

# Biofarmasi

**Journal of Natural Products Biochemistry**

**VOLUME 8  
NOMOR 1  
FEBRUARI 2010  
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: <http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm>

**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.

## Ekstraksi dan karakterisasi pektin pada cincau hijau (*Premna oblongifolia*) untuk pembuatan *edible film*

### Extraction and characterization of pectin on green cincau (*Premna oblongifolia*) in edible film production

ARINDA KARINA RACHMAWATI, R. BASKORO KATRI ANANDITO, GODRAS JATI MANUHARA

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 21 Oktober 2009. Revisi disetujui: 7 Januari 2010.

**Abstract.** Rachmawati AK, Anandito RBK, Manuhara GJ. 2010. Extraction and characterization of pectin on green cincau (*Premna oblongifolia*) in edible film production. *Biofarmasi* 8: 1-10. The use of green cincau pectin was presumed to influence the result of edible film characteristics, i.e. thickness, solvability, elongation, tensile strength, and water vapour transmission (WVTR). The aims in this research were: (i) to find out the chemical characteristics of green cincau pectin on the physical (thickness and solvability) and mechanical properties (elongation and tensile strength), (ii) to determine the edible film inhibition of green cincau pectin against the water vapour transmission rate, and (iii) to find out the edible film capability in inhibiting the weight loss on green grape by wrapping and coating method. The five major steps in this research were material preparation (making green cincau powder and pectin extraction), the characterization of extraction result pectin, making edible film, edible film characterization, and edible film application. This research used a completely randomized design with twice replications in edible film making for each treatment concentration and twice replication for edible film characteristic testing in each edible film making replication. Variance analysis was used to analyze data, if there was a significant difference, it will be continued with a Duncan Multiple Range Test at a significance level of 0.05. The yield of green cincau powder and pectin were 27.5% and 15.2%, respectively. The extraction result pectin consisted of 5.09% water, 11.06% protein, 0.35% fat, 28.5% ash, 55.00% carbohydrate (by different), and 12.15% crude fiber. The increasing of pectin concentration tends to increase the thickness and tensile strength, but reduced the water vapour transmission rate. The lowest water vapour transmission rate occurred at the edible film with 30% pectin concentration. Its water vapour transmission rate was 0.317 g.mm/m<sup>2</sup>.hour. The green grape weight loss with a wrapping method was 0.0212 g/hour, and the green grape weight loss with a coating method was 0.0634 g/hour.

**Keywords:** *Edible film*, green cincau, pectin, *Premna oblongifolia*

#### PENDAHULUAN

Tanaman cincau termasuk tanaman asli Indonesia dengan nama lain diantaranya camcao, juju, kepleng (Jawa); camcauh, tahulu (Sunda). Tanaman ini tumbuh menyebar di daerah Jawa Barat (sekitar Gunung Salak, Batujajar, Ciampea, Ciomas), Jawa Tengah (Gunung Ungaran, Gunung Ijen), Sulawesi, Bali, Lombok, dan Sumbawa (Astawan 2002).

Menurut Pitojo dan Zumiyati (2005), terdapat empat jenis tanaman cincau, yaitu cincau hijau, terdiri dari jenis cincau hijau rambat (*Cyclea barbata*) dan cincau hijau pohon (*Premna oblongifolia*), cincau perdu (*Premna serratifolia*), cincau hitam (*Mesona palustris*), dan cincau minyak (*Stephania hermandifolia*). Dari keempat jenis tanaman cincau tersebut, jenis yang paling dikenal oleh sebagian besar masyarakat adalah cincau hijau dan cincau perdu. Namun, cincau yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat adalah cincau hijau, cincau perdu, dan cincau hitam. Karakter morfologi ketiga jenis tanaman cincau tersebut berbeda satu sama lain. Namun, masyarakat Indonesia sangat menggemari jenis cincau hijau, sebab daunnya tipis dan lemas, sehingga lebih mudah diremas untuk dijadikan gel atau agar-agar. Cincau hijau pohon

(*Premna oblongifolia* Merr.) merupakan bahan makanan tradisional yang telah lama dikenal masyarakat dan digunakan sebagai bahan minuman segar. Jenis cincau tersebut disenangi masyarakat karena rasanya khas, segar, dingin, dan harganya relatif murah.

Di Kabupaten Wonogiri, tepatnya di Kecamatan Bulukerto, banyak dibudidayakan tanaman janggolan dan cincau hijau dengan jumlah produksi sekitar 6.000 ton per tahun di atas lahan seluas 1.000 hektar. Permintaan cincau cukup besar, bahkan mencapai Provinsi Jawa Timur, Jawa Barat, dan Daerah Istimewa Yogyakarta.

Kurnia (2007) menjelaskan bahwa cincau hijau kaya akan karbohidrat, polifenol, saponin, lemak, kalsium, fosfor, serta vitamin A dan B. Selain itu, menurut Nurdin dan Suharyono (2007), komponen utama ekstrak cincau hijau yang membentuk gel adalah polisakarida pektin yang bermetoksi rendah. Pektin tersebut merupakan kelompok hidrokoloid pembentuk gel yang apabila diserut tipis-tipis bersifat amat rekat terhadap cetakan dan tembus pandang, sehingga berpotensi untuk dibuat sebagai *edible film*, dimana komponen utama penyusun *edible film* dapat dibedakan menjadi tiga kelompok, yaitu hidrokoloid, lemak, dan komposit. Penggunaan pektin dari ekstrak cincau hijau dapat dikombinasikan dengan tepung tapioka,

sehingga menghasilkan *film* yang bersifat transparan dan kaku. Menurut Krochta dan de Mulder-Johnston dalam Murdianto et al. (2005), *edible film* dari tapioka memiliki sifat mekanik yang hampir sama dengan plastik dan bersifat transparan.

*Edible film* adalah lapisan tipis yang terbuat dari bahan-bahan yang dapat dikonsumsi. *Edible film* dapat digunakan sebagai pelapis komponen makanan (*coating*), atau diletakkan di antara komponen makanan (*film*) yang berfungsi sebagai *barrier* terhadap transfer massa, seperti kelembapan, oksigen, lipid, cahaya, dan zat larut. Selain itu, *edible film* juga dapat digunakan sebagai *carrier* bahan makanan atau bahan tambahan, serta untuk mempermudah penanganan makanan (Krochta dan de Mulder-Johnston 1997). Oleh karena cincau hijau mengandung warna hijau alami yang disebut klorofil, diduga *edible film* yang dihasilkan dari pektin cincau hijau akan menghasilkan warna hijau yang lebih seragam, sehingga sesuai untuk digunakan sebagai pengemas buah atau sayuran yang berwarna hijau, seperti anggur hijau.

Dengan mempertimbangkan bahwa potensi sumber daya alam Indonesia yang cukup besar untuk menghasilkan daun cincau hijau dan ubi kayu sebagai penghasil pektin dan tapioka untuk pembuatan *edible film*, serta manfaat yang diperoleh dari penggunaan *edible film*, maka penelitian tentang pengembangan *edible film* dari pektin cincau hijau dan tapioka perlu diupayakan.

Tujuan dari penelitian ini adalah: 1) Mengetahui karakteristik kimia serbuk dan pektin cincau hijau melalui analisis proximat; 2) Mengetahui pengaruh penggunaan pektin cincau hijau terhadap sifat fisik (ketebalan dan kelarutan), mekanik (pemanjangan dan kuat regang putus), serta penghambatan *edible film* dari pektin cincau hijau komposit tepung tapioka terhadap laju transmisi uap air (WVTR); 3) Mengetahui pengaruh *coating* dan *wrapping* dengan *edible film* pada buah anggur hijau.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Pangan dan Gizi Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta, serta Laboratorium Rekayasa Teknologi II Fakultas Teknologi Pangan Universitas Gadjah Mada, pada bulan Februari sampai Juni 2009.

### Alat dan bahan

Bahan utama dalam penelitian ini berupa daun cincau hijau jenis *Premna oblongifolia* Merr. varietas cincau pohon. Pada tahap aplikasi dengan kemasan *edible film* digunakan buah anggur hijau. Pada tahap ekstraksi pektin cincau hijau digunakan etanol 96% dan akuades. Bahan yang digunakan untuk analisis proximat pada pektin cincau hijau hasil ekstraksi yaitu petroleum eter, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, HCl 0,02 N, asam borat 4%, dan akuades. Bahan yang digunakan untuk pembuatan *edible film* antara lain pektin cincau hijau hasil ekstraksi, tapioka, CaSO<sub>4</sub>,

akuades, dan gliserol. Bahan yang digunakan dalam karakterisasi *edible film* adalah akuades, larutan garam 40%, anggur hijau segar, dan silika gel.

Alat yang digunakan dalam pembuatan serbuk cincau hijau adalah blender, oven, ayakan 80 mesh, dan gelas Beaker. Alat yang digunakan dalam ekstraksi pektin cincau hijau adalah blender, gelas Beaker, *magnetic stirrer*, termometer, pengaduk, kain saring, dan ayakan 100 mesh. Analisis pektin cincau hijau hasil ekstraksi antara lain oven, eksikator, *muffle*, dan kompor listrik. Pada pembuatan *edible film*, alat yang digunakan meliputi timbangan analitik, gelas ukur, gelas Beaker, plat plastik, *hot plate*, *magnetic stirrer*, pengaduk, dan oven. Alat yang digunakan untuk karakterisasi *edible film* adalah mikrometer *Mitutoyo* (ketelitian 0,001), *Lloyd's Universal Testing Instrument* 50 Hz model 1000 s, stoples plastik, dan cawan WVTR. Alat yang digunakan dalam analisis permeabilitas uap air film dan nilai susut berat meliputi cawan WVTR, stoples, *hair dryer*, dan timbangan analitik.

### Cara kerja

Terdapat lima tahapan utama dalam penelitian ini, yaitu (i) penyiapan bahan, meliputi pembuatan serbuk cincau hijau dan ekstraksi pektin daun cincau hijau, (ii) karakterisasi pektin hasil ekstraksi, (iii) pembuatan *edible film*, (iv) karakterisasi *edible film*, serta (v) aplikasi *edible film*.

#### *Pembuatan serbuk cincau hijau*

Pembuatan serbuk cincau hijau mengacu pada penelitian yang telah dilakukan oleh Koswara (2008). Pembuatan serbuk cincau hijau diawali dengan mencuci daun cincau segar dengan air pada suhu kamar, kemudian daun dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 18 jam atau dijemur dari pukul 08.00 sampai 15.00 selama tiga hari (total 21 jam). Kemudian daun yang sudah kering tersebut digiling dan diayak dengan ayakan berdiameter 0,5 milimeter.

#### *Tahap ekstraksi pektin*

Metode ekstraksi pektin yang digunakan adalah berdasarkan pembuatan *edible film* ekstrak daun janggolan oleh Murdianto et al. (2005) yang telah dimodifikasi, yaitu tanpa perlakuan pemanasan. Bubuk cincau hijau sebanyak 25 gram ditambah dengan 500 ml akuades dalam gelas Beaker 1000 ml pada suhu 25°C dan diaduk-aduk sampai homogen dengan menggunakan *magnetic stirrer* untuk membantu dalam proses ekstraksi. Kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain saring, sehingga diperoleh filtrat berupa cairan dan ampas. Filtrat selanjutnya ditambah dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:1, sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi gel yang terdapat di antara cairan supernatan. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan dua fraksi tersebut. Gel yang telah bebas dari air dan *impurities* lainnya tersebut, selanjutnya dikeringkan dengan *cabinet dryer* pada suhu 50°C selama 5 jam sehingga diperoleh bentuk lembaran-lembaran kering ekstrak daun cincau hijau (pektin). Lembaran-lembaran pektin tersebut kemudian diblender sampai halus dan diayak dengan ayakan 100 mesh.

#### Karakterisasi serbuk cincau hijau dan pektin cincau hijau

Pektin cincau hijau hasil ekstraksi selanjutnya dilakukan analisis proksimat yang meliputi analisis kadar air, kadar lemak, kadar protein dengan penentuan kadar N total dengan cara Mikro Kjeldahl yang dimodifikasi dengan Kjeltac, kadar abu berdasarkan metode yang dikembangkan dalam Sudarmadji et al. (1989), dan kadar karbohidrat *by different* berdasarkan metode Winarno (1992).

#### Pembuatan edible film pektin cincau hijau

Pembuatan *edible film* ini mengacu pada metode yang dikembangkan oleh Murdianto et al. (2005) yang telah dimodifikasi dengan variasi konsentrasi pektin cincau hijau (0%, 10%, 20%, 30%, b/b berat tapioka). Diagram alir pembuatan *edible film* komposit pektin cincau hijau dapat dilihat pada Gambar 1.

Dua jenis larutan dipersiapkan terlebih dahulu. Larutan pertama adalah larutan pektin cincau hijau dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, dan 30% (b/b tapioka), serta  $\text{CaSO}_4$  0,05% (b/b pektin cincau). Pektin cincau hijau dan  $\text{CaSO}_4$  0,05% (b/b pektin cincau) dilarutkan dalam 150 ml akuades.

Larutan kedua berisi 4 gram tapioka yang dilarutkan dalam 150 ml akuades, dipanaskan di atas *hotplate* selama 30 detik hingga warnanya berubah menjadi bening, dan dilanjutkan dengan pengadukan dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 detik. Kemudian larutan tapioka dituang ke dalam gelas Beaker yang telah berisi larutan pektin cincau hijau dan  $\text{CaSO}_4$  0,05%. Selanjutnya, gliserol 0,87% (b/v) atau sebanyak 2,6 gram ditambahkan ke dalam larutan yang mengandung larutan pektin cincau hijau,  $\text{CaSO}_4$  0,05%, dan tapioka, kemudian diaduk dan dipanaskan hingga suhu 75°C (dipertahankan selama 5 menit), selanjutnya dipanaskan sambil diaduk hingga suhu larutan antara 80-85°C (dipertahankan selama 10 menit). Larutan dicetak dan dikeringkan pada suhu 60°C selama 12 jam.

#### Karakterisasi edible film

Pengujian karakter fisik *edible film* meliputi ketebalan film (McHugh et al. 1993), pemanjangan film, kuat regang putus film, kelarutan film, dan permeabilitas uap air (WVTR) (Gontard et al. 1993). *Edible film* dengan WVTR terendah dipilih untuk digunakan dalam tahap aplikasi.

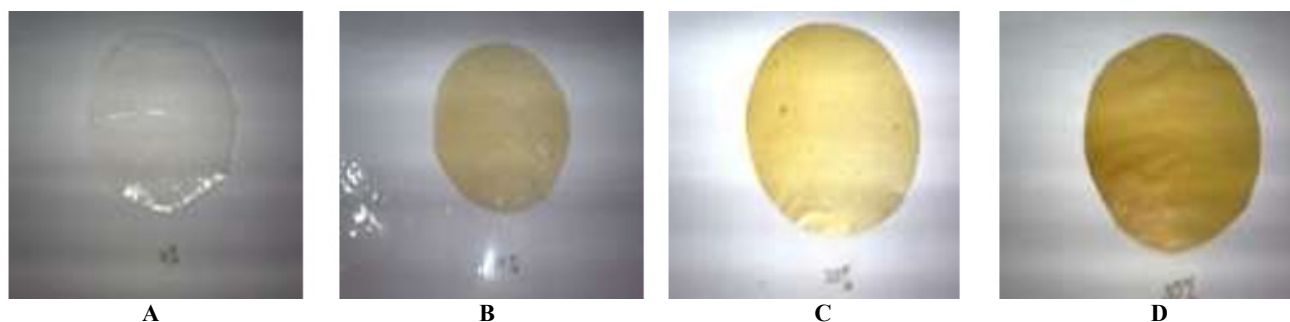
#### Aplikasi edible film

Aplikasi *edible film* dilakukan dengan cara *coating* dan *wrapping* pada buah anggur hijau.

**Coating (pelapisan) buah anggur hijau.** Aplikasi film pada buah anggur hijau dengan cara *coating* (pelapisan) ini mengacu pada metode yang digunakan oleh MgHugh dan Sanesi (2000), yang telah dimodifikasi dalam Siswanti (2008). Lima buah anggur mula-mula dicelupkan ke dalam larutan natrium benzoat 0,05% sesuai dengan tahapan yang dijelaskan oleh Pradnyamitha (2008), hal ini dimaksudkan untuk mencegah timbulnya jamur selama penyimpanan, kemudian anggur dicelupkan ke dalam larutan *edible film* selama 5 menit. Buah anggur yang telah dicelupkan ke dalam larutan *edible film* selanjutnya dipindahkan dan dikeringkan pada suhu 40°C selama 35 menit dengan *hair dryer*. Pencelupan dilakukan sebanyak 3 kali agar semua bagian pada buah anggur terlapisi secara merata. Buah anggur yang telah di-*coating*, selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri dan dimasukkan ke dalam stoples plastik yang telah diberi silica gel, kemudian disimpan pada suhu 25-27°C selama 3 hari.

**Wrapping (pengemasan) buah anggur hijau.** Aplikasi film pada buah anggur hijau dengan cara *wrapping* (pengemasan) ini mengacu pada metode yang digunakan oleh MgHugh dan Sanesi (2000), yang telah dimodifikasi dalam Siswanti (2008). *Edible film* dari pektin cincau hijau yang memiliki nilai permeabilitas uap air terendah, diuji dengan cara dibandingkan dengan plastik saran, *edible film* dari agar-agar (nutrijell), dan perlakuan tanpa *wrapping* sebagai kontrol.

Masing-masing cawan pengujian berisi lima buah anggur hijau dengan berat total kelima buah anggur hijau yang relatif sama untuk setiap cawan. Sampel tersebut selanjutnya disimpan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan dilakukan terhadap susut berat buah anggur dalam cawan-cawan tersebut dari hari ke-0 hingga ke-8 setiap harinya. Nilai susut berat yang terbentuk dari titik-titik merupakan hasil *ploting* nilai susu berat (sumbu y), dan hari pengamatan (sumbu x). Selain itu, diamati juga kandungan vitamin C pada buah anggur dari perlakuan tersebut.



**Gambar 1** *Edible film* pektin cincau hijau. A. 0%, B. 10%, C. 20%, E. 30%

### Analisis data

Pada penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap dan dilakukan dua kali ulangan dalam pembuatan *edible film* untuk setiap perlakuan konsentrasi pektin cincau hijau, dan dua kali ulangan dalam pengujian karakteristik *edible film* dalam setiap ulangan pembuatan *edible film*. Data yang diperoleh selanjutnya dilakukan analisis varian, jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata dengan menggunakan analisis *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat signifikansi  $\alpha=0,05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Ekstraksi dan karakterisasi pektin cincau hijau

#### Karakteristik kimia dan rendemen serbuk cincau hijau

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cincau hijau *P. oblongifolia* yang terlebih dahulu dikeringkan menjadi serbuk sebelum diekstraksi pektinnya. Serbuk cincau hijau yang diperoleh selanjutnya diuji melalui analisis proksimat dan dihitung rendemennya. Analisis proksimat ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik kimia dari serbuk cincau hijau yang dihasilkan sebelum dilakukan ekstraksi pektin.

Kandungan air dalam cincau hijau segar tergolong tinggi yaitu lebih dari 66% (Pitojo dan Zumiyati 2005). Namun, setelah melalui proses pengeringan, sebagian air dari daun cincau hijau ikut menguap, sehingga kandungan air dari serbuk cincau hijau dalam penelitian ini menjadi 6,71%. Menurut Haryadi (1991), kandungan air pada cincau hijau yang dikeringkan berubah, dari 71,1% menjadi 8,3%. Apabila dibandingkan dengan kandungan air cincau hitam yang memiliki kandungan air sebesar 98% (Astawan dan Andreas 2008), kandungan air cincau hijau jauh lebih rendah.

Menurut Haryadi (1991), pengeringan daun cincau hijau dan pembuatan serbuk cincau dapat lebih memudahkan pengujian sifat fungsionalnya, namun dengan adanya pengeringan juga dapat mengakibatkan penurunan kemampuan daun cincau untuk membentuk gel. Pada penelitian ini dihasilkan kandungan protein dari serbuk cincau hijau sebesar 16,81%, sedangkan kandungan lemaknya sebesar 1,22%. Menurut Pitojo dan Zumiyati (2005), kandungan protein dan lemak dari cincau hijau berturut-turut adalah 6% dan 1%. Kandungan protein cincau hijau dalam penelitian ini tergolong lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kandungan protein dalam penelitian Pitojo dan Zumiyati (2005).

Serat kasar yang terkandung dalam cincau bubuk sebesar 18,88%, sedangkan kandungan karbohidrat dalam serbuk cincau sebesar 67,72%. Apabila dibandingkan dengan kandungan karbohidrat dari cincau hitam, yaitu sebesar 26% (Astawan dan Andreas 2008), maka kandungan karbohidrat dari cincau hitam jauh lebih tinggi. Kandungan serat kasar dan karbohidrat dalam serbuk cincau lebih tinggi daripada kandungan gizi yang lain, hal ini disebabkan komponen utama yang terkandung dalam cincau hijau adalah polisakarida. Menurut Nurdin dan

Suharyono (2007), komponen utama ekstrak cincau hijau yang membentuk gel adalah polisakarida pektin, oleh karena kandungan utamanya adalah pektin maka cincau hijau dianggap sebagai sumber serat yang baik.

#### Karakterisasi kimia dan rendemen pektin cincau hijau

Setelah diperoleh serbuk cincau hijau, dilakukan ekstraksi pektin cincau hijau. Pektin yang diperoleh dianalisis karakteristik kimianya melalui analisis proksimat dan dilakukan penghitungan rendemen. Hasil analisis proksimat dan rendemen pektin cincau hijau disajikan pada Tabel 1.

Kandungan protein dan lemak dari pektin pada hasil penelitian ini, berturut-turut adalah 11,06% dan 0,35%, sedangkan kandungan abu, serat kasar, dan karbohidrat berturut-turut sebesar 28,5%; 12,5%; dan 55,00%. Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa kandungan abu dari pektin cincau hijau lebih banyak dibandingkan serbuk cincau hijau. Menurut Haryadi (1991), cincau dalam bentuk serbuk yang bebas klorofil dari hasil ekstraksi, tersusun atas sebagian besar polisakarida dengan sedikit bahan lain.

Warna hijau pada cincau hijau disebabkan oleh adanya klorofil. Menurut Haryadi (1991), klorofil dapat larut dalam sebagian besar pelarut organik, sehingga penggunaan etanol sebagai pelarut organik dapat memucatkan warna dari ekstrak cincau kering. Selain itu, menurut Haryadi (1991), hal tersebut juga dapat menurunkan kualitas dan kenampakan warna dari cincau hijau. Berkurangnya kandungan klorofil tersebut dapat mengakibatkan warna serbuk pektin yang dihasilkan menjadi berwarna kekuningan.

Hasil penelitian Nurdin dan Suharyono (2007) menunjukkan rendemen hidrokoloid yang dihasilkan melalui proses ekstraksi dengan asam sitrat tanpa proses pemurnian dengan etanol berkisar antara 16,93-23,91%. Apabila dibandingkan dengan rendemen pektin yang dihasilkan pada penelitian ini maka rendemen pektin cincau hijau hasil pemurnian dengan etanol lebih rendah. Menurut Nurdin dan Suharyono (2007), proses pemurnian dapat menyebabkan penurunan rendemen. Asam dapat menyebabkan hidrolisis terhadap struktur komponen pembentuk gel cincau pohon, sehingga diduga terdapat sebagian komponen pembentuk gel cincau pohon hasil hidrolisis yang larut dalam air maupun etanol pengeksrak yang lolos dari kain saring selama proses penyaringan.

**Tabel 1.** Karakteristik serbuk dan pektin cincau hijau

Parameter	Serbuk		Pektin	
	Kadar Wet Basis (%)	Kadar Dry Basis (%)	Kadar Wet Basis (%)	Kadar Dry Basis (%)
Air	6,71	7,24	5,09	5,37
Protein (N total x 6,25)	16,81	17,25	11,06	11,25
Lemak	1,22	1,23	0,35	0,351
Abu	7,54	8,16	28,5	39,86
Karbohidrat (by different)	67,72	66,12	55,00	43,17
Serat kasar	18,88	23,27	12,15	13,10
Rendemen	27,5	-	15,2	-

### **Karakterisasi edible film cincau hijau**

#### *Pengaruh konsentrasi pektin pada ketebalan edible film*

Ketebalan film merupakan parameter penting yang berpengaruh terhadap penggunaan film dalam pembentukan produk yang akan dikemas. Ketebalan film akan mempengaruhi permeabilitas gas. Semakin tebal *edible film* maka permeabilitas gas akan semakin kecil dan dapat melindungi produk yang dikemas dengan lebih baik. Ketebalan film juga dapat mempengaruhi sifat mekanik film yang lain, seperti *tensile strength* dan elongasi. Namun dalam penggunaannya, ketebalan *edible film* harus disesuaikan dengan produk yang dikemas (Kusumasmarawati 2007). Hasil pengukuran ketebalan *edible film* pada berbagai variasi konsentrasi pektin cincau hijau disajikan pada Gambar 2.

Hasil penelitian ketebalan *edible film* cincau hijau menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau menyebabkan kenaikan total padatan terlarut dalam larutan film, sehingga menyebabkan ketebalan film semakin meningkat. Pektin pada konsentrasi 30% memberikan nilai ketebalan tertinggi, sedangkan pada konsentrasi pektin 10% memberikan nilai ketebalan terendah namun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi pektin 0% dan 20%.

Pada penelitian ini dapat diketahui bahwa *edible film* pektin cincau hijau mempunyai ketebalan antara 0,127-0,145 mm (Gambar 3). Hasil analisis statistik menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan konsentrasi.

Apabila dibandingkan dengan ketebalan film pada *edible film* komposit maizena glukomanan yang mempunyai ketebalan 0,1613-0,1828 mm pada penelitian yang dilakukan oleh Siswanti (2008) maka *edible film* pektin cincau hijau yang dihasilkan pada penelitian ini jauh lebih tipis. Namun, apabila dibandingkan dengan *edible film* yang dibuat dari komposit pektin albedo semangka dan tapioka dari penelitian yang dilakukan oleh Anugrahati (2001) yang memiliki ketebalan antara 0,105-0,120 mm; hasil penelitian *edible film* yang dibuat dari komposit protein biji kecipir dan tapioka oleh Poeloengasih (2002) yang memiliki ketebalan 0,096-0,104 mm; serta hasil penelitian Murdianto et al. (2005) berupa *edible film* dari ekstrak janggolan dengan ketebalan 0,073-0,085 mm maka *edible film* pektin cincau hijau jauh lebih tebal. Murdianto et al. (2005) menyebutkan bahwa perbedaan ketebalan antara berbagai jenis film tersebut disebabkan oleh adanya komposisi formula film yang berbeda.

#### *Pengaruh konsentrasi pektin terhadap kelarutan edible film*

Kelarutan film merupakan faktor yang penting dalam menentukan biodegradabilitas film ketika digunakan sebagai pengemas. Ada film yang dikehendaki memiliki tingkat kelarutan yang tinggi atau sebaliknya, tergantung jenis produk yang dikemas (Nurjannah 2004). Hasil pengujian terhadap tingkat kelarutan *edible film* cincau hijau ditunjukkan pada Gambar 3.

Pada kenyataannya, semakin tinggi konsentrasi pektin yang ditambahkan maka semakin meningkatkan tingkat kelarutan *edible film*. Murdianto et al. (2005) menyebutkan bahwa penambahan komponen yang bersifat hidrofob mengakibatkan film memiliki kelarutan yang rendah.

