terbentuknya kelat stabil menyebabkan reaksi kimia biasa sebagai ion logam akan hilang dan dapat menurunkan kadar ion logam toksik dalam jaringan dengan mengikatnya sebagai kelat yang larut dan mudah diekskresikan oleh ginjal. Gugus  $-\text{OH}$  flavonoid bertindak sebagai ligan yang cenderung akan berikatan koordinasi dengan ion logam membentuk senyawa kompleks kelat, dalam hal ini ligan mempunyai pasangan elektron bebas. Menurut Pauling, atom O mempunyai tingkat

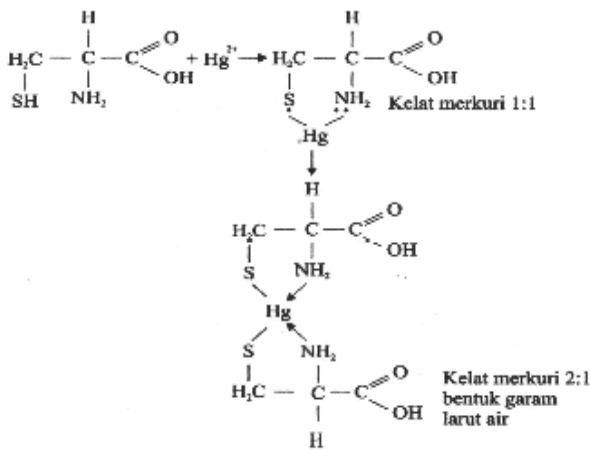
keelektronegatifan yang tinggi, yaitu 3,5. Sebaliknya, ion logam  $\text{Hg}^{2+}$  merupakan penerima elektron yang sangat kuat, karena termasuk dalam kelompok ion logam yang mempunyai subkulit  $-d$  yang terisi penuh dan untuk mencapai susunan elektron gas mulia berikutnya harus menerima 4 pasang elektron ( $s^2p^2$ ) (Rivai 1995). Akibatnya, ikatan antara ion logam  $\text{Hg}^{2+}$  dengan ligan dalam flavonoid dapat berupa ikatan kovalen seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2-4.

Penelitian Szymusiak dan Zielinski (2000) yang didukung oleh Afana's et al. (1989) dan Bors et al. (2000) melaporkan bahwa flavonoid jenis quercetin mempunyai kemampuan mengkelat ion logam berkation divalen, antara lain  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ , dan  $\text{Cu}^{2+}$ . Middleton et al. (2000) menyatakan bahwa flavonoid juga mempunyai kemampuan mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme berbagai macam xenobiotik yang bersifat lipofil. Lu (1995) mengatakan bahwa metil merkuri bersifat lipofilik sehingga mudah melintasi membran sel yang terdiri atas lapisan biomolekuler yang dibentuk oleh molekul lipid dengan molekul protein. Jika suatu logam telah terikat pada suatu protein maka senyawa tersebut akan diserap secara endositosis dan mendenaturasi protein. Chadhq (1995) menambahkan bahwa metil merkuri akan mengganggu secara seluler dengan cara membuat gugus  $-\text{SH}$  dalam tubuh menjadi inaktif.

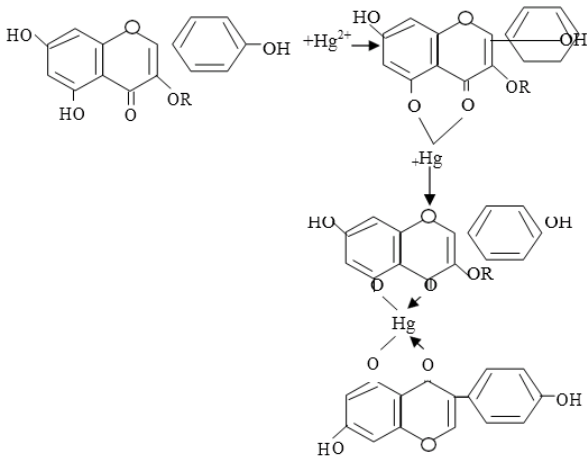
Cook dan Saaman (1996) menyatakan bahwa flavonoid merupakan antioksidan yang potensial mengikat radikal bebas. Cadenas dan Lester dalam Harun dan Syahri (2002) menambahkan bahwa aktivitas antioksidan flavonoid dilakukan dengan mereduksi radikal hidroksil, superoksida, dan radikal peroksil. Yang et al. (2001) telah melakukan penelitian dan menyimpulkan bahwa aktivitas antioksidan flavonoid tergantung pada potensial oksidasi senyawa tersebut dan struktur kimia flavonoid yang berperan dalam aktivitas antioksidan, yaitu struktur  $\text{O}^-$  dihidroksi pada cincin B, ikatan rangkap pada  $\text{C}_2$  dan  $\text{C}_3$  yang terkonjugasi dengan gugus okso dan adanya gugus hidroksil.

Berdasarkan hasil penelitian ini, kadar metil merkuri dalam darah menurun setelah pemberian ekstrak daun sambung nyawa dalam berbagai variasi dosis. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan mengkelat ion logam  $\text{Hg}^{2+}$  dan menangkap radikal bebas yang dipicu oleh pemberian metil merkuri klorida. Seperti telah diketahui bahwa radikal bebas dalam tubuh mampu berikatan dengan komponen seluler tubuh, sehingga dapat menimbulkan kerusakan pada sel darah merah.

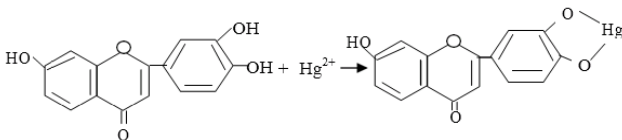
Metil merkuri bersifat menghambat kerja enzim mikrosom dalam retikulum endoplasma (RE) dan mengacaukan struktur RE tersebut (Goering et al. 1987; Lu 1995). Membran RE agranuler (REA) merupakan tempat enzim-enzim yang berperan dalam sintesis lipoprotein dan juga enzim-enzim yang berperan dalam proses detoksifikasi yang sebagian besar adalah sitokrom P-450. Senyawa yang bersifat racun dan berbahaya akan diubah menjadi tidak berbahaya. Di dalam membran REA, toksikan yang bersifat lipofilik akan dibuat inaktif oleh serangkaian reaksi yang umumnya oksidasi menggunakan  $\text{O}_2$



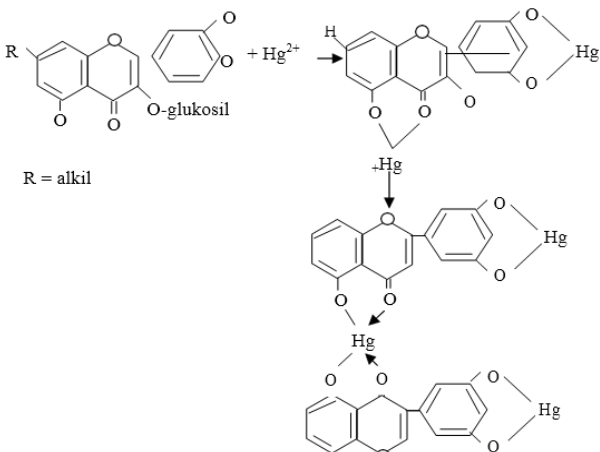
Gambar 1. Reaksi L-sistein dengan ion  $Hg^{2+}$ .



Gambar 2. Reaksi kaempferol dengan ion  $Hg^{2+}$ .



Gambar 3. Reaksi flavonol dengan ion  $Hg^{2+}$ .



Gambar 4. Reaksi auron dengan ion  $Hg^{2+}$ .

dan NADPH dengan bantuan katalisator NADPH-sitokrom P-450 reduktase dan sitokrom P-450. Hasil reaksi ini merupakan senyawa yang mudah larut dalam air. Flavonoid mempunyai kemampuan untuk mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme bermacam-macam xenobiotik yang lipofil (Middleton et al. 2000). Flavonoid alami maupun flavonoid sintetik telah dilaporkan mempunyai efek pada sistem P-450-monooksigenase (Sato dan Omura 1978) yang meliputi induksi sintesis dan aktivasi P-450 spesifik (Wood et al. 1982).

**Nilai hematokrit atau *Packed Cell Volume***

Hematokrit adalah perbandingan sel-sel darah merah dalam suatu volume darah tertentu, atau dengan kata lain hematokrit menunjukkan persentase eritrosit dari sejumlah darah. Nilai hematokrit diperoleh dengan prinsip bahwa setelah dilakukan sentrifugasi akan terjadi pengendapan eritrosit yang memisahkannya dari cairan plasma di bagian atas, dengan skala khusus hematokrit dapat diketahui persentase yang ditempati eritrosit (Wulangi 1993). Menurut Benjamin (1987), nilai hematokrit dapat digunakan untuk mengetahui abnormalitas darah dan merupakan cara yang sangat sederhana untuk dilakukan. Nilai ini umumnya sama manfaatnya dengan jumlah eritrosit total.

Nilai hematokrit tikus uji setelah 20 hari diberi perlakuan percobaan bernilai lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Nilai hematokrit tikus putih normal adalah 45-47% (Smith dan Mangkoewidjojo 1988). Dari uji Anava dan DMRT pada taraf signifikansi 5% diketahui bahwa masing-masing kelompok perlakuan tidak berbeda nyata.

Pada pemberian metil merkuri klorida dosis 2,99 mg/kg BB terjadi penurunan nilai hematokrit dibandingkan tikus kontrol (Tabel 2), hal ini menunjukkan adanya kecenderungan tikus untuk mengalami anemia yang ditandai dengan menurunnya konsentrasi eritrosit, dimana anemia yang terjadi masih bersifat regeneratif. Penurunan nilai hematokrit ini terjadi karena pemberian metil merkuri klorida dosis tinggi dapat mempengaruhi kestabilan membran eritrosit. Kerusakan membran sel dapat terjadi setelah pemaparan suatu toksikan. Metil merkuri klorida yang bersifat lipofilik mudah terabsorpsi ke dalam eritrosit melalui membran eritrosit.

Membran eritrosit yang selalu berhubungan dengan metil merkuri klorida akan terganggu kestabilannya akibat perubahan tekanan osmolaritas antara cairan sel dengan plasma, sehingga jumlah eritrosit yang stabil dalam darah hanya sebagian kecil saja, hal ini dapat diketahui dari menurunnya jumlah eritrosit. Pemberian metil merkuri klorida selama 10 hari mampu merusak membran eritrosit dan menyebabkan terjadinya hemolisis pada eritrosit. Membran eritrosit merupakan membran yang berhubungan dengan  $O_2$ . Membran yang berhubungan dengan  $O_2$  sering mengalami proses oksidasi. Radikal bebas yang terbentuk dari metil merkuri klorida yang merusak membran akan berinteraksi dengan  $O_2$  membentuk radikal peroksida, sehingga membran menjadi lemah dan akibatnya persentase eritrosit yang bertahan dalam darah akan menurun. Hal ini didukung oleh penelitian Hariono et al.

(1994) bahwa pemberian metil merkuri pada mencit bunting dan keturunannya menyebabkan penurunan nilai hematokrit pada minggu ke-9.

Pemberian L-sistein selama 10 hari (kelompok III) mampu memperbaiki nilai hematokrit pada tikus uji setelah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). Hal ini berarti L-sistein mampu memperbaiki kestabilan membran eritrosit yang semula terganggu akibat pemberian metil merkuri klorida. L-sistein bekerja pada tingkat seluler dan memisahkan unsur ion  $Hg^{2+}$  dari radikal -SH dalam enzim jaringan tubuh lalu membawa unsur tersebut ke cairan jaringan, masuk ke plasma, dan akhirnya diekskresikan menuju urine dalam bentuk kompleks yang larut dalam air dan bersifat non toksik. Katzung (1997) menambahkan bahwa zat ini berinteraksi langsung dengan ion logam  $Hg^{2+}$  dalam darah dan cairan jaringan serta mereaktivasi enzim seluler yang mengandung gugus -SH.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari (kelompok IV dan V) mampu memperbaiki nilai hematokrit pada tikus uji setelah terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). Hal ini berarti ekstrak daun sambung nyawa juga mampu memperbaiki kestabilan membran eritrosit yang semula terganggu akibat pemberian metil merkuri klorida dengan nilai hematokrit tertinggi terdapat pada pemberian ekstrak daun sambung nyawa dengan dosis tertinggi yaitu 5,834 g/kg BB. Hal ini karena kerja flavonoid dalam ekstrak daun sambung nyawa yang mampu mengikat ion logam  $Hg^{2+}$  dalam darah menjadi senyawa kompleks non toksik dan dapat dengan mudah diekskresikan dari tubuh melalui urine. Akumulasi metil merkuri yang semula ada dalam tubuh dapat dengan cepat diekskresikan, sehingga tubuh dapat melakukan proses fisiologi yang normal kembali. Hal ini didukung oleh penelitian Gultom (2003) yang mengatakan bahwa flavonoid mampu meningkatkan jumlah hematokrit, hemoglobin, dan eritrosit pada tikus yang diinduksi  $CCl_4$ .

