

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 8
NOMOR 2
AGUSTUS 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.

Efek perlindungan ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap kerusakan histologis lambung mencit yang diinduksi aspirin

The effect of meniran (*Phyllanthus niruri*) extract protection on mice gastric histology damage induced by aspirin

PEDIANA RACHMAWATI, ENDANG LISTYANINGSIH SUPARYANTI, ISDARYANTO

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

Manuskrip diterima: 5 April 2010. Revisi disetujui: 27 Juni 2010.

Abstract. Rachmawati P, Suparyanti EL, Isdaryanto. 2010. The effect of meniran (*Phyllanthus niruri*) extract protection on mice gastric histology damage induced by aspirin. *Biofarmasi* 8: 41-46. This experiment aimed to determine the effect of meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) extract protection on mice (*Mus musculus*) gastric histology damage induced by aspirin. This study belongs to an experimental laboratory research with post-test only controlled group design. The tested animals used were 25 Swiss Webster male mice in 6-8 weeks age and ± 20 g body weight, divided into 5 groups: (i) control group (K) that given with 0.2 mL CMC, Na 0.5% and 0.1 mL aquadest, (ii) treatment group I (PI) that given with 0.2 mL aquadest and 0.1 mL aspirin with a dosage of 1.7 mg/20 g BW mice per oral, (iii) treatment group II (PII) that given with 0.2 mL meniran extract with a dosage of 1.3 mg/20 g BW per oral and 0.1 mL aspirin with a dosage of 1.7 mg/20 g BW mice per oral, (iv) treatment group III (PIII) that given with 0.2 mL meniran extract with a dosage of 2.6 mg/20 g BW per oral and 0.1 mL aspirin with a dosage of 1.7 mg/20 g BW mice per oral, and (v) a positive control group (PIV) that given with 0.2 Cimetidine with a dosage of 2.6 mg/20 g BW per oral and 0.1 mL aspirin with a dosage of 1.7 mg/20 g BW mice per oral. The gastric histological description could be seen with a bright light microscope with 100x magnification followed by 400x magnification. Then, the gastric histological description was divided into normal, light damage, and heavy damage. The data obtained were analyzed by using Kruskal Wallis and Mann Whitney statistical tests at $\alpha = 0.05$. The results of Kruskal Wallis statistical test showed that there was at least one population with a value that higher than other population. The result of Mann Whitney statistical test showed that there was a significant difference between groups K-PI, PI-PII, PII-PIII, and PII-PIV, and no significant difference between K-PII, K-PIII, K-PIV, PII-PIII, PII-PIV, and PIII-PIV. The conclusion of the research was the meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) extract can give a protection on mice (*Mus musculus*) gastric histological damage induced by aspirin.

Keywords: Aspirin, gastric histological damage, meniran, *Phyllanthus niruri*

PENDAHULUAN

Obat antiinflamasi nonsterooid (OAINS) merupakan kelompok obat yang paling banyak dikonsumsi di seluruh dunia untuk mendapatkan efek analgetik, antipiretik, dan antiinflamasi. Obat ini merupakan salah satu kelompok obat yang banyak diresepkan dan juga digunakan tanpa resep dokter. Salah satu OAINS yang sering digunakan dan merupakan prototipe awal adalah aspirin (Wilmana dan Gan 2007). OAINS, termasuk aspirin, menyebabkan perubahan kualitatif mukus lambung yang dapat mempermudah terjadinya degradasi mukus oleh pepsin. Selain itu, aspirin bersifat merusak mukosa lambung dengan merusak permeabilitas sawar epitel sehingga memungkinkan difusi balik asam klorida (HCl) yang mengakibatkan kerusakan jaringan, terutama pembuluh darah (Price dan Wilson 2006).

Aspirin mempunyai beberapa efek samping, terutama pada sistem gastrointestinal, berupa dispepsia, nyeri epigastrik, mual, muntah, dan perdarahan pada lambung. Hal ini dapat dijelaskan bahwa aspirin menghambat *cyclooxygenase-1* (COX-1) lebih besar daripada *cyclooxygenase-2* (COX-2). COX-1 mensintesis prostaglandin,

sehingga terhambatnya COX-1 diikuti juga dengan terhambatnya prostaglandin, yang merupakan salah satu aspek pertahanan mukosa lambung disamping mukus, bikarbonat, resistensi mukosa, dan aliran darah mukosa. Dengan terhambatnya pembentukan prostaglandin maka akan terjadi gangguan barier mukosa lambung, berkurangnya sekresi mukus dan bikarbonat, berkurangnya aliran darah mukosa, serta terhambatnya proses regenerasi epitel mukosa lambung, sehingga akan mudah terserang tukak lambung (Soelistiono 2002).

Banyak penelitian telah dilakukan untuk tetap mengoptimalkan fungsi aspirin dan mencegah efek sampingnya, khususnya perdarahan mukosa lambung. Sebagian besar penelitian tersebut banyak dilakukan dengan memanfaatkan potensi alam seiring berkembangnya iklim gerakan kembali ke alam (*back to nature*) yang dalam pelaksanaannya membiasakan hidup dengan menghindari bahan-bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan bahan-bahan alami. Semua hal yang bersifat alami semakin digemari dan dicari oleh sebagian besar masyarakat. Salah satunya adalah penggunaan tumbuhan untuk pengobatan (Kardinan dan Kusuma 2004).

Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) merupakan salah satu jenis tumbuhan liar yang berkhasiat obat. Ekstrak meniran secara klinis telah terbukti bersifat immunostimulan atau mampu meningkatkan daya tahan tubuh (Hirschmann dan Yesilida 2007).

Meniran kaya akan berbagai senyawa fitokimia seperti flavonoid yang terdiri dari *astragalin*, *quercetin*, *quercetol*, dan *quercitrin* (Shokunbi dan Odetola 2008). *Quercetin* bekerja dengan menghambat enzim histidin dekarboksilase, sehingga sintesis histamin terhambat. Histamin yang dihasilkan akan memacu sekresi cairan lambung, khususnya HCl. Asam lambung yang berlebih menyebabkan rusaknya sel mukosa lambung (Wilmana dan Gan 2007). Disamping itu, meniran juga mengandung tanin dan kalium (Kardinan dan Kusuma 2004).

Meniran telah dilaporkan bersifat gastroprotektif dan hepatoprotektif (Raphael dan Kuttan 2003). Beberapa hasil studi sebelumnya menunjukkan bahwa kandungan senyawa dalam meniran bersifat antioksidan dan antidiabetik (Kumaran dan Karunakaran 2007). Adanya efek merusak dari aspirin terhadap mukosa lambung dan adanya kandungan gastroprotektif dari meniran, menjadi pijakan untuk mengetahui manfaat lebih lanjut tentang meniran, serta khasiat meniran dalam melindungi kerusakan lambung akibat aspirin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) dalam memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi dengan aspirin.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

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

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang hewan percobaan, timbangan, sonde lambung, alat bedah hewan percobaan (*scalpel*, pinset, gunting, jarum, meja lilin), peralatan untuk pembuatan preparat histologi, mikroskop cahaya, dan gelas ukur. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi hewan percobaan berupa mencit (*Mus musculus*), makanan hewan percobaan (pelet dan air PAM), ekstrak meniran, suspensi aspirin, suspensi Cimetidin, dan akuades.

Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dan merupakan tahap awal sebelum diterapkan pada manusia (*trial clinic*). Perlakuan diberikan terhadap sampel berupa hewan percobaan di laboratorium kemudian hewan uji diobservasi dan dilakukan pengambilan data (Taufiqurrohman 2003). Pada penelitian ini digunakan metode *The post-test only controlled group design*.

Subjek penelitian

Subjek yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Swiss Webster sebanyak 25 ekor berumur 6-8 minggu dengan berat badan ± 20 g, yang didapatkan dari Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Teknik sampling

Teknik yang dipakai untuk pengambilan sampel adalah *incidental sampling*. Kriteria yang dijadikan pemilihan antara lain variasi genetik galur Swiss Webster, jenis kelamin (jantan), umur 6-8 minggu, berat badan (± 20 g), dan jenis makanan (disamakan). Populasi mencit yang telah memenuhi kriteria tersebut kemudian diambil sebanyak 25 ekor, kemudian dikelompokkan secara randomisasi ke dalam 5 kelompok perlakuan, sehingga masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit. Penetapan besar sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

$$(n-1) \times (t-1) > 15$$

Keterangan:

n = besar sampel setiap kelompok

t = banyaknya kelompok

$$(n-1) \times (5-1) > 15$$

$$(n-1) \times 4 > 15$$

$$(n-1) > 3,75$$

$$n > 4,75$$

Dengan demikian, setiap kelompok minimal harus terdiri dari 4,75 sampel hewan uji. Pada penelitian ini digunakan 5 ekor mencit pada tiap kelompok.

Rancangan penelitian

Sebanyak 25 ekor hewan uji dibagi ke dalam 5 kelompok perlakuan sebagai berikut: (i) K: Kelompok kontrol yang diberi 0,2 mL CMC-Na 0,5% dan 0,1 mL akuades. (ii) P1: Kelompok perlakuan pertama, diberikan 0,2 mL akuades dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral. (iii) P2: Kelompok perlakuan kedua, diberikan 0,2 mL ekstrak meniran 1,3 mg/20 g BB mencit secara per oral dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral. (iv) P3: Kelompok perlakuan ketiga, diberikan 0,2 mL ekstrak meniran 2,6 mg/20 g BB secara per oral dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral. (v) P4: Kelompok perlakuan keempat, diberikan 0,2 mL Cimetidin dosis 0,26 mg/20 g BB dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral.

Cara kerja

Membuat ekstrak meniran dan suspensi ekstrak

Meniran segar ditimbang, kemudian dicuci, ditiriskan, dan dikeringkan dengan oven 45°C selama 48 jam. Sampel yang sudah dikeringkan selanjutnya dibuat serbuk dan diayak pada saringan dengan diameter lubang ayakan 1 mm. Serbuk herba meniran ditambah dengan etanol 70%, kemudian diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam. Setelah didiamkan selama 24 jam, sampel disaring sebanyak 3 kali sehingga didapatkan ampas dan filtrat.

Filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* dan pemanas *waterbath* beruhu 70°C sehingga diperoleh ekstrak kental meniran. Ekstrak kental tersebut dituang ke dalam cawan porselin, kemudian dipanaskan dengan pemanas *waterbath* sambil terus diaduk sehingga didapatkan ekstrak meniran. Dari 100 g berat serbuk herba meniran diperoleh ekstrak meniran sebesar 15 g. Untuk membuat larutan ekstrak meniran digunakan larutan CMC-Na 0,5% yang dilarutkan dengan akuades sambil dipanaskan dan terus diaduk sampai volume 100 mL. Pembuatan ekstrak dilakukan di LPPT Unit I Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Sebelum dilakukan penelitian, terlebih dahulu ditentukan dosis yang akan digunakan untuk penelitian. Dosis ekstrak meniran pada manusia adalah 500 mg/kg BB dan 1000 mg/kg BB (Shokunbi dan Odetola 2008). Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026 (Ngatidjan 1990).

Perhitungan dosis meniran yang digunakan adalah sebagai berikut:

Konversi dosis meniran 500 mg/kg BB

$$= 500 \times 0,0026$$

$$= 1,3 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Konversi dosis meniran 1000 mg/kg BB

$$= 1000 \times 0,0026$$

$$= 2,6 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Ekstrak meniran dengan dosis 1,3 mg/20 g BB mencit (0,2 mL) diberikan pada kelompok perlakuan kedua, sedangkan dosis 2,6 mg/20 g BB mencit (0,2 mL) diberikan pada kelompok perlakuan ketiga selama 17 hari. Pada hari 15-17, hewan uji diberikan ekstrak meniran 1 jam sebelum pemberian aspirin (Shokunbi dan Odetola 2008).

Dosis dan pengenceran aspirin

Dosis toksik aspirin pada manusia adalah 600 mg/kg BB tikus (Sangelorang 1998). Dosis toksik aspirin untuk tikus berdasarkan tabel konversi manusia dengan berat badan 200 g dan dengan faktor konversi 0,14 (Ngatidjan 1990) yaitu:

$$= 600 \times 0,14$$

$$= 84 \text{ mg/kg BB mencit}$$

$$= 1,68 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

$$\approx 1,7 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Suspensi aspirin dibuat dengan cara melarutkan aspirin ke dalam akuades. Untuk pemberian 0,1 mL larutan aspirin, aspirin tablet 500 mg dilarutkan ke dalam akuades sebanyak $= 500/z = 1,7/0,1$. Nilai z diperoleh hasil sebesar 29,4 mL \approx 29 mL (pelarut). Aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit (0,1 mL) diberikan secara per oral pada kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan 4 pada hari ke-(15-17) satu kali sehari.

Dosis dan pengenceran Cimetidin

Dosis pemeliharaan untuk ulkus lambung adalah 10-200 mg/hari (Massarrat et al. 1981). Dosis Cimetidin setiap kali pemberian adalah 100 mg/kg BB manusia (Shokunbi dan Odetola 2008). Nilai konversi manusia (70 kg) ke mencit (20 g) adalah 0,0026 (Ngatidjan 1990) dengan perhitungan sebagai berikut:

$$= 100 \times 0,0026$$

$$= 0,26 \text{ mg/20 g BB mencit}$$

Tablet Cimetidin 200 mg memerlukan pelarut (akuades) sebanyak: $200/z = 0,26/0,2$ sehingga nilai z diperoleh hasil 153,8 mL \approx 154 mL (pelarut).

Pemberian Cimetidin dengan dosis 0,26 mg/20 g BB pada hari ke-(1-14) dilakukan satu kali sehari (0,2 mL). Pada hari ke-(15-17) dilakukan satu kali sehari (0,2 mL) sebelum pemberian aspirin (0,1 mL). Pemberian Cimetidin hanya berfungsi sebagai pembanding.

Pengelompokan subjek

Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Selanjutnya, hewan uji diberi perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan sebagai berikut: (i) K = Kelompok kontrol yang diberi 0,2 mL CMC-Na 0,5% dan 0,1 mL akuades, (ii) P1 = kelompok perlakuan pertama, diberikan 0,2 mL akuades dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral, (iii) P2 = kelompok perlakuan kedua, diberikan 0,2 mL ekstrak meniran 1,3 mg/20 g BB mencit secara peroral dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral, (iv) P3 = kelompok perlakuan ketiga, diberikan 0,2 mL ekstrak meniran 2,6 mg/20 g BB secara per oral dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral, serta (v) P4 = kelompok perlakuan empat, diberikan 0,2 mL Cimetidin dosis 0,26 mg/20 g BB dan 0,1 mL aspirin dosis 1,7 mg/20 g BB mencit secara per oral.

Pengukuran hasil

Setelah diberi perlakuan selama 17 hari, semua hewan percobaan dikorbankan dengan cara dislokasi leher, kemudian organ lambung bagian *curvatura minor* diambil untuk selanjutnya dibuat preparat lambung dengan metode blok parafin dengan pengecatan Hematoksin-Eosin (HE). Tahap tersebut dilakukan pada hari ke-18 agar efek perlakuan masih tampak (Cahyawati 2006). Pengambilan preparat dilakukan pada bagian *curvatura minor* karena daerah tersebut merupakan daerah dengan vaskularisasi minimal sehingga mudah dirusak oleh zat-zat yang bersifat erosif terhadap lambung (Sangelorang 1998). Pengambilan preparat pada *curvatura minor* juga dilakukan untuk penyeragaman sampel. Dari tiap-tiap lambung mencit dibuat 3 irisan dengan tebal tiap irisan $\pm 4 \mu\text{m}$. Pengamatan preparat dilakukan dengan perbesaran 100x dilanjutkan dengan perbesaran 400x. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya kelainan pada lambung. Gambaran pada lambung diklasifikasikan menjadi normal, kerusakan ringan, dan kerusakan berat. Dari tiap lambung diperoleh 3 gambaran histologis, sehingga dalam satu kelompok diperoleh 15 gambaran histologis lambung. Kemudian data yang diperoleh diuji dengan uji statistik.

Analisis data

Untuk mengetahui perbedaan yang signifikan di antara semua kelompok perlakuan, data yang diperoleh diuji dengan menggunakan uji statistik Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$), kemudian untuk mengetahui perbedaan di antara dua kelompok perlakuan digunakan uji statistik Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) (Murthi 1994). Analisis data dilakukan dengan

menggunakan program komputer SPSS 15.0 Windows.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Pada penelitian ini didapatkan data hasil pengamatan dari masing-masing kelompok. Berdasarkan hasil pengamatan didapatkan gambaran mikroskopis lambung dalam kondisi normal, mengalami kerusakan ringan, dan mengalami kerusakan berat. Pada tiap mencit dibuat 3 irisan jaringan lambung (3 preparat). Tiap preparat kemudian diamati, apabila diperoleh gambaran normal maka diberi skor 0, apabila terjadi kerusakan ringan maka diberi skor 1, dan apabila terjadi kerusakan berat maka diberi skor 2, sehingga dari tiap kelompok terdapat 15 gambaran mikroskopis lambung. Data hasil pengamatan untuk masing-masing kelompok, yaitu kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, kelompok perlakuan 3, dan kelompok perlakuan 4 disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengamatan mikroskop pada kelompok kontrol (K) didapatkan satu sampel dengan gambaran histologis normal, 14 sampel mengalami kerusakan ringan, dan tidak ada sampel yang mengalami kerusakan berat. Pada kelompok perlakuan 1 (P1) didapatkan 3 sampel mengalami kerusakan ringan, 12 sampel mengalami kerusakan berat, dan tidak diperoleh gambaran histologis normal. Pada kelompok perlakuan 2 (P2) didapatkan 15 sampel mengalami kerusakan ringan tanpa ada gambaran histologis normal dan kerusakan berat. Pada kelompok perlakuan 3 (P3) didapatkan 15 sampel mengalami kerusakan ringan tanpa ada gambaran histologis normal dan kerusakan berat. Pada kelompok perlakuan 4 (P4) didapatkan 15 sampel mengalami kerusakan ringan tanpa ada gambaran histologis normal dan kerusakan berat.

Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan secara mikroskopis selanjutnya dilakukan uji statistik menggunakan program komputer SPSS 15.0 Windows. Terdapat 2 uji statistik yang digunakan yaitu uji statistik Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.

Uji statistik Kruskal-Wallis dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Hasil yang diharapkan dalam uji ini adalah perbedaan yang signifikan atau terdapat perbedaan gambaran histologis lambung mencit yang hanya diberi akuades dan CMC-Na 0,5% (kelompok kontrol) dengan perlakuan aspirin saja (kelompok P1), perlakuan aspirin dan ekstrak meniran dosis 1 (kelompok P2), perlakuan aspirin dan ekstrak meniran dosis 2 (kelompok P3), atau dengan perlakuan aspirin dan Cimetidin (kelompok P4).

Sementara itu, uji statistik Mann-Whitney bertujuan untuk mengetahui letak adanya perbedaan dalam populasi. Uji ini dilakukan antara kelompok kontrol dengan kelompok P1, kelompok kontrol dengan kelompok P2, kelompok kontrol dengan kelompok P3, kelompok kontrol dengan kelompok P4, kelompok P1 dengan kelompok P2, kelompok P1 dengan kelompok P3, kelompok P1 dengan

kelompok P4, kelompok P2 dengan kelompok P3, kelompok P2 dengan kelompok P4, dan kelompok P3 dengan kelompok P4. Hasil yang diharapkan pada uji ini adalah dapat diketahui kelompok-kelompok yang menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik dengan Kruskal-Wallis diperoleh nilai $p=0,000$ dan nilai hitung H sebesar 53,430. Nilai ini lebih besar daripada harga χ^2_t pada tabel ($\alpha=0,05$ dan $df=4$) yaitu 9,488. Oleh karena nilai H hitung $> \chi^2_t$ atau nilai $p<0,05$ maka hipotesis nihil ditolak dan hipotesis kerja diterima. Jadi, terdapat perbedaan yang signifikan di antara lima kelompok perlakuan.

Pada lima kelompok sampel terdapat perbedaan yang signifikan, sehingga uji statistik dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Berdasarkan hasil uji Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol dan P1, kelompok P1 dan P2, kelompok P1 dan P3, serta kelompok P1 dan P4. Adapun antara kelompok kontrol dan P2, kelompok kontrol dan P3, kelompok kontrol dan P4, kelompok P2 dan P3, kelompok P2 dan P4, serta kelompok P3 dan P4 terdapat perbedaan yang tidak signifikan. Data hasil perhitungan berdasarkan uji Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) dapat dilihat pada Tabel 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa antara kelompok kontrol dan P1 didapatkan U hitung $< U$ tabel atau nilai $p<0,05$, sehingga hipotesis nihil ditolak dan hipotesis kerja diterima. Jadi, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan P1. Hasil yang sama juga terlihat antara kelompok P1 dan P2, kelompok P1 dan P3, serta kelompok P1 dan P4, yang berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok P1 dan P2, antara kelompok P1 dan P3, serta antara kelompok P1 dan P4.