Sementara itu, Siswanti (2008) menyebutkan bahwa peningkatan jumlah komponen yang bersifat hidrofilik diduga menyebabkan peningkatan persentase kelarutan film.

Dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa tingkat kelarutan dari *edible film* cincau hijau berkisar antara 64,9-77,4%. Namun dari hasil penelitian yang diperoleh, tidak terdapat perbedaan yang nyata pada setiap perlakuan konsentrasi. *Edible film* cincau hijau bersifat hidrofilik, sehingga lebih mudah menyerap air. Apabila dibandingkan dengan tingkat kelarutan pada *edible film* cincau hitam pada penelitian yang dilakukan oleh Murdianto et al. (2005) dengan tingkat kelarutan 44,9-72,9%, serta *edible film* komposit glukomanan-maizena pada penelitian yang dilakukan oleh Siswanti (2008) dengan tingkat kelarutan berkisar antara 40,6-50,6% maka *edible film* pektin cincau hijau ini memiliki tingkat kelarutan yang lebih besar.

#### *Pengaruh konsentrasi pektin pada tensile strength edible film*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau, meningkatkan *tensile strength* (kekuatan regang putus) *edible film* yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kisaran nilai kuat regang putus antara 0,70-2,53 Mpa, dan berdasarkan hasil uji statistik, terdapat perbedaan kekuatan regang putus yang signifikan antar keempat jenis *edible film*. Hasil pengujian kekuatan regang putus *edible film* cincau hijau ditunjukkan pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa variasi konsentrasi pektin cincau hijau yang ditambahkan (10%, 20%, 30%) berpengaruh nyata terhadap kekuatan regang putus *edible film* cincau hijau yang dihasilkan. Hal ini disebabkan semakin meningkatnya konsentrasi pektin cincau hijau yang ditambahkan maka gaya interaksi antar matriks molekul yang terdapat dalam *edible film* semakin kuat, sehingga meningkatkan kekuatan dari *edible film* yang dihasilkan.

Apabila dibandingkan dengan *edible film* ekstrak daun janggolan dari hasil penelitian Murdianto et al. (2005) dengan nilai kuat regang putus 3,10-5,70 Mpa maka *edible film* cincau hijau memiliki kuat regang putus yang lebih kecil. Hal ini disebabkan karena perbedaan komposisi dan konsentrasi mempengaruhi kuat regang putus yang dihasilkan. Siswanti (2008) menyebutkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak yang ditambahkan maka kekuatan regang putus film juga semakin meningkat akibat adanya interaksi antar polimer glukomanan yang semakin kuat. Interaksi yang terbentuk tersebut selanjutnya memperkuat jaringan tiga dimensi dalam *edible film* yang dihasilkan.

Manuhara (2003) menyebutkan bahwa sifat mekanik film tergantung pada kekuatan bahan yang digunakan dalam pembuatan film, untuk membentuk ikatan molekuler dalam jumlah yang banyak dan/atau kuat. Gontard et al. (1993), dalam penelitiannya juga menyebutkan bahwa *tensile strength* akan menurun, disebabkan oleh adanya reduksi interaksi intermolekuler rantai protein, sehingga matriks film yang terbentuk akan semakin sedikit. Reduksi interaksi intermolekuler rantai protein terjadi akibat adanya penambahan gliserol dan molekul *plasticizer* yang dapat

mengganggu kekompakan pati, menurunkan interaksi intermolekul, dan meningkatkan mobilitas polimer, selanjutnya menyebabkan peningkatan *elongasi* dan penurunan *tensile strength* seiring dengan peningkatan konsentrasi gliserol. Penurunan interaksi intermolekul dan peningkatan mobilitas molekul akan memfasilitasi migrasi molekul uap air (Rodrigues et al. 2006). Gliserol yang digunakan dalam penelitian *edible film* cincau hijau ini lebih besar jumlahnya apabila dibandingkan pada *edible film* ekstrak daun janggolan. Semakin tinggi konsentrasi gliserol yang ditambahkan maka reduksi interaksi intermolekuler rantai protein juga akan semakin meningkat, sehingga *tensile strength* akan semakin menurun.

Menurut Suryaningrum et al. (2005), *edible film* dengan kekuatan tarik yang tinggi mampu melindungi produk yang dikemas dari gangguan mekanis dengan baik, sedangkan kekuatan tarik film dipengaruhi oleh formulasi bahan yang digunakan.

#### *Pengaruh konsentrasi pektin terhadap elongasi edible film*

Anugrahati (2001) menyebutkan bahwa elongasi merupakan persentase perubahan panjang film saat ditarik. Perubahan panjang dapat dilihat pada film yang robek, semakin tinggi konsentrasi pektin yang digunakan maka semakin menurunkan tingkat elongasi yang dihasilkan.

Elongasi *edible film* yang dihasilkan dari berbagai konsentrasi pektin cincau hijau ditunjukkan pada Gambar 5. Dari hasil penelitian diperoleh kisaran elongasi dari *edible film* yang dihasilkan, yaitu antara 13,7-19,5%, namun dari hasil penghitungan secara statistik tidak diperoleh perbedaan yang signifikan. Peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau cenderung menurunkan elongasi (pemanjangan) *edible film* yang dihasilkan. Namun, berdasarkan hasil uji statistik, penggunaan konsentrasi pektin cincau hijau sebesar 20% menghasilkan nilai elongasi yang cenderung lebih tinggi dibanding ketiga *edible film* yang lain, namun tidak berbeda nyata dengan konsentrasi pektin 0% dan 10%. Hal ini disebabkan gliserol (*plasticizer*) yang digunakan dalam pembuatan film pada konsentrasi 20%, berikatan dengan pektin secara seimbang, sehingga tidak terdapat kelebihan ataupun kekurangan gliserol.

Menurut Barus (2002), peningkatan konsentrasi bahan akan menyebabkan peningkatan matrik yang terbentuk, sehingga film akan menjadi kuat. Namun, peningkatan konsentrasi bahan juga menyebabkan penurunan rasio gliserol sebagai *plasticizer*, sehingga mengakibatkan penurunan elongasi film apabila terkena gaya yang kemudian menyebabkan film mudah patah.

Nilai elongasi pada *edible film* cincau hijau yang dihasilkan berkisar antara 13,7-19,5%. Apabila dibandingkan dengan *edible film* komposit protein biji kecipir dan tapioka pada penelitian yang dilakukan oleh Poeloengasih (2002) dengan nilai elongasi berkisar antara 1,68-3,48%, serta *edible film* dari ekstrak daun janggolan pada penelitian yang dilakukan oleh Murdianto et al. (2005) dengan elongasi antara 0,14-0,27%, *edible film* pektin cincau hijau memiliki nilai elongasi yang jauh lebih besar.

Anugrahati (2001) menyebutkan bahwa film yang terbentuk dari pektin saja menghasilkan matriks yang lebih elastis. Selain itu, penggunaan gliserol sebagai *plasticizer* dalam penelitian *edible film* pektin cincau hijau ini lebih besar daripada *edible film* dari ekstrak daun janggolan serta protein biji kecipir dan tapioka. Reduksi interaksi intermolekuler rantai protein terjadi disebabkan oleh adanya penambahan gliserol. Molekul *plasticizer* akan mengganggu kekompakan pati, menurunkan interaksi intermolekul, dan meningkatkan mobilitas polimer, selanjutnya menyebabkan peningkatan elongasi dan penurunan *tensile strength* seiring dengan peningkatan konsentrasi gliserol (Rodrigues et al. 2006).

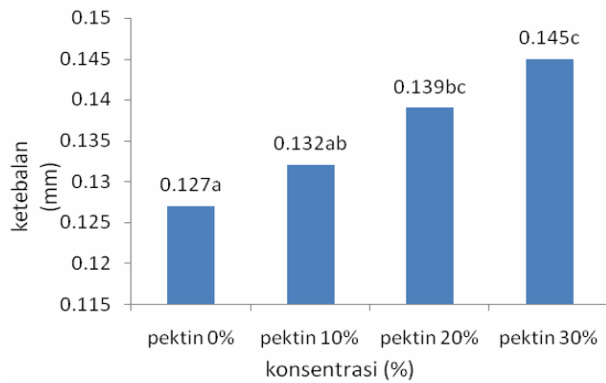
Hasil penelitian menunjukkan bahwa *edible film* cincau hijau mempunyai tingkat elongasi yang cukup baik. Krochta dan de Mulder-Johnston (1997) dalam Suryaningrum et al. (2005) menyebutkan bahwa persentase elongasi *edible film* dikatakan baik jika nilainya lebih dari 50% dan dikatakan jelek jika nilainya kurang dari 10%.

#### *Pengaruh konsentrasi pektin pada laju transmisi uap air edible film*

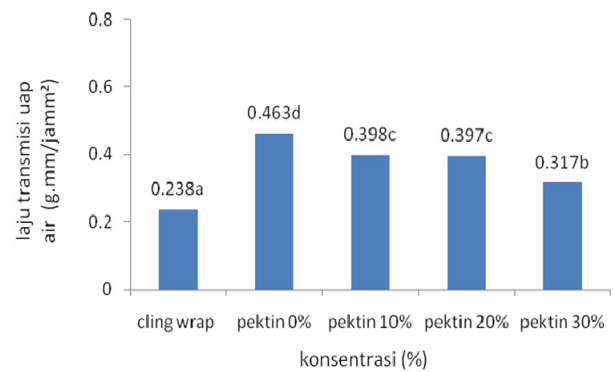
Krochta et al. (1994) menyebutkan bahwa nilai laju transmisi uap air dapat digunakan untuk menentukan umur simpan produk. Hal ini dikarenakan jika laju transmisi uap air dapat ditahan maka umur simpan produk dapat diperpanjang. Hilangnya air pada buah-buahan dan sayuran merupakan penyebab utama kerusakan bahan selama penyimpanan. Kehilangan air dapat menyebabkan buah dan sayuran mengalami susut berat dan tampak layu, sehingga kurang disenangi oleh konsumen. Menurut Gontard (1993), salah satu fungsi *edible film* adalah untuk menahan migrasi uap air. Barus (2002) menyebutkan bahwa migrasi uap air umumnya terjadi pada bagian film yang bersifat hidrofilik. Dengan demikian, rasio antara bagian yang bersifat hidrofilik dan hidrofobik dari komponen film akan mempengaruhi nilai laju transmisi uap air film tersebut. Semakin besar tingkat hidrofobitas film maka nilai laju transmisi uap air film tersebut akan semakin menurun.

Pada penelitian ini, laju transmisi uap air dapat ditahan oleh *edible film* cincau hijau yang dihasilkan berkisar antara 0,463-0,317 g mm/m<sup>2</sup>.jam. Hasil pengujian laju transmisi uap air pada *edible film* cincau hijau ditunjukkan pada Gambar 6.

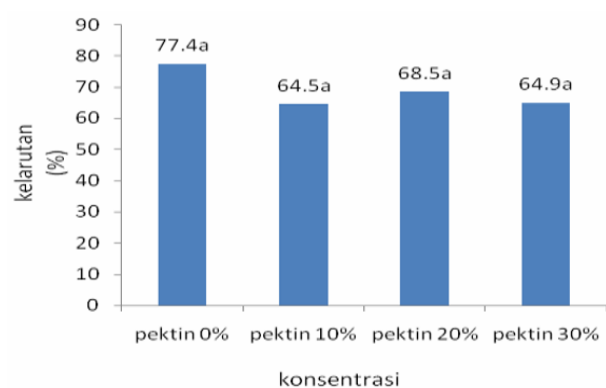
Semakin kecil migrasi uap air yang terjadi pada produk yang dikemas oleh *edible film* maka semakin baik kemampuan *edible film* dalam menjaga umur simpan produk yang dikemas. Peningkatan konsentrasi pektin cenderung menurunkan laju transmisi uap air *edible film* yang dihasilkan. Siswanti (2008) menyebutkan dalam penelitiannya bahwa semakin meningkatnya konsentrasi glukomanan maka dapat menurunkan laju transmisi uap air. Hal ini disebabkan peningkatan molekul larutan menyebabkan matriks film semakin banyak, sehingga struktur film yang kuat dengan struktur jaringan film yang semakin kompak dan kokoh dapat meningkatkan kekuatan film dalam menahan laju transmisi uap air.



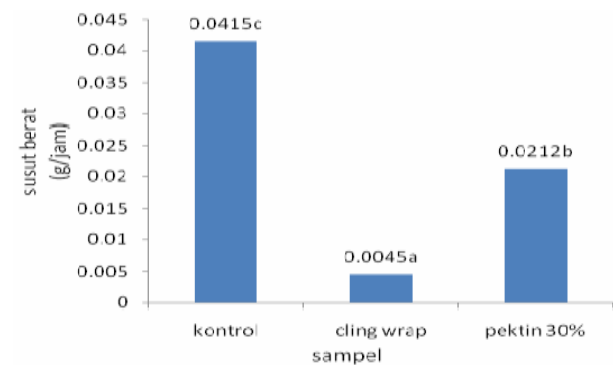
**Gambar 2** Ketebalan *edible film* pektin cincau hijau



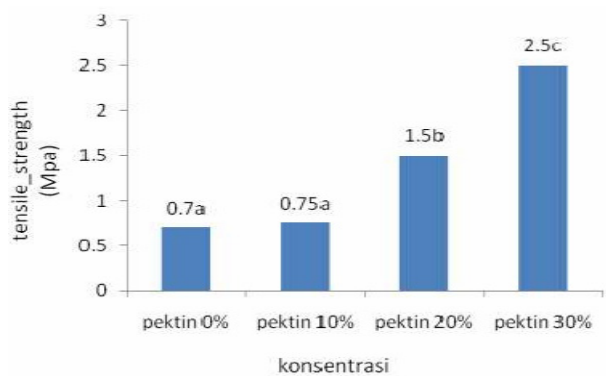
**Gambar 6.** Laju transmisi uap air *edible film* cincau hijau.



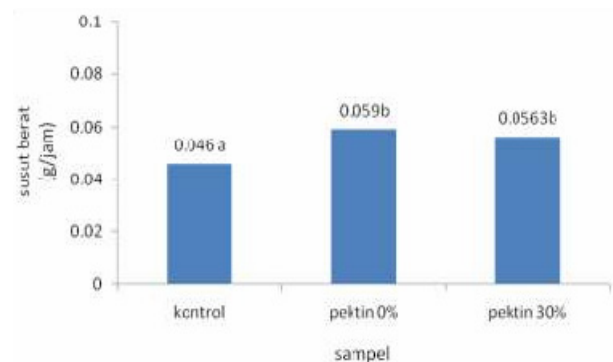
**Gambar 3** Kelarutan *edible film* cincau hijau



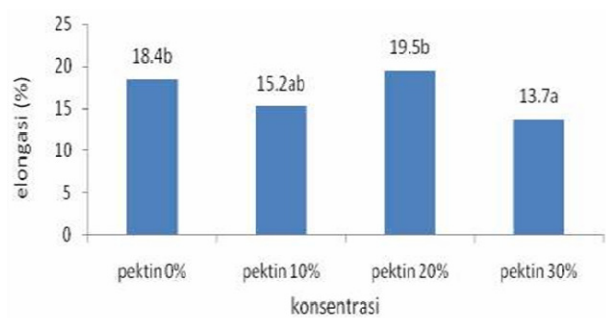
**Gambar 7.** Susut berat buah anggur hijau dengan metode *wrapping*



**Gambar 4.** Kekuatan regang putus *edible film* cincau hijau



**Gambar 8.** Susut berat buah anggur hijau dengan metode *coating*



**Gambar 5.** Elongasi *edible film* cincau hijau

Apabila dibandingkan dengan *edible film* dari ekstrak janggolan dengan laju transmisi uap air berkisar antara 0,818-1,751 g mm/jam.m<sup>2</sup> maka *edible film* dari pektin cincau hijau memiliki kemampuan dalam menahan laju transmisi uap air yang lebih besar. Cincau hijau memiliki sifat alamiah yang bersifat hidrofilik, namun menurut Haryadi (1991), dijelaskan bahwa cincau hijau yang dikeringkan dapat menurunkan daya pembentukan gel, sehingga lebih sulit untuk menyerap air daripada cincau hijau segar. Selain itu, dalam pembuatan *edible film* pektin cincau hijau juga digunakan CaSO<sub>4</sub>. Menurut Koswara et al. (2002), CaSO<sub>4</sub> berfungsi sebagai pengukuh gel cincau hijau, sehingga dalam pembuatan *edible film* dapat

digunakan untuk memperkuat matriks-matriks yang terdapat di dalam jaringan *edible film*. Kandungan pektin pada tanaman sebagian besar terdapat pada lamela tengah dinding sel (Nurdin dan Suharyono 2007). Pada dinding sel tanaman, pektin berikatan dengan ion kalsium dan berfungsi untuk memperkuat struktur dinding sel. Semakin banyak ion kalsium yang diikat oleh pektin maka akan memperkecil laju transmisi uap air.

Nilai laju transmisi uap air terendah pada penelitian ini dimiliki oleh *edible film* dengan konsentrasi pektin 30%. Dengan demikian, dapat ditentukan konsentrasi penambahan pektin yang digunakan untuk membuat *edible film* untuk tahap aplikasi. Kriteria yang digunakan untuk menentukan konsentrasi pektin tersebut adalah konsentrasi pektin dalam *edible film* yang dapat memberikan laju transmisi uap air paling rendah, yaitu pada penambahan konsentrasi pektin sebesar 30%.

#### **Aplikasi *edible film* cincau hijau pada buah anggur hijau** *Aplikasi pengukuran susut berat buah anggur hijau dengan metode wrapping*

Semua produk hasil pertanian mudah rusak, apalagi setelah jangka waktu penyimpanan tertentu, sehingga diperlukan pengemas untuk membatasi antara bahan pangan dan kondisi sekitar untuk menunda proses kerusakan dalam jangka waktu yang diinginkan. Buckle et al. (1985) menjelaskan bahwa pengemasan merupakan suatu cara dalam memberikan kondisi sekitar yang tepat bagi bahan pangan, dengan demikian membutuhkan pemikiran dan perhatian yang lebih besar dari yang biasanya diketahui. Konsep dasar dalam memperpanjang umur simpan produk hasil pertanian pada umumnya dilakukan dengan menekan laju respirasi, transpirasi, dan laju produksi etilen ( $C_2H_2$ ) serta metabolisme lain pasca pemetikan. Penghambatan laju respirasi dan produksi etilen dapat dilakukan dengan cara penyimpanan pada suhu dingin, modifikasi atmosfer, dan aplikasi bahan pelapis yang bersifat *edible* (Krochta et al. 1994).

Pada penelitian ini, *edible film* yang terpilih adalah *edible film* dengan laju transmisi uap air terendah yang diaplikasikan pada buah anggur hijau dengan cara *wrapping*, dimana sebelumnya buah anggur hijau telah dicelupkan dalam larutan NaOH 0,05% untuk mencegah timbulnya jamur selama penyimpanan. Hasil pengamatan terhadap susut berat buah anggur hijau secara *wrapping* ditunjukkan pada Gambar 7.

Pada penelitian ini, metode *wrapping* yang digunakan dalam aplikasi *edible film* dilakukan selama 8 jam dengan penimbangan cawan setiap jamnya, serta parameter yang diamati berupa susut berat buah anggur hijau. Dalam penelitian ini juga digunakan pembandingan atau perlakuan kontrol berupa anggur hijau dalam cawan tanpa dikemas, serta perlakuan pengemasan anggur hijau dalam cawan menggunakan plastik saran (*Cling Wrap*). Gambar 7 menunjukkan bahwa *edible film* pektin cincau hijau mampu menurunkan susut berat buah anggur hijau selama penyimpanan hingga mendekati setengahnya dari susut berat kontrol dengan nilai susut berat sebesar 0,0212 g/jam. Namun demikian, kemampuan *edible film* tersebut dalam menurunkan susut berat buah anggur hijau masih jauh lebih

rendah dan berbeda secara signifikan apabila dibandingkan dengan plastik saran komersial (*Cling Wrap*).

Dalam penelitian ini, dapat diketahui bahwa susut berat buah anggur hijau yang dikemas dengan *edible film* pektin cincau hijau lebih baik daripada susut berat buah yang dikemas dengan *edible film* komposit glukomanan-maizena (Siswanti 2008), yaitu sebesar 0,0885 g/jam. Hal ini disebabkan buah yang digunakan dalam aplikasi pada penelitian ini adalah buah anggur hijau yang memiliki kulit buah yang masih segar, sedangkan pada penelitian *edible film* komposit glukomanan-maizena dalam penelitian yang dilakukan oleh Siswanti (2008), digunakan potongan buah apel tanpa kulit, sehingga perpindahan air bahan dari dalam potongan buah lebih besar daripada perpindahan air bahan dari buah anggur hijau segar yang masih memiliki kulit. Tranggono dan Sutardi (1990) menyebutkan bahwa tipe permukaan buah-buahan dan jaringan di bawahnya mempunyai pengaruh yang besar terhadap kecepatan kehilangan air. Banyak macam bahan segar yang permukaan kulitnya berlilin (kutikula) sehingga resistan terhadap aliran air atau uap air. Lapisan lilin pada kulit buah yang tersusun dari platelet tumpang tindih kompleks dengan struktur yang teratur, memberikan retensi yang besar terhadap kehilangan air dari jaringan buah. Dengan demikian, buah yang belum dikupas kulitnya mempunyai penghambatan kehilangan air lebih besar daripada buah yang sudah dikupas. Faktor inilah yang diduga menyebabkan nilai susut berat buah anggur hijau yang dikemas dengan *edible film* pektin cincau hijau lebih kecil daripada buah yang dikemas dengan *edible film* glikomanan-maizena.

Penghambatan susut berat buah banyak dipengaruhi oleh kemampuan penghambatan laju transmisi uap air (WVTR) film, sedangkan WVTR *edible film* dipengaruhi oleh sifat alami dari bahan pembuatan *edible film* itu sendiri. Tranggono dan Sutardi (1990) juga menyebutkan bahwa derajat penurunan kecepatan kehilangan air juga tergantung pada permeabilitas kemasan terhadap transfer uap air pada kerapatan isi kemasan. Semua bahan yang biasa digunakan sebagai pengemas bersifat permeabel terhadap uap air sampai batas-batas tertentu. Cincau hijau memiliki sifat alami yang suka terhadap air (hidrofil), namun menurut Pitojo dan Zumiyati (2005), pengeringan menyebabkan penurunan kemampuan penjendalan, sehingga diperlukan waktu yang lama untuk melakukan rehidrasi. Haryadi (1991) juga menyebut bahwa kemungkinan penyebabnya adalah akibat aktivitas enzim yang secara alami berada dalam jaringan daun. Hal inilah yang diduga menyebabkan permeabilitas dari *edible film* cincau hijau lebih rendah apabila dibandingkan dengan *edible film* dari cincau hitam dan *edible film* dari glukomanan-maizena.

Dalam penelitian ini, *edible film* yang dihasilkan dan digunakan sebagai pengemas anggur hijau dalam cawan memiliki warna hijau keruh kekuningan, hal ini disebabkan etanol yang digunakan dalam ekstraksi pektin cincau hijau dapat melarutkan klorofil tetapi tidak seluruhnya. Jika digunakan untuk pengemas maka produk yang dikemas tidak akan terlihat sehingga tidak menarik konsumen.

Haryadi (1991) menyebutkan bahwa ekstraksi klorofil disarankan dilakukan dengan aseton, sehingga diperoleh serbuk cincau yang berwarna putih pucat yang tahan lama dan dapat digunakan untuk berbagai keperluan. Aseton merupakan bahan pelarut organik yang baik, apabila meninggalkan sisa pada bahan, sedikit aseton tidak akan mengganggu kesehatan manusia yang mengonsumsinya.

#### *Aplikasi pengukuran susut berat buah anggur hijau dengan metode coating*

Salah satu metode yang digunakan untuk memperpanjang umur simpan produk pasca panen adalah *edible coating*. *Coating* yang dibuat dari bahan-bahan *edible* yang digunakan pada produk segar, bertujuan untuk mengurangi *barrier* semipermeabel gas dan uap air. Khrochta et al. (1994) menyebutkan bahwa keuntungan dari *coating* polisakarida adalah meskipun permeabel terhadap CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>, namun menghasilkan penghambatan kematangan terhadap berbagai buah klimakterik, disamping itu juga meningkatkan umur simpan tanpa menghasilkan kondisi anaerobik yang tinggi. Hasil pengamatan terhadap susut berat buah anggur hijau disajikan pada Gambar 8.

Pada pengukuran susut berat buah anggur hijau, sebelumnya dicelupkan dalam larutan NaOH 0,05%, hal ini bertujuan untuk mencegah timbulnya jamur selama proses penyimpanan. Jenis perlakuan yang dibandingkan dalam pengukuran susut berat menggunakan metode *coating* ini adalah perlakuan kontrol, yaitu buah anggur hijau tanpa *coating*, buah anggur hijau yang *coating* dengan *edible film* pektin cincau hijau pada konsentrasi 0%, dan *edible film* terpilih pektin cincau hijau pada konsentrasi 30%. Dari hasil penelitian, diperoleh bahwa *edible film coating* dengan konsentrasi pektin cincau hijau 30% mampu menghambat susut berat hingga 0,0563 g/jam. Angka tersebut masih lebih besar apabila dibandingkan dengan penghambatan susut berat pada perlakuan kontrol, namun tidak berbeda secara signifikan apabila dibandingkan dengan buah anggur yang *coating* dengan cairan *edible film* pektin cincau hijau pada konsentrasi 0%.

Hal ini disebabkan pada perlakuan *coating* 30% mengalami pemanasan suhu 40°C, yang berasal dari *hair dryer*, sehingga pori-pori pada permukaan buah anggur hijau membuka yang mengakibatkan susut berat lebih besar daripada kontrol yang tidak mengalami proses pemanasan, dimana pori-pori yang terdapat pada buah anggur hijau belum terbuka. Menurut Siswanti (2008), bertambahnya susut berat buah disebabkan oleh terjadinya transpirasi pada buah, yaitu kehilangan air dari dalam buah melalui pori-pori.

Apabila dibandingkan dengan *edible film* glukomanan-maizena pada penelitian Siswanti (2008), yang mampu menghambat susut berat potongan buah apel pada kisaran 0,0671-0,0597 g/jam maka *edible film* cincau hijau memiliki penghambatan susut berat yang jauh lebih baik. Hal ini disebabkan buah yang digunakan dalam aplikasi *edible film* komposit glukomanan-maizena adalah potongan buah apel tanpa kulit dengan pori-pori yang jauh lebih besar dibandingkan buah anggur hijau yang masih memiliki kulit seperti yang digunakan dalam penelitian ini. Selain itu, metode yang digunakan dalam aplikasi *edible*

*film* secara *coating* tersebut menggunakan pemanasan dari *hair dryer*, sehingga semakin besar pori-pori yang dimiliki oleh tubuh buah maka dengan adanya pemanasan, pertukaran air dari dalam tubuh buah ke lingkungan juga semakin besar.