### Kadar hemoglobin (Hb)

Hemoglobin adalah komponen eritrosit yang terdiri dari protein globin yang berkombinasi dengan heme, berfungsi sebagai alat transportasi  $O_2$  dan  $CO_2$ . Penetapan kadar tersebut sering dilakukan sebagai pemeriksaan terhadap adanya anemia (Tahono et al. 2000).

Anemia dapat terjadi karena adanya gangguan pada sintesis Hb. Sintesis Hb dimulai dalam eritoblast dan terus berlangsung sampai tingkat retikulosit, dimulai dengan pembentukan senyawa pirol, lalu 4 senyawa pirol bersatu membentuk senyawa protoporfirin yang kemudian berikatan dengan besi membentuk molekul heme. Akhirnya, 4 molekul heme berikatan dengan 1 molekul globin yang merupakan suatu globulin yang disintesis dalam ribosom RE membentuk Hb (Guyton 1991).

Berdasarkan data yang diperoleh, terlihat bahwa rata-rata kadar Hb darah tikus uji setelah 20 hari diberi masing-masing perlakuan lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Dari hasil uji Anava dan DMRT pada taraf signifikansi 5%, diketahui bahwa masing-masing kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang signifikan (Tabel 2). Kelompok kontrol memiliki rata-rata kadar Hb darah paling tinggi

sebesar 13,128 g/dl. Kadar Hb pada tikus putih normal adalah 13 g/dl (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

Kelompok perlakuan yang diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB memiliki rata-rata kadar Hb darah paling rendah sebesar 8,123 g/dl. Penurunan kadar Hb darah ini terjadi akibat keluarnya Hb dari eritrosit menuju cairan di sekelilingnya karena dirusak oleh xenobiotik metil merkuri klorida. Selain itu, kondisi tersebut juga disebabkan oleh inaktivasi enzim  $\delta$ -Amino Levulinic Acid Dehydratase ( $\delta$ -ALAD). Inaktivasi enzim  $\delta$ -ALAD tersebut berhubungan dengan peran Fe dalam sintesis Hb, yaitu terletak pada heme. Heme merupakan komponen Hb yang berikatan dengan globin dan merupakan porfirin tipe III (protoporfirin) yang mengandung Fe (Guthrie 1980; Lehninger 1982). Inaktivasi enzim  $\delta$ -ALAD oleh metil merkuri klorida menyebabkan pembentukan porfobilinogen, uroporfirinogen, dan protoporfirin menjadi terhambat, sehingga heme tidak dapat dihasilkan karena tidak adanya protoporfirin yang mengikat Fe. Metil merkuri klorida merupakan zat lipofilik yang dapat menumpuk di membran sel dan mengganggu transpor  $O_2$  dan glukosa ke dalam sel (Darmono 1995). Pengikatan, pengangkutan, dan pelepasan  $O_2$  oleh Hb tidak tergantung pada eritrosit, tetapi eritrosit memerlukan energi yang diperoleh dari metabolisme anaerobik glukosa. Terganggunya transpor  $O_2$  dan glukosa menyebabkan eritrosit tidak dapat mempertahankan gradien elektrolit normal pada membran plasma, mempertahankan atom Fe dari Hb dalam bentuk divalen, dan mempertahankan gugus -SH dari enzim sel merah dan Hb dalam bentuk aktif. Hal ini didukung oleh penelitian Hariono et al. (1994) yang menyatakan bahwa terjadi penurunan kadar Hb pada mencit yang dipapari metil merkuri karena terjadi inaktivasi enzim  $\delta$ -ALAD darah melalui pembentukan ikatan kation metil merkuri terhadap gugus -SH.

Kelompok perlakuan yang diberi L-sistein 5,4 mg/kg BB selama 10 hari mampu memperbaiki kadar Hb dalam darah tikus putih setelah dipapari metil merkuri klorida selama 10 hari (Tabel 2). L-sistein mempunyai 2 gugus reaktif terhadap ion logam  $Hg^{2+}$ , yaitu gugus sulfhidril (-SH) dan gugus amina (-NH<sub>2</sub>) yang dapat membentuk molekul kelat yang mudah diekskresikan.

Pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari mampu memperbaiki kadar Hb darah tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari. Perlakuan ekstrak daun sambung nyawa pada berbagai dosis menunjukkan peningkatan kadar Hb darah yang sebanding dengan kenaikan dosis ekstrak daun sambung nyawa. Semakin besar dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan, kadar Hb darah semakin meningkat. Dosis yang paling efektif meningkatkan kadar Hb darah adalah 5,834 g/kg BB. Perlakuan ini memiliki rata-rata kadar Hb darah yang berbeda nyata satu sama lain (Tabel 2). Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar terjadi karena mengandung senyawa aktif yang juga semakin besar. Perbaikan kadar Hb belum sampai mendekati kadar Hb pada tikus putih normal, karena eritrosit yang ada baru terbentuk, sehingga Hb yang ada pada eritrosit belum mencapai kadar yang optimal. Jumlah Hb yang belum

stabil menyebabkan kemampuan Hb untuk mengikat O<sub>2</sub> juga belum optimal.

### Jumlah eritrosit

Jumlah eritrosit merupakan salah satu parameter penting untuk menilai kesehatan, mengingat perannya yang sangat besar dalam mengangkut O<sub>2</sub> ke seluruh tubuh (Loomis 1978). Berdasarkan data yang diperoleh, terlihat bahwa rata-rata jumlah eritrosit pada tikus putih setelah 20 hari diberi perlakuan lebih rendah dibandingkan tikus kontrol. Jumlah eritrosit pada tikus putih normal adalah  $(7,2-9,6) \times 10^6$  sel/mm<sup>3</sup> darah (Smith dan Mangkoewidjojo 1988). Kelompok perlakuan yang diberi metil merkuri klorida 2,99 mg/kg BB menunjukkan penurunan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok I. Kondisi ini menyebabkan kecenderungan tikus mengalami anemia, karena jumlah eritrosit berada di bawah kisaran normal. Penurunan jumlah eritrosit ini terjadi karena adanya kematian sel induk dan terjadinya perpanjangan interfase antara mitosis yang satu dengan mitosis berikutnya, terutama pada sumsum tulang. Eritrosit mengandung bermacam-macam enzim, di antaranya glutathion tripeptid yang merupakan  $\gamma$ -glutamilsisteinilglisin. Konsentrasi glutathion dalam darah sekitar 1 mmol/L, sebagian besar terdapat dalam eritrosit. Glutathion dapat disintesis dari komponen asam amino dalam eritrosit. Glutathion merupakan pereduksi alami karena mengandung gugus -SH. Eritrosit mengandung reduktase glutathion yang mengkatalisis reduksi glutathion teroksidasi. Substrat kedua untuk enzim ini adalah NADPH. Dalam eritrosit juga terdapat reduktase dehidroaskorbat yang memberi hubungan langsung antara glutathion dan hemoglobin. Metil merkuri klorida akan mengikat secara bolak-balik gugus -SH dalam eritrosit. Reaksi pengikatan ini akan mempengaruhi pembentukan sel-sel darah dalam sumsum tulang dan menghambat pembentukan hemoglobin.

Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein 5,4 mg/kg BB selama 10 hari menunjukkan kenaikan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok II, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok IV, V, dan VI (Tabel 2). Peningkatan jumlah eritrosit ini terjadi karena L-sistein mampu mengekskresikan metil merkuri klorida yang terakumulasi dalam tubuh, khususnya dalam eritrosit, sehingga fungsi-fungsi fisiologis dalam tubuh dapat berjalan normal kembali. Penurunan jumlah eritrosit terjadi karena toksisitas ini mempengaruhi terbentuknya eritropoietin dan merangsang terjadinya eritropoiesis dalam sumsum tulang belakang.

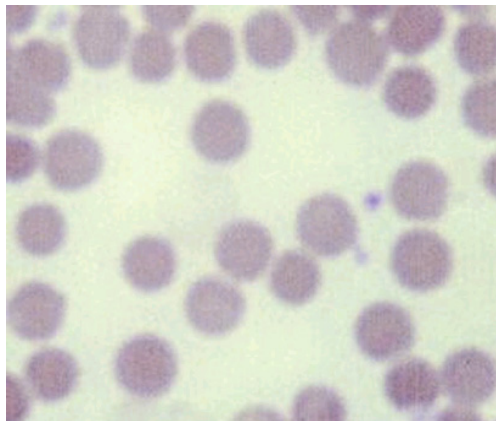
Kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa selama 10 hari menunjukkan kenaikan jumlah eritrosit yang berarti. Dari hasil uji DMRT 5%, diketahui bahwa kelompok perlakuan ini berbeda nyata dengan kelompok II (kontrol negatif) yang hanya dipapari metil merkuri klorida tanpa dilanjutkan dengan pemberian suatu antidotum, sehingga jumlah eritrosit jauh lebih rendah karena tidak ada senyawa aktif yang mampu memperbaiki jumlah eritrosit, namun

tidak berbeda nyata dengan kelompok perlakuan III (kontrol positif) yang dilanjutkan dengan pemberian L-sistein yang merupakan senyawa aktif penurun kadar metil merkuri darah, sehingga terjadi perbaikan jumlah eritrosit yang hampir sama dengan kelompok perlakuan yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun sambung nyawa mempunyai kemampuan hampir sama dengan L-sistein (Tabel 2). Perlakuan ekstrak daun sambung nyawa dalam berbagai dosis menunjukkan peningkatan jumlah eritrosit sebanding dengan peningkatan dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan, sehingga jumlah eritrosit semakin meningkat. Dosis yang paling efektif meningkatkan jumlah eritrosit tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida adalah dosis 5,834 g/kg BB. Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang semakin besar karena mengandung senyawa aktif yang juga semakin besar untuk memperbaiki jumlah eritrosit. Telah diketahui sebelumnya bahwa tikus yang terpapar metil merkuri klorida selama 10 hari mempunyai kadar hemoglobin dan jumlah eritrosit yang sangat rendah jauh dari normal. Penurunan jumlah eritrosit dapat mempengaruhi terbentuknya eritropoietin dan merangsang terjadinya eritropoiesis. Penurunan kadar hemoglobin darah menyebabkan jumlah O<sub>2</sub> yang ditranspor ke jaringan akan berkurang dan biasanya akan meningkatkan kecepatan pembentukan eritrosit. Hal ini disebabkan jumlah O<sub>2</sub> yang menurun akan mengakibatkan hati melepaskan lebih banyak globulin dan ginjal memproduksi lebih banyak faktor eritropoietik ginjal. Di dalam darah, globulin dan faktor eritropoietik ginjal akan saling mengadakan interaksi membentuk eritropoietin yang kemudian merangsang terjadinya eritropoiesis. Kemampuan flavonoid pada ekstrak daun sambung nyawa dalam memperbaiki jumlah eritrosit pada tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida disebabkan oleh kemampuannya dalam mengaktifkan dan menginduksi sintesis enzim mula-mula yang terlibat dalam metabolisme metil merkuri klorida yang merupakan xenobiotik lipofil, seperti yang telah dikemukakan oleh Middleton et al. (2000).