Tabel 1. Hasil pengamatan kerusakan histologis lambung mencit pada tiap-tiap kelompok perlakuan

Kelompok	Normal	Kerusakan Ringan	Kerusakan Berat	Jumlah
K (Kontrol)	1	14	0	15
P1	0	3	12	15
P2	0	15	0	15
P3	0	15	0	15
P4	0	15	0	15

Keterangan: Pengelompokan subjek K, P1, P2, P3, P4 dapat diperiksa pada metode

Tabel 2. Hasil perhitungan dengan uji Mann-Whitney ($\alpha=0,005$) pada lima kelompok sampel

Kelompok	U-hitung	U-tabel	Nilai p	Keterangan
K-P1	21,0	64	0,000	Perbedaan signifikan
K-P2	105,0	64	0,317	Perbedaan tidak signifikan
K-P3	105,0	64	0,317	Perbedaan tidak signifikan
K-P4	105,0	64	0,317	Perbedaan tidak signifikan
P1-P2	22,5	64	0,000	Perbedaan signifikan
P1-P3	22,5	64	0,000	Perbedaan signifikan
P1-P4	22,5	64	0,000	Perbedaan signifikan
P2-P3	112,5	64	1,000	Perbedaan tidak signifikan
P2-P4	112,5	64	1,000	Perbedaan tidak signifikan
P3-P4	112,5	64	1,000	Perbedaan tidak signifikan

Keterangan: Pengelompokan subjek K, P1, P2, P3, P4 dapat diperiksa pada metode

Tabel 2 memperlihatkan bahwa antara kelompok kontrol dan P2 didapat U hitung $> U$ tabel atau nilai $p > 0,05$, sehingga hipotesis nihil diterima dan hipotesis kerja ditolak. Jadi, terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dan P2. Hasil yang sama juga terlihat antara kelompok kontrol dan P3, kelompok kontrol dan P4, kelompok P2 dan P3, serta kelompok P3 dan P4.

Pembahasan

Berdasarkan data-data yang diperoleh dari hasil penelitian, setelah dianalisis dengan uji statistik menunjukkan adanya pengaruh dari ekstrak meniran terhadap gambaran histologis lambung mencit yang diinduksi oleh aspirin. Hal itu dapat diketahui dari hasil uji statistik Kruskal-Wallis dan Mann-Whitney.

Pada hasil uji statistik Kruskal-Wallis diperoleh hasil perbedaan yang signifikan, atau dengan kata lain terdapat perbedaan gambaran histologis lambung mencit pada seluruh kelompok perlakuan tanpa diketahui kelompok yang berbeda secara signifikan. Setelah dilanjutkan dengan uji statistik Mann-Whitney didapatkan hasil perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol dan P1, antara kelompok P1 dan P2, antara kelompok P1 dan P3, serta antara kelompok P1 dan P4.

Hasil yang diperoleh pada penelitian ini dapat dijelaskan bahwa pada kelompok perlakuan P1 diberi aspirin sebagai faktor agresif lambung, tanpa diberi faktor defensif lambung yang mengakibatkan kerusakan lambung. Menurut Simadibrata (2005), aspirin dapat menyebabkan kerusakan sawar (barier) mukosa lambung. Terdapat dua mekanisme patogenik utama kerusakan akibat aspirin yang merupakan OAINS. Pertama adalah efek topikal yang menyangkut perubahan permeabilitas mukosa lambung dan kedua adalah efek sistemik yang menghambat COX-1. Hambatan pada COX-1 dapat menyebabkan penurunan sintesis prostaglandin (Simadibrata 2005).

Penurunan sintesis prostaglandin menyebabkan penurunan sekresi mukus dan bikarbonat epitel, aliran darah mukosa, dan proliferasi epitel (Wolfe et al. 1999). Selain mempunyai sifat menghambat prostaglandin, aspirin juga dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan superoksida, serta dapat berinteraksi dengan adenilil siklase untuk mengubah konsentrasi cAMP seluler (Katzung 1998). Pemakaian OAINS juga dapat menimbulkan kerusakan mikrovaskuler yang menyebabkan penurunan aliran darah. Selain itu, OAINS juga meningkatkan ekspresi adhesi molekul dan perlekatan neutrofil pada epitel pembuluh darah dalam mikrosirkulasi lambung. Hambatan aliran darah yang terjadi dalam pembuluh darah tersebut menimbulkan iskemik mikrovaskuler dan pembentukan radikal bebas (Kusumobroto 2003). Kadar puncak aspirin dalam darah dicapai dalam waktu antara 1-2 jam, sedangkan waktu paruhnya antara 6-7 jam. Regenerasi epitel mukosa lambung berlangsung kurang lebih 3-4 hari. Hal tersebut menjadi alasan dalam penelitian ini hewan uji diberi perlakuan aspirin selama 3 hari. Selain alasan tersebut, pemberian aspirin selama 3 hari juga dilakukan atas dasar penelitian sebelumnya, jadi penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian sebelumnya.

Gambaran histologis lambung digolongkan menjadi tiga yaitu kondisi normal, mengalami kerusakan ringan, dan kerusakan berat. Gambaran mikroskopis lambung dikatakan normal jika tidak terlihat adanya tanda-tanda gastritis ataupun ulkus. Pada kerusakan ringan, gambaran mikroskopis lambung mempunyai tanda-tanda gastritis ringan, antara lain adanya hiperemia, edema disertai sekukan sel-sel radang pada lamina propria, dan eksfoliasis. Pada kerusakan berat, gambaran mikroskopis lambung selain terdapat tanda-tanda gastritis juga terdapat tanda-tanda ulkus, yaitu terjadi pelepasan sebagian mukosa yang melibatkan jaringan di bawah epitel, seluruh mukosa, dan bahkan sampai pada tunika muskularis dengan atau tanpa terlihat tanda-tanda perdarahan.

Pada kelompok kontrol, dimana hanya diberi perlakuan akuades dan CMC-Na 0,5%, didapatkan gambaran histologis dimana sebagian besar sampel mengalami kerusakan ringan, yaitu sebanyak 14 sampel dengan kerusakan ringan dan 1 sampel normal. Hal ini diduga akibat adanya variabel luar yang tidak dapat dikendalikan, seperti kondisi psikologis mencit maupun kondisi awal lambung mencit. Diduga selama digunakan dalam penelitian, hewan uji mengalami stres berat akibat masa perlakuan yang dilakukan selama 17 hari dan oleh sebab lain yang tidak diketahui, sehingga asam lambung mencit menjadi meningkat secara berlebihan. Sebab lainnya diduga akibat kondisi awal lambung mencit yang sudah mengalami kerusakan, baik gastritis maupun ulkus.

Pada uji statistik antara kelompok P1 dengan P2 dan antara kelompok P1 dengan P3, terdapat perbedaan yang signifikan. Pada kelompok P2 dan P3 selain diberi aspirin yang merupakan faktor agresif lambung, juga diberi ekstrak meniran yang merupakan faktor defensif lambung. Dalam hal ini, ekstrak meniran mempunyai tiga mekanisme. Pertama, sebagai antioksidan dan antihistamin dari kandungan flavonoid (kuersetin) (Zayachkivska et al. 2005). Kedua, melalui efek vasokonstriktor dari tanin (astringen), sehingga perdarahan mukosa lambung dapat dihentikan (Wilmana dan Gan 2007). Ketiga adalah karena kandungan kalium dalam meniran yang dapat digunakan untuk menyeimbangkan pH lambung agar tidak terlalu asam (Mitta 2008). Adanya efek perlindungan ekstrak meniran tersebut akan melindungi mukosa lambung mencit dari kerusakan akibat aspirin. Pada kelompok P2, yaitu kelompok yang mendapatkan perlakuan aspirin dan ekstrak meniran dosis 1,3 mg/20 g BB mencit secara per oral, didapatkan data bahwa keseluruhan sampel, yaitu sebanyak 15 sampel, mengalami kerusakan ringan. Hal ini juga terlihat pada kelompok P3, yaitu kelompok yang diberi perlakuan aspirin dan ekstrak meniran dosis 2,6 mg/20 g BB mencit secara per oral, dimana keseluruhan sampel yaitu sebanyak 15 sampel mengalami kerusakan ringan. Secara statistik, hasil dari kelompok P2 dan P3 berbeda dengan kelompok P1 yang sebagian besar sampel mengalami kerusakan berat. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak meniran dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung mencit yang diinduksi aspirin.

Pada uji statistik antara kelompok P1 dan P4 juga menunjukkan perbedaan yang signifikan. Pada kelompok

P4, yaitu kelompok yang diberi perlakuan aspirin dan Cimetidin, didapatkan 15 sampel dengan gambaran histologis mengalami kerusakan ringan. Hal ini berarti bahwa Cimetidin dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit yang diinduksi aspirin. Hal ini sesuai dengan teori mengenai Cimetidin bahwa Cimetidin menghambat reseptor H2 secara selektif dan *reversible*. Reseptor H2 berperan dalam efek histamin terhadap sekresi cairan lambung, perangsangan jantung, serta relaksasi uterus tikus dan bronkus domba. Perangsangan reseptor H2 akan merangsang sekresi cairan lambung, sehingga pemberian Cimetidin akan menghambat sekresi asam lambung. Cimetidin juga dapat menghambat sekresi cairan lambung akibat perangsangan obat muskarinik atau gastrin. Cimetidin mengurangi volume dan kadar ion hidrogen cairan lambung (Wilmana dan Gan 2007). Oleh karena mekanisme tersebut, Cimetidin dapat melawan peran aspirin sebagai faktor agresif lambung, sehingga dalam kelompok P4 didapatkan data statistik berbeda dengan kelompok P1 yang sebagian besar sampel menunjukkan kerusakan berat.

Pada hasil uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol dengan kelompok P2, antara kelompok kontrol dengan kelompok P3, antara kelompok kontrol dengan kelompok P4, antara kelompok P2 dengan P3, antara kelompok P2 dengan P4, serta antara kelompok P3 dengan P4 terdapat perbedaan yang tidak signifikan. Perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok P2, antara kelompok kontrol dengan kelompok P3, serta antara kelompok kontrol dengan kelompok P4 menunjukkan bahwa ekstrak meniran dan Cimetidin dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit mendekati gambaran histologis kelompok kontrol. Adapun perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok P2 dengan P4 dan antara kelompok P3 dengan P4 menunjukkan bahwa ekstrak meniran memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit yang diinduksi aspirin, sebanding dengan gambaran histologis lambung menciit yang diberi Cimetidin. Dengan kata lain, ekstrak meniran mempunyai pengaruh yang sebanding dengan efek yang ditimbulkan oleh Cimetidin. Adapun perbedaan yang tidak signifikan antara kelompok P2 dengan P3 menunjukkan bahwa peningkatan pemberian dosis ekstrak meniran pada penelitian tidak dapat meningkatkan pengaruh ekstrak meniran dalam memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit yang diinduksi aspirin. Atau dengan kata lain, kemampuan ekstrak meniran dosis 1,3 mg/20 g BB menciit secara per oral sebanding dengan ekstrak meniran dosis 2,6 mg/20 g BB menciit secara per oral dalam memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit yang diinduksi aspirin.

Berdasarkan hasil uji statistik, pada penelitian ini hipotesis kerja diterima, yaitu ekstrak meniran dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis

lambung menciit yang diinduksi aspirin. Hal ini dapat ditunjukkan dari adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan P1 dengan P2, serta antara kelompok P1 dengan P3.

KESIMPULAN

Ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri* Linn.) dapat memberikan perlindungan terhadap kerusakan histologis lambung menciit (*Mus musculus*) yang diinduksi oleh aspirin.

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyawati N. 2006. Pengaruh Pemberian Madu terhadap Kerusakan Mukosa Lambung Akibat Pemberian Aspirin pada Menciit. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Hirschmann GS, Yesilida E. 2007. Traditional medicine and gastroprotective crude drugs. *J Ethnopharmacol* 100: 61-66.
- Kardinan A, Kusuma FR. 2004. Meniran: Penambah daya tahan tubuh alami. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Katzung BG. 1998. Farmakologi dasar dan klinik. Edisi VI. EGC, Jakarta.
- Kumaran A, Karunakaran RJ. 2007. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Sci Technol* 40: 344-352.
- Kusumobroto H. 2003. Penatalaksanaan terkini pada gastropati OAINS. www.pgh.or.id. [17 Maret 2009].
- Massarrat S, Herbert V, Veith R. 1981. Effect low dose of cimetidine on gastric potential difference and acetyl salicylic acid-induced change. *Klin Wochenschr* 59: 911-912.
- Mitta K. 2008. Asam lambung. dhammacitta.org. [10 Maret 2009].
- Murthi B. 1994. Penerapan metode statistik nonparametrik dalam ilmu kesehatan. PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk laboratorium metode laboratorium dalam toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Price SA, Wilson LM. 2006. Patofisiologi, konsep klinis proses-proses penyakit. EGC, Jakarta.
- Raphael KR, Kuttan R. 2003. Inhibition of experimental gastric lesion and inflammation by *Phyllanthus amarus* extract. *J Ethnopharmacol* 87: 193-197.
- Sangelorang S. 1998. Pengaruh Ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Ross) terhadap Tukak Lambung yang Diinduksi Aspirin pada Tikus Putih. [Skripsi]. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Shokunbi, Odetola. 2008. Gastroprotective and antioxidant activities of *Phyllanthus amarus* extracts on absolute ethanol-induced ulcer in albino rats. *J Med Plants Res* 2 (10): 261-267.
- Simadibrata M. 2005. Kelainan saluran cerna sebagai efek samping obat antiinflamasi nonsteroid. *Acta Med* 32: 201-202.
- Soelistiono. 2002. Analgesics in dental pain (Clinical Review). www.pabmi.com. [4 Maret 2009].
- Taufiqurohman MA. 2003. Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan. CSGF, Surakarta.
- Wilmana PF, Gan S. 2007. Farmakologi dan terapi. Edisi ke-5. Gaya Baru, Jakarta.
- Wolf MM, Lichtenstein DR, Singh. 1999. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. content.ncjm.org. [24 Maret 2007].
- Zayachkivska OS, Konturek SJ, Drozdowick D et al. 2005. Gastroprotective effects of flavonoids in plant extracts. *J Physiol Pharmacol* 56: 219-231.

Pengaruh pemberian ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap spermatogenesis mencit

Effect of beluntas (*Pluchea indica*) leaf extract on mice spermatogenesis

NUR AMALINA, SUYATMI, ENDANG LISTYANINGSIH SUPARYANTI

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

Manuskrip diterima: 11 Mei 2010. Revisi disetujui: 18 Agustus 2010.

Abstract. Amalina N, Suyatmi, Suparyanti EL. 2010. *Effect of beluntas (Pluchea indica) leaf extract on mice spermatogenesis. Biofarmasi 8: 47-51.* This research aimed to determine the effect of beluntas (*Pluchea indica* L.) leaf extract in habiting spermatogenesis. Flavonoids can inhibit aromatase enzyme that function to catalyze the conversion of androgens into estrogen so that the level of the testosterone hormone will increase. The high concentration of testosterone will affect on the feedback to the pituitary, that not releasing FSH and LH, so it will inhibit spermatogenesis. This research is an experimental research with post-test only controlled group design method, using male mice, 2-3 months age, weight 20-30 g, as many as 24 mice divided into 4 groups. The first group was a control group, the second group as treatment group I that given with 1.4 mg/20 g body weight beluntas extract, the third group as treatment group II that given with 2.8 mg/g body weight beluntas extract. The fourth group as treatment group III that given with 5.6 mg/g body weight beluntas extract. The treatment was given for 10 days after that the testes of mice were taken and from each testicle was made 3 slices and from each slice the most representative seminiferous tubule was taken for spermatid cells. So, each mice had 18 units of data would be analyzed. The data obtained were analyzed with Anova to determine the significant differences before and after the treatment of extract and to be compared the difference between four groups with Dunnet T3 test to determine the difference between each group. Based on the statistical test results with Dunnet T3, it showed a significant difference between the four study groups, except between treatment groups I and II. This might be due to the effectiveness of the two doses equally so that by doubling the dose, it did not give a doubling effect on decreasing spermatids. The provision of beluntas leaf extract can cause a decrease in the number of spermatid cells in mice. The average spermatid cells number decreased with increasing beluntas leaf extract dose. The best dose for reducing the number of spermatids in this study was the dose in the treatment group III that was 5.6 mg/g body weight.

Keywords: Beluntas leaf extract, flavonoid, spermatid cell

PENDAHULUAN

Keterbatasan sumber daya alam dan pertumbuhan penduduk yang pesat merupakan masalah di negara-negara yang sedang berkembang, termasuk Indonesia. Pertambahan penduduk yang cepat tidak saja mempersulit usaha peningkatan dan pemerataan kesejahteraan rakyat di bidang pangan, lapangan kerja, pendidikan, kesehatan, dan perumahan, tetapi juga menyebabkan pembangunan menjadi kurang berarti (Susetyarini 2003).

Untuk mengurangi laju pertumbuhan penduduk sejak tahun 1970, pemerintah telah mencanangkan program Keluarga Berencana (KB). Semakin melembaga dan berakarnya Norma Keluarga Kecil yang Bahagia dan Sejahtera, membawa serta tuntutan baru tentang metode dan media KB yang terjangkau bagi masyarakat untuk mencapai tata kehidupan yang selaras dan seimbang dengan aspirasi setiap warga masyarakat. Pergeseran pola pikir masyarakat juga terlihat dalam penggunaan metode KB. Pada zaman dahulu, metode KB lebih ditekankan pada wanita, namun kini masyarakat dapat menerima penggunaan metode KB bagi pria (Lastari 1987).

Metode kontrasepsi hormonal pada pria belum banyak dikenal dan belum memasyarakat sebagai salah satu

metode kontrasepsi, dibandingkan metode kontrasepsi pada wanita yang sudah dikenal dan diterima secara luas. Meskipun demikian, penelitian-penelitian sudah banyak dilakukan tentang kontrasepsi hormonal pada pria, disamping kontrasepsi dengan memakai kondom atau dengan melakukan vasektomi (Baziad 2002).

Pria merupakan fokus baru untuk program KB yang selama ini belum banyak diperhatikan. Dengan ditemukannya berbagai hasil penelitian terbaru, kontrasepsi pria mempunyai harapan perkembangan yang cukup luas di masa mendatang. WHO sebagai badan kesehatan dunia telah membentuk suatu *Task Force* untuk mencari atau mengembangkan metode pengaturan kesuburan pria yang aman, efektif, reversible, dan dapat diterima oleh masyarakat, serta memonitor keamanan dan efektivitas metode yang ada (Baziad 2002).

Dalam upaya meningkatkan keikutsertaan kaum pria dalam program keluarga berencana perlu dilakukan penelitian obat antifertilitas yang dapat digunakan oleh kaum pria. Menurut de Kretser (1979), obat-obatan antifertilitas pria dapat dibedakan menjadi tiga kelompok berdasarkan aktivitasnya, yaitu (Susetyarini 2003): (i) Mempengaruhi sistem hormonal yang mempengaruhi fungsi testis, (ii) Menghambat spermatogenesis dengan

cara mempengaruhi secara langsung fungsi testis, serta (iii) Mempengaruhi daya fertilisasi spermatozoa.

Secara garis besar, teknik kontrasepsi pria dapat dibagi menjadi cara mekanis dan cara medikamentosa. Secara mekanis, teknik kontrasepsi dilakukan dengan pemakaian kondom dan secara operatif dengan vasektomi. Salah satu cara pengaturan kesuburan pria dapat dilakukan dengan medikamentosa adalah dengan menggunakan hormon. Hingga saat ini telah diketahui beberapa hormon yang dapat menekan produksi spermatozoa, antara lain *gonadotropin-releasing hormone analogue* (GnRH) dan hormon steroid seperti androgen, progesterin, dan estrogen (Baziad 2002).

Kadar testosteron normal dalam darah berfungsi memelihara dan mempertahankan spermatogenesis. Sebaliknya, kadar testosteron yang tinggi di atas kadar fisiologis akan menghambat spermatogenesis, akibatnya terjadi oligozoospermia atau azoospermia. Hal inilah yang menjadi dasar pemikiran perkembangan kontrasepsi pada pria (Handelsman 2000).

Penggunaan jamu atau tumbuhan obat sebagai kontrasepsi telah lama dikenal masyarakat, terutama di berbagai daerah di Indonesia. Kontrasepsi tradisional banyak ditemukan di daerah pedesaan, dimana masyarakatnya masih memegang teguh tradisi nenek moyangnya (Purwaningsih 2003).