Apabila dibandingkan dengan perlakuan aplikasi secara *wrapping* maka aplikasi *edible film* secara *coating* dalam menghambat susut berat jauh lebih rendah. Apabila dibandingkan dengan perlakuan kontrol, perlakuan *coating* dengan konsentrasi pektin 30% menghasilkan warna yang seragam dan lebih mengilap pada kenampakan warna dari buah anggur hijau sehingga lebih menarik perhatian konsumen.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan sebagai berikut. Rendemen serbuk dan pektin dari cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) masing-masing sebesar 27,5% dan 15,2%. Pektin hasil ekstraksi mengandung kadar air 5,09%, protein 11,06%, lemak 0,35%, abu 28,5%, serat kasar 12,15%, dan karbohidrat (*by different*) 55,00%. Peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau cenderung meningkatkan ketebalan serta kekuatan regang putus *edible film* yang dihasilkan. Peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau cenderung menurunkan elongasi dan persentase kelarutan *edible film* yang dihasilkan. *Edible film* dengan konsentrasi pektin terpilih untuk tahap aplikasi adalah *edible film* dengan konsentrasi pektin 30% yang memiliki nilai ketebalan, kelarutan, *tensile strength*, dan elongasi berturut-turut sebesar 0,145 mm, 64,9%, 2,5 Mpa, dan 13,7%. Peningkatan konsentrasi pektin cincau hijau cenderung menurunkan laju transmisi uap air (WVTR) *edible film* yang dihasilkan. Laju transmisi uap air terendah dihasilkan pada *edible film* pektin cincau hijau dengan konsentrasi pektin sebesar 30%, yaitu sebesar 0,317 g.mm/m<sup>2</sup>.jam. *Edible film* pektin cincau hijau pada konsentrasi 30%, dengan teknik *wrapping* secara nyata mampu menurunkan susut berat buah anggur hijau selama penyimpanan menjadi setengah dari susut berat kontrol, namun demikian, kemampuan *edible film* tersebut masih jauh lebih rendah apabila dibandingkan dengan plastik saran komersial. Susut berat buah anggur hijau yang *coating* dengan *edible film* tersebut masih jauh lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kontrol tanpa dikemas dan berbeda secara nyata, namun tidak berbeda secara nyata dengan konsentrasi 0%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anugrahati NA. 2001. Karakterisasi *Edible Film* Komposit Pektin Albido Semangka (*Citrullus vulgaris* Schard) dan Tapioka. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Astawan M, Andreas LK. 2008. Khasiat warna-warni makanan. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Astawan M. 2002. Cincau hitam pelepas dahaga. Majalah Sedap Sekejap, Jakarta.
- Barus SP. 2002. Karakteristik Film Pati Biji Nangka (*Artocarpus integra* Meur) dengan Penambahan CMC. [Skripsi]. Universitas Atma Jaya, Yogyakarta.

- Buckle KA, Edwards RA, Fleet GH et al. 1985. Ilmu pangan. UI Press, Jakarta.
- Gontard N, Guilbert S, Cuq JL. 1993. Water and glycerol as plasticizer affect mechanical and water barrier properties at an edible wheat gluten film. *J Food Sci* 58 (1): 206-211.
- Haryadi. 1991. Pengujian pektin hidrokolloid camcao. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Koswara S, Purwiyatno H, Eko HP. 2002. Edible film. *Jurnal Teknologi Pangan dan Agroindustri* 1 (12): 183-196.
- Koswara S. 2008. Pembuatan cinau bubuk. [www.ebookpangan.com](http://www.ebookpangan.com). [15 Desember 2008].
- Krochta JM, de Mulder-Johnston C. 1997. Edible and biodegradable polymers film: Changes and opportunities. *Food Technol* 51 (2): 61-74.
- Krochta JM, Baldwin EA, Nisperos-Carriedo MO. 1994. Edible coatings and films to improve food quality. Technomic Publishing Co, Inc., Lancaster, Bosc.
- Kurnia K. 2007. Cinau, segar dan menyehatkan. [www.kotasantri.com](http://www.kotasantri.com). [21 Januari 2009].
- Kusumasmarawati AD. 2007. Pembuatan Pati Garut Butirat dan Aplikasinya dalam Pembuatan *Edible film*. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Manuhara GJ. 2003. Ekstraksi Karaginan dari Rumput Laut *Eucheuma* sp. untuk Pembuatan *Edible film*. [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- McHugh TH, Sanesi E. 2000. Apple wraps, A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *J Food Sci* 56 (3): 480-485.
- McHugh TH. 1993. Hydrophilic edible films: Modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *J Food Sci* 58 (4): 899-903.
- Murdianto W, Marseno DW, Haryadi. 2005. Sifat fisik dan mekanik *edible film* dari ekstrak daun janggolan. *Agrosains* 18 (3).
- Nurdin SU, Suharyono AS. 2007. Karakteristik fungsional polisakarida pembentuk gel daun cinau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) [upppolinela.files.wordpress.com](http://upppolinela.files.wordpress.com). [15 Desember 2008].
- Nurjannah W. 2004. Isolasi dan Karakterisasi Alginat dari Rumput Laut *Sargassum* sp. untuk Pembuatan *Biodegradable Film* Komposit Alginat Tapioka. [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pitojo S, Zumiayati. 2005. Cinau: Cara pembuatan dan variasi olahannya. PT Agromedia Pustaka, Tangerang.
- Poeloengasih CD. 2002. Karakterisasi *Edible film* Komposit Protein Biji Kecapir (*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) D.C.) dan Tapioka. [Tesis]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pradnyamitha. 2008. Jenis bahan pengawet pada makanan. [bayivegetarian.com](http://bayivegetarian.com). [15 Desember 2008].
- Rodrigues M, Ose's J, Ziani K et al. 2006. Combined effect of plasticizer and surfactants on the physical properties of starch based edible films. *Food Res Int* 39: 840-846. Doi: 10.1016/j.foodres.2006.04.002.
- Siswanti. 2008. Karakterisasi *Edible film* dari Tepung Komposit Glukomanan Umbi Iles-iles (*Amorphophallus Muelleri* Blume) dan Tepung Maizena. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi E. 1989. Analisis bahan makanan dan pertanian. Liberty, Yogyakarta.
- Suryaningrum DTH, Basmal J, Nurochmawati. 2005. Studi pembuatan *edible film* dari karaginan. *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 11 (4): 1-13.
- Tranggono, Sutardi. 1990. Biokimia dan teknologi pasca panen. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Winarno FG. 1992. Kimia pangan dan gizi. PT Gramedia utama, Jakarta.

## Efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kinerja tikus galur Wistar pasca *restraint* stres

### The effect of ethanol extract of pegagan (*Centella asiatica*) on the performance of Wistar rats after *restraint* stress

BAARID LUQMAN HAMIDI, SAMIGUN, ANIK LESTARI

Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 21 Desember 2009. Revisi disetujui: 8 Februari 2009.

**Abstract.** Hamidi BL, Samigun, Lestari A. 2010. The effect of extract ethanol of pegagan (*Centella asiatica*) on the performance of Wistar rats after *restraint* stress. *Biofarmasi* 8: 11-16. The aim of this research was to investigate the effects of extract ethanol of pegagan (*Centella asiatica*) after treated with *restraint* stress by measuring the eight arms radial maze performance of rats. Pre-test and post-test controlled groups design was applied in this research. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with the mean age of 8 weeks and the body weight of 150-200 grams which used for sample were divided randomly into 4 groups, each group consisted of 6 rats, i.e. (i) control group (without any treatment), (ii) stress group (it was given by *restraint* stress for 2 hours/day for each rat), (iii) pegagan group (it was given by 0.3 mg/g BW/day/rat extract ethanol of pegagan), and (iv) pegagan and stress group (it was given by 0.3 mg/g BW/day/rat extract ethanol of pegagan and *restraint* stress for 2 hours/day for each rat). The treatments were given for 21 days. Within 12 days for each pre-treatment and post-treatment, a test on the eight arm radial maze was conducted on individual rat to observe its performance. The assessment of rat performance in the eight arms radial maze test was conducted based on error type B. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests with SPSS for Windows 16 version were applied to analyze statistically the difference between four groups. Kruskal-Wallis test was used to show the significant performance level difference between four groups of rats with  $p=0.001$ , while Mann-Whitney test was used to determine the significant difference between stress group and pegagan group ( $p=0.001$ ), also stress group and pegagan and stress group ( $p=0.001$ ). The result of research showed that there was no significant difference between control group and stress group ( $p=0.051$ ), control group and pegagan group ( $p=0.143$ ), control group and pegagan and stress group ( $p=0.143$ ), also pegagan group and pegagan and stress group ( $p=0.952$ ). It was concluded that extract ethanol of pegagan improved the performances of rats on the eight arms radial maze after treated with *restraint* stress.

**Keywords:** *Centella asiatica*, pegagan, performance, rat, *restraint* stress

#### PENDAHULUAN

Sejak ribuan tahun yang lalu, pengobatan tradisional sudah ada di Indonesia, jauh sebelum pelayanan kesehatan formal dengan obat-obatan modern dikenal masyarakat. Pengobatan tradisional dengan memanfaatkan tumbuhan berkhasiat obat merupakan pengobatan yang diakui masyarakat dunia dan menunjukkan kesadaran untuk kembali ke alam (*back to nature*) untuk mendapatkan kesehatan yang optimal dan mengatasi berbagai penyakit secara alami (Wijayakusuma 2000).

Pegagan (*Centella asiatica*) telah lama dikenal sebagai salah satu obat tradisional di Asia selama ratusan tahun dan sering digunakan sebagai nutrisi otak untuk meningkatkan kemampuan belajar dan mengingat (Rahmasari 2006). Pegagan dipercaya dapat meningkatkan daya ingat dan konsentrasi pada anak yang mengalami retardasi mental (Kumar dan Gupta 2003). Khasiat pegagan ini diduga karena adanya bahan aktif yang terkandung di dalamnya, yaitu asiaticosida, madekasosida, dan asam madekasat (Sudarsono et al. 2002).

Telah dilakukan banyak penelitian yang membuktikan manfaat pegagan terhadap peningkatan dan perbaikan

memori. Dalam suatu penelitian disebutkan bahwa tanaman pegagan mampu meningkatkan biosintesis neurotransmitter, arborisasi dendrit, dan myelinisasi akson (Rao et al. 2005, 2007; Soumyanath et al. 2005). Diungkapkan juga bahwa pegagan dapat mencegah kerusakan sel-sel saraf akibat stres oksidatif (Mook-Jung et al. 1999; Kumar et al. 2003; Rao et al. 2005; Rao et al. 2007).

Salah satu penyebab penurunan kinerja memori adalah stres (Lupien et al. 1997; Kuhlman et al. 2005). Studi terkini menyebutkan bahwa respons stres berbeda-beda tergantung dengan stresornya. Stresor dapat dibedakan menjadi stresor psikogenik dan stresor neurogenik. *Restraint* stres mempunyai kedua jenis stresor tersebut. Dua kombinasi stresor tersebut dapat mengakibatkan perubahan yang luas terhadap fungsi kinerja otak (Bowman et al. 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Rao et al. (2005) menunjukkan bahwa terdapat peningkatan secara signifikan panjang dendrit dan titik percabangan di sepanjang neuron *amygdala* pada tikus neonatus dengan pemberian jus pegagan pada dosis 4 dan 6 ml/kg BB/hari selama 4 dan 6 minggu. Soumyanath et al. (2005)

menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan sebanyak 300-330 mg/kg BB/hari dapat meningkatkan perbaikan akson. Di samping itu, penelitian tentang *restraint* stres juga dilakukan oleh Bowman et al. (2002) yang menerapkan *restraint* stres secara kronik (6 jam/hari selama 7-28 hari) pada tikus jantan dan betina, terbukti bahwa pada penelitian tersebut stres mempengaruhi tingkat kecepatan *transmitter central* pada korteks frontal, *hippocampus*, dan *amygdala* yang berkaitan dengan jenis kelamin. Disebutkan juga bahwa *restraint* stres kronik (2 jam/hari selama 21 hari) dapat melemahkan memori nonspasial (Walesiuk et al. 2005).

Perbedaan penelitian ini dengan penelitian sebelumnya adalah penerapan *restraint* stres pada tikus untuk mengetahui efek ekstrak etanol pegagan terhadap kinerja tikus pada *maze* radial delapan lengan. Parameter yang digunakan juga berbeda karena pada penelitian ini digunakan parameter kesalahan tipe B untuk mengukur kinerja tikus pada *maze* radial delapan lengan. Ditinjau dari hubungan yang erat antara beberapa aspek tersebut maka dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak etanol pegagan terhadap perbaikan kinerja tikus setelah diberi *restraint* stres.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*) terhadap perbaikan kinerja pada tikus putih pasca *restraint* stress.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang tikus, timbangan duduk, timbangan Sartorius, spuit pencekok/oral 3 ml, pipa *restraint* stress, *stopwatch*, *maze* radial delapan lengan, dan tempat pelet tikus.

Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak etanol pegagan (*C. asiatica*), pelet, pakan tikus, etanol, dan akuades.

### Bahan tanaman

Ekstrak etanol pegagan yang digunakan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (BPTOOT) Tawangmangu, Karanganyar.

### Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur *Wistar* sebanyak 24 ekor berumur 8 minggu, dengan berat 150-200 gram yang diperoleh dari Universitas Setia Budi Surakarta. Sampel dibagi ke dalam empat kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih. Jumlah ulangan tersebut diperhitungkan menurut Rumus Federer.

$$(k-1)(n-1) \geq 15$$

Dimana: k = jumlah kelompok dan n = besar sampel per kelompok.

### Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium (Taufiqurrohman 2003).

### Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *Pre-test and Post-test Controlled Groups Design*. Kelompok kontrol digunakan sebagai pembanding.

### Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara *random sampling* (Budiarto 2002).

### Cara kerja

#### *Pra-perlakuan*

Tikus dilatih untuk beradaptasi dengan *maze* radial delapan lengan selama 3 hari. Tikus dilatih setiap hari untuk belajar tentang lokasi makanan di semua lengan pada *Maze Radial Delapan Lengan*. Tikus dipuasakan selama 12 jam terlebih dahulu sebelum dilatih dalam *maze* radial delapan lengan.

Pada hari pertama, makanan tikus masing-masing sebanyak 4 gram diletakkan di pintu masuk, bagian tengah, dan ujung setiap lengan pada *maze* radial delapan lengan. Pada hari kedua, makanan diletakkan di bagian tengah dan ujung pada setiap lengan, dan pada hari ketiga makanan tikus diletakkan di ujung setiap lengan. Tikus diletakkan pada tabung penutup di tengah-tengah *maze* radial delapan lengan dengan arah yang berlawanan dengan arah peneliti. Tabung penutup baru dibuka 30 detik kemudian agar tikus dapat beradaptasi terlebih dahulu.

Setelah proses adaptasi, dilakukan pengukuran kinerja tikus selama 12 hari berturut-turut dengan waktu pengujian 10 menit tiap tikus dan diberi makanan tikus dalam jumlah yang sama.

#### *Pemberian perlakuan*

Perlakuan diberikan selama 21 hari dengan pembagian kelompok sebagai berikut: (i) Kelompok I (kelompok kontrol): Diberi akuades dengan dosis 0,3 mg/g BB tikus/hari. (ii) Kelompok II (kelompok stres): Diberi *restraint* stres selama 2 jam/hari. (iii) Kelompok III (kelompok pegagan): Diberi ekstrak etanol pegagan dengan dosis 0,3 mg/g BB tikus/hari. (iv) Kelompok IV (kelompok pegagan dan stres): Diberi ekstrak etanol pegagan dengan dosis 0,3 mg/g BB tikus/hari, setelah itu diberi *restraint* stres selama 2 jam/hari.

Pada tiga hari terakhir perlakuan, tikus dilatih untuk melakukan penyesuaian terhadap *maze* radial delapan lengan seperti pada latihan pra-perlakuan.

#### *Setelah perlakuan*

Setelah latihan penyesuaian terhadap *maze* radial delapan lengan, dilakukan pengukuran terhadap kinerja tikus selama 12 hari berturut-turut dengan waktu pengujian 10 menit tiap tikus, atau setelah tikus memakan semua pelet.

### Penentuan dosis

Dosis ekstrak etanol pegagan yang diberikan sebesar 0,3 mg/g BB/hari (Soumyanath et al. 2005), sedangkan dosis *restraint* stres yang diberikan yaitu 2 jam/hari selama 21 hari.

### Pengujian kinerja

Skala kinerja (skala rasio) ditentukan berdasarkan parameter jumlah lengan yang dimasuki dan pilihan yang salah dari delapan lengan pada *maze* radial delapan lengan (kesalahan tipe B) selama 10 menit. Kesalahan diperhitungkan apabila tikus memasuki lengan *maze* radial delapan lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan makanan (imbalan) yang disediakan (Sari 2000). Rumus penilaian yang digunakan adalah sebagai berikut:

Kesalahan tipe B:

$$\frac{\text{Memasuki lengan pada Maze Radial Delapan Lengan lebih dari separuh tetapi tidak memakan imbalan}}{\text{Jumlah lengan yang dimasuki}} \times 100\%$$

### Teknik analisis data statistik

Data (skala rasio) yang terkumpul selanjutnya dianalisis secara statistik dengan Uji *Anova* dan Uji-t apabila memenuhi syarat yaitu sebaran data normal dan menghasilkan varian data yang tidak sama. Uji *Anova* digunakan untuk membandingkan perbedaan *mean* lebih dari dua kelompok (Murti 1994). Apabila tidak memenuhi syarat maka data yang terkumpul (rasio) dianalisis dengan menggunakan Uji Kruskal-Wallis (nonparametrik) untuk menggantikan Uji *One-Way Anova* (parametrik), dilanjutkan dengan Uji Mann-Whitney (nonparametrik) untuk menggantikan analisis *post-hoc test* pada *One-Way Anova*, untuk mengetahui perbedaan kinerja *maze* radial delapan lengan antar kelompok.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian

Pada penelitian efek pemberian ekstrak etanol pegagan terhadap kinerja *maze* radial delapan lengan pada tikus (*Rattus norvegicus*) pasca *restraint* stres ini dilakukan pada 4 kelompok, yaitu (i) kelompok kontrol, (ii) kelompok yang diberi *restraint* stres selama 2 jam/hari (kelompok stres), (iii) kelompok yang diberi ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) sebanyak 0,3 mg/g BB/hari (kelompok pegagan), dan (iv) kelompok yang diberi ekstrak etanol pegagan dengan dosis yang sama yaitu 0,3 mg/g BB/hari kemudian dilanjutkan dengan *restraint* stres selama 2 jam/hari (kelompok pegagan dan stres). Semua perlakuan tersebut dilakukan selama 21 hari.

Pada penelitian ini, pengamatan dilakukan selama 24 hari, terdiri dari sebelum perlakuan (*pre-test*) selama 12 hari dan sesudah perlakuan (*post-test*) selama 12 hari. Pengamatan dilakukan pada *maze* radial delapan lengan yang telah diberi makanan tikus sebanyak 4 gram pada tiap ujung lengan. Waktu pengujian berlangsung selama 10

menit atau setelah semua makanan pada tiap ujung lengan habis. Parameter penilaian kinerja dilakukan berdasarkan kesalahan tipe B yang diperhitungkan jika tikus memasuki lengan pada *maze* radial delapan lengan lebih dari separuh panjang lengan tetapi tidak memakan makanan yang disediakan.

Gambar 1 menunjukkan kurva pengamatan kinerja *maze* radial delapan lengan pada tikus. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa pada awal sebelum perlakuan banyak terjadi kesalahan tipe B, yaitu pada hari ke-1 sampai hari ke-5, dimana terdapat banyak kesalahan tipe B yang fluktuatif dengan nilai kesalahan tertinggi diperoleh pada hari ke-4 yaitu sebesar 25,67% pada kelompok yang nantinya akan diberi perlakuan ekstrak etanol pegagan. Kesalahan tipe B pada kelompok yang lain berada di bawah kelompok yang nantinya diberi ekstrak etanol pegagan. Sementara itu, pada hari berikutnya, yaitu hari ke-6 sampai hari ke-12, diperoleh hasil yang relatif sama dimana tidak muncul kesalahan tipe B.

Gambar 2 menunjukkan kurva pengamatan kinerja *maze* radial delapan lengan pada tikus. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa pada kelompok stres, tikus cenderung banyak melakukan kesalahan yang terjadi secara fluktuatif. Hal ini dapat dilihat adanya kurva pada kelompok stres yang letaknya cenderung berada di atas dibandingkan dengan kelompok lain. Kesalahan tipe B pada kelompok stres paling tinggi terjadi pada hari pertama, yaitu sebesar 9,83%.

Sementara itu, kurva pada kelompok pegagan serta kelompok pegagan dan stres cenderung berada di bawah kurva kelompok kontrol dan kelompok stres, yang menunjukkan bahwa kesalahan tipe B yang dilakukan oleh kelompok pegagan serta kelompok pegagan dan stres hanya sedikit. Berdasarkan hasil pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa pada saat *post-test*, kelompok pegagan hanya melakukan kesalahan tipe B sebanyak 1 kali, yaitu pada hari ke-1 sebesar 4,17%, disamping itu kelompok pegagan dan stres juga hanya melakukan kesalahan tipe B sebanyak 1 kali, yaitu pada hari ke-2 sebesar 3,33%.

Tabel 1. Tabel pengamatan kinerja *maze radial* delapan lengan pada tikus (%).

Hari	Kontrol		Stres		Pegagan		Pegagan/Stres	
	Pre Tes	Post Tes	Pre Tes	Post Tes	Pre Tes	Post Tes	Pre Tes	Post Tes
1	6,00±7,46	1,83±4,49	15,83±8,61	9,83±5,78	3,83±6,34	4,17±6,54	0,00±	0,00±0
2	9,00±7,90	5,33±8,84	14,00±13,05	1,33±2,27	18,17±9,89	0,00±0	9,50±10,82	3,33±5,20
3	5,00±10	0,00±0	7,50±6,83	4,00±6,23	4,33±7,23	0,00±0	6,83±13,21	0,00±0
4	14,33±17,90	1,67±4,08	6,67±12,45	0,00±0	25,67±24,47	0,00±0	5,00±8,62	0,00±0
5	3,33±5,20	0,00±0	0,00±0	3,00±4,65	1,17±2,86	0,00±0	0,33±0,81	0,00±0
6	0,00±0	0,00±0	0,00±0	1,83±4,49	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
7	0,00±0	0,00±0	0,00±0	1,67±4,08	0,00±0	0,00±0	1,83±4,49	0,00±0
8	0,00±0	5,83±9,04	0,00±0	5,33±6,12	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
9	0,00±0	0,00±0	0,00±0	2,83±4,49	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
10	0,00±0	0,00±0	0,00±0	2,17±5,31	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
11	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
12	0,00±0	0,00±0	0,00±0	1,33±5,37	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0
rata-rata	3,14±4,67	1,22±2,15	3,67±5,92	2,78±2,70	4,43±8,46	0,35±1,20	1,96±3,29	0,28±0,96

### Hasil uji kinerja dalam *Maze* radial delapan lengan antar kelompok setelah perlakuan (*post-test*)

Dalam penelitian ini diharapkan ekstrak etanol pegagan dapat meningkatkan kinerja tikus di dalam *maze* radial

delapan lengan yang diukur berdasarkan parameter kesalahan tipe B. Untuk mengetahui peningkatan atau penurunan memori spasial tikus serta faktor-faktor yang mempengaruhinya, perlu dikaji perbandingan kinerja masing-masing tikus setiap hari dan perbandingan kinerja yang dicapai antara kelompok kontrol dan kelompok yang diberi perlakuan (kelompok stres, kelompok pegagan, serta kelompok pegagan dan stres). Uji kinerja sebelum perlakuan (*pre-test*) dilakukan untuk mengetahui memori dasar tikus, sedangkan uji kinerja setelah perlakuan (*post-test*) digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kinerja tikus dalam *maze* radial delapan lengan.

Berdasarkan hasil yang diperoleh, perbandingan antara kelompok kontrol dan kelompok stres secara statistik tidak signifikan, hal ini diduga disebabkan karena pengaruh hormon glukokortikoid serta pengaruh hormon-hormon lain yang berkaitan dengan stres, sehingga diperoleh kurva dosis berbentuk U terbalik (*inverted U shape dose response curve*). Pada stres tingkat awal, banyak hormon yang dihasilkan sebagai respons dari stres dan mengakibatkan terjadinya penurunan kinerja, namun pada stres yang lama, hormon yang menyebabkan stres mengalami proses retensi, sehingga organ-organ yang menjadi target hormon tidak peka lagi terhadap pengaruh hormon tersebut, dalam hal ini target hormon yang diteliti difokuskan pada *hippocampus* (Gamaro dan Michalowski 1999). Disamping itu, stres sangat tergantung dengan proses adaptasi individu. Paparan stres yang lama memungkinkan individu menjadi terbiasa dengan stres tersebut, sehingga tidak terlalu mempengaruhi kinerja individu tersebut.

Berdasarkan hasil Uji Mann-Whitney pada kelompok kontrol dan kelompok pegagan, maupun kelompok kontrol serta kelompok pegagan dan stres, keduanya tidak signifikan. Hal ini dapat saja terjadi, karena berdasarkan hasil penelitian Pramono dan Ajiastuti (2004), kandungan asiaticosida ekstrak herba pegagan dari Tawangmangu paling rendah dibandingkan dengan pegagan yang tumbuh di Kaliurang dan Boyolali. Hal ini juga dapat disebabkan akibat stres yang tidak terduga (*unpredictable stress*), misalnya pada saat disonde, tikus dapat mengalami stres yang tidak terduga. Dalam hal ini, tikus diduga juga mengalami stres akibat efek pemberian ekstrak etanol pegagan yang kurang maksimal. Alvarez et al. (2002) menyebutkan bahwa stres yang tidak terduga secara kronik dapat mengganggu *long-term potentiation* pada *hippocampus area CA1* dan *gyrus dentatus* secara *in vitro*.

Perbandingan antara kelompok stres dan kelompok pegagan, maupun kelompok stres dengan kelompok pegagan dan stres menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Hal ini sesuai dengan sumber-sumber ilmiah yang menyebutkan kemampuan neurogenesis dan sinaptogenesis pegagan. Rao et al. (2005) menyatakan bahwa terjadi peningkatan yang signifikan pada panjang dendrit dan titik percabangan di sepanjang neuron *amygdala* pada tikus neonatus dengan pemberian jus pegagan pada dosis 4 dan 6 ml/kg BB/hari selama 4 dan 6 minggu. Soumyanath et al. (2005) menyatakan bahwa pemberian ekstrak etanol pegagan sebanyak 300-330 mg/kg BB/hari dapat meningkatkan perbaikan akson.

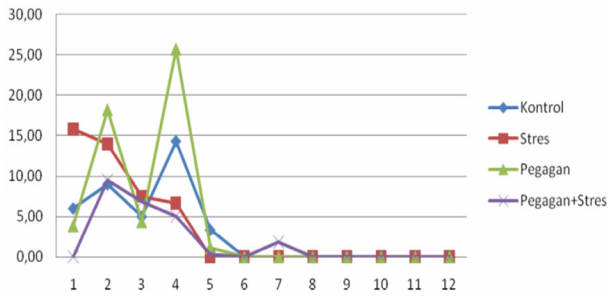
Berdasarkan hasil uji statistik, perbandingan antara kelompok pegagan dengan kelompok pegagan dan stres tidak signifikan. Hal ini menunjukkan peningkatan memori oleh ekstrak etanol pegagan disebabkan pegagan lebih bersifat neuroprotektif terhadap kematian sel. Pada dosis 1  $\mu\text{M}$ , *asiatic acid* dan *asiaticoside* mampu mengurangi jumlah apoptosis yang diinduksi oleh *strusporine*, serta menurunkan kadar radikal bebas intraseluler (Mook-Jung 1999).

#### Hasil uji kinerja sebelum perlakuan (*pre-test*) dan setelah perlakuan (*post-test*)

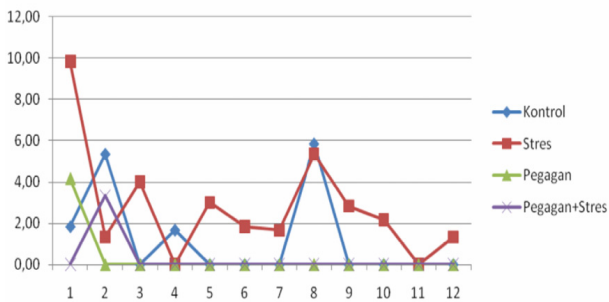
Secara keseluruhan, kesalahan tipe B yang terjadi pada tikus mengalami fluktuasi setiap harinya, baik pada saat sebelum perlakuan (*pre-test*) maupun sesudah perlakuan (*post-test*). Gambar 1 memperlihatkan kesalahan tipe B yang fluktuatif pada *pre-test* hari ke-1 sampai hari ke-5. Hal yang sama juga dapat dilihat saat *post-test* hari ke-1 sampai hari ke-4 (Gambar 2). Meskipun demikian, grafik tersebut cenderung menunjukkan terjadinya penurunan kesalahan tipe B (Gambar 2 dan Gambar 3). Kesalahan tipe B pada *post-test* juga relatif mengalami penurunan apabila dibandingkan dengan *pre-test*. Hal ini dikarenakan memori spasial adalah *working memory*, yaitu merupakan perpaduan antara perhatian (*attention*), konsentrasi, dan memori jangka pendek (Budson dan Price 2005). Memori jangka pendek hanya bertahan beberapa jam saja dan *working memory* diingat kembali (*retrieve*) hanya pada saat melakukan tugas tertentu. Oleh karena jeda waktu antara uji *maze* radial delapan lengan dengan uji *maze* radial delapan lengan berikutnya mencapai 24 jam, diduga memori jangka pendek tikus telah hilang, sehingga tikus harus mencoba memasuki *maze* radial delapan lengan tersebut dan menyimpan memori jangka pendek yang baru lagi selama beberapa jam ke depan.

Pada diagram *pre-test* dan *post-test* pada kelompok kontrol (Gambar 3) dapat diketahui bahwa pada *pre-test* hari ke-1 sampai ke-5, banyak terjadi kesalahan tipe B dengan kesalahan tertinggi pada hari ke-4 yaitu sebesar 14%. Pada hari ke-5 sampai ke-12, tidak terjadi kesalahan tipe B karena diduga tikus sudah mempunyai ingatan mengenai *maze* radial delapan lengan pada tes kinerja hari sebelumnya. Penurunan kesalahan tipe B pada hari-hari terakhir saat *pre-test* maupun *post-test* ini terjadi pada hampir semua kelompok, kecuali pada kelompok stres.

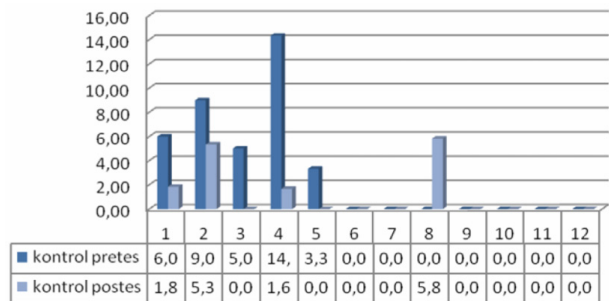
Saat *pre-test* pada hari ke-1 sampai ke-4 pada kelompok stres (Gambar 4) terjadi banyak kesalahan tipe B dimana pada hari selanjutnya tidak terjadi. Hal ini diduga terjadi karena tikus sudah mempunyai ingatan mengenai *maze* radial delapan lengan pada tes kinerja hari sebelumnya. Adapun pada saat *post-test*, kesalahan tipe B pada kelompok stres tetap terjadi. Dibandingkan dengan kelompok lainnya, kelompok stres relatif lebih banyak melakukan kesalahan tipe B saat *post-test*. Hal ini diduga disebabkan karena adanya pengaruh *restraint* stres yang diberikan. Peningkatan stres yang diukur berdasarkan kinerja tikus dalam *maze* radial delapan lengan kurang signifikan, hal ini diduga disebabkan karena stres yang terlalu lama maupun proses adaptasi dari tikus tersebut, atau gabungan keduanya.



**Gambar 1.** Grafik kumulatif *pre-test* kinerja *maze* radial delapan lengan pada tikus (%)



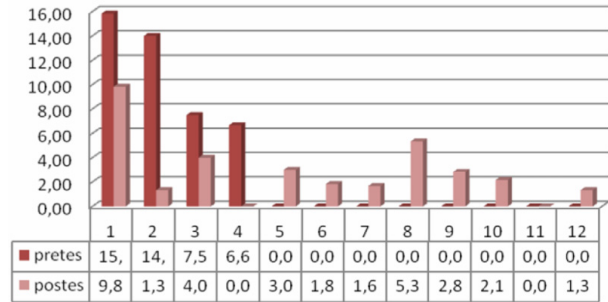
**Gambar 2.** Grafik kumulatif *post-test* kinerja *maze* radial delapan lengan pada tikus (%)



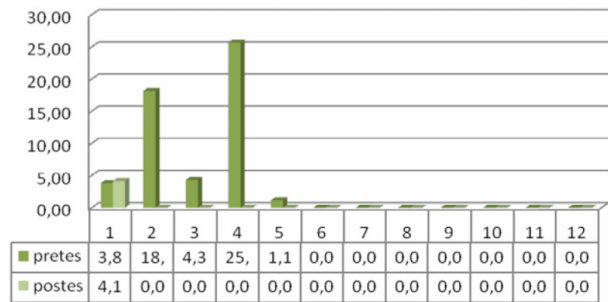
**Gambar 3.** Perbandingan *pre-test* dan *post-test* dalam *maze* radial delapan lengan pada kelompok kontrol

Hasil pengamatan pada kelompok pegagan (Gambar 5), menunjukkan bahwa pada *pre-test* terjadi kesalahan pada hari ke-1 sampai ke-5 dengan tingkat kesalahan tipe B yang berfluktuatif. Pada hari selanjutnya, kesalahan tersebut tidak terjadi lagi. Pada *post-test*, kesalahan tipe B hanya terjadi satu kali pada hari ke-1, yaitu sebesar 4,1%. Kesalahan yang dilakukan oleh kelompok pegagan paling sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok yang lain. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan memberikan efek pada peningkatan kinerja tikus dalam *maze* radial delapan lengan.

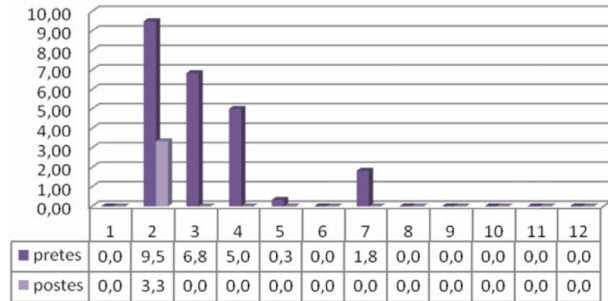
Saat *pre-test* pada kelompok pegagan dan stres (Gambar 6) terjadi kesalahan tipe B pada hari ke-2 sampai ke-4 dan hari ke-7, sedangkan pada saat *post-test*, hanya terjadi satu kesalahan tipe B pada hari ke-2, yaitu sebesar 3,3%.



**Gambar 4.** Perbandingan *pre-test* dan *post-test* dalam *maze* radial delapan lengan pada kelompok stress



**Gambar 5.** Perbandingan *pre-test* dan *post-test* dalam *maze* radial delapan lengan pada kelompok pegagan



**Gambar 6.** Perbandingan *pre-test* dan *post-test* dalam *maze* radial delapan lengan pada kelompok pegagan dan stress

Kesalahan yang dilakukan oleh kelompok pegagan dan stres lebih sedikit apabila dibandingkan dengan kelompok yang lain, tetapi masih di bawah kelompok pegagan yang mempunyai kesalahan tipe B paling sedikit. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak etanol pegagan memberikan efek pada peningkatan kinerja tikus dalam *maze* radial delapan lengan.

### KESIMPULAN

Pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) dapat memperbaiki kinerja tikus dalam *maze* radial delapan lengan pasca *restraint* stres. Diperlukan

penelitian mengenai fitofarmaka lain, seperti *Gingko biloba* dan ginseng Jawa, sehingga dapat diketahui efeknya dan diperoleh perbandingan potensi keefektifan antara satu fitofarmaka dengan fitofarmaka yang lain. Hendaknya digunakan parameter penelitian yang bervariasi, contohnya dengan memakai parameter berdasarkan ketepatan pemilihan lengan maupun berdasarkan lamanya waktu tikus ketika memakan semua makanan di ujung lengan *maze* radial delapan lengan. Penggunaan alat ukur kinerja yang membutuhkan waktu penelitian lebih singkat dibandingkan dengan *maze* radial delapan lengan, misalnya *Morris Water Maze*, yang hanya membutuhkan waktu 5 hari. Disarankan untuk menggunakan *purposive sampling* dibanding *random sampling* sehingga dimungkinkan diperoleh sampel yang homogen.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alfarez DN, Joël M, Krugers HJ. 2003. Chronic unpredictable stress impairs long-term potentiation in rat hippocampal CA1 area and dentate gyrus in vitro. *Eur J Neurosci* 17(9): 1928-1934.
- Bowman RE, Beck KD, Luine VN. 2002. Chronic stress effects on memory: Sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav* 43: 48-59.
- Budiarto E. 2002. Biostatistika. EGC, Jakarta.
- Budson AE, Price BH. 2005. Memory dysfunction. *N Engl J Med* 352(7): 692-699.
- Gamaro GD, Michalowski MB. 1999. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Braz J Med Biol Res* 32: 341-347.
- Kuhlmann S, Piel M, Wolf OT. 2005. Impaired memory retrieval after psychosocial stress in healthy young men. *J Neurosci* 25(11): 2977-2982.
- Kumar V, Gupta MH. 2003. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in intracerebroventrikuler streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 74(3): 579-585.
- Lupien SJ, Gaudreau S, Tchiteya BM et al. 1997. Stress-induced declarative memory impairment in healthy elderly subjects: Relationship to cortisol reactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 82(7): 2070-2075.
- Mook-Jung I, Shin JE, Yun SH et al. 1999. Protective effects of asiaticoside derivatives against beta-amyloid neurotoxicity. *J Neurosci Res* 59(3): 417-425.
- Murti B. 1994. Penerapan metode statistik nonparametrik dalam ilmu kesehatan. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Pramono S, Ajiastuti D. 2004. Standardisasi ekstrak herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) berdasarkan kadar asiaticosida secara KLT-densitometri. *Majalah Farmasi Indonesia* 15(3): 119-123.
- Rahmasari M. 2006. Pengaruh ekstrak air daun pegagan (*Centella asiatica* L.) terhadap kemampuan belajar dan mengingat, kadar hemoglobin, dan nilai hematokrit pada tikus jantan galur Wistar (*Rattus norvegicus* L.) dewasa. Sekolah Ilmu Teknologi Hayati (SITH)-ITB, Bandung.
- Rao KGM, Rao SM, Rao SG. 2005. *Centella asiatica* (Linn.) induced behavioral changes during growth spurt period in neonatal rats. *Neuroanatomy* 4: 18-23.
- Rao KGM, Rao SM, Rao SG. 2007. Enhancement of amygdaloid neuronal dendritic arborization by fresh leaf juice of *Centella asiatica* (Linn.) during growth spurt period in rats. *eCAM* 6(2): 203-210.
- Sari DCR. 2000. Pengaruh pemberian estrogen terhadap aktivitas neuron-neuron serotonergik di *nucleus raphe cranialis* pada tikus (*Rattus norvegicus*). *Yarsi* 9(2): 62-72.
- Soumyanath A, Zhong YP, Gold SA et al. 2005. *Centella asiatica* accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 57(9): 1221-1229.
- Sudarsono P, Gunawa D, Wahyono. 2002. Tumbuhan obat: Hasil penelitian, sifat-sifat dan penggunaan. Pusat Penelitian Obat Tradisional, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Taufiqurrohman MA. 2003. Metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. CSGF, Klaten.
- Walesiuk A, Trofilmiuk E, Braszko JJ. 2005. *Gingko biloba* extract diminishes stress-induced memory deficit in rats. *Pharmacol Rev* 57: 176-187.
- Wijayakusuma H. 2000. Ensiklopedi milenium tumbuhan berkhasiat obat Indonesia. Penerbit Prestasi Insan Indonesia, Jakarta.

## Pengaruh pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap ekspresi p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D

### The effect of ethanolic and petroleum ether fractions of bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) bulb extract on expression of p53 mutant in breast cancer cell line T47D

IVAN HENDRA SUDARMAWAN, DJOKO DLIDIR, AMBAR MUDIGDO, DYAH RATNA BUDIANI

Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Desember 2009. Revisi disetujui: 25 Februari 2010.

**Abstract.** Sudarmawan IH, Dlidir D, Mudigdo A, Budiani DR. 2010. The effect of ethanolic and petroleum ether fractions of bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) bulb extract on expression of p53 mutant in breast cancer cell line T47D. *Biofarmasi* 8: 17-26. Breast cancer was still to be the most popular disease. The second highest morbidity and mortality stages after cervix cancer which need to be involved in alternative therapy. Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr ) had been used as anti-cancer in empiric therapy by urban society. Therefore, it was needed to determine the influence of etanolic and petroleum eter fractions of bawang dayak extract on the p53 mutant expression in T47D breast cancer cell in vitro. Epithelial cell in ductal mammae breast cancer T47D which had a malignancy and p53 mutant, with ER/PR positive status. As a comparison, it was used MCF7 cell specimen (negative control). They were cultured on 60 wells for T47D and MCF7 in RPMI 1640 media. Each well was filled with  $2 \times 10^5$  cells/200  $\mu$ l media. Thirty wells with a size of 1.5 cm/T47D cell diameter, cultured in etanolic and petroleum eter fractions with under concentration of LC50. The number of sample was determined by using "Rule of Thumb". The result of LC50 on T47D breast cancer cell were etanolic fraction 125  $\mu$ g/mL, while petroleum eter fraction 31.25  $\mu$ g/mL. The result of expression percentage of p53 mutant given by the extract of etanolic fraction of bawang dayak were: 0  $\mu$ g/mL = 36.11%, 15.625  $\mu$ g/mL = 28.32%, 31.25  $\mu$ g/mL = 27.46%, 62.5  $\mu$ g/mL = 19.67%, and 125  $\mu$ g/mL = 11.02%. Other result of bawang dayak extract percentage given in petroleum eter fraction were: 0  $\mu$ g/mL = 26.16%, 3.90625  $\mu$ g/mL = 25.29%, 7.8125  $\mu$ g/mL = 22.70%, 15.625  $\mu$ g/mL = 22.27%, and 31.25  $\mu$ g/mL = 15.78%. The treatment of bawang dayak extract in etanolic and petroleum eter fractions were able to inhibit the expression of p53 mutant in vitro. The result of this research showed no significant difference in the inhibition expression of p53 mutant in breast cancer cell T47D.

**Keywords:** Bawang dayak, breast cancer cell T47D, ethanolic fraction, petroleum eter fraction, p53 mutant

#### PENDAHULUAN

Kanker payudara sampai saat ini masih merupakan penyakit yang memiliki tingkat morbiditas dan mortalitas penderita tertinggi kedua setelah kanker leher rahim. Kanker payudara di Indonesia menunjukkan kecenderungan adanya peningkatan angka kejadian dari tahun ke tahun dengan nilai insidensi relatif sebesar 11,5%. Angka kejadian di Amerika Serikat 27 per 100.000 atau 18% dari kematian yang terjadi pada wanita (Tjindarbumi 2004). Terapi kanker payudara secara medis yang meliputi pembedahan, penyinaran, dan penggunaan obat sitostatik, belum menghasilkan penyembuhan yang sepenuhnya memuaskan bagi penderita, karena pada umumnya penderita datang ke dokter pada stadium kanker yang sudah lanjut. Oleh karena itu perlu dikembangkan terapi alternatif yang dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah untuk meringankan penderitaan dan meningkatkan kesembuhan (Ashariati 2005).

Selain prosedur baku secara medis, banyak cara yang dapat dilakukan penderita untuk mendapatkan kesembuhan dari penyakit kanker, salah satunya dengan menggunakan

tanaman obat (Ashariati 2005). Banyak jenis tanaman obat yang sudah lama dikenal sebagai obat antikanker, beberapa diantaranya sudah diisolasi bahan aktifnya dan dijadikan sebagai kemoterapi, seperti Taxan dan Placitaxel. Jenis obat-obatan kemoterapi berkembang dari empiris menuju klinis, ditunjukkan dengan adanya bukti bahwa banyak bahan sitostatika telah mendapatkan tempat yang tetap di klinik.

Kemoterapi yang telah tersedia saat ini belum sepenuhnya dapat mengatasi kanker dan secara klinis banyak menimbulkan efek samping, antara lain selektivitas yang rendah. Timbulnya berbagai efek samping dalam pemberian kemoterapi sebagai antikanker telah mendorong perlunya usaha untuk menemukan obat antikanker yang baru (Katzung 2001).

Tanaman obat Indonesia telah secara sporadis diteliti di berbagai universitas dan lembaga penelitian di Indonesia. Tujuan beberapa penelitian ini umumnya untuk membuktikan apakah penggunaan suatu jenis tanaman obat terhadap penyakit kanker dapat dibuktikan secara ilmiah (Aulia 2003). Penelitian-penelitian yang pernah ada sebelumnya lebih bersifat pembuktian atas rasionalitas atau

irrasionalitas penggunaan jenis tanaman tersebut sebagai obat dan bukan suatu pencarian obat baru. Berbagai jenis tanaman obat memang sudah biasa digunakan sebagai obat dan dirasakan efektivitasnya secara empiris, sehingga penelitian yang dilakukan adalah upaya untuk membuktikannya. Hasil-hasil penelitian mengenai jenis-jenis tanaman yang berpotensi untuk mengobati penyakit kanker dapat dikelompokkan menjadi: (i) tanaman obat yang bersifat sitotoksik dan sitostatik, (ii) tanaman obat yang bersifat imunostimulan, dan (iii) tanaman obat yang bersifat antioksidan (Ashariati 2005).

Di Indonesia, pengobatan tradisional dengan menggunakan tumbuh-tumbuhan, termasuk penggunaan beberapa jenis tanaman yang berpotensi untuk menyembuhkan berbagai jenis kanker, sudah menjadi kebiasaan selama puluhan tahun. Meskipun demikian, bukti ilmiah tentang efektivitas penyembuhannya belum terungkap seluruhnya. Aktivitas antikanker suatu jenis tanaman obat atau senyawa dapat dievaluasi dari efek sitotoksitasnya secara *in vitro* pada berbagai macam sel kanker (Katzung 2001).

Pemahaman tentang perilaku sel kanker payudara serta faktor risikonya telah banyak mengubah konsep dasar pengobatan. Dengan berkembangnya teknologi kedokteran, menyebabkan modalitas terapi menjadi lebih beragam dan sangat mempengaruhi penderita, sehingga pemilihan jenis terapi dan seleksi penderita menjadi sangat penting (Albar et al. 2004). Kemajuan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran (Iptekdok), khususnya biomolekuler yang sangat pesat, tentunya mempengaruhi tata cara penanganan kanker payudara itu sendiri dari deteksi dini, diagnostik, dan terapi serta penanganan tindak lanjut. Informasi mengenai berbagai ekspresi protein spesifik dalam sel neoplasma dapat dipakai sebagai salah satu indikator untuk menentukan keganasan, pemilihan metode terapi, serta prognosisnya (Tjindarbumi 2004).

Dari beberapa hasil penelitian sebelumnya telah didapatkan sel kanker payudara yang memiliki mutasi pada protein p53. Mutasi pada gen p53 banyak dijumpai menyertai *genetic aberrations* selama karsinogenesis pada sebagian besar jenis kanker, termasuk kanker payudara dan *cancer-derived cell lines* (Smardova et al. 2005).

Galur sel kanker payudara T47D adalah galur sel kanker yang diisolasi dari penderita kanker payudara, serta merupakan *human ductal breast epithelial cancer cell line* (Flaman et al. 1995). Galur sel ini mengalami mutasi pada gen p53 pada posisi asam amino ke-194, dengan asam amino fenilalanin (Nigro et al. 1989). Disamping itu, T47D juga memiliki status *Estrogen Receptor* (ER) positif. Pada kondisi kultur normal, sel tersebut juga mengekspresikan *Progesterone Receptor* (PR).

Bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) merupakan salah satu jenis tanaman obat yang selama ini dipercaya oleh masyarakat Kalimantan sebagai obat tradisional yang memiliki potensi sebagai herba antikanker. Namun, penelitian ilmiah yang mendukung potensi antikanker jenis tanaman tersebut belum banyak diteliti, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.

Aulia (2003) melakukan penelitian tentang kandungan bawang dayak dengan fraksi etanolik dan petroleum eter,

dari penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak bawang dayak mempunyai efek sebagai antibakteri serta mengandung kumarin, terpenoid, flavonoid, dan antraknon yang berpotensi sebagai antikanker. Oleh karena itu dianggap perlu untuk melihat efek kedua fraksi tersebut sebagai antikanker yang didemonstrasikan secara *in vitro* dengan kultur sel kanker payudara T47D dan MCF7 melalui ekspresi gen p53 mutan.

Berdasarkan hal tersebut diperlukan penelitian mengenai potensi ekstrak bawang dayak dengan berdasarkan larutan penyaring yang berbeda, yaitu petroleum eter dan etanol, terhadap tingkat pemulihan kualitas struktur gen p53 mutan yang dimiliki oleh sel kanker payudara T47D sebagai model percobaan. Kualitas struktur gen p53 mutan pada sel T47D dibandingkan dengan tingkat ekspresi gen p53 *wild type* pada sel MCF7 sebagai kontrol negatif.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi etanolik terhadap penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*, (ii) Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi petroleum eter terhadap penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*, (iii) Mengetahui perbedaan potensi penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan antara pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter pada biakan galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta pada bulan Februari 2008.

### Alat dan bahan

Alat yang digunakan meliputi *Laminary Air Flow Cabinet*, *Tissue Culture Flask* (TCF), *microplate* 96 sumuran, mikropipet, inkubator CO<sub>2</sub>, sentrifuse, mikroskop *inverted*, mikroskop cahaya, *Improved Neubauer hemocytometer*, dan *Soxhlet*. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi serbuk umbi bawang dayak, galur sel kanker payudara T47D, MCF7, petroleum eter, dan alkohol absolut (96%).

### Sampel penelitian

Sel kanker payudara T47D berasal dari *American Type Culture Collection*, sel ini merupakan sel epitel duktus mammae yang mengalami malignansi dan mutasi pada gen p53, dengan status ER dan PR positif. Sebagai pembanding (kontrol negatif) digunakan galur sel MCF7, sel ini merupakan sel epitel duktus mammae yang mengalami malignansi dan tidak mengalami mutasi pada gen p53. Sel ini kemudian dikulturkan pada media RPMI 1640 dengan FBS 10% dalam inkubator dengan suhu 37°C, antibiotik,

dan antifungal di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

### Jenis penelitian

Penelitian ini berupa penelitian prospektif dengan jenis penelitian eksperimental laboratorik. Teknik pengambilan sampel dilakukan berdasarkan *quota sampling*. Variabel terikatnya (*dependent*) adalah ekspresi gen p53 mutan, sedangkan variabel bebas (*independent*) adalah konsentrasi ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik atau fraksi petroleum eter.

### Besar sampel

Penelitian ini menggunakan 60 *well* kultur sel T47D dan 60 *well* kultur sel MCF7 pada medium RPMI 1640. Masing-masing *well* berisi  $2 \times 10^5$  sel/200  $\mu$ l media. Sebanyak 30 *well* dengan diameter 1,5 cm pada kultur sel T47D diperlakukan dengan fraksi etanolik umbi bawang dayak dengan konsentrasi 125  $\mu$ g/mL, 62,5  $\mu$ g/mL, 31,25  $\mu$ g/mL, 15,62  $\mu$ g/mL, dan 0  $\mu$ g/mL dengan masing-masing seri konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak 6 kali, serta 30 *well* diperlakukan dengan fraksi petroleum eter dengan konsentrasi 31,25  $\mu$ g/mL, 15,62  $\mu$ g/mL, 7,8  $\mu$ g/mL, 3,9  $\mu$ g/mL, dan 0  $\mu$ g/mL dengan masing-masing seri konsentrasi diulang sebanyak 6 kali, demikian juga pada kultur sel MCF7. Penentuan jumlah sampel tersebut dilakukan dengan menggunakan patokan *rule of thumb*, berdasarkan pendapat Murti (1997) yang menyatakan bahwa besar sampel dalam sejumlah kelompok studi berdasarkan tingkat perlakuan sebaiknya jangan sampai kurang dari 5 subjek.

### Cara kerja

Kultur sel T47D, MCF7, uji sitotoksitas dan persiapan kultur sel guna penentuan tingkat ekspresi p53 mutan:

Kultur galur sel kanker payudara T47D pada media RPMI 1640, yang diperkaya FBS (*Fetal Bovine Serum*), 10%, Antibiotik (Penstrep 1%) dan anti fungal (Amphotericin 1%).

Starvasi dilakukan setelah sel pada tahap (a) tumbuh, dilaksanakan dengan menumbuhkan sel ke dalam media RPMI 1640 dengan FBS 0,05 %, berikut antibiotik dan anti fungi. Tahapan ini bertujuan untuk menyamakan umur sel pada saat perlakuan.

Uji penghambatan pertumbuhan dan kematian sel dilaksanakan dengan perlakuan ekstrak batang bawang dayak fraksi etanol dan petroleum eter dengan variasi konsentrasi yang ditentukan kemudian.

Setelah LC50 ditentukan untuk masing-masing perlakuan sesuai dengan rumus *Abbott* yang dilanjutkan dengan analisis probit, maka sel T47D ditumbuhkan pada media RPMI lengkap yang pada 30 *well microplate* dengan kepadatan 5.000 sel/250  $\mu$ l media/*well* dengan perlakuan masing-masing ekstrak dengan konsentrasi di bawah nilai LC50 dengan diberi alas *tissue culture cover slips* steril, dengan diameter : 13 mm, selama 3 hari (72 jam)

Setelah 3 hari dikulturkan, *tissue culture cover slips* yang telah terlekat penuh oleh sel kanker payudara T47D dan MCF7 difiksasi menggunakan metanol dan siap untuk dilaksanakan immunositokimia dengan menggunakan monoklonal anti bodi anti human p53 mutan. Sistem deteksi yang digunakan adalah Avidin Biotin Kompleks.

Perhitungan tingkat ekspresi p53 mutan dilaksanakan dengan menentukan prosentase jumlah sel positif p53 mutan pada tiap lapang pandang, pada perbesaran 400 kali. Lapang pandang yang digunakan sebanyak 9 lapang pandang tiap slide.

Sel dengan ekspresi p53 mutan positif ditandai dengan warna kuning keemasan hingga coklat pada inti sel dan sitoplasma sel T47D.

### Analisis data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan SPSS 15. Jenis analisis yang digunakan adalah uji Kolmogorov-Smirnov untuk menguji distribusi data tergolong normal atau tidak. Analisis regresi korelasi linier dilakukan untuk menguji pengaruh pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter bawang dayak terhadap tingkat ekspresi gen p53 mutan. Uji selanjutnya adalah uji *t-test* untuk menguji perbedaan potensi penghambatan tingkat ekspresi gen p53 mutan antara fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter umbi bawang dayak.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian

Penelitian ini menggunakan galur sel kanker payudara T47D (Gambar 1-18). Uji sitotoksitas pemberian ekstrak umbi bawang dayak dilakukan dengan menggunakan fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter. Penekanan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada sel T47D dengan menggunakan fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ditentukan pada konsentrasi di bawah LC50. LC50 dari fraksi petroleum eter dan fraksi etanolik dijabarkan pada Tabel 1.

Pengujian ekspresi gen p53 mutan fraksi etanolik ekstrak umbi bawang dayak dilaksanakan pada seri konsentrasi LC50 dan di bawah LC50 sebagai berikut: 0  $\mu$ g/mL, 15,62  $\mu$ g/mL, 31,25  $\mu$ g/mL, 62,50  $\mu$ g/mL, dan 125  $\mu$ g/mL. Sementara itu, pengujian ekspresi gen p53 mutan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dilaksanakan pada seri konsentrasi di bawah LC50 sebagai berikut: 0  $\mu$ g/mL, 3,90  $\mu$ g/mL, 7,81  $\mu$ g/mL, 15,62  $\mu$ g/mL, dan 31,25  $\mu$ g/mL (Tabel 2).

**Tabel 1.** Tabulasi nilai LC50 fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak pada sel T47D

Jumlah Sel	Fraksi etanolik LC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	Fraksi petroleum eter ( $\mu$ g/mL)
T47D	125	31,25

**Tabel 2.** Tabulasi hasil pengamatan persentase p53 mutan pada sel T47D dengan pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak

Fraksi Etanolik			Fraksi Petroleum Eter		
Subjek	n	Rerata (%)	Subjek	n	Rerata (%)
TE 0 (Konsentrasi 0 µg/mL)	30	36,11	PE 0 (Konsentrasi 0 µg/mL)	30	26,16
TE 1 (Konsentrasi 15,625 µg/mL)	30	28,32	PE 1 (Konsentrasi 3,906 µg/mL)	30	25,29
TE 2 (Konsentrasi 31,25 µg/mL)	30	27,46	PE 2 (Konsentrasi 7,813 µg/mL)	30	22,70
TE 3 (Konsentrasi 62,5 µg/mL)	30	19,67	PE 3 (Konsentrasi 15,63 µg/mL)	30	22,27
TE 4 (Konsentrasi 125 µg/mL)	30	11,02	PE 4 (Konsentrasi 31,25 µg/mL)	30	15,78

Hasil analisis persentase gen p53 mutan pada sel T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dengan menggunakan uji *t-test* (SPSS 15) menunjukkan tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Sementara itu, hasil pengamatan persentase gen p53 mutan pada sel T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak dengan menggunakan uji *t-test* (SPSS 15) didapatkan  $\alpha = 0,475$ . Dengan demikian, tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro* (Gambar 19-20).

### Pembahasan

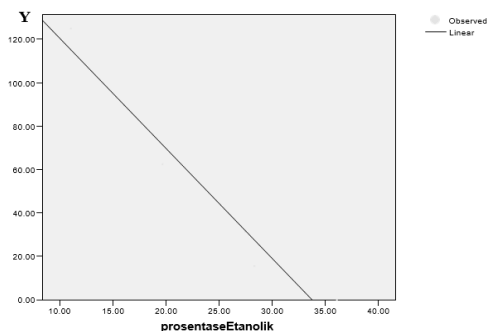
Hasil penelitian pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter yang dibuktikan

dengan uji korelasi regresi menunjukkan terdapat hubungan antara konsentrasi fraksi etanolik ekstrak umbi bawang dayak dengan ekspresi gen p53 mutan, dimana dengan peningkatan konsentrasi ekstrak umbi bawang dayak terjadi penekanan ekspresi gen p53 mutan secara *in vitro*. Hal ini sesuai dengan grafik korelasi regresi bahwa pada konsentrasi tertentu, ekspresi gen p53 mutan menunjukkan gambaran stasioner, yaitu pada konsentrasi 0 µg/mL, ekspresi gen p53 mutan sangat tinggi, sedangkan pada konsentrasi LC50 dan di atasnya terjadi penekanan terhadap ekspresi gen p53 mutan.

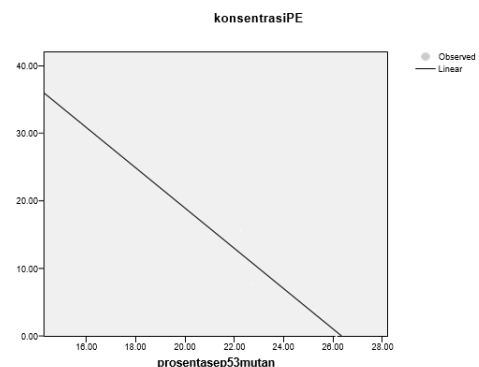
Berdasarkan hasil uji *Anova* satu jalur, fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Dengan tertekannya ekspresi gen p53 mutan tersebut memacu proses apoptosis dan penghambatan siklus sel (*cell cycle arrest*) yang memberikan kesempatan bagi sel untuk melakukan *DNA repair* sesuai dengan efek seluler *downstream* akibat dari aktivator *upstream* yang menyebabkan kerusakan DNA.

Hasil uji *t-test* menunjukkan tidak terdapat perbedaan potensi antara pemberian ekstrak umbi bawang dayak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter dalam menekan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*. Hal ini menunjukkan bahwa baik fraksi etanolik maupun petroleum eter mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan dengan konsentasi yang berbeda dan keduanya dapat digunakan sebagai terapi herba antikanker.

Penelitian ini membuktikan bahwa kematian sel kanker payudara T47D dan MCF7 disebabkan karena adanya induksi bahan aktif yang terkandung dalam kedua jenis fraksi umbi bawang dayak yang diujikan. Pemberian kedua fraksi ekstrak umbi bawang dayak mampu mengurangi aktivasi *oncogene*, memacu terjadinya apoptosis, dan berpotensi untuk mengaktivasi proses *DNA repair*. Hal ini ditunjukkan dengan semakin kecilnya persentase ekspresi gen p53 mutan pada sel T47D dengan pemberian konsentrasi baik fraksi etanolik maupun fraksi petroleum eter umbi bawang dayak.



**Gambar 19.** Uji pengaruh pemberian ekstrak bawang dayak fraksi petroleum eter pada penekanan tingkat ekspresi p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D secara *in vitro*.



**Gambar 20.** Uji perbedaan potensi penghambatan ekspresi p53 mutan dengan uji *t-test*.

Penelitian ini membuktikan bahwa bahan aktif yang terlarut dalam etanol dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak berpotensi sebagai antikanker, setidaknya dalam hal mendukung terhentinya siklus sel, apoptosis, dan reparasi DNA. *Apoptosis* yang terjadi dapat dipacu oleh penekanan ekspresi gen p53 mutan atau peningkatan gen supresor kanker yang lain atau dapat juga melalui jalur lain. Dalam penelitian ini digunakan fraksi etanolik dan petroleum eter dari ekstrak umbi bawang dayak karena sesuai dengan penelitian Aulia (2003) yang menggunakan kedua fraksi tersebut sebagai antibakteri dan telah dibuktikan bahwa kandungan dari ekstrak umbi bawang dayak menggunakan kedua fraksi tersebut mempunyai senyawa yang berpotensi sebagai anti kanker.

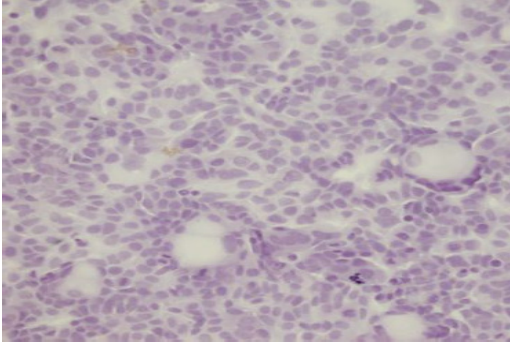
Adanya akumulasi dari protein p53 yang terjadi akibat adanya kerusakan DNA memegang peranan penting dalam *DNA repair*. Protein p53 akan merangsang keluarnya p21 yang dapat mengakibatkan terjadinya *cell cycle arrest*. *Cell cycle arrest* ini dapat memberikan waktu bagi sel untuk melakukan *DNA repair* akibat kerusakan, sehingga apabila *DNA repair* berhasil, sel dapat berproliferasi secara normal. Apabila kerusakan sel berlangsung hebat dan tidak dapat dilakukan *DNA repair* maka jalur apoptosis akan diaktifkan untuk mengeliminasi sel yang mengalami kerusakan. Apabila *DNA repair* secara normal tidak terjadi akibat terjadinya mutasi dari gen p53 maka sel dapat berproliferasi secara abnormal dan dapat terjadi keganasan. Protein p53 dapat merangsang apoptosis dengan merangsang ekspresi dari gen pro-apoptosis seperti *Bax*, *Fas/Apo-1*, *Death Reseptor 5 (DR5)*, atau *Insulin Like Growth Fator-Binding Protein 3 (IGF-BP3)*, atau dengan merangsang ekspresi gen anti-apoptosis seperti *Bcl-2*, *cellular inhibitor of apoptosis protein-2 (c-IAP2)* dan *Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein 1 (NAIP1)*. Jika Apoptosis tidak terjadi akibat mutasi dari gen p53 atau disregulasi dari interaksi *Fas-FasL* maka sel dapat berkembang ke arah keganasan. Aktivitas protein p53 sebagai supresor kanker dapat diturunkan atau dihambat oleh protein *Mdm2*, yaitu suatu ligase ubiquitin yang dapat memberi tanda untuk proteolisis yang mengakibatkan terjadinya degradasi dari protein p53 menjadi lebih cepat. Protein *Mdm2* juga memodifikasi aktivitas p53 akibat terikat pada domain transaktivasi p53 pada N-terminus dan transpor protein pada sitoplasma, jauh dari DNA nuklear, sehingga aktivitas protein p53 sebagai suatu faktor transkripsi tidak dapat dijangkau. Gen *Mdm2* itu sendiri juga diaktifkan oleh protein p53 sehingga dapat memberikan umpan balik negatif (*negative autoregulatory loop*) (Chen et al. 2000).

Tidak berfungsinya kontrol *checkpoint* yang mengakibatkan gagalnya respons penghentian siklus sel pada sel kanker juga dapat menjadi target potensial terapi antikanker (Abrahamson et al. 1995). Sel dengan kontrol *checkpoint* yang rusak lebih sensitif terhadap perubahan genotoksik atau kerusakan mikrotubular. Kontrol *checkpoint* berfungsi untuk memastikan bahwa kromosom tetap utuh dan tahap-tahap kritis siklus sel telah sempurna sebelum memasuki tahap selanjutnya (Alfred et al. 1997). Pengaturan *checkpoint* tersebut melibatkan aktivasi dan

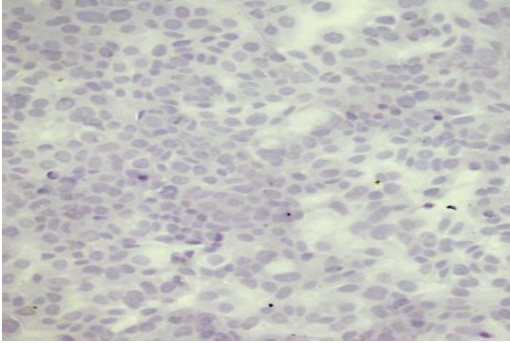
degradasi *cyclin*, aktivasi *cyclin dependent kinases (CDKs)*, *cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKIs)*. Interaksi antara ketiga kelas protein tersebut berperan mengontrol berbagai tahap siklus sel, mencegah sel ke tahap selanjutnya jika terjadi kerusakan DNA melalui mekanisme *checkpoint*, dan deregulasi proses tersebut berperan dalam pembentukan kanker (Dyson 1998).

Proses apoptosis dibedakan menjadi dua jalur, yaitu (1) jalur ekstrinsik atau *death receptor (DR)*, dan (2) jalur intrinsik atau jalur mitokondria. *DR pathway* dimulai dengan pengaktifan *tumour necrosis factor receptor (TNFR)*, yang meliputi Fas, DR 4, TNFR I, dan TNFR II. Fas menginduksi apoptosis melalui dua jalur. Jalur pertama berlangsung dengan mengikat ligan. Ikatan ligan mengaktifkan reseptor TNFRI dan Fas untuk menarik dan mengikat protein *death effector Fadd/Mort-1*. Ikatan Fadd/Mort-1 menarik *procaspase 8*. *Procaspase 8* diubah menjadi bentuk aktifnya yaitu *caspace 8* dan dilepaskan kembali ke dalam sitosol. *Caspase 8* akan memecah dan mengaktifkan *caspace 3*. Sementara itu, jalur kedua berlangsung lewat jalur alternatif sinyal transduksi. Reseptor Fas berikatan dengan protein adapter yang akan mengaktifkan *mitogen activated protein (MAP) kinase* dan memicu kaskade fosforilasi yang meningkat pada aktivasi *c-Jun N terminal kinase (JNK)*. JNK yang teraktivasi memfosforilasi substrat, seperti c-Jun dan p53, serta menginduksi apoptosis lewat berbagai mekanisme, meliputi modifikasi dan pengaturan protein pada famili Bcl-2. Disamping itu, aktivasi apoptosis dapat terjadi melalui jalur intrinsik. Pada jalur tersebut, inisiasi apoptosis ditimbulkan oleh produk biokimia yang berasal dari stres intraseluler, seperti stres oksidatif, perubahan redoks, ikatan kovalen, peroksidase lipid. Bahan-bahan tersebut memberikan sinyal kepada mitokondria sehingga menyebabkan perubahan pada mitokondria yang dimulai dengan terbukanya membran bagian luar dan diikuti pembengkakan matriks dan hilangnya potensial membran yang menyebabkan keluarnya protein-protein mitokondria termasuk *cytochrome-c*. Apoptosis akan menghasilkan *apoptotic bodies* yang terdiri dari fragmen sisa-sisa sel yang akan difagositosis oleh sistem retikuloendotelial di sekitarnya.

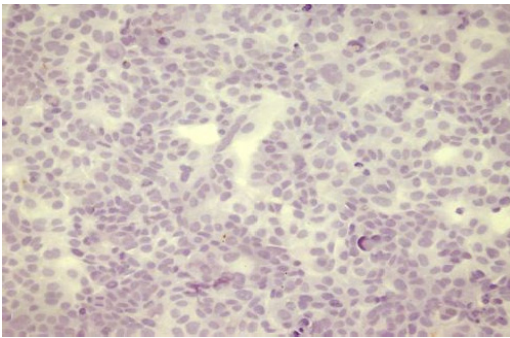
Proses apoptosis tersebut dikendalikan oleh dua perangkat gen yang berfungsi antagonistik yaitu memacu dan menghambat, termasuk gen yang memacu proses apoptosis yaitu p53, pRB, dan E2F, dimana protein gen-gen tersebut lebih berperan dalam siklus sel. Ketika terjadi kerusakan DNA maka p53 akan teraktivasi dan mengaktifkan p21 yaitu suatu *CDK Inhibitor*. P21 akan mengikat dan menginaktifkan kompleks CDK4 yang akan menyebabkan fosforilasi Rb terhambat dan pelepasan faktor transkripsi E2F terhenti, sehingga siklus sel terhenti pada tahap G1-S. Saat siklus sel terhenti, DNA mempunyai kesempatan untuk memperbaiki diri sebelum memasuki tahap pembelahan selanjutnya. Jika kerusakan DNA berat dan tidak dapat direparasi maka sel akan memasuki jalur apoptosis. Kompleks E2F dengan pRB merupakan kompleks stabil untuk mengaktifkan berbagai promoter dalam sintesis DNA. Pada kondisi tanpa adanya sinyal pertumbuhan, pRB dalam keadaan hipofosforilasi.



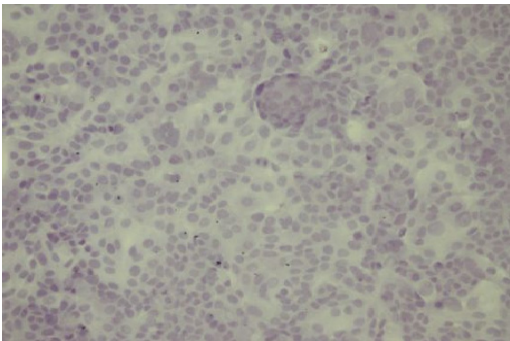
**Gambar 1.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



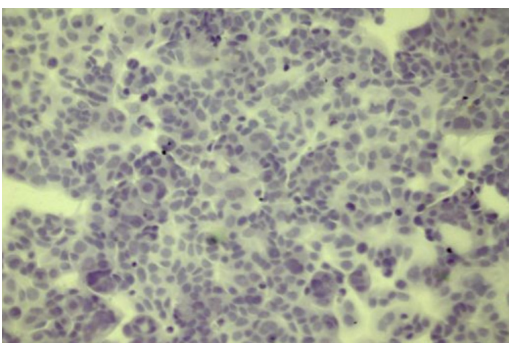
**Gambar 2.** Hasil *imunostaining* ekspresi p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



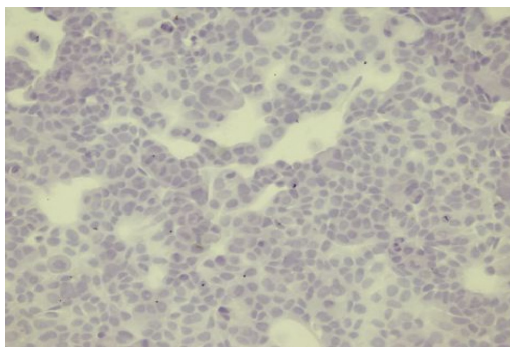
**Gambar 3.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 62,50 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



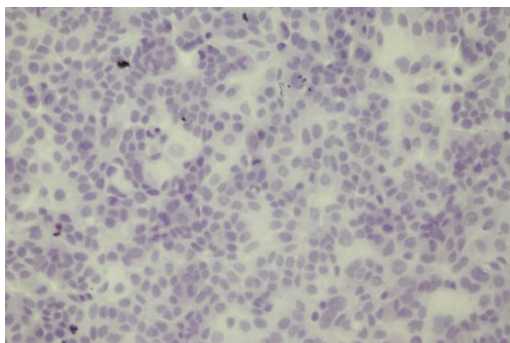
**Gambar 4.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 0 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



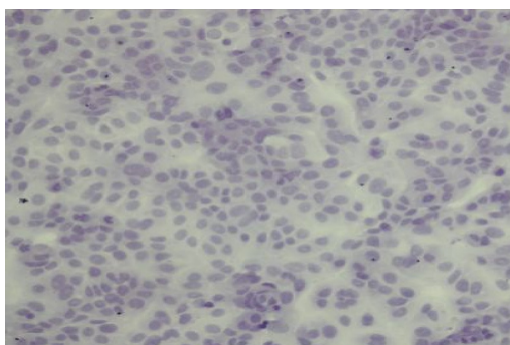
**Gambar 5.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 1,95 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



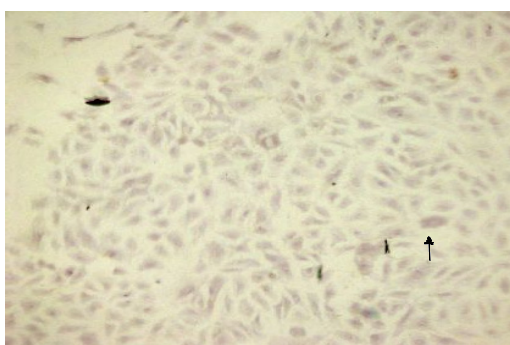
**Gambar 6.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 3,90 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



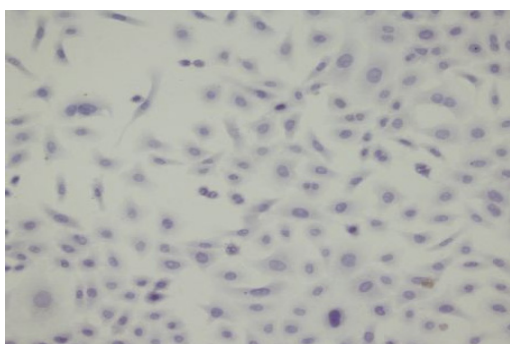
**Gambar 7.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 7,81 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



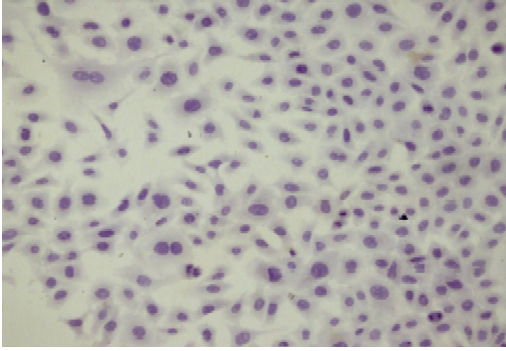
**Gambar 8.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan negatif pada hasil kultur sel MCF7 dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



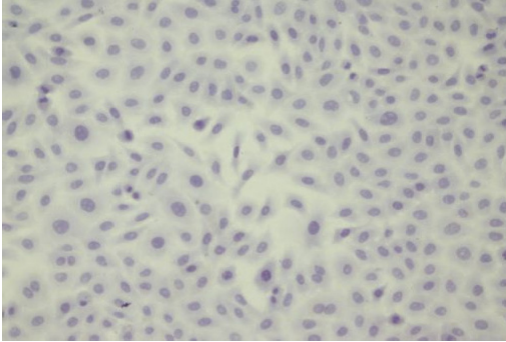
**Gambar 9.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 0 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna inti kecokelatan.



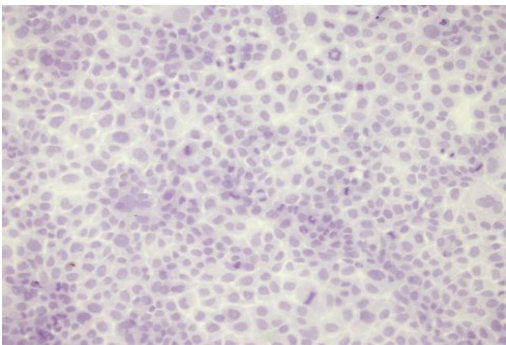
**Gambar 10.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



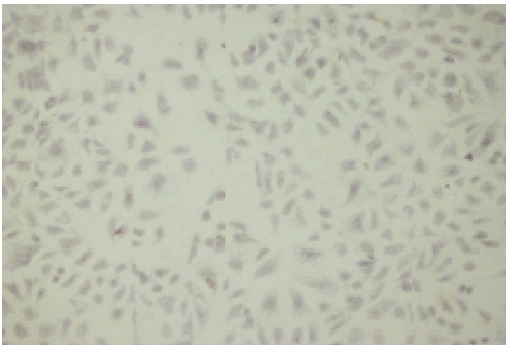
**Gambar 11.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



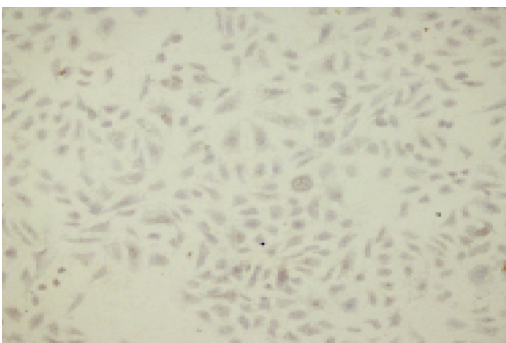
**Gambar 12.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 62,50 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



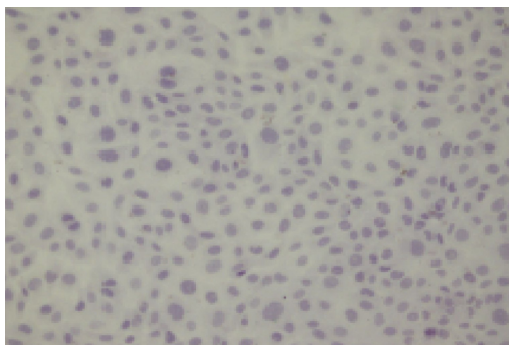
**Gambar 13.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi etanolik pada konsentrasi 125 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada pembesaran 400x.



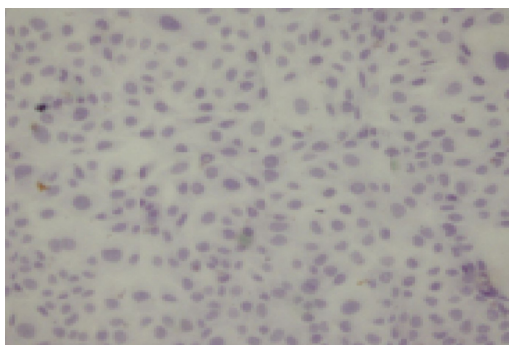
**Gambar 14.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 0 µg/mL pada ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna inti kecokelatan.



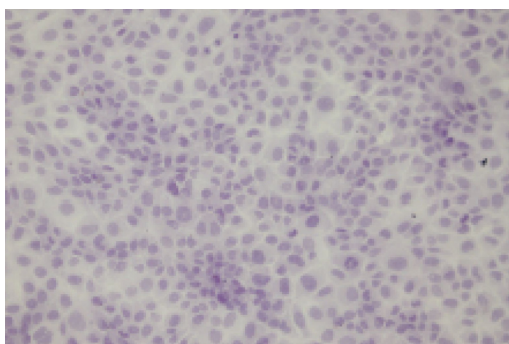
**Gambar 15.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 3,90 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x. Sel positif p53 mutan ditunjukkan dengan warna kecokelatan, sedangkan sel negatif berwarna kebiruan.



**Gambar 16.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 7,8 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.



**Gambar 17.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 15,62 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.



**Gambar 18.** Hasil *imunostaining* ekspresi gen p53 mutan positif pada hasil kultur sel T47D dengan perlakuan fraksi petroleum eter pada konsentrasi 31,25 µg/mL ekstrak umbi bawang dayak pada perbesaran 400x.

Pada keadaan terhipofosforilasi, pRB berikatan dengan E2F dan HDAC (*histone deacetylase*), serta menginaktifkan faktor transkripsi E2F. Ikatan antara pRB dengan HDAC dan E2F diatur oleh fosforilasi *serine/threonine*. E2F merupakan faktor transkripsi *cyclin E*, *cyclin A*, dan protein-protein lain yang terlibat dalam siklus sel. Fosforilasi tahap pertama oleh *cyclin D/CDK 4*, dalam stimulus *growth factor*, melepaskan HDAC dari kompleks HDAC-pRB-E2F. Fosforilasi tahap berikutnya dilakukan oleh *cyclin E/CDK 2* dan melepaskan E2F dari pRB. E2F yang dihasilkan akan menginduksi transkripsi gen, seperti *DNA polymerase* dan *thymidin kinase*, yang diperlukan untuk masuk ke dalam fase S.

Dari uraian tersebut dapat diketahui dengan jelas bahwa proses apoptosis dapat dipacu oleh berbagai faktor, baik dari jalur ekstrinsik maupun jalur intrinsik. Selain itu, siklus sel juga diatur dan dipengaruhi oleh berbagai macam enzim maupun protein yang berperan sebagai supresor gen kanker. Dengan demikian, penekanan ekspresi gen p53 mutan pada sel karsinoma payudara T47D pada pemberian fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter ekstrak bawang

dayak, menunjukkan penghambatan proliferasi sel terjadi akibat adanya apoptosis melalui jalur ekstrinsik atau intrinsik dan faktor-faktor yang mempengaruhinya meskipun proses apoptosis yang terjadi belum dapat ditentukan. Hal ini tentunya perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk mencari dan membuktikan faktor-faktor yang berpengaruh dalam penekanan ekspresi gen p53 mutan pada galur sel kanker payudara. Pengembangan obat antikanker yang didasarkan pada regulasi siklus sel selanjutnya diarahkan pada penghambatan terjadinya proses pembelahan sel dan pemacu apoptosis. Dengan demikian, senyawa atau protein yang diberikan pada penderita dapat mencegah sintesis DNA dan mitosis, sehingga dapat menghentikan proliferasi sel kanker.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak fraksi etanolik dan fraksi petroleum eter umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) mampu menekan tingkat ekspresi gen p53 mutan

pada galur sel kanker payudara T47D secara in vitro. Tidak terdapat perbedaan potensi penekanan signifikan dari fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak terhadap penekanan ekspresi gen p53 mutan pada sel kanker payudara T47D.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Abrahamson JA, Lee JM, Bernstein A. 1995. Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by steel factor. *Mol Cell Biol* 15: 6953-6960.
- Albar ZA, Tjindarbumi D, Ramli. 2004. Protokol PERABOI 2003, Edisi I. Peraboi, Bandung.
- Alfred MC, Bruce DM. 1997. Cancer of the colon. In: Devita V (ed). *Cancer, Principles and Practice of Oncology*. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott-Raben, USA.
- Ashariati A. 2005. Pengelolaan medik penderita kanker. *Basic Science of Oncology*, Pertemuan Ilmiah Berkala Proyek Trigonum Plus XVIII. SMF Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga-RSU Dr. Soetomo, Surabaya.
- Aulia N. 2003. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Umbi Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr) terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Escherichia coli*. UII, Yogyakarta.
- Chen F, Chang D, Goh M et al. 2000. Role of p53 in cell cycle regulation and apoptosis following exposure to proteasome inhibitor. *Cell Growth Differ* 11(5): 239-246.
- Dyson N. 1998. Genes and development, the regulation of E2F by pRB-family proteins. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [www.genesdev.org](http://www.genesdev.org).
- Flaman JM, Frebourg T, Moreau V et al. 1995. A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood and tumors. *Proc Natl Acad Sci* 92: 3963-3967.
- Katzung BG. 2001. *Basic and clinical pharmacology*, Eighth edition. Mc Graw-Hill Companies, Philadelphia.
- Murti B. 1997. *Prinsip dan metode riset epidemiologi*. UGM Press, Yogyakarta.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC et al. 1989. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342(6250): 705-708.
- Smardova J, Pavlova S, Svitakova M et al. 2005. Analysis of p53 status in human cell lines using a functional assay in yeast: Detection of new non-sense p53 mutation in codon 124. *Oncol Rep* 14: 901-907.
- Tjindarbumi D. 2004. Penanganan kanker payudara masa kini dengan berbagai macam isu di Indonesia. *Indonesian Issues of Breast Cancer*. Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya.

# Efek mortalitas ekstrak biji jarak (*Ricinus communis*) terhadap larva *Aedes aegypti*

## The mortality effect of castor bean (*Ricinus communis*) extract on *Aedes aegypti* larvae

TRI NUGROHO WIBOWO, DARUKUTNI, SUTARTINAH SRI HANDAYANI

Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 2 Februari 2010. Revisi disetujui: 26 Februari 2010.

**Abstract.** Wibowo TN, Darukutni, Handayani SS. 2010. The mortality effect of castor bean (*Ricinus communis*) extract on *Aedes aegypti* larvae. *Biofarmasi* 8: 77-81. The aim of this research was to determine the mortality effect of *Ricinus communis* L. extract on *Aedes aegypti* L. larvae. This research was an laboratory experimental, with a post-test only controlled group design, and used 750 larvae Instar III of *A. aegypti* L. that divided into 6 groups (control group, and five treatment groups consisted of 0.10% extract, 0.25% extract, 0.50% extract, 0.75% extract and 1% extract). The sampling technical was a purposive sampling method. The larvae were put into 25 ml experimental liquid for 24 hours. The observation was counting a number of dead larvae in 24 hours. Data were analyzed with one-way ANOVA test continued with Least Significant Difference (LSD) using SPSS for Windows Release statistically with a significance level  $p < 0.05$  then continued with a probit analysis. There were 0 larva death at negative control, 23.8 (95%) larvae death at 0.10% extract concentration, 24.6 (98%) larvae death at 0.25% extract concentration, 25.0 (100%) larvae death at 0.50%, 0.75% and 1.00% extract concentration. There was a significant difference in larvae death of *A. aegypti* in all groups. The LC50 of *R. communis* extract was 0.01036% (103.6 ppm), therefore it could be concluded that *R. communis* extract had a mortality effect to *A. aegypti* larvae.

**Keywords:** Castor bean extract, larvae *Aedes aegypti*, mortality

### PENDAHULUAN

Demam Berdarah Dengue (DBD) masih menjadi masalah kesehatan utama di Indonesia (Luh dan Sanusi 2004). Demam Berdarah Dengue atau *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh virus dengue dari Famili *Flaviviridae*, dengan genus *Flavivirus*. Virus tersebut mempunyai empat serotipe yang dikenal dengan DEN-1, DEN-2, DEN-3, dan DEN-4 (Suhendro et al. 2007).

*Aedes aegypti* L. merupakan jenis nyamuk yang dapat membawa virus dengue penyebab penyakit demam berdarah. Selain virus dengue, *A. aegypti* juga merupakan pembawa virus demam kuning (*yellow fever*) dan chikungunya. Sebagai pembawa virus dengue, *A. aegypti* merupakan pembawa utama (*primary vector*), dan bersama *Aedes albopictus* L. menciptakan siklus persebaran dengue di desa dan kota. Mengingat keganasan penyakit demam berdarah, masyarakat harus mengenali dan mengetahui cara-cara mengendalikan jenis nyamuk tersebut untuk membantu mengurangi penyebaran penyakit demam berdarah.

Pemberantasan DBD dipusatkan pada nyamuk pembawa virus dengue, sehingga pemberantasan larva nyamuk akan dapat membantu mencegah penularan penyakit tersebut (Noegroho et al. 1997). Virus dengue bersirkulasi pada darah manusia yang terinfeksi rata-rata pada saat demam, dan nyamuk yang tidak terinfeksi tertular virus dari manusia yang mengandung virus dengue. Virus berkembang di tubuh nyamuk selama periode 8-10

hari sebelum dapat ditularkan kepada manusia lainnya (Monte 2009).

Pengendalian vektor utama adalah upaya untuk menurunkan kepadatan populasi nyamuk *A. aegypti* hingga serendah mungkin, sehingga kemampuannya sebagai vektor dapat menghilang (Soegijanto 2004). Untuk pengendalian tersebut dapat digunakan bahan kimia yang berkhasiat untuk membunuh serangga (insektisida) atau hanya untuk menghalau serangga (*repellent*). Namun, cara pengendalian tersebut hanya bersifat sementara dan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan (Gandahasada et al. 1998). Akibat penggunaan insektisida yang berulang-ulang dapat membunuh serangga bukan target dan timbulnya resistensi pada vektor (Luh dan Sanusi 2004).

Indonesia memiliki berbagai jenis tumbuhan yang sangat beraneka ragam, yang mengandung zat-zat sumber bahan insektisida untuk pengendalian vektor penyakit (Sundari dan Wulandari 2005). Risin merupakan suatu enzim yang memiliki rantai A dan rantai B. Rantai A memiliki aktivitas toksik karena dapat menghambat sintesis protein. Risin termasuk protein inaktivator ribosom tipe II *heterodimeric glycoproteins* (Sudjadi et al. 2007). Tanpa adanya ribosom atau ribosom yang tidak aktif bekerja, protein yang dibutuhkan untuk kehidupan sel akan berhenti diproduksi dan akhirnya sel pun akan mati (Nugroho 2008).

Berdasar uraian tersebut, pada penelitian ini akan diteliti mengenai efek ekstrak biji jarak terhadap mortalitas larva *A. aegypti*, mengingat biji jarak yang diekstraksi dengan metode perkolasi mengandung risin. Tujuan dari

penelitian ini adalah untuk mengetahui efek mortalitas ekstrak biji jarak (*Ricinus communis* L.) terhadap larva *A. aegypti*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga, Jawa Tengah.

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi wadah plastik 100 ml, gelas ukur 100 ml, pipet plastik, pipet ukur, neraca, lidi, kasa kain, alat penghitung, dan *Beaker glass*. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi larva *A. aegypti*, instar III, ekstrak biji jarak (*R. communis*), akuades, dan CMC 1%.

### Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium.

### Subjek penelitian

Subjek penelitian adalah larva *A. aegypti* yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Vektor dan Reservoir Penyakit (B2P2VRP) Salatiga, Jawa Tengah.

### Teknik sampling

Dalam penelitian ini, sampel diambil dengan cara *purposive sampling*, yaitu metode pemilihan subjek berdasarkan atas ciri atau sifat tertentu yang berkaitan dengan karakteristik populasi (Taufiqurrahman 2004). Dalam penelitian ini, subjek yang digunakan adalah larva *A. aegypti* yang berada pada fase instar III.

### Cara kerja

#### Tahap persiapan

Tahap persiapan meliputi tahap persiapan pembuatan ekstrak biji jarak dengan metode perkolasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat (B2P2TO) Tawangmangu, Karanganyar. Perkolasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan pencari selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Metode perkolasi digunakan untuk mencari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan pencari, tidak mengandung benzoin, tiraks, dan lilin (Alam et al. 2007).

Pembuatan ekstrak biji jarak dilakukan dengan cara menimbang serbuk biji jarak sebanyak 400 gram. Kemudian serbuk biji jarak dibungkus dengan kertas saring, dibentuk silinder dan diikat dengan tali, lalu dimasukkan ke dalam alat perkolasi dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 4 liter. Proses perkolasi dihentikan setelah larutan berwarna jernih. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menguapkan pelarut di atas penangas api hingga diperoleh ekstrak pekat berupa gel tanpa mengandung etanol.

### Uji pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Berdasarkan hasil penelitian, daya bunuh ekstrak biji jarak terhadap larva *A. aegypti* di laboratorium menunjukkan bahwa dosis 1250 ppm menyebabkan kematian larva sebesar 86% (Suwarno 1997). Dengan demikian, pada uji pendahuluan digunakan konsentrasi larutan ekstrak sebesar 1%, 3%, dan 5% untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak biji jarak yang memiliki efek mortalitas terhadap larva *A. aegypti* (Tabel 1).

### Uji penelitian

Ekstrak biji jarak ditimbang kemudian dilarutkan dalam larutan akuades dengan CMC 1%. Konsentrasi ekstrak 1% didapat dengan cara melarutkan 1 gr ekstrak biji jarak pada larutan akuades dengan CMC 1% sampai volume larutan 100 ml. *Carboxyl methyl cellulose* (CMC) adalah zat pelarut minyak pada ekstrak yang berfungsi untuk menstabilkan emulsi (Supriyo 2008). Pemakaian CMC karena CMC tidak mempengaruhi larva *A. aegypti* secara signifikan. Konsentrasi ekstrak yang dipergunakan adalah 0,1%, 0,25%, 0,5%, 0,75%, dan 1%.

Ke dalam tiap-tiap konsentrasi ekstrak dimasukkan sebanyak 25 ekor larva *A. aegypti* instar III, termasuk kontrol, tanpa diberi makanan (Calvacanti et al. 2004).

$$(K-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

K = jumlah kelompok percobaan

n = jumlah sampel

Besar sampel:

$$(6-1)(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 20$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Besar sampel yang digunakan harus lebih dari 4. Dalam percobaan ini digunakan 25 ekor sampel tiap kelompok uji.

$$P(n-1) \geq 16$$

Keterangan:

P = jumlah perlakuan percobaan

n = jumlah pengulangan

Banyak pengulangan:

$$5(n-1) \geq 16$$

$$5n \geq 21$$

$$n \geq 4,20$$

Banyaknya pengulangan dalam percobaan ini harus lebih dari 4,20 kali. Dalam percobaan ini dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

**Tabel 1.** Jumlah kematian larva *Aedes aegypti* setelah diuji dengan ekstrak biji jarak dalam berbagai konsentrasi pada uji pendahuluan

Ulangan	Kelompok			
	I	II	III	IV
1	0	23	25	25
2	0	24	25	25
3	0	25	25	25
4	0	24	24	25
5	0	24	25	25
Jumlah kematian	0	120	124	125
Rata-rata	0	24	24,8	25

Keterangan: Kelompok I = Akuades dengan CMC 1% (kontrol), kelompok II = konsentrasi ekstrak 1%, kelompok III = konsentrasi ekstrak 3%, kelompok IV = konsentrasi ekstrak 5%.

### Analisis data

Setelah diperoleh jumlah larva yang hidup dan jumlah larva yang mati, dilakukan uji statistik sebagai berikut: (i) Uji *One-Way Anova*, Untuk mengetahui perbedaan jumlah kematian larva *A. aegypti* antar kelompok uji. (ii) Uji *Least Significance Difference (LSD)*, Untuk mengetahui pasangan *mean* yang perbedaannya signifikan. (iii) Analisis *Probit*, Untuk mengetahui efek mortalitas ekstrak biji jarak terhadap larva *A. aegypti* yang dinyatakan dengan LC (*Lethal Concentration*).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian

#### Uji Analisis Varian (ANOVA)

Dari hasil percobaan pada Tabel 2 setelah dilakukan analisis dengan uji ANOVA pada taraf kepercayaan ( $\alpha$ ) 0,05 (Tabel 3) didapatkan nilai F hitung (3052,040), maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Hal ini menunjukkan bahwa paling sedikit ada dua kelompok konsentrasi ekstrak biji jarak mempunyai efek larvasida yang berbeda ( $p=0,000$ ).

#### Uji Least Significance Difference (LSD)

Berdasarkan hasil pengujian data penelitian dengan *Least Significance Difference (LSD)* menggunakan Program SPSS 17.0, didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antara masing-masing pasangan uji ( $p=0,000$ ; maka  $p<0,05$ ), kecuali antara kelompok IV, V, dan VI tidak signifikan karena  $p>0,05$ .

#### Analisis Probit

Selanjutnya hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan analisis probit untuk mendapatkan nilai LC50 dan LC99. Dari hasil analisis probit, didapatkan perkiraan besar konsentrasi ekstrak yang mengakibatkan kematian larva *A. aegypti* sebesar 50% yaitu pada konsentrasi 0,01036%. Adapun kematian larva sebesar 99% didapatkan pada konsentrasi ekstrak 0,25981%.

### Pembahasan

Pada uji pendahuluan dapat diketahui bahwa pada konsentrasi ekstrak biji jarak 1%, 3%, dan 5% didapatkan jumlah rata-rata kematian larva *A. aegypti* yang beragam, yaitu 96% pada konsentrasi 1%, 99,2% pada konsentrasi

3%, dan 100% pada konsentrasi 5%. Hasil yang didapat dari uji pendahuluan ini menjadi dasar penetapan konsentrasi ekstrak yang dipakai pada penelitian ini. Dari hasil penelitian pada uji pendahuluan belum dapat diketahui interval konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% larva *A. aegypti* (LC50). Padahal, untuk menentukan LC50 diperlukan data berbagai macam konsentrasi yang mengakibatkan jumlah kematian yang beragam. Hal ini seringkali sulit untuk diterapkan, oleh karena itu seringkali digunakan empat konsentrasi atau lebih dengan harapan bahwa sekurang-kurangnya tiga diantaranya akan berada pada rentang konsentrasi yang diharapkan. Pada penelitian ini, konsentrasi ekstrak biji jarak yang digunakan adalah 0,10%, 0,25%, 0,50%, 0,75%, dan 1% dengan harapan dapat memenuhi persyaratan tersebut.

Berdasar hasil penelitian, dapat diketahui bahwa ekstrak biji jarak berpengaruh secara signifikan terhadap mortalitas larva *A. aegypti*. Secara garis besar, kenaikan konsentrasi ekstrak juga diikuti dengan kenaikan jumlah kematian larva sampai tingkat konsentrasi tertentu seperti yang dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari hasil analisis statistik dengan menggunakan uji ANOVA pada taraf kepercayaan  $\alpha=0,05$ , didapatkan nilai F hitung = 3052,040. Adapun nilai F tabel dengan derajat kebebasan pembilang 5 dan penyebut 24, bernilai 4,53 yang berarti F hitung > F tabel, dengan demikian  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat efek mortalitas ekstrak biji jarak terhadap larva *A. aegypti*.

Setelah data hasil penelitian diuji dengan ANOVA, pengujian dilanjutkan dengan uji LSD. Dari hasil uji LSD didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antara masing-masing pasangan kelompok uji ( $p=0,000$ ; maka  $p<0,05$ ), kecuali pada kelompok uji, kelompok V, dan kelompok VI yang tidak signifikan karena  $p>0,05$  dan memiliki efek mortalitas yang sama terhadap larva *A. aegypti*.

**Tabel 2.** Jumlah kematian larva *Aedes aegypti* setelah diuji dengan ekstrak biji jarak dalam berbagai konsentrasi pada uji penelitian

Ulangan	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
1	0	23	25	25	25	25
2	0	24	25	25	25	25
3	0	24	24	25	25	25
4	0	25	24	25	25	25
5	0	23	25	25	25	25
Jumlah	0	119	123	125	125	125
Rata-rata	0	23,8	24,6	25	25	25

Keterangan: Kelompok I = Akuades dengan CMC 1% (kontrol), kelompok II = konsentrasi ekstrak biji jarak 0,10%, kelompok III = konsentrasi ekstrak biji jarak 0,25%, kelompok IV = konsentrasi ekstrak biji jarak 0,50%, kelompok V = konsentrasi ekstrak biji jarak 0,75%, kelompok VI = konsentrasi ekstrak biji jarak 1%.

**Tabel 3.** Hasil uji ANOVA satu arah (*One-Way ANOVA*)

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Between Groups	2543,367	5	508,673	3052,040	0,000
Within Groups	4,000	24	0,167		
Total	2547,367	29			

**Tabel 4.** Perbandingan LC50 dari beberapa ekstrak tumbuhan yang mematikan larva *Aedes aegypti* L. dalam waktu 24 jam

Tumbuhan larvasida	Kandungan	LC50 (ppm)
Daun pandan wangi ( <i>Pandanus amaryllifolius</i> Roxb.)	Saponin, flavonoid, alkaloid, polifenol, minyak atsiri	2918,46
Ekstrak daun teklan ( <i>Eupatorium riparium</i> Regel)	Alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, kuinon, steroid, terpenoid	1400
Daun gigil ( <i>Dichroa febrifuga</i> Lour)	alkoloid, saponin, flavonoid, tanin	1000
Biji mahkota dewa ( <i>Phaleria papuana</i> Warb.)	saponin, flavonoid, tanin, alkaloid, polifenol, minyak atsiri	925,5
Ekstrak bunga cengkih ( <i>Syzygium aromaticum</i> L.)	saponin, flavonoid, tanin, eugenol, minyak atsiri	817,3
Kamndrah ( <i>Croton tiglium</i> L.)	Piperine	769,52

Berdasarkan hasil analisis *Probit*, didapatkan hasil perkiraan besar LC50 adalah pada konsentrasi ekstrak biji jarak 0,01036%, apabila dikonversikan ke dalam satuan ppm (*part per million*) senilai 103,6 ppm. Ekstrak dari tumbuhan dapat dipertimbangkan sebagai larvasida jika nilai LC50-nya kurang dari 0,5% atau setara dengan 5000 ppm (Wulandari et al. 2006). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa LC50 ekstrak biji jarak dicapai pada konsentrasi di bawah 5000 ppm, sehingga tumbuhan tersebut dapat dipertimbangkan sebagai salah satu larvasida yang cukup potensial terhadap larva *A. aegypti*.

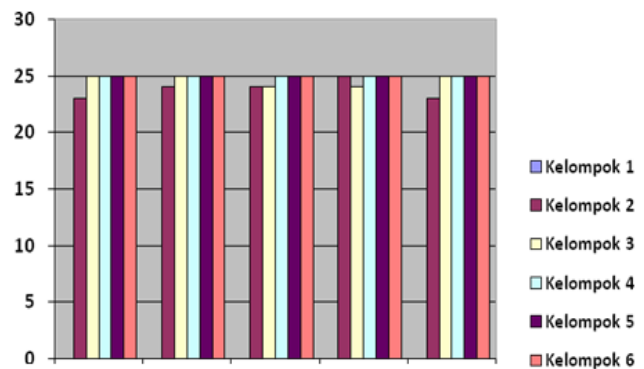
Berikut ini ditampilkan perbandingan LC50 dari beberapa ekstrak tumbuhan yang mempunyai kandungan yang hampir sama untuk mematikan larva *A. aegypti* dalam waktu 24 jam (Tabel 4). Semakin rendah nilai LC50 suatu zat berarti zat tersebut memiliki aktivitas yang lebih tinggi dalam membunuh hewan percobaan, karena zat tersebut memerlukan konsentrasi yang lebih rendah untuk mematikan hewan percobaan (Chang 2004). Oleh karena itu, dari Tabel 2 dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji jarak merupakan kandidat larvasida yang lebih efektif daripada ekstrak tanaman lain, karena LC50 ekstrak biji jarak adalah terendah yaitu 103,6 ppm.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak biji jarak memiliki efek mortalitas terhadap larva *A. aegypti*. LC50 didapatkan pada konsentrasi ekstrak biji jarak 0,01036% atau 103,6 ppm.

## DAFTAR PUSTAKA

Alam, Gemini, Rahim A. 2007. Penuntun Praktikum Fitokimia. UIN Alaudin, Makasar.



**Gambar 1.** Kematian larva *Aedes aegypti* pada berbagai konsentrasi ekstrak biji jarak

- Calvacanti ESB, de Morais SM, Lima AMA et al. 2004. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian plants against *Aedes aegypti* L. www.scielo.br. [8 Maret 2009].
- Chang PST. 2004. Cinnamon oil may be an environmentally friendly pesticide with the ability to kill mosquito larvae. www.news-medical.net. [10 Desember 2009].
- Gandahasada S, Henry DI, Pribadi W. 1998. Parasitologi kedokteran. Gaya Baru, Jakarta.
- Monte SLK. 2009. Demam Berdarah Dengue. www.pkugombong.blogspot.com. [14 Maret 2009].
- Luh N, Sanusi M. 2004. Uji toksisitas jamur *Metarhizium anisopliae* terhadap larva *Aedes aegypti*. Media Litbang Kesehatan 14(3): 25-30.
- Noegroho SP, Mulyani S, Mulyaningsih B. 1997. Aktivitas larvasida minyak atsiri daun jukut (*Hyptis suaveolens* L.) terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti* instar IV dan analisis Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa. Maj Farm Ind 8(4): 11.
- Nugroho S. 2008. Risin, bioteroris yang juga bisa bersahabat. www.chemistry.org. [24 Maret 2009].
- Soegijanto S. 2004. Demam Berdarah Dengue. Airlangga University Press, Surabaya.
- Sudjadi, Witasari LD, Sadarum MT et al. 2007. Efek sitotoksik suatu protein seperti *Ribosome Inactivating Proteins* yang bersifat asam dari daun *Mirabilis jalapa* L. pada sel kanker. Majalah Farmasi Indonesia 18(4): 8-14.
- Suhendro, Nainggolan L, Chen K et al. 2007. Demam Berdarah Dengue. In: Sundaru AW et al. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Pusat Penerbitan FKUI, Jakarta.
- Sundari S, Wulandari T. 2005. Efikasi fase air ekstrak biji srikaya (*Annona squamosa* L.) sebagai larvasida terhadap larva nyamuk *Aedes aegypti*. Jurnal Kedokteran YARSI 13(1): 56-60.
- Supriyo E. 2008. Pengaruh Konsentrasi *Surfactant* pada Formulasi Propuxure 20ec dan Efektivitasnya dalam Membasmi Nyamuk *Aedes Aegypti*. [Thesis]. Universitas Diponegoro, Semarang.
- Suwarno H. 1997. Berbagai cara pemberantasan larva *Aedes aegypti*. Cermin Dunia Kedokteran 119: 32-34.
- Taufiqurrahman MA. 2004. Metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. Penerbit CSGF, Klaten.
- Wulandari DN, Soetjipto H, Hastuti SP. 2006. Skrining fitokimia dan efek larvasida ekstrak biji kecubung wulung (*Datura metel* L.) terhadap larva Instar III dan IV *Aedes aegypti*. Berkala Ilmiah Biologi 5(2): 101-107.

# Pengaruh variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi terhadap kadar asam sianida dan senyawa fenolik pada tempe koro babi (*Vicia faba*)

## Influence of size reduction variation and fermentation time towards cyanide acid contents and phenolic compound in faba bean (*Vicia faba*) tempeh

CHRISTIANA SEPTI INDRIYANI, SRI HANDAYANI, DIAN RACHMAWATI

Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 1 Februari 2010. Revisi disetujui: 22 Februari 2010.

**Abstract.** *Indriyani CS, Handayani S, Rachmawati D. 2010. Influence of size reduction variation and fermentation time towards cyanide acid contents and phenolic compound in faba bean (Vicia faba) tempeh. Biofarmasi 8: 31-36.* Tempeh is fermentation product which very known by Indonesian society and has been familiar with various western society. Tempeh can be made from various ingredient, but usually, tempeh is made from soybean. Due to the increasing soybean price, it has been found another Leguminosae to substitute soybean. One of legume was faba bean, Leguminosae, that generally contains phenol as antioxidant and cyanide acid as anti-nutrient and toxic material. The aim of this research was to determine the effect of size reduction variation and fermentation time variation of faba beans tempeh production to cyanide acid and total phenol contents. This research used a factorial experiment that arranged in a Randomized Complete Design (RCD) with two experimental factors including size reduction (chopped and sliced) and the time of fermentation (0, 30, 36, 42 and 48 hours). The result showed that cyanide acid content in fermentation of 0, 30, 36, 42 and 48 hours on faba beans tempeh by chopped seeds were 0.060 mg/g, 0.048 mg/g, 0.036 mg/g, 0 mg/g and 0 mg/g, respectively, then on faba beans tempeh by sliced seeds were 0.072 mg/g, 0.036 mg/g, 0.036 mg/g, 0 mg/g and 0 mg/g, respectively. Meanwhile, the content of total phenol on faba beans tempeh by chopped seeds were 0.014750%, 0.149900%, 0.201825%, 0.170400% and 0.234400%, while on faba beans tempeh by sliced seeds were 0.014750%, 0.152650%, 0.178300%, 0.162750% and 0.192620%, respectively. The fermentation time and the size of faba beans seeds affected on cyanide acid and total phenol contents of faba beans tempeh. The longer fermentation time of faba beans tempeh caused lower cyanide acid content and higher total phenol content. The smaller size of faba beans seeds on tempeh caused lower cyanide acid content and higher total phenol content. The lowest cyanide acid content was contained in faba beans tempeh with chopped and sliced seeds with 42 and 48 hours fermentation reached 0 mg/g. The highest total phenol content was contained in chopped faba beans tempeh with 48 hours fermentation reached 0.234400%.

**Keywords:** Cyanide acid contents, faba beans, fermentation time, size reduction, total phenol contents

### PENDAHULUAN

Tempe merupakan salah satu makanan khas Indonesia. Selain mengandung protein nabati yang tinggi, harga tempe juga sangat terjangkau dan memasyarakat. Tempe merupakan salah satu sumber protein nabati yang sering dikonsumsi dan pada umumnya berbahan baku kedelai. Bahan baku tempe selama ini masih diimpor dari Amerika, rata-rata sebesar 40%, karena produksi kedelai lokal terus mengalami penurunan (5,2%) dan tidak dapat memenuhi kebutuhan kedelai nasional yang terus meningkat (1,8% per tahun) (Pitojo 2003), sementara tingkat impor kedelai terus meningkat. Oleh karena itu, perlu alternatif bahan baku tempe, sehingga kebutuhan masyarakat akan sumber protein dapat terus terpenuhi. Di daerah-daerah tertentu di Indonesia telah ditemukan beberapa masyarakat yang menggunakan jenis kacang-kacangan lain yang dimanfaatkan sebagai bahan baku tempe.

Kacang-kacangan telah lama dikenal sebagai sumber protein yang saling melengkapi dengan bahan pangan dari biji-bijian, seperti beras dan gandum. Komoditas ini ternyata juga potensial sebagai sumber zat gizi lain selain

protein, seperti mineral, vitamin B, karbohidrat kompleks, dan serat makanan. Disamping diolah secara tradisional dengan direbus, dikukus, dan disayur, sebenarnya potensi penggunaan kacang-kacangan sangat luas untuk menghasilkan produk baru.

Banyak ragam kacang-kacangan yang ada di Indonesia, salah satunya adalah koro babi (*Vicia faba*). Koro babi merupakan jenis kacang-kacangan yang potensial. Jika dibandingkan dengan kedelai, koro babi mempunyai kandungan protein dan lemak yang sedikit lebih rendah, sedangkan kandungan karbohidratnya lebih tinggi. Koro babi merupakan sumber riboflavin, niasin, fosfor, dan potasium. Selain itu, koro babi juga merupakan sumber folat, tembaga, dan mangan yang sangat baik. Akan tetapi, koro babi mempunyai biji yang keras dan mengandung senyawa antigizi seperti pada umumnya kacang-kacangan yang lain.

Koro babi merupakan salah satu jenis Leguminosae yang dapat digunakan sebagai salah satu alternatif bahan baku sumber protein non-kedelai yang dapat diolah menjadi tempe. Koro babi memiliki kandungan protein yang cukup tinggi (22%). Selain itu, koro babi diproduksi

secara lokal, sehingga tidak terpengaruh oleh biaya masuk impor.

Senyawa-senyawa antigizi yang terdapat dalam kacang-kacangan meliputi asam fitat, tanin, protease inhibitor (tripsin dan *chymotrypsin*),  *$\alpha$ -amylase inhibitor*, HCN, serta lektin. Selain itu, tingkat pencernaan pati dan proteinnya dalam tubuh juga rendah yang dikarenakan keberadaan senyawa-senyawa antigizi tersebut. Hal inilah yang menyebabkan pemanfaatan kacang-kacangan pada umumnya masih terbatas.

Asam sianida (HCN) merupakan senyawa racun yang dapat mengganggu kesehatan. Keberadaan senyawa tersebut dapat menimbulkan rasa pahit. Senyawa tersebut banyak dijumpai pada kacang koro. Keberadaan HCN dapat mengurangi ketersediaan nutrisi dalam tubuh.

Asam sianida (HCN) dikenal dengan nama lain sebagai racun biru. Tubuh manusia umumnya tidak tahan terhadap HCN pada dosis 0,06 gram. Apabila mengonsumsi HCN pada dosis *lethal* (mematikan) tersebut, manusia dapat mengalami kematian. Namun demikian, terdapat juga manusia yang masih mampu bertahan hidup dan disembuhkan meskipun telah mengonsumsi HCN sebanyak tiga kali lipat dari dosis *lethal* tersebut.

Fermentasi sederhana, seperti pada pembuatan tempe kedelai, diduga dapat menjadi salah satu alternatif pemanfaatan koro babi. Menurut Kasmidjo (1990), fermentasi dapat mengurangi senyawa-senyawa antigizi serta dapat meningkatkan pencernaan protein dan senyawa gizi lainnya, karena pada proses fermentasi berlangsung proses perombakan senyawa makromolekul menjadi komponen-komponen yang lebih sederhana. Menurut Handajani (2008), pada proses pembuatan tempe koro benguk, fermentasi dapat menurunkan kandungan HCN biji koro benguk. Diduga proses fermentasi dapat menurunkan kadar HCN karena aktivitas kapang yang menghasilkan panas hingga 40°C, serta menaikkan kadar air selama fermentasi yang dapat mempengaruhi sifat HCN yang larut air dan mempunyai titik didih 26,5°C.

Sebagian besar senyawa organik bahan alam termasuk dalam golongan senyawa aromatik. Senyawa aromatik tersebut mengandung cincin karboaromatik yaitu cincin aromatik yang hanya terdiri dari atom karbon seperti benzena, naftalena, dan antrasena. Cincin karboaromatik tersebut biasanya tersubstitusi oleh satu atau lebih gugus hidroksil atau gugus lainnya yang ekuivalen ditinjau dari segi biogenetiknya. Oleh karena itu, senyawa bahan alam aromatik tersebut sering disebut sebagai senyawa fenol meskipun sebagian diantaranya bersifat netral karena tidak mengandung gugus fenol dalam keadaan bebas (Sovia 2006).

Senyawa fenol dalam tempe kedelai dan seperti pada Leguminosae yang lain, yaitu berupa isoflavon yang merupakan senyawa fungsional yang berperan sebagai antioksidan. Diduga di dalam tempe koro babi juga terdapat senyawa fenol. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian tentang jumlah total fenol dalam tempe koro babi sebagai manfaatnya untuk manusia.

Mengacu pada penelitian sebelumnya (Laela 2008) pada tempe koro benguk yang juga dilakukan pengecilan ukuran biji, dimana pengecilan ukuran biji dapat

menurunkan kadar asam fitat dan komponen lainnya maka pengecilan ukuran biji pada pembuatan tempe koro babi, diharapkan juga dapat memberikan pengaruh terhadap kadar asam sianida dan total fenol, akibat perbedaan luas permukaan biji.

Senyawa antigizi biji koro babi merupakan kelemahan yang harus dapat diatasi secara baik dan benar pada pengolahan koro babi, salah satunya dengan pembuatan tempe, sehingga dapat dihasilkan produk yang aman dan layak untuk dikonsumsi oleh masyarakat. Oleh karena itu diperlukan suatu upaya untuk mengurangi jumlah senyawa antigizi pada produk tempe koro babi. Dengan perbedaan ukuran biji tersebut diharapkan akan didapatkan perlakuan yang efektif untuk mempersingkat waktu fermentasi.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengetahui pengaruh pengecilan ukuran biji koro babi dan lama fermentasi terhadap kadar asam sianida pada pembuatan tempe koro babi, serta (ii) Mengetahui pengaruh pengecilan ukuran biji koro babi dan lama fermentasi terhadap senyawa fenolik pada pembuatan tempe koro babi.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Laboratorium Biologi Tanah Jurusan Ilmu Tanah Fakultas Pertanian, Laboratorium MIPA Pusat Universitas Sebelas Maret, Surakarta, dan Laboratorium CV. Chemix Pratama, Bantul, Yogyakarta. Penelitian dilaksanakan mulai April hingga September 2009.

### Alat dan bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan tempe meliputi koro babi yang dibeli dari pasar tradisional di Wonosobo, Jawa Tengah, ragi tempe merek "RAPRIMA" produksi Bandung yang diperoleh dari Koperasi "Makmur" Mojosoongo, Surakarta, air sumur, daun pisang, dan kertas koran.

Pada pengujian asam sianida digunakan metode AOAC. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis asam sianida antara lain akuades, 0,02 N AgNO<sub>3</sub>, 0,02 N HNO<sub>3</sub>, K-Thiosianat, dan indikator ferri.

Pada pengujian total fenol digunakan metode Folin-Ciocalteu. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis total fenol antara lain etanol, akuades, reagen Folin-Ciocalteu, dan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%.

Alat yang digunakan yaitu oven (merek Memmert UNM 400) dan spektrofotometer (merek Thermo Electron Corporation). Alat-alat untuk analisis asam sianida meliputi labu Kjeldahl, erlenmeyer, krus Gooch, dan buret. Alat yang diperlukan untuk analisis total fenol dengan metode Folin-Ciocalteu meliputi erlenmeyer, botol gelas, labu takar, tabung reaksi, pipet ukur, blender, baskom, timbangan mekanik, dan kertas saring. Sementara itu, alat-alat untuk pembuatan tempe meliputi kompor, panci, alat perajang, baskom, dan timbangan mekanik.

### Rancangan percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian hubungan fungsional yang pendekatan variabelnya melalui suatu eksperimen dengan menggunakan sampel tempe koro babi. Rancangan dasar yang digunakan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari dua faktor yaitu variasi pengecilan ukuran (2 macam) serta variasi lama fermentasi (4 macam) (Tabel 1).

### Parameter/peubah yang diamati

Peubah yang digunakan dalam penelitian ini adalah: (i) Variabel bebas, yaitu lama fermentasi dan pengecilan ukuran pada tempe koro babi, serta (ii) Variabel terikat utama, yaitu kadar total fenol dan kadar asam sianida pada tempe koro babi.

### Cara kerja

#### *Persiapan bahan dan sortasi*

Koro babi disortasi dari cemaran fisik kemudian ditimbang, lalu dicuci terlebih dahulu sebelum diproses ke tahap berikutnya.

#### *Perebusan*

Koro babi direbus sampai mendidih. Perbandingan air dan koro babi yang digunakan adalah 4:1. Setelah mendidih, airnya dibuang dan diganti dengan air dingin kemudian direbus kembali sampai mendidih. Setelah dingin, biji koro babi dikupas kulitnya.

#### *Perendaman selama 6x12 jam*

Koro babi yang telah dikupas kulitnya direndam kembali dengan air selama 6x12 jam. Perbandingan air dan koro babi adalah 4:1. Tiap 12 jam air diganti.

#### *Pengukusan*

Pengukusan dilakukan selama 20 menit dengan api kecil.

#### *Penirisan*

Penirisan dilakukan dengan menggunakan saringan.

#### *Pendinginan*

Pendinginan dilakukan dalam suhu kamar dan udara terbuka.

#### *Perlakuan pengecilan ukuran*

Koro babi dibagi menjadi dua bagian yang sama banyak, satu bagian dirajang (1 lembaga dibelah secara vertikal menjadi 3) dengan dimensi kurang lebih  $2,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$ , dan satu bagian lagi dicacah (1 lembaga dibelah secara vertikal menjadi 3 bagian, kemudian dibelah secara horisontal menjadi 5-7 bagian) dengan dimensi kurang lebih  $0,5 \times 0,5 \times 0,5 \text{ cm}^3$ .

#### *Inokulasi*

Inokulasi dilakukan dengan menggunakan ragi tempe dengan perbandingan 2 g ragi tempe dalam 1 kg koro babi kemudian dilakukan pencampuran secara homogen. Selanjutnya, koro dibungkus dengan daun pisang.

**Tabel 1.** Rancangan percobaan yang digunakan

Lama Fermentasi (jam)	Perlakuan	
	Koro rajang	Koro cacah
0	0R	0C
30	30R	30C
36	36R	36C
42	42R	42C
48	48R	48C

#### *Fermentasi*

Koro babi yang telah diberi ragi tempe selanjutnya diinkubasi dengan menata sampel di atas rak pada suhu kamar selama 30 jam, 36 jam, 42 jam, dan 48 jam.

### Analisis laboratorium

#### *Uji kadar asam sianida*

Uji kadar asam sianida merupakan pengujian untuk mengetahui kadar asam sianida dalam tempe koro babi. Pengujian kadar asam sianida dilakukan dengan menggunakan metode AOAC. Sebelum dianalisis, tempe pada tiap perlakuan dikecilkan ukurannya kemudian dioven pada suhu  $100^\circ\text{C}$  selama 2 jam. Setelah itu, bahan dihaluskan dengan menggunakan blender hingga melewati ayakan 80 mesh. Semua bahan yang telah halus disimpan dalam botol kering dan ditutup rapat untuk selanjutnya dilakukan analisis asam sianida.

#### *Uji total fenol*

Pengujian kadar total fenol dilakukan dengan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Tujuan dilakukannya analisis ini adalah untuk mengetahui jumlah komponen fenolik, terutama dalam bentuk asam galat yang terdapat pada kacang. Sebagai standar digunakan asam galat dan hasilnya dinyatakan dalam satuan *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Reagen Folin-Ciocalteu merupakan larutan ion kompleks yang terbentuk dari asam fosfotungstat dan asam. Reagen ini dapat bereaksi dengan fenol, sehingga campuran asam fosfotungstat-asam fosfomolibdat tersebut tereduksi menjadi kompleks berwarna biru dalam larutan basa.

### Analisis data

Analisis statistik untuk parameter asam sianida dan total fenol dilakukan dengan mengaplikasikan *software* SPSS 13.0 dengan menggunakan analisis variansi (ANOVA) pada  $\alpha=5\%$ , kemudian dilanjutkan dengan uji DMRT.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Asam sianida (HCN)

Glikosida sianogenik merupakan senyawa yang terdapat dalam bahan pangan nabati dan secara potensial dapat bersifat racun karena dapat terurai dan menghasilkan hidrogen sianida yang berbahaya bagi kesehatan manusia. Pengujian yang dilakukan ini merupakan pengujian untuk mengetahui kadar asam sianida dalam tempe koro babi. Pengujian kadar asam sianida dilakukan dengan menggunakan metode titrasi AOAC. Sebelum dianalisis,

tempe dari tiap perlakuan dikecilkan ukurannya kemudian dioven pada suhu 100°C selama 2 jam yang bertujuan untuk memaksimalkan hidrolisis HCN dalam bahan. Setelah itu, bahan dihaluskan dengan menggunakan blender hingga melewati ayakan 80 mesh. Semua bahan yang telah halus disimpan dalam botol kering dan ditutup rapat untuk selanjutnya dianalisis. Kadar asam sianida (HCN) pada tempe koro babi dengan variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada fermentasi selama 0 jam, tempe koro babi dengan perlakuan pencacahan dan perajangan menunjukkan hasil yang berbeda nyata, hal ini disebabkan karena variasi ukuran biji koro sebelum difermentasi. Pada tempe koro babi dengan perlakuan pencacahan selama 0 jam, kadar asam sianidanya lebih rendah dibandingkan tempe koro babi dengan perlakuan perajangan selama 0 jam. Pada fermentasi tempe koro babi selama 30 jam menunjukkan hasil yang berbeda nyata dengan waktu fermentasi 0 jam, dan pada perlakuan pencacahan dan perajangan menunjukkan perbedaan yang nyata. Sementara itu, pada fermentasi selama 36 jam, perlakuan pencacahan dan perajangan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada fermentasi selama 42 jam menunjukkan perbedaan yang nyata dengan waktu fermentasi sebelumnya, tetapi antara tempe dengan perlakuan perajangan dan pencacahan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada waktu fermentasi selanjutnya, yaitu 48 jam, hasil yang diperoleh menunjukkan tidak berbeda nyata dengan tempe fermentasi selama 42 jam. Begitu juga pada variasi pengecilan ukuran tidak memberikan pengaruh pada kadar HCN tempe koro babi.

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa variasi pengecilan ukuran dengan perajangan dan pencacahan menunjukkan perbedaan yang nyata pada kadar HCN tempe koro babi. Variasi lama fermentasi tempe koro babi selama 0 jam sampai dengan 36 jam berpengaruh terhadap kadar HCN tempe koro babi yang kadar HCN-nya terus mengalami penurunan. Fermentasi selama 42 jam ke atas juga memberikan pengaruh terhadap kadar HCN tempe koro babi, dimana kandungannya dapat mencapai 0 mg.

Apabila dilihat dari kadar HCN tempe koro babi pada fermentasi selama 0 jam, yaitu sebesar 0,072 mg/g sampel, maka diperkirakan biji mentahnya mempunyai kadar asam sianida yang lebih tinggi dari 0,072 mg/g. Kandungan HCN yang ada diduga telah banyak tereliminasi karena sifat HCN yang larut air, dan sebelumnya telah dilakukan perendaman selama 3 hari dengan penggantian air setiap harinya. Setelah proses fermentasi, kadar HCN mengalami penurunan hingga 0 mg/g. Pola penurunannya dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan kadar HCN pada tempe koro babi dengan perajangan lebih tinggi. Hal ini disebabkan oleh perbedaan luas permukaan sampel akibat perbedaan pengecilan ukuran antara perlakuan pencacahan dan perajangan. Ukuran biji pada tempe cacah lebih kecil, sehingga lebih banyak jumlah HCN yang tereleminasi, sedangkan pada tempe dengan perlakuan perajangan yang ukurannya lebih besar, lebih banyak

kandungan HCN yang terperangkap dalam sampel. Menurut Kanetro dan Hastuti (2006), langkah pertama untuk menghilangkan kandungan HCN yaitu dengan cara pengirisan dan perendaman. Langkah selanjutnya adalah dengan cara pemanasan atau perebusan.

Perlakuan perendaman dan pemanasan efektif dalam mengeliminasi HCN yang terikat pada senyawa glikosida dan pada prinsipnya adalah mengusahakan terjadinya hidrolisis untuk membebaskan HCN pada bahan. Cheeke and Shull (1985) menjelaskan bahwa koro babi dipengaruhi oleh sifat asam sianida yang mempunyai titik didih 26,5°C dan sangat larut dalam air, sehingga proses perebusan pada suhu di atas titik didih asam sianida, dapat menurunkan kadar asam sianida yang terkandung di dalam koro babi. Proses pengolahan seperti perendaman, pengirisan, dan penghancuran dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis sehingga membebaskan senyawa HCN. Selain mengeliminasi senyawa HCN, proses perebusan juga dapat menyebabkan biji koro menjadi lebih lunak sehingga lebih aman dan mudah untuk dikonsumsi.

Penurunan kadar HCN diduga dipengaruhi oleh adanya aktivitas bakteri. Diketahui bahwa titik didih HCN sekitar 26,5°C. Pada 24 jam fermentasi, suhu tempe meningkat hingga 40°C, lalu pada 36-48 jam suhunya berkisar antara 25-37°C (Kasmidjo 1990), hal ini diduga HCN rusak akibat suhu tempe lebih tinggi dari titik didihnya. Kemungkinan yang lain diduga peningkatan kadar air pada tempe selama fermentasi juga turut melarutkan HCN dalam tempe dan HCN ikut teruap pada saat pengerangan.

Menurut Winarno (2002), kapang menghasilkan enzim untuk memecah ikatan glukosidik. Enzim yang berperan dalam memecah ikatan glukosidik adalah enzim glukosidik (Mega dan Matsushima 1979). Menurut Medikasari dan Marniza (2007), pada fermentasi kecap koro bengkuk, penurunan kadar HCN yang terkandung di dalam kecap diduga terjadi akibat adanya senyawa HCN yang dipecah oleh kapang. HCN kemudian diuapkan oleh pemasakan moromi, sehingga kadarnya berkurang. Menurut Werdhastri (1993), *Rhizopus oryzae* dapat menurunkan kadar HCN (67,79%), demikian juga *Aspergillus oryzae* (37,20%). Diduga terjadi mekanisme yang sama pada fermentasi tempe koro babi.

Data kadar HCN yang didapat dari penelitian dibandingkan dengan *lethal dose* atau kadar HCN maksimal yang dapat diterima tubuh menunjukkan kandungan HCN dapat menyebabkan kematian pada dosis 0,5-3,5 mg HCN/kg berat badan (Winarno 2002). Berdasarkan hasil penelitian, diasumsikan bahwa apabila orang mengonsumsi 100 g tempe koro babi maka total HCN yang masuk ke tubuh sebesar 0,072 mg/g bahan (jumlah tertinggi dari hasil penelitian) dikalikan dengan 100 g bahan, yaitu sebesar 7,2 mg HCN. Jika rata-rata berat manusia diasumsikan 50 kg maka didapatkan hasil HCN yang masuk ke tubuh sebesar 7,2 mg/50 kg berat badan atau 0,144 mg/kg berat badan. Dibandingkan dengan dosis HCN yang dapat menyebabkan kematian tersebut maka dapat dikatakan bahwa tempe koro babi dengan kadar HCN tertinggi pun masih layak untuk dikonsumsi. Tubuh manusia umumnya tidak tahan terhadap HCN pada dosis 0,06 gram. Apabila mengonsumsi HCN pada dosis *lethal*

(mematikan) tersebut, biasanya manusia sudah dapat mengalami kematian. Namun, ada juga yang masih mampu bertahan hidup dan disembuhkan meskipun telah mengonsumsi HCN sebanyak tiga kali lipat dari dosis *lethal* tersebut.

**Total fenol**

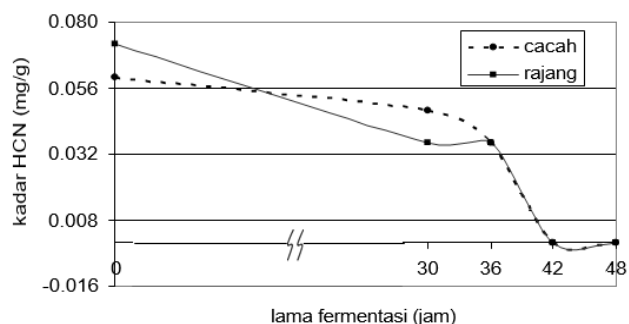
Komponen fenolik, atau disebut juga polifenol, merupakan produk metabolisme sekunder tanaman yang banyak terdapat pada tanaman. Substansi tersebut mempunyai berbagai macam struktur dan fungsi yang berbeda-beda. Secara umum, fenolik terdiri atas cincin aromatik yang mengikat satu atau lebih gugus hidroksil (Robards et al. 1999). Kadar total fenol pada tempe koro babi dengan variasi lama fermentasi dan pengecilan ukuran dapat dilihat pada Tabel 3.

Pada fermentasi selama 0 jam, kadar total fenol pada tempe dengan perlakuan pencacahan dan perajangan menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata, hal ini diduga disebabkan koro babi sama-sama belum terfermentasi. Begitu juga pada fermentasi selama 30 jam, kadar total fenol tempe dengan perlakuan pencacahan dan perajangan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Adapun pada fermentasi selama 36 jam, kadar total fenol tempe dengan perlakuan pencacahan dan perajangan menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada fermentasi selama 42 jam,

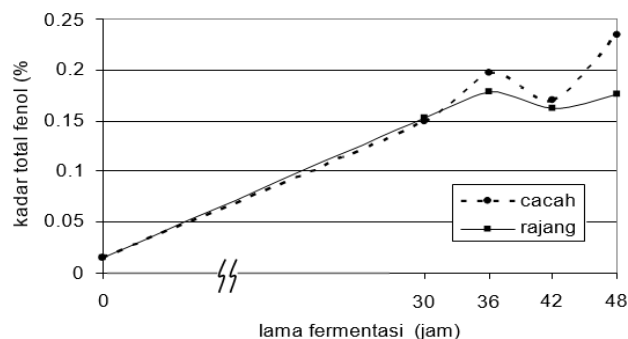
kadar total fenol berbeda nyata dengan waktu fermentasi sebelumnya, tetapi antara tempe dengan perlakuan perajangan dan pencacahan tidak menunjukkan perbedaan yang nyata. Pada waktu fermentasi selanjutnya, yaitu selama 48 jam, kadar total fenol berbeda nyata dengan tempe dengan fermentasi selama 42 jam. Begitu juga perlakuan variasi pengecilan ukuran juga memberikan pengaruh terhadap kadar total fenol tempe koro babi.

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa variasi pengecilan ukuran biji koro babi berpengaruh terhadap kadar total fenol tempe koro babi. Variasi lama fermentasi tempe koro babi, dari 0 jam sampai dengan 48 jam juga berpengaruh terhadap kadar total fenol tempe koro babi. Selanjutnya, kenaikan kadar total fenol tempe koro babi dapat dilihat pada Gambar 2.

Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan kadar total fenol pada tempe koro babi dengan perlakuan perajangan lebih tinggi dibandingkan tempe koro babi dengan perlakuan pencacahan. Dari Gambar 2 dapat dilihat bahwa kadar total fenol yang diperoleh mengalami kenaikan pada masing-masing perlakuan pengecilan ukuran dan lama fermentasi, dengan demikian pengecilan ukuran dan lama fermentasi dapat meningkatkan kadar total fenol pada tempe koro babi.



**Gambar 1.** Kadar HCN selama fermentasi tempe koro babi



**Gambar 2.** Kenaikan kadar total fenol tempe koro babi

**Tabel 2.** Kadar asam sianida (mg/g db) tempe koro babi dengan berbagai perlakuan

Lama fermentasi (jam)	Pengecilan ukuran	
	Dicacah	Dirajang
0	0,060 <sup>d</sup>	0,072 <sup>e</sup>
30	0,048 <sup>c</sup>	0,036 <sup>d</sup>
36	0,036 <sup>d</sup>	0,036 <sup>d</sup>
42	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
48	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Keterangan: \*Superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antarperlakuan (p<0,05)

**Tabel 3.** Kadar total fenol (mg/g db) tempe koro babi dengan berbagai perlakuan

Lama fermentasi (jam)	Pengecilan ukuran	
	Dicacah	Dirajang
0	0,014750 <sup>a</sup>	0,014750 <sup>a</sup>
30	0,149900 <sup>b</sup>	0,152650 <sup>b</sup>
36	0,201825 <sup>f</sup>	0,178300 <sup>e</sup>
42	0,170400 <sup>d</sup>	0,162750 <sup>d</sup>
48	0,234400 <sup>g</sup>	0,192620 <sup>f</sup>

Keterangan: \*Superscript yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antarperlakuan (p<0,05)

Pada kedua perlakuan pengecilan ukuran, dari fermentasi 0 jam hingga 36 jam, kadar total fenol terus mengalami peningkatan, namun pada fermentasi selama 42 jam kadar total fenol dengan perlakuan pencacahan dan perajangan mengalami penurunan. Lalu pada fermentasi selama 48 jam, kadar total fenol kembali mengalami kenaikan pada masing-masing variasi pengecilan ukuran.

Kemungkinan yang terjadi adalah pada 0-36 jam fermentasi terjadi pembentukan senyawa fenol oleh perombakan senyawa dalam tempe koro babi oleh mikrobia. Kadar total fenol paling tinggi diperoleh pada perlakuan fermentasi selama 36 jam, setelah itu terjadi penurunan kadar total fenol pada fermentasi selama 42 jam. Hal ini diduga disebabkan aktivitas mikrobia paling maksimal terjadi pada fermentasi selama 36 jam, setelah itu aktivitas mikrobia mengalami penurunan karena substrat telah habis dirombak, atau kondisi yang tidak lagi sesuai dengan syarat tumbuh mikrobia. Penyimpangan yang terjadi adalah pada fermentasi selama 48 jam, kadar total fenol kembali mengalami kenaikan. Hal ini diduga tempe telah mengalami *over fermented* akibat aktivitas lanjutan dari mikrobia yang menghasilkan bau dan terdeteksi sebagai fenol, sehingga kadar total fenol tempe koro babi kembali mengalami kenaikan setelah mengalami penurunan.

Koro babi mengandung senyawa antioksidan seperti asam fenolik, tanin, serta antosianin (Akroum 2009). Kemudian dalam tempe juga ditemukan suatu zat antioksidan dalam bentuk isoflavon. Seperti halnya vitamin C dan E serta karotenoid, isoflavon juga merupakan antioksidan yang sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk menghentikan reaksi pembentukan radikal bebas (Arthur 2009).

Menurut Arthur (2009), kedelai mengandung tiga jenis isoflavon, yaitu daidzein, glisitein, dan genistein. Disamping ketiga jenis isoflavon tersebut, tempe juga mengandung antioksidan faktor II (6,7,4-trihidroksi isoflavon) yang mempunyai sifat antioksidan paling kuat dibandingkan dengan isoflavon dalam kedelai. Antioksidan tersebut disintesis pada saat terjadinya proses fermentasi kedelai menjadi tempe oleh bakteri *Micrococcus luteus* dan *Coreyne bacterium*. Pada fermentasi tempe ditemukan adanya bakteri *Micrococcus* sp. Bakteri tersebut berbentuk kokus, termasuk gram positif, berpasangan tetrad atau kelompok kecil, bersifat aerob, tidak menghasilkan spora, serta dapat tumbuh baik pada media *nutrient agar* (NA) pada suhu 30°C dalam kondisi aerob. Bakteri tersebut menghasilkan senyawa isoflavon sebagai antioksidan.

## KESIMPULAN

Variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi berpengaruh terhadap kadar HCN tempe koro babi,

semakin kecil ukuran biji koro dan semakin lama waktu fermentasi maka kadar asam sianidanya semakin rendah. Pada fermentasi selama 0, 30, 36, 42, dan 48 jam, kadar asam sianida biji koro babi dengan perlakuan pencacahan berturut-turut sebesar 0,060 mg/g, 0,048 mg/g, 0,036 mg/g, 0 mg/g, dan 0 mg/g, sedangkan untuk biji koro babi dengan perlakuan perajangan adalah 0,072 mg/g, 0,036 mg/g, 0,036 mg/g, 0 mg/g, dan 0 mg/g. Kadar asam sianida terendah terdapat pada tempe koro babi dengan perlakuan perajangan maupun pencacahan pada tempe dengan lama fermentasi 42 dan 48 jam, yaitu mencapai 0 mg/g bahan. Variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi juga berpengaruh terhadap kadar total fenol tempe koro babi, semakin kecil ukuran biji koro dan semakin lama waktu fermentasi maka kadar total fenol semakin rendah. Pada fermentasi selama 0, 30, 36, 42, dan 48 jam, kadar total fenol biji koro babi dengan perlakuan pencacahan berturut-turut sebesar 0,014750%, 0,149900%, 0,201825%, 0,170400%, dan 0,234400%, sedangkan untuk biji koro babi dengan perajangan sebesar 0,014750%, 0,152650%, 0,178300%, 0,162750%, dan 0,192620%. Kadar total fenol terendah terdapat pada tempe koro babi dengan perlakuan cacah dengan lama fermentasi selama 48 jam.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akroum S. 2009. Antimicrobial, antioxidant, cytotoxic activities and phytochemical. *Eur J Sci Res* 31 (2): 289-295.
- Arthur S. 2009. Fermentasi tempe. [sutikno.staff.uns.ac.id](http://sutikno.staff.uns.ac.id). [15 Juli 2009].
- Cheeke PR, Shull LR. 1985. *Natural Toxicant in Feed and Poisonous Plants*. AVI Publishing Company, Inc. Westport, Connecticut.
- Handajani S. 2008. Peningkatan gizi masyarakat. Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi, Jakarta.
- Kanetro B, Hastuti S. 2006. Ragam produk olahan kacang-kacangan. Universitas Wangsa Manggala Press, Yogyakarta.
- Kasmidjo RB. 1990. Tempe: Mikrobiologi dan biokimia pengolahan serta pemanfaatannya. Pusat antar Universitas Pangan dan Gizi. UGM, Yogyakarta.
- Laela NR. 2008. Kajian Kadar Asam Fitat dan Kadar Protein Selama Pembuatan Tempe Koro Benguk (*Mucuna pruriens*) dengan Variasi Pengecilan Ukuran dan Lama Fermentasi. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Medikasari, Marniza. 2007. Studi mutu kecap benguk: Pengaruh jenis dan konsentrasi kapang pada fermentasi koji. Teknologi Hasil Pertanian, Universitas Lampung, Lampung.
- Mega T, Matsushima Y. 1979. Comparative studies of three exo-β-glycosidases of *Aspergillus oryzae*. *J Biochem* 85: 335-341.
- Pitojo S. 2003. Benih kedelai. Kanisius, Yogyakarta.
- Robards K, Prenzler P, Tucker D et al. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chem* 66: 401-436.
- Sovia L. 2006. Senyawa flavanoida, fenil propanoida dan alkaloida. Departemen Kimia, Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Werdhastri S. 1993. Penurunan kadar glukosida sianogenik biji koro benguk (*Mucuna pruriens* DC) oleh aktivitas fermentasi *Aspergillus oryzae*, *A. sojae*, *Rhizopus oligosporus*, dan *R. oryzae*. *Agric Sci* 5 (2): 593-602.
- Winarno FG. 2002. Kimia pangan dan gizi. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

# Pengaruh pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) terhadap derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi

## Effect of patikan kebo (*Euphorbia hirta*) extract with bronchial inflammation grade on Balb/C mice asthma allergic model

KUNTORO, SRI SUTATI, R. PRIHANDJOJO ANDRI PUTRANTO

Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 22 Januari 2010. Revisi disetujui: 24 Februari 2010.

**Abstract.** Kuntoro, Sutarti S, Putranto RPA. 2010. Effect of patikan kebo (*Euphorbia hirta*) extract with bronchial inflammation grade on Balb/C mice with asthma allergic model. *Biofarmasi* 8: 37-40. This research aimed to determine the effect of patikan kebo extract towards bronchial inflammation grade on Balb/C mice asthma allergic model. This research used a laboratory experiment with a post-test only control group design by using 24 Balb/C male mice, divided into four groups (control group, asthma allergic group, patikan kebo 10 mg/mice, patikan kebo 20 mg/mice). Samples were sensitized on day-0 and day-14 intraperitoneally, and continued in day-21, 23, 25 and 27 aerosol in 30 minutes. In day-28, the bronchus samples were collected, and the bronchial inflammation grade was observed with Hematoxylin-Eosin staining. The obtained data were analyzed statistically with Kruskal-Wallis continued with Mann-Whitney using the program of SPSS for Windows Release 12.0. The data were analyzed with a margin of significance  $p < 0.05$ . The grading the inflammation of control group was grade 2 (83.33%) and grade 3 (16.67%). Asthma allergic group was grade 3 (16.67%) and grade 4 (83.33%). Patikan kebo 10 mg/mice group was grade 2 (33.33%) and grade 3 (66.67%). Patikan kebo 20 mg/mice group was grade 2 (33.33%) and grade 3 (66.67%). There was a significant difference between asthma allergic group with patikan kebo 10 mg/mice and patikan kebo 20 mg/mice group in a grade inflammation ( $p=0.009$ ). There was no significant difference in a grade inflammation between patikan kebo 10 mg/mice group with patikan kebo 20 mg/mice ( $p=1,000$ ). Patikan kebo extract 10 mg/mice and 20 mg/mice reduced the bronchial inflammation grade in Balb/C mice asthma allergic model.

**Keywords:** Asthma allergic, bronchus, grade inflammation, patikan kebo

### PENDAHULUAN

Alergi adalah suatu kondisi hipersensitivitas yang diinduksi oleh pajanan terhadap antigen tertentu yang menimbulkan reaksi imunologi berbahaya pada pajanan berikutnya (Dorland 2002). Degranulasi mastosit merupakan komponen sentral pada penyakit alergi, sedangkan manifestasi klinis dan patologisnya bergantung pada letak dan kronisitasnya (Abbas dan Lichtman 2003).

Alergi pada saluran pernapasan diawali dengan masuknya alergen ke dalam tubuh. Alergen selanjutnya akan diolah oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) dan hasil olahan alergen akan dikomunikasikan kepada sel  $CD4^+$  Th2 (*T-helper 2*) (Heru dan Sukanto 2006). Sel  $CD4^+$  sangat berperan dalam menimbulkan inflamasi yang menjadi dasar dari penyakit asma (Blease et al. 2000). Selanjutnya, sel  $CD4^+$  Th2 akan memacu sel B untuk menghasilkan Ig E (Imunoglobulin E). Kemudian, Ig E yang terbentuk akan menempel pada sel mast dalam saluran pernapasan. Pada pemaparan ulang oleh alergen yang sama, alergen tersebut akan diikat oleh Ig E yang terdapat di saluran pernapasan (Abbas dan Litchman 2003). Ikatan tersebut akan memacu degranulasi dari sel mast yang menghasilkan mediator-mediator inflamasi seperti histamin, leukotrien, tromboksan, prostaglandin, dan *Eosinophil Chemotactic Factor of Anaphylaxis* (ECF-

A). Mediator-mediator inflamasi tersebut akan memacu infiltrasi sel-sel radang seperti eosinofil, limfosit, makrofag, neutrofil, dan basofil ke dalam jaringan bronkus (Abbas dan Litchman 2003). Infiltrasi sel-sel radang tersebut akan menyebabkan peradangan pada bronkus.

Patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) merupakan jenis tumbuhan yang banyak tumbuh di sekitar kita, tetapi pemanfaatannya masih sangat kurang. Patikan kebo mengandung banyak senyawa kimia yang dapat menunjukkan aktivitas antihistamin, antiinflamasi, antilipoksigenase, serta menghambat enzim siklo-oksigenase dan menghambat  $Ca^{2+}$  influx (Duke 2009). Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak patikan kebo diharapkan mampu memperkecil kerusakan jaringan (inflamasi) yang diakibatkan oleh pelepasan mediator lipid (leukotrien), prostaglandin, dan histamin pada peristiwa asma alergi. Dari permasalahan tersebut maka perlu untuk dilakukan penelitian mengenai pengaruh ekstrak patikan kebo terhadap derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta* L.) terhadap derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C model asma alergi.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret.

### Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kandang hewan ukuran 35x20x15 cm<sup>3</sup>, spuit injeksi 1 mL, sonde 1 mL, tabung ukur 10 mL dan 50 mL, *Beaker glass* 100 mL, mikroskop cahaya, timbangan listrik merek *Mettle Toledo*, dan Nebulizer.

Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak patikan kebo, akuabides, BR1, ovalbumin, saluran pernapasan hewan percobaan (bronkus), formalin *buffer* 10%, blok parafin 2 buah, dan pewarna HE.

### Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik, dengan *post-test only control group design*.

### Subjek penelitian

Subjek penelitian berupa 24 ekor mencit Balb/C jantan, dengan berat badan antara 20-30 gram, dan berumur 6-8 minggu. Mencit Balb/C diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Universitas Setyabudi, Surakarta. Bahan makanan untuk mencit berupa pakan mencit BR1.

### Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan metode *accidental sampling*. Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Federer, yaitu:

$$(k-1)(n-1) \geq 15$$

Keterangan:

k = jumlah kelompok

n = jumlah sampel tiap kelompok (Purawisastra 2001)

Dalam penelitian ini, subjek penelitian dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga berdasarkan rumus Federer didapatkan jumlah subjek masing-masing kelompok sebagai berikut:

$$(k-1)(n-1) \geq 15$$

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi, minimal tiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit Balb/C. Pada penelitian ini digunakan 6 ekor mencit untuk tiap kelompok perlakuan.

### Penentuan dosis perlakuan

#### *Dosis ekstrak patikan kebo*

Berdasarkan penelitian, dosis patikan kebo yang digunakan 500-1000 mg/kg BB/hari, atau 0,5-1 mg/gr BB/hari. Dengan demikian, dengan mengambil rata-rata berat badan mencit 20 g maka dosis patika kebo yang digunakan menjadi 10-20 mg/20 g/hari. Dosis per oral patikan kebo kelompok 3 yang digunakan sebesar 0,1 mL yang mengandung 10 mg ekstrak patikan kebo, sehingga untuk kelompok 4 digunakan 0,2 mL.

Pemberian ekstrak patikan kebo secara per oral pada mencit menggunakan dosis 10 mg/mencit/hari pada

kelompok 3 dan 20 mg/mencit/hari pada kelompok 4. Dosis yang disondekan pada mencit kelompok 3 adalah 0,1 mL dan pada kelompok 4 adalah 0,2 mL. Jumlah ekstrak patikan kebo yang diperlukan selama penelitian adalah:

$$(10 + 20) \text{ mg/mencit/hari} \times 6 \text{ mencit} \times 27 \text{ hari} = 4860 \text{ mg} \leftrightarrow 5000 \text{ mg}$$

Volume akuabides yang digunakan sebagai pelarut ekstrak patikan kebo adalah:

$$5000 \text{ mg}/10 \text{ mg} = V (\text{mL})/0,1 \text{ mL} = 5000 \text{ mg} \times 0,1 \text{ mL}$$

$$V = 50 \text{ mL}$$

#### *Dosis ovalbumin*

Pada penelitian ini, sensitisasi pada mencit dilakukan dengan melalui injeksi ovalbumin dengan dosis: (i) Pada hari ke-0 dan ke-14, sebanyak 0,15 cc OVA dalam Al(OH)<sub>3</sub>/mencit dari 2,5 mg OVA yang dilarutkan dalam 7,75 mL Al(OH)<sub>3</sub>. (ii) Pada hari ke-21, 23, 25, dan 27, ovalbumin aerosol 50 mg dilarutkan ke dalam 5 mL akuabides selama 30 menit.

### Cara kerja

#### *Sebelum perlakuan*

Kandang mencit disiapkan. Satu kandang berisi satu kelompok mencit. Mencit diadaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan selama 7 hari. Sebanyak 30 ekor mencit dikelompokkan secara acak menjadi 5 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit dengan rincian sebagai berikut: (i) Kelompok 1: sebagai kontrol negatif, mencit hanya diberi diet standar tanpa perlakuan. (ii) Kelompok 2: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin. (iii) Kelompok 3: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin + ekstrak patikan kebo 10 mg/mencit/hari secara per oral. (iv) Kelompok 4: mencit diberi diet standar + paparan ovalbumin + ekstrak patikan kebo 20 mg/mencit/hari secara per oral.

#### *Hewan percobaan model asma alergi*

Pada hari ke-0 dan ke-14, mencit disensitisasi melalui intraperitoneal dengan 0,15 cc dalam Al(OH)<sub>3</sub>/mencit dari 2,5 mg ovalbumin yang dilarutkan dalam 7,75 mL Al(OH)<sub>3</sub>. Selanjutnya, pada hari ke-21, ke-23, ke-25, dan ke-27, mencit dipaparkan dengan ovalbumin aerosol dari 50 mg ovalbumin yang dilarutkan dalam 5 mL akuabides dengan alat *nebulezer* dengan kecepatan 6 L/menit selama 30 menit.

#### *Setelah perlakuan*

Setelah 24 jam pada akhir pemaparan ovalbumin, semua mencit dikorbankan dengan menggunakan teknik *cervical dislocation*. Selanjutnya diambil bronkusnya dan dibuat preparat dengan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE). Pada tahap berikutnya dilihat gambaran histologist preparat dengan mikroskop cahaya untuk ditentukan tingkatan reaksi inflamasinya.

### Analisis data

Data hasil penelitian berupa *grade* histologis saluran pernapasan yang diperoleh pada hari ke-28. Data dikumpulkan secara serempak kemudian dianalisis

menggunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan Mann-Whitney menggunakan Program SPSS for Windows Release 12.0.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil penelitian

Setelah perlakuan, ditentukan infiltrasi sel-sel radang dengan teknik pewarnaan Hematoksilin-Eosin. Selanjutnya, preparat bronkus diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali dalam satu bidang pandang dan diamati infiltrasi sel-sel radang ke dalam jaringan bronkus (Gambar 1).

Dari data yang diperoleh selanjutnya diuji dengan uji statistik menggunakan software Program SPSS for Windows Release 12.0. Uji pertama yang dilakukan adalah uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Dari hasil perhitungan statistik dengan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok sampel dengan  $p=0,002$ .

Oleh karena terdapat perbedaan yang signifikan di antara keempat kelompok sampel maka uji statistik dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Dari hasil uji Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ), terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok 1 dengan kelompok 2, serta kelompok 2 dengan kelompok 3 dan 4. Adapun untuk kelompok 1 dengan kelompok 3 dan 4, serta kelompok 3 dengan kelompok 4 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Data selengkapnya disajikan dalam Tabel 1, Gambar 2.

### Pembahasan

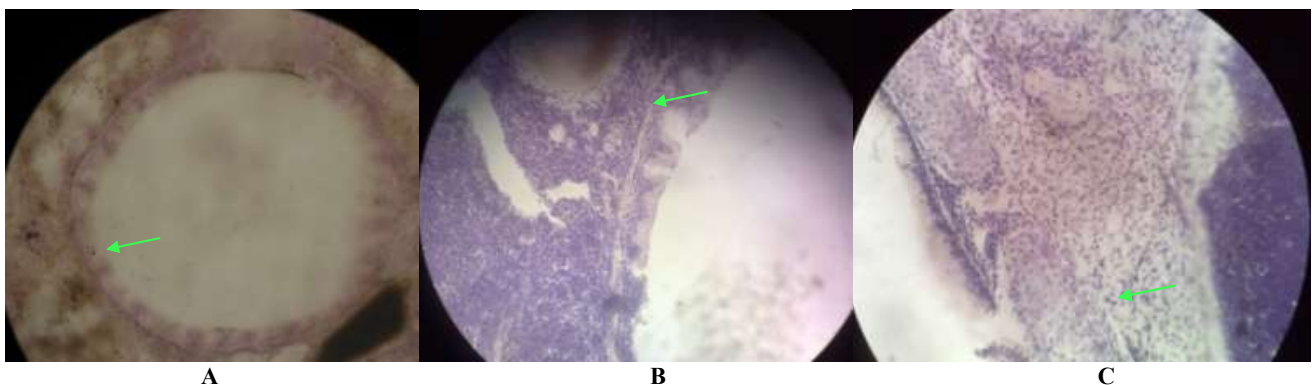
Ovalbumin yang berfungsi sebagai alergen akan diproses oleh APC dan selanjutnya akan memacu diferensiasi sel CD4 *naive* menjadi sel CD4<sup>+</sup> Th2. Sel CD4<sup>+</sup> Th2 tersebut melalui IL-4 dan IL-5 yang dihasilkan akan memacu sel B untuk memproduksi Ig E yang spesifik

terhadap ovalbumin. Ig E yang diproduksi akan berikatan dengan reseptor FcεRI pada permukaan sel mast dan basofil.

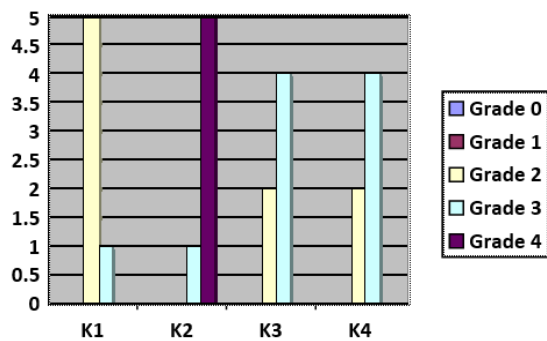
Terjadi paparan ulang oleh alergen yang sama (OVA), akibatnya terjadi *cross-linking* yang akan memicu respons sel mast, meliputi reaksi fase cepat dan reaksi fase lambat. Reaksi cepat tersebut diakibatkan oleh mediator primer, utamanya histamin, yang menyebabkan terjadinya vasodilatasi pembuluh darah bronkus dan konstriksi otot polos bronkus. Sementara itu, reaksi fase lambat yang terjadi beberapa jam kemudian diperantarai oleh mediator sekunder yang terdiri atas mediator lipid (leukotrien, prostaglandin, dan PAF) serta sitokin dan kemokin proinflamasi. Mediator-mediator proinflamasi tersebut akan menyebabkan infiltrasi sel-sel radang ke jaringan bronkus. Hasil penelitian memperlihatkan pemaparan OVA secara inhalasi mampu meningkatkan derajat inflamasi pada jaringan bronkus, hal ini terlihat dari hasil *scoring* infiltrasi sel radang pada kelompok OVA yang menunjukkan *grade* 3 sebanyak 1 sampel (16,67%) dan *grade* 4 sebanyak 5 sampel (83,33%), yang berbeda secara signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif dengan  $p=0,002$  (Tabel 1). Hal ini sesuai dengan penelitian Diding et al. (2007) dimana pemaparan OVA secara intraperitoneal dan dilanjutkan secara aerosol dapat menimbulkan reaksi alergi pada saluran pernapasan mencit yang ditunjukkan dengan derajat inflamasi bronkus.

**Tabel 1.** Hasil perhitungan uji Mann-Whitney ( $\alpha=0,05$ ) antar kelompok perlakuan

Kelompok	z	p Value	Makna
K <sub>1</sub> -K <sub>2</sub>	-3,028	0,002	Signifikan
K <sub>1</sub> -K <sub>3</sub>	-1,682	0,180	Tidak signifikan
K <sub>1</sub> -K <sub>4</sub>	-1,682	0,180	Tidak signifikan
K <sub>2</sub> -K <sub>3</sub>	-2,768	0,009	Signifikan
K <sub>2</sub> -K <sub>4</sub>	-2,768	0,009	Signifikan
K <sub>3</sub> -K <sub>4</sub>	0,000	1,000	Tidak signifikan



**Gambar 1.** A. Gambaran mikroskopis pengumpulan kandungan HCN selama fermentasi tempe koro babi. B. Gambaran mikroskopis derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C grade 3. Sel radang ditunjukkan dengan tanda panah hijau. C. Gambaran mikroskopis derajat inflamasi bronkus mencit Balb/C grade 4. Sel radang ditunjukkan dengan tanda panah hijau



**Gambar 2.** Grading inflamasi dari masing-masing kelompok perlakuan

Menurut Duke (2009), patikan kebo memiliki kandungan kimia yang sangat berguna bagi pengobatan asma alergi, seperti *ascorbic acid*, *caffeic acid*, flavonoid, dan *quercetin*. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari dan dosis 20 mg/mencit/hari dapat menurunkan derajat inflamasi bronkus secara signifikan ( $p=0,009$ ) dibandingkan kelompok asma alergi. Adapun antara kelompok patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari dengan kelompok patikan kebo dosis 20 mg/mencit/hari tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p=1,000$ ) dalam menurunkan derajat inflamasi bronkus. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak patikan kebo dosis 10 mg/mencit/hari memiliki kemampuan yang tidak jauh berbeda dengan ekstrak patikan kebo dosis 20 mg/mencit/hari dalam menurunkan derajat inflamasi bronkus. Penurunan derajat inflamasi diduga terjadi akibat adanya kandungan-kandungan senyawa kimia yang dimiliki oleh patikan kebo seperti *ascorbic acid* dan *caffeic acid* yang memiliki efek antagonis terhadap kalsium. Efek antagonis terhadap kalsium tersebut akan menghambat masuknya kalsium ke dalam sel mast, sehingga proses degranulasi sel mast menjadi terhambat. Dengan dihambatnya degranulasi sel mast maka pelepasan mediator-mediator inflamasi, seperti prostaglandin, leukotrien, dan histamin, juga akan dihambat. Selanjutnya dengan dihambatnya pelepasan mediator-mediator inflamasi tersebut akan menurunkan derajat inflamasi bronkus. Pemberian ekstrak patikan kebo yang mengandung *kaempferol* dan *quercetin* dengan aktivitas antihistamin akan menurunkan produksi histamin. Menurunnya produksi histamin akan menurunkan juga sekresi sejumlah sitokin yang berperan penting dalam

memediatori terjadinya reaksi alergi-inflamasi. Hal ini dikarenakan pelepasan histamin akan mengakibatkan respons imun alergi-inflamasi, termasuk meningkatkan produksi sitokin-sitokin IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 (Janeway et al. 2005). Menurut Kimata et al. (2000) dan Theoharides et al. (2001), *quercetin* juga dapat menghambat leukotrin, PGD<sub>2</sub>, dan GMCSF yang dilepaskan oleh sel mast. Dengan demikian, ekstrak patikan kebo dapat menurunkan derajat inflamasi bronkus pada asma alergi.

## KESIMPULAN

Pemberian ekstrak patikan kebo dengan dosis 10 mg/mencit/hari dan dosis 20 mg/mencit/hari dapat menurunkan secara signifikan derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi. Perbedaan dosis tidak menyebabkan perbedaan penurunan derajat inflamasi bronkus.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cellular and molecular immunology. Elsevier Science, USA.
- Blease K, Lukacs NW, Hogaboam CM et al. 2000. Chemokines and their role in airway hyper-reactivity. *Respir Res* 1(1): 54-61.
- Diding HP, Sasono, Hartati S. 2007. Aerosolized ovalbumin exposure facilities change in the airway histologic pattern in mouse. *Symposium Nasional Reuni Akbar. Fakultas Kedokteran, UNS, Surakarta, 18 Maret 2007.*
- Dorland WA. 2002. Kamus Kedokteran Dorland. Penerbit Buku Kedokteran ECG, Jakarta.
- Duke JA. 2009. List of chemicals of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. *Phytochemical and Ethnobotanic Database. www.natrindex.com.*
- Heru SS, Sukamto. 2006. Asma bronchial. In: Sudoyo AW et al. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid I, Edisi IV.* Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Janeway CA, Paul T, Mark W et al. 2005. *Immunobiology the immune system in health and disease, 6<sup>th</sup> edition.* Garland Science Publishing, New York.
- Kimata M, Shichijo M, Miura T et al. 2000. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy* 30: 501-508.
- Purawisastra S. 2001. Penelitian pengaruh isolat galaktomanan kelapa terhadap penurunan kadar kolesterol serum kelinci. *digilib.ekologi.litbang.depkes.go.id.*
- Theoharides TC, Alexandraki M, Kempuraj D et al. 2001. Anti-inflammatory actions of flavonoids and structural requirements for new design. *Int J Immunopathol Pharmacol* 14: 119-127.

## 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.

- Ekstraksi dan karakterisasi pektin pada cincau hijau (*Premna oblongifolia*) untuk pembuatan edible film** 1-10
- ARINDA KARINA RACHMAWATI, R. BASKORO KATRI ANANDITO, GODRAS JATI MANUHARA
- Efek pemberian ekstrak etanol pegagan (*Centella asiatica*) terhadap kinerja tikus galur Wistar pasca restraint stres** 11-16
- BAARID LUQMAN HAMIDI, SAMIGUN, ANIK LESTARI
- Pengaruh pemberian fraksi etanolik dan petroleum eter ekstrak umbi bawang dayak (*Eleutherine palmifolia*) terhadap ekspresi p53 mutan pada galur sel kanker payudara T47D** 17-26
- IVAN HENDRA SUDARMAWAN, DJOKO DLIDIR, AMBAR MUDIGDO, DYAH RATNA BUDIANI
- Efek mortalitas ekstrak biji jarak (*Ricinus communis*) terhadap larva *Aedes aegypti*** 27-30
- TRI NUGROHO WIBOWO, DARUKUTNI, SUTARTINAH SRI HANDAYANI
- Pengaruh variasi pengecilan ukuran dan lama fermentasi terhadap kadar asam sianida dan senyawa fenolik pada tempe koro babi (*Vicia faba*)** 31-36
- CHRISTIANA SEPTI INDRIYANI, SRI HANDAYANI, DIAN RACHMAWATI
- Pengaruh pemberian ekstrak patikan kebo (*Euphorbia hirta*) terhadap derajat inflamasi bronkus pada mencit Balb/C model asma alergi** 37-40
- KUNTORO, SRI SUTATI, R. PRIHANDJOJO ANDRI PUTRANTO