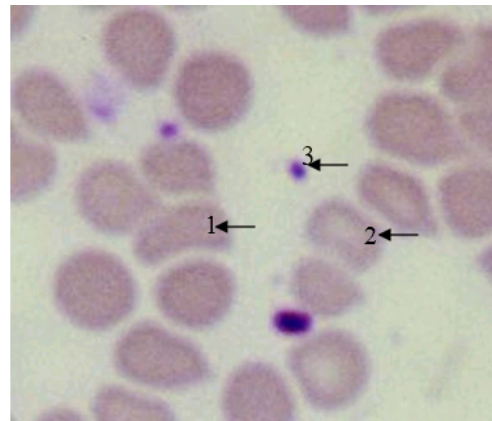
### Perubahan morfologi eritrosit

Gambaran morfologi eritrosit merupakan salah satu indikator dari berbagai perubahan patologis dalam tubuh (Leeson et al. 1996). Secara morfologi, eritrosit berbentuk cakram bikonkaf dan jika dilihat pada bidang datar berbentuk bulat. Pada penyakit-penyakit tertentu ditemukan eritrosit-eritrosit yang telah berubah bentuk di dalam peredaran darah. Eritrosit bersifat elastis dan mampu berubah bentuk (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

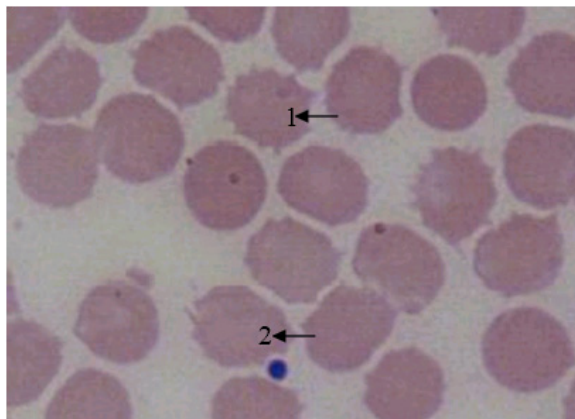
Secara morfologi, setelah 20 hari diberi perlakuan, semua kelompok mengalami perubahan morfologi eritrosit, antara lain terdapat eritrosit berbentuk topi, paku payung, poikilositosis (bentuk bervariasi), dan anulositosis (eritrosit tanpa inti) seperti yang terlihat pada **Gambar 5-10**, kecuali pada kelompok I (plasebo).



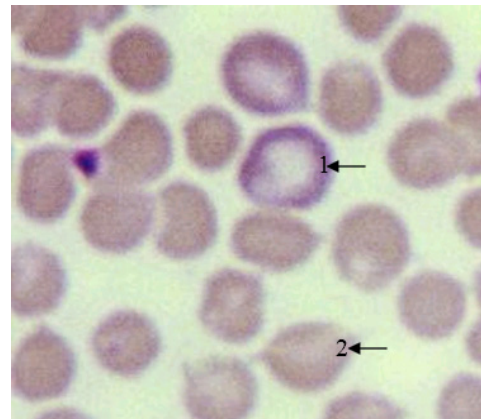
**Gambar 5.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) kontrol. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



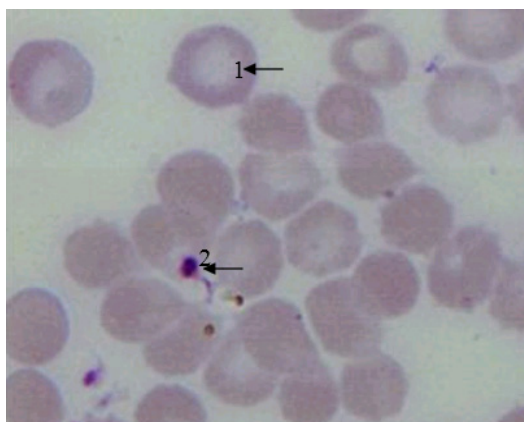
**Gambar 8.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 1,945 g/kg. 1 = Eritrosit berbentuk topi, 2 = poikilositosis, 3 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



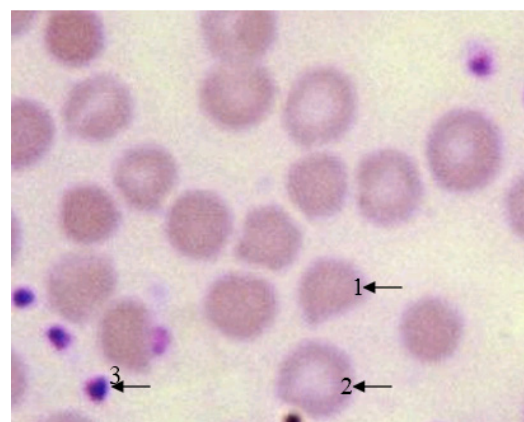
**Gambar 6.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg. 1 = Eritrosit berbentuk paku payung, 2 = poikilositosis. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



**Gambar 9.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 3,889 g/kg. 1 = Anulosis, 2 = eritrosit berbentuk topi. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



**Gambar 7.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan L-sistein 5,4 mg/kg. 1 = Anulosis, 2 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa



**Gambar 10.** Morfologi eritrosit tikus putih (*R. norvegicus*) setelah pemberian metil merkuri klorida 2,99 mg/kg dilanjutkan dengan ekstrak daun sambung nyawa 5,834 g/kg. 1 = Eritrosit berbentuk topi, 2 = anulosis, 3 = trombosit. Perbesaran: 1000x, Pewarnaan: Giemsa

Perubahan morfologi eritrosit terjadi karena hemolisis membran eritrosit yang merupakan salah satu membran yang berhubungan dengan O<sub>2</sub> dan sering mengalami oksidasi. Radikal bebas dari metil merkuri klorida bergabung dengan O<sub>2</sub> yang diikat Hb membentuk ikatan radikal peroksida yang kemudian menyerang membran eritrosit, sehingga menyebabkan tidak stabilnya struktur membran tersebut. Metil merkuri klorida yang bersifat lipofilik dapat menumpuk pada membran sel dan mengganggu transport O<sub>2</sub> dan glukosa ke dalam sel. Ion Hg<sup>2+</sup> akan membentuk kompleks dengan basa-basa fosfolipid dan memperluas permukaan membran, sehingga fungsi membran berubah. Hal ini menyebabkan hilangnya fungsi Hb sebagai pembawa O<sub>2</sub>. Selain itu, tanpa adanya glukosa, eritrosit tidak dapat mengganti enzim dan protein membran yang telah usang, sehingga kemampuan memompa ion Na<sup>+</sup> keluar sel dan menarik air akan menurun, sehingga sel tidak lagi berbentuk bulat.

Pada kelompok perlakuan III, masih terdapat kelainan morfologi pada eritrosit, tetapi lebih sedikit dibanding kelompok perlakuan II, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7 dengan adanya eritrosit yang cenderung berbentuk elips (tidak bulat). Hal ini menunjukkan bahwa L-sistein belum efektif menstabilkan morfologi eritrosit. Ketidakstabilan morfologi eritrosit tersebut disebabkan adanya penyerangan radikal bebas pada membran eritrosit oleh akumulasi metil merkuri klorida. Ikatan radikal bebas-oksigen yang terbentuk dapat menimbulkan stres oksidatif dalam membran sel yang ditunjukkan dengan terbentuknya sel-sel yang tidak normal.

Berdasarkan hasil pengamatan pada Gambar 8-10, terlihat bahwa dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa pada tikus uji pasca pemaparan metil merkuri klorida terdapat sedikit perbaikan pada morfologi eritrosit, dimana kelompok perlakuan VI mempunyai kelainan morfologi eritrosit paling sedikit. Hal ini berarti bahwa perbaikan morfologi eritrosit dengan pemberian ekstrak daun sambung nyawa meningkat seiring dengan meningkatnya variasi dosis. Namun demikian, perbaikan yang dihasilkan belum mendekati normal. Hal ini diduga disebabkan oleh dosis ekstrak daun sambung nyawa yang diberikan belum mampu mengembalikan fungsi normal sel, sehingga struktur sel belum kembali dalam keadaan normal.

### KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa: (i) Pemberian ekstrak daun sambung nyawa dosis 1,945; 3,889; dan 5,834 g/kg BB dapat menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih yang meliputi kadar hemoglobin, jumlah eritrosit, dan morfologi eritrosit; (ii) Dosis ekstrak daun sambung nyawa yang paling efektif menurunkan kadar metil merkuri dalam darah dan memperbaiki karakteristik eritrosit tikus putih yang terpapar metil merkuri klorida adalah 5,834 g/kg BB; serta (iii) Ekstrak daun sambung nyawa dapat digunakan

sebagai alternatif antidotum alami untuk memperbaiki efek negatif yang ditimbulkan oleh metil merkuri klorida.

### DAFTAR PUSTAKA

- Afana's ev IB, Dorozkho AI, Brodsk AV et al. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38: 1763-1769.
- Ariens EJ, Mutschler E, Simonis AM. 1994. Toksikologi umum. Alih bahasa: Wattimena YR, Mathilda B, Widiyanto et al. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 1997. Toxicological profile for mercury. Draft for Public Comment (UPDATE). Prepared by Research Triangle Institute Under Contract No. 205-93-0606. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, USA.
- Athens, Tugawati AT, Sukar. 1992. Kandungan logam berat (Hg, Cl, dan Pb) dalam air tanah pada perumahan tipe kecil di Jabotabek. *Buletin Penelitian Kesehatan* 24(4): 18-27.
- Beayens W. 1992. Speciation of mercury in different compartment of the environment. *Trends Anal Chem* 11: 245-254.
- Beim AM, Groshva EI. 1991. Ecological chemistry of mercury contained in bleached jraft pulp mill effluents. Institute of Ecotoxycology, USSR, Baikalsk.
- Benjamin SS. 1987. Outline of veterinary clinical pathology. 3<sup>th</sup> edition. The Iowa State University Press, Iowa.
- Berlin M, Nordberg G, Hellberg J. 1973. The uptake and distribution of methyl mercury in the brain of samiri sciureus in relation behavioral and morphological changes. In: Miller M, Clarkson T (eds). *Mercury, Mercurials, and Mercaptan*. Springfield.
- Bors W, Michel C, Stettmaier K. 2000. Flavonoids and their free radical reaction. Oxygen. Society Education Program. The Virtual Free Radical School, Germany.
- Buck WB, Osweiler GD. 1976. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. 2<sup>nd</sup> edition. In: Van Gelder GA. Kendall/Hunt Publishing Company.
- Chadhq PV. 1995. Catatan kuliah ilmu forensik dan toksikologi. In: Kartini A (ed). *Handbook of Forensic Medicine and Toxicology Medical Jurisprudence*. Alih Bahasa: Hutauruk J. Widya Medica, Jakarta.
- Clarke ML, Harvey DG, Humphreys DJ. 1981. *Veterinary toxicology*. 2<sup>nd</sup> edition. The English Language Book Society and Baillie, Tindall.
- Cook NY, Saaman S. 1996. Review: Flavonoid, chemistry, metabolism, cardioprotective, effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem* 7: 66-67.
- Darmansjah I. 1995. *Dasar toksikologi*. Edisi ke-4. Gaya Baru, Jakarta.
- Darmono. 1995. *Logam dalam sistem biologi makhluk hidup*. Indonesia University Press, Jakarta.
- Estes GO, Knoop WE, Houghton FD. 1973. Soil plant response to surface-applied mercury. *J Environ Qual* 2: 451-452.
- Eva F, Sabu EP, Sudarso. 1993. Penelitian toksisitas akut ekstrak etanol daun beluntas china (*Gynura procumbens* Backer) pada mencit putih. *Risalah Simposium Penelitian Tumbuhan Obat VII*. Jurusan Farmasi Fakultas MIPA, UNHAS, Makasar.
- Fujiki M. 1973. The transitional condition of minamata bay and neighbouring sea polluted by factory waste water containing mercury. *Advances in Water Pollution Research*. Proceeding of the 6<sup>th</sup> International Conference. Pergamon Press, Oxford.
- Gandasoebrata R. 1992. *Penuntun laboratorium klinik*. Dian Rakyat, Jakarta.
- Goering PL, Mistry P, Fowler BA. 1987. Mechanism of metal toxicity. In: Haley TJ, Berndt WO (eds). *Handbook of Toxicology*. Hemisphere, New York.
- Gultom MLR. 2003. Pengaruh Flavonoid terhadap Jumlah Eritrosit, Hemoglobin, PCV Tikus yang Diinduksi Karbon Tetra Klorida. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Guthrie FE. 1980. Absorption and distribution. In: Hodgson E, Guthrie FE (eds). *Introduction to Biochemical Toxicology*. Elsevier, New York.
- Guyton CA. 1991. *Fisiologi manusia dan mekanisme penyakit*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Harun N, Syahri W. 2002. Aktivitas antioksidan ekstrak daun *Gynura procumbens* (Lour) Merr. dalam menghambat sifat hepatotoksik