Penggunaan kontrasepsi asal tanaman perlu diperhatikan sifat merusak atau pengaruhnya terhadap sistem reproduksi, baik pada pria maupun wanita, sebaiknya digunakan jenis-jenis tanaman yang pengaruhnya terhadap sistem reproduksi bersifat sementara (*reversible*), yaitu apabila obat tidak digunakan lagi maka sistem reproduksinya akan kembali normal (Agusta 2008). Metode KB untuk pria yang efektif harus aman, *reversible*, bereaksi cepat, dapat diterima oleh pemakai, dan tidak mempengaruhi kemampuan seksual atau libido. Selain itu, mekanisme pengaturannya juga harus mudah dan harganya relatif terjangkau (Lastari 1987).

Salah satu jenis tanaman yang berpotensi sebagai obat kontrasepsi pria adalah beluntas (*Pluchea indica* L.). Beluntas biasa digunakan masyarakat untuk menghilangkan bau badan, bau mulut, menambah nafsu makan (stomakik), gangguan pencernaan pada anak, mengobati penyakit TBC kelenjar, nyeri rematik, nyeri tulang, dan sakit pinggang. Daun beluntas berbau khas aromatik dan rasanya getir. Daun beluntas mengandung zat-zat aktif, yaitu alkaloid, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri. Adapun akar beluntas mengandung zat aktif berupa flavonoid dan tanin (Susetyarini 2003). Flavonoid dapat menghambat sintesis enzim aromatase, yaitu enzim yang berfungsi mengkatalisis konversi androgen menjadi estrogen yang akan memicu peningkatan hormon testosteron. Tingginya konsentrasi testosteron akan berpengaruh terhadap umpan balik ke hipofisis, yaitu tidak melepaskan FSH dan LH, sehingga akan menghambat spermatogenesis (Gui 2004).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap spermatogenesis mencit.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Histologi Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang mencit, timbangan hewan, timbangan neraca, alat bedah hewan percobaan (*scalpel*, pinset, gunting, jarum, meja parafin), sonde lambung, peralatan untuk pembuatan preparat histologi, mikroskop cahaya media terang, *hand tally counter*, gelas ukur, dan pengaduk. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi ekstrak beluntas, pelarut CMC-Na, pakan hewan percobaan (pelet), akuades, serta bahan-bahan untuk pembuatan preparat histologi dengan pengecatan HE.

Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium yaitu *the post-test only controlled group design*.

Subjek penelitian

Subjek penelitian berupa mencit jantan sebanyak 24 ekor, usia kurang lebih 2-3 bulan dengan berat badan kira-kira 20-30 gram. Jumlah subjek penelitian dihitung dengan menggunakan rumus Federer:

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

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

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

$$n \geq 6$$

Dimana n adalah jumlah mencit tiap kelompok dan k adalah jumlah perlakuan. Oleh karena jumlah mencit minimal pada tiap perlakuan adalah 6 maka digunakan 6 ekor mencit untuk penelitian.

Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling* (Murti 2006).

Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *the post-test only controlled group design* (Taufiqurohman 2003).

Cara kerja

Sebelum diberi perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama 1 (satu) minggu di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, dan dijaga agar sesedikit mungkin mendapat gangguan. Semua perlakuan dilakukan antara pukul 08.00-10.00 WIB.

Hewan percobaan yang digunakan sebanyak 20 ekor mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor. Berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan uji dari berbagai spesies dan manusia, konversi dosis untuk manusia dengan berat badan 70 kg pada mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026 (Ngatidjan 1991). Dosis ekstrak daun beluntas yang dipakai untuk orang dewasa adalah 15 g, sehingga dosis untuk mencit = 1500 mg x 0,0026/20 g BB mencit = 52 mg/20 g BB mencit

(Ngatidjan 1990). Oleh karena nilai konversi dari daun segar ke ekstrak adalah 0,052 maka dosis ekstrak yang dibutuhkan sebanyak 2,8 mg.

Hewan percobaan dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan, yaitu kelompok K (kontrol), kelompok I, II, dan III. Kelompok kontrol (K) adalah kelompok yang diberi akuades dan pelarut ekstrak berupa CMC-Na. Kelompok I diberi ekstrak beluntas sebanyak 1,4 mg/20 g BB. Kelompok II diberi ekstrak beluntas sebanyak 2,8 mg/20 g BB. Kelompok III diberi ekstrak beluntas sebanyak 5,6 mg/20 g BB. Pemberian ekstrak dilakukan secara intra gastrik. Perlakuan diulang setiap hari selama 10 hari. Pemberian makanan mencit berupa pelet dan minuman berupa air diberikan secara *ad libitum* sebanyak 0,5 ml.

Setelah mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak beluntas selama 10 hari, yaitu sesuai dengan lama satu siklus spermatogenesis mencit (Nalbandov 1990), testis mencit diambil dan dimasukkan ke dalam larutan fiksatif (Larutan Bouin). Kemudian spesimen tersebut dibuat sediaan histologi dengan metode parafin. Sediaan diwarnai dengan metode pewarnaan Hematoksin-Eosin.

Untuk pengamatan struktur histologi dilakukan dengan menggunakan mikroskop. Pertama dipilih tubulus seminiferus yang berbentuk bulat untuk masing-masing preparat, kemudian diidentifikasi jenis-jenis sel spermatogenik yaitu spermatogonium, spermatosit, dan spermatid, dimana sel yang dihitung hanya spermatid saja.

Data dikumpulkan dari hasil pengamatan pada setiap hewan uji sesuai dengan kelompok perlakuan masing-masing. Dari setiap hewan percobaan dibuat tiga buah sediaan dari masing-masing testis, masing-masing sediaan dihitung jumlah sel spermatidnya dari tiga tubulus seminiferus yang berbentuk bulat yang berasal dari testis kanan dan testis kiri. Pada setiap sediaan dilakukan pengamatan dengan bantuan mikroskop cahaya. Pengamatan preparat dilakukan dengan perbesaran 100x dan dilanjutkan dengan perbesaran 400x. Pengamatan jumlah sel spermatid dilakukan pada setiap lapangan bidang pandang dari irisan preparat untuk masing-masing testis kiri dan testis kanan. Perubahan jumlah sel spermatid diuji dengan rumus analisis varian dan dilanjutkan dengan uji Post-Hoc.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji statistik *One-Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan rata-rata jumlah spermatid antara kelompok kontrol (K), kelompok I, kelompok II, dan kelompok III. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Dunnett T3* dengan derajat signifikansi $\alpha=0,05$ untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rata-rata jumlah spermatid diantara kedua kelompok.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

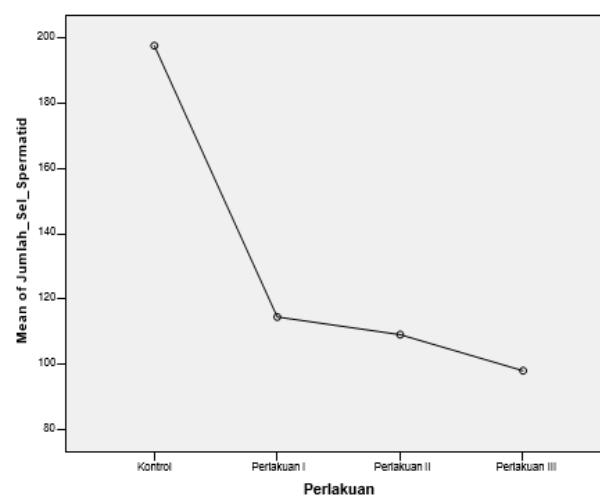
Data hasil penelitian yang diperoleh berupa data rasio yaitu jumlah sel spermatid yang dihitung dari tiap preparat hewan percobaan. Dari setiap preparat hewan percobaan

dipilih tiga irisan dari masing-masing testis dan dipilih tiga tubulus seminiferus yang paling representatif dari masing-masing irisan, lalu dihitung jumlah sel spermatidnya untuk masing-masing kelompok perlakuan. Jadi, masing-masing hewan percobaan mempunyai 18 unit analisis yang akan diolah, kemudian dicari hasil jumlah rata-rata untuk tiap preparat hewan percobaan. Hasil perhitungan jumlah rata-rata sel spermatid dari masing-masing kelompok perlakuan disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1 memperlihatkan nilai rata-rata sel spermatid dari masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok kontrol memiliki jumlah spermatid rata-rata 197,685 sel, kelompok I memiliki nilai rata-rata 114,585 sel, kelompok II memiliki nilai rata-rata 110,333 sel, dan kelompok III memiliki nilai rata-rata 95,370 sel.

Dari Gambar 1 dapat dilihat bahwa jumlah rata-rata sel spermatid setelah diberi ekstrak beluntas mengalami penurunan yang semakin nyata apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan jumlah sel spermatid semakin berkurang dengan bertambahnya dosis ekstrak beluntas yang diberikan. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa kelompok kontrol memiliki rata-rata jumlah sel spermatid yang paling banyak. Kelompok perlakuan I dan II memiliki jumlah sel spermatid rata-rata terbanyak kedua. Kelompok perlakuan III memiliki jumlah sel spermatid rata-rata paling sedikit, sehingga pemberian dosis pada kelompok III merupakan perlakuan terbaik.

Analisis yang dilakukan terhadap data hasil eksperimen bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh yang signifikan dari variabel independen (pemberian ekstrak beluntas) terhadap variabel dependen (jumlah sel spermatid), kemudian menentukan dosis perlakuan yang terbaik. Sampel hasil eksperimen terdiri dari 4 kelompok perlakuan (kontrol, perlakuan I, perlakuan II, perlakuan III) masing-masing kelompok terdiri dari 108 sampel (replikasi).



Gambar 1. Jumlah rata-rata sel spermatid testis kiri dan testis kanan dari masing-masing kelompok perlakuan

Metode yang digunakan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh yang signifikan dari variabel independen terhadap variabel dependen adalah *One-Way Anova*. Metode tersebut termasuk kategori teknik analisis komparasi parametrik sehingga mensyaratkan dua macam asumsi yaitu asumsi normalitas data dan asumsi homogenitas variansi. Asumsi normalitas data merupakan syarat layak tidaknya penggunaan *One-Way Anova*. Adapun asumsi homogenitas variansi merupakan dasar penentuan metode *Post-Hoc Test*. Pengujian asumsi normalitas data dilakukan dengan *One Sample Kolmogorov-Smirnov Test*, sedangkan pengujian asumsi homogenitas variansi dilakukan dengan *Levene's Test*.

Metode *Post-Hoc Test* yang digunakan adalah *LSD* atau *Dunnnett T3*. Hasil *Post-Hoc Test* digunakan untuk menentukan dosis perlakuan terbaik. *LSD* digunakan apabila data memenuhi asumsi homogenitas variansi, sedangkan *Dunnnett T3* digunakan apabila data tidak memenuhi asumsi homogenitas variansi. Berdasarkan Tabel 2 terlihat bahwa keempat kelompok sampel memiliki nilai probabilitas (*Asymp. Sig*) di atas 0,05, sehingga H_0 diterima. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa keseluruhan sampel memenuhi asumsi normalitas data sehingga layak untuk dianalisis dengan *One-Way Anova*.

Dari hasil uji normalitas data terlihat bahwa keempat kelompok sampel memiliki nilai probabilitas (*Asymp. Sig*) di atas 0,05 sehingga H_0 diterima. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa keseluruhan sampel memenuhi asumsi normalitas data sehingga layak untuk dianalisis dengan *One-Way Anova* (Tabel 3).

Adapun untuk uji homogenitas diperoleh nilai probabilitas (*Sig*) sebesar 0,000. Angka tersebut lebih kecil dari 0,05, sehingga H_0 ditolak. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa sampel tidak memenuhi asumsi homogenitas variansi. Berdasarkan kesimpulan ini maka metode *Post-Hoc Test* yang digunakan adalah *Dunnnett T3* (Tabel 4).

Pembahasan

Pada penelitian dengan pemberian ekstrak daun beluntas selama 10 hari diperoleh jumlah rata-rata sel spermatid kiri dan kanan untuk kelompok kontrol (K) 197,685 sel, untuk kelompok perlakuan I 114,585 sel, untuk kelompok perlakuan II 110,333 sel, untuk kelompok perlakuan III 95,370 sel. Jumlah sel spermatid kelompok perlakuan mengalami penurunan yang signifikan.

Dari data yang diperoleh dapat diindikasikan bahwa pemberian ekstrak beluntas dengan dosis 1,4 mg/20 g BB, 2,8 mg/g BB, dan 5,4 mg/g BB dapat menyebabkan perubahan jumlah rata-rata sel spermatid yang cenderung semakin menurun. Semakin besar dosis yang diberikan maka semakin besar pula penurunan jumlah sel spermatid. Penurunan jumlah sel spermatid tersebut mengindikasikan adanya pengaruh ekstrak beluntas terhadap spermatogenesis.

Penurunan jumlah rata-rata sel spermatid pada kelompok perlakuan I dibandingkan dengan kelompok kontrol sebesar:

$$\frac{197,685 - 114,585}{197,685} \times 100\% = 42,04\%$$

Tabel 1. Jumlah rata-rata sel spermatid testis kiri dan kanan dari masing-masing kelompok

Kelompok perlakuan	N	Jumlah sel spermatid testis kiri dan testis kanan
Kontrol	108	197,685
Perlakuan I	108	114,585
Perlakuan II	108	110,333
Perlakuan III	108	95,370

Tabel 2. Hasil uji normalitas antara keempat kelompok untuk pada parameter jumlah sel spermatid

Kelompok perlakuan	<i>Asymp. Sig</i>	Keputusan
Kontrol	0,877	H_0 diterima
Perlakuan I	0,121	H_0 diterima
Perlakuan II	0,122	H_0 diterima
Perlakuan III	0,330	H_0 diterima

Tabel 3. Hasil uji Anova searah antara keempat kelompok untuk rata-rata jumlah sel spermatid

	Df	Fo	Nilai P
Antar Kelompok	3	289,352	0,000
Dalam Kelompok	428		
Total	431		

Tabel 4. Hasil uji *Dunnnett T3* antara kedua kelompok untuk jumlah rata-rata sel spermatid

Pasangan perlakuan yang diuji	<i>Sig</i>	Keputusan	Kesimpulan
Kontrol Perlakuan I	0,000	H_0 ditolak	Berbeda secara signifikan
Perlakuan II	0,000	H_0 ditolak	Berbeda secara signifikan
Perlakuan III	0,000	H_0 ditolak	Berbeda secara signifikan
Perlakuan I Perlakuan II	0,602	H_0 diterima	Tidak berbeda secara signifikan
Perlakuan III	0,000	H_0 ditolak	Berbeda secara signifikan
Perlakuan II Perlakuan III	0,005	H_0 ditolak	Berbeda secara signifikan

Penurunan jumlah rata-rata sel spermatid pada kelompok perlakuan II dibandingkan dengan kelompok kontrol sebesar:

$$\frac{197,685 - 110,333}{197,685} \times 100\% = 44,12\%$$

Penurunan jumlah rata-rata sel spermatid pada kelompok perlakuan III dibandingkan dengan kelompok kontrol sebesar:

$$\frac{197,685 - 95,370}{197,685} \times 100\% = 51,76\%$$

Dari hasil uji *Anova* searah pada penelitian ini diperoleh nilai probabilitas (*Sig*) sebesar 0,000. Angka tersebut lebih kecil dari 0,05, sehingga H_0 ditolak. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak beluntas berpengaruh secara signifikan terhadap jumlah sel spermatid.

Post-Hoc Test dilakukan untuk mencari perbedaan antara keempat kelompok perlakuan. Apabila kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan I diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok tersebut. Apabila kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan II diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok tersebut. Apabila kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan III diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok tersebut. Apabila kelompok perlakuan I dibandingkan dengan kelompok perlakuan II diperoleh nilai $p=0,602$ ($p>0,05$), hal ini berarti tidak terdapat perbedaan yang signifikan diantara kedua kelompok tersebut.

Pada pemberian ekstrak beluntas pada kelompok I dan II tidak memberikan perbedaan yang signifikan, hal ini diduga disebabkan oleh efektivitas antara kedua dosis sama, sehingga dengan pemberian dosis dua kali lipat tidak menyebabkan penurunan jumlah spermatid dua kali lipat juga. Apabila kelompok perlakuan I dibandingkan dengan kelompok perlakuan III diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok tersebut. Apabila kelompok perlakuan II dibandingkan dengan kelompok perlakuan III diperoleh nilai $p=0,000$ ($p<0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kedua kelompok tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa pada dosis perlakuan I dan II dengan perlakuan III dapat menyebabkan penurunan jumlah spermatid lebih nyata.

Dari data-data yang diperoleh menunjukkan bahwa pada semua kelompok perlakuan terjadi penurunan jumlah rata-rata sel spermatid jika dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan rata-rata tersebut diduga disebabkan oleh flavonoid yang terkandung dalam daun beluntas. Flavonoid yang terkandung dalam beluntas termasuk salah satu senyawa yang diduga bersifat antifertilitas (Susetyorini 2003).

Senyawa antifertilitas pada prinsipnya bekerja dengan dua cara, yaitu melalui efek sitostatik dan melalui efek hormonal yang menghambat laju metabolisme sel spermatogenik dengan cara mengganggu keseimbangan sistem hormon (Herdiningrat 2002). Flavonoid dapat menghambat enzim aromatase, yaitu enzim yang berfungsi mengkatalisis konversi androgen menjadi estrogen yang akan meningkatkan hormon testosterone. Tingginya

konsentrasi testosterone akan berpengaruh terhadap umpan balik ke hipofisis, yaitu tidak melepaskan FSH dan LH, sehingga akan menghambat spermatogenesis. Selain itu, salah satu zat aktif lainnya yaitu tanin dapat menggumpalkan sperma (Winarno dan Sundari 1997).

Dalam penelitian ini didapatkan dosis yang paling baik untuk menurunkan jumlah spermatid yaitu pada kelompok perlakuan III dengan dosis 5,4 mg/20 g BB. Hewan percobaan dalam kelompok perlakuan tersebut tidak tampak mengalami efek samping ataupun mati akibat pemberian ekstrak beluntas. Oleh karena itu masih memungkinkan untuk peningkatan dosis supaya untuk menentukan dosis optimum untuk menghambat spermatogenesis pada mencit.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak beluntas dapat mempengaruhi penurunan jumlah rata-rata sel spermatid testis kiri dan testis kanan mencit yang ditandai dengan adanya penurunan yang signifikan jumlah rata-rata sel spermatid testis kiri dan testis kanan mencit untuk masing-masing kelompok. Tingkat penurunan jumlah rata-rata sel spermatid testis kiri dan testis kanan mencit semakin besar sebanding dengan besarnya dosis ekstrak beluntas yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A. 2008. Tanaman Anti Hamil Plus Obat Kuat. <http://tanamanobatku.blogspot.com/>. [10 Maret 2009].
- Baziad A. 2002. Kontrasepsi hormonal. Jakarta, PT Bina Pustaka Sarwono.
- De Kretser. 1979. Fertility regulation in the male. *Bulletin of the World Health Organization* 56(3): 353.
- Gui Y, He C, Amory JK. 2004. Male hormonal contraception: Suppression of spermatogenesis by injectable testosterone undecanoate alone or with levonorgestrel implants in Chinese men. *J Androl* 25: 720-727.
- Handelsman DJ. 2000. Hormonal male contraception. *J Androl* 23: 8-12.
- Herdiningrat S. 2002. Efek pemberian infus buah manggis muda (*Garcinia mangostana* Linn.) terhadap spermatozoa mencit (*Mus musculus*). *Majalah Andrologi Indonesia* 10: 130.
- Lastari P. 1987. Metoda keluarga berencana untuk pria. *Cermin Dunia Kedokteran* 43: 44-48.
- Murti B. 1994. Penerapan metode statistik non parametrik dalam ilmu kesehatan. Jakarta, PT Gramedia Pustaka Utama.
- Naibandov AV. 1990. Fisiologi reproduksi pada mamalia dan unggas. Jakarta, Penerbit UI-Press.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk laboratorium metode laboratorium dalam toksikologi. Yogyakarta, Pusat Antar Universitas Bioteknologi, UGM.
- Purwaningsih E. 2003. Pengaruh beberapa tanaman obat tradisional terhadap proses spermatogenesis dan kualitas spermatozoa. *Jurnal Kedokteran YARSI* 11: 67-73.
- Susetyorini E. 2003. Efek beluntas terhadap sel spermatogenik tikus putih sebagai alternatif kontrasepsi tradisional. *digilib.umm.ac.id*. [30 Maret 2009].
- Taufiqqurohman MA. 2003. Metodologi penelitian kedokteran dan kesehatan. Surakarta, CSGF.
- Winarno W, Sundari D. 1997. Informasi tanaman obat untuk kontrasepsi tradisional. *Cermin Dunia Kedokteran* 120: 25-28.

Pengaruh ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao*) terhadap hepatotoksisitas parasetamol pada mencit

Effect of cocoa (*Theobroma cacao*) seed extract against paracetamol hepatotoxicity in mice

YESSI OKTIARI, S. BAMBANG WIDJOKONGKO, LILIK WIJAYANTI

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

Manuskrip diterima: 7 Juni 2010. Revisi disetujui: 24 Agustus 2010.