- halotan dengan dosis subanestesi pada mencit. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 2(7): 63-70.
- Hariono B, Santosa EB, Soesanto M. 1994. Pengaruh senyawa metil merkuri terhadap kadar enzim  $\delta$ -Amino Levulinic Acid Dehydratase, gambaran darah, dan histopatologi ginjal, hati, dan otak mencit bunting dan keturunannya. Laporan Penelitian. Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hodgson E, Levi PE. 2000. *Textbook of Modern Toxicology*. 2<sup>nd</sup> edition. The Mc. Graw-Hill Companies, Inc., Singapore.
- Hunter D. 1969. *The Disease of Occupation*. Little Brown, London.
- Katzung BG. 1997. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi ke-6. In: Agoes HA (ed). EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Lourence DR, Bacharach AL. 1964. *Evaluation of drug activities*. Academic Press, London.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. 1996. *Buku ajar histologi*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Lehninger AL. 1982. *Dasar-dasar biokimia*. Erlangga, Jakarta.
- Loomis TA. 1978. *Toksikologi dasar*. Edisi ke-3. IKIP Press, Semarang.
- Lu FC. 1995. *Toksikologi dasar: Asas, organ sasaran, dan penilaian resiko*. Edisi ke-2. IU Press, Jakarta.
- Middleton EJr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev* 52(4): 673-751.
- Modell W, Schild HO, Wilson A. 1976. *Applied Pharmacology*. American Ed., Saunders, Philadelphia.
- Murray TRK, Granner DK, Mayes PA et al. 1999. *Biokimia Harper*. EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Mutschler E. 1991. *Dinamika obat*. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung.
- Oda EE, Ingle JD. 1981. Continuous flow cold vapor atomic absorption determination of mercury. *Anal Chem* 53: 2030-2031.
- Rivai H. 1995. *Asas pemeriksaan kimia*. IU Press, Jakarta.
- Sato R, Omura T. 1978. *Cytochrome P-450*. Academic Press, New York.
- Schunack W, Mayer K, Haake M. 1990. *Senyawa obat*. Buku Pelajaran Kimia Farmasi. Edisi II. In: Padmawinata K (ed). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan pembiakan dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis*. Indonesia University Press, Jakarta.
- Sudarto B. 1990. *Studi Farmakognosi Tumbuhan Gynura procumbens (Lour) Merr.* [Tesis]. Fakultas Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Sugiyanto, Soegihardjo CJ, Meiyanto E. 1994. Uji anti karsinogenik rutin, flavonol dan sari etanol daun *Gynura procumbens* dengan metode *new born mice*. Laporan Penelitian. Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Szymusiak H, Zielinski R. 2000. Structure and binding sites of most stable chelates of neutral, mono- and di-deprotonated forms of quercetin with divalent metal cations. Department of Technology and Environmental Protection, Faculty of Commodity, Poznan, Poland.
- Tahono, Hadiwidodo, Yuwono et al. 2000. *Patologi klinik I*. Pengantar Analisa Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran. UNS Press, Surakarta.
- Taras MJ, Greedberg AE, Hoak RD et al. 1971. *Standard methods for eximination of waste water*. Thirtieth edition. American Public Health Association, Washington.
- Tjokronegoro A. 2000. *Pemeriksaan laboratorium sederhana*. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- US PHS [US Public Health Service]. 1988. *Draft toxicological profile for mercury*. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. US Public Health Service, GA EPA, Atlanta.
- Wood AJ. 1982. *Drug receptor interactions*. Drug Anesthesia. In: Ood M, Wood AJJ. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Wulangi KS. 1993. *Prinsip-prinsip fisiologi hewan*. Proyek Pembinaan Tenaga Kependidikan. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktur Jenderal Perguruan Tinggi, Jakarta.
- Yang B, Kotani A, Kusu F. 2001. Estimation of the antioxidant of flavonoids from their oxidation potentials. *Anal Sci* 17: 599- 604.

## Pertumbuhan dan kandungan reserpin kultur kalus *Rauvolfia verticillata* pada variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS

### The growth and reserpine content of callus culture of *Rauvolfia verticillata* on the variation of sucrose concentration in MS medium

IRMAWATI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 30 Januari 2007. Revisi disetujui: 27 Februari 2007.

**Abstract.** Irmawati, Solichatun, Anggarwulan E. 2007. The growth and reserpine content of callus culture of *Rauvolfia verticillata* on the variation of sucrose concentration in MS medium. *Biofarmasi* 5: 38-46. The aim of this research was to study the effect of the variation of sucrose concentration on the growth and reserpine content on callus culture of *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon. The research was conducted with callus culture method consisted of two stages. The first stage was callus initiation to induce callus from leaf explant of *R. verticillata*, and the second stage was the reserpine production on treatment medium. This research used a Completely Randomized Design (CRD) by one factor, i.e. the variation of sucrose concentration. The sucrose concentration consisted of five levels, i.e. 0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L and 40 g/L, each concentration in five replicates. The collected data consisted of qualitative and quantitative data. The qualitative data, callus morphology, was presented descriptively. The quantitative data, included fresh weight callus, dry weight callus and reserpine content, were analyzed by using ANOVA and followed by DMRT at 5% significance level. The result of research showed that the variation of sucrose concentration influenced fresh weight callus, dry weight callus and reserpine content. The increasing of sucrose concentration tended to raise callus growth, which could be seen from the fresh and dry weight callus. The highest fresh weight callus was found in medium with sucrose concentration of 20 g/L, while the highest dry weight callus was found in medium with sucrose concentration of 40 g/L. The increasing of sucrose concentration until 30 g/L raised reserpine content, but the sucrose concentration over 30 g/L decreased the reserpine content.

**Keywords:** Callus growth, *Rauvolfia verticillata*, reserpine, sucrose

#### PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan masalah yang sangat penting dalam kehidupan. Berbagai jenis penyakit sekarang ini banyak menyerang masyarakat. Sejalan dengan hal itu, berbagai jenis obat-obatan telah dimanfaatkan untuk mengatasi penyakit, baik obat sintetik maupun obat alami (tradisional). Salah satu bahan baku obat adalah senyawa-senyawa kimia yang terdapat dalam tumbuhan. Tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat misalnya *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon. Tumbuhan ini mengandung senyawa kimia reserpin yang bermanfaat sebagai obat tekanan darah tinggi (antihipertensi) (LIPI 1999).

Kebutuhan senyawa kimia dalam tumbuhan obat semakin meningkat, tetapi keberadaan tumbuhan yang bersangkutan semakin langka. Kelangkaan tumbuhan obat ini diantaranya disebabkan oleh penggunaan yang terus-menerus serta laju pemanenan dan pemanfaatan yang lebih tinggi dibanding laju kemampuan alam untuk memulihkan populasinya. Untuk mengatasi hal tersebut dibutuhkan suatu teknologi agar diperoleh senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan secara optimal dengan tidak menyebabkan kepunahan tumbuhan yang bersangkutan (Mulabagal dan Tsay 2004).

Kultur in vitro merupakan salah satu teknik yang dapat digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder hanya

dengan menggunakan bagian tertentu dari suatu tumbuhan. Dengan kultur in vitro, produksi metabolit sekunder dapat diperoleh setiap saat karena tidak tergantung pada kondisi lingkungan, seperti iklim dan kondisi tanah (Fisher et al. 1999). Menurut Ramachandra (2000), produksi metabolit sekunder yang bernilai ekonomi tinggi melalui kultur in vitro dapat diperoleh melalui beberapa metode khusus antara lain pemilihan klon sel, pemberian prekursor, elisitasi, serta manipulasi faktor lingkungan dan media.

Optimalisasi produksi metabolit sekunder dengan manipulasi media dapat dilakukan dengan cara memanipulasi faktor fisik dan optimalisasi elemen nutrisi (Choi et al. 1994 dalam Mulabagal dan Tsay 2004). Penambahan sumber karbon pada media kultur dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder. Menurut Manuhara (1995), kandungan alkaloid vinkristin *Catharanthus roseus* meningkat setelah penambahan sumber karbon berupa sukrosa pada media kultur. Penambahan kombinasi sukrosa dan glukosa juga dapat meningkatkan kandungan saponin pada kultur kalus *Talinum paniculatum* (Suskendriyati 2003).

Berdasarkan uraian tersebut di atas, penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh pemberian variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk: (1) mempelajari

pengaruh variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus *R. verticillata*, dan (2) mempelajari pengaruh variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS terhadap kandungan reserpin kalus *R. verticillata*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama enam bulan yaitu bulan Mei-November 2006, bertempat di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta.

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan sebagai berikut. Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan adalah *Rauvolfia verticillata* yang diperoleh dari Tawangmangu, Karanganyar. Daun *R. verticillata* yang digunakan adalah daun ketiga dari pucuk. Bahan yang digunakan untuk sterilisasi eksplan adalah air mengalir, akuades steril, Dithane 3%, agrape 2%, dan alkohol 70%. Bahan-bahan untuk pembuatan media inisiasi kalus terdiri dari bahan-bahan kimia pada komposisi dasar media Murashige Skoog (MS), bahan pematat berupa agar 7 g/L, KOH 1N, HCl 1N, NAA 2 mg, kinetin 2 mg, dan akuades. Media perlakuan menggunakan bahan-bahan kimia seperti pada media inisiasi kalus yang ditambah sukrosa dengan variasi konsentrasi 0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40 g/L (modifikasi dari Manuhara 1995; Suskendriyati 2003). Bahan kimia yang digunakan untuk analisis kandungan reserpin adalah etanol p.a., akuabides, asam sulfamat 5%, sodium nitrit 0,3%, dan senyawa reserpin murni.

Alat-alat yang digunakan sebagai berikut. Untuk sterilisasi alat dan media digunakan autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm. Peralatan yang digunakan meliputi timbangan analitik, gelas beker, gelas ukur, pipet volume, pipet tetes, spatula, pH-meter, botol kultur, *aluminium foil*, *hot plate* dengan *magnetic stirrer*, kertas label, dan karet gelang. Alat-alat yang digunakan adalah *laminar air flow cabinet*, *bunsen burner*, cawan petri, gunting, pinset, skalpel, tisu, dan *hand sprayer*. Alat yang digunakan meliputi mortar dan *pestle*, tabung reaksi, pipet volum, kertas saring, vorteks, *waterbath*, dan spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu UV-160 IPC).

### Rancangan percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor perlakuan, yaitu penambahan sukrosa dengan lima taraf konsentrasi (0 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40g/L) dengan lima ulangan. Penentuan taraf perlakuan ini berdasarkan pada penelitian yang telah dilakukan oleh Manuhara (1995) dan Suskendriyati (2003).

### Cara kerja

#### *Sterilisasi alat*

Alat-alat dan botol kultur dicuci dengan detergen, dibilas dengan air kemudian dikeringkan. Setelah kering,

botol kultur dan alat yang berbentuk botol atau tabung ditutup dengan *aluminium foil*, sedangkan alat-alat lainnya seperti skalpel, pinset, spatula, dan pipet dibungkus dengan kertas. Semua alat dan botol kultur disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama satu jam.

#### *Pembuatan larutan stok*

Bahan-bahan kimia untuk stok media MS ditimbang, kemudian dilarutkan dalam 50 ml akuades dalam gelas beker dan diaduk dengan *magnetic stirrer*. Setelah bahan larut, volume ditetapkan hingga 100 ml, kemudian larutan dimasukkan ke dalam botol stok dan diberi label. Untuk larutan Fe EDTA, setelah larutan Na<sub>2</sub>EDTA dilarutkan baru ditambahkan serbuk Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Setelah bahan kimia larut, volume ditetapkan hingga 100 ml, kemudian dimasukkan dalam botol stok dan diberi label. Semua botol berisi larutan stok ditutup dengan *aluminium foil*, lalu disimpan dalam lemari es.

#### *Pembuatan media: Media inisiasi kalus*

Gelas beker volume 1 liter diletakkan di atas *hot plate* dan diisi dengan akuades hingga sepertiganya, kemudian masing-masing larutan stok dimasukkan sesuai dengan komposisi media MS. Sukrosa 30 g ditambahkan ke dalam gelas piala dan diaduk hingga larut sempurna. Campuran diaduk setiap kali penambahan larutan hingga larut sempurna. Kemudian akuades dimasukkan hingga  $\frac{3}{4}$  bagian dari kapasitas gelas beker. Keasaman (pH) larutan media diukur dengan pH-meter pada kisaran 5,6-5,8. Apabila pH larutan terlalu tinggi maka ditambahkan HCl 1N tetes demi tetes untuk menurunkan pH dan apabila pH larutan terlalu rendah maka ditambah dengan KOH 1N untuk menaikkan pH. Larutan diaduk dengan *magnetic stirrer* hingga diperoleh pH yang diharapkan. Zat pengatur tumbuh (NAA 2 mg dan kinetin 2 mg) ditambahkan ke dalam larutan. Setelah itu, agar sebanyak 8 g dimasukkan, lalu ditambah akuades hingga volume total 1 liter. Media dimasak hingga mendidih, setelah itu dituangkan ke dalam botol kultur steril sebanyak 25 ml per botol. Botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil* dan diberi label. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Media yang telah disterilkan didinginkan dan disimpan pada rak media.

#### *Pembuatan media: Media perlakuan*

Pembuatan media perlakuan sama seperti pada media inisiasi kalus, tetapi dengan penambahan sukrosa sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

#### *Sterilisasi eksplan*

Daun *R. verticillata* dicuci dengan air mengalir serta dibuang bagian daun yang kotor dan mati. Setelah itu, daun direndam dalam larutan Dithane 3% selama 2 menit, lalu akuades steril selama 5 menit. Kemudian daun direndam dalam larutan agrape 2% selama 3 menit, lalu akuades steril selama 5 menit. Setelah itu, daun direndam dalam alkohol 70% selama 30 detik, lalu akuades steril tiga kali masing-masing selama 5 menit.

#### *Penanaman eksplan*

Eksplan yang telah disterilkan ditanam dalam media inisiasi kalus. Penanaman eksplan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet* yang telah disinari sinar UV minimal 1 jam sebelumnya. Botol kultur yang telah berisi eksplan ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi selama 30 hari.

#### *Pemeliharaan eksplan*

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi kalus dipindah ke media perlakuan. Pemindahan kalus dilakukan pada hari ke-30. Pemindahan dilakukan secara aseptik ke dalam *laminar air flow cabinet* dengan menggunakan pinset steril. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 15 hari.

#### *Penanaman kalus pada media perlakuan*

Kalus yang diperoleh dari media inisiasi kalus dipindah ke media perlakuan. Pemindahan kalus dilakukan pada hari ke-30. Pemindahan dilakukan secara aseptik dalam *laminar air flow cabinet* dengan menggunakan pinset steril. Setelah kalus dimasukkan, botol kultur ditutup rapat dengan *aluminium foil*, kemudian diinkubasi dalam ruang kultur selama 15 hari.

#### *Pemeliharaan selama perlakuan*

Inkubasi kalus dalam media perlakuan dilakukan selama 15 hari. Untuk mencegah terjadinya kontaminasi, botol-botol kultur disemprot dengan alkohol 70% minimal tiga hari sekali.

#### *Pengamatan pertumbuhan kalus*

Pengamatan terhadap pertumbuhan kalus sangat penting dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pertumbuhan dan sintesis metabolit sekunder serta akumulasinya dalam kalus. Pertumbuhan kalus ditentukan dengan mengukur berat basah dan berat kering. Pengukuran berat basah kalus dilakukan dengan menimbang berat basah kalus awal dan berat basah kalus akhir. Berat basah kalus awal diperoleh dengan menimbang kalus beserta botol kultur, media, dan *aluminium foil* pada hari ke-0, hasilnya dikurangi dengan berat botol, media, serta *aluminium foil* sebelum ditanami kalus. Berat basah akhir diperoleh dengan menimbang kalus secara langsung pada akhir pengamatan (hari ke-15 dari awal penanaman pada media perlakuan). Berat kering kalus diperoleh dengan mengukur berat kalus yang telah dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dengan pengukuran dilakukan setiap 24 jam hingga diperoleh berat yang konstan. Pengamatan morfologi kalus dilakukan setiap hari selama 15 hari. Parameter yang diamati meliputi warna dan tekstur kalus.

#### *Analisis kadar reserpin*

Kalus yang telah dikeringkan digerus dengan menggunakan mortar sampai berbentuk serbuk halus. Serbuk kalus dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 100 mg, ditambahkan pelarut etanol p.a sebanyak 10 ml lalu divorteks, kemudian ditambah akuabides hingga volume total 100 ml. Larutan disaring dan ditambahkan

sodium nitrit 0,3% sebanyak 1 ml, kemudian diendapkan dalam *waterbath* bersuhu 55°C selama 30 menit. Larutan didinginkan dan ditambahkan asam sulfamat 5% sebanyak 0,5 ml. Ekstrak yang diperoleh diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu UV-160 IPC) pada panjang gelombang 399 nm dengan larutan pembanding reserpin murni (Singh et al. 2004).

Kadar reserpin (mg/L pelarut) hasil spektrofotometer kemudian dikonversi dalam bentuk mg/g kalus kering, dengan rumus:

$$R = (S \times V) / B$$

Keterangan:

R = Kadar reserpin (mg/g) berat kering kalus

S = Kadar reserpin sampel hasil spektrofotometer (mg/L) pelarut V = Volume pelarut (L)

B = Berat serbuk kalus yang dispektrofotometer (g)

#### **Analisis data**

Data yang diperoleh berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa morfologi kalus (warna dan tekstur kalus) yang disajikan secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif meliputi berat basah kalus, berat kering kalus, dan kadar reserpin dalam kalus. Data kuantitatif dianalisis secara statistik dengan uji ANAVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf signifikansi 5%.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Induksi Pembentukan Kalus**

Induksi pembentukan kalus merupakan tahapan penting dalam kultur jaringan tumbuhan. Melalui tahap inilah, tahapan selanjutnya (produksi metabolit sekunder) dapat dilakukan. Kalus diinduksi dalam media MS (Murashige Skoog) dengan penambahan zat pengatur tumbuh (ZPT). Menurut Santoso dan Nursandi (2004), ZPT dapat merangsang terbentuknya kalus. Pada penelitian ini, eksplan ditanam pada media MS yang diberi NAA 2 mg/L dan kinetin 2 mg/L.

NAA (Asam Naftalen Asetat) adalah jenis auksin dalam kultur jaringan tumbuhan yang dikenal sebagai hormon yang memiliki kemampuan untuk menginduksi kalus. Auksin menyebabkan pembesaran dan pemanjangan sel. Sementara itu, kinetin adalah jenis sitokinin yang dapat merangsang pembelahan sel eksplan, proliferasi sel-sel kalus, dan mendorong pembentukan klorofil pada kalus (Santoso dan Nursandi 2004).

Eksplan pada media inisiasi terlihat mengalami pembengkakan pada hari ke-1 sampai hari ke-7. Hal ini terjadi karena eksplan menyerap air dari media melalui proses imbibisi sebagai tahap awal proses pertumbuhan, akibatnya sel-sel membesar. Pada tahap tersebut belum terlihat adanya kalus, karena eksplan berada pada fase lag yaitu fase adaptasi dengan media. Kalus mulai terbentuk pada hari ke-7 setelah penanaman yang ditandai dengan terbentuknya tonjolan-tonjolan berwarna keputihan pada bagian bekas luka (iris). Hal ini sesuai dengan pernyataan Suryowinoto (1996) bahwa timbulnya kalus

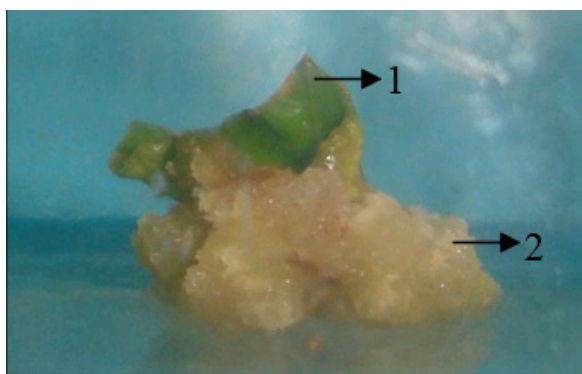
merupakan aktivitas sel-sel pada bagian eksplan yang terluka dengan cara sel-selnya menjadi meristematik lagi. Luka pada jaringan atau sel tumbuhan akan mengaktifasi mekanisme pertahanan diri tumbuhan, baik secara lokal maupun sistemik (pada jaringan yang tidak luka), dalam bentuk perubahan arah jalur metabolisme dan menginduksi ekspresi gen- gen tertentu. Hanya pada jaringan yang rusak akan terbentuk struktur sel tidak beraturan, mengalami dediferensiasi, mengeluarkan senyawa simpanan, dan kehilangan banyak air. Pembelahan sel yang terus-menerus mengakibatkan terbentuknya jaringan penutup luka. Jaringan inilah yang disebut kalus. Kalus merupakan massa sel yang tidak terdiferensiasi (Leon et al. 2001).

Morfologi kalus yang terbentuk pada media inisiasi selama 30 hari mempunyai tekstur yang kompak (Gambar 1). Menurut Street (1973), kalus yang kompak disebabkan kalus memiliki susunan sel yang rapat sehingga sulit dipisahkan.

Kalus yang terbentuk memiliki warna putih kekuningan dan sedikit kecokelatan. Warna kalus yang kurang hijau diduga erat kaitannya dengan mekanisme pertahanan diri terhadap perlakuan pada jaringan atau sel eksplan, yaitu berupa sayatan atau pengaruh dari sterilan, sehingga metabolisme terfokus untuk pertahanan diri. Menurut Leon et al. (2001), pada saat terjadi pelukaan, tumbuhan akan segera memproduksi sejenis oksigen reaktif (*reactive oxygen species*) yaitu anion superoksida pada jaringan yang rusak dan hidrogen peroksida, baik pada skala lokal maupun sistemik. Adanya oksigen reaktif berpotensi menimbulkan proses oksidasi, akibatnya terjadi pencokelatan secara cepat baik pada kalus maupun sel pada awal pertumbuhannya. Peristiwa pencokelatan merupakan proses adaptif bagian tanaman akibat adanya pengaruh fisik atau biokimia seperti memar, pengupasan, pemotongan, serangan penyakit, atau kondisi lain yang tidak normal (Santoso dan Nursandi 2004). Warna kehijauan pada kalus diduga disebabkan adanya sitokinin dalam media inisiasi yang dapat memacu terbentuknya klorofil.

### Kalus dalam media perlakuan

Kalus umur 30 hari yang diperoleh dari media inisiasi disubkultur pada media perlakuan dengan variasi konsentrasi sukrosa yang telah ditentukan. Kalus diinkubasi selama 15 hari dalam ruang kultur.



**Gambar 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* umur 30 hari pada media inisiasi. (1) Eksplan, (2) kalus.