Abstract. Oktiari Y, Widjokongko SB, Wijayanti L. 2010. *Effect of cocoa (Theobroma cacao) seed extract against paracetamol hepatotoxicity in mice.* Biofarmasi 8: 52-57. Cocoa bean (*Theobroma cacao*) contains flavonoids, an antioxidant that can reduce oxidant from the process of metabolism of paracetamol. This metabolism creates NAPQI. This study explained the effect of cocoa bean extract to reduce the liver histologic disruption of mice (*Mus musculus*) that treated by paracetamol. This study was a laboratory experimental research with a post-test only controlled group design. The samples used in this research included forty male mice, Swiss Webster type, 2-3 months in age and ± 20 g body weight. The samples divided into 4 groups, each group consisted of ten mice. Mice for the control group (K) were not given with paracetamol and the cocoa bean extract, but they were given only with aquadest of 0.2 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially. The first treatment group (P1) was given with paracetamol with a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice on the day 15, 16 and 17. The second treatment group (P2) was given with a dose of cocoa bean extract I consisted of 0.02 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially and also paracetamol in a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice at day 15, 16 and 17. The third treatment group (P3) was given a dose of extract II consisted of 0.04 mL/20 g body weight of mice for 17 days serially and paracetamol in a dose of 0.1 mL/20 g body weight of mice on day 15, 16 and 17. On the 18th day, mice were sacrificed by the neck dislocation. After that, the liver slides were prepared by stained with Hematoxylin-Eosin (HE). The ANOVA One-Way results showed that there were significant differences between the four groups. The results of the LSD method showed that there were significant differences between K-P1, K-P2, K-P3 and P1-P2 groups, but there was no a significant difference between K-P3 and P2-P3 groups. Cocoa extract can reduce the histologic disruption of mice that given a toxic by paracetamol.

Keywords: Cacao bean extract, liver cell damage, mice, paracetamol, *Theobroma cacao*

PENDAHULUAN

Kakao, atau juga populer dengan sebutan coklat, dikenal dan digunakan sejak ratusan tahun lalu. Kakao merupakan salah satu bahan makanan yang memiliki kandungan flavonoid tinggi (Keen 2001). Kandungan flavonoid utamanya adalah *epicatechin*, *proanthocyanidin*, dan *catechin*. Kandungan flavonoid kakao lebih tinggi daripada bahan makanan lainnya, seperti apel, bawang putih, dan anggur yang dikenal mengandung banyak flavonoid (Lamuela-Raventós et al. 2005). Flavonoid berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen tersebut akan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil sehingga tidak merusak lipid, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang menjadi target kerusakan seluler (Ide 2008).

Penelitian ini membuktikan bahwa kakao memiliki manfaat kardioprotektif melalui pencegahan aktivasi platelet (Rein et al. 2000) dan vasodilatasi koroner (Flammer et al. 2007). Selain itu, kakao juga meningkatkan *fecal bulk*, serta menurunkan rasio kolesterol *Low Density Lipoprotein* (LDL)/*High Density Lipoprotein* (HDL) (Jenkins et al. 2000). Sebuah penelitian di Amerika juga

telah membuktikan bahwa flavonoid yang ditemukan dalam kakao dapat mencegah *early alcohol-induced liver injury* (McKim et al. 2002). Di Indonesia sendiri penelitian tentang khasiat kakao belum banyak dilakukan. Manfaat kakao sebagai hepatoprotektif juga belum banyak diteliti.

Parasetamol dipilih sebagai penginduksi kerusakan histologi hepar mencit karena parasetamol merupakan salah satu obat yang paling sering digunakan secara overdosis (Gunnell et al. 2000). Parasetamol, atau dikenal juga sebagai asetaminofen, digunakan secara luas sebagai analgesik dan antipiretik yang banyak ditemui di toko-toko obat maupun sebagai obat resep. Meskipun parasetamol relatif aman digunakan pada dosis terapi, overdosis dapat menyebabkan nekrosis sentrilobular dan tubulus proksimalis pada manusia dan hewan percobaan (Lucas et al. 2000).

Parasetamol diaktifkan oleh enzim sitokrom P450 menjadi bahan metabolit bernama *N-acetyl-p-benzoquinone imine* (NAPQI) yang reaktif, sehingga menekan glutathione hepar kemudian berikatan kovalen dengan protein. Ikatan kovalen tersebut berhubungan dengan toksisitas parasetamol yang mengakibatkan kerusakan hepar (James et al. 2003).

Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk membuktikan potensi ekstrak biji kakao dalam

mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat paparan parasetamol. Dengan demikian, tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak biji kakao dalam mengurangi kerusakan histologis sel hepar mencit (*Mus musculus*) akibat pemberian parasetamol.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

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

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang mencit 4 buah, masing-masing untuk 10 ekor mencit, timbangan hewan, timbangan obat, alat bedah hewan percobaan (*scalpel*, pinset, gunting, jarum, meja lilin, sonde lambung, peralatan untuk pembuatan preparat histologi, mikroskop cahaya medan terang, gelas ukur, pengaduk, dan kamera digital. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi parasetamol, makanan hewan percobaan (*pellet*), akuades, bahan-bahan untuk pembuatan preparat histologi dengan pengecatan HE, dan ekstrak biji kakao.

Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik. Pada penelitian ini diberikan perlakuan ekstrak biji kakao terhadap sampel yang telah ditentukan yaitu berupa hewan percobaan di laboratorium.

Subjek penelitian

Populasi yang digunakan berupa mencit (*Mus musculus*) jantan dengan galur Swiss Webster berumur 2-3 bulan dan berat badan ± 20 gram. Jumlah sampel yang digunakan ditentukan berdasarkan rumus *Federer* (Purwisastra 2001) sebagai berikut:

$$\begin{aligned}(k-1)(n-1) &> 15 \\ (4-1)(n-1) &> 15 \\ 3(n-1) &> 15 \\ 3n &> 15+3 \\ n &> 6\end{aligned}$$

Keterangan:

K = Jumlah kelompok

N = Jumlah sampel dalam tiap kelompok

Pada penelitian ini, jumlah sampel untuk tiap kelompok ditentukan sebanyak 10 ekor mencit ($n > 6$), dan terdapat 4 kelompok perlakuan, sehingga pada penelitian ini dibutuhkan 40 mencit dari populasi yang ada. Sampel didapatkan dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

Teknik sampling

Teknik *sampling* yang digunakan adalah *purposive sampling* (Murti 2006).

Desain penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *The post-test only control group design* (Taufiqqurohman 2003) yang dibagi dalam 4 kelompok perlakuan berikut ini: (i) K (kontrol negatif) = Kelompok kontrol, tanpa diberi ekstrak biji kakao maupun parasetamol. Kelompok ini diberi akuades 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut. (ii) P1 = Kelompok perlakuan I, diberi parasetamol tanpa diberi ekstrak biji kakao. Kelompok ini diberikan akuades secara per oral sebanyak 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut dan pada hari ke-15, 16, dan 17 diberi parasetamol 0,1 mL/20 g BB mencit per hari. (iii) P2 = Kelompok perlakuan II, diberi parasetamol dan ekstrak biji kakao dosis I. Kelompok ini diberi perlakuan ekstrak biji kakao secara per oral pada dosis I yaitu 0,2 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut, dimana pada hari ke-15, 16, dan 17 juga diberikan parasetamol dosis 0,1 mL/20 g BB mencit per hari 1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao. (iv) P3 = Kelompok perlakuan III, diberi parasetamol dan ekstrak biji kakao dosis II. Kelompok ini diberi perlakuan ekstrak biji kakao dosis II yaitu 0,4 mL/20 g BB mencit per hari selama 17 hari berturut-turut, dimana pada hari ke-15, 16, dan 17 juga diberikan parasetamol dosis 0,1 mL/20 g BB mencit per hari 1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao.

Selanjutnya, pada masing-masing kelompok perlakuan dilakukan pengamatan terhadap jumlah inti sel hati piknosis, karioreksis, dan kariolisis dari 100 sel di sentriolobuler hepar. Pengamatan jumlah inti sel hepar piknosis, karioreksis, dan kariolisis tersebut dilakukan pada hari ke-18.

Cara kerja

Dosis dan pengenceran ekstrak biji kakao

Dosis ekstrak biji kakao yang diberikan ditentukan berdasar hasil konversi dari tikus ke mencit (Ngatidjan 1991) dengan menggunakan dosis pada penelitian sebelumnya yaitu sebesar 400 mg/kg BB/hari pada tikus (McKim et al. 2002). Dosis pemberian ekstrak biji kakao tersebut diberikan dalam dua dosis, yaitu dosis I = 0,2 mL/20 g BB mencit per hari dan dosis II = 0,4 mL/20 g BB mencit per hari. Masing-masing dosis yang disondakan tersebut adalah ekstrak biji kakao yang diencerkan dengan akuades menjadi volume 0,2 mL (untuk dosis I) dan 0,4 mL (untuk dosis II). Ekstrak biji kakao diberikan sehari sekali selama 17 hari berturut-turut pada kelompok perlakuan 2, sedangkan ekstrak biji kakao dosis II diberikan sehari sekali selama 17 hari berturut-turut pada kelompok perlakuan 3.

Ekstrak biji kakao dosis I

Penghitungan ekstrak biji kakao dosis I yaitu sebagai berikut:

$$\begin{aligned}&= \text{Nilai konversi} \times 400 \text{ mg/kg BB} \\ &= 0,14 \times 400 \text{ mg/kg BB} \\ &= 56 \text{ mg/kg BB} \\ &= 1,12 \text{ mg/20 g BB}\end{aligned}$$

Sementara itu, pengenceran ekstrak biji kakao yaitu 56 mg ekstrak biji kakao + akuades \rightarrow 10 mL larutan ekstrak biji kakao. Dalam 1 mL larutan mengandung 5,6 mg

ekstrak biji kakao → 0,2 mL larutan mengandung 1,12 mg ekstrak biji kakao.

Ekstrak biji kakao yang disondekan adalah ekstrak biji kakao yang telah diencerkan. Ekstrak biji kakao yang disondekan pada satu ekor mencit dengan berat badan 20 gram = 0,2 mL per hari yang diberikan selama 17 hari berturut-turut.

Ekstrak biji kakao dosis II

Ekstrak biji kakao dosis II adalah dua kali dosis ekstrak biji kakao dosis I yaitu sebesar 2,24 mg per hari. Jadi, larutan ekstrak biji kakao yang disondekan pada satu ekor mencit (20 gram) = 0,4 mL per hari yang diberikan selama 17 hari berturut-turut.

Pemberian ekstrak biji kakao selama 17 hari berturut-turut dimaksudkan untuk meningkatkan kadar antioksidan, sehingga kerusakan hepar dapat dicegah ketika terpapar parasetamol dosis toksik. Menurut Engler et al. (2004), pemberian cokelat dengan kandungan flavonoid yang tinggi selama dua minggu dapat meningkatkan konsentrasi *epicatechin* dalam plasma. Di luar jadwal perlakuan, mencit diberi pakan *pellet* dan minum air PAM secara *ad libitum*.

Dosis dan pengenceran parasetamol

LD-50 untuk mencit secara per oral yang telah diketahui adalah 338 mg/kg BB atau 6,76 mg/20 g BB mencit (Alberta dan Canada 2006). Dosis parasetamol yang dapat menimbulkan efek kerusakan hepar berupa nekrosis sel hepar tanpa menyebabkan kematian mencit adalah dosis 3/4 LD-50 per hari (Sabrang 2008). Dosis yang digunakan adalah 338 mg/kg BB x 0,75 = 253,5 mg/kg BB = 5,07 mg/20 g BB mencit. Parasetamol 500 mg dilarutkan dalam akuades hingga 9,86 mL, sehingga dalam 0,1 mL larutan parasetamol mengandung 5,07 mg parasetamol.

Parasetamol diberikan selama 3 hari berturut-turut yaitu pada hari ke-15, 16, dan 17. Pemberian parasetamol dengan cara ini dimaksudkan untuk menimbulkan kerusakan pada sel hepar berupa nekrosis pada daerah sentrolobularis tanpa menimbulkan kematian pada mencit. Menurut Wilmana dan Gunawan (2007), pemberian parasetamol dosis tunggal sudah dapat menimbulkan kerusakan sel hepar berupa nekrosis pada daerah sentrolobularis dalam waktu 2 hari setelah pemberian parasetamol.

Persiapan mencit

Mencit diadaptasikan terlebih dahulu selama tujuh hari di Laboratorium Histologi Fakultas Kedokteran UNS, Surakarta. Sesudah adaptasi, keesokan harinya dilakukan penimbangan untuk menentukan dosis dan diberikan perlakuan.

Pengelompokan subjek perlakuan

Percobaan mulai dilakukan pada minggu kedua. Subjek dikelompokkan menjadi empat kelompok secara random, dan masing-masing kelompok terdiri dari 10 mencit. Masing-masing kelompok diberi perlakuan parasetamol dan ekstrak biji kakao sesuai dengan dosis yang telah ditentukan sebelumnya. Sebelum pemberian parasetamol dan ekstrak biji kakao, mencit dipuasakan terlebih dahulu

±5 jam untuk mengosongkan lambung mencit. Pemberian parasetamol dilakukan ±1 jam setelah pemberian ekstrak biji kakao agar ekstrak biji kakao terabsorpsi terlebih dahulu.

Pengukuran derajat kerusakan sel hepar

Parameter yang digunakan dalam sistem penilaian derajat kerusakan sel hepar adalah piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Ketiga parameter tersebut diduga merupakan proses yang tidak berkelanjutan atau masing-masing berdiri sendiri. Oleh karena itu, skor yang diberikan pada penelitian ini adalah 1 untuk masing-masing tipe kerusakan.

Pada hari ke-18 setelah perlakuan pertama diberikan, semua hewan percobaan dikorbakan dengan cara dislokasi vertebra servikalis, kemudian organ hepar diambil untuk selanjutnya dibuat preparat histologi dengan metode blok parafin dengan pengecatan HE. Pembuatan preparat dilakukan pada hari ke-18 agar efek perlakuan tampak nyata. Lobus hepar yang diambil adalah lobus kanan dan irisan untuk preparat diambil pada bagian tengah dari lobus tersebut, hal ini dilakukan untuk mendapatkan preparat yang seragam. Dari tiap lobus kanan hepar dibuat 3 irisan dengan tebal tiap irisan 3-8 µm. Jarak antar irisan satu dengan irisan yang lain kira-kira 25 irisan. Tiap hewan percobaan dibuat 3 preparat. Kemudian dari 3 preparat tersebut diambil satu preparat secara random. Dari masing-masing preparat diambil satu daerah di sentrolobuler yang terlihat kerusakannya paling berat. Dari satu zona tersebut didapatkan satu skor untuk tiap 100 sel sentrolobuler, sehingga didapatkan satu skor dari satu ekor hewan percobaan. Dalam percobaan ini digunakan 10 hewan percobaan dalam tiap kelompok, sehingga diperoleh 10 skor untuk tiap kelompok percobaan. Pengamatan preparat dilakukan dengan perbesaran 100 kali untuk mengamati seluruh lapang pandang, kemudian ditentukan daerah yang diamati pada sentrolobuler lobulus hepar dan dipilih satu daerah yang kerusakannya terlihat paling berat. Dari tiap zona sentrolobuler lobulus hepar tersebut diamati dengan pembesaran 400 kali kemudian ditentukan jumlah inti sel yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis dari tiap 100 sel.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan uji *One-Way Analysis of Variant* (ANOVA). Jika terdapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc*. Derajat signifikansi yang digunakan adalah $\alpha=0,05$ (Riwidikdo 2007).

Syarat dilakukan uji *One-Way ANOVA* adalah variabel data berupa variabel numerik/kontinu/rasio. Data pada penelitian ini adalah skor kerusakan histologis sel hepar mencit yang dinyatakan dengan angka rasio. Sebaran data harus normal, hal ini dibuktikan dengan nilai uji Kolmogorov-Smirnov atau Saphiro-Wilk yang memiliki nilai p lebih besar daripada nilai α . Misalnya nilai $\alpha=0,05$ maka nilai p untuk uji sebaran data harus $>0,05$. Varians data harus sama. Hal ini dapat diketahui dengan menggunakan uji *Homogeneity of Variances*, dimana untuk varians data yang sama akan memiliki nilai $p >$ nilai α . Jika

ketiga syarat tersebut tidak terpenuhi maka dapat digunakan uji hipotesis alternatif yaitu berupa uji hipotesis non-parametrik Kruskal-Wallis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Hasil rata-rata skor jumlah kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada masing-masing kelompok disajikan pada Tabel 1. Skor kerusakan yang paling tinggi adalah pada kelompok P1 yaitu $60,300 \pm 10,698$ dan skor kerusakan paling rendah adalah pada kelompok kontrol (K) yaitu $28,500 \pm 7,487$.

Data yang diperoleh dari hasil penelitian, pertama kali diuji adanya perbedaan skor rata-rata kerusakan sel hepar mencit yang signifikan antara keempat kelompok dengan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program komputer *Statistical Product and Service Solution (SPSS) 17.0 for Windows*.

Metode analisis yang dapat digunakan untuk menentukan sebaran data termasuk normal atau tidak normal adalah uji Kolmogorov-Smirnov (sampel > 30) atau uji Saphiro-Wilk (sampel < 30). Pada penelitian ini digunakan 40 sampel sehingga digunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk menentukan sebaran data termasuk normal atau tidak.

Nilai p dari hasil uji Kolmogorov-Smirnov untuk kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 berturut-turut yaitu 0,156; 0,200; 0,200; dan 0,200 dimana keempat nilai tersebut lebih besar dari $\alpha=0,05$. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa sebaran data kelompok kontrol normal, sebaran data kelompok perlakuan 1 normal, sebaran data kelompok perlakuan 2 normal, dan sebaran data kelompok perlakuan 3 normal.

Syarat kedua untuk menggunakan uji *One-Way ANOVA* telah terpenuhi, selanjutnya dilakukan uji *Homogeneity of Variances* untuk mengetahui varians data tergolong sama atau tidak. Nilai p yang didapatkan dari uji *Homogeneity of Variances* adalah sebesar 0,670, dimana nilai tersebut lebih besar dari 0,05 dan dapat diartikan bahwa varians data antarkelompok sama. Syarat ketiga untuk menggunakan uji *One-Way ANOVA* telah terpenuhi, sehingga uji *One-Way ANOVA* dapat dilakukan.

Nilai p dari hasil uji *One-Way ANOVA* adalah sebesar 0,000 ($p < 0,05$), sehingga terdapat perbedaan skor rata-rata kerusakan histologis sel hepar yang signifikan antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan 1, kelompok perlakuan 2, dan kelompok perlakuan 3.

Oleh karena didapatkan adanya perbedaan yang signifikan dari empat kelompok tersebut maka uji statistik dilanjutkan dengan uji *Post-Hoc* untuk mengetahui kelompok-kelompok yang menunjukkan perbedaan rata-rata skor jumlah kerusakan histologis sel hepar. Adapun uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji LSD (Tabel 2).

Tabel 1. Rerata skor kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada masing-masing kelompok perlakuan

Kelompok	Rata-rata Skor	Standar Deviasi
K	28,500	7,487
P1	60,300	10,698
P2	38,000	6,667
P3	33,400	6,077

Keterangan: K = Kelompok kontrol, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3

Tabel 2. Ringkasan hasil uji LSD ($\alpha=0,05$)

Kelompok	p	Signifikansi
K – P1	0,000	Signifikan
K – P2	0,014	Signifikan
K – P3	0,162	Tidak signifikan
P1 – P2	0,000	Signifikan
P1 – P3	0,000	Signifikan
P2 – P3	0,365	Tidak signifikan

Keterangan: K = Kelompok kontrol, P1 = kelompok perlakuan 1, P2 = kelompok perlakuan 2, P3 = kelompok perlakuan 3

Pembahasan

Sel-sel hati berbentuk poligonal, dengan 6 permukaan atau lebih, dan mempunyai garis tengah kira-kira 20-30 μm . Ukurannya bermacam-macam, inti besar, bulat, atau lonjong, dengan permukaan sel teratur, besarnya bervariasi antar satu sel dengan sel lainnya, vesicular atau kadang-kadang berinti dua, serta mempunyai sitoplasma granula asidofil. Pada potongan yang diwarnai dengan Hematoksilin dan Eosin, sitoplasma hepatosit bersifat eosinofilik terutama karena adanya mitokondria dalam jumlah besar dan sedikit retikulum endoplasma halus. Pada sel hati jarang ditemukan mitosis, tetapi banyak sel mitosis ditemukan selama penyembuhan setelah cedera (Fiore dan Mariano 1996; Junqueira dan Carneiro 1995; Lesson et al. 1996).