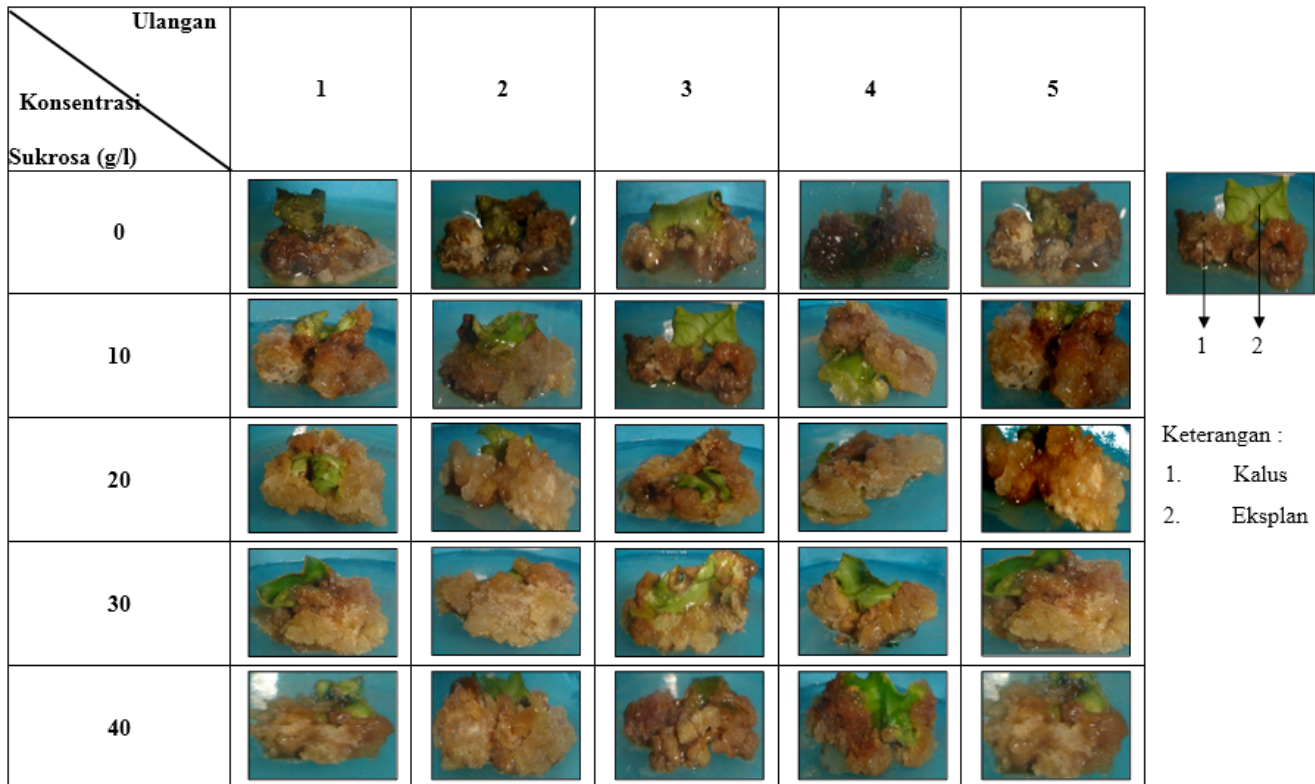
### Morfologi kalus

Kalus yang disubkultur pada media perlakuan memiliki tekstur yang cenderung kompak (*non freeable*) hingga akhir perlakuan. Warna kalus mengalami perubahan menjadi cokelat muda dan cokelat tua. Morfologi kalus pada media perlakuan umur 15 hari disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tekstur kalus yang kompak memiliki susunan sel yang rapat dan padat sehingga sulit dipisah-pisahkan. Kalus *non freeable* juga disebabkan sebagian sel-selnya memiliki proporsi vakuola yang lebih besar serta mempunyai dinding polisakarida yang besar pula (Street 1973). Dari Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa kalus tidak berwarna hijau. Hal ini diduga karena adanya dekomposisi klorofil. Menurut Guilano et al. (1993) dalam Santoso dan Nursandi (2004), dekomposisi klorofil secara biokimia dapat terjadi melalui: (1) hilangnya rantai *phyton* karena enzim klorofilase, sehingga terbentuk klorofilin/klorofilid yang menghasilkan warna hijau cerah; (2) dekomposisi klorofilid lebih lanjut menjadi *phaeophorbides* (berwarna cokelat) dan klorin (tidak berwarna); serta (3) fotooksidasi sehingga  $Mg^{2+}$  hilang dan terbentuk *phaeophytin* yang berwarna cokelat dan hijau olive (keputihan).

**Tabel 1.** Morfologi kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari).

Konsentrasi sukrosa (g/L)	Ulangan	Morfologi kalus	
		Tekstur	Warna
0	1	Kompak	Cokelat tua
	2	Kompak	Cokelat tua
	3	Kompak	Cokelat tua
	4	Kompak	Cokelat tua
	5	Kompak	Cokelat tua
10	1	Kompak	Cokelat agak tua
	2	Kompak	Cokelat tua
	3	Kompak	Cokelat tua
	4	Kompak	Cokelat muda
	5	Kompak	Cokelat tua
20	1	Agak remah	Cokelat muda
	2	Kompak	Cokelat muda
	3	Kompak	Cokelat tua
	4	Kompak	Cokelat tua
	5	Kompak	Cokelat tua
30	1	Agak remah	Cokelat muda
	2	Agak remah	Cokelat muda
	3	Kompak	Cokelat muda
	4	Kompak	Cokelat muda
	5	Kompak	Cokelat muda
40	1	Kompak	Cokelat muda
	2	Agak remah	Cokelat muda
	3	Kompak	Cokelat tua
	4	Kompak	Cokelat tua
	5	Kompak	Cokelat agak tua



**Gambar 2.** Morfologi kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari)

Menurut George dan Sherrington (1984), gula (sukrosa) dalam media kultur jaringan dapat menghambat sintesis klorofil dengan tingkat penghambatan yang berbeda-beda, tergantung jaringan dan spesies tumbuhan. Penimbunan gula dalam sel dapat menghambat proses fotosintesis dan menyebabkan pertumbuhan tidak normal serta daun nekrotik (Jana dan Sheen (1992) dalam Fitriyani et al. 1999). Penimbunan sukrosa disebabkan oleh absorpsi sukrosa dari media melalui bagian eksplan yang teriris. Penimbunan sukrosa dalam sel menyebabkan kebutuhan gula dalam sel sudah terpenuhi, sehingga sel-sel tidak melakukan fotosintesis, akibatnya pembentukan klorofil terhambat. Pencokelatan juga merupakan gejala proses penuaan. Pencokelatan kalus juga dapat disebabkan oleh akumulasi senyawa fenol dalam sel kalus. Menurut Santoso dan Nursandi (2004), enzim yang berperan dalam proses pencokelatan tersebut merupakan enzim kompleks polifenol oksidase yaitu fenol hidroksilase, kresolase, dan katekolase. Pembentukan senyawa fenol juga dapat didorong oleh adanya bahan-bahan kimia dalam media,

misalnya auksin. Auksin menurut Santoso dan Nursandi (2004) dapat mendorong terjadinya pencokelatan pada eksplan daun muda kelapa sawit.

#### Pertumbuhan kalus

Pertumbuhan adalah suatu proses dalam kehidupan tumbuhan yang mengakibatkan perubahan ukuran, bentuk, dan jumlah sel pada kondisi-kondisi tertentu (Sitompul dan Guritno 1995). Menurut Yokota et al. (1999), pertumbuhan kalus pada media kultur biasanya ditentukan dengan mengukur berat kalus.

#### Berat basah

Parameter pertumbuhan dapat diamati dari peningkatan berat basah. Peningkatan berat basah kalus dihitung dengan cara berat basah akhir dikurangi berat basah awal. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), berat merupakan integrasi dari hampir semua peristiwa yang dialami tumbuhan. Rata-rata peningkatan berat basah kalus disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Rata-rata peningkatan berat basah, berat kering dan kadar reserpin kalus *R. verticillata* pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa (umur 15 hari)

Konsentrasi sukrosa (g/L)	0	10	20	30	40
Rata-rata peningkatan berat basah (g)	0,40 <sup>a</sup>	0,80 <sup>b</sup>	0,92 <sup>b</sup>	0,90 <sup>b</sup>	0,76 <sup>b</sup>
Rata-rata berat kering (g)	0,044 <sup>a</sup>	0,074 <sup>b</sup>	0,102 <sup>c</sup>	0,124 <sup>d</sup>	0,152 <sup>e</sup>
Rata-rata kadar reserpin (mg/g)	93,204 <sup>a</sup>	140,444 <sup>a</sup>	302,56 <sup>b</sup>	548,90 <sup>c</sup>	373,24 <sup>b</sup>

Keterangan: Angka-angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa variasi konsentrasi sukrosa pada media perlakuan memberikan pengaruh yang signifikan terhadap peningkatan berat basah kalus. Pada Tabel 2 terlihat bahwa konsentrasi sukrosa 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L, dan 40 g/L memberikan pengaruh yang tidak signifikan terhadap peningkatan berat basah kalus, tetapi signifikan dengan media tanpa pemberian sukrosa.

Secara keseluruhan, media perlakuan mampu meningkatkan berat basah kalus. Media dengan konsentrasi sukrosa 20 g/L menghasilkan pertumbuhan kalus terbesar. Rata-rata peningkatan berat basah kalus pada media tersebut sebesar 0,92 g atau sebesar 108,85% dari berat basah awal. Hal ini dapat dikatakan bahwa konsentrasi sukrosa 20 g/L merupakan konsentrasi yang optimum untuk pertumbuhan kalus *R. verticillata* karena pada konsentrasi sukrosa 30 g/L terjadi penurunan berat basah. Peningkatan berat basah kalus terendah terjadi pada media tanpa pemberian sukrosa, dengan rata-rata peningkatan berat basah sebesar 0,4 g atau sebesar 64,85% dari berat basah awal. Hal ini disebabkan jumlah sukrosa yang dibutuhkan sebagai sumber energi dan sumber karbon untuk memacu pertumbuhan kalus tidak mencukupi. Karbohidrat sangat dibutuhkan untuk memacu pertumbuhan sel dan berperan dalam metabolisme (Wetter dan Constabel 1991). Sukrosa merupakan salah satu disakarida yang berperan penting bagi tumbuhan sebagai sumber energi, sumber karbon, dan pembentuk komponen sel (Dwidjoseputro 1994). Menurut George (1993) dalam Iraqi dan Tremblay (2001), sukrosa merupakan sumber karbon dan sumber energi yang paling sesuai untuk pertumbuhan jaringan pada kultur sel tanaman dibandingkan dengan jenis karbohidrat lainnya.

Sukrosa dalam media masuk ke dalam sel melalui proses difusi bebas, osmosis, maupun arus massa. Sukrosa dalam sel akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase. Proses hidrolisis sukrosa oleh invertase berlangsung di sitosol, vakuola, maupun dinding sel (Salisbury dan Ross 1995). Pemecahan sukrosa menjadi monosakarida, glukosa dan fruktosa, merupakan langkah awal penggunaan sukrosa oleh sel kalus (Iraqi dan Tremblay 2001). Glukosa dan fruktosa yang terbentuk akan digunakan sebagai sumber energi maupun sumber karbon untuk pertumbuhan sel. Glukosa dan fruktosa dalam metabolisme sel akan masuk dalam glikolisis dan siklus Krebs untuk membentuk energi berupa ATP yang akan digunakan untuk pertumbuhan kalus.

Pada tumbuhan yang sedang mengalami pertumbuhan, laju respirasi meningkat sebagai akibat dari proses pertumbuhan yang membutuhkan banyak energi. Menurut Salisbury dan Ross (1995), sukrosa merupakan gula yang paling banyak ditranslokasikan dalam tumbuhan dan merupakan pemasok glukosa dan fruktosa yang paling banyak sebagai substrat respirasi. Konsentrasi sukrosa yang optimum dalam media akan memberikan energi yang optimum pula untuk pertumbuhan. Pada umumnya, sumber karbon utama bagi tumbuhan adalah CO<sub>2</sub> yang difiksasi dari udara yang akan diubah menjadi gula heksosa melalui proses fotosintesis. Pada tumbuhan yang ditumbuhkan secara *in vitro*, fotosintesis berlangsung kurang optimal,

sehingga pemberian sumber karbon dalam media sangat dibutuhkan (Marezki (1974) dalam Suskendriyati (2003).

Sukrosa yang terangkut ke dalam sel sebagian akan diubah menjadi energi dan sebagian lainnya diubah menjadi bahan-bahan yang diperlukan untuk memacu pertumbuhan kalus (Salisbury dan Ross 1995). Sukrosa juga berperan terhadap pemanjangan dan pembesaran sel. Sukrosa yang terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa oleh enzim invertase menyebabkan terjadinya peningkatan tekanan turgor. Tekanan turgor menyebabkan pemanjangan dan pembesaran sel. Hal inilah yang diduga menyebabkan perbedaan peningkatan berat basah kalus, sebab respons setiap sel berupa tekanan turgor terhadap kondisi cairan di sekitar sel berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan pernyataan Marezki (1974) dalam Suskendriyati (2003) bahwa respons pertumbuhan sel terhadap penambahan karbohidrat berbeda-beda untuk setiap spesies.

#### *Berat kering kalus*

Indikator pertumbuhan kalus selain ditentukan dengan peningkatan berat basah juga dapat dilihat pada berat kering kalus. Berat kering kalus merupakan indikator pertumbuhan yang lebih representatif dibandingkan dengan berat basah kalus. Menurut Sitompul dan Guritno (1995), berat basah atau berat segar sulit digunakan sebagai indikator pertumbuhan karena berat basah masih dipengaruhi oleh kandungan air dalam sel. Kandungan air sel dipengaruhi oleh kondisi lingkungan yang tidak selalu konstan, sehingga kandungan air dalam sel, jaringan, atau keseluruhan tubuh tanaman berubah sesuai dengan kondisi lingkungan dan umur sel itu sendiri.

Rata-rata berat kering kalus pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 2. Berat kering kalus yang digunakan adalah berat kering konstan. Untuk mendapatkan berat kering yang konstan, kalus dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C dan ditimbang setiap hari hingga diperoleh berat yang konstan. Pengerangan kalus bertujuan untuk menghentikan aktivitas metabolisme sel dengan segera (Sitompul dan Guritno 1995).