Sel hepar mencit yang terpapar parasetamol akan mengalami kerusakan yang digambarkan dengan terdapatnya inti sel yang mengalami piknotik, karioreksis, dan kariolisis. Adapun dengan pemberian parasetamol ditambah dengan ekstrak biji kakao, derajat kerusakan sel hepar yang didapatkan lebih sedikit dibandingkan dengan pemberian parasetamol tanpa ekstrak biji kakao, karena ekstrak biji kakao memiliki efek hepatoprotektif terhadap efek toksik yang disebabkan oleh pemberian parasetamol. Kelompok kontrol digunakan sebagai pembanding terhadap kelompok parasetamol dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol hanya diberikan akuades sebagai placebo dan diharapkan kerusakan sel hepar yang terjadi dapat seminimal mungkin, dimana derajat kerusakan pada kelompok kontrol dianggap sebagai derajat normal.

Dari uji *One-Way ANOVA* didapatkan perbedaan yang signifikan antara keempat kelompok perlakuan. Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok K-P1, K-P2, P1-P2, dan P1-3, tetapi antara kelompok K-P3 dan P2-P3 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Hasil uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari skor rata-rata kerusakan sel hepar pada kelompok kontrol dan P1. Hal ini terjadi karena kelompok P1 mengalami kerusakan sel hepar akibat pemberian parasetamol dosis toksik. Hasil tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa parasetamol dosis toksik mengakibatkan kerusakan sel hepar (Hardman dan Limbird 2008).

Kerusakan sel hepar disebabkan oleh metabolit antara parasetamol yang berikatan dengan protein sel. Metabolit antara tersebut dikenal dengan *quinoneimin* yang dibentuk oleh enzim P450. Pada dosis terapeutik parasetamol, *quinoneimin* yang terbentuk akan berkonjugasi dengan *glutathion*. Pada dosis yang lebih besar, *glutathion* yang tersedia akan semakin sedikit dan akhirnya habis. Akibatnya, *quinoneimin* akan berikatan dengan gugus sulfhidril (-SH) protein sel dan menyebabkan nekrosis sel hepar (Hodgson dan Levi 2000; Smith dan Reynard 1992). *Glutathion* berperan sebagai antioksidan. Sebagai antioksidan, tripeptida tersebut difasilitasi oleh gugus sulfhidril dari sistein (Winarsi 2007).

Pada kelompok kontrol didapatkan juga gambaran inti sel hepar yang mengalami piknosis, karioreksis, dan kariolisis. Hal ini diduga disebabkan oleh proses penuaan dan kematian sel secara fisiologis setiap 150 hari serta akibat pengaruh variabel luar yang tidak dapat dikendalikan (Gartner dan Hiatt 2007).

Dari hasil analisis skor kerusakan sel antara kelompok P1-P2 didapatkan perbedaan yang signifikan. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis I yaitu 1,12 mg/20 g BB mencit selama 14 hari berturut-turut dapat mengurangi jumlah inti sel hepar yang mengalami kerusakan akibat pemberian parasetamol. Menurut Kumar et al. (2005), hepatotoksitas dapat dikurangi dengan pemberian antioksidan. Kakao mengandung antioksidan dalam bentuk flavonoid. Flavonoid mampu menangkap radikal bebas (*free radical scavengers*) dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya (Keen 2001; Ide 2008). Melalui mekanisme antioksidan tersebut, ekstrak biji kakao dapat mencegah kerusakan histologis sel hepar.

Kelompok P2 merupakan kelompok perlakuan setelah pemberian ekstrak biji kakao dosis 1,12 mg/20 g BB mencit dan parasetamol. Hasil analisis kerusakan sel hepar pada kelompok P2 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol dan kelompok P1. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis 1,12 mg/20 g BB mencit dapat mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol, tetapi tidak dapat mengembalikan sel hepar pada kondisi seperti pada kelompok kontrol.

Hasil kelompok P3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok P1, namun menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok kontrol. Hal ini berarti pemberian ekstrak biji kakao dengan dosis 2,24 mg/20 g BB dapat mengurangi kerusakan sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol dan mempertahankan sel hepar pada kondisi seperti kelompok kontrol.

Derajat kerusakan sel hepar pada kelompok P2 lebih besar daripada kelompok P3, namun hasil uji LSD menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan. Hal ini

berarti peningkatan dosis ekstrak biji kakao dapat meningkatkan efek proteksi terhadap kerusakan sel hepar yang ditimbulkan oleh parasetamol, tetapi peningkatannya tidak signifikan. Menurut Bourne dan Roberts (1998), kurva hubungan antara dosis dan efek obat berbentuk sigmoid dengan suatu bagian tengah yang lurus atau linier. Dengan bertambahnya dosis obat, peningkatan respons berkurang, dan akhirnya dosis maksimal tercapai, dimana responsnya tidak dapat ditingkatkan lagi. Pengaruh ekstrak biji kakao terhadap kerusakan sel hepar yang diinduksi parasetamol dapat dianalogikan dengan cara kerja obat tersebut. Apabila dosis ekstrak biji kakao digambarkan dalam kurva hubungan antara dosis dan efek obat maka efek dosis I dan dosis II berada pada bagian kurva yang hampir lurus atau linier, sehingga peningkatan efeknya tidak terlalu signifikan.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terbukti adanya efek proteksi ekstrak biji kakao terhadap sel hepar berupa pengurangan jumlah kerusakan sel hepar mencit yang diinduksi parasetamol pada dosis I, yaitu sebesar 1,12 mg/20 g BB, meskipun belum optimal karena hasilnya belum sebanding dengan kelompok kontrol. Adapun pada dosis yang lebih besar, yaitu dosis II sebesar 2,24 mg/20 g BB, terbukti adanya peningkatan efek proteksi ekstrak biji kakao terhadap hepar meskipun perbedaannya tidak signifikan dibandingkan dengan dosis I dan hasilnya cukup optimal karena hasilnya sebanding dengan kelompok kontrol.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak biji kakao dapat mengurangi kerusakan histologis sel hepar mencit akibat pemberian parasetamol.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberta G, Canada G. 2006. Drug bank: Acetaminophen (APRD00252). redpoll.pharmacy.ualberta.ca. [26 November 2009].
- Bourne HR, Roberts JW. 1998. Reseptor-reseptor obat dan farmakodinamik. In: Katzung BG. Farmakologi Dasar dan Klinik, Edisi VI. EGC, Jakarta.
- Engler MB, Engler MM, Chen CY et al. 2004. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentration in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 23: 197-204.
- Fiore, Mariano SH. 1996. Atlas histologi manusia. Edisi ke-6. EGC, Jakarta.
- Flammer AJ, Hermann F, Sudano I et al. 2007. Dark chocolate improves coronary vasomotion and reduces platelet reactivity. *Circulation* 116: 2376-2382.
- Gartner LP, Hiatt JL. 2007. Color textbook of histology. 3rd edition. Elsevier Inc., China.
- Gunnell D, Murray V, Hawton K. 2000. Use of paracetamol (acetaminophen) for suicide and nonfatal poisoning: Worldwide patterns of use and misuse. *Suicide Life Threat Behav* 30(4): 313-326.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. 2008. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 10th edition. McGraw-Hill Companies, New York.
- Hodgson E, Levi PE. 2000. A textbook of modern toxicology. McGraw-Hill Companies Inc., Singapore.
- Ide P. 2008. Dark chocolate healing. PT Elex Media Computindo, Jakarta.

- James LP, Mayeux PR., Hinson JA. 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Clin Pharmacol Ther* 31: 1499-1506.
- Jenkins DJA, Kendall CWC, Vuksan V et al. 2000. Effect of cocoa bran on low-density lipoprotein oxidation and fecal bulking. *Arch Intern Med* 160: 2374-2379.
- Junqueira LC, Carneiro J. 1995. *Histologi dasar*. Edisi ke-3. EGC, Jakarta.
- Keen CL. 2001. Chocolate: Food as medicine/medicine as food. *J Am Coll Nutr* 20: 436-439.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N. 2005. *Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Elsevier Inc., China.
- Lamuela-Raventós RML, Pérez AIR., Lacueva CA et al. 2005. Health effects of cocoa flavonoids. *SAGE Journals* 11: 159.
- Leeson CR, Leeson TR, Paparo AA. 1996. *Buku teks histologi*. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Lucas AM, Hennig G, Dominick PK et al. 2000. Ribose cysteine protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. *Toxicol Pathol* 28: 697-704.
- McKim SE, Konno A, Uesugi T et al. 2002. Cocoa extract protects against early alcohol-induced liver injury in the rat. *Arch Biochem Biophys* 406 (1): 40-46.
- Murti B. 2006. *Desain dan ukuran sampel untuk penelitian kuantitatif dan kualitatif di bidang kesehatan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Ngatidjan. 1991. *Petunjuk laboratorium: Metode laboratorium dalam toksikologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Purawisastra S. 2001. Penelitian pengaruh isolat galaktomannan kelapa terhadap penurunan kadar kolesterol serum kelinci. digilib.itb.ac.id. [26 November 2009].
- Rein D, Paglieroni TG, Wun T et al. 2000. Cocoa inhibits platelet activation and function. *Am J Clin Nutr* 72: 30-35.
- Riwidikdo H. 2007. *Statistik kesehatan, belajar mudah teknik analisis data dalam penelitian kesehatan*. Mitra Cendikia Press, Yogyakarta.
- Sabrang R. 2008. Pengaruh Minyak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) terhadap Kerusakan Histologis Hepar Mencit (*Mus musculus*) yang Diinduksi Parasetamol. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Smith CM, Reynard AM. 1992. *Textbook of Pharmacology*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Taufiqurohman MA. 2003. *Metodologi Penelitian Kedokteran dan Kesehatan*. CSGF, Surakarta.
- Wilmana PF, Gunawan SG. 2007. Analgesik-antipiretik analgesik anti-inflamasi nonsteroid dan obat gangguan sendi lainnya. In: Gunawan SG (ed). *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Gaya Baru, Jakarta.
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Kanisius, Yogyakarta.

Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan waktu penyimpanan terhadap kualitas daging ikan tongkol

The effect of ethanol extracts concentration of mengkudu fruit (*Morinda citrifolia*) and storage time toward *Euthynnus affinis* meat quality

VENERANDA SONYA AYU, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI, TJAHJADI PURWOKO

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 28 Juli. Revisi disetujui: 23 Agustus 2010.

Abstract. Ayu VS, Nugraheni ER, Purwoko T. 2010. The effect of ethanol extracts concentration of mengkudu fruit (*Morinda citrifolia*) and storage time toward *Euthynnus affinis* meat quality. *Biofarmasi* 8: 58-65. High protein content in fish and the storage in a relatively short time will encourage the growth of bacteria. Therefore, the preservation techniques are required to expand the fish store. The use of formalin as a preservative substance, especially for fish, can damage to health, so it is necessary to find out the preservative substance as an alternative to substitute formalin. Mengkudu fruit (*Morinda citrifolia* L.) contains compounds that have an antibacterial activity, such as alkaloids and flavonoids. The purposes of this study were to determine the effect of ethanol extract concentration of mengkudu fruit and the storage time on the number of bacteria in *Euthynnus affinis* meat, and the concentration which have the same activity with formalin in inhibiting the number of bacteria in *E. affinis* meat. This research used a completely randomized design. The tested sample was *Euthynnus affinis* meat that soaked in ethanol extract of mengkudu fruit with concentrations between 10-100%. Every four hours, the TPC test, the water content, pH value and temperature of samples were measured. The results of observation were analyzed by ANOVA, further the results that significantly different were followed by a DMRT test with 95% confidence level. Based on the statistical analysis, the concentration of ethanol extract of mengkudu fruit and the storage time were significantly ($p < 0.05$) in inhibiting the number of bacteria in *Euthynnus affinis* meat. The concentrations of extracts 80%, 90% and 100% had almost same activity to formalin in inhibiting the number of bacteria in *Euthynnus affinis* meat.

Keywords: *Euthynnus affinis*, *Morinda citrifolia*, meat quality, storage time

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara perairan yang kaya akan ikan laut. Menurut Sulistiyarto (2002), berdasarkan data FAO dari tahun 1994 sampai 1999, total perikanan dunia mengalami peningkatan, bahkan diprediksi akan terjadi peningkatan jumlah kebutuhan ikan pada tahun 2010, yaitu berkisar antara 105-110 juta ton berat basah. Hal ini disebabkan pertumbuhan jumlah penduduk dunia sekitar 1,8% per tahun, terutama di negara-negara berkembang (Sulistiyarto 2002).

Ikan tongkol (*Euthynnus affinis*) (Muklis et al. 2009) termasuk salah satu jenis ikan laut yang terdapat di perairan Indonesia. Ikan tongkol merupakan sumber protein hewani yang banyak dikonsumsi masyarakat. Tingginya kadar protein mencerminkan tingginya kualitas daging ikan. Namun demikian, dengan tingginya kandungan protein akan memacu pertumbuhan bakteri yang dapat menimbulkan kerusakan. Menurut Fardiaz (1992), kerusakan bahan pangan, termasuk ikan, disebabkan bakteri memiliki berbagai enzim yang dapat memecah komponen-komponen kompleks menjadi senyawa-senyawa sederhana yang mengakibatkan terjadinya perubahan-perubahan sifat, seperti warna, bau,

rasa, dan tekstur. Oleh karena itu, diperlukan teknik pengawetan untuk mengatasi kerusakan pada daging ikan.

Teknik pengawetan adalah suatu metode untuk memperpanjang waktu simpan bahan pangan, dalam hal ini daging ikan. Teknik pengawetan yang umum dilakukan untuk mengatasi kerusakan tersebut adalah dengan pemberian es. Metode ini hanya mampu mempertahankan kualitas ikan dalam beberapa jam saja. Sementara itu, banyak dijumpai produsen ikan menggunakan formalin sebagai bahan pengawet.

Penggunaan formalin sangat dilarang oleh Pemerintah Indonesia, karena dapat mengakibatkan luka korosif pada lapisan mukosa saluran pencernaan dan disertai mual, muntah, dan rasa perih; pengaruh sistemik berupa depresi susunan saraf pusat, koma, kejang, dan terdapat sel darah merah pada urin; terjadi kerusakan hati, jantung, otak, limpa, pankreas, dan ginjal; serta formalin bersifat karsinogenik (Setyabudi et al. 2008). Dengan demikian, perlu dicari alternatif pengawet makanan, terutama daging ikan, yang aman bagi kesehatan dan memiliki aktivitas antibakteri.

Salah satu jenis tanaman yang memiliki aktivitas antibakteri adalah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). Buah mengkudu digunakan sebagai obat antihipertensi,

antikanker, dan antibakteri. Senyawa antibakteri yang terdapat dalam buah mengkudu adalah *acubin*, *lasperuloside*, *alizarin*, serta komponen *antraquinon* lainnya. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaui*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, dan *Shigella* (Winarti 2005).

Menurut Mangunwardoyo et al. (2007), bakteri patogen yang terdapat pada ikan laut adalah *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, dan *Enterobacteriaceae*. Adapun berdasarkan laporan penelitian Purwani et al. (2008), 4 dari 10 isolat bakteri pada daging dan ikan laut segar meliputi *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, serta *Escherichia coli*.

Berdasarkan latar belakang tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas senyawa antibakteri buah mengkudu pada daging ikan laut. Dalam penelitian ini dilakukan uji secara *in vivo* untuk diketahui jumlah bakteri pada daging ikan tongkol seiring dengan bertambahnya waktu penyimpanan, serta kualitas daging ikan tongkol berdasarkan pengaruh faktor-faktor lingkungan, yaitu kadar air, pH, dan suhu.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu terhadap jumlah bakteri pada daging ikan tongkol, pengaruh waktu penyimpanan terhadap jumlah bakteri pada daging ikan tongkol, serta konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu yang memiliki aktivitas yang sama dengan formalin dalam menghambat jumlah bakteri pada daging ikan tongkol.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan di Sub-Laboratorium Biologi Pusat Universitas Sebelas Maret Surakarta dari Juni 2009 sampai Januari 2010.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi kain hitam, tampah, pisau, telenan, baskom, nampan, gelas beker 1 L, corong gelas, oven, blender, stoples maserasi, Erlenmeyer 1 L, *rotary evaporator*, neraca digital, *waterbath*, botol flakon, gelas arloji, sarung tangan, masker, spatula, mikropipet, *blue tip*, *yellow tip*, gelas beker 50 ml, pinset, cawan petri, botol semprot (untuk alkohol 70%), tabung reaksi, rak tabung reaksi, *dryglasky*, mikropipet, erlenmeyer, gelas beker, kamera digital, *bunsen burner*, LAF, inkubator, *colony counter*, *autoclave*, pH-meter, dan termometer.

Sementara itu, bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mengkudu yang diperoleh dari Desa Sukomangu, Kota Purwanto, Kabupaten Wonogiri. Buah mengkudu tersebut berumur 4-5 bulan dengan tingkat kematangan sedang (buah berwarna kuning keputihan). Bahan-bahan lainnya diantaranya etanol 96% (untuk maserasi), kertas saring, CMC 0,1%, akuades, kertas label, daging ikan tongkol segar dari agen ikan laut di Kota Surakarta, ekstrak etanol buah mengkudu konsentrasi 10-100%, formalin 1%, garam fisiologis 0,9%, *peptone water*

0,1 %, media NA, alkohol 70% (untuk sterilisasi alat, LAF), *aluminium foil*, dan CMC 0,1%.

Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental dengan menggunakan RAL dua arah. Penelitian ini menggunakan 2 faktor, yaitu konsentrasi ekstrak buah mengkudu yang terdiri dari 12 perlakuan yaitu konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%, formalin 1%, dan waktu penyimpanan yang terdiri dari 5 perlakuan, yaitu 0, 4, 8, 12, dan 16 jam. Penelitian dilakukan dengan dua kali ulangan perlakuan.

Cara kerja

Penyiapan sampel buah mengkudu

Buah mengkudu dicuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya, buah mengkudu diiris tipis, pemotongan ini bertujuan untuk mempercepat proses pengeringan. Pengeringan dilakukan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam, selanjutnya buah mengkudu dikeringkan lagi di dalam oven bersuhu 45°C. Buah mengkudu yang telah kering dihancurkan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.

Ekstraksi dan pembuatan seri konsentrasi ekstrak buah mengkudu

Serbuk buah mengkudu ditimbang hingga konstan menggunakan neraca digital kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96% selama 24 jam. Setelah 24 jam, hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan corong gelas, kemudian filtrat (maserat) I yang dihasilkan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga dihasilkan ekstrak etanol. Ekstrak etanol tersebut kemudian dikeringkan menggunakan *waterbath* hingga berbentuk pasta. Ampas serbuk buah mengkudu dimaserasi kembali seperti cara sebelumnya sebanyak tiga kali ulangan sehingga diperoleh filtrat II dan III, kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dan dikeringkan menggunakan *waterbath* hingga berbentuk pasta.

Seri konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu dibuat dengan cara menimbang sejumlah ekstrak kasar sesuai dengan besarnya konsentrasi yang akan dibuat (10-100%). Ekstrak yang sudah ditimbang menggunakan neraca digital, dilarutkan ke dalam CMC 0,1% dan dihomogenkan secara sempurna.

Uji in vivo daging ikan tongkol

Ikan tongkol segar dengan saluran pencernaan yang telah dibuang, dicuci bersih dengan air mengalir. Selanjutnya, daging ikan tongkol dipotong-potong dan ditimbang dengan berat rata-rata 12 gram. Daging ikan tongkol direndam dengan ekstrak etanol buah mengkudu untuk masing-masing seri konsentrasi selama 2 menit, kemudian disimpan pada suhu kamar untuk diuji ALT setiap 4 jam. Sebagai kontrol digunakan formalin 1%.

Uji ALT daging ikan tongkol

Uji ALT dilakukan secara aseptis setiap 4 jam terhadap sampel daging ikan tongkol. Semua peralatan yang digunakan disterilkan terlebih dahulu menggunakan

autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit. Daging ikan tongkol yang telah direndam ekstrak selanjutnya dihancurkan dan dihomogenasi dengan *peptone water* 0,1% dan garam fisiologis 0,9% di dalam erlenmeyer steril. Sebanyak 100 µl sampel diambil menggunakan pipet, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi 9,9 ml *peptone water* 0,1% dan garam fisiologis 0,9% sebagai pengenceran 10⁻², selanjutnya sebanyak 100 µl diambil dari pengenceran 10⁻² dimasukkan ke dalam tabung kedua sebagai pengenceran 10⁻⁴, proses berlanjut hingga pengenceran 10⁻⁸. Keempat tabung reaksi tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex*. Hasil dilusi untuk tiap faktor pengenceran ditumbuhkan ke dalam cawan petri steril yang berisi media NA sebanyak 100 µl. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung menggunakan *colony counter* (Depkes RI 1995).

Uji kadar air daging ikan tongkol

Potongan daging ikan tongkol dengan berat sekitar 1 gram direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu untuk masing-masing konsentrasi selama 2 menit, kemudian disimpan pada suhu kamar setiap 4 jam. Uji kadar air ini dilakukan dengan penimbangan botol flakon kosong menggunakan neraca digital. Selanjutnya, botol flakon diisi dengan potongan daging ikan tongkol seberat 1 gram yang sudah diuji secara *in vivo* untuk masing-masing konsentrasi ekstrak kemudian dilakukan penimbangan kembali. Berat botol flakon kosong yang berisi potongan daging ikan tongkol tersebut dianggap sebagai berat sampel awal. Botol flakon yang berisi potongan daging ikan tongkol kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 100°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, botol flakon berisi potongan daging ikan tongkol ditimbang kembali hingga konstan menggunakan neraca digital dan nilainya dianggap sebagai berat sampel akhir. Selisih antara berat basah dengan berat kering adalah nilai perubahan kadar air dalam daging ikan tongkol. Berikut ini rumus penghitungan kadar air dalam daging ikan tongkol:

$$\frac{\text{berat sampel awal}-\text{berat sampel akhir}}{\text{berat sampel awal}} \times 100\%$$

Uji nilai pH daging ikan tongkol

Potongan daging ikan tongkol dengan berat sekitar 1 gram direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu untuk masing-masing konsentrasi selama 2 menit, kemudian disimpan pada suhu kamar untuk diukur nilai pH-nya setiap 4 jam menggunakan pH-meter yang sebelumnya telah dikalibrasi. Sebagai kontrol digunakan formalin 1%.

Uji suhu daging ikan tongkol

Potongan daging ikan tongkol dengan berat sekitar 1 gram direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu untuk masing-masing konsentrasi selama 2 menit, kemudian disimpan pada suhu kamar untuk diukur suhunya setiap 4 jam menggunakan termometer. Sebagai kontrol digunakan formalin 1%.

Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis dengan ANAVA. Jika terdapat perbedaan yang nyata maka dilanjutkan dengan uji DMRT dengan tingkat kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tahap preparasi dan pengujian awal

Buah mengkudu yang digunakan dalam penelitian ini berumur sekitar 4 bulan dan berwarna kuning keputihan, karena memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi (Hilman 2009). Sebelum dibuat serbuk, buah mengkudu mengalami proses penyiapan yang meliputi penyortiran, pencucian, pemotongan, pengeringan, serta penghancuran, sehingga diperoleh simplisia serbuk sebanyak 1200 gram. Pembuatan serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan partikel yang berinteraksi dengan pelarut sehingga mempermudah melarutkan metabolit sekunder. Tahap selanjutnya dilakukan ekstraksi dan pembuatan seri konsentrasi.

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dengan etanol 96% bertujuan untuk menyari senyawa-senyawa yang bersifat polar, seperti senyawa golongan polifenol, fenol, glikosida, dan flavonoid (Virganita 2009). Setelah itu dilakukan pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu dengan pelarut CMC 0,1%. CMC merupakan turunan selulosa bersifat mudah larut dalam air yang berfungsi untuk melarutkan ekstrak. Pada tahap berikutnya dilakukan uji *in vivo*, selanjutnya dilakukan uji ALT serta faktor-faktor lingkungan (kadar air, pH, dan suhu) pada daging ikan tongkol.

Hasil perhitungan jumlah bakteri pada daging ikan tongkol dengan metode ALT

Uji ALT dilakukan secara aseptis setiap 4 jam terhadap sampel daging ikan tongkol. Semua peralatan yang digunakan dalam kondisi steril, karena sebelumnya telah dicuci dengan air mengalir, dikeringkan, dan disterilkan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 30 menit. Uji ALT dilakukan di dalam ruang LAF untuk menciptakan kondisi yang steril. Tahapan uji ALT meliputi proses homogenisasi sampel, pengenceran, penanaman pada media padat (inokulasi), tahap inkubasi, serta penghitungan jumlah koloni bakteri (Badan POM 2008).

Tahap homogenisasi sampel merupakan tahap pendahuluan dalam pengujian. Tahap homogenisasi sampel dalam penelitian ini yaitu daging ikan tongkol dicuci bersih dengan air mengalir, kemudian dihancurkan dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer untuk selanjutnya dilakukan tahap pengenceran. Homogenisasi bertujuan untuk membebaskan sel bakteri yang mungkin terlindung partikel sampel dan untuk memperoleh distribusi bakteri sebaik mungkin (Badan POM 2008).

Tahap pengenceran bertujuan untuk mengurangi kepekatan mikroba dalam suatu larutan, sehingga diperoleh koloni murni. Pengenceran menggunakan larutan pengencer yang berfungsi untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin kehilangan vitalitasnya akibat

kondisi di dalam sampel yang kurang menguntungkan (Badan POM 2008). Larutan pengencer yang digunakan adalah *peptone water* 0,1% dan garam fisiologis 0,9%. *Peptone water* berfungsi untuk mempertahankan sel (fase tumbuh) dan sebagai sumber nutrisi bagi bakteri, sedangkan garam fisiologis mengandung ion-ion yang berfungsi dalam metabolisme sel bakteri. Larutan pengencer dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi cacahan daging ikan tongkol. Pengenceran dilakukan hingga 10^{-8} .

Tahap berikutnya adalah penanaman bakteri pada media padat (inokulasi). Inokulasi suspensi sampel ke dalam media NA steril dilakukan dengan metode cawan sebar menggunakan *dryglasky*. Pada media NA terkandung natrium sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan bakteri pada sampel. Selanjutnya, cawan petri tersebut diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam, hal ini bertujuan untuk menumbuhkan koloni bakteri. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh dihitung menggunakan *colony counter* (Depkes RI 1995). Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri pada daging ikan tongkol menggunakan metode ALT dapat dilihat pada Gambar 1.

Jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada 4 jam penyimpanan cenderung mengalami peningkatan, kecuali pada konsentrasi 80%, 90%, dan 100% serta formalin 1%. Peningkatan jumlah bakteri tersebut mempengaruhi peningkatan suhu, seperti pada Gambar 4. Hal ini disebabkan semakin tinggi pertumbuhan bakteri maka suhu semakin meningkat, karena bakteri aktif melakukan metabolisme untuk pertumbuhan sel. Adapun pada konsentrasi 80%, 90%, dan 100% serta formalin 1% cenderung mengalami penurunan jumlah bakteri. Penurunan jumlah bakteri pada awal penyimpanan mempengaruhi penurunan kadar air dan pH. Menurut Yanti et al. (2008), hasil metabolisme bakteri antara lain air yang dapat meningkatkan kadar air pada daging. Oleh karena itu, semakin sedikit bakteri yang tumbuh maka jumlah air yang dihasilkan juga semakin rendah.

Secara keseluruhan, grafik hasil perhitungan jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu selama 4 jam penyimpanan (Gambar 1) cenderung mengandung jumlah bakteri yang masuk dalam batas kelayakan konsumsi, kecuali pada konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Batas maksimal cemaran bakteri pada daging segar sesuai Standar Nasional Indonesia (SNI) No. 01-6366-2000 yaitu 1×10^4 CFU/gram (Yanti et al. 2008). Jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 10%, 20%, dan 30% cenderung meningkat melebihi batas kelayakan konsumsi ($>10^4$ CFU/gram) hingga 16 jam. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa senyawa antibakteri dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 10%, 20%, dan 30% tidak efektif menghambat pertumbuhan bakteri pada daging ikan tongkol. Hal ini dapat terjadi akibat terdegradasinya komponen-komponen senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri, akan tetapi komponen-komponen nutrisi seperti gula, senyawa logam, atau serat masih bersifat aktif dan berperan dalam metabolisme sel,

sehingga dimanfaatkan sel bakteri untuk meningkatkan pertumbuhannya (Rahayu 2000). Selain itu, terjadinya peningkatan jumlah bakteri hingga 16 jam diduga disebabkan tingginya kandungan lemak dalam daging ikan yang mampu membentuk lapisan pada permukaan bakteri, sehingga mencegah penetrasi zat antibakteri dari ekstrak ke dalam sel bakteri.

Daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada 8 jam penyimpanan memiliki jumlah bakteri yang cenderung meningkat. Peningkatan jumlah bakteri tersebut menyebabkan terjadinya peningkatan kadar air dan suhu. Berdasarkan Gambar 1, hasil perhitungan jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 40%, 50%, 60%, dan 70% melebihi batas kelayakan konsumsi ($>10^4$ CFU/gram), sehingga diasumsikan bahwa ekstrak tersebut hanya mampu mempertahankan masa simpan daging ikan tongkol selama 4 jam penyimpanan. Adapun jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 80%, 90%, dan 100% serta formalin 1% selama 8 jam penyimpanan masuk dalam batas kelayakan konsumsi ($<10^4$ CFU/gram), sehingga ekstrak tersebut masih berfungsi efektif untuk mengawetkan daging ikan.

Pada 12 jam penyimpanan, jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol pada konsentrasi 80% mengalami peningkatan hingga melebihi batas kelayakan konsumsi ($>10^4$ CFU/gram). Peningkatan jumlah bakteri tersebut didukung oleh faktor lingkungan, yaitu pH dan suhu. Hal ini disebabkan semakin tinggi pH dan suhu maka akan terjadi peningkatan jumlah bakteri, begitu juga sebaliknya. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80% hanya mampu mempertahankan masa simpan daging ikan selama 8 jam penyimpanan.

Jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu konsentrasi 90% cenderung menurun pada 12 jam penyimpanan dengan jumlah bakteri di bawah batas ($<10^4$ CFU/gram). Penurunan tersebut mempengaruhi penurunan pH dan suhu. Menurut Yanti et al. (2008), pH rendah, yaitu 5,1-6,1, menyebabkan daging mempunyai stabilitas yang lebih baik terhadap kerusakan oleh mikroorganisme, sedangkan pH daging ikan yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 90% adalah 5. Oleh karena itu, pernyataan Yanti et al. (2008) sesuai dengan penelitian ini. Akan tetapi, jumlah bakteri meningkat melebihi batas ($>10^4$ CFU/gram) pada 16 jam penyimpanan. Peningkatan tersebut mempengaruhi kadar air dan suhu. Berdasarkan uraian tersebut maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 90% mampu memperpanjang masa simpan daging ikan tongkol selama 12 jam penyimpanan.

Daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 100% mampu memperpanjang masa simpan daging ikan tongkol hingga 16 jam. Terjadinya penghambatan jumlah bakteri oleh ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 100% didukung oleh pengaruh faktor lingkungan, yaitu kadar air.

Hal ini sesuai dengan pernyataan Wulandari et al. (2005) bahwa kadar air merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi daya tahan suatu bahan pangan. Semakin rendah kadar air maka semakin lambat pertumbuhan bakteri, sehingga bahan pangan dapat tahan lama untuk disimpan. Sebaliknya, semakin tinggi kadar air, semakin cepat pertumbuhan bakteri. Menurut Nursal et al. (2006), salah satu faktor yang dapat menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan koloni bakteri adalah kerusakan pada komponen struktural membran sel bakteri akibat pengaruh aktivitas senyawa antibakteri. Selain itu, tingginya kandungan senyawa antibakteri dan antioksidan dalam ekstrak dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam jangka waktu yang lama. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1988) bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka semakin tinggi aktivitas antibakterinya.

Berdasarkan analisis statistik, diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol buah mengkudu dan waktu penyimpanan berpengaruh signifikan ($p < 0,05$) terhadap jumlah bakteri pada daging ikan tongkol, serta ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80%, 90%, dan 100% memiliki aktivitas antibakteri yang hampir sama dengan formalin dalam menghambat jumlah bakteri pada daging ikan tongkol. Hal ini sesuai dengan pernyataan Zuhud et al. (2001) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka jumlah senyawa antibakteri yang dilepaskan semakin besar, sehingga mempermudah penetrasi senyawa tersebut masuk ke dalam sel. Secara umum dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan lama waktu kontak maka aktivitas antibakteri ekstrak semakin baik.

Tingginya kandungan senyawa antibakteri dalam ekstrak etanol buah mengkudu, yaitu senyawa fenol, akan mempengaruhi keawetan suatu bahan pangan. Hal ini disebabkan kemampuan fenol untuk mendenaturasi protein dan merusak membran sel dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel karena senyawa fenol mampu bermigrasi dari fase cair ke lemak (Rahayu 2000). Selain itu, adanya senyawa antioksidan dalam buah mengkudu dapat menghambat autooksidasi pada lemak dengan menghambat reaksi antara peroksida aktif dan ikatan rangkap lemak (Rini 2009). Senyawa antioksidan juga berfungsi sebagai antibakteri karena kemampuannya membentuk kompleks dengan protein yang larut, protein ekstraseluler, dan dinding sel bakteri (Kresnawaty et al. 2009).

Berdasarkan hasil analisis statistik dengan uji T, terdapat perbedaan jumlah bakteri pada daging ikan tongkol antara perlakuan kontrol dan formalin 1%. Pada kontrol, jumlah bakteri meningkat karena jumlah bakteri pada 16 jam penyimpanan berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan jumlah bakteri pada 0 jam. Adapun daging ikan tongkol yang direndam dengan formalin 1% cenderung mengalami penghambatan jumlah bakteri karena jumlah bakteri pada 16 jam dan 0 jam penyimpanan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$), hal ini sesuai dengan hasil grafik ALT (Gambar 1) bahwa formalin 1% mampu mempertahankan masa simpan daging ikan tongkol hingga 16 jam dengan jumlah bakteri paling rendah. Hal ini dikarenakan formalin memiliki unsur aldehida yang mudah bereaksi dengan

protein dan membentuk lapisan baru yang melindungi lapisan di bawahnya, sehingga tahan terhadap serangan bakteri lain.

Hasil uji faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi kualitas daging ikan tongkol

Kadar air daging ikan tongkol

Kadar air daging ikan tongkol yang direndam pada semua konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu dan formalin 1%, cenderung mengalami penurunan pada 4 jam penyimpanan. Salah satu penyebab penurunan kadar air tersebut adalah berkurangnya jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu, seperti pada grafik ALT (Gambar 1). Hal ini didukung oleh pernyataan Fardiaz (1992) yang menyatakan bahwa semakin sedikit bakteri yang tumbuh maka jumlah air yang dihasilkan juga semakin rendah.

Kadar air daging ikan tongkol yang direndam dalam beberapa konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu pada 8 jam penyimpanan cenderung mengalami penurunan, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, serta 40%. Penurunan kadar air tersebut diduga disebabkan ekstrak pada awal waktu penyimpanan lebih difokuskan untuk menyerap air pada daging ikan tongkol melalui osmosis. Dengan berkurangnya kadar air, diharapkan dapat memperpanjang masa simpan daging ikan tongkol. Hal ini sesuai dengan pernyataan Sedjati et al. (2007) bahwa rendahnya kadar air dalam suatu bahan pangan dapat memperpanjang masa simpan karena semakin sedikit bakteri yang tumbuh (Fardiaz 1992). Adapun peningkatan kadar air yang terjadi pada ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, dan 40% terjadi akibat peningkatan jumlah bakteri seperti pada grafik ALT (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Yanti et al. (2008) bahwa air merupakan hasil metabolisme dari bakteri, sehingga semakin tinggi total koloni bakteri pada daging maka semakin tinggi kadar airnya.

Daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada penyimpanan 12 jam, menunjukkan pola grafik kadar air yang cenderung menurun, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 40%, 50%, 70%, 90%, dan 100%. Peningkatan kadar air pada beberapa konsentrasi tersebut disebabkan terjadinya peningkatan total koloni bakteri seperti pada grafik ALT (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Yanti et al. (2008) bahwa semakin tinggi total koloni bakteri pada daging maka semakin tinggi kadar airnya, karena air merupakan hasil metabolisme dari bakteri.

Sementara itu, pada penyimpanan selama 16 jam, kadar air daging ikan tongkol cenderung meningkat. Peningkatan kadar air tersebut terjadi akibat peningkatan jumlah bakteri hingga melebihi batas kelayakan konsumsi oleh beberapa konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu, seperti pada grafik ALT (Gambar 1).

Formalin 1% cenderung mengalami penurunan kadar air dan memiliki kemampuan pengeringan kadar air terbaik. Hal ini dikarenakan formalin merupakan formaldehida yang mampu mengikat protein hingga menembus dalam sel, sehingga sulit terdegradasi dan

memiliki kemampuan difusi yang optimal.

Secara keseluruhan, kadar air daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 60-100% selama 16 jam penyimpanan, memiliki kadar air yang cukup rendah yaitu berkisar antara 63-67%. Sebagai pembandingan adalah kadar air daging ikan tongkol tanpa perlakuan, yaitu sebesar 77%. Dengan demikian dapat diasumsikan bahwa kadar air daging yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi yang cukup tinggi memiliki kadar air yang lebih rendah dibanding daging ikan tongkol tanpa perlakuan, dengan demikian dapat memperpanjang masa simpan daging ikan tongkol.

Nilai pH daging ikan tongkol

Nilai pH merupakan salah satu faktor penting yang dapat mempengaruhi pertumbuhan, aktivitas biologi dan enzim, serta kematian bakteri (Sumarsih 2003). Nilai pH daging ikan tongkol pada semua konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu cenderung mengalami penurunan pada 4 jam penyimpanan dengan pH lebih rendah dari kontrol. Menurut Rostini (2007), penurunan pH dapat memperlambat pertumbuhan mikroorganisme pembusuk. Pernyataan tersebut sesuai dengan grafik ALT (Gambar 1), yaitu terjadi kecenderungan penurunan jumlah bakteri pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu.

Berdasarkan hasil penelitian Jayaraman et al. (2008), yaitu salah satu kandungan senyawa antibakteri dalam buah mengkudu adalah flavonoid. Flavonoid merupakan golongan fenol alam yang ditemukan pada semua tumbuhan hijau (Ambarwati 2007). Menurut Rahayu (2000), jika kondisi substrat dengan pH rendah, seperti pada nilai pH daging ikan tongkol dengan penyimpanan selama 4 jam maka akan meningkatkan aktivitas senyawa fenol dalam menghambat pertumbuhan mikroba. Hal ini dikarenakan fenol memiliki kemampuan untuk mendenaturasi protein dan merusak membran sel bakteri dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel bakteri karena senyawa fenol mampu melakukan migrasi dari fase cair ke fase lemak. Selain itu, beberapa senyawa turunan fenol memiliki kemampuan untuk menurunkan tegangan permukaan sel bakteri.

Daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada penyimpanan selama 8 jam cenderung mengalami penurunan nilai pH, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 100%. Nilai pH yang rendah akan menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga total koloni bakteri menjadi rendah (Yanti et al. 2008). Peningkatan pH pada ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 100% dipengaruhi oleh peningkatan pertumbuhan bakteri seperti pada grafik ALT (Gambar 1).

Nilai pH daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu selama 12 jam penyimpanan cenderung menurun, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 50% dan 80%. Ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 50% dan 80% cenderung mengalami peningkatan nilai pH karena terjadi peningkatan jumlah bakteri, seperti yang ditunjukkan pada grafik ALT (Gambar 1). Adapun pada penyimpanan selama 16 jam,

nilai pH daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu cenderung menurun, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 40% dan 100%. Peningkatan pH pada ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 40% dan 100% terjadi karena peningkatan jumlah bakteri, seperti yang ditunjukkan pada grafik ALT (Gambar 1).

Nilai pH medium sangat mempengaruhi jenis mikroba yang tumbuh. Nilai pH daging ikan tongkol dari hasil penelitian ini berkisar antara 4-5,5. Dengan demikian diduga bakteri yang terdapat pada daging ikan tongkol tersebut adalah golongan bakteri asam laktat. Hal ini disebabkan bakteri asam laktat mampu memecah glukosa menghasilkan asam laktat sehingga menyebabkan pH menjadi rendah. Nilai pH yang rendah dapat menghambat pertumbuhan bakteri lain sehingga dapat berfungsi sebagai pengawet makanan (Kusmiati dan Malik 2002). Selain itu, aktivitas senyawa fenol dapat meningkat pada kondisi pH media yang rendah (Rahayu 2000), sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri pembusuk dan dapat digunakan sebagai alternatif pengawet alami pada daging ikan tongkol.

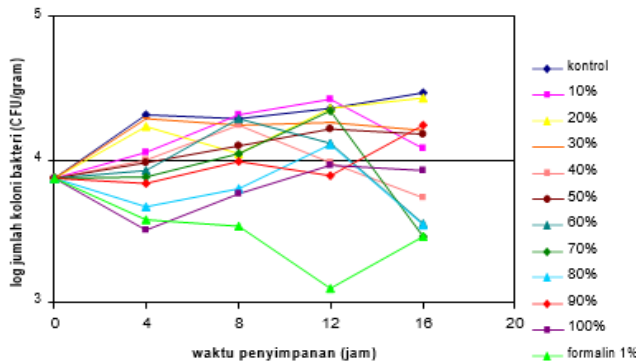
Suhu daging ikan tongkol

Berdasarkan Gambar 4, dapat diketahui bahwa suhu daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu cenderung meningkat pada 4 jam penyimpanan. Kecenderungan peningkatan suhu tersebut disebabkan oleh peningkatan jumlah bakteri, seperti pada grafik ALT (Gambar 1). Hal ini disebabkan semakin tinggi jumlah bakteri maka semakin tinggi suhunya, karena bakteri aktif melakukan metabolisme.