Hasil uji statistik terhadap berat kering kalus menunjukkan bahwa pemberian sukrosa dengan berbagai konsentrasi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap berat kering kalus untuk setiap perlakuan. Dari Tabel 2 terlihat bahwa rata-rata berat kering kalus tertinggi diperoleh dari media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L yaitu sebesar 0,152 g. Hasil ini belum menunjukkan hasil yang optimum sebab belum terlihat adanya penurunan berat kering kalus pada penelitian ini. Sukrosa merupakan sumber energi dan karbon untuk pertumbuhan kalus serta komponen penyusun sel. Ketersediaan sukrosa yang besar memungkinkan tersedianya cukup energi serta bahan-bahan penting untuk pertumbuhan dan pembentukan biomassa.

Menurut Sitompul dan Guritno (1995), sukrosa yang terangkut ke dalam sel sebagian akan mengalami metabolisme untuk menghasilkan energi dan sebagian lainnya diubah menjadi bahan esensial seperti bahan dinding sel, protein, dan bahan lainnya yang diperlukan untuk pertumbuhan. Berat kering kalus terendah diperoleh

pada media tanpa pemberian sukrosa yaitu sebesar 0,044 g. Pada media ini, kalus tidak memperoleh cukup bahan untuk membentuk biomassa sebab jumlah karbohidrat (sukrosa) yang berfungsi sebagai sumber energi dan sumber karbon sangat kurang bahkan mungkin tidak ada.

Hasil penelitian menunjukkan adanya peningkatan berat kering kalus seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa. Hal ini diduga peningkatan konsentrasi sukrosa menyebabkan pembentukan metabolit untuk mendorong pembelahan dan pertumbuhan kalus. Sukrosa dalam media menyebabkan sel-sel kalus aktif membelah, sehingga kalus lebih banyak membentuk biomassa selama pertumbuhan (Suskendriyati 2003). Sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa. Selain menghasilkan energi, metabolisme sukrosa juga berperan untuk menyediakan kerangka karbon antara yang dapat digunakan untuk menghasilkan produk esensial lainnya dalam tumbuhan, misalnya metabolit sekunder (Salisbury dan Ross 1995).

Pada penelitian ini, terdapat perbedaan pola antara berat basah dan berat kering kalus. Pada peningkatan berat basah kalus terlihat adanya penurunan peningkatan berat basah pada konsentrasi sukrosa 30 g/L dan 40 g/L, sedangkan pada berat kering kalus belum terlihat adanya penurunan berat kering sampai pada konsentrasi sukrosa 40 g/L (konsentrasi tertinggi). Hal ini diduga disebabkan oleh kemampuan kalus dalam menyerap dan menyimpan air. Berat basah dipengaruhi kandungan air dalam kalus, sedangkan berat kering merupakan berat konstan yang tidak dipengaruhi oleh kandungan air. Kalus yang memiliki berat basah tinggi tetapi berat kering rendah disebabkan kalus mampu menyerap dan menyimpan air dalam jumlah banyak, sehingga ketika dikeringkan, banyak air yang hilang dan menyebabkan berat kering kalus rendah. Pada berat basah kalus yang rendah tetapi berat kering tinggi disebabkan kalus hanya mampu menyerap dan menyimpan air sedikit, sehingga ketika dikeringkan, air yang hilang hanya sedikit dan diperoleh berat kering yang tinggi.

Kemampuan kalus dalam menyerap dan menyimpan air dipengaruhi oleh tekstur kalus. Menurut Abidin (1990), sel yang berada pada lapisan luar dan kontak dengan media lebih mudah menyerap air daripada sel yang berada di lapisan dalam. Tekstur kalus yang tidak rata menyebabkan tidak semua sel kalus mampu menyentuh media terutama sel kalus bagian dalam, akibatnya kemampuan kalus untuk menyerap dan menyimpan air tidak sama. Sel kalus yang memiliki vakuola lebih besar akan menyimpan air lebih banyak dibanding sel dengan vakuola kecil. Hal inilah yang diduga menyebabkan adanya perbedaan pola antara berat basah dan berat kering kalus.

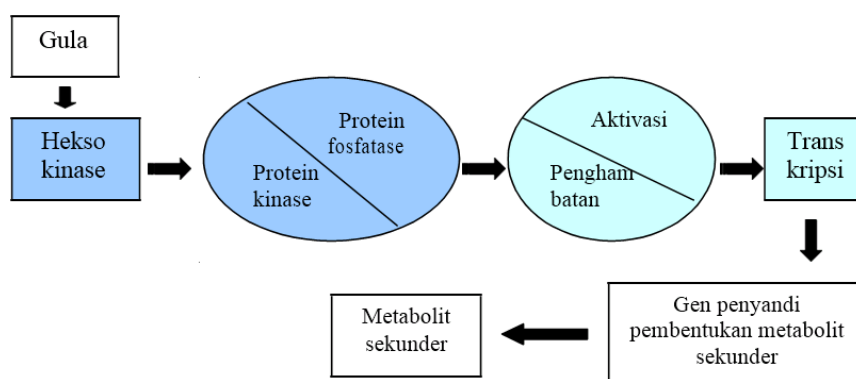
#### Analisis kandungan reserpin dalam kalus

Kadar reserpin dalam kalus *R. verticillata* yang ditanam pada media MS dengan variasi konsentrasi sukrosa dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 399 nm. Rata-rata kadar reserpin dalam kalus disajikan pada Tabel 4.

Hasil uji statistik menunjukkan variasi konsentrasi sukrosa memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kadar reserpin kalus *R. verticillata*. Dari Tabel 4 diketahui bahwa kadar reserpin terendah diperoleh pada media perlakuan tanpa sukrosa yaitu 93,204 mg/g kalus kering dan kadar reserpin tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L yaitu sebesar 548,9 mg/g kalus kering. Kadar reserpin yang rendah pada media tanpa sukrosa diduga disebabkan oleh sumber karbon yang tersedia hanya cukup untuk pertumbuhan sehingga untuk membentuk metabolit sekunder tidak mencukupi. Pada konsentrasi sukrosa yang rendah, sel akan kekurangan sumber karbon untuk proses asimilasi. Pada media dengan penambahan sukrosa yang cukup tinggi, sumber karbon dan energi yang tersedia selain mencukupi untuk pertumbuhan kalus juga cukup untuk pembentukan metabolit sekunder, sehingga reserpin yang terbentuk tinggi.

Reserpin merupakan senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam kelompok Alkaloid Indol Monoterpenoid (AIM). Kelompok alkaloid ini pada dasarnya merupakan turunan dari satu unit asam amino triptamin dan satu unit C9 dan C10 dari terpenoid (secologanin) (Ramawat dan Merillon 1999). Kandungan reserpin dipengaruhi oleh konsentrasi dan metabolisme nitrogen dalam sel. Metabolisme nitrogen sendiri membutuhkan energi yang diperoleh dari metabolisme karbohidrat. Nitrogen merupakan unsur penyusun asam amino yang merupakan prekursor metabolit sekunder. Menurut Bloom dalam Palaniswamy et al. (2002), penyerapan nitrogen oleh tumbuhan dapat dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$  dan  $\text{NO}_3^-$ . Keberadaan karbohidrat yang tinggi akan meningkatkan penyerapan  $\text{NH}_4^+$ . Sumber nitrogen dalam bentuk  $\text{NH}_4^+$  dapat langsung dipakai untuk membentuk asam amino tanpa harus direduksi sehingga tidak membutuhkan banyak energi. Hal ini berarti karbohidrat yang tersedia dapat dipakai sebagai sumber energi dan sumber karbon untuk membentuk metabolit sekunder. Konsentrasi karbohidrat yang rendah menyebabkan penyerapan  $\text{NH}_4^+$  menjadi terhambat, sehingga sumber nitrogen yang banyak digunakan adalah  $\text{NO}_3^-$ . Penggunaan  $\text{NO}_3^-$  harus melalui proses reduksi yang membutuhkan sekitar 25% energi dari hasil fotosintesis, akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pembentukan metabolit sekunder tidak optimal.

Sukrosa selain sebagai sumber karbon dan energi dalam pembentukan metabolit sekunder juga berfungsi mengatur sinyal yang mempengaruhi ekspresi gen dalam proses pembentukan metabolit sekunder (Jang dan Sheen 1997 dalam Ramawat dan Merillon 1999). Menurut Ramawat dan Merillon (1999), heksokinase dalam sel tumbuhan berfungsi sebagai sensor gula. Sukrosa yang tinggi akan mengaktifkan heksokinase. Heksokinase akan mengaktifkan protein fosfatase dan protein kinase yang mengatur proses transkripsi protein, sehingga terbentuk gen pengeksresi pembentukan metabolit sekunder (Gambar 3).



**Gambar 3.** Sinyal transduksi gula pada tumbuhan (Ramawat dan Merillon 1999)

Sukrosa dalam sel kalus akan terhidrolisis membentuk glukosa dan fruktosa. Sukrosa mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder melalui jalur glikolisis dan siklus Krebs. Dengan adanya enzim heksokinase, monosakarida hasil hidrolisis sukrosa membentuk gula terfosforilasi yang akan masuk jalur glikolisis membentuk asam piruvat. Melalui proses oksidasi asam piruvat, terbentuk asetil Ko-A yang akan masuk siklus Krebs untuk menghasilkan energi berupa ATP dan NADH yang digunakan untuk pembentukan metabolit sekunder. Asetil Ko-A dari glikolisis mengalami kondensasi membentuk hidrosimetil glutaril Ko-A (HMG-CoA) yang kemudian tereduksi membentuk asam mevalonat (MVA). Dengan energi ATP dari siklus Krebs, asam mevalonat diubah menjadi asam mevalonat 5 pirofosfat (MVA PP) dengan penambahan fosfat inorganik (Pi). Asam mevalonat 5 pirofosfat diubah menjadi isopentenil pirofosfat (IPP) oleh enzim anhidrokarboksilase dengan energi ATP dan melepaskan CO<sub>2</sub>, Pi, dan ADP. Melalui proses isomerase, isopentenil pirofosfat diubah menjadi dimetil alil pirofosfat yang kemudian berkondensasi dengan isopentenil pirofosfat membentuk geranil pirofosfat yang dikatalisis oleh enzim prenil transferase. Geranil pirofosfat diubah menjadi geranil difosfat. Geranil difosfat diubah menjadi geraniol dengan melepaskan fosfat inorganik. Geraniol diubah menjadi 10-hidroksigeraniol dengan katalisator enzim geraniol 10-hidroksilase (G10H), selanjutnya terbentuk loganin dan secologanin. Secologanin merupakan kelompok terpenoid yang dalam pembentukan AIM akan berkondensasi dengan triptamin membentuk 3 $\alpha$ (s)-striktosidin (Shank et al. 1998; Manitto 1981).

Pembentukan metabolit sekunder melalui jalur shikimat dimulai dari fosfoenol piruvat (PEP) yang mengalami kondensasi tipe aldo stereospesifik dengan D-eritrose-4-fosfat membentuk 3-deoksi-D-arabinoheptulosonat-7-fosfat (DAHP). Adanya penutupan cincin DAHP menyebabkan terbentuknya asam dehidrokinat (DHQ). Asam dehidrokinat mengalami dehidrasi reversibel membentuk asam dehidrosikimat, kemudian dengan adanya NADPH membentuk asam shikimat. Penambahan fosfat pada asam shikimat dan eliminasi air membentuk enamin yang akan berkondensasi dengan PEP membentuk asam isokhorismat.

Eliminasi 1,4-konjugat asam fosfor dari asam isokhorismat menghasilkan asam khorismat. Dengan adanya proses aminasi terbentuk asam anthranilat yang kemudian membentuk triptofan. Triptofan diubah menjadi triptamin dengan katalisator enzim triptofan dekarboksilase (Herbert 1995; Manitto 1981). Triptamin merupakan substrat enzim striktosidin sintase (SSS) pada pembentukan AIM. Triptamin dari jalur shikimat akan berkondensasi dengan secologanin dari jalur mevalonat membentuk 3 $\alpha$ (s)-striktosidin dengan katalisator enzim striktosidin sintase. Senyawa 3 $\alpha$ (s)-striktosidin digunakan sebagai prekursor pembentukan AIM (Shank et al. 1998), salah satunya reserpin (Verpoorte et al. 2002; Shank et al. 1998).