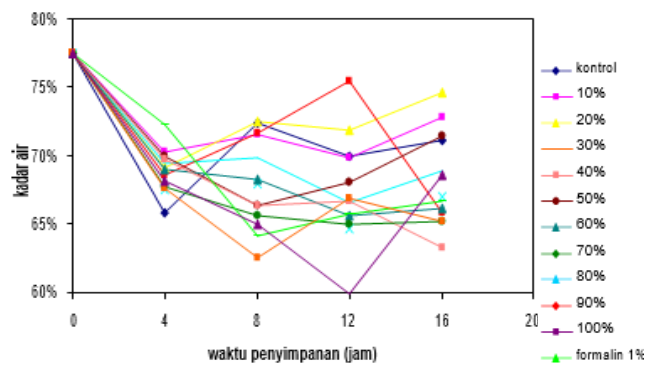
Suhu daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu pada 8 jam penyimpanan cenderung menurun, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 10%, 20%, dan 50%. Peningkatan suhu dipengaruhi oleh peningkatan jumlah bakteri karena bakteri aktif melakukan metabolisme.

Pada penyimpanan 12 jam, grafik suhu daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu cenderung menurun, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80%. Grafik suhu daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80% menunjukkan adanya kenaikan suhu. Kenaikan suhu tersebut diikuti dengan kenaikan jumlah bakteri, hal ini sesuai dengan grafik ALT (Gambar 1).

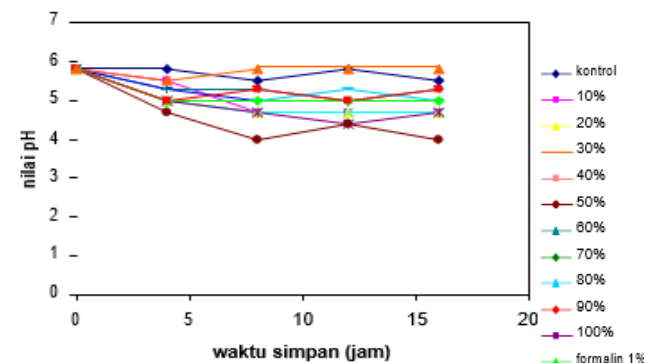
Grafik suhu daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu selama 16 jam penyimpanan cenderung meningkat, kecuali ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80%. Penurunan suhu pada daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu dengan konsentrasi 80% menyebabkan penurunan jumlah bakteri, seperti yang ditunjukkan pada grafik ALT (Gambar 1). Hal ini sesuai dengan pernyataan Ramli (2001) bahwa temperatur merupakan faktor yang harus diperhatikan untuk mengatur pertumbuhan bakteri, sebab semakin tinggi temperatur maka tingkat pertumbuhan bakteri semakin besar, dan semakin rendah temperatur maka pertumbuhan bakteri semakin rendah.



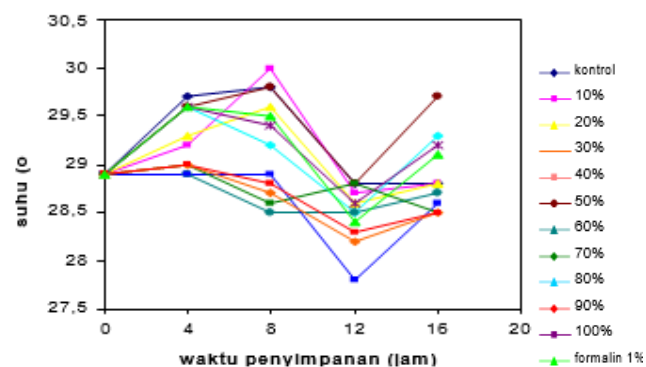
Gambar 1. ALT daging ikan tongkol dengan pemberian ekstrak etanol buah mengkudu



Gambar 2. Kadar air daging ikan tongkol dengan pemberian ekstrak etanol buah mengkudu



Gambar 3. pH daging ikan tongkol dengan pemberian ekstrak etanol buah mengkudu



Gambar 4. Suhu daging ikan tongkol dengan pemberian ekstrak etanol buah mengkudu

Secara keseluruhan, daging ikan tongkol yang direndam dalam ekstrak etanol buah mengkudu memiliki suhu lebih rendah dari kontrol. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah mengkudu dapat digunakan sebagai alternatif pengawet alami karena dapat memperpanjang waktu simpan daging ikan tongkol. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Haryuni et al. (2003), yaitu semakin rendah suhu maka semakin lambat proses metabolisme dan semakin lama daging dapat disimpan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu berpengaruh secara signifikan dalam menghambat jumlah bakteri pada daging ikan tongkol. Waktu penyimpanan berpengaruh signifikan dalam menghambat jumlah bakteri pada daging ikan tongkol. Konsentrasi 80%, 90%, dan 100% merupakan konsentrasi yang memiliki aktivitas hampir sama dengan formalin dalam menghambat jumlah bakteri pada daging ikan tongkol.

DAFTAR PUSTAKA

Badan POM [Badan Pengawas Obat dan Makanan]. 2008. Pengujian mikrobiologi pangan. Info POM 9(2): 1-11.

Depkes RI [Departemen Kesehatan Republik Indonesia]. 1995. Farmakope Indonesia Edisi IV. Depkes RI, Jakarta.

Fardiaz. 1992. Mikrobiologi pangan. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.

Haryuni, Dini R, Suranto et al. 2003. Pengaruh Rempah-rempah terhadap kualitas fillet ikan mas (*Cyprinus carpio* L.). *Enviro* 3(1):10-17.

Hilman. 2009. Buah mengkudu untuk obat kanker. www.naturindonesia.com. [12 April 2010].

Jayaraman SK, Manoharan S, Illachezian S. 2008. Antibacterial, antifungal, and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. *Int J Integr Biol* 3(1): 44-49.

Kresnawaty, Irma, Zainuddin A. 2009. Aktivitas antioksidan dan antibakteri dari derivat metil ekstrak etanol daun (*Uncaria gambir*). *Jurnal Litri* 15(4): 145-151.

Kusmiati, Malik A. 2002. Aktivitas bakteriosin dari bakteri *Leuconostoc mesenteroides* Pbac 1 pada berbagai media. *Makara Kesehatan* 6(1): 1-6.

Mangunwardoyo, Sophia WRA, Heruwati ES. 2007. Seleksi dan pengujian aktivitas enzim L-histidine decarboxylase dari bakteri pembentuk histamin. *Makara Sains* 11(2): 104-109.

Muklis, Gaol JL, Simbolon D. 2009. Pemetaan daerah potensial penangkapan ikan cakalang (*Katsuwonus pelamis*) dan tongkol (*Euthynnus affinis*) di perairan utara Nanggroe Aceh Darussalam. *E-Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis* 1(1): 24-32.

Nursal, Wulandari S, Juwita WS. 2006. Bioaktivitas ekstrak jahe (*Zingiber officinale* Roxb.) dalam menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *Biogenesis* 2(2): 64-66.

Pelczar, Michael J, Chan ECS. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press, Jakarta.

Purwani, Retnaningtyas E, Widowati D. 2008. Pengembangan pengawet alami dari ekstrak lengkuas, kunyit, dan jahe pada daging dan ikan segar. Laporan Penelitian. Fakultas Ilmu Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

Rahayu WP. 2000. Aktivitas antimikroba bumbu masakan tradisional hasil olahan industri terhadap bakteri patogen dan perusak. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 11(2): 42-48.

Ramli. 2001. Perbandingan Jumlah Bakteri pada Ayam Buras Sebelum dan Setelah Penjualan. [Skripsi]. Universitas Syiah Kuala, Aceh.

Rini R. 2009. Produksi antioksidan dari daun simpur (*Dillenia indica*) menggunakan metode ekstraksi tekanan tinggi dengan sirkulasi

- pelarut. Seminar Nasional Teknik Kimia Indonesia. Jurusan Teknik Metalurgi dan Material Fakultas Teknik Universitas Indonesia, Jakarta.
- Rostini I. 2007. Peranan bakteri asam laktat (*Lactobacillus plantarum*) terhadap masa simpan filet nila merah pada suhu rendah. Karya Ilmiah. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Padjadjaran, Jatinangor.
- Sedjati S, Agustini TW, Surti T. 2007. Studi penggunaan khitosan sebagai antibakteri pada ikan teri (*Stolephorus heterolobus*) asin kering selama penyimpanan suhu kamar. *Jurnal Pasir Laut* 2(2): 54-66.
- Setyabudi DA, Winarti C, Risfuher. 2008. Perlunya standar mutu buah impor: Studi kasus kontaminan pada buah-buahan impor. Prosiding PPI. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pasca-panen Pertanian, Bogor.
- Sulistiyarto B. 2002. Pendekatan kelestarian ekologis untuk pengelolaan perikanan (*Ecological sustainability approach for fisheries management*). Makalah Falsafah Sains. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Sumarsih S. 2003. Mikrobiologi dasar. Universitas Pembangunan Nasional, Yogyakarta.
- Virganita J. 2009. Uji Antibakteri Komponen Bioaktif Daun Lobak (*Raphanus sativus* L.) terhadap *Escherichia coli* dan Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Winarti C. 2005. Peluang pengembangan minuman fungsional dari buah mengkudu. *Jurnal Litbang Pertanian* 24(4): 149-154.
- Wulandari S, Sayuti I, Asnaini. 2005. Analisis mikrobiologi: Produk ikan kaleng (*sardines*) kemasan dalam limit waktu tertentu (*expire*). *Jurnal Biogenesis* 2(1): 30-35.
- Yanti H, Hidayati, Elfawati. 2008. Kualitas daging sapi dengan kemasan plastik PE (*polyethylen*) dan plastik PP (*polypropylen*) di Pasar Arengka Kota Pekanbaru. *Jurnal Peternakan* 5(1): 22-27.
- Zuhud EAM, Rahayu WP, Wijaya CH et al. 2001. Aktivitas antimikroba ekstrak kedawung (*Parkia roxburghii* G. Don). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 12(1): 6-12.

Pengaruh pemberian ekstrak herba daun sendok (*Plantago major*) terhadap kadar glukosa darah mencit Balb/C induksi streptozotocin

The effect of daun sendok (*Plantago major*) extract on the blood glucose level of Balb/C mice induced by streptozotocin

PUTRI SATRIANY, R.P. ANDRI PUTRANTO, IPOP SYARIFAH

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

Manuskrip diterima: 20 Juli 2010. Revisi disetujui: 25 Agustus 2010.

Abstract. Satriany P, Putranto RPA, Syarifah I. 2010. The effect of daun sendok (*Plantago major*) extract on the blood glucose level of Balb/C mice induced by streptozotocin. *Biofarmasi* 8: 66-71. This research aimed to determine the effect of daun sendok (*Plantago major* L.) extract on the blood glucose level of Balb/C mice induced by streptozotocin. This study was a laboratory experimental pre and post-test control group design. The subjects used were 16 male mice. Then, mice were induced with streptozotocin by a dose of 65 mg/kg body weight intraperitoneally freshly dissolved in 0.02 M citrate saline buffer. Mice used were mice with blood glucose levels ≥ 200 mg/dL. Furthermore, mice were divided into 2 groups by a simple random sampling. Group 1 was given metformin in a dose of 1.3 mg/mice/day and group 2 was given daun sendok extract in a dose of 1000 mg/kg body weight/day. At the 2nd week, it was measured for the glucose levels from the blood of mice tail by a Blood Glucose Stick Meter (Gluco DrTM). The data obtained were statistically analyzed by independent samples t-test by using SPSS Programme for Microsoft Windows release 17.0. The significance was set at $p < 0.05$. The difference of average blood glucose levels pre vs post experiment, metformin group was -145.87 mg/dL and daun sendok group was -85.00 mg/dL ($p = 0.024$). The experiment results showed that daun sendok extract in a dose of 1000 mg/kg body weight/day could reduce the blood glucose levels in Balb/C mice induced by streptozotocin.

Keywords: Blood glucose level, diabetes mellitus, *Plantago major*, streptozotocin

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan sumber bahan obat alam dan obat tradisional yang telah digunakan oleh sebagian besar masyarakat Indonesia secara turun-temurun (Zein 2005). Penggunaan obat-obatan dari bahan alami tersebut semakin meningkat. Selain harganya yang terjangkau, obat herbal juga memiliki efek samping yang relatif kecil (Suharmiaty 2003). Pada pembukaan Seminar Obat Alami Cina-Indonesia tanggal 8 Desember 2003, secara eksplisit Presiden RI menekankan perlunya perhatian khusus yang sungguh-sungguh untuk mengembangkan obat alami di Indonesia yang sangat penting dalam rangka meningkatkan pelayanan dan kemandirian Indonesia di bidang kesehatan (Suryana 2007).

WHO telah merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif, dan kanker (WHO 2004). Namun demikian, penggunaan tanaman sebagai bahan obat tradisional memerlukan penelitian ilmiah untuk mengetahui kebenaran khasiatnya.

Kondisi demografi Indonesia dengan jumlah penduduk yang terus meningkat, penduduk usia lanjut yang bertambah banyak, dan urbanisasi yang semakin tidak terkendali ditambah gaya hidup yang kebarat-baratan, seperti meningkatnya jumlah pengunjung di restoran siap saji (*fast food*), pendapatan per kapita yang tinggi, serta

teknologi canggih yang menimbulkan *sedentary life*, menjadi faktor-faktor pemicu meningkatnya penyakit di Indonesia saat ini (Suyono 2006).

Pada dasarnya, penyakit dibagi menjadi penyakit menular dan penyakit tidak menular atau dapat juga disebut penyakit degeneratif. Diantara berbagai penyakit degeneratif yang dijumpai, Diabetes Melitus (DM) merupakan salah satu penyakit yang menjadi masalah cukup serius dalam menyebabkan morbiditas dan mortalitas di berbagai belahan dunia, terutama di negara-negara berkembang (Suyono 2006).

World Health Organization (WHO) memprediksikan adanya kecenderungan peningkatan jumlah penderita diabetes yang cukup besar pada tahun-tahun mendatang. Fakta yang dihimpun oleh WHO menunjukkan lebih dari 220 juta orang di dunia menderita diabetes (WHO 2009). Di Indonesia sendiri, WHO memprediksikan jumlah penderita diabetes dari 8,4 juta penduduk pada tahun 2000 menjadi sekitar 21,3 juta pada tahun 2030.

Diabetes melitus merupakan penyakit menahun yang akan diderita pasien seumur hidup (Perkeni 2006). Diabetes secara luas menyebabkan morbiditas dan mortalitas sebagai akibat dari komplikasi mikrovaskuler dan makrovaskuler. Luasnya komplikasi pada diabetes tampaknya berkorelasi dengan konsentrasi glukosa darah, sehingga kadar glukosa berlebih diduga menjadi penyebab utama kerusakan jaringan (Rahbani-Nobar et al. 1999). Dari beberapa rekomendasi terapi menyatakan bahwa

penurunan kadar glukosa darah secara baik dan tepat yang mendekati nilai normal dapat menurunkan komplikasi makrovaskuler maupun mikrovaskuler (Permana 2010).

Salah satu tanaman obat yang dimanfaatkan secara tradisional karena mengandung senyawa antidiabetes adalah daun sendok (*Plantago major* L.). Daun sendok adalah tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat Eropa untuk mengobati penyakit pencernaan dan diabetes melitus (Aguilar et al. 2006).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun sendok kaya akan kandungan kimia, diantaranya *ascorbic acid*, *chlorogenic-acid*, *ursolic-acid*, *choline*, *fiber*, *sorbitol*, *salicylic-acid*, dan *tannin* (Duke 2010). Kandungan kimia daun sendok tersebut memiliki beberapa efek farmakologis, diantaranya efek antidiabetik, hipoglikemik, dan antioksidan. Efek-efek tersebut yang menjadikan daun sendok dapat dimanfaatkan oleh penderita diabetes sebagai pilihan fitofarmaka. Namun, keberadaan daun sendok sebagai obat pengontrol gula darah belum banyak diketahui dan pemanfaatannya masih jarang. Hal tersebut diduga dikarenakan tingkat pengetahuan dan kepercayaan masyarakat terhadap daun sendok sebagai herbal pengontrol gula darah masih kurang.

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian ekstrak herba daun sendok (*Plantago major* L.) terhadap kadar glukosa darah mencit Balb/C yang diinduksi *streptozotocin*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Uji Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi kandang hewan uji berukuran 30 cm x 20 cm x 10 cm, timbangan *Mettler Toledo*, spuit injeksi *tuberculin* 1 cc, *blood glucose stick meter* Gluco DrTM, gelas ukur 100 cc, labu ukur 5 ml, *beaker glass* 5 ml, sonde 1 ml, gunting, dan sarung tangan. Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan meliputi mencit Balb/C jantan, ekstrak daun sendok, *streptozotocin*, *buffer* sitrat 0,02 M, akuades, metformin 500 mg, dan *Chlorethyle*.

Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik *pre and post-test control group design*.

Subjek penelitian

Hewan uji yang digunakan berupa mencit Balb/C jantan berumur 4-6 minggu dengan berat badan antara 20-30 gram. Mencit diperoleh dari UD Wistar, Yogyakarta. Bahan makanan mencit yang digunakan berupa pakan mencit BR I.

Teknik sampling

Teknik *sampling* yang digunakan untuk menentukan besar sampel pada penelitian ini adalah *purposive sampling* karena kriteria sampel yang diambil sudah ditetapkan terlebih dahulu. Setelah diinduksi dengan STZ, mencit dengan kadar GDS ≥ 200 mg/dL dikelompokkan secara *random sampling* untuk membagi subjek penelitian menjadi dua kelompok, yaitu: (i) Kelompok I: Kelompok mencit dengan DM yang diberi metformin dosis 1,3 mg/mencit/hari. (ii) Kelompok II: Kelompok mencit dengan DM yang diberi ekstrak daun sendok dosis 1000 mg/kg BB/hari.

Besar sampel

Besar sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung dengan menggunakan rumus sampel independen (tidak berpasangan) untuk menaksir perbedaan rerata antara dua populasi, yaitu:

$$n = 2 \left[\frac{Z\alpha s}{d} \right]^2$$

Keterangan:

- n : jumlah sampel tiap kelompok perlakuan
 $Z\alpha$: nilai pada distribusi normal standar untuk uji dua sisi pada tingkat signifikansi α . Misalnya 1,96 untuk $\alpha=0,05$
 s : simpangan baku pada dua kelompok
 d : tingkat ketepatan absolut dari beda rerata (Arief 2008)

Oleh karena insidensi belum diketahui maka ditetapkan $s = d$, sehingga didapatkan:

$$n = 2 \left[\frac{Z\alpha d}{d} \right]^2$$

$$n = 2[Z\alpha]^2$$

$$n = 2[1,96]^2$$

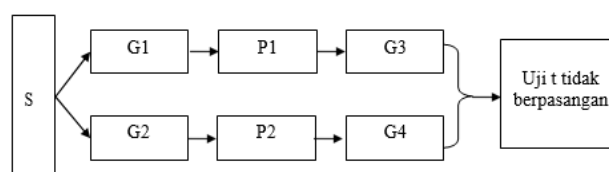
$$= 2(3,846)$$

$$n = 7,68$$

$$n \approx 8$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 8 ekor mencit untuk setiap kelompok perlakuan.

Rancangan penelitian yang digunakan sebagai berikut:



Gambar 1. Skema rencana penelitian. S = Jumlah sampel, P1= kelompok 1 (DM + metformin 1,3 mg/mencit/hari), P2 = kelompok 2 (DM + ekstrak daun sendok dosis 1000 mg/kg BB/hari), G1 = kadar glukosa darah sewaktu kelompok 1 sebelum perlakuan, G2 = kadar glukosa darah sewaktu kelompok 2 sebelum perlakuan, G3 = kadar glukosa darah sewaktu kelompok 1 setelah perlakuan, G4 = kadar glukosa darah sewaktu kelompok 2 setelah perlakuan.

Penentuan dosis

Induksi *Streptozotocin*

Umumnya untuk membuat mencit model diabetes dilakukan dengan pemberian STZ secara intraperitoneal dosis 40 mg/kg BB/hari selama 5 kali berturut-turut dalam 0,02 M *buffer* salin sitrat pH 4,5. Hanya mencit dengan kadar glukosa darah ≥ 200 mg/dL yang digunakan dalam penelitian ini (Amirshahrokhi et al. 2008).

Pada penelitian ini, STZ yang digunakan sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dalam 50 ml *buffer* sitrat 0,02 M, sehingga 1 ml larutan mengandung 10 mg STZ. Dosis STZ yang digunakan untuk induksi adalah 65 mg/kg BB dan diberikan sebanyak dua kali induksi.

Apabila berat mencit rata-rata adalah 30 gram maka dibutuhkan 1,95 mg STZ untuk setiap ekor mencit. Jika 1 ml larutan mengandung 10 mg STZ maka induksi secara intraperitoneal memerlukan 0,195 ml ~ 0,2 ml larutan.

Dosis ekstrak daun sendok

Dosis ekstrak daun sendok yang digunakan pada penelitian ini adalah 1000 mg/kg BB. Apabila setiap mencit mempunyai berat 30 gram maka dosis daun sendok yang digunakan yaitu:

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

Oleh karena volume cairan maksimal yang dapat diberikan per oral pada mencit adalah 1 ml/20 g BB (Ngatidjan 1991) maka disarankan takaran pemberian tidak melebihi volume maksimalnya. Oleh karena itu dilakukan pengenceran ekstrak dengan rincian 10 gram ekstrak yang dilarutkan dalam 10 ml akuades.

$$\begin{aligned} \text{Pengenceran ekstrak} &= \frac{60 \text{ g ekstrak}}{300 \text{ ml aquades}} = \frac{60.000 \text{ mg ekstrak}}{300 \text{ ml aquades}} \\ &= 200 \text{ mg ekstrak dalam 1 ml larutan} \end{aligned}$$

Atau dengan kata lain, 1 ml larutan mengandung 200 mg ekstrak. Apabila dosis tiap mencit adalah 30 mg maka volume ekstrak yang diberikan adalah 0,15 ml.

Penentuan dosis metformin

Berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis untuk berbagai jenis hewan uji dari berbagai spesies dan manusia maka konversi dosis manusia dengan berat badan 70 kg pada mencit dengan berat badan 20 g adalah 0,0026. Dosis metformin yang dipakai untuk orang dewasa adalah 500 mg (ISO 2009), sehingga dosis untuk mencit 20 gr yaitu = 500 mg x 0,0026/mencit = 1,3 mg/20 g BB mencit (Ngatidjan 1991).

Oleh karena pemberian metformin dilakukan secara per oral maka perlu dilakukan pelarutan dalam akuades dengan rincian 260 gram metformin dilarutkan dalam 20 ml akuades sehingga didapatkan 26 mg metformin dalam 2 ml larutan. Apabila dosis untuk tiap mencit adalah 1,3 mg maka volume metformin yang diberikan adalah 0,1 ml.

Alur penelitian

Kandang mencit disiapkan. Mencit diadaptasikan terlebih dahulu dengan lingkungan selama satu minggu.

Setelah satu minggu dilakukan pengukuran kadar glukosa darah sewaktu (GDS) pada mencit. Kadar glukosa tersebut akan digunakan sebagai kadar GDS normal mencit. Selanjutnya dilakukan penimbangan untuk menentukan dosis. Mencit diinduksi dengan *Streptozotocin* 65 mg/kg BB. Setelah lima hari dilakukan induksi ulang dengan dosis yang sama, kemudian dilakukan pengukuran kadar GDS. Kadar GDS akan digunakan sebagai kadar GDS mencit model DM. Mencit sebanyak 16 ekor dikelompokkan secara *random sampling* menjadi 2 kelompok, masing-masing 8 ekor mencit.

Kelompok 1 diberi diet standar dan diberi metformin dosis 1,3 mg/mencit/hari, sedangkan kelompok 2 diberi diet standar dan diberi ekstrak daun sendok dengan dosis 1000 mg/mencit secara per oral setiap hari selama penelitian berlangsung. Pengukuran GDS dilakukan kembali setelah perlakuan. Perlakuan berakhir sekitar akhir minggu ke-2. Pengukuran GDS pada semua kelompok perlakuan dilakukan dengan menggunakan *Blood glucose stick meter* Gluco DrTM. Kadar GDS pada tiap kelompok diobservasi dan dibandingkan.

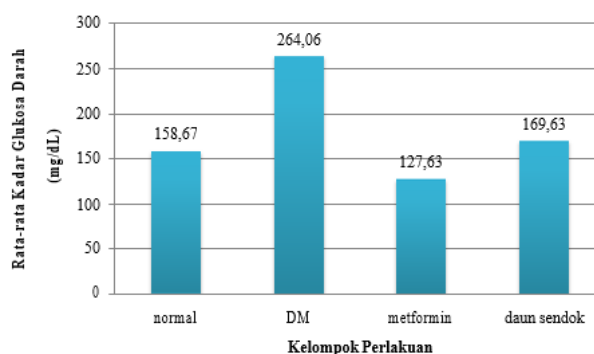
Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan menggunakan program *Statistical Product and Service Solutions (SPSS) for Microsoft Windows release 17.0*. dan $p < 0,05$ dipilih sebagai tingkat minimal signifikansinya. Uji statistik yang digunakan adalah uji-t tidak berpasangan untuk menguji rata-rata pada dua kelompok data yang independen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Pada penelitian ini didapatkan rata-rata kadar normal glukosa darah mencit sebesar 158,67 mg/dL. Induksi STZ dosis 65 mg/kg BB dalam larutan *buffer* salin sitrat terlihat secara signifikan meningkatkan kadar glukosa darah, dengan rata-rata kadar glukosa darah setelah induksi STZ sebesar 264,06 mg/dL. Peningkatan kadar glukosa darah rata-rata sebelum dan sesudah perlakuan terlihat pada semua kelompok meskipun besar kenaikannya bervariasi. Kadar glukosa darah mencit pada masing-masing kelompok perlakuan selengkapnya disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Rata-rata kadar glukosa darah mencit sebelum dan sesudah perlakuan.

Tabel 1 menunjukkan perubahan kadar glukosa darah yang merupakan selisih antara kadar glukosa darah sesudah perlakuan (GDS2) dan kadar glukosa darah sebelum perlakuan (GDS1) pada masing-masing kelompok. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui adanya pengaruh perlakuan terhadap kadar glukosa darah, berupa penurunan atau peningkatan kadar glukosa darah pada mencit. Pada Tabel 1 terlihat bahwa selisih rata-rata kadar glukosa darah pada semua kelompok perlakuan bertanda negatif (-), hal ini menunjukkan bahwa dengan perlakuan ekstrak daun sendok terjadi penurunan kadar glukosa darah antara sebelum dan sesudah perlakuan.

Hasil penelitian pada Tabel 1 kemudian dilakukan uji normalitas data untuk menjamin validitas penelitian dan keakuratan dalam penarikan kesimpulan. Uji normalitas data yang digunakan pada penelitian ini adalah Shapiro-Wilk, karena jumlah sampel yang digunakan kecil ($n < 50$) dengan ketentuan bahwa suatu data dikatakan mempunyai sebaran normal jika nilai $p > 0,05$ (Sastroasmoro 2008).

Dari Tabel 2 didapatkan nilai signifikansi untuk kelompok metformin sebesar 0,584 dan untuk kelompok daun sendok sebesar 0,133. Hasil tersebut menunjukkan bahwa secara statistik sebaran sampel pada kelompok metformin dan daun sendok adalah normal karena $p > 0,05$.

Selanjutnya, untuk mengetahui adanya hubungan antara pemberian metformin dan ekstrak daun sendok dengan besar penurunan kadar gula darah sewaktu mencit, digunakan uji-t tidak berpasangan dengan nilai signifikansi apabila nilai $p < 0,05$.

Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa kelompok perlakuan memiliki nilai signifikansi 0,024 terhadap kadar GDS. Hal ini menunjukkan bahwa hubungan antara kelompok perlakuan dengan kadar gula darah sewaktu secara statistik signifikan karena nilai $p < 0,05$.

Tabel 1. Rata-rata selisih kadar glukosa darah sebelum dan sesudah perlakuan masing-masing kelompok (mg/dL)

Kelompok	Rata-rata \pm SD
DM + metformin	-145,87 \pm 50,22
DM + ekstrak daun sendok	-85,00 \pm 46,02

Tabel 2. Hasil uji Shapiro-Wilk pada kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	<i>p</i> _value
Metformin	0,584
Ekstrak daun sendok	0,133

Tabel 3. Hasil uji statistik dengan uji-t tidak berpasangan

Variabel	<i>p</i> _value
Kelompok Metformin vs ekstrak daun sendok	0,024

Pembahasan

Pemanfaatan tanaman berkhasiat obat untuk membantu menurunkan kadar glukosa darah yang tinggi pada penderita diabetes melitus semakin mendapat perhatian dari masyarakat. Salah satu jenis tanaman obat yang dimanfaatkan secara tradisional mengandung senyawa antidiabetes adalah daun sendok. Daun sendok adalah jenis tanaman obat yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat Eropa untuk mengobati penyakit pencernaan dan diabetes melitus (Aguilar et al. 2006).

Pemberian injeksi STZ mengakibatkan GDS pada mencit meningkat dari sebelumnya. Kadar GDS mencit tergolong normal yaitu sebesar 158,67 mg/dL. Kemudian setelah mencit diinduksi dengan STZ dosis 65 mg/kg BB menunjukkan tanda-tanda diabetes dengan kadar GDS 264,06 mg/dL. Kondisi tersebut sesuai dengan kriteria penegakan diagnosis DM yaitu kadar glukosa darah sewaktu dalam plasma ≥ 200 mg/dL (WHO 2006).

Streptozotocin secara luas telah digunakan untuk menginduksi diabetes pada hewan percobaan. Hal tersebut disebabkan oleh efek diabetogenik dari STZ terhadap sel β -pankreas. Induksi STZ akan menyebabkan nekrosis sel β -pankreas, sehingga menghambat produksi dan sekresi insulin yang pada akhirnya akan terjadi hiperglikemi (Szkudelski 2001).

Streptozotocin masuk ke sel β -pankreas melalui transporter glukosa GLUT 2. Aksi STZ intraseluler menghasilkan perubahan DNA pada sel β -pankreas. Alkilasi DNA oleh STZ melalui gugus nitrosourea mengakibatkan kerusakan pada sel β -pankreas. STZ merupakan donor *nitric oxide* (NO) yang mempunyai kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. *Nitric oxide* dihasilkan pada saat STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu membangkitkan oksigen reaktif yang mempunyai peran tinggi dalam kerusakan sel β -pankreas. Pembentukan anion superoksida terjadi karena adanya aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria. Produksi ATP mitokondria yang terbatas selanjutnya mengakibatkan pengurangan secara drastis nukleotida sel β -pankreas. Mekanisme STZ sebagai agen diabetogenik terhadap sel β -pankreas melalui proses nekrosis (Szkudelski 2001).

Induksi STZ pada penelitian ini bertujuan untuk membuat mencit model diabetes. Berdasarkan hasil penelitian Amirshahrokhi et al. (2008), induksi STZ dengan dosis 65 mg/kg BB menghasilkan hewan percobaan model diabetes autoimun yang mirip dengan DM tipe-1 pada manusia. Hal ini dibuktikan dengan adanya infiltrasi sel-T dan makrofag pada sel pulau langerhans akibat kerusakan yang total secara permanen dari sel β -pankreas. Pada penelitian ini, induksi STZ pertama dengan dosis 65 mg/kg BB mengakibatkan kadar GDS mencit meningkat dari sebelumnya, namun kadar GDS setelah induksi pertama tersebut < 200 mg/dL, sehingga belum dapat dikategorikan sebagai mencit diabetes. Tidak tercapainya kondisi diabetes tersebut diduga disebabkan oleh melemahnya kemampuan STZ dalam merusak sel β -

pankreas akibat waktu penyimpanan STZ dalam bentuk yang sudah diencerkan lebih dari 1 bulan. Kondisi tersebut menyebabkan kerusakan sel β -pankreas oleh STZ bersifat *reversible* karena masih terdapat sisa sel β -pankreas yang masih berfungsi dengan baik untuk memproduksi insulin, sehingga kadar GDS yang dihasilkan tidak sampai membuat mencit mengalami diabetes. Untuk selanjutnya, dilakukan induksi STZ kedua dengan dosis yang sama, yaitu 65 mg/kg BB. Setelah dilakukan induksi STZ kedua, ternyata kadar GDS mencit mencapai >200 mg/dL. Mencit tersebut selanjutnya digunakan sebagai mencit model diabetes pada penelitian ini dengan diabetes yang dihasilkan adalah diabetes tipe-2.

Daun sendok merupakan gulma di perkebunan teh dan karet, atau tumbuh liar di hutan, ladang, dan halaman berumput yang agak lembap. Jenis tumbuhan ini berasal dari daratan Asia dan Eropa, dapat ditemukan dari dataran rendah sampai ketinggian 3.300 mdpl (Dalimartha 1999). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun sendok kaya akan kandungan kimia, diantaranya *ascorbic acid*, *chlorogenic-acid*, *ursolic-acid*, *choline*, *fiber*, *sorbitol*, *salicylic-acid*, dan *tannin*. Kandungan kimia daun sendok tersebut memiliki beberapa efek farmakologis, diantaranya efek antidiabetik, hipoglikemik, dan antioksidan (Duke 2010). Pada penelitian lain dilaporkan bahwa pemberian ekstrak metanol dan ekstrak air biji *Plantago major* L. dosis 500 mg/kg BB (*i.p.*) pada mencit yang diinduksi dengan aloksan, dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan masing-masing persentase penurunan kadar glukosa darah (PKGD) $52,2 \pm 8,4$ mg/dL dan $43,6 \pm 6,3$ mg/dL, dimana senyawa yang diduga berkhasiat sebagai antidiabetes adalah polisakarida (Aguilar et al. 2006).

Pada penelitian ini digunakan obat hipoglikemi oral (OHO) sebagai pembanding. OHO yang digunakan yaitu metformin. Kondisi hiperglikemi yang terjadi pada mencit setelah diinduksi dengan STZ adalah kerusakan sel β -pankreas, sehingga produksi dan sekresi insulin menjadi terhambat. Jadi, pemilihan metformin sebagai OHO pembanding dianggap tepat, karena mekanisme kerja metformin dalam tubuh yaitu dengan cara memperbaiki sensitivitas hepar dan jaringan perifer terhadap insulin tanpa mempengaruhi sekresi insulin. Efek tersebut terjadi karena adanya aktivasi kinase di dalam sel (*AMP-activated kinase*) (Suharti dan Suherman 2007). Di samping itu, metformin meningkatkan pemakaian glukosa oleh sel usus, sehingga menurunkan glukosa darah dan juga diduga menghambat absorpsi glukosa di usus sesudah asupan pakan (Soegondo 2006).

Pada Tabel 1 dapat dilihat selisih rata-rata kadar glukosa darah setelah diberikan perlakuan. Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa kelompok yang diberi ekstrak daun sendok dosis 1000 mg/kg BB/hari selama 2 minggu dan kelompok yang diberikan metformin dosis 1,3 mg/kg BB/mencit/hari sama-sama mampu menurunkan kadar GDS mencit yang ditunjukkan dengan nilai selisih rata-rata kadar glukosa darah pada kedua kelompok perlakuan bertanda negatif (-).

Berdasarkan analisis data penelitian dengan uji-t tidak berpasangan didapatkan hasil bahwa terdapat perbedaan yang signifikan penurunan kadar GDS mencit antara

kelompok yang diberikan metformin dengan kelompok yang diberikan ekstrak daun sendok ($p=0,024$). Kemudian, jika dilihat dari nilai selisih rata-rata kadar GDS sebelum dan sesudah perlakuan, dapat diketahui bahwa kemampuan daun sendok dalam menurunkan kadar GDS mencit lebih rendah dibandingkan kemampuan metformin (Tabel 1).

Berdasarkan hasil penelitian, diperkirakan bahwa ekstrak daun sendok menunjukkan mekanisme yang serupa dengan metformin dalam menurunkan kadar glukosa darah, yaitu dengan cara memperbaiki sensitivitas hepar dan jaringan perifer terhadap insulin tanpa mempengaruhi sekresi insulin serta mampu menghambat absorpsi glukosa di usus sesudah asupan pakan (Hannan et al. 2006). Dari hasil penelitian ini dapat dikembangkan penelitian ekstrak daun sendok sebagai fitofarmaka terapi diabetes melitus.

Perbedaan hasil penelitian ini dengan penelitian yang lain diduga dikarenakan keterbatasan waktu pemaparan perlakuan yang singkat, yaitu kurang dari 2 minggu, selain itu penggunaan dosis tunggal ekstrak daun sendok sehingga tidak dapat diketahui dosis efektif untuk menurunkan kadar glukosa darah.

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak herba daun sendok (*Plantago major* L.) dosis 1000 mg/kg BB/hari selama 2 minggu mampu menurunkan kadar glukosa darah mencit Balb/C dengan induksi *streptozotocin*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aguilar FA, Avila EV, Perez JA et al. 2006. Hipoglycemic effect of *Plantago major* seeds in healthy and alloxan-diabetic mice. *Proc West Pharmacol Soc* 49: 51-54.
- Amirshahroki K, Dehpour AR, Hadjati J. 2008. Methadone ameliorates multiple low dose streptozotocin induced type 1 diabetes in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 232: 119-124.
- Arief MTQ. 2008. Pengantar metodologi penelitian untuk ilmu kesehatan. Sebelas Maret University Press, Surakarta.
- Dalimartha S. 1999. Atlas tumbuhan obat Indonesia, Jilid I. Trubus Agri Widya, Jakarta.
- Duke JA. 2010. Chemicals and their biological activities in *Plantago major* L. (Plantaginaceae). www.ars-grin.gov. [4 Maret 2010].
- Hannan JMA, Ali L, Khaleque J et al. 2006. Aqueous extracts of husks of *Plantago ovata* reduce hyperglycemia in Type 1 and Type 2 diabetes by inhibition of intestinal glucose absorption. *Br J Nutr* 96: 131-137.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk laboratorium metode laboratorium dalam toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Perkeni. 2006. Konsensus pengelolaan dan pencegahan diabetes mellitus Tipe 2 di Indonesia. Perkumpulan Endokrinologi Indonesia, PB PERKENI, Jakarta.
- Permana H. 2010. Peran terapi kombinasi diabetes Tipe 2 pada risiko dan progresivitas CVD. pustaka.unpad.ac.id. [1 Maret 2010].
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Rahbani-Nobar M et al. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Med J of Islamic World Acad Sci* 12(4):109-114.
- Sastroasmoro S. 2008. Dasar-dasar metodologi penelitian klinis. Bagian Ilmu Kesehatan Anak FK UI. Binarupa Aksara, Jakarta.
- Soegondo S. 2006. Farmakoterapi pada pengendalian glikemia diabetes melitus Tipe 2. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Pusat Penerbitan Fakultas Ilmu Penyakit Dalam FKUI, Jakarta.
- Suharmiati. 2003. Pengujian bioaktivitas antidiabetes mellitus tumbuhan obat. *Cermin Dunia Kedokteran* 140: 8.

- Suharti, Suherman. 2007. Insulin dan antidiabetik oral dalam farmakologi dan terapi, Edisi ke-5. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Suryana A. 2007. Prospek dan arah pengembangan agribisnis tanaman obat, Edisi ke-2. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian Departemen Pertanian, Jakarta.
- Suyono S. 2006. Diabetes mellitus di Indonesia. In: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I et al. (eds). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Pusat Penerbitan Departemen Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546.
- WHO [World Health Organization]. 2004. Guidelines for the regulation of herbal medicines in the South-East Asia Region. WHO Document Production Services, New Delhi.
- WHO [World Health Organization]. 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a World Health Organization/International Diabetes Foundation Consultation. WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland.
- WHO [World Health Organization]. 2009. Diabetes. World Health Organization. www.who.int. [25 Februari 2001].
- Zein U. 2005. Pemanfaatan tumbuhan obat dalam upaya pemeliharaan Kesehatan. e-USU repository. library.usu.ac.id. [25 Februari 2001].

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 mm²), 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⁻², l⁻¹, h⁻¹) 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 97th 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 α , β , χ , 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.

- Efek perlindungan ekstrak meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap kerusakan histologis lambung mencit yang diinduksi aspirin** 41-46
- PEDIANA RACHMAWATI, ENDANG LISTYANINGSIH SUPARYANTI, ISDARYANTO
- Pengaruh pemberian ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap spermatogenesis mencit** 47-51
- NUR AMALINA, SUYATMI, ENDANG LISTYANINGSIH SUPARYANTI
- Pengaruh ekstrak biji kakao (*Theobroma cacao*) terhadap hepatotoksisitas parasetamol pada mencit** 52-57
- YESSI OKTIARI, S. BAMBANG WIDJOKONGKO, LILIK WIJAYANTI
- Pengaruh konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan waktu penyimpanan terhadap kualitas daging ikan tongkol** 58-65
- VENERANDA SONYA AYU, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI, TJAHJADI PURWOKO
- Pengaruh pemberian ekstrak herba daun sendok (*Plantago major*) terhadap kadar glukosa darah mencit Balb/C induksi streptozotocin** 66-71
- PUTRI SATRIANY, R.P. ANDRI PUTRANTO, IPOP SYARIFAH