Peningkatan kadar reserpin terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa sampai pada konsentrasi sukrosa 30 g/L lalu menurun pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Konsentrasi sukrosa yang rendah dalam media diduga tidak digunakan untuk membentuk metabolit sekunder, tetapi dioptimalkan untuk pertumbuhan dan perkembangan sel. Pada media dengan nutrisi yang optimal, sel-sel kalus dapat menggunakan nutrisi dalam media untuk pertumbuhan dan pembentukan biomassa serta untuk pembentukan metabolit sekunder, sehingga pada kondisi ini dapat diperoleh biomassa yang besar serta kadar reserpin yang tinggi pula. Konsentrasi sukrosa lebih dari 30 g/L memang memacu pertumbuhan sel sehingga diperoleh laju pertumbuhan kalus yang tinggi, tetapi menghambat pembentukan metabolit sekunder dalam sel (Mantell dan Smith 1986). Penghambatan pembentukan metabolit sekunder juga dapat disebabkan oleh sukrosa yang tersisa dari proses pertumbuhan terkonversi menjadi hasil samping berupa senyawa-senyawa lain, misalnya asam-asam organik dan CO<sub>2</sub>. Hal inilah yang menyebabkan kadar reserpin pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L lebih rendah daripada kadar reserpin pada media dengan konsentrasi sukrosa 30 g/L. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan Manuhara (1995) bahwa kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharantus roseus* (L.) G. Don dipengaruhi oleh konsentrasi sukrosa.

Manuhara (1995) telah melakukan penelitian tentang pengaruh manipulasi media terhadap kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharantus roseus*. Pada penelitian

tersebut, salah satu perlakuan yang diberikan adalah variasi konsentrasi sukrosa (20, 30, 40, 50, dan 60 g/L). Kadar alkaloid vinkristin tertinggi pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L. Kalus pada media yang mengandung sukrosa 50 g/L mengandung alkaloid vinkristin lebih sedikit, sedangkan penambahan sukrosa 20, 30, dan 60 g/L pada media tidak menunjukkan adanya alkaloid vinkristin. Hal ini diduga disebabkan sukrosa sebagai sumber karbon, hidrogen, dan oksigen dalam jumlah 20 dan 30 g/L tidak digunakan untuk pembentukan vinkristin, tetapi hanya dipakai untuk pertumbuhan kalus. Penambahan sukrosa lebih dari 50 g/L diduga dapat menghambat pembentukan alkaloid vinkristin (Manuhara 1995).

Variasi konsentrasi sukrosa pada penelitian ini mempengaruhi pertumbuhan dan kandungan reserpin kalus daun *R. verticillata*. Pertumbuhan kalus cenderung meningkat yang ditunjukkan pada berat basah dan berat kering kalus. Penambahan sukrosa sampai dengan 20 g/L pada media meningkatkan berat basah kalus, sedangkan pada konsentrasi sukrosa di atas 20 g/L, peningkatan berat basah kalus mengalami penurunan. Berat kering kalus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi sukrosa. Berat kering kalus tertinggi diperoleh pada media dengan konsentrasi sukrosa 40 g/L. Hal ini berarti belum diketahui adanya penurunan berat kering kalus. Kandungan reserpin meningkat sampai pada konsentrasi sukrosa 30 g/L, kemudian mengalami penurunan pada konsentrasi sukrosa 40 g/L. Konsentrasi sukrosa 30 g/L adalah konsentrasi yang optimum untuk meningkatkan kandungan reserpin kalus daun *R. verticillata*.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut: (1) Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam media MS cenderung meningkatkan pertumbuhan kalus *R. verticillata* yang ditunjukkan pada berat basah dan berat kering kalus. (2) Peningkatan konsentrasi sukrosa dalam media MS cenderung meningkatkan kandungan reserpin kalus *R. verticillata*. Penambahan sukrosa sampai dengan 30 g/L meningkatkan kandungan reserpin, sebaliknya konsentrasi sukrosa di atas 30 g/L menurunkan kandungan reserpin.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin Z. 1990. Dasar-dasar pengetahuan tentang zat pengatur tumbuh. Penerbit Angkasa, Bandung.
- Dwidjoseputro D. 1994. Pengantar fisiologi tumbuhan. PT Gramedia, Jakarta.
- Fischer R, Liao YC, Hoffmann K et al. 1999. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol Chem* 380: 825-839.
- Fitriyani I, Margono B, Dahlia. 1999. Pengaruh asam 2,4-D diklorofenoksi asetat terhadap klorofil dan glukosa kalus *Morinda citrifolia* L. *Chimera* 4(1): 37-46.
- George EP, Sherington PD. 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetic Limited, Eversley.
- Herbert RB. 1995. Biosintesis metabolit sekunder. Jilid ke-2. (Diterjemahkan oleh: Srigandono B). Chapman and Hall, London and New York.
- Iraqi D, Tremblay FM. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugar and protein during spruce somatic embryogenesis suggest a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* 52: 2301-2311.
- Leon J, Pojo E, Sanchez-Serano JJ. 2001. Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52(34): 1-3.
- LIPI [Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia]. 1999. Koleksi tumbuhan obat Kebun Raya Bogor. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya Bogor (LIPI), Bogor.
- Manitto P. 1981. Biosintesis produk alami. (Diterjemahkan oleh: Koensoemardiyah). IKIP Semarang Press, Semarang.
- Mantell SH, Smith H. 1986. Plant biotechnology. Cambridge University Press, Great Britain.
- Manuhara YSW. 1995. Pengaruh manipulasi media terhadap kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Berkala Penelitian Hayati 1: 1-7.
- Mulabagal V, Tsay HS. 2004. Plant cell culture – An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *Int J Appl Sci Eng* 2(1): 29-48.
- Palaniswamy UR, Bernard BB, Richard JM. 2002. Effect of nitrate: Ammonium nitrogen ratio on oxalate levels of purslane. In: Janick J, Whipkey A (eds). Trends in New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria VA.
- Ramachandra RS. 2000. Biotechnological production of phyto-pharmaceuticals. *J Biochem Mol Biol Biophys* 4: 73-102.
- Ramawat KG, Merillon JM. 1999. Biotechnology secondary metabolites. Science Publisher, Inc., New Hampshire.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. Fisiologi tumbuhan. Jilid ke-3. (Diterjemahkan oleh: Lukman DR, Sumaryono). Penerbit ITB, Bandung.
- Santoso U, Nursandi F. 2004. Kultur jaringan tanaman. Universitas Muhammadiyah Malang, Malang.
- Shank JB, Bhadra J, Morgan J et al. 1998. Quantification of metabolites in the indole alkaloid pathways of *Catharanthus roseus*: Implication of metabolites engineering. *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 333-338.
- Singh DK, Srivastava B, Sahu A. 2004. Spectrophotometric determination of *Rauwolfia* alkaloid: Estimation of reserpin in pharmaceuticals. *Analytical Sciences*. The Japan Society for Analytical Chemistry 20: 571-573.
- Sitompul SM, Guritno B. 1995. Analisis pertumbuhan tanaman. UGM Press, Yogyakarta.
- Street HE. 1973. Plant tissue and cell culture. University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- Suryowinoto M. 1996. Pemuliaan tanaman secara in vitro. Kanisius, Yogyakarta.
- Suskendriyati H. 2003. Pertumbuhan dan Produksi Saponin Kultur Kalus *Talinum paniculatum* Gaertn. dengan Variasi Pemberian Sumber Karbon. [Skripsi]. Jurusan Biologi F MIPA UNS, Surakarta.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochem Rev* 1: 13-25.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Metode kultur jaringan tanaman. (Diterjemahkan oleh: Widiyanto MB). Edisi kedua. ITB, Bandung.
- Yokota T, Tutumi N, Takahasi K. 1999. Growth rate estimation of in vitro primarily induced carrot callus by a fractal based model. *Biochem Eng J* 3: 231-234.

## PEDOMAN UNTUK PENULIS

Format penulisan pada nomor ini merupakan acuan utama bagi para penulis, adapun pedoman ini hanya merupakan ringkasannya. Setiap naskah harus disertai surat pengantar yang menyatakan bahwa tulisan merupakan hasil karya penulis atau para penulis dan belum pernah dipublikasikan. Penulis diminta mengirimkan dua kopi naskah dan satu disket ukuran 3½", kecuali naskah yang dikirim melalui e-mail. Pada koreksi terakhir kembali diminta satu disket untuk pencetakan.

**Tulisan** diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm<sup>2</sup>), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m<sup>-2</sup>, l<sup>-1</sup>, h<sup>-1</sup>) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

**Judul** ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat berseri, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian, dan metode-metode khusus yang digunakan.

**Pendahuluan** (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka, dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan menyertakan foto atau gambar untuk sampul depan meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

**Pustaka** dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa penulis, nama penulis diurutkan berdasarkan kebaruan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis diikuti et al. atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto et al. 1998; Baker and Manwell 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy 1991 *cit* Coward 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward 1999).

**Daftar Pustaka** diketik dengan spasi ganda. Sitasi mengikuti CBE-ELSE-Vancouver style dengan modifikasi sebagai berikut:

### Jurnal:

Suranto S, Gough KH, Shukla DD et al. 1998. Coat protein sequence of Krish-infecting strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. *Arch Virol* 143: 1015-1020.

### Buku:

Sprent JI, Sprent P. 1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. Chapman and Hall, London.

### Bab dalam buku:

Baker CMA, Manwell C. 1991. Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: Hickman CG (ed). *Cattle Genetic Resources*. Elsevier, Amsterdam.

### Abstrak:

Liu Q, Salih S, Ingersoll J et al. 2000. Response of transgenic 'Royal Gala' apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoots, containing the modified cecropin MB39 gene to *Erwinia amylovora* [084]. Abstracts of 97<sup>th</sup> Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. Lake Buena Vista, FL, 23-26 July 2000.

### Prosiding:

Alikodra HS. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. In: Setyawan AD, Sutarno (eds). Menuju Taman Nasional Gunung Lawu, Prosiding Semiloka Nasional Konservasi Biodiversitas untuk Perlindungan dan Penyelamatan Plasma Nutfah di Pulau Jawa. Surakarta, 17-20 Juli 2000.

### Skripsi, Tesis, Disertasi:

Purwoko T. 2001. Biotransformasi Isoflavon oleh *Rhizopus oryzae* UICC 524 dan Aktivitas Antioksidan Isoflavon Aglikon dari Tempe terhadap Oksidasi Minyak Kedelai. [Tesis]. Universitas Indonesia, Jakarta.

### Informasi dari Internet:

Rosauer D. 1998. Forest disturbance and succession. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

Naskah publikasi "*in press*" dapat disitasi dan dicantumkan dalam daftar pustaka. "Komunikasi pribadi" dapat disitasi, tetapi tidak dapat dicantumkan dalam daftar pustaka. Penelitian yang tidak dipublikasikan atau sedang dalam tahap pengajuan publikasi tidak dapat disitasi.

**Beberapa catatan tambahan.** Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "l" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\chi$ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

**Kemajuan Naskah.** Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjujuran keaslian penelitian, dan korespondensi tidak ditanggapi. Penulis atau penulis pertama pada naskah kelompok akan mendapatkan satu eksemplar jurnal yang memuat tulisannya selambat-lambatnya sebulan setelah naskah diterbitkan. Penulis akan kembali mendapatkan satu eksemplar jurnal nomor penerbitan berikutnya.

**PENTING:** Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok masih memegang hak cipta (*copyright*) dan mempertahankan hak penerbitan tanpa pembatasan atas naskah yang diterbitkan **Biofarmasi**. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

- Fermentasi nira tebu untuk pembuatan minuman probiotik dengan variasi jenis dan konsentrasi inokulum** 1-7
- DWI KRISTANTI, RATNA SETYANINGSIH, ARI SUSILOWATI
- Efek diuretik kopi susu pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan variasi jenis susu** 8-15
- DINA ANGELIA BISTANI, SHANTI LISTYAWATI, AHMAD DWI SETYAWAN
- Pengaruh penurunan konsentrasi fosfor dalam media MS terhadap pertumbuhan kalus dan produksi reserpin pule pandak *Rauvolfia verticillata* (Lour.) Baillon secara in vitro** 16-25
- SUPATMI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN
- Pengaruh ekstrak daun sambung nyawa (*Gynura procumbens*) terhadap kadar metil merkuri darah dan karakteristik eritrosit tikus putih pasca pemaparan metil merkuri klorida** 26-37
- WIWIK WIDYAWATI, WIRYANTO, SHANTI LISTYAWATI
- Pertumbuhan dan kandungan reserpin kultur kalus *Rauvolfia verticillata* pada variasi konsentrasi sukrosa dalam media MS** 38-46
- IRMAWATI, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN

