

# Biofarmasi

**Journal of Natural Products Biochemistry**

**VOLUME 14  
NOMOR 1  
FEBRUARI 2016  
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  
Gut Windarsih  
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.

# Pengaruh metode ekstraksi oleoresin temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan pengeringan solar dryer terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan

## Effect of extraction method on *Curcuma xanthorrhiza* oleoresin using solar dryer to concentration of curcuminoid, total phenol and antioxidant activity

THERESIA AGNIEST PRICILLA VITANTI, KAWIJI, EDHI NURHARTADI

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

Manuscript received: 26 Juli 2015. Revision accepted: 7 Oktober 2015.

**Abstract.** Vitanti TAP, Kawiji, Edhi N. 2012. Effect of extraction method on *Curcuma xanthorrhiza* oleoresin using solar dryer to concentration of curcuminoid, total phenol, and antioxidant activity. *Biofarmasi* 14: 1-9. *Curcuma* (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) is a type of drug plant that has high enough capacity of production in Indonesia. Generally, commerced in the form of fresh *curcuma* or processed product as simple as *simplicia* and *curcuma* powder. Processed products that could be developed is *curcuma* oleoresin. It is a mixture of essential oils and resins obtained from extraction process of *curcuma* powder using an organic solvent. Oleoresin has the same flavor and aroma to the extracted material. Due to these characteristics, it is used as a flavor and food coloring, other than as a raw material in pharmaceutical industry. In addition, it also contains active compounds which can support the utilization of drug and food industries. This study aims to determine whether the size of the powder, powdered *curcuma* immersion time, and interactions between them that can be influenced the content of curcuminoids, total phenol and antioxidant activity of *curcuma* oleoresin. Selection of solar dryers in the drying process is based on previously studied that compare the natural drying technique with a solar dryer, and the best results of those studies are shown in the solar dryer. This research using completely randomized design with two factors: the size variation of *curcuma* powder (60, 80 and 100 mesh) and immersion time variation (extraction) of *curcuma* powder (12, 24 and 36 hours). The results showed that the powder size of *curcuma* and immersion time has an effect on curcuminoid content, total phenol and antioxidant activity of *curcuma* oleoresin. However, there are no interaction between both factors. That is, the size and the immersion time of *curcuma* powder do not affect each other on the content of curcuminoid, total phenol and activity of antioxidant.

**Keywords:** Antioxidant activity, *Curcuma oleoresin*, curcuminoid, total phenol

## PENDAHULUAN

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan tanaman asli Indonesia dan termasuk salah satu jenis temu-temuan (Zingiberaceae). Rimpang temulawak merupakan bagian yang banyak digunakan sebagai ramuan jamu (tradisional) dan sebagai bahan baku industri obat alami. Selain itu, temulawak merupakan sumber bahan pangan, pewarna, serta dibuat makanan atau minuman segar (Rukmana 1995). Ekspor rimpang temulawak di Indonesia tahun 2003 sebesar US\$ 5.452 juta dengan jumlah sebanyak 9.149 ton rimpang temulawak. Sedangkan di Jawa Tengah kebutuhan industri terhadap rimpang temulawak mencapai 3.140 ton/tahun berat segar (BPS dalam Sembiring et al. 2006).

Kandungan utama temulawak adalah fraksi pati, kurkuminoid dan minyak atsiri. Rimpang temulawak ini mempunyai kandungan kurkuminoid sebesar 1,6-2,2%, minyak atsiri sebesar 6-10% dan fraksi pati sebesar 48,18-59,64% (Sidik dan Muhtadi 1995). Fraksi pati merupakan kandungan terbesar dalam rimpang temulawak, dimana pati ini dapat dikembangkan sebagai sumber karbohidrat yang digunakan untuk campuran bahan makanan.

Kurkuminoid pada temulawak merupakan zat warna kuning yang terdiri dari senyawa kurkumin dan desmetoksi kurkumin (Ayu 2008). Minyak atsiri merupakan cairan berwarna kuning atau kuning jingga yang berbau aromatik tajam. Menurut Dalimartha (2000), minyak atsiri pada temulawak terdiri dari isofuranogermakren, trisiklin, alloaromadendren, germakren, dan xanthorrhizol. Kurkuminoid dan komponen yang menyusun minyak atsiri seperti xanthorrhizol merupakan senyawa fenolik yang bersifat sebagai antioksidan (Sidik dan Muhtadi 1995).

Selain dimanfaatkan sebagai obat tradisional, rimpang temulawak juga dapat dijadikan oleoresin. Oleoresin merupakan campuran minyak dan resin atau gum yang dihasilkan melalui ekstraksi menggunakan pelarut organik dari berbagai jenis rempah, baik yang berasal dari buah, biji, daun, kulit maupun rimpang (Abubakar et al. 2006). Oleoresin biasanya berbentuk cairan kental, pasta atau semi padat, yang memiliki aroma dan rasa sesuai dengan bahan yang diekstrak. Oleoresin biasanya digunakan sebagai bahan baku flavor pada industri makanan dan sebagai bahan baku obat. Pengambilan oleoresin merupakan salah satu cara yang efektif untuk memanfaatkan temulawak. Oleoresin tersebut diperoleh

melalui proses pengeringan kemudian diekstrak menggunakan pelarut organik, setelah itu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator*. Perlu adanya proses penanganan yang tepat untuk mendapatkan komponen senyawa aktif terbaik yang terkandung di dalam temulawak. Salah satunya menggunakan proses ekstraksi yang sesuai, maka dapat dihasilkan oleoresin yang berkualitas tinggi.

Dalam pembuatan oleoresin, temulawak dirajang kemudian dikeringkan. Perajangan (*slicing*) merupakan proses pengecilan ukuran bahan untuk mendapatkan ukuran yang seragam dengan potongan-potongan yang lebih kecil dan tipis. Pengeringan dapat memperlambat proses enzimatis dan kegiatan mikroorganisme, sehingga diperlukan proses pengeringan yang efektif untuk menghasilkan simplisia yang berkualitas. Hal ini dikarenakan kadar air dalam temulawak yang berkurang setelah pengeringan. Berdasarkan penelitian Nugraha (2010), diperoleh hasil bahwa proses pengeringan *solar dryer* dengan ditutup kain putih dapat mempertahankan senyawa aktif lebih baik dibandingkan proses pengeringan alami. Setelah dikeringkan, simplisia temulawak diolah menjadi tepung atau bubuk dengan proses penepungan (*milling*). Proses penepungan akan memperbesar luas permukaan bahan (Adam 2008). Bubuk temulawak selanjutnya diekstrak menggunakan metode maserasi. Metode maserasi merupakan salah satu metode yang digunakan dalam proses ekstraksi oleoresin, yaitu dengan merendam bahan dalam pelarut organik yang disertai dengan pengadukan. Bubuk temulawak yang halus, mempunyai luas permukaan yang besar, sehingga kelarutan senyawa aktif dalam pelarut organik akan semakin besar. Hal ini dapat memaksimalkan proses pembuatan oleoresin.

Kandungan senyawa aktif yang terdapat pada temulawak memiliki aktivitas antioksidan yang dapat menghilangkan radikal-radikal bebas dan menghambat terbentuknya oksidasi lipida sehingga dapat mencegah penyakit degeneratif (Sidik dan Muhtadi 1995). Kurkuminoid sebagai antioksidan sangat rentan terhadap kerusakan. Hal ini dikarenakan sifat kurkumin yang rentan terhadap cahaya. Bila kurkumin terkena cahaya, akan terjadi dekomposisi struktur atau terjadi degradasi struktur (Tonnesen and Karlsen 1985).

Ekstraksi dengan metode maserasi bertujuan untuk mengikat senyawa aktif yang terkandung dalam temulawak menggunakan pelarut organik. Oleh karena itu, dalam proses ekstraksi perlu adanya penanganan yang baik guna mempertahankan senyawa aktif yang terkandung didalam temulawak.

Tujuan penelitian ini adalah: (i) Mengetahui pengaruh ukuran bubuk temulawak terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak. (ii) Mengetahui pengaruh lama perendaman bubuk temulawak terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak. (iii) Mengetahui pengaruh interaksi ukuran bubuk temulawak dan lama perendaman bubuk temulawak terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak.

## BAHAN DAN METODE

### Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Pangan dan Gizi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah dan Sub Lab. Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta. Penelitian ini dilaksanakan dalam jangka waktu 4 bulan mulai bulan Februari-Mei 2011.

### Bahan dan alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini berupa rimpang temulawak yang dirajang, sedangkan pelarut yang digunakan adalah pelarut etanol 96%. Bahan-bahan yang digunakan untuk analisis kadar air adalah: xylene; kadar kurkuminoid: kurkuminoid standar, etanol; aktivitas antioksidan: DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazil), methanol; kadar total fenol: aquadest, folin Ciocalteu, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% dan fenol.

Alat yang digunakan dalam proses pembuatan oleoresin temulawak ini adalah *slicer*, *solar dryer*, kain putih, *milling* dengan saringan kecil, 3 buah ayakan (60, 80 dan 100 mesh), *rotary evaporator*, beker glass, pengaduk, erlenmeyer, corong dan termometer. Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk analisis kadar air adalah: gelas ukur, labu destilasi, pipet, alat destilasi; analisis kadar kurkuminoid adalah: spektrofotometer UV-Vis, beker glass, pipet volume, gelas ukur, vortex, tabung reaksi; Analisis Antioksidan adalah spektrofotometer UV-Vis, vial, pipet volume dan vortex; analisis total fenol adalah: erlenmeyer 100 ml, gelas ukur, vortex, tabung reaksi, spektrofotometer UV-Vis, labu takar 250 ml, pengaduk, pipet volume, sentrifuse.

### Cara kerja

#### Penyiapan bahan dan perajangan

Rimpang temulawak yang digunakan berasal dari Batu, Wonogiri, Jawa Tengah dengan umur rata-rata 10-12 bulan (Raharjo dan Rostiana 2005). Kemudian rimpang tersebut dicuci sampai bersih dan dilakukan proses perajangan menggunakan mesin perajang (*slicer*). Proses perajangan dilakukan untuk mempercepat proses pengeringan.

#### Pengeringan

Proses pengeringan dilakukan untuk mengurangi kadar air dalam rimpang temulawak. Proses pengeringan tersebut dihentikan sampai kadar air rimpang temulawak sebesar 12% (rim pang kering dapat dipatahkan) (Anonim 2009). Proses pengeringan ini dilakukan dengan teknik Pengeringan *Solar Dryer* dan perlakuan ditutup dengan kain putih (Nugraha 2010). Pengujian kadar air dilakukan dengan pengambilan sampel secara acak menggunakan metode thermovolumetri (Sudarmadji et al. 1997).

#### Penepungan dan pengayakan

Proses penepungan simplisia temulawak dilakukan menggunakan mesin penepung dan saringan berukuran kecil untuk menghasilkan bubuk temulawak. Selanjutnya bubuk temulawak tersebut diayak menggunakan 3 buah

ayakan, yaitu ayakan berukuran 60, 80 dan 100 mesh menggunakan mesin pengayak.

#### Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi yaitu dengan perendaman bubuk temulawak yang disertai dengan pengadukan dalam temperatur ruangan (28-30°C). Proses ekstraksi ini dilakukan dengan perbandingan bahan dan pelarut 1: 5 (b/v) dan 3 variasi lama perendaman yaitu 12, 24 dan 36 jam. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi bubuk temulawak ini adalah etanol 96%.

#### Penyaringan

Penyaringan digunakan untuk memisahkan antara ampas (endapan) dan filtrat. Proses penyaringan pada ekstrak bubuk temulawak dilakukan menggunakan kertas saring.

#### Evaporasi

Proses pembuatan oleoresin temulawak dilakukan menggunakan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu 65°C dengan kecepatan yang konstan. Proses ini dihentikan setelah pelarut etanol teruapkan semua dan didapatkan oleoresin yang berbentuk pasta. Dalam proses evaporasi ini terjadi pemisahan antara pelarut dengan oleoresin berdasarkan perbedaan titik didih menggunakan perputaran dan pemvakuman.

#### Metode analisis senyawa aktif oleoresin temulawak

Metode analisis senyawa aktif pada oleoresin temulawak ditunjukkan pada Tabel 1.

Dalam penelitian ini digunakan Rancangan Acak Lengkap menggunakan dua faktor, yaitu variasi ukuran bubuk temulawak (60, 80 dan 100 mesh) dan lama perendaman bubuk temulawak (12, 24 dan 36 jam). Percobaan dilakukan dengan tiga kali pengulangan untuk setiap perlakuan dan tiga kali pengulangan analisis. Rancangan percobaan Acak Lengkap dengan dua faktor yaitu ukuran bubuk temulawak dan lama perendaman bubuk temulawak ditunjukkan pada Tabel 2.

**Tabel 1.** Metode Analisis Senyawa Aktif Oleoresin Temulawak

Macam uji	Metode
Kurkuminoid	Spektrofotometer UV-visible (Zahro 2009; Nugraha 2010)
Toatal fenol	Folin Ciocalteu (Senter et al. 1989)
Antioksidan	DPPH yang dilanjutkan dengan uji perbandingan menggunakan Asam Askorbat (Handajani 2009)

**Tabel 2.** Rancangan Percobaan Acak Lengkap dengan dua faktor

Lama perendaman	Ukuran bubuk		
	S	D	K
T	ST	DT	KT
A	SA	DA	KA
P	SP	DP	KP

Keterangan: S = ukuran 60 mesh, T = perendaman 12 jam, D = ukuran 80 mesh, A = perendaman 24 jam, K = ukuran 100 mesh, P = perendaman 36 jam

## HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Kadar air

Pada umumnya bahan pangan yang mudah rusak adalah bahan pangan yang memiliki kandungan air yang tinggi. Untuk mencegah atau mengurangi kerusakan itu bisa dilakukan pengurangan kadar air dengan cara dikeringkan. Salah satu pengeringan yang bisa digunakan adalah pengering efek rumah kaca. Prinsip kerja pengering *solar dryer* sama dengan pengering efek rumah kaca, dimana pengering *solar dryer* juga menggunakan energi surya atau sinar matahari dengan memanfaatkan penutup transparan untuk menaikkan suhu udara pengeringnya. Lapisan transparan memungkinkan radiasi gelombang pendek dari matahari masuk ke dalam dan mengenai elemen-elemen bangunan. Hal ini menyebabkan radiasi gelombang pendek yang terpantul berubah menjadi gelombang panjang dan terperangkap dalam bangunan karena tidak dapat menembus penutup transparan sehingga menyebabkan suhu menjadi tinggi (Julisti 2010).

Kadar air merupakan banyaknya air yang terkandung dalam bahan yang dinyatakan dalam persen. Penentuan kadar air merupakan salah satu parameter untuk menentukan kualitas simplisia temulawak yang digunakan. Dalam penelitian Sembiring et al. (2006), kadar air simplisia temulawak maksimal 12%. Hasil analisis kadar air bubuk temulawak ditunjukkan pada Tabel 3.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar air bubuk temulawak memiliki nilai rata-rata sebesar 11,389%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa kadar air bubuk temulawak seluruhnya kurang dari 12%. Sampel-sampel tersebut memenuhi karakteristik mutu simplisia temulawak yang dinyatakan dalam penelitian Sembiring et al. (2006), mengatakan bahwa kadar air simplisia temulawak maksimal 12%. Dalam penelitian ini, pengukuran kadar air simplisia hanya didasarkan pada bisa atau tidaknya simplisia tersebut dipatahkan. Pengukuran kadar air simplisia simplisia tersebut diperlukan untuk menghentikan suatu penghentian proses pengeringan. Menurut Cahyono (2007), penghentian proses pengeringan yang dilakukan oleh petani dalam memperoleh gambaran mengenai kadar air simplisia apabila simplisia tersebut bisa dipatahkan. Umumnya kadar air simplisia yang bisa dipatahkan kira-kira antara 10-12%.

#### Kadar kurkuminoid

Kurkuminoid merupakan fraksi yang memberikan warna kuning pada rimpang temulawak. Kurkuminoid bersifat tidak larut air tetapi larut dalam aseton, alkohol, asam asetat, dan alkali hidroksida. Selain itu, kurkuminoid mempunyai aroma yang khas dan tidak bersifat toksik (Sidik dan Muhtadi 1995). Fraksi kurkuminoid ini stabil terhadap suhu tinggi tetapi tidak stabil terhadap cahaya. Karena sifatnya inilah, apabila kurkumin terkena cahaya maka akan terjadi degradasi atau dekomposisi struktur berupa siklisasi kurkumin (Tonnesen and Karlsen 1985). Menurut Sidik dan Muhtadi (1995), siklisasi kurkuminoid menyebabkan senyawa kurkuminoid terdegradasi menjadi asam ferulat sehingga kadarnya dalam ekstrak menjadi remdah.

#### *Pengaruh ukuran bubuk terhadap kadar kurkuminoid*

Pada penelitian ini, perlakuan pengecilan ukuran bubuk temulawak yang berbeda merupakan proses untuk mendapatkan oleoresin temulawak yang berbeda kandungan senyawa aktifnya. Proses pengecilan ukuran bertujuan untuk memperbesar luas permukaan bahan. Sedangkan proses pengayakan bertujuan untuk menghomogenkan bubuk temulawak yang diperoleh dari proses penepungan. Ukuran ayakan yang digunakan ada tiga, yaitu 60, 80 dan 100 mesh. Hasil pengujian analisis kadar kurkuminoid oleoresin temulawak dengan perlakuan ukuran bubuk yang berbeda ditunjukkan pada Tabel 4.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa perlakuan pengecilan ukuran menggunakan ukuran 60, 80 dan 100 mesh memiliki kadar kurkuminoid yang saling berbeda nyata. Kadar kurkuminoid yang diperoleh dari perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh sebesar 0,289%. Sedangkan dengan perlakuan pengecilan ukuran 80 mesh diperoleh kadar kurkuminoid sebesar 0,396%. Untuk perlakuan pengecilan ukuran 100 mesh, kadar kurkuminoid yang dihasilkan sebesar 0,57%. Hasil tersebut dapat dilihat bahwa pada perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh memiliki kadar kurkuminoid yang paling rendah, diikuti dengan perlakuan pengecilan ukuran 80 mesh, dan perlakuan pengecilan ukuran 100 mesh memiliki kadar kurkuminoid yang paling tinggi.

Pengecilan ukuran merupakan salah satu proses ekstraksi yang bertujuan untuk memperluas atau memperbesar luas permukaan bahan, sehingga kontak antara bahan (bubuk temulawak) dengan pelarut yang digunakan (etanol) menjadi lebih besar. Akibatnya, oleoresin temulawak menjadi lebih mudah terekstrak dan jumlah oleoresin temulawak yang dihasilkan menjadi lebih banyak. Selain itu, luas permukaan yang semakin besar dimaksudkan untuk mempercepat proses pelarutan senyawa aktif yang terkandung dalam bubuk temulawak. Oleh karena itu, semakin kecil ukuran bubuk temulawak maka semakin besar kadar kurkuminoid oleoresin temulawak yang dihasilkan. Hal ini diperkuat dengan pernyataan dari Ketaren (1987) bahwa ekstraksi minyak atsiri dapat dipermudah dengan melakukan perajangan atau pengecilan ukuran untuk merusak dinding-dinding sel yang bersifat semipermeabel, sehingga dengan rusaknya dinding-dinding sel atau jaringan bahan maka minyak menjadi lebih mudah terekstrak.

#### *Pengaruh lama perendaman terhadap kadar kurkuminoid*

Pada penelitian ini, lama perendaman bubuk temulawak yang berbeda dilakukan untuk memperoleh oleoresin temulawak yang berbeda kandungan senyawa aktifnya. Lama perendaman bubuk temulawak yang digunakan ada tiga, yaitu 12, 24 dan 36 jam. Lama perendaman bubuk temulawak dilakukan untuk melarutkan senyawa aktif yang terkandung dalam bahan (bubuk temulawak). Hasil pengujian analisis kadar kurkuminoid oleoresin temulawak dengan perlakuan lama perendaman bubuk temulawak yang berbeda ditunjukkan pada Tabel 5.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada perlakuan perendaman 12 jam diperoleh kadar kurkuminoid sebesar 0,318%. Sedangkan kadar

kurkuminoid yang diperoleh pada perlakuan perendaman 24 jam sebesar 0,381%. Dan untuk perlakuan perendaman 36 jam diperoleh kadar kurkuminoid sebesar 0,493%. Dari data tersebut, dapat diketahui bahwa kadar kurkuminoid terendah diperoleh pada perlakuan perendaman 12 jam, diikuti dengan perlakuan perendaman 24 jam, dan kadar kurkuminoid tertinggi diperoleh pada perlakuan perendaman 36 jam.

Perlakuan perendaman bubuk temulawak atau yang dikenal dengan metode maserasi merupakan proses ekstraksi guna menghasilkan oleoresin temulawak. Berdasarkan uji DMRT pada tingkat signifikansi  $\alpha$  0,05 ternyata perlakuan perendaman 12 dan 24 jam tidak berbeda nyata sedangkan pada perlakuan perendaman 36 jam menunjukkan beda nyata terhadap kedua perlakuan lainnya. Semakin lama waktu perendaman bubuk temulawak yang dilakukan, maka kadar kurkuminoid oleoresin temulawak yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal ini dikarenakan dengan semakin lama proses ekstraksi (lama waktu perendaman), maka semakin lama juga waktu kontak yang terjadi antara bahan (bubuk temulawak) dengan pelarut (etanol). Dari hasil penelitian, diduga bahwa kadar kurkuminoid oleoresin temulawak akan optimal atau meningkat setelah perendaman 24 jam.

#### *Pengaruh interaksi ukuran bubuk dan lama perendaman*

Dari analisis statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa nilai signifikansi ukuran bubuk dan lama perendaman diatas  $\alpha$  0,05. Ini berarti bahwa tidak ada interaksi antara ukuran bubuk dan lama perendaman. Adanya interaksi akan ditunjukkan apabila nilai signifikansi yang dihasilkan dibawah  $\alpha$  0,05. Masing-masing perlakuan ukuran bubuk dan lama perendaman tidak saling mempengaruhi antara yang satu dengan lainnya terhadap kadar kurkuminoid oleoresin temulawak yang dihasilkan. Hasil analisis kadar kurkuminoid oleoresin temulawak yang dihasilkan pada masing-masing sampel ditunjukkan pada Tabel 6.

Dari Tabel 6. terlihat bahwa kadar kurkuminoid pada ukuran bubuk 60 mesh dengan perendaman 12 jam tidak berbeda nyata dengan kadar kurkuminoid pada ukuran bubuk 80 mesh dengan perendaman 12 jam dan ukuran bubuk 60 mesh dengan perendaman 24 jam. Kadar kurkuminoid pada ukuran bubuk 80 mesh (12 jam) dan 60 mesh (24 jam) tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 100 mesh pada perendaman 12 jam, ukuran bubuk 80 dan 100 mesh pada perendaman 24 jam dan ukuran bubuk 60 mesh dengan perendaman 36 jam. Pada perlakuan perendaman 24 jam (100 mesh) menghasilkan kadar kurkuminoid yang tidak berbeda nyata dengan perlakuan ukuran bubuk 80 mesh pada perendaman 36 jam. Dan untuk ukuran bubuk 80 mesh (36 jam) menghasilkan kadar kurkuminoid yang tidak berbeda nyata dengan ukuran 100 mesh pada perendaman 36 jam. Kadar kurkuminoid oleoresin temulawak yang diperoleh mulai dari perlakuan perendaman 12 jam dengan ukuran bubuk 60 mesh sampai dengan perlakuan perendaman 36 jam dengan ukuran bubuk 100 mesh secara berturut-turut adalah 0,183%, 0,325% dan 0,444%; 0,323%, 0,354% dan 0,465%; 0,361%, 0,507% dan 0,612%.

### Total fenol

Fenol ( $C_6H_5OH$ ) atau asam karbolat atau benzenol adalah zat kristal tidak berwarna yang memiliki bau yang khas. Selain itu, fenol memiliki cincin aromatik yang berikatan dengan gugus hidroksil. Senyawa fenol berfungsi sebagai antioksidan karena mampu menyumbangkan atom hidrogen kepada radikal-radikal bebas, sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipid (Widiyanti 2006). Penentuan kandungan fenolik total dapat dilakukan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen Folin-Ciocalteu. Adanya inti aromatis pada senyawa fenol (gugus hidroksi fenolik) dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Pratimasari 2009).

### Pengaruh ukuran bubuk

Proses pengecilan ukuran bertujuan untuk memperbesar luas permukaan bahan. Sedangkan proses pengayakan bertujuan untuk menghomogenkan bubuk temulawak yang diperoleh dari proses penepungan. Hasil analisis kadar total fenol oleoresin temulawak dengan perlakuan pengecilan ukuran yang berbeda ditunjukkan pada Tabel 7.

Pengecilan ukuran merupakan salah satu cara untuk menghasilkan oleoresin yang tinggi. Perlakuan pengecilan ukuran ini dapat mengoptimalkan proses ekstraksi senyawa aktif yang terkandung dalam temulawak. Pada pengecilan ukuran akan menyebabkan terjadinya gesekan atau benturan antara bahan sumber oleoresin dengan alat pengecil ukuran (*miller*). Selain itu, pengecilan ukuran bertujuan untuk memperbesar luas permukaan bahan. Luas permukaan yang semakin besar dimaksudkan untuk mempercepat proses pelarutan senyawa aktif yang terkandung dan akan menyebabkan kontak antara bahan (bubuk temulawak) dengan pelarut (etanol) yang semakin besar.

Dari data pada Tabel 7, ditunjukkan bahwa ukuran bubuk 60 mesh tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 80 mesh terhadap kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan. Pada ukuran bubuk 80 mesh juga tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 100 mesh terhadap kadar total fenol yang diperoleh. Kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan dengan perlakuan pengecilan ukuran 60, 80 dan 100 mesh secara berturut-turut adalah 1,344%, 1,402% dan 1,568%. Dari hasil tersebut, ditunjukkan bahwa kadar total fenol tertinggi diperoleh pada perlakuan pengecilan ukuran 100 mesh, diikuti dengan perlakuan pengecilan ukuran 80 mesh, dan kadar total fenol terendah diperoleh pada perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh. Jadi, semakin kecil ukuran bubuk temulawak maka kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan akan semakin tinggi.

**Tabel 3.** Kadar air bubuk temulawak

Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3	Rata-rata
11,167 %	11,667%	11,333%	11,389%

**Tabel 4.** Kadar kurkuminoid oleoresin temulawak

Ukuran Bubuk	Kadar (%)
Ukuran 60 mesh	0,289a
Ukuran 80 mesh	0,396b
Ukuran 100 mesh	0,507c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

**Tabel 5.** Kadar kurkuminoid oleoresin temulawak

Lama Perendaman	Kadar (%)
Perendaman 12 jam	0,318a
Perendaman 24 jam	0,381b
Perendaman 48 jam	0,493c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

**Tabel 6.** Kadar kurkuminoid oleoresin temulawak

Sampel	Kadar (%)
Perendaman 12 jam, ukuran 60 mesh	0,183a
Perendaman 12 jam, ukuran 80 mesh	0,325b
Perendaman 12 jam, ukuran 100 mesh	0,444c
Perendaman 24 jam, ukuran 60 mesh	0,323a
Perendaman 24 jam, ukuran 80 mesh	0,354b
Perendaman 24 jam, ukuran 100 mesh	0,465c
Perendaman 36 jam, ukuran 60 mesh	0,361a
Perendaman 36 jam, ukuran 80 mesh	0,507b
Perendaman 36 jam, ukuran 100 mesh	0,612c

**Tabel 9.** Kadar total fenol oleoresin temulawak

Sampel	Kadar (%)
Perendaman 12 jam, ukuran 60 mesh	1,113a
Perendaman 12 jam, ukuran 80 mesh	1,149b
Perendaman 12 jam, ukuran 100 mesh	1,304c
Perendaman 24 jam, ukuran 60 mesh	1,359a
Perendaman 24 jam, ukuran 80 mesh	1,443b
Perendaman 24 jam, ukuran 100 mesh	1,674c
Perendaman 36 jam, ukuran 60 mesh	1,560a
Perendaman 36 jam, ukuran 80 mesh	1,613b
Perendaman 36 jam, ukuran 100 mesh	1,726c

**Tabel 7.** Kadar total fenol oleoresin temulawak

Ukuran Bubuk	Kadar (%)
Ukuran 60 mesh	1,344a
Ukuran 80 mesh	1,402b
Ukuran 100 mesh	1,568c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

**Tabel 8.** Kadar total fenol oleoresin temulawak

Lama Perendaman	Kadar (%)
Perendaman 12 jam	1,189a
Perendaman 24 jam	1,492b
Perendaman 36 jam	1,633c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

### *Pengaruh lama perendaman*

Perlakuan lama perendaman dalam proses ekstraksi oleoresin temulawak dapat mengikat senyawa aktif yang terkandung pada bahan (bubuk temulawak). Lama perendaman bubuk temulawak yang digunakan ada tiga, yaitu 12, 24 dan 36 jam. Hasil analisis kadar total fenol oleoresin temulawak dengan perlakuan lama perendaman yang berbeda ditunjukkan pada Tabel 8.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa pada perlakuan perendaman 12, 24 dan 36 jam diperoleh kadar total fenol secara berturut-turut sebesar 1,189%, 1,492% dan 1,633%. Dari data tersebut, dapat diketahui bahwa kadar total fenol terendah diperoleh pada perlakuan perendaman 12 jam, diikuti dengan perlakuan perendaman 24 jam, dan kadar total fenol tertinggi diperoleh pada perlakuan perendaman 36 jam.

Perlakuan perendaman yang lebih lama dalam proses ekstraksi bubuk temulawak akan menghasilkan kadar total fenol oleoresin temulawak yang semakin tinggi. Hal ini dikarenakan semakin lama proses ekstraksi maka semakin lama pula waktu kontak yang terjadi antara bahan (bubuk temulawak) dengan pelarutnya (etanol), sehingga menyebabkan semakin banyak komponen fenol yang terlarut selama proses ekstraksi berlangsung. Oleh karena itu, kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan semakin tinggi. Semakin lama waktu perendaman bubuk temulawak, maka akan semakin besar kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan.

Dari hasil uji DMRT pada tingkat signifikansi  $\alpha$  0,05, dapat diketahui bahwa pada perlakuan perendaman 12 jam menunjukkan beda nyata dengan perlakuan perendaman 24 dan 36 jam. Sedangkan untuk perlakuan perendaman 24 dan 36 jam tidak menunjukkan beda nyata. Hal ini diduga bahwa perlakuan perendaman selama 24 jam merupakan waktu yang efektif dalam menghasilkan kadar total fenol karena pada perendaman 24 jam telah tercapai kondisi yang konstan sehingga dengan perendaman yang lebih lama, yaitu 36 jam tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan.

### *Pengaruh interaksi ukuran bubuk dan lama perendaman*

Dari analisis statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa nilai signifikansi ukuran bubuk dan lama perendaman diatas  $\alpha$  0,05. Ini berarti bahwa tidak ada interaksi antara ukuran bubuk dan lama perendaman. Adanya interaksi akan ditunjukkan apabila nilai signifikansi yang dihasilkan dibawah  $\alpha$  0,05. Masing-masing perlakuan ukuran bubuk dan lama perendaman tidak saling mempengaruhi antara yang satu dengan lainnya terhadap kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan. Hasil analisis kadar total fenol oleoresin temulawak yang dihasilkan dari tiap-tiap perlakuan ditunjukkan pada Tabel 9.

Pada Tabel 9. dapat diketahui kadar total fenol pada ukuran bubuk 60 mesh dengan perendaman 12 jam tidak berbeda nyata dengan ukuran 80 dan 100 mesh pada perendaman 12 jam dan ukuran bubuk 60 mesh pada perendaman 24 jam. Kadar total fenol pada ukuran 80 dan 100 mesh dengan perendaman 12 jam tidak berbeda nyata

dengan ukuran 60 dan 80 mesh pada perendaman 24 jam. Kadar total fenol pada ukuran bubuk 80 mesh (24 jam) tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 60 dan 80 mesh dengan perendaman 36 jam. Pada ukuran bubuk 60 dan 80 mesh (36 jam) menghasilkan kadar total fenol yang berbeda nyata dengan ukuran 100 mesh pada perendaman 24 jam. Dan untuk ukuran 100 mesh (24 jam) menghasilkan kadar total fenol yang tidak berbeda nyata dengan ukuran 100 mesh pada perendaman 36 jam. Kadar total fenol oleoresin temulawak yang diperoleh mulai dari perlakuan perendaman 12 jam dengan ukuran bubuk 60 mesh sampai dengan perlakuan perendaman 36 jam dengan ukuran bubuk 100 mesh adalah 1,113%, 1,149% dan 1,304% ; 1,359%, 1,443% dan 1,674% ; 1,560%, 1,613% dan 1,726%.

### **Aktivitas antioksidan**

Fungsi utama antioksidan digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak, memperkecil terjadinya proses kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi (Raharjo dan Rostiana 2005). Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat lipid peroksidasi pada makanan. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksi dalam struktur molekulnya. Salah satu metode uji untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (1,1 Diphenyl-2-picrylhidrazyl). Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunardi 2007).

### *Pengaruh ukuran bubuk*

Pada penelitian ini, adanya aktivitas antioksidan pada masing-masing sampel ditunjukkan dengan penurunan intensitas warna ungu pada larutan yang ditunjukkan dengan mengamati nilai absorbansinya. Hasil analisis aktivitas antioksidan oleoresin temulawak dengan perlakuan pengecilan ukuran yang berbeda ditunjukkan pada Tabel 10.

Dari analisis statistik, ditunjukkan bahwa perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh tidak berbeda nyata dengan ukuran 80 mesh terhadap aktivitas antioksidan oleoresin temulawak. Ukuran 80 mesh juga tidak memberikan beda nyata dengan ukuran 100 mesh terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Dari perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh diperoleh aktivitas antioksidan sebesar 48,874%, sedangkan pada perlakuan pengecilan ukuran 80 mesh diperoleh aktivitas antioksidan sebesar 52,311%. Dan untuk aktivitas antioksidan pada perlakuan pengecilan ukuran 100 mesh sebesar 54,654%. Dengan demikian, perlakuan pengecilan ukuran 60 mesh memiliki aktivitas antioksidan yang paling rendah daripada kedua perlakuan lainnya, yaitu perlakuan pengecilan ukuran 80 dan 100 mesh.

**Tabel 10.** Kadar total oleoresin temulawak

Ukuran Bubuk	Kadar (%)
Ukuran 60 mesh	48,874a
Ukuran 80 mesh	52,311b
Ukuran 100 mesh	54,654c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

**Tabel 11.** Kadar antioksidan oleoresin temulawak

Lama Perendaman	Kadar (%)
Perendaman 12 jam	49,878a
Perendaman 24 jam	52,215b
Perendaman 36 jam	53,746c

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi  $\alpha$  0,05

**Tabel 12.** Kadar antioksidan oleoresin temulawak

Sampel	Kadar (%)
Perendaman 12 jam, ukuran 60 mesh	46,316a
Perendaman 12 jam, ukuran 80 mesh	50,553b
Perendaman 12 jam, ukuran 100 mesh	52,765c
Perendaman 24 jam, ukuran 60 mesh	49,243a
Perendaman 24 jam, ukuran 80 mesh	53,003b
Perendaman 24 jam, ukuran 100 mesh	54,339c
Perendaman 36 jam, ukuran 60 mesh	51,063a
Perendaman 36 jam, ukuran 80 mesh	53,378b
Perendaman 36 jam, ukuran 100 mesh	56,798c
Asam askorbat 500 ppm	97,852d

Efek antioksidan disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti yang terdapat pada minyak atsiri. Mekanisme antioksidan pada kurkumin dihubungkan dengan adanya atom H dari gugus fenolik (Sunardi 2007). Dengan adanya proses pengecilan ukuran, maka luas permukaan bahan sumber oleoresin akan semakin besar. Hal inilah yang menyebabkan aktivitas antioksidannya juga semakin besar. Oleh karena itu, aktivitas antioksidan oleoresin temulawak akan semakin besar seiring dengan semakin kecilnya ukuran bubuk temulawak yang digunakan dalam proses maserasi.

#### *Pengaruh lama perendaman*

DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Hasil analisis aktivitas antioksidan oleoresin temulawak dengan perlakuan lama perendaman yang berbeda-beda ditunjukkan pada Tabel 11.

Pada perlakuan perendaman 12 jam, aktivitas antioksidan yang diperoleh dari oleoresin temulawak sebesar 49,878%. Dengan perlakuan perendaman 24 jam diperoleh aktivitas antioksidan sebesar 52,215%. Sedangkan aktivitas antioksidan sebesar 53,746% diperoleh pada perlakuan perendaman 36 jam. Dari hasil tersebut,

dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh pada perlakuan perendaman 36 jam dan aktivitas antioksidan terendah diperoleh pada perlakuan perendaman 12 jam.

Dari hasil uji DMRT pada tingkat signifikansi  $\alpha$  0,05 diketahui bahwa pada perlakuan perendaman 12 jam tidak memberikan beda nyata dengan perendaman 24 jam terhadap aktivitas antioksidan oleoresin temulawak. Aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang diperoleh pada perendaman 24 jam tidak berbeda nyata dengan perendaman 36 jam. Hal ini diduga bahwa pada perlakuan perendaman 24 jam telah tercapai kondisi yang konstan dan efisien dalam menghasilkan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang optimal karena aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang diperoleh pada perendaman 24 jam tidak berbeda nyata dengan perendaman 12 dan 36 jam.

Aktivitas antioksidan akan semakin meningkat dengan adanya perlakuan perendaman yang semakin lama. Hal ini dikarenakan adanya waktu kontak yang terjadi antara bahan sumber oleoresin dengan pelarutnya. Semakin lama kontak yang terjadi dapat mengakibatkan semakin tingginya kelarutan senyawa aktif seperti aktivitas antioksidan dari bahan sumber oleoresin. Jadi, aktivitas antioksidan akan semakin meningkat seiring dengan lama waktu perendaman yang dilakukan. Dengan demikian, semakin lama waktu perendaman bubuk temulawak maka aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang dihasilkan akan semakin besar.

#### *Pengaruh interaksi ukuran bubuk dan lama perendaman*

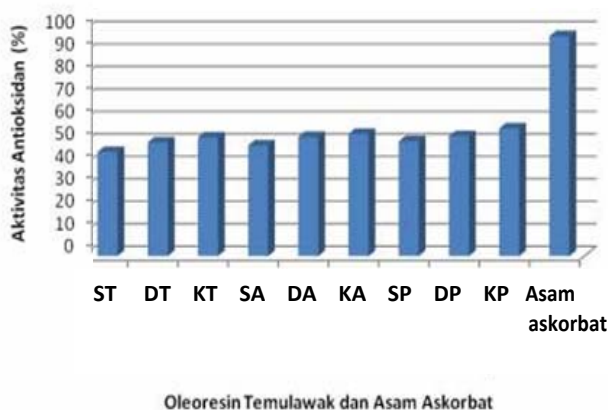
Dari analisis statistik yang dilakukan menunjukkan bahwa nilai signifikansi ukuran bubuk dan lama perendaman diatas  $\alpha$  0,05. Ini berarti bahwa tidak ada interaksi yang artinya perlakuan ukuran bubuk dan lama perendaman tidak saling mempengaruhi terhadap aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang dihasilkan. Hasil analisis aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang dihasilkan dari tiap- tiap perlakuan ditunjukkan pada Tabel 12.

Aktivitas antioksidan oleoresin temulawak pada ukuran bubuk 60 mesh dengan perendaman 12 jam tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 80 dan 100 mesh pada perendaman 12 jam, ukuran bubuk 60 dan 80 mesh pada perendaman 24 jam dan dengan ukuran bubuk 60 mesh pada perendaman 36 jam. Ukuran bubuk 80 dan 100 mesh (12 jam), ukuran bubuk 60 dan 80 (24 jam) dan ukuran bubuk 60 mesh pada perendaman 36 jam menghasilkan aktivitas antioksidan yang tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 100 mesh pada perendaman 24 jam dan ukuran bubuk 80 mesh pada perendaman 36 jam. Aktivitas antioksidan yang dihasilkan pada ukuran bubuk 100 mesh (24 jam) dan ukuran bubuk 80 mesh (36 jam) tidak berbeda nyata dengan ukuran bubuk 100 mesh pada perendaman 36 jam. Dan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak yang dihasilkan pada ukuran bubuk 100 mesh (36 jam) berbeda nyata dengan aktivitas antioksidan asam askorbat 500 ppm. Aktivitas antioksidan oleoresin temulawak mulai dari perlakuan perendaman 12 jam dengan ukuran bubuk 60 mesh sampai dengan perlakuan perendaman 36 jam dengan

ukuran bubuk 100 mesh adalah 46,316%, 50,553% dan 52,765% ; 49,2435, 53,003% dan 54,399% ; 51,063%, 53,378% dan 56,798%. Sedangkan aktivitas antioksidan asam askorbat 500 ppm sebesar 97,852%.

Pembanding yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan ini adalah asam askorbat murni dengan kadar 500 ppm. Pemilihan asam askorbat sebagai pembanding karena asam askorbat merupakan antioksidan alami yang memberikan aktivitas antioksidan terbesar dibandingkan dengan antioksidan alami lainnya, seperti tokoferol dan betakaroten. Perbedaan aktivitas antioksidan oleoresin temulawak dari tiap perlakuan dengan asam askorbat ditunjukkan pada Gambar 3.

Aktivitas antioksidan asam askorbat yang tertera pada Gambar 3. sebesar 97,852%. Sampel ST, DT, KT, SA, DA, KA, SP, DP, KP memiliki aktivitas antioksidan masing-masing sebesar 46,316%, 50,553% dan 52,765%; 49,2435%, 53,003% dan 54,399% ; 51,063%, 53,378% dan 56,798%. Dengan demikian, semua sampel memiliki aktivitas antioksidan setengah kali lebih kecil dari asam askorbat. Meskipun oleoresin temulawak yang dihasilkan memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah tetapi masih berpotensi sebagai antioksidan alami yang nantinya diharapkan dapat menggantikan antioksidan sintetis. Senyawa antioksidan dari oleoresin temulawak ini merupakan antioksidan alami yang diharapkan dapat menggantikan antioksidan sintetis seperti BHA dan BHT. BHA dan BHT merupakan antioksidan sintetis yang banyak digunakan dalam makanan. Antioksidan sintetis ini memiliki kemampuan yang sama dengan antioksidan alami dalam menangkal radikal bebas. Akan tetapi, penggunaan antioksidan sintetis dalam jangka waktu yang panjang dan dengan dosis yang berlebih dapat menyebabkan karsinogenik. Oleh karena itu, antioksidan alami sangat dibutuhkan untuk menggantikan penggunaan antioksidan sintetis untuk menghindari karsinogenik tersebut.



**Gambar 3.** Uji pembanding aktivitas antioksidan antara oleoresin temulawak dengan asam askorbat. Keterangan: ST = ukuran bubuk 60 mesh, lama perendaman 12 jam, DT = ukuran bubuk 80 mesh, lama perendaman 12 jam, KT = ukuran bubuk 100 mesh, lama perendaman 12 jam, SA = ukuran bubuk

## KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pengecilan ukuran berpengaruh terhadap kandungan senyawa aktif oleoresin temulawak. (i) Perlakuan pengecilan ukuran 100 mesh menghasilkan kandungan senyawa aktif (kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan) dengan kadar yang lebih tinggi dari pada perlakuan pengecilan ukuran 60 dan 80 mesh, yaitu sebesar 0,507%, 1,568% dan 54,654%; (ii) Perlakuan lama perendaman berpengaruh terhadap kandungan senyawa aktif oleoresin temulawak. Perlakuan perendaman 36 jam memiliki kandungan senyawa aktif (kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan) dengan kadar yang lebih tinggi dari pada perlakuan perendaman 12 dan 24 jam, yaitu sebesar 0,493%, 1,633% dan 53,746%; (iii) Perlakuan pengecilan ukuran dan lama perendaman tidak memberikan interaksi pada semua parameter uji, dimana perlakuan pengecilan ukuran dan lama perendaman tidak saling mempengaruhi kandungan senyawa aktif (kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan) oleoresin temulawak yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, Mulyono E, Yulianingsih. 2006. Prospek Oleoresin dan Penggunaannya di Indonesia. Balai Besar Litbang Pascapanen Pertanian, Bogor.
- Adam J. 2008. Alat dan Mesin. <http://billyjoeadam.blogspot.com>. Diakses tanggal 03 November 2010.
- Anonim. 2009. Temulawak. <http://www.osun.org>. Diakses tanggal 30 Oktober 2010.
- Ayu D. 2008. Pola Protein dan Kandungan Kurkuminoid Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Institut Pertanian Bogor.
- Cahyono B. 2007. Standardisasi Bahan Baku Obat Alam. Seminar Nasional Penggunaan Obat Bahan Alam Dalam Pelayanan Kesehatan, Semarang.
- Dalimartha S. 2000. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya. Jakarta.
- Handayani S. 2009. Isolasi, Identifikasi Isoflavon, dan Uji Aktivitas Antioksidan Tempe Kedelai Berbahan Baku Kedelai Kuning (*Glycine max* L Merrill) Madura Jawa Timur dengan Variasi Lama Waktu Fermentasi. Seminar Kimia FKIP UNS. Surakarta.
- Julisti B. 2010. Optimasi Proses Pengeringan Bahan Pangan. <http://btgallery.blogspot.com>. Diakses pada tanggal 18 Mei 2011.
- Ketaren S. 1987. Minyak Atsiri. UI Press. Jakarta.
- Nugraha AA. 2010. Kajian Kadar Kurkuminoid, Total Fenol Dan Aktivitas Antioksidan Oleoresin Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) Dengan Variasi Teknik Pengeringan dan Warna Kain Penutup. [Skripsi]. Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Pratimasari D. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah *Carica papaya* L. dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik Serta Flavonoid Totalnya. [Skripsi]. UMS, Surakarta.
- Raharjo M, Rostiana O. 2005. Budidaya Tanaman Temulawak. Sirkuler No. 11. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor.
- Rukmana R. 1995. Temulawak: Tanaman Rempah dan Obat. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Sembiring BB, Ma'mun, Ginting EI. 2006. Pengaruh kehalusan bahan dan lama ekstraksi terhadap mutu ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat 17 (2): 53-58.
- Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. 1989. Phenolic compound of the mesocarp of cresthaven peaches during storage and ripening. J Food Sci 54: 1259-1268.

- Sidik MW, Muhtadi A. 1995. Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phytomedica. Jakarta.
- Sudarmadji, Haryono B, Suhardi. 1997. Prosedur Analisa Untuk Bahan Makanan dan Pertanian (Edisi Keempat). Liberty. Yogyakarta.
- Sunardi IK. 2007. Uji aktivitas antioksidan ekstrak belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH). Seminar Nasional Teknologi 2007 (Snt 2007). Yogyakarta.
- Tonnesen HH, Karlsen J. 1985. Studies on curcumin and curcuminoids alkaline degradation of curcumin. *Z. Lebens, Unters, Forsch* 180: 132-134.
- Widiyanti R. 2006. Analisa Kandungan Antioksidan dan Fenol pada Jahe. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Zahro L, Cahyono B, Hastuti RB. 2009. Profil tampilan fisik dan kandungan kurkuminoid dari simplisia temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb) pada beberapa metode pengeringan. *Jurnal Sains & Matematika* 17 (1): 24-32

## Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*

### *In vitro* testing of antibacterial activity of extracts of seed cardamom (*Amomum compactum*) against by *Aeromonas hydrophila*

SISKA DYAH KUSUMA PUTRI, ARI SUSILOWATI, RATNA SETYANINGSIH

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

Manuskrip diterima: 29 Mei 2015. Revisi disetujui: 29 Mei 2012.

**Abstract.** Putri SDK, Susilowati A, Setyaningsih R. 2016. *In vitro* testing of antibacterial activity of extracts of seed cardamom (*Amomum compactum*) against by *Aeromonas hydrophila*. *Biofarmasi* 14: 10-18. One of the obstacles that hinder the cultivation of common freshwater fish is the presence of pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. These bacteria cause Motile *Aeromonas* Septicemia (MAS). One effort against MAS on freshwater fish is the use of cardamom seed (*Amomum compactum*). The purpose of this study were to know the antibacterial activity and get the minimum concentration of cardamom seed extract that was able to inhibit *A. hydrophila* *in vitro*. Cardamom seed extraction was done by stratified maceration using three solvent i.e. n-hexane, ethyl acetate and methanol. Antibacterial activity was conducted using disc diffusion method by 100% concentration for each extract, solvents, only bacteria culture without the extract as negative control and positive control for chloramphenicol 3,4%. *Minimum Concentration Inhibitory* test (MIC) performed using extracts of the most widespread inhibitory zone. The extract concentrations tested 5,71%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34%, 0,17%(b/v), and 0% as a negative control, while the antibiotic chloramphenicol as a positive control. Data analysis using Analysis of Variance test (ANOVA) and Duncans Multiple Range test (DMRT) level of 5%. Cardamom seed extracted by n – hexane, ethylacetate and methanol as a solvent were 11,1 g, 10 g and 15,1 g extract respectively. Inhibition zone of 100% cardamom seed extract with the solvent n - hexane, ethyl acetate and methanol were 5,25 mm, 6,25 mm and 5,75 mm respectively. MIC values in the ethyl acetate extract of *A. hydrophila* was 2,70%.

**Keywords:** *Amomum compactum*, antibacterial, cardamom seed extract, *Aeromonas hydrophila*, *in vitro*

### PENDAHULUAN

Potensi budidaya ikan air tawar cukup besar yaitu sekitar 10 ton/tahun. Pada tahun 2006, ekspor perikanan budidaya di Indonesia mencapai 1.329 juta ton. Nilainya mencapai US \$21 miliar atau sekitar Rp. 18,9 triliun (Pasaribu 2006).

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* merupakan salah satu penyakit ikan yang utama di Indonesia. Selain menyerang ikan juga dapat menyerang manusia, meskipun kasus yang terjadi masih langka (Noorastuti 2012). Pada tahun 1980, wabah penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* menyebabkan kematian 82.288 ikan di Jawa Barat. Pada tahun 2005, sebanyak 47 ton ikan gurame dan 2,1 juta ekor benih gurame yang siap dipasarkan mati disebabkan oleh penyakit yang disebabkan *A. hydrophila* di Lubuk Pandan, Sumatera Barat (Zainal 2009).

Metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Penggunaan terapi kimiawi dan antibiotik untuk penanganan penyakit ikan pada akuakultur telah mendapatkan kritikan tajam (FAO 2005). Penanganan yang dilakukan di tingkat petani bergantung pada antibiotik seperti oksitetrasiklin dan hijau malachite (Jangkaru 2007). Penggunaan antibiotik secara berlebihan

dan jenis antibiotik yang tidak tepat mengakibatkan adanya galur resisten dari bakteri *A. hydrophila* dalam budidaya ikan, serta bau antibiotik yang mencemari perairan (Mohammad dan Abasali 2010).

Resistensi bakteri terhadap obat-obatan merupakan salah satu proses alamiah yang dilakukan oleh organisme untuk mengembangkan toleransi terhadap keadaan lingkungan yang baru (Skou dan Jensen 2007). Pada penelitian Kaskhedikar dan Chhabra (2010), cara pengobatan dengan menggunakan kombinasi berbagai antibiotik dapat menimbulkan masalah resistensi yaitu munculnya bakteri yang multiresisten terhadap antibiotik seperti pada isolat *A. hydrophila* yang resisten terhadap antibiotik ampicilin dan kolistin (Tjay dan Rahardja 2002). Meskipun demikian penggunaan antibiotik tidak bisa 100% ditinggalkan sehingga bahan alam bisa digunakan sebagai pengobatan alternatif.

*Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) atau *penyakit merah*, merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila*. MAS merupakan penyakit bakterial yang bersifat akut, menginfeksi semua umur dan semua jenis ikan air tawar baik yang dibudidayakan seperti: ikan mas, lele, patin, nila, dan gurame maupun ikan yang ada di perairan umum. Tingkat kematian akibat penyakit tersebut dapat mencapai 80% dalam periode yang relatif singkat dengan kerugian ekonomi yang signifikan. Gejala klinis

akibat infeksi bakteri tersebut antara lain: warna tubuh pucat, *haemorrhagic septicemia* atau pendarahan yang meluas di seluruh permukaan tubuh, luka/borok (*ulcer*), perut busung (*dropsy*), sisik terkuak, dan luka pada sirip disertai kematian. Komisi Kesehatan Ikan dan Lingkungan Nasional pada tahun 2006 telah menetapkan jenis penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* sebagai salah satu penyakit ikan utama di Indonesia (Choudhury et al. 2006).

Indonesia merupakan negara kaya dengan tumbuhan yang berkhasiat untuk obat. Penggunaan tumbuhan sebagai obat telah dikenal sejak zaman nenek moyang dan telah diwariskan secara turun-temurun (Oswald 1995). Banyak jenis bahan alam mengandung senyawa yang bersifat antibakteri. Sejumlah bahan alam mengandung senyawa bersifat bakterisidal (pembunuh bakteri), dan bakteristatik (penghambat pertumbuhan bakteri). Bahan alam untuk obat banyak diperoleh di pekarangan rumah dan mudah dikerjakan oleh siapa saja dalam keadaan yang mendesak sekalipun. Kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi modern ternyata tidak mengesampingkan begitu saja peranan bahan alam tetapi justru saling melengkapi. Hal ini terbukti dari banyaknya peminat bahan alam (Solikhah 2009).

Pemakaian ekstrak biji kapulaga sebagai antibakteri pada ikan belum banyak digunakan dan besarnya aktivitas antibakteri dari bahan-bahan tersebut belum banyak diketahui. Untuk itu perlu dilakukan penelitian tentang antibakteri ekstrak kapulaga terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro*. Berdasarkan penelitian Maipiliandari et al. (2008), ekstrak kapulaga memiliki kemampuan menghambat aktivitas bakteri gram negatif yaitu *E. coli* dengan menghasilkan zona hambat sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/mL. Permintaan buah kapulaga ini sangatlah laku keras di pasaran Indonesia. Permintaan buah kapulaga untuk obat di Indonesia tahun 1978 sebanyak 97 ton, dan 1979 sebanyak 142 ton. Pada tahun 2006, ketika panen raya pada bulan Juni-Agustus, permintaan melonjak menjadi 3 ton per hari (Yajri 2009).

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah mengetahui besarnya aktivitas antibakteri dari ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *A. hydrophila* secara *in vitro* dan mengetahui konsentrasi minimum ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2011 sampai Maret 2012 bertempat di Laboratorium Biologi FMIPA dan Sub Laboratorium Biologi, UPT Laboratorium MIPA Pusat, Universitas Sebelas Maret Surakarta, Jawa Tengah.

### Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam biakan murni *Aeromonas hydrophila* dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta, Biji kapulaga (*Amomum compactum*) yang

telah diidentifikasi di Balai Besar Penelitian Tanaman Obat dan Obat Tradisional (BBPTO-OT) Tawangmangu Karanganyar, Jawa Tengah; *Trypticase Soy Broth* (TSB) dan *Trypticase Soy Agar* (TSA); pelarut aquades, *Carboxyl Methyl Cellulose* (CMC), metanol, etil asetat dan n-heksana; cakram kertas, dan kloramfenikol.

Alat yang digunakan untuk membiakan bakteri: erlenmeyer 50 mL, tabung reaksi, *shaker*, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, cawan petri, bunsen burner, jarum ose, mikropipet 100  $\mu$ L-1000  $\mu$ L dan mikropipet 20  $\mu$ L-200  $\mu$ L. Alat yang digunakan untuk ekstraksi: blender, toples maserasi, oven, corong pisah, erlenmeyer, dan *rotary evaporator*. Alat yang digunakan untuk uji penghambatan dengan pengukuran zona bening: jangka sorong, cawan petri, mikropipet 100  $\mu$ L-1000  $\mu$ L dan mikropipet 20  $\mu$ L-200  $\mu$ L. Alat yang diperlukan untuk penentuan MIC: Seperangkat alat spektrofotometer, dan tabung reaksi.

### Cara kerja

#### Pembuatan serbuk biji kapulaga

Biji kapulaga dicuci bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Biji kapulaga yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk digunakan untuk pembuatan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol.

#### Pembuatan ekstrak kapulaga

Menurut Harmani et al. (2001), ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol yang masing-masing bersifat non polar, semi polar, dan polar. Serbuk kapulaga 550 g dilarutkan dalam n-heksana sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  L), dikocok dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut etil asetat sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  L), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dengan pelarut metanol sampai terendam semua ( $\pm 2,5$  L), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Masing-masing filtrat dipekatkan dengan cara dievaporasi dengan suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak agak kental. Ekstrak agak kental diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan diperoleh ekstrak yang lebih kental. Konsentrasi ekstrak dibuat dengan menambahkan CMC 0,1% sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan.

#### Penyiapan media untuk pertumbuhan bakteri

Komposisi TSB: *peptonase from casein* 17,0 g, *peptone from soymeal* 3,0 g, D(+) glukosa 2,5 g, sodium chloride 5,0 g, dipotassium hydrogen fosfat 2,5 g, aquades 1000 mL pH akhir 7,3. TSA: TSB ditambahkan *agar bacteriological*. Media TSB dan TSA yang akan digunakan untuk menumbuhkan bakteri beserta peralatan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm.

#### Pembuatan kurva standar *A. hydrophila*

Hubungan antara nilai absorbansi dan jumlah bakteri per mL didapatkan melalui pembuatan kurva standar

dengan menentukan plot antara nilai absorbansi dan nilai hitung cawan. Sebanyak 1 ose biakan bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan dalam 10 mL media TSB digoyangkan di atas *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam sampai media menjadi keruh. Kemudian, 5 mL biakan bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 5 mL media TSB, dilakukan pengenceran berseri sebanyak 5 tabung yang berisi media TSB sehingga diperoleh perbandingan 1: 1/2: 1/4: 1/8: 1/16. Masing-masing tabung reaksi yang berisi media dan biakan bakteri diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Setelah diketahui nilai OD, 1 mL biakan bakteri ditumbuhkan ke dalam 9 mL garam fisiologis 0,85% dalam tabung reaksi dan dihomogenkan dengan *vortek* (pengenceran  $10^{-1}$ ). Biakan bakteri diambil 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  dan dimasukkan ke dalam garam fisiologis 9 mL dalam tabung reaksi lain (pengenceran  $10^{-2}$ ). Seri pengenceran dibuat sampai pengenceran  $10^{-5}$ . Masing-masing biakan dalam tabung reaksi diambil 100  $\mu$ L biakan bakteriditetskan pada media TSA dalam cawan petri dan diratakan dengan batang kaca penyebar selama 48 jam kemudian diinkubasi dengan suhu 29°C. Setiap pengenceran diambil 2 kali untuk ditumbuhkan pada cawan petri yang berbeda (2 ulangan). Metode yang digunakan adalah *spread plate*. Jumlah bakteri dihitung jika jumlah koloni yang tumbuh antara 30-300. Jika yang memenuhi syarat 30-300 ada dua tingkat pengenceran maka jika perbandingan lebih dari atau sama dengan 2: 1, dipilih pengenceran yang lebih dulu. Jika perbandingan kurang dari 2: 1, hasilnya dirata-rata. Jika ada kontaminasi yang menutupi lebih dari separuh petri, koloni dalam cawan tersebut tidak dapat dihitung. Jumlah sel per mL dihitung dengan cara membagi jumlah koloni dengan faktor pengenceran dan volume suspensi yang disebar. Kurva standar dapat diperoleh dengan nilai regresi  $y = bx + a$ , dengan  $y$  = nilai absorbansi,  $x$  = jumlah sel bakteri.

#### Pembuatan kurva pertumbuhan *A. hydrophila*

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan untuk mengetahui fase log bakteri sehingga dapat diketahui waktu yang tepat yaitu fase log untuk melakukan uji aktivitas antibakteri terhadap *A. hydrophila*. Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan cara memindahkan satu ose biakan bakteri ke dalam 10 mL media TSB kemudian digoyangkan di atas *shaker* dengan kecepatan 120 rpm dalam suhu 29°C selama 24 jam. Setelah inkubasi 24 jam, 5 mL biakan bakteri tersebut dipindahkan dalam 95 mL media serupa dan diukur nilai absorbansi setiap 2 jam selama 24 jam pada panjang gelombang 595 nm dengan menggunakan spektrofotometer sehingga didapatkan nilai *optical density* (OD). Media steril digunakan sebagai blangko. Kurva pertumbuhan ditentukan dengan plot antara waktu dan log jumlah bakteri per mL (Grandiosa 2010).

#### Penyiapan biakan bakteri

Satu ose bakteri *A. hydrophila* ditumbuhkan di media TSB 10 mL, digoyangkan dengan *shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 24 jam, kemudian 5 mL suspensi bakteri tersebut dipindahkan ke dalam 95 mL media TSB, sehingga diperoleh volume 100 mL biakan bakteri. Biakan bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas penghambatan

adalah biakan bakteri pada fase log dengan kepadatan  $10^6$ - $10^8$  cfu/mL ditentukan berdasarkan nilai OD yang didapatkan dari kurva standar.

#### Uji penghambatan dengan metode difusi cakram

Bulatan cakram kertas berdiameter 5 mm ditetesi dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol masing-masing dengan konsentrasi 100%, pelarut n-heksana, etil asetat, metanol, CMC 0,1%, biakan bakteri sebagai kontrol negatif dan kloramfenikol 3,4% yang digunakan sebagai kontrol positif. Cakram kertas ditetesi dengan larutan uji, dikeringanginkan kemudian ditetesi kembali dengan ekstrak sampai ekstrak yang terserap sebanyak 5  $\mu$ L. Dengan pinset steril, bulatan cakram kertas yang telah kering tersebut dilekatkan dalam media TSA dalam cawan petri yang sebelumnya telah diinokulasi dengan 0,1 mL suspensi bakteri dengan kerapatan sekitar  $10^8$  sel/mL. Kemudian biakan disimpan dalam lemari pendingin selama  $\pm$  2 jam agar proses difusi ekstrak kapulaga berjalan dengan baik. Setelah itu, keseluruhan cawan petri diinkubasi pada suhu 29°C selama 24 jam. Pengujian ini dilakukan dengan empat ulangan. Pengamatan penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar cakram kertas dengan menggunakan jangka sorong yang merupakan diameter zona penghambatan (Brooks dan Morse 2005). Ekstrak yang menunjukkan diameter zona penghambatan paling besar terhadap pertumbuhan bakteri kemudian diujikan lebih lanjut.

#### Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Percobaan MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimal ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri setelah dikontakkan dengan ekstrak dengan beberapa konsentrasi kemudian diinkubasi selama 24 jam. Konsentrasi ekstrak ditentukan berdasarkan hasil uji penghambatan metode difusi. Ekstrak biji kapulaga yang paling luas zona penghambatannya dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), dan 0% sebagai kontrol negatif, antibiotik kloramfenikol sebesar 3,4% sebagai kontrol positif. Nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga dengan konsentrasi 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,35%, 0,17% (b/v), tanpa bakteri diukur dan digunakan sebagai pembanding. Penentuan MIC dilakukan dengan metode dilusi/pengenceran, media yang digunakan adalah TSB.

Sebanyak 10 mL TSB ditambahkan pada setiap tabung uji. Sejumlah 400  $\mu$ L ekstrak tiap konsentrasi dan 400  $\mu$ L kultur bakteri dengan kepadatan  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi berbeda. Ekstrak masing-masing konsentrasi sebanyak 400  $\mu$ L ditambahkan dalam media TSB steril untuk digunakan sebagai pembanding. Perlakuan tersebut menggunakan lima ulangan. Pengamatan MIC dilakukan dengan melihat adanya kekeruhan pada media sebagai indikasi adanya pertumbuhan bakteri setelah 24 jam inkubasi pada suhu 29°C dan bila medianya bening diindikasikan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri.

Tabung reaksi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran

nilai OD dengan spektrofotometer ( $\lambda$  595 nm) (Lukistyowati 2005). Apabila hasil pengukuran terhadap nilai MIC merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentasi penghambatan:  $1-(OD \text{ Uji}/OD \text{ kontrol})$  (Sherlock et al. 2010).

#### Analisis data

Analisis data meliputi secara statistik dengan Analysis of Variance (ANOVA) dan dilanjutkan uji Duncans Multiple Range Test (DMRT) taraf 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Komponen bioaktif pada biji kapulaga

Pemisahan komponen bioaktif biji kapulaga dengan menggunakan metode ekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Maserasi 550 g berat kering biji kapulaga menghasilkan ekstrak kental sebanyak 2,018% menggunakan pelarut n-heksana, 1,188% menggunakan pelarut etil asetat, dan 2,745% menggunakan pelarut metanol dari massa awal. Ekstrak kental dari masing-masing pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah n-heksana, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dengan pelarut n-heksana ini dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar alami terutama senyawa-senyawa lilin, minyak nabati dan sebagian minyak atsiri yang terkandung dalam biji kapulaga. Ekstraksi dengan pelarut etil asetat dimaksudkan untuk menarik senyawa-senyawa semi polar seperti alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga. Pelarut metanol digunakan untuk menarik senyawa-senyawa polar seperti fenolik, karbohidrat, asam amino dan protein yang terkandung dalam biji kapulaga. Proses maserasi perlu disertai dengan pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk dan maserat dapat lebih homogen. Pengadukan juga dapat menimbulkan sirkulasi sehingga ekstraksi dapat berlangsung optimal. Pelarut akan mengalir secara berulang-ulang ke dalam serbuk. Perpindahan pelarut dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah tidak terjadi apabila konsentrasi di dalam dan di luar sel dalam keadaan seimbang. Maserasi dengan n-heksana, etil asetat dan metanol dilakukan dalam waktu 24jam, dengan asumsi bahwa dengan rentang waktu tersebut senyawa yang diinginkan telah terambil.

Hasil maserasi biji kapulaga untuk pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki nilai rendemen yang tinggi jika dibandingkan dengan biji teratai dan agak rendah jika dibandingkan dengan daging biji kepel. Untuk rendemen maserasi biji teratai dengan pelarut n-heksana sebanyak 0,84%, etil asetat sebanyak 0,95% dan etanol sebanyak 7,34% (Fitrial et al. 2008). Untuk biji kepel (*Stelechocarpus buharol*) rendemen maserasi dengan pelarut metanol sebanyak 18,76% (Sumartini 2008). Jika dibandingkan dengan hasil maserasi biji belimbing dengan menggunakan pelarut metanol rendemennya hanya sekitar

1,41% (Sukadana 2009). Rendemen maserasi biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol lebih besar. Hasil rendemen maserasi untuk biji dan biji sangat kecil dibandingkan dengan maserasi bagian-bagian lain pada tumbuhan seperti daun atau akar. Perbedaan rendemen dari hasil maserasi dikarenakan perbedaan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam simplisia dan kemampuan pelarut untuk mengambil kandungan senyawa aktif yang berada di dalam suatu simplisia.

### Kurva standar *A. hydrophila*

Penentuan kepadatan *A. hydrophila* yang mampu mencapai aktivitas antibakteri dilakukan dengan membuat kurva standar *A. hydrophila*. Suspensi *A. hydrophila* diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 595 nm sehingga diperoleh OD yang kemudian dikorelasikan dengan jumlah bakteri pada hitung cawan Tabel 2. Nilai OD dan jumlah bakteri hasil hitungan cawan dan 10b) dibuat kurva standar *A. hydrophila* sehingga diperoleh persamaan  $y = 1,625x - 11,83$  dapat dilihat pada Gambar 1.A.

Uji virulensi *A. hydrophila* melalui penyuntikan menunjukkan bahwa bakteri tersebut sangat virulen terhadap ikan nila dan menyebabkan infeksi pada kepadatan  $10^6$  cfu/mL, ikan uji telah mengalami kematian sebesar 50% dalam waktu 96 jam (Mangunwardoyo et al. 2010). Berdasarkan kurva standar tersebut, kepadatan *A. hydrophila* sebesar  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL dicapai pada nilai OD  $\leq 1$ .

### Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*

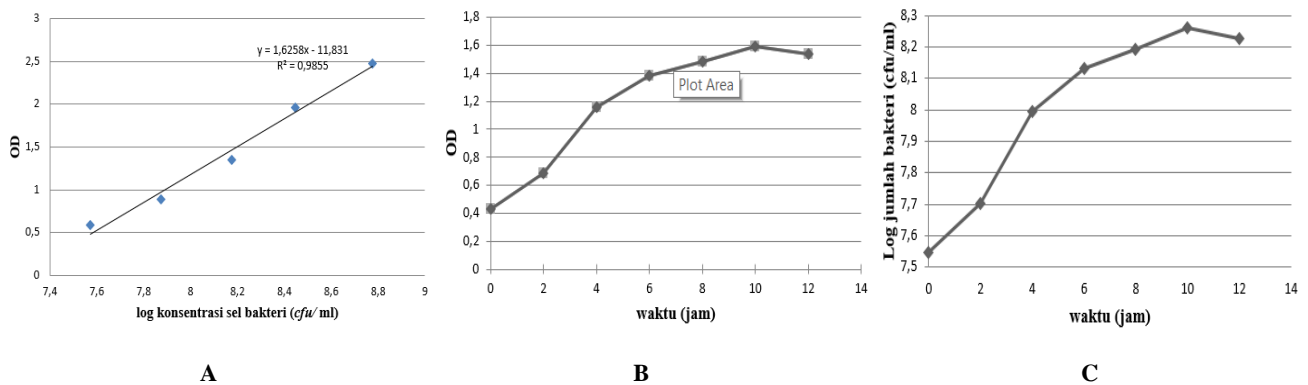
Pengukuran kurva pertumbuhan dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui fase log dari pertumbuhan bakteri yang nantinya akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Pengukuran nilai OD *A. hydrophila* dilakukan pada panjang gelombang 595 nm dan dilakukan 2 jam sekali selama 24 jam. Dari pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 1.B.

**Tabel 1.** Berat dan warna ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi bertingkat biji kapulaga dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol

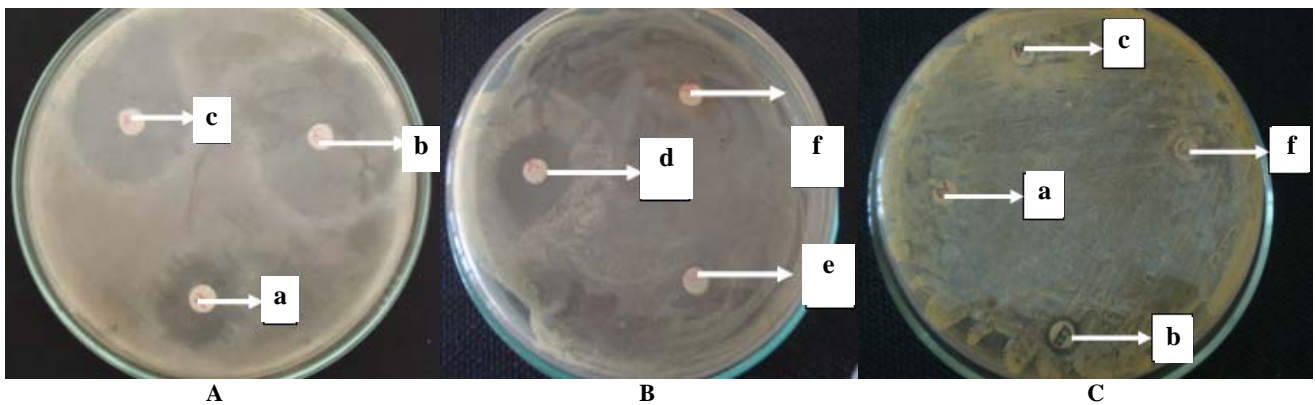
	Pelarut ( $\pm 2,5$ L)		
	N-heksana	Etil asetat	Metanol
Berat ekstrak (g)	11,1 g	10 g	15,1 g
Warna ekstrak	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman	Hitam Kecoklatan

**Tabel 2.** Nilai OD dan jumlah bakteri *A. hydrophila* dalam hitung cawan

Pengenceran Tabung ke-	OD	Jumlah bakteri	Log jumlah bakteri
1	2,4724	$6 \times 10^8$	8,778
2	1,9631	$3 \times 10^8$	8,477
3	1,3510	$1,5 \times 10^8$	8,176
4	0,8876	$7,5 \times 10^7$	7,875
5	0,5846	$3,75 \times 10^7$	7,574



**Gambar 1.** A. Kurva Standar *A. hydrophila*, B. Kurva Pertumbuhan *A. hydrophila* selama 24 jam. C. Konsentrasi sel bakteri dalam waktu 24 jam



**Gambar 2.** Zona penghambatan antibakteri ekstrak biji kapulaga konsentrasi 100% terhadap bakteri *A. hydrophila*: a. Pelarut n-heksana, b. Pelarut etil asetat, c. Pelarut metanol, d. Pelarut kloramfenikol 3,4%, e. Tanpa perlakuan, f. Pelarut CMC 0,1%

Dari kurva pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui bahwa pada jam ke 10 terjadi kestabilan nilai OD karena telah memasuki fase stasioner. Berdasarkan kurva pertumbuhan ditentukan bahwa bakteri yang digunakan untuk inokulum berumur 6 jam dengan kepadatan  $1,29 \times 10^8$  cfu/mL (Gambar 1.B-C). Menurut Schlegel dan Schmidt (1994), pada fase lag pertumbuhan bakteri berlangsung lambat karena bakteri harus mulai beradaptasi dengan medium baru.

Pada fase log pertumbuhan bakteri berlangsung cepat karena ketersediaan nutrisi yang cukup. Selanjutnya pada fase stasioner pertumbuhan jumlah bakteri semakin sedikit karena ketersediaan nutrisi yang semakin terbatas. Bakteri akan mengalami fase kematian setelah melewati fase 24 jam. Kondisi tersebut terkait dengan ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang tepat untuk kehidupan bakteri tersebut (Purwoko 2007).

Selama masa pertumbuhan *A. hydrophila* yang ditumbuhkan dalam media akan mengeluarkan metabolit primer maupun sekunder yang dapat menurunkan kualitas nutrisi dalam media. Kondisi tersebut dapat mempengaruhi aktivitas dan patogenitas bakteri (Maturin dan Peller 1998).

#### Aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*

Ketahanan mikroorganisme terhadap suatu antibakteri dapat dilakukan dengan pengujian menggunakan antibiotik komersial. Metode ini dikembangkan oleh Kirby-Bauer dikenal dengan *Kirby-Bauer Disk Method*. Prinsip kerja metode ini yaitu kemampuan difusi antibiotik yang diberikan pada suatu cakram kertas untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji pada medium kultur (Atlas et al. 1984). Hasil uji antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona hambat oleh adanya pengaruh ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol biji kapulaga pada *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 2.

Ukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram kertas pada mikroorganisme uji tergantung pada beberapa faktor. Faktor ini antara lain, adalah densitas dan viskositas medium kultur, kemampuan difusi antibiotik, konsentrasi antibiotik pada cakram kertas, sensitivitas mikroorganisme uji terhadap antibiotik dan interaksi antara antibiotik dan medium (Atlas et al. 1984).

**Tabel 3.** Diameter zona hambat antibakteri ekstrak biji kapulaga 100% terhadap bakteri *A. hydrophila* pada inkubasi selama 24 jam

Perlakuan	Diameter zona hambat (mm)
Pelarut n-heksana	0 <sup>a</sup>
Pelarut etil asetat	0,75 <sup>a</sup>
Pelarut metanol	0 <sup>a</sup>
Pelarut CMC 0,1%	0 <sup>a</sup>
Ekstrak n-heksana	5,25 <sup>b</sup>
Ekstrak etil asetat	7,00 <sup>c</sup> *
Ekstrak Metanol	5,75 <sup>b</sup>
Kloramfenikol 3,4%	5,5
Tanpa perlakuan	0

Keterangan: \* : Diameter zona hambat terbesar. Angka-angka pada kolom yang sama yang didampingi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak biji kapulaga yang diujikan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Aktivitas penghambatan ini ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekeliling cakram kertas. Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* oleh ekstrak biji kapulaga pada berbagai pelarut dapat dilihat pada Tabel 3.

Menurut Davis dan Stout (1971) ketentuan kekuatan daya antibiotik-antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan berukuran 5-10 mm dikategorikan sedang, daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah.

Hasil pengukuran zona hambat menunjukkan bahwa ekstrak biji kapulaga dengan ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol memiliki daya hambat yang sedang terhadap bakteri *A. hydrophila* yaitu sekitar 5-6,25 mm setelah dikurangi dengan masing-masing pelarut. Namun, ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat memiliki daya hambat paling besar dibandingkan dengan ekstrak bijikapulaga dengan pelarut metanol yaitu sebesar 6,25 mm setelah dikurangi pelarut etil asetat. Sedangkan kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sebesar 5,5 mm. Hal ini diketahui dengan adanya zona bening pada biakan bakteri di cawan petri.

Penelitian Maipiliandri (2008) menyatakan bahwa ekstrak biji kapulaga memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri gram negatif. Biji kapulaga dengan pelarut metanol memiliki daya hambat sedang terhadap bakteri *E. coli* sebesar 8,0 mm untuk konsentrasi 250 mg/mL.

Ardiansyah (2007) mengatakan bahwa secara umum mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu gangguan pada senyawa penyusun dinding bakteri, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik.

Mekanisme pertama mengganggu pembentukan dinding sel, mekanisme ini disebabkan karena adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding atau membran sel sehingga menyebabkan perubahan komposisi

penyusun dinding sel. Terjadinya akumulasi senyawa antimikroba dipengaruhi oleh bentuk tak terdisosiasi. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel, komponen bioaktif dapat mengganggu dan mempengaruhi integritas membran sitoplasma yang dapat mengakibatkan kebocoran materi intraseluler, mengakibatkan lisis sel dan menyebabkan denaturasi protein, penghambatan pembentukan protein sitoplasma dan asam nukleat, dan menghambat ikatan ATP-ase pada membran sel. Mekanisme kedua bereaksi dengan membran sel. Mekanisme ketiga menginvasi enzim, mekanisme yang terjadi menunjukkan bahwa kerja enzim akan terganggu dan mempertahankan kelangsungan aktivitas antimikroba, sehingga mengakibatkan enzim akan memerlukan energi dalam jumlah besar mempertahankan kelangsungan aktivitasnya. Akibatnya energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang sehingga aktivitas mikroba menjadi terhambat atau jika kondisi ini berlangsung lama akan mengakibatkan pertumbuhan mikroba terhenti (inaktif). Efek senyawa antimikroba dapat menghambat kerja enzim jika mempunyai spesifitas yang sama antara ikatan kompleks yang menyusun struktur enzim dengan komponen senyawa antimikroba. Mekanisme keempat menginaktivasi fungsi material genetik, komponen bioaktif dapat mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA), menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik yang selanjutnya akan mengaktifasi atau merusak materi genetik sehingga terganggunya proses pembelahan untuk pembiakan.

Perbedaan zona hambat tersebut juga dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri. Perbedaan zona hambat untuk antibiotik kloramfenikol dikarenakan kloramfenikol yang digunakan dalam penelitian ini bukan menggunakan kloramfenikol murni sehingga memiliki zonahambat yang berbeda jika menggunakan kloramfenikol murni, media yang digunakan pada penelitian sebelumnya berbeda dengan penelitian ini sehingga diperoleh hasil yang berbeda. Komposisi media yang berbeda menyebabkan perbedaan aktivitas dari bakteri.

Kloramfenikol sebagai kontrol positif dalam penelitian ini digunakan karena merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan *A. hydrophila*. Kloramfenikol mampu bergabung dengan subunit ribosom sehingga menghambat sintesis protein (Brooks et al. 2005; Noga 2000).

Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan luas zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut metanol dan n-heksana pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut n-heksana dan metanol tidak berbeda nyata. Ekstrak etil asetat memberikan penghambatan tertinggi. Hal ini berarti senyawa yang paling baik untuk penghambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah semi polar seperti alkaloid. Senyawa ini diduga sebagai senyawa antimikroba dikarenakan mempunyai sifat sebagai pengkhelat/pengikatan senyawa berefek spasmolitik. Efek spasmolitik dapat mengerutkan dinding sel *A. hydrophila*

sehingga sel bakteri terganggu permeabilitasnya. Selain itu senyawa alkaloid yang terkandung dalam biji kapulaga diperkirakan mempengaruhi hambatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Kemampuan senyawa semi polar untuk menghambat pertumbuhan berkaitan dengan komponen dinding sel bakteri yang tidak bersifat absolut hidrofobik maupun absolut hidrofilik. Kanazawa et al. (1995) menyatakan bahwa suatu senyawa antimikroba dengan bakteri diperlukan keseimbangan hidrofobik-hidrofilik. Di duga senyawa semi polar mempunyai afinitas lebih tinggi untuk berinteraksi dengan dinding sel, sehingga ekstrak semi polar lebih efektif menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dari pada senyawa polar (metanol) dan nonpolar (n-heksana). Sifat hidrofilik diperlukan untuk menjamin senyawa dapat larut dalam fase air yang merupakan tempat hidup mikroba, tetapi senyawa yang bekerja pada membran sel yang hidrofobik memerlukan pula sifat lipofilik, sehingga senyawa antibakteri memerlukan keseimbangan hidrofobik-lipofilik untuk memperoleh aktivitas yang optimum.

Alkaloid dapat mengganggu bakteri dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel serta mengendapkan protein. Komponen alkaloid juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap perkembangbiakan spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam perkembangbiakan. Senyawa alkaloid yang mampu menginaktivkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Senyawa alkaloid mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel. Ikatan peptidoglikan ini secara mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Jenis bakteri yang digunakan adalah bakteri gram negatif dengan dinding sel terdapat peptidoglikan yang tipis atau sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung fosfolipid, lipopolisakarida, dan lipoprotein. Setelah menerobos dinding sel, senyawa akan menyebabkan kebocoran isi sel dengan cara merusak ikatan hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan tekanan terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Robinson 1991).

Kontrol berupa pelarut n-heksana, dan metanol tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan tidak mempengaruhi hasil penelitian. Sedangkan pada pelarut etil asetat terdapat zona hambat meskipun tidak terlalu besar. Hal ini mengindikasikan bahwa kontrol yang digunakan mempengaruhi uji aktivitas antibakteri meskipun sedikit. CMC dalam penelitian sebagai pelarut tidak mempengaruhi hasil penelitian. CMC adalah derivat dari selulosa. CMC dapat diuraikan secara biologi oleh berbagai macam bakteri aerob maupun anaerob. Hasil penguraiannya berupa fragmen CMC yang lebih kecil dari gula. Selain itu, struktur molekul CMC terlalu besar untuk dapat menetrasi dinding sel bakteri. Ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat diujikan lebih lanjut untuk mengetahui besarnya nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

### Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Pengujian aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan menggunakan metode kontak langsung antara bakteri *A. hydrophila* dengan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Metode MIC ini digunakan untuk mendapatkan nilai MIC dari suatu ekstrak antimikroba. Uji MIC menggunakan metode dilusi/pengenceran.

Uji MIC didefinisikan sebagai nilai terendah dari konsentrasi antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah diinkubasi 24 jam. MIC digunakan sebagai petunjuk konsentrasi antibiotik yang mampu menghambat pertumbuhan mikroba dan juga memberi petunjuk mengenai dosis yang diperlukan dalam pengobatan penyakit (Andrews 2001). Penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditandai dengan media yang jernih ditetapkan sebagai MIC. Berdasarkan Sherlock et al. (2010), pengamatan terhadap nilai MIC dengan menggunakan nilai absorbansi merupakan konsentrasi terendah pada ekstrak uji yang mana hasil penghambatan 100% terhadap pertumbuhan suatu organisme. Formulasi persentase penghambatan:  $1 - (\text{OD Uji} / \text{OD kontrol})$ .

Nilai MIC dipengaruhi oleh bakteri uji yang digunakan, jumlah inokulum yang digunakan, komposisi dari kultur media, waktu inkubasi, kondisi inkubasi seperti suhu, pH, dan aerasi. Nilai MIC dilihat dari tingkat kekeruhan tabung dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dengan melihat tingkat kekeruhan media, untuk ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, dan kloramfenikol dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan gejala bening pada media. Untuk ekstrak konsentrasi 0,68%, 0,34% dan 0,17% menunjukkan gejala kekeruhan (Gambar 4). Tabung reaksi ekstrak tanpa bakteri dan media tidak ada yang menunjukkan gejala kekeruhan yaitu pada ekstrak 5,41%, 2,70%, 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17%. Semua konsentrasi menunjukkan gejala bening. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak dengan tidak terkontaminasi bakteri lain dan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pengamatan ini digunakan sebagai pembandingan dengan pengamatan uji penghambatan ekstrak biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*.

Berdasarkan pengamatan ini konsentrasi ekstrak 1,35% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya untuk memastikan nilai MIC dilakukan spektrofotometri. Nilai absorbansi menunjukkan besarnya cahaya dalam spektrofotometer yang diserap oleh sel dalam kuvet, yang berbanding lurus dengan jumlah sel tersebut. Hasil pengukuran nilai absorbansi ekstrak biji kapulaga terhadap *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 4.

Pertumbuhan bakteri dapat diketahui dengan adanya kekeruhan pada media. Jumlah bakteri dapat diukur dengan cara mengetahui kekeruhan (turbiditas) kultur. Semakin keruh suatu kultur, semakin banyak jumlah selnya. Cahaya yang dipancarkan pada spektrofotometer akan mengenai sel sehingga sebagian cahaya akan diserap dan sebagian lagi diteruskan. Banyaknya cahaya yang diabsorpsi sebanding dengan banyaknya sel bakteri pada batas-batas tertentu (Purwoko 2007).

**Tabel 4.** Nilai absorbansi pada kontrol

Perlakuan	OD	Persentase penghambatan
Kloramfenikol 3,4% Bakteri	0,2592 1,8436	85,94% -

Keterangan: Angka-angka pada kolom yang sama yang didampingi oleh huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%.

**Tabel 5.** Nilai absorbansi pada uji MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga terhadap bakteri *A. hydrophila*

Konsentrasi Ekstrak	Perlakuan (OD)		Selisih (OD)	Persentase penghambatan	Aktivitas
	Bakteri	Tanpa bakteri			
5,41%	0,1417	0,1415	0,0002	99,96% <sup>a</sup>	Menghambat
2,70%	0,1677	0,1638	0,0039	99,78% <sup>a</sup>	Menghambat
1,35%	0,2124	0,1365	0,0759	95,87% <sup>b</sup>	-
0,68%	0,3333	0,1300	0,2033	88,96% <sup>c</sup>	-
0,34%	0,8386	0,1245	0,7141	61,26% <sup>d</sup>	-
0,17%	1,6559	0,1238	1,5321	16,89% <sup>e</sup>	-

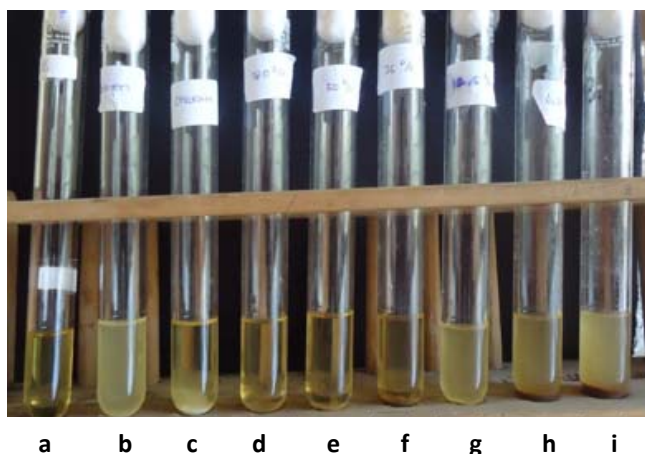
Nilai MIC ditentukan berdasarkan dari konsentrasi terendah dengan nilai OD yang paling kecil. Nilai OD yang terkecil menyatakan adanya penurunan nilai absorbansi yang berarti terjadi penurunan jumlah sel setelah inkubasi. Nilai OD terbesar menunjukkan adanya peningkatan nilai absorbansi yang masih terdapat pertumbuhan bakteri. Masih adanya pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak tersebut belum dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan pengamatan OD

konsentrasi ekstrak 2,70% dapat dijadikan nilai MIC yang menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* karena konsentrasi minimal yang memiliki persentase penghambatan 100%.

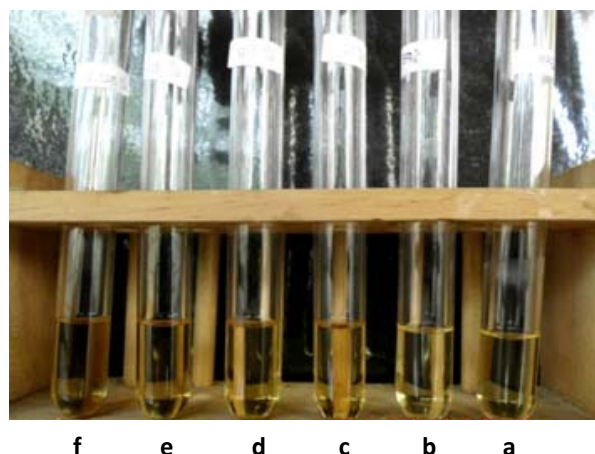
Ekstrak kapulaga dengan pelarut etil asetat dengan konsentrasi 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% sebanding atau tidak beda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95%. Perlakuan ekstrak 5,41% dan 2,70% berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada tingkat kepercayaan 95% terhadap ekstrak 1,35%, 0,68%, 0,34% dan 0,17% (Tabel 5). Hasil pengukuran OD nilai MIC biji kapulaga terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* tercapai pada konsentrasi 2,70%.

Aktivitas bakteriostatik ekstrak etil asetat biji kapulaga dinyatakan dalam nilai MIC, yaitu pada konsentrasi minimal yang menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% lebih baik jika dibandingkan dengan kloramfenikol. Kloramfenikol memiliki persentase penghambatan 85,94% sedangkan ekstrak etil asetat biji kapulaga dengan konsentrasi 2,70% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sebanyak 99,78%.

Jika dibandingkan dengan nilai MIC ekstrak tanaman lain, seperti ekstrak etil asetat bunga kecombrang nilai MIC ekstrak terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium* adalah 4 mg/mL (Naufalin 2005) dan ekstrak jintan hitam terhadap *A. hydrophila* adalah 1000 ppm atau 1 mg/mL (Grandiosa 2010). Nilai MIC pada penelitian ini adalah 2,70%. Nilai MIC pada ekstrak biji kapulaga dapat tercapai jika ekstraknya lebih banyak. Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan spesies bakteri yang dijadikan percobaan serta perbedaan kandungan zat aktif yang diduga berperan sebagai zat antibakteri.



**Gambar 3.** Kekeuhan media pada uji MIC biji kapulaga dengan pelarut etil asetat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*: a. Media, b. Tanpa perlakuan, c. Kloramfenikol, d. Ekstrak 5,41%, e. Ekstrak 2,70%, f. Ekstrak 1,35%, g. Ekstrak 0,68%, h. Ekstrak 0,34%, i. Ekstrak 0,17%



**Gambar 4.** Media dan ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat tanpa bakteri: a. Ekstrak 5,41%, b. Ekstrak 2,70%, c. Ekstrak 1,35%, d. Ekstrak 0,68%, e. Ekstrak 0,34%, f. Ekstrak 0,17%

## KESIMPULAN

Ekstrak biji kapulaga yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap *A. hydrophila* adalah ekstrak biji kapulaga dengan pelarut etil asetat. Senyawa yang memiliki aktivitas penghambatan terbesar *A. hydrophila* adalah senyawa semipolar. Nilai MIC ekstrak etil asetat biji kapulaga (*A. compactum*) terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah pada konsentrasi 2,7.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aberoum A, Jooyandeh H. 2010. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World J Fish Mar Sci* 2: 519-523.
- Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chem* 48: 5-16.
- Ardiansyah. 2007. Antimikroba dari Tumbuhan. [www.beritaipetek.com](http://www.beritaipetek.com).
- Atlas RM, Brown AL, Dobra KW, Miller L. 1984. *Microbiology Fundamental and Application*. MacMillan Publishing Company, New York.
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill, New York.
- Choudhury D, Pal AK, Sahu NP, Kumar S, Das SS, Mukherjee SC. 2006. Dietary yeast RNA supplementation reduces mortality by *Aeromonas hydrophila* in rohu (*Labeo rohita* L.) juveniles. *Fish Shellfish Immun* 19: 281-291.
- Davis WW, Stout TR. 1971. Disc Plate Methode of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiology* 22: 659-665.
- FAO. 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, Rome.
- Fitrial Y, Astawan M, Soekarto S, Wiryawan K, Wrediyati T, Khairina R. 2008. Aktivitas antibakteri ekstrak biji teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) terhadap bakteri patogen penyebab diare. *J Teknol Indon Pangan* 88: 158-154.
- Grandiosa R. 2010. Efektivitas Penggunaan Larutan Filtrat Jintan Hitam (*Nigella sativa*) dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In-vitro dan Uji Toksisitasnya terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). [Skripsi]. Universitas Padjajaran, Jatinangor, Sumedang.
- Harmani MN, Djas P, Said N. 2001. Penapisan hayati antimikroba ekstrak biji pisang batu (*Musa brachicarpa*). *J Natural* 1: 34-37. <http://teknologi.vivanews.com/news/read/320486-bakteri-pemangsa-daging-manusia> [diakses 13 Juni 2012]
- Jangkaru Z. 2007. *Pembesaran Ikan Air Tawar di Berbagai Lingkungan Pemeliharaan*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Kanazawa A, Ikeda T, Endo T. 1995. A Novel approach to mode of action of calionic biocides morfological effect on bacterial activity. *J Appl Bacteriol* 60: 77-88.
- Kashedikar M, Chhabra D. 2010. Multiple drug resistance in *Aeromonas hydrophila* isolates of fish. *Veterinary World* 3: 76-78.
- Larkin JM. 2000. *A Laboratory Manual for Microbiology*. Kendall/Hunt Publishing Company, New York.
- Lukistyowati I. 2005. *Teknik Pemeriksaan Penyakit Ikan*. Universitas Riau Press, Pekanbaru.
- Maipiliandari I, Herawati S, Irawan, Widiantipa N. 2008. Aktivitas antimikrob dari oleoresin beberapa tanaman rempah. *Warta Akrab* 19: 1-10.
- Mangunwardoyo W, Ismayasari R, Riani E. 2010. Uji patogenisitas dan virulensi *Aeromonas hydrophila* stainer pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) melalui Postulat Koch. *J Ris Akua* 5: 245-255.
- Mariyono, Sundana A. 2002. Teknik pencegahan dan pengobatan penyakit bercak merah pada ikan air tawar yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian* 7: 33-36.
- Maturin LJ, Peeler JT. 1998. Aerobic Plate Count. *J Bacteriol* 8: 1-10.
- Mohammad S, Abasali H. 2010. Effect of Plant Extract Supplement Diets on Immunity and Resistance to *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Res J Anim Sci* 4 (1): 26-34
- Naufalin R. 2005. Kajian sifat antimikroba ekstrak bunga kecombrang (*Nicolaria speciosa* Horan) terhadap berbagai mikroba patogen dan perusak pangan. [Disertasi]. IPB, Bogor.
- Noga JE. 2000. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa State Press, USA.
- Noorastuti PT. 2012. *Bakteri Pemangsa Daging Manusia*. <http://www.viva.co.id/indepth/sorot/320022-bakteri-pemangsa-daging-manusia>
- Osward TT. 1995. *Tumbuhan Obat*. Baratha, Jakarta.
- Pasaribu F, Dalimurte H, Poeloegan M. 2006. *Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Ikan Bercak Merah*. IPB, Bogor.
- Purwoko T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Bumi Aksara, Jakarta.
- Robinson T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung.
- Schlegel HG, Schmidt K. 1984. *Mikrobiologi Umum* (edisi keenam terjemahan). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Setiabudy R, Vincent HSG. 2002. *Farmakologi dan Terapi: Pengantar Antimikroba*. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Sherlock O, Dolan A, Athman R, Power A, Gethin G, Cowman S, Humphreys H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Compl Altern Med* 10: 47-52.
- Skou T, Jensen GS. 2007. *Mikrobiologi*. Norhaven Book, Denmark.
- Solikhah EH. 2009. Efektivitas Campuran Meniran *Phyllanthus niruri* dan Bawang Putih *Allium sativum* dalam Pakan untuk Pengendalian Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo *Clarias* sp. [Skripsi]. IPB, Bogor.
- Sukadana IM. 2009. Senyawa antibakteri golongan flavanoid dari biji belimbing manis (*Averrhoa carambola* Linn. L). *J Kimia* 3: 109-116.
- Sumartini. 2008. Studi aktivitas antioksidan senyawa fenolik dalam daging biji kepel (*Stelechocarpus burahol*). [Skripsi]. IPB, Bogor.
- Tjay T, Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting: Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. PT. Elek Media Komputindo, Jakarta.
- Yajri F. 2009. *Ratu Rempah Minim Pasokan*. <http://www.mediaindonesia.com/mediahidupsehat/index.php/read/2009/08/07/1466/9/Ratu-Rempah-Minim-Pasokan>.
- Zainal. 2009. *Atasi Bakteri Ikan dengan Tanaman Obat*. Suplemen Media Indonesia, Jakarta.

## Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa*

### Antibacterial activity of the sambiloto leaf extracts (*Andrographis paniculata*) to *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*

RUTH NOVA MARDIANA, NESTRI HANDAYANI

Prodi Diploma 3 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36a, Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 7 Juli 2015. Revisi disetujui: 28 November 2015.

**Abstract.** *Mardiana RN, Handayani N. 2016. Antibacterial activity of the sambiloto leaf extracts (Andrographis paniculata) to Bacillus cereus and Pseudomonas aeruginosa. Biofarmasi 14: 19-24.* The purpose of this research was to evaluate the antibacterial activity of sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) extract against bacterial *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Some research had proven sambiloto leaf extract evident had antibacterial activity to bacteria *Staphylococcus aureus*. The sample of sambiloto leaf was macerated using 70% ethanol, and the extract was concentrated using rotary evaporator. The antibacterial activity was evaluated by diffusion method. Antibacterial potency of the extract was compared with by Amoxicillin made default curve among logarithm concentrates to constraining diameter (mm), then accounted by its equivalence point. Ethanol extract of sambiloto leaf had antibacterial activity to *B. cereus* and *P. aeruginosa*. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of 12,5% against *B. cereus* and *P. aeruginosa*. The potential antibacterial activity of sambiloto leaf extract was 0,2% for *B. cereus* and 0.3% for *P. aeruginosa*; as compared with Amoxicillin. This, potential antibacterial activity of sambiloto leaf extract to the two tested bacteria was much smaller than that of Amoxicillin synthetic antibiotic.

**Keywords:** Antibacteria, *Andrographis paniculata*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*

#### PENDAHULUAN

Hampir setiap orang Indonesia pernah menggunakan tumbuhan obat untuk mengobati penyakit atau kelainan yang timbul pada tubuh selama hidupnya, baik ketika masih bayi, kanak-kanak, maupun setelah dewasa. Dan diakui serta dirasakan manfaat tumbuhan obat ini dalam menyembuhkan penyakit yang diderita atau meredakan kelainan yang timbul pada tubuh (Kemala et al. 2003).

Obat tradisional sejak dulu memainkan peranan yang penting dalam menjaga kesehatan, mempertahankan stamina dan mengobati penyakit, oleh karena itu obat tradisional masih berakar kuat dalam kehidupan masyarakat hingga kini. Tumbuhan yang berkhasiat obat banyak sekali di sekitar kita. Ada yang berupa bumbu dapur, tanaman buah, tanaman hias dan tanaman sayur, selain itu juga ada tanaman liar yang tumbuh di sembarang tempat tanpa ada yang memperhatikan (Muhlisah 1995).

Dewasa ini, pemakaian bahan alam sebagai obat tradisional maupun diolah menjadi produk kesehatan telah mengalami kemajuan pesat, karena bahan alami tersebut didukung oleh adanya sifat bakteriostatik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu (Sophia 2003). Pemanfaatan *herbal medicine* ramai dibicarakan, termasuk dalam manfaatnya, namun kebanyakan informasi yang ada hanya sebatas bukti empiris belum ada bukti ilmiah. Tanaman sambiloto merupakan salah satu bahan alam yang

semakin banyak peminatnya untuk dijadikan obat karena mengandung senyawa bioaktif berkhasiat.

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees), famili Acanthaceae, sangat banyak digunakan sebagai obat tradisional. Kandungan kimia sambiloto yaitu andrografolid, neo-andrografolid, panikulin, mineral (kalium, kalsium, natrium), flavonoid, asam kersik, dan damar. Zat aktif (berkhasiat obat) ialah andrografolid yang rasanya sangat pahit. Kadar andrografolid 2,5-4,6% dari bobot kering. Kadar kalium juga relatif cukup tinggi (Santa 1996). Uji khasiat sambiloto pada hewan dan sebagian dengan darah manusia secara in vitro antara lain sebagai antipiretika, antiinflamasi, antidiabetes, anti-malaria, antibakteri, antifilariasis, diuretika, infeksi saluran kemih, analgetika, diare, menurunkan kontraksi usus dan tekanan darah, aktifitas imunodulator, antiandrogenik dan antispermatogenik, melindungi kerusakan hati dan jantung yang bersifat reversibel (Nuratmi et al. 1996).

Pada penelitian sebelumnya sambiloto telah di uji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Stapylococcus aureus*, dan terbukti bahwa sambiloto dapat menghambat bakteri *S.aureus* (Arbianti et al. 2008) maka perlu uji antibakteri terhadap bakteri yang lain, disesuaikan dengan khasiatnya. Karena tanaman sambiloto mempunyai banyak khasiat menyembuhkan penyakit yang disebabkan oleh bakteri, sehingga memacu untuk melakukan penelitian tentang kegunaan sambiloto sebagai antibakteri.

Pada penelitian ini dipilih bakteri *Bacillus cereus* karena bakteri ini menyebabkan diare dan k anti-diare; serta *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri yang menyebabkan infeksi saluran kemih. Khasiat daun sambiloto sendiri juga sebagai obat infeksi saluran kemih.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak sambiloto terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak sambiloto terhadap bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa*; serta mengetahui potensi ekstrak etanol daun sambiloto dibanding dengan Amoksisilin.

## BAHAN DAN METODE

### Metode

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode eksperimental di laboratorium. Pembuatan ekstrak sambiloto dilakukan dengan metode maserasi dilanjutkan dengan evaporasi. Uji aktivitas ekstrak dilakukan dengan metode difusi dan selanjutnya penentuan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum). Uji potensi ekstrak dibandingkan dengan amoksisilin dengan cara membuat kurva standar antara log konsentrasi terhadap diameter hambat (mm).

### Waktu dan tempat penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Mei 2011 sampai Juni 2011, di Sub-lab. Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

### Alat dan bahan

Blender elektrik, kertas saring steril, inkubator, seperangkat alat evaporasi, bunsen, jarum ose, dor gabus, pipet, kamera, toples kaca, cawan petri, timbangan, autoklav, LAF (*Laminar Air Flow*), Mikropipet, Teep, dan Alat-alat gelas.

*Simplisia sambiloto*, aquades, kertas, isolat *Bacillus cereus*, isolat *Pseudomonas aeruginosa*, kapas, aluminium foil, media NA (Natrium Agar), etanol teknis 70%, DMSO (Dimetil Sulfoksida) dan amoksisilin.

### Prosedur penelitian

#### Determinasi bahan

Determinasi tanaman yang digunakan dalam penelitian ini dilakukan di Universitas Setia Budi Surakarta. Determinasi berdasarkan pada pengamatan ciri mikroskopis serbuk daun *Andrographis paniculata* Ness.

#### Persiapan sampel

Simplisia daun *Andrographis paniculata* Ness yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TO2T) Tawangmangu Karanganyar, Jawa Tengah yang kemudian diblender kasar.

#### Pembuatan ekstrak

Ekstraksi yang dilakukan menggunakan metode maserasi selama 24 jam dengan pelarut etanol 70%. Sari yang diperoleh kemudian diperas untuk memisahkan ampas

dengan sari. Ampas dimaserasi kembali selama 24 jam. Sari tersebut kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* sehingga menghasilkan ekstrak kental.

#### Uji aktifitas antibakteri ekstrak

Sterilisasi alat: Alat yang digunakan untuk aktivitas antibakteri disterilkan dalam autoklav dengan temperatur 121°C selama kurang lebih 20 menit.

Pembuatan media agar miring: Natrium Agar (NA) ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 50 mL aquades, dipanaskan diatas *hotplate stirer* sampai mendidih dan terbentuk larutan agar yang berwarna kuning bening. Masukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 mL. Tutup tabung reaksi dengan kapas serta aluminium foil. Tabung reaksi yang berisi agar disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya ditempatkan pada rak miring dan diakan sampai padat pada suhu kamar.

Pembuatan biakan bakteri: Sebanyak 1 ose isolat bakteri digoreskan pada media miring agar NA dengan pola zig-zag, masing-masing bakteri dibuat 3 biakan bakteri. Proses ini dilakukan dalam keadaan steril pada ruang isolasi dengan sinar UV. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto: Natrium agar (NA) ditimbang sebanyak 3 gram kemudian dilarutkan dalam 150 mL air aquades, dipanaskan, *distirer* diatas *hotplate* sampai mendidih sehingga terbentuk larutan agar yang berwarna kuning bening. Tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 3 mL aquades dan ditutup rapat dengan kapas dan aluminium foil untuk membuat suspensi bakteri dengan catatan 1 tabung 1 bakteri. NA yang telah dididihkan, aquades dalam tabung reaksi, cawan petri yang telah dibungkus kertas dan alat-alat yang akan digunakan dalam uji antibakteri disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. ditumbuhkan dalam media NA miring masing-masing diambil 1 ose dan dimasukan kedalam aquades steril. Agar pertumbuhan bakteri merata, sebelumnya satu ose bakteri dicampur dalam tabung reaksi difortex terlebih dahulu. Setelah itu 20 mL NA steril dan 100 µL suspensi bakteri dituang dalam cawan petri dan diputar membentuk angka delapan agar media dan bakteri tercampur rata, tunggu sampai padat. Untuk uji antibakteri, bakteri yang telah ditumbuhkan dicetak dengan bor gabus ukuran diameter 6 mm. Kemudian dimasukan ekstrak etanol dengan konsentrasi 100%, 75%, 50% dan 25% sebanyak 20 µL dengan menggunakan mikropipet. Cawan kemudian di inkubasi di dalam inkubator suhu 37°C selama 18-24 jam.

Pengamatan hasil: Pengamatan zona hambat sampel terhadap pertumbuhan bakteri uji dilakukan dengan mengukur diameter zona bening di sekitar sumuran yang merupakan diameter zona penghambat sampel.

Penentuan KHM: Ekstrak konsentrasi 100% yang menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri, dibuat variasi konsentrasi secara menurun yang selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dari masing-masing konsentrasi 100%, 75%, 50% dan 25% tersebut untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum.

Penentuan nilai banding: Sebagai pembanding digunakan standar dengan perlakuan yang sama seperti uji.

Standar yang digunakan adalah amoksisilin. Dari hasil yang diperoleh kemudian dibuat kurva standar antara log konsentrasi terhadap DDH diameter hambatan (mm). Kurva ini digunakan sebagai pembanding bagi sampel yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan cara menarik garis lurus yang memotong kurva standar dan diameter hasil pengamatan sehingga diperoleh harga log konsentrasi dan kemudian dihitung antilognya untuk mendapatkan konsentrasi yang sebenarnya. Nilai banding sampel terhadap baku amoksisilin dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{Nilai banding} = \frac{\text{konsentrasi sampel dari kurva} \times 100\%}{\text{konsentrasi sampel sebenarnya}}$$

### Analisis data

Dari uji antibakteri dengan metode difusi akan didapat nilai diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan kemudian akan dibandingkan dengan zona hambat antibiotik sintesis

Penentuan nilai banding penentuan nilai banding antibakteri ekstrak dibanding amoksisilin dilakukan dengan cara dibuat kurva standar antara log konsentrasi terhadap diameter hambat (mm). Kurva ini digunakan sebagai sampel pembanding bagi sampel yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi dengan cara menarik garis lurus yang memotong kurva standar dan diameter hasil pengamatan sehingga diperoleh konsentrasi. Nilai banding sampel terhadap baku amoksisilin dapat dihitung dengan persamaan:

$$\text{Nilai banding} = \frac{\text{konsentrasi sampel dari kurva} \times 100\%}{\text{konsentrasi sampel sebenarnya}}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Determinasi bahan

Hasil determinasi sampel tanaman yang dilakukan oleh laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar daun *Andrographis paniculata* Nees atau sambiloto.

### Persiapan sampel

Daun sambiloto yang telah dibersihkan dan dicuci kemudian dikeringkan selama  $\pm$  3 hari pada suhu kamar dan tidak boleh terkena matahari langsung. Tujuan dari pengeringan ini untuk mengurangi kadar air dalam daun sambiloto sehingga bakteri dan jamur tidak tumbuh selama penyimpanan. Daun sambiloto tidak boleh terkena sinar matahari secara langsung karena akan menyebabkan kehilangan kandungan zat aktif nya (Ketaren 1985).

### Ekstraksi daun sambiloto

Serbuk simplisia sebanyak 50 gram diekstraksi dengan metode maserasi (perendaman bahan) etanol sebanyak 1x24 jam untuk mendapatkan senyawa-senyawa kimia sambiloto. Proses maserasi dipilih karena prosesnya lebih

mudah pada teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, dikarenakan pelarut etanol merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan hampir sebagian besar komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak (Palleros 1993). Remaserasi dilakukan untuk memaksimalkan jumlah senyawa dalam simplisia yang dapat tersari. Proses maserasi yang disertai pengadukan berkala bertujuan untuk menghindari memadatnya serbuk, jika serbuk memadat maka pelarut sulit menembus bahan dan sulit mengambil senyawa-senyawa aktifnya. Selain itu pengadukan dapat menyempurnakan kontak antara pelarut dan sampel. Cairan penyari akan menembus dinding sel yang mengandung zat aktif, zat aktif tersebut akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang ada diluar sel, maka larutan yang terpekat di desak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar sel dan di dalam sel.

Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga tidak ada pelarut yang tertinggal dan dihasilkan ekstrak sebanyak 13 gram dengan rendemen 26% (b/b). Untuk mengetahui ekstrak etanol mempunyai antibakteri terhadap bakteri *B.cereus* dan *P.aeruginosa* atau tidak maka dilakukan pengujian aktivitas antibakteri.

### Uji antibakteri

#### Uji antibakteri ekstrak daun sambiloto

Metode yang digunakan dalam uji antibakteri ekstrak etanol daun sambiloto ini adalah metode difusi dengan teknik sumuran dimana bakteri yang digunakan yaitu bakteri gram positif *B. cereus* dan gram negatif *P. aeruginosa* yang merupakan bakteri yang bersifat patogen pada manusia. Uji antibakteri ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanol daun sambiloto dalam menghambat pertumbuhan bakteri dan mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) suatu antibakteri. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sambiloto dilakukan pada konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%.

Metode difusi dipilih karena pada metode ini bakteri dapat teramati dengan jelas, sehingga dapat memudahkan dalam pengamatan bakteri uji. Diameter hambat pertumbuhan bakteri ini ditandai dengan adanya daerah bening disekitar sumuran, sedangkan warna keruh pada media menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sambiloto positif menghambat pertumbuhan bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa*. Pengujian antibakteri ini juga dilakukan pada kontrol negatif yang berupa pelarut dari sampel yaitu dimetil sulfoksida (DMSO) karena DMSO tidak mempunyai efek antibakteri sehingga tidak mempengaruhi hasil uji antibakteri (Ristiningsih 2009). Yuliani (2001) telah membuktikan bahwa DMSO tidak aktif sebagai anti bakteri.

Menurut Elganjar (2006) kekuatan antibakteri digolongkan menjadi tiga, yaitu kuat jika menghasilkan diameter zona hambat lebih dari 8 mm, aktivitas sedang jika menghasilkan diameter zona hambat 7-8 mm, dan aktivitas lemah jika memiliki diameter zona hambat kurang dari 7 mm. Hasil uji diatas menunjukkan bahwa ekstrak

etanol mempunyai aktivitas antibakteri yang kuat karena zona hambatnya lebih dari 8 mm.

Konsentrasi ekstrak meningkat maka kadar bahan aktif antibakterinya semakin besar sehingga kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga semakin besar. Kemampuan suatu bahan antimikroba dalam menghambat maupun membunuh mikroorganisme tergantung pada konsentrasi bahan antimikroba (Schlegel dan Schmidt 1994).

Zat antibakteri menyebabkan membran sel berada dalam lingkungan yang hipertonik. Suatu keadaan hipertonik dapat menyebabkan penghambatan pembentukan dinding sel sehingga sel hanya dibatasi oleh membran sel yang tipis (Jawetz et al. 2005). Membran sel bakteri gram negatif tersusun atas lapisan peptidoglikan yang tipis, sedangkan lapisan fosfolipid lebih tebal. Senyawa antibakteri dapat melisis membran sel dengan melarutkan lapisan fosfolipid dari membran sel bakteri (Kusumaningrum 2002).

Dilihat dari data aktivitas penghambatan ekstrak etanol daun sambiloto pada bakteri gram positif relatif lebih kecil daripada gram negatif. Perbedaan nyata dalam komposisi dan struktur dinding sel antara bakteri gram positif dan gram negatif menyebabkan respon keduanya terhadap berbagai perlakuan dan bahan, seperti pewarnaan gram dan antibiotik-antibiotik tertentu. Bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak, atau substansi seperti lemak dalam prosentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri gram positif. Dinding sel bakteri juga lebih tipis daripada dinding bakteri gram positif (Pelczar dan Chan, 1986). Bagian terluar dinding sel bakteri gram negatif adalah membran luar. Struktur membran luar terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (bagian luar) (Purwoko 2007).

Permeabilitas dinding sel bakteri dipengaruhi oleh tebal tipisnya lapisan peptidoglikan dalam dinding sel. Perbedaan permeabilitas diantara dua kelompok dinding sel bakteri juga menyebabkan perbedaan daya hambat antara bakteri antara bakteri gram positif dan gram negatif. Dinding sel bakteri gram negatif mengandung peptidoglikan jauh lebih sedikit, dan peptidoglikan ini mempunyai ikatan silang yang jauh kurang ekstensif dibandingkan dengan yang dijumpai pada dinding bakteri gram positif (Pelczar dan Chan 1986). Sehingga permeabilitas bakteri gram positif lebih rendah dibandingkan permeabilitas bakteri gram negatif. Dengan permeabilitas yang rendah maka zat aktif dari ekstrak akan mengalami kesulitan untuk menembus membran sel bakteri gram positif sehingga efek bakterinya kurang optimal. Dengan terganggunya sistesis peptidoglikan maka pembentukan dinding sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan sehingga sel hanya dilapisi oleh membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel bakteri mudah mengalami lisis karena tekanan osmotik yang menyebabkan sel bakteri mati (Prihnowati 2009).

Jika dilihat dari Tabel 1 menunjukkan bahwa setiap konsentrasi menyebabkan perbedaan nyata terhadap diameter hambat pada masing-masing bakteri uji. Aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto pada konsentrasi 100% > 75% > 50% > 25%. Hal ini sesuai dengan Ajizah (2004)

dimana semakin kecil konsentrasi maka semakin sedikit jumlah zat aktif yang terkandung didalamnya, sehingga semakin rendah kemampuan dalam menghambat pertumbuhan suatu bakteri. Menurut Pelczar dan Chan (1986) semakin besar konsentrasi zat yang terdapat pada cakram akan memperbesar kemampuan difusi zat tersebut pada media sehingga mempermudah penetrasi zat dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Maka, aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto tergantung dari konsentrasi yang digunakan. Zat aktif yang terkandung dalam daun sambiloto yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah flavonoid (Cushnie dan Lamb 2005).

#### *Penentuan KHM ekstrak daun sambiloto*

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah antibakteri yang masih mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Lay, 1994). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto positif menghambat pertumbuhan bakteri kemudian dilanjutkan uji untuk mengetahui nilai KHM dengan bervariasi konsentrasi ekstrak hingga didapat konsentrasi ekstrak yang sudah tidak menghambat pertumbuhan bakteri lagi. Variasi konsentrasi yang digunakan mulai dari konsentrasi 12,5% sampai 0,3%. Nilai KHM dari ekstrak daun sambiloto dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 2, diketahui bahwa pada *B.cereus* dan *P.aeruginosa* nilai KHMnya sama yaitu 12,5% dengan diameter hambat masing-masing adalah 8,13 dan 8,34 mm atau sekitar 2,13 dan 2,34 mm dari tepi sumuran. Pada konsentrasi dibawah 6,25% sudah tidak terdapat zona bening disekitar sumuran, sehingga dapat dikatakan pada konsentrasi tersebut ekstrak sudah tidak dapat menghambat bakteri.

#### *Penetapan KHM amoksisilin dan uji potensi antibakteri daun sambiloto*

Uji potensi antibakteri ekstrak sambiloto dilakukan terhadap antibiotik amoksisilin. Pemilihan amoksisilin ini dikarenakan amoksisilin merupakan antibiotik yang berspektrum penghambatan yang luas sehingga dapat digunakan untuk semua bakteri uji. Selain itu, meskipun amoksisilin mempunyai aktivitas yang sama dengan ampisilin akan tetapi respon lebih lengkap dan pesat dengan kadar darah dua kali lipat (Tjay dan Rahardja 2008).

Amoksisilin dapat berfungsi sebagai antibakteri karena dapat menghambat tahap akhir sintesis dinding sel bakteri. Amoksisilin dapat menghambat kerja enzim transpeptidase dengan cara mengikat enzim melalui ikatan kovalen sehingga mencegah pembentukan dinding sel bakteri. Akibatnya dinding sel menjadi lemah dan karena adanya tekanan turgor dari dalam, dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mati (Siswandono dan Soekardjo 2000). Selain itu amoksisilin merupakan pengasilasi kuat, dimana reaksi asilasi menyebabkan kekuatan dinding sel bakteri menjadi lemah dan mudah terjadi lisis sehingga bakteri mengalami kematian (Jawetz et al. 2005).

**Tabel 1.** Data Diameter Daerah Hambat ekstrak etanol daun sambiloto

Konsentrasi ekstrak etanol (b/v)	Rata-rata DDH (mm)	
	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
100%	14,75	15,69
75%	12,37	13,60
50%	11,49	12,66
25%	10,68	10,49

Keterangan : Rata-rata hasil 3x pengujian, Diameter lubang = 6 mm, DDH = Diameter Daya Hambat (mm)

**Tabel 2.** Nilai KHM ekstrak daun sambiloto terhadap bakteri uji

Konsentrasi (v/b)	Rata-rata DDH	
	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
12,5%	8,13*	8,34*
6,25%	6,00	6,00
3,125%	6,00	6,00
1,5%	6,00	6,00
0,7%	6,00	6,00
0,3%	6,00	6,00

Keterangan: Rata-rata hasil 3x pengujian. Diameter lubang = 6mm. DDH= Diameter Hambat Minimum. \*= nilai KHM dari bakteri

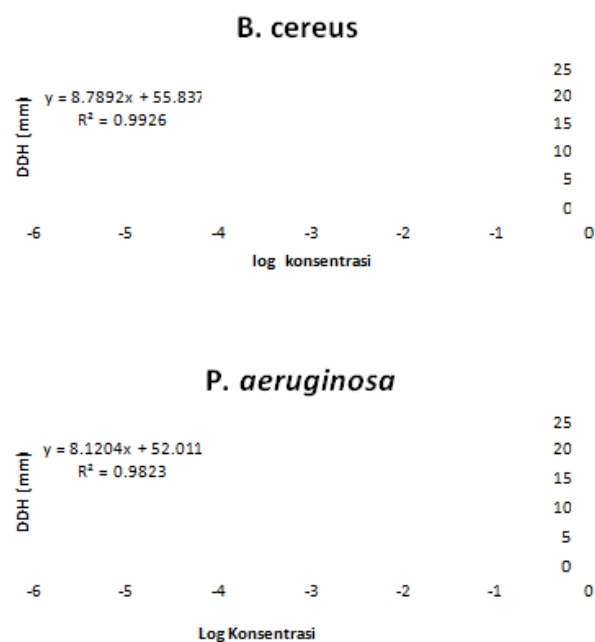
**Tabel 3.** Hasil pengujian KHM amoksisilin

Konsentrasi amoksisilin % (b/v)	Rata-rata DDH (mm)	
	<i>B.cereus</i>	<i>P.aeruginosa</i>
$1 \times 10^{-4}$	20,37	18,82
$5 \times 10^{-5}$	18,22	17,13
$2,5 \times 10^{-5}$	15,19	15,29
$1 \times 10^{-5}$	12,53	12,35
$5 \times 10^{-6}$	9,58*	8,61*
$2,5 \times 10^{-6}$	6,00	6,00

Keterangan: Rata-rata hasil 3x pengujian, Diameter lubang = 6 mm, DDH = Diameter Daya Hambat (mm), \* = nilai KHM

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap amoksisilin dilakukan dengan variasi konsentrasi  $1 \times 10^{-4}$ %,  $5 \times 10^{-5}$ %,  $2,5 \times 10^{-5}$ %,  $1 \times 10^{-5}$ %,  $5 \times 10^{-6}$ % dan  $2,5 \times 10^{-6}$ %. Hasil pengujian aktivitas KHM amoksisilin dapat dilihat pada Tabel 3. Nilai KHM amoksisilin terhadap semua bakteri uji adalah sama yaitu  $5 \times 10^{-6}$ % tetapi DDH bakteri uji tersebut berbeda-beda. DDH dari *B.cereus* sebesar 9,58 mm dan *P.aeruginosa* sebesar 8,61 mm. Penetapan nilai banding bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak sebagai antibiotik alami dibandingkan dengan amoksisilin sebagai antibiotik sintetis. Konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk menetapkan nilai banding adalah 100% yang merupakan konsentrasi tertinggi untuk penentuan KHM.

Penentuan nilai banding ekstrak daun sambiloto dilakukan dengan menggunakan kurva hubungan antara logaritma konsentrasi amoksisilin (% b/v) dengan rata-rata DDH (mm) untuk setiap bakteri uji (Gambar 1). Dari grafik didapat persamaan garis untuk masing-masing bakteri uji. Persamaan garis tersebut digunakan untuk menetapkan nilai banding ekstrak terhadap amoksisilin. Diameter

**Gambar 1.** Konsentrasi amoksisilin (mg/  $\mu$ L) vs DDH (mm) amoksisilin bakteri *B. cereus* dan *P.aeruginosa***Tabel 4.** Potensi ekstrak sambiloto terhadap amoksisilin

Bakteri	Nilai banding
<i>B. cereus</i>	0,2%
<i>P. aeruginosa</i>	0,3%

Daerah Hambat (DDH) rata-rata ekstrak daun sambiloto pada masing-masing bakteri dimasukkan ke persamaan garis linier dari grafik amoksisilin sehingga akan dapat harga x. Harga x ini kemudian dicari anti log x-nya. Dari harga antilog x ini dapat dicari nilai banding ekstrak daun sambiloto terhadap amoksisilin. Nilai perhitungan potensi ekstrak dibanding amoksisilin dapat dilihat pada Tabel 4. Dari nilai banding ternyata ekstrak daun sambiloto sebagai antibakteri mempunyai potensi yang relatif kecil terhadap bakteri *B. cereus* dan *P. aeruginosa* dibanding dengan antibiotik sintetis (amoksisilin).

## KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun sambiloto mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *B.cereus* dan *P.aeruginosa* dengan nilai KHM sebesar 12,5% b/v terhadap kedua bakteri. Potensi ekstrak daun sambiloto dibanding amoksisilin untuk masing-masing bakteri adalah *B.cereus*

sebesar 0,2% dan *P. aeruginosa* sebesar 0,3%, hal ini menunjukkan bahwa potensi antibakteri ekstrak daun sambiloto jauh lebih kecil dibandingkan dengan antibiotik amoksisilin.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah A. 2004. Sensitivitas Salmonella tyhimurium terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. Journal Bioscientiae 1 (1):-.
- Arbianti R, Surya T, Hermansyah H, Widyasari A. 2008. Ekstraksi daun sambiloto dengan metode sonikasi dan pengaruhnya pada kenaikan indeks biasanya dan daya hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*. Jurnal Teknologi Proses 7 (2): 161-166.
- Cushnie TPT, Lamb A J. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids, Intl J Antimicrob Agents 26 (5): 343-356.
- Elganjar. 2006. Dalam Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia tahun 2006. Identifikasi dan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Bunga Legetan (*Spilanthes paniculata* Wall). Departemen Perindustrian RI dan Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1980. Review of Medical Microbiology. 14 th ed. Lange Medical Publications. Los Altos, CA
- Kemala S, Sudiarto ER, Yuhono JT, Nurhayati H. 2003. Studi Serapan, Pasokan dan pemanfaatan Tanaman Obat di Indonesia. Laporan Teknis Penelitian Bagian Proyek Penelitian Tanaman Rempah dan Obat APBN 2003, Jakarta.
- Ketaren S. 1985. Pengantar Teknologi Minyak Atsiri. Balai Pustaka, Jakarta
- Kusumaningrum GD. 2002. Aktivitas Penghambatan Minyak atsiri dan Ekstrak Kasar Biji Pala terhadap Pertumbuhan Bakteri *Xanthomonas campestris* Oammel. [Skripsi ]. FMIPA UNS, Surakarta.
- Muhlisah F. 2005. Tanaman Obat Keluarga. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Nuratmi B, Adjirni DL, Paramita. 1996. Beberapa Penelitian Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Warta Tumbuhan Obat Indonesia 3: 1-24
- Palleros DR. 1993. Experimental Organic Chemistry. John Willey and Sons, Singapore.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. UI Press, Jakarta.
- Prihnowati TW. 2009. Isolasi, identifikasi komponen kimia dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun lampes (*Ocimum sanctum* L.) pada *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Jurusan Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Purwoko C. 2007. Fisiologi Mikroba. Edisi I. PT Bumi Akasara, Jakarta.
- Ristiningsih T. 2009. Uji Antibakteri Komponen Bioaktif Daun Lobak (*Raphanus sativus* L. var. *hortensis* Back.) Terhadap *Staphylococcus aureus* rosenbach dan Profil Kandungan Kimianya. [Skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Santa IGP. 1996. Studi Taksonomi Sambiloto *Andrographis paniculata* Nees. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 3: 14-15.
- Siswandono, Soekardjo B. 2000. Kimia Medisinal. Edisi 2. Airlangga University Press, Surabaya.
- Sophia D. 2003. Antioksidan dan Radikal Bebas. Kimia Indonesia, Jakarta.
- Tjay TH, Rahardja K. 2008. Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya. Edisi Keenam. Penerbit PT. Elex. Media Komputindo, Jakarta.
- Yuliani S. 2001. Prospek Pengembangan Obat Tradisional Menjadi Obat *Fitofarmaka*. Jurnal Litbang Pertanian Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat 20 (3):-.

## Pengaruh ekstrak jahe terhadap perbaikan kerusakan mukosa *ileum* tikus yang terpapar 5-fluorourasil

### Effect of ginger extract on reparation of mucosal damage in ileal rats exposed by 5-fluorouracil

KHUSNUL DWI TYASARI, KIYATNO, BALGIS

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

Manuskrip diterima: 16 Agustus 2015. Revisi disetujui: 5 Desember 2015.

**Abstract.** Tyasari KD, Kiyatno, Balgis. 2016. *Effect of ginger extract on reparation of mucosal damage in ileal rats exposed by 5-fluorouracil.* Biofarmasi 14: 24-31. This research had an objective to know the effect of ginger extract giving toward reparation of mucosal damage in ileal rats exposure by 5-fluorouracil. This research was a pure experiment with post test only control group design. We used 28 male Wistar Rats that were divided into 4 groups; control group, 5-FU group, 5-FU+ginger extract 9 mg dose group, and 5-FU+ginger extract 18 mg dose group. At days 3, 5, 7, and 9, 2 rats per day were killed by decapitation. Then the ileal rats were made to be sections and were colored by hematoxylin and eosin (HE). From each section, we measured height of 1 villi and depth of 1 cript in 3 vision field. The data obtained were analyzed by Kruskal-Wallis test with SPSS for Windows Release 16.0 program. Kruskal-Wallis test showed mean of villus height had p-value = 0,083 in day 3, p-value = 0,083 in day 5, p-value = 0,139 in day 7, and p-value = 0,160 in day 9. Whereas mean of cript depth had p-value = 0,114 in day 3, p-value = 0,198 in day 5, p-value = 0,083 in day 7, and p-value = 0,092 in day 9. All of p-values showed  $p > 0.05$  in which there were no significant differences. From this experiment, we concluded that there was no effect of ginger extract giving toward reparation of mucosal damage of ileal rats which exposure by 5-FU.

**Keywords:** 5-fluorouracil, ginger extract, mucositis

### PENDAHULUAN

5-fluorourasil (5-FU) merupakan kemoterapi analog pirimidin sintetik yang telah digunakan selama beberapa dekade sebagai antineoplastik dengan spektrum luas terhadap tumor solid dan berbagai malignansi seperti kanker pada traktus gastrointestinal, kanker payudara, dan kanker pada leher dan kepala. Metabolit aktif 5-FU (5-FdUMP) mencegah sintesis DNA melalui penghambatan terhadap timidilat sintetase (Baydar et al. 2005). Aktivitas penghambatan ini tidak bekerja selektif pada sel-sel tumor saja, tetapi juga pada sel-sel normal yang berproliferasi cepat seperti sel-sel epitel mukosa traktus gastrointestinal (GIT) dan selanjutnya menyebabkan terjadinya mukositis pada GIT (Shirasaka et al. 2000; Rosen et al. 2006).

Pada tingkat seluler, mukositis akibat pemberian 5-FU disebabkan adanya kerusakan DNA dan ditandai dengan terjadinya apoptosis, inflamasi, hingga ulserasi. Hal ini menyebabkan kerusakan mukosa intestinum yang ditandai dengan pemendekan vili dan berkurangnya kedalaman kripte (Verburg et al. 2001; Niscola et al. 2007).

Setelah mengalami kerusakan akibat paparan kemoterapi, mukosa intestinum akan mengalami regenerasi. Regenerasi mulai terjadi pada hari ke-5 dan regenerasi lengkap terjadi pada hari ke-8 sampai 10 (Verburg et al. 2001). Mukositis intestinum yang paling parah terjadi di *ileum* (Niscola et al. 2007). Di samping itu, *ileum* merupakan tempat utama terjadinya absorpsi nutrisi. Manifestasi mukositis instestinum yang berupa mual,

muntah, dan diare menyebabkan masukan nutrisi pada pasien kemoterapi menjadi terganggu, sehingga dapat memperburuk kondisi pasien. Oleh karena itu, penelitian ini difokuskan pada *ileum*.

Mengingat dampak yang ditimbulkan oleh mukositis saluran cerna, sangat diperlukan suatu terapi alternatif yang efektif untuk mengurangi kerusakan mukosa akibat paparan 5-FU. Smith et al. (2004) menyebutkan bahwa pemberian ekstrak jahe dengan dosis 500-1000 mg mempunyai efek sebagai antiemetik pada wanita hamil. Kandungan aktif dalam jahe yang dominan adalah [6]-gingerol dan [6]-shogaol. [6]-gingerol berperan sebagai antiinflamasi dengan menghambat produksi prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Young et al. 2005) dan menghambat aktivitas sitokin proinflamasi seperti NF- $\kappa$ B, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan juga COX-2 (Surh 2002). Sedangkan [6]-shogaol berperan dalam mengurangi respon inflamasi dengan menghambat *lipoxygenase* (Levy et al. 2006).

Dengan adanya bukti-bukti bahwa pemberian ekstrak jahe mempunyai efek terhadap gangguan gastrointestinal, menghambat sintesis prostaglandin dan leukotrien, dan dapat menghambat terjadinya inflamasi, peneliti ingin melihat apakah pemberian ekstrak jahe dapat menginduksi perbaikan yang nyata pada kerusakan mukosa saluran cerna terutama *ileum* yang mendapat paparan kemoterapi 5-FU.

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak jahe terhadap perbaikan kerusakan mukosa *ileum* tikus yang terpapar 5-FU.

## BAHAN DAN METODE

### Lokasi penelitian

Pemeliharaan tikus dan pembuatan blok jaringan intestinum dilakukan di Laboratorium Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Pengecatan Hematoksilin Eosin (HE) dilakukan di Laboratorium Fisiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

### Subjek penelitian

**Populasi.** Tikus jantan galur Wistar dengan berat badan 125-160 gram dikondisikan satu tikus dalam satu kandang selama tiga hari dengan siklus terang dan gelap masing-masing 12 jam. Kandang diletakkan dalam ruangan dengan suhu udara terkontrol dan tikus diberikan makanan standar dan minuman tidak terbatas. Semua protokol eksperimen diajukan untuk mendapat persetujuan komisi etik binatang percobaan.

**Sampel.** Besar sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer (Purawisastra 2001), dimana (t) adalah jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dan (n) adalah jumlah perlakuan.

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

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

$$t \geq 6$$

**Teknik sampling.** Pengambilan sampel dilakukan dengan metode *quota sampling*. Sampel dipilih dari satu indukan dengan umur dan jenis kelamin yang sama. Sampel sebanyak 28 ekor dibagi menjadi 4 kelompok sehingga setiap kelompok terdiri dari 7 ekor tikus.

Desain penelitian adalah *post test only control group design*.

Bahan utama yang digunakan adalah 5-FU dan ekstrak jahe.

### Cara kerja

#### Persiapan

Sebanyak 28 ekor tikus galur Wistar ditimbang dan dikelompokkan secara acak ke dalam 4 kelompok. Setiap ekor tikus ditempatkan pada masing-masing satu kandang tersendiri. Tikus diadaptasikan selama tiga hari dengan siklus terang dan gelap masing-masing 12 jam. Kandang diletakkan dalam ruangan dengan suhu udara terkontrol dan tikus diberikan makanan standar dan minuman tidak terbatas. Selanjutnya pada hari ke-0, 7 ekor pada kelompok I injeksi 2 ml larutan normal saline secara intraperitoneal (kelompok kontrol) (Tavakkolizadeh et al. 2000). Kemudian semua tikus dikorbankan pada hari ke-1. (i) 7 ekor kelompok II mendapatkan asupan makanan standar dan injeksi 5-FU dosis 150 mg/kgBB secara intraperitoneal pada hari ke-0 (kelompok perlakuan I). Kemudian, tikus dikorbankan pada hari ke-3, 5, 7, dan 9. (ii) 7 ekor kelompok III mendapatkan asupan makanan standar dan injeksi 5-FU dosis 150 mg/kgBB secara intraperitoneal pada hari pertama, pada hari ke-3 dan seterusnya sampai hari ke-9 diberi larutan yang mengandung ekstrak jahe menggunakan sonde lambung dengan dosis I (kelompok perlakuan II). Tikus dikorbankan pada hari ke-3, 5, 7, dan 9. (iii) 7 ekor kelompok IV mendapatkan asupan makanan

standar dan injeksi 5-FU dosis 150 mg/kgBB secara intraperitoneal pada hari pertama, pada hari ke-3 dan seterusnya sampai hari ke-9 diberi larutan yang mengandung ekstrak jahe menggunakan sonde lambung dengan dosis II (kelompok perlakuan III). Tikus dikorbankan pada hari ke-3, 5, 7, dan 9.

#### Pengorbanan

Setelah diberikan perlakuan, tikus dikorbankan pada hari yang telah ditentukan dengan cara *neck dislocation*. Organ *ileum* diambil untuk dibuat preparat histologis dengan metode blok parafin dan dengan pengecatan Hematoksilin Eosin (HE).

#### Pengamatan preparat histologis

Setiap potongan jaringan dibuat 2 preparat dengan tebal irisan  $\pm 5\mu\text{m}$ . Setelah dibuat preparat histologis, dilakukan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya yang dilengkapi pengukur skala mikrometer. Panjang vili dan kedalaman kriptte diukur. Untuk mengukur panjang vili digunakan perbesaran 100x sedangkan untuk mengukur kedalaman kriptte digunakan perbesaran 400x.

Dari tiap preparat dilihat 3 lapang pandang dan tiap lapang pandang dipilih 1 vili dan kriptte. Vili dan kriptte yang akan diukur dipilih yang utuh atau jika mengalami kerusakan bukan akibat kesalahan pemotongan. Pengukuran dimulai dari pangkal hingga puncak vili dan dari permukaan hingga dasar kriptte. Dari hasil pengukuran tersebut akan didapatkan selisih ukuran vili dan kriptte saat mulai terjadi kerusakan (hari ke-3) hingga terjadi regenerasi (hari ke-5, 7, 9). Perbaikan mukosa pada kelompok yang dipapar 5-FU tanpa terapi dibandingkan dengan perbaikan mukosa pada kelompok yang dipapar 5-FU dengan pemberian ekstrak jahe dan dibandingkan pula terhadap kontrol.

#### Analisis statistik

Untuk mengetahui perbedaan yang bermakna di antara semua kelompok perlakuan dilakukan uji *One Way Anova* ( $\alpha = 0.05$ ) dengan syarat data terdistribusi normal dan homogen. Apabila data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, maka digunakan uji non parametrik *Kruskal-Wallis*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Berat badan subjek penelitian

Sebelum diberi perlakuan, terlebih dahulu dilakukan penimbangan berat badan tikus dengan tujuan untuk menentukan dosis 5-FU dan ekstrak jahe yang akan diberikan, sehingga didapatkan dosis yang tepat. Dari 28 tikus yang digunakan dalam penelitian, diperoleh rata-rata berat badan sebesar  $142,50 \pm 9,179$  gram. Setelah itu tikus dikelompokkan menjadi 4 kelompok dan dihitung rata-rata berat badan setiap kelompok (Tabel 1).

Dari Tabel 1 dapat dilihat rata-rata berat badan setiap kelompok perlakuan. Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna rata-rata berat badan pada 4 kelompok, dilakukan uji *one way anova* menggunakan

program *SPSS for Windows Release version 16.0*. Untuk dapat melakukan uji *one way anova*, harus memenuhi 2 syarat yaitu sampel harus terdistribusi normal dan homogen. Dari uji normalitas sampel, didapatkan  $p > 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan berat badan terdistribusi normal. Kemudian analisis homogenitas varian menunjukkan  $p = 0,983$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti data terdistribusi homogen. Oleh uji prasyarat *one way anova* telah terpenuhi, data berat badan dapat diuji dengan *one way anova*. Hasil uji *one way anova* menunjukkan  $p = 0,238$  ( $p > 0,05$ ). Dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna berat badan tikus pada seluruh kelompok, sehingga diharapkan hasil penelitian tidak dipengaruhi oleh perbedaan rata-rata berat badan tikus pada tiap kelompok.

**Tinggi vili mukosa ileum**

Pengamatan histologis preparat mukosa ileum dari tiap kelompok perlakuan dilakukan di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Pengukuran panjang vili menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Pada lensa objektifnya ditambahkan mikrometer agar dapat dilakukan pengukuran. Dari tiap preparat dipilih 3 lapang pandang dan tiap lapang pandang dipilih satu vili. Vili yang diukur dipilih yang utuh atau jika mengalami kerusakan bukan akibat kesalahan pematangan. Pengukuran dimulai dari pangkal hingga puncak vili. Rata-rata tinggi vili pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat dilihat perbandingan rata-rata tinggi vili mukosa ileum pada tiap kelompok perlakuan. Pada hari ke-3, rata-rata tinggi vili pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PII mempunyai nilai rata-rata tinggi vili lebih besar daripada kelompok PI, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PIII. Pada hari ke-5, rata-rata tinggi vili pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PI mempunyai nilai rata-rata tinggi vili lebih besar daripada kelompok PII, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PIII. Pada hari ke-7, rata-rata tinggi vili pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PII mempunyai nilai rata-rata tinggi vili lebih besar daripada kelompok PI, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PIII. Pada hari ke-9, rata-rata tinggi vili pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K, namun lebih besar dibandingkan dengan kelompok PII dan PIII. Perbedaan rata-rata tinggi vili dapat digambarkan dengan garis bertanda seperti pada Gambar 2.

Kemudian, data yang telah diperoleh dianalisis dengan uji *one way anova*. Untuk dapat melakukan uji *one way anova* dilakukan uji normalitas dan homogenitas rata-rata tinggi vili mukosa ileum menggunakan program *SPSS for Windows Release version 16.0*.

**Analisis statistik hari ke-3**

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata tinggi vili tiap kelompok pada hari ke-3 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value*

sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata tinggi vili pada semua kelompok perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* rata-rata tinggi vili pada hari ke-3 didapatkan *P-value* sebesar 0,083 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata tinggi vili yang signifikan pada hari ke-3).

**Analisis statistik hari ke-5**

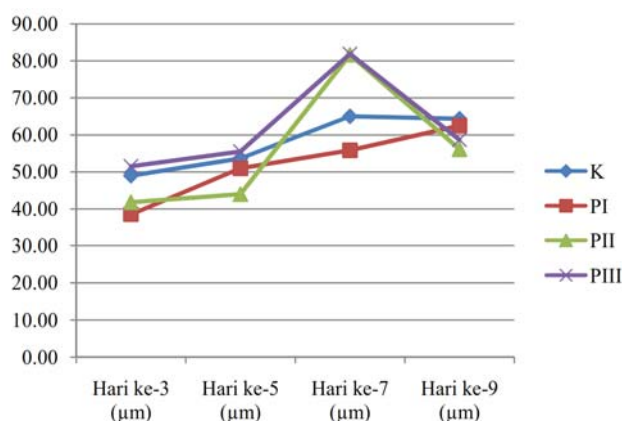
Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata tinggi vili tiap kelompok pada hari ke-5 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata tinggi vili pada semua kelompok perlakuan. Dari hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* rata-rata tinggi vili pada hari ke-5 didapatkan *P-value* sebesar 0,083 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata tinggi vili yang signifikan pada hari ke-5).

**Tabel 1.** Rata-rata berat badan subjek penelitian

Kelompok	Rerata	SD
K	141,43	8,997
PI	140,71	8,381
PII	139,29	9,322
PIII	148,57	8,997

**Tabel 2.** Rata-rata tinggi vili semua kelompok

Kel.	Rerata hari ke-3 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-5 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-7 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-9 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
K	49,00 $\pm$ 0,94	53,67 $\pm$ 1,41	65,00 $\pm$ 3,78	64,34 $\pm$ 0,47
PI	38,50 $\pm$ 0,24	51,00 $\pm$ 0,95	55,84 $\pm$ 2,59	62,50 $\pm$ 4,48
PII	41,83 $\pm$ 3,54	44,00 $\pm$ 0,95	81,67 $\pm$ 1,41	56,17 $\pm$ 0,23
PIII	51,50 $\pm$ 0,24	55,50 $\pm$ 0,71	81,84 $\pm$ 2,60	58,67 $\pm$ 0,94



**Gambar 2.** Rata-rata tinggi vili semua kelompok

#### Analisis statistik hari ke-7

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata tinggi vili tiap kelompok pada hari ke-7 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata tinggi vili pada semua kelompok perlakuan. Dari hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* rata-rata tinggi vili pada hari ke-7 didapatkan *P-value* sebesar 0,139 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata tinggi vili yang signifikan pada hari ke-7).

#### Analisis statistik hari ke-9

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata tinggi vili tiap kelompok pada hari ke-9 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata tinggi vili pada semua kelompok perlakuan. Dari hasil analisis uji *Kruskal-Wallis* rata-rata tinggi vili pada hari ke-9 didapatkan *P-value* sebesar 0,160 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata tinggi vili yang signifikan pada hari ke-9).

#### Kedalaman kripte mukosa *Ileum*

Pengukuran kedalaman kripte menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x. Pada lensa objektifnya ditambahkan mikrometer agar dapat dilakukan pengukuran. Dari tiap preparat dipilih 3 lapang pandang dan tiap lapang pandang dipilih satu kripte. Kripte yang diukur dipilih yang utuh atau jika mengalami kerusakan bukan akibat kesalahan pemotongan. Pengukuran dimulai dari permukaan hingga dasar kripte. Rata-rata kedalaman kripte pada setiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Dari Tabel 3 dapat dilihat perbandingan rata-rata kedalaman kripte mukosa *ileum* pada tiap kelompok perlakuan. Pada hari ke-3, rata-rata kedalaman kripte pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PII mempunyai nilai rata-rata kedalaman kripte lebih besar daripada kelompok PI, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PIII. Pada hari ke-5, rata-rata kedalaman kripte pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PII dan PIII. Pada hari ke-7, rata-rata kedalaman kripte pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PII mempunyai nilai rata-rata kedalaman kripte lebih besar daripada kelompok PI dan PIII. Pada hari ke-9, rata-rata kedalaman kripte pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Kelompok PII mempunyai nilai rata-rata kedalaman kripte lebih besar daripada kelompok PI, namun lebih kecil dibandingkan dengan kelompok PIII.

Perbedaan rata-rata kedalaman kripte dapat digambarkan dengan garis bertanda seperti pada Gambar 2. Kemudian, data yang telah diperoleh dianalisis dengan uji

*one way anova*. Untuk dapat melakukan uji *one way anova* dilakukan uji normalitas dan homogenitas rata-rata kedalaman kripte mukosa *ileum* menggunakan program *SPSS for Windows Release version 16.0*.

#### Analisis statistik hari ke-3

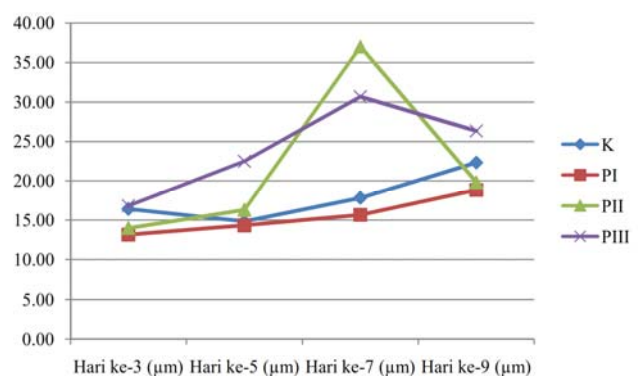
Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata kedalaman kripte tiap kelompok pada hari ke-3 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata kedalaman kripte pada semua kelompok perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* rata-rata kedalaman kripte pada hari ke-3 didapatkan *P-value* sebesar 0,114 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata kedalaman kripte yang signifikan pada hari ke-3).

#### Analisis statistik hari ke-5

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata kedalaman kripte tiap kelompok pada hari ke-5 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata kedalaman kripte pada semua kelompok perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* rata-rata kedalaman kripte pada hari ke-5 didapatkan *P-value* sebesar 0,198 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata kedalaman kripte yang signifikan pada hari ke-5).

**Tabel 3.** Rata-rata kedalaman kripte semua kelompok

Kel.	Rerata hari ke-3 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-5 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-7 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD	Rerata hari ke-9 ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ SD
K	16.43 $\pm$ 0,47	14.84 $\pm$ 1,65	17.84 $\pm$ 0,23	22.34 $\pm$ 0,47
PI	13.17 $\pm$ 0,17	14.34 $\pm$ 1,89	15.67 $\pm$ 0,47	18.84 $\pm$ 0,23
PII	14.00 $\pm$ 1,41	16.33 $\pm$ 2,83	37.00 $\pm$ 1,88	19.84 $\pm$ 1,18
PIII	16.84 $\pm$ 0,23	22.50 $\pm$ 0,71	30.67 $\pm$ 1,41	26.34 $\pm$ 0,47



**Gambar 2.** Rata-rata kedalaman kripte semua kelompok

#### Analisis statistik hari ke-7

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata kedalaman kripte tiap kelompok pada hari ke-7 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel tidak homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata kedalaman kripte pada semua kelompok perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* rata-rata kedalaman kripte pada hari ke-7 didapatkan *P-value* sebesar 0,083 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata kedalaman kripte yang signifikan pada hari ke-7).

#### Analisis statistik hari ke-9

Dari hasil analisis uji normalitas nilai rata-rata kedalaman kripte tiap kelompok pada hari ke-9 menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dengan  $\alpha = 0,05$ , *P-value* tidak dapat dihitung (berarti distribusi sampel tidak normal). Sedangkan, dari uji homogenitas didapatkan *P-value* sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ; berarti sampel homogen). Karena uji prasyarat untuk *one way anova* tidak terpenuhi, maka digunakan uji *Kruskal-Wallis* untuk melihat perbedaan rata-rata kedalaman kripte pada semua kelompok perlakuan. Dari uji *Kruskal-Wallis* rata-rata kedalaman kripte pada hari ke-9 didapatkan *P-value* sebesar 0,092 ( $p > 0,05$ ; berarti tidak terdapat perbedaan rata-rata kedalaman kripte yang signifikan pada hari ke-9).

Hasil pengamatan mikroskopis kondisi mukosa ileum pada penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.

#### Pembahasan

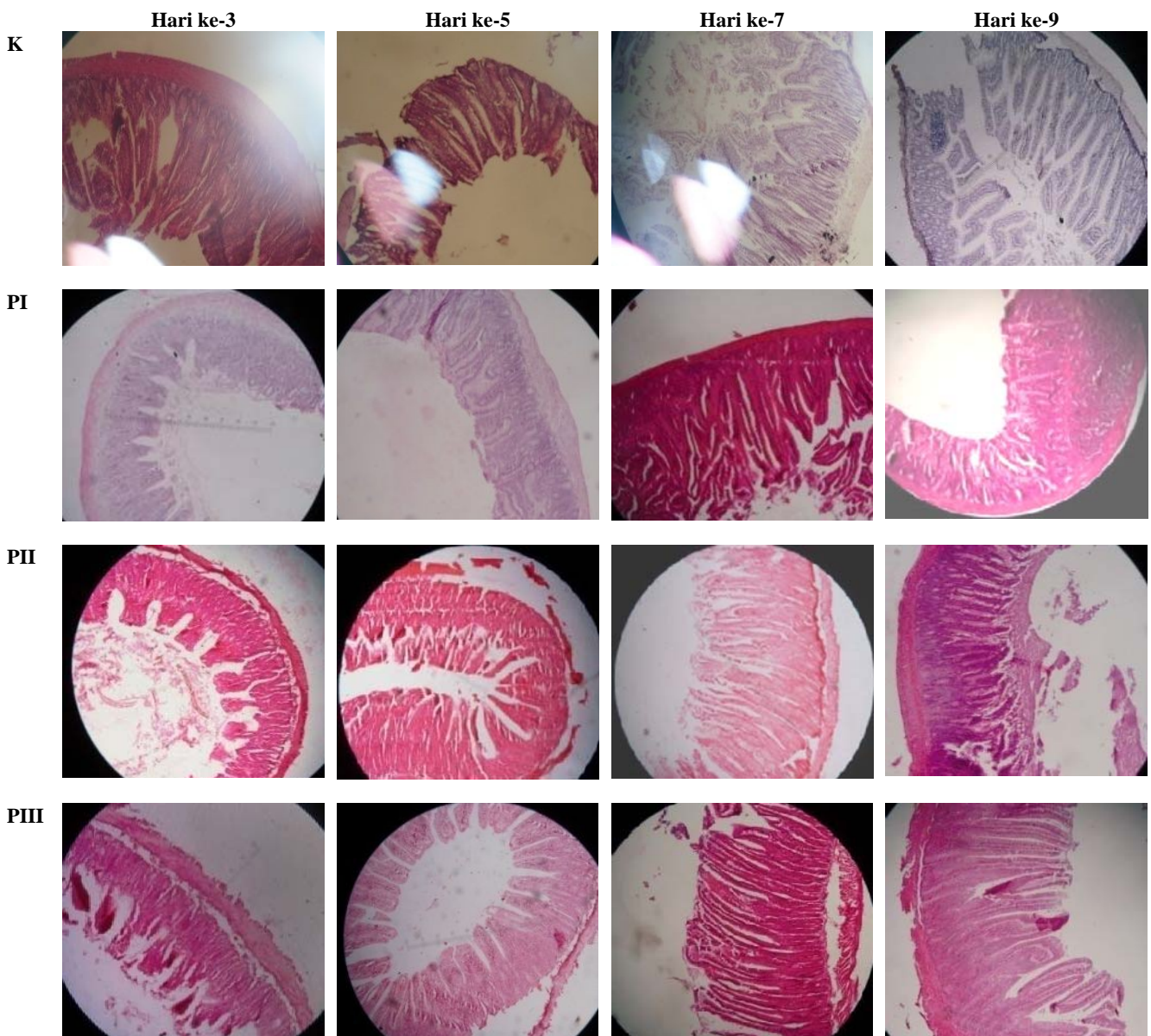
Penelitian ini menggunakan uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan tinggi vili dan kedalaman kripte di antara semua kelompok. Hasil analisis berdasarkan uji *Kruskal Wallis* tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. Hal ini dapat disebabkan oleh karena sedikitnya sampel pada tiap hari pengamatan masing-masing kelompok. Perhitungan sampel yang telah dilakukan berdasarkan rumus Federer adalah untuk setiap kelompok. Sedangkan, dalam penelitian ini dari masing-masing kelompok subjek penelitian masih dibagi lagi menjadi 4 hari pengamatan yaitu hari ke-3, 5, 7, dan 9. Idealnya, sampel pada masing-masing hari pada setiap kelompok adalah lebih dari 6 ekor, namun karena terbatasnya biaya penelitian dan waktu penelitian maka peneliti menggunakan subjek penelitian sejumlah 7 ekor pada tiap kelompok.

Hasil penelitian ini dapat dibahas melalui perhitungan persentase rata-rata tinggi vili tiap kelompok perlakuan yang dibandingkan dengan kelompok kontrol dan gambaran histologis vili dan kripte mukosa *ileum* pada semua kelompok. Rata-rata tinggi vili pada kelompok kontrol yaitu 58,00  $\mu\text{m}$  dan rata-rata kedalaman kripte pada kelompok kontrol yaitu 17,84  $\mu\text{m}$ . Rata-rata tersebut dianggap 100%.

Rata-rata tinggi vili pada kelompok PI yaitu yang diberi injeksi 5-FU saja pada hari ke-3 adalah 38,5  $\mu\text{m}$  (66,38%), sedangkan pada hari ke-5 adalah 51  $\mu\text{m}$  (87,93%), pada

hari ke-7 adalah 55,84  $\mu\text{m}$  (96,28%), dan pada hari ke-9 adalah 62,5  $\mu\text{m}$  (107,76%) (Tabel 4). Pada hari ke-3, vili mukosa ileum mengalami pemendekan ditunjukkan dengan persentase yang lebih kecil dibanding dengan kontrol. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Verburg et al. (2001) yang menunjukkan bahwa pada hari ke-3 dan 4 terjadi atrofi vili dan deplesi sel-sel epitel vili sehingga vili tampak mengalami pendataran. Hal ini didukung dengan gambaran histologis vili mukosa *ileum* tikus pada kelompok PI hari ke-3 (Gambar 3). Terlihat adanya pendataran vili sehingga lebih pendek dari vili pada kelompok K. Pada hari ke-5, mulai terjadi regenerasi vili ditandai dengan penambahan tinggi vili dan berkurangnya deplesi vili. Regenerasi ini terus berlangsung sampai hari ke-9. Namun, pada hari ke-9, terjadi hiperplasia epitel vili yang ditunjukkan dengan tinggi vili pada hari ke-9 yang melampaui tinggi vili pada kelompok kontrol. Keadaan ini serupa dengan hasil penelitian Verburg et al. (2000) yang menunjukkan terjadi hiperplasia epitel vili mukosa ileum pada hari ke-5 dan 6 setelah pemberian 5-FU. Namun, masih belum diketahui secara pasti mekanisme terjadinya hiperplasia epitel usus halus. Hasil penelitian Verburg et al. (2000) menunjukkan bahwa hiperplasia terbesar terjadi pada usus halus bagian distal yaitu *ileum*. Hal ini mungkin terjadi karena mekanisme umpan balik negatif dari ileum untuk menghentikan proliferasi epitel vili kurang terkontrol dibanding dengan usus halus bagian proksimal. Pada penelitian tersebut, pengamatan dilakukan sampai hari ke-10 sehingga dapat melihat lebih lanjut pengaruh pemberian 5-FU pada ketinggian vili mukosa ileum yaitu kembalinya ketinggian vili mukosa ileum mendekati nilai kontrol, sedangkan pada penelitian ini pengamatan hanya dilakukan sampai hari ke-9 sehingga tidak dapat melihat pengaruh pemberian 5-FU pada hari ke-10 dan selanjutnya.

Rata-rata panjang vili pada kelompok PII pada hari ke-3 adalah 41,83  $\mu\text{m}$  (72,12%), pada hari ke-5 adalah 44  $\mu\text{m}$  (75,86%), pada hari ke-7 adalah 81,67  $\mu\text{m}$  (140,81%), dan pada hari ke-9 adalah 56,17  $\mu\text{m}$  (96,84%). Dari perhitungan ini dapat dilihat bahwa persentase rata-rata tinggi vili kelompok PII pada hari ke-3 lebih besar dibanding dengan kelompok PI (66,38%). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jahe menghasilkan regenerasi yang lebih baik daripada regenerasi spontan kelompok PI. Namun, pada hari ke-5 persentase tinggi vili pada PII lebih kecil dari PI. Sedangkan pada hari ke-7, terjadi hiperplasia sel epitel PII ditandai dengan persentase yang lebih besar 40,81% dibanding dengan kelompok kontrol. Pada hari ke-9, tinggi vili mendekati nilai kontrol. Hiperplasia epitel vili terjadi lebih awal pada kelompok yang diberi ekstrak jahe, tidak seperti yang terjadi pada kelompok PI, hiperplasia terjadi pada hari ke-9. Hal ini mungkin karena adanya pengaruh pemberian jahe. Adanya pemberian jahe dapat menekan terjadinya inflamasi (Afzal et al. 2001) karena pengaruh 5-FU, sehingga dapat memperbaiki kerusakan mukosa ileum. Hal ini didukung dengan gambaran histologis mukosa ileum pada kelompok PII (Gambar 3).



**Gambar 3.** Pengamatan mikroskopis preparat histologis

**Tabel 4.** Persentase vili semua kelompok

Kel.	Hari ke-3	Hari ke-5	Hari ke-7	Hari ke-9
K	100%	100%	100%	100%
PI	66,38%	87,93%	96,28%	107,76%
PII	72,12%	75,86%	140,81%	96,84%
PIII	88,79%	95,69%	141,10%	101,15%

Rata-rata tinggi vili pada kelompok PIII adalah 51,5  $\mu\text{m}$  (88,79%) pada hari ke-3, 55,5  $\mu\text{m}$  (95,69%) pada hari ke-5, 81,84  $\mu\text{m}$  (141,10%) pada hari ke-7, dan 58,67  $\mu\text{m}$  (101,15%) pada hari ke-9. Dari perhitungan ini dapat

dilihat bahwa persentase rata-rata tinggi vili kelompok PIII pada hari ke-3 lebih besar dibanding dengan kelompok PI dan PII. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak jahe dosis II dapat mempercepat perbaikan kerusakan epitel vili mukosa ileum. Namun, hiperplasia masih terjadi pada hari ke-7 dan kembali mendekati nilai normal pada hari ke-9. Apabila dilihat pengaruh pemberian ekstrak jahe pada perbedaan gambaran histologis (Gambar 3), Kelompok PIII menunjukkan keutuhan vili dan kriptes. Meskipun dari hasil analisis statistik tidak ada perbedaan yang bermakna tinggi vili dan kedalaman kriptes pada semua kelompok, perbedaan persentase dan gambaran histologis yang lebih baik dari kelompok PIII memberikan sinyal positif adanya pengaruh pemberian jahe terhadap kerusakan mukosa ileum akibat 5-FU.

Rata-rata tinggi vili hari ke-3, 5, dan 7 pada kelompok PI lebih kecil daripada kelompok K. Hal ini menunjukkan adanya kerusakan mukosa akibat pemberian 5-fluorourasil. Pada hari ke-9 telah terjadi peningkatan tinggi vili mukosa ileum mendekati nilai kontrol. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Verburg et al. (2000).

Rata-rata tinggi vili pada kelompok PII dan PIII lebih tinggi daripada PI. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan tinggi vili yang lebih besar pada kelompok yang mendapat pemberian ekstrak jahe dibanding dengan kelompok yang hanya diberikan 5-fluorourasil. Namun, terjadi hiperplasia vili pada hari ke-7. Hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Verburg et al. (2000) dan penyebab terjadinya hiperplasia masih belum diidentifikasi. Analisis terhadap pengaruh pemberian ekstrak jahe mungkin dapat menjelaskan fenomena ini. Ekstrak jahe mempunyai pengaruh menghambat terjadinya inflamasi dan meningkatkan proliferasi sel untuk membantu regenerasi mukosa yang rusak. Pada keadaan tertentu seperti kontrol yang buruk dari individu terhadap keseimbangan deplesi dan proliferasi sel, hal ini dapat berlebihan sehingga terjadi hiperplasia. Namun, hiperplasia ini kembali mendekati nilai kontrol pada hari ke-9.

Rata-rata kedalaman kriptte pada kelompok PI pada hari ke-3 adalah 13,17  $\mu\text{m}$  (73,82%), pada hari ke-5 adalah 14,34  $\mu\text{m}$  (80,38%), pada hari ke-7 adalah 15,67  $\mu\text{m}$  (87,84%), dan pada hari ke-9 adalah 18,34  $\mu\text{m}$  (105,61%) (Tabel 5). Verburg et al. (2001) yang menyatakan bahwa regenerasi kriptte dimulai pada hari ke-3 dan 4. Pada penelitian ini, kedalaman kriptte pada hari ke-3 menunjukkan adanya pendangkalan. Namun, tidak diketahui perbandingannya dengan hari 1 karena tidak dilakukan pengamatan. Pada hari ke-5, mulai terjadi regenerasi dan berlanjut sampai hari ke-9 seperti penelitian yang dilakukan oleh Verburg et al. (2001). Seperti yang terjadi pada tinggi vili, pada hari ke-9 kedalaman kriptte melebihi nilai kontrol namun masih belum diketahui bagaimana hiperplasia terjadi.

Rata-rata kedalaman kriptte pada kelompok PII pada hari ke-3 adalah 14,00  $\mu\text{m}$  (80,09%), pada hari ke-5 adalah 16,33  $\mu\text{m}$  (91,54%), pada hari ke-7 adalah 37,00  $\mu\text{m}$  (207,40%), dan pada hari ke-9 adalah 19,84  $\mu\text{m}$  (111,21%). Pada penelitian ini terjadi hiperplasia mulai dari hari ke-7 dan seterusnya. Seperti yang terjadi pada vili, pemberian jahe menimbulkan adanya hiperplasia. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bagaimana perbedaan hiperplasia pada vili dan kriptte.

Rata-rata kedalaman kriptte pada kelompok PIII pada hari ke-3 adalah 16,84  $\mu\text{m}$  (94,39%), pada hari ke-5 adalah 22,5  $\mu\text{m}$  (126,12%), pada hari ke-7 adalah 30,67  $\mu\text{m}$  (171,92%), dan pada hari ke-9 adalah 26,34  $\mu\text{m}$  (147,65%). Persentase rata-rata kedalaman kriptte pada kelompok PIII, terlihat sangat berbeda dengan kelompok K, PI, dan PII. Pada hari ke-3, kedalaman kriptte sudah mulai mendekati normal. Namun, terjadinya hiperplasia pun lebih awal dari kelompok PI dan PII. Perlu diadakan penelitian lebih lanjut yang mengidentifikasi keutuhan vili dan kriptte agar tidak terjadi kesalahan dalam pengukuran.

**Tabel 5.** Persentase kedalaman kriptte semua kelompok

Kel.	Hari ke-3	Hari ke-5	Hari ke-7	Hari ke-9
K	100%	100%	100%	100%
PI	73,82%	87,93%	96,28%	107,76%
PII	80,09%	91,54%	207,40%	111,21%
PIII	94,39%	95,69%	141,10%	101,15%

Seperti yang terjadi pada tinggi vili, rata-rata kedalaman kriptte pada kelompok PII dan PIII lebih tinggi daripada PI. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan kedalaman kriptte yang lebih besar pada kelompok yang mendapat pemberian ekstrak jahe dibanding dengan kelompok yang hanya diberikan 5-fluorourasil. Namun, karena adanya hiperplasia epitel vili berakibat pada bertambah dalamnya kriptte pada hari ke-7. Hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Verburg et al. (2000) dan penyebab terjadinya hiperplasia masih belum diidentifikasi. Analisis terhadap pengaruh pemberian ekstrak jahe mungkin dapat menjelaskan fenomena ini. Ekstrak jahe mempunyai pengaruh menghambat terjadinya inflamasi dan meningkatkan proliferasi sel untuk membantu regenerasi mukosa yang rusak. Pada keadaan tertentu seperti kontrol yang buruk dari individu terhadap keseimbangan deplesi dan proliferasi sel, hal ini dapat berlebihan sehingga terjadi hiperplasia. Namun, hiperplasia ini kembali mendekati nilai kontrol pada hari ke-9.

Belum ada penelitian mengenai pengaruh ekstrak jahe terhadap perbaikan mukosa ileum yang mengalami mukositis akibat kemoterapi. Hasil dalam penelitian ini menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna pada perbaikan mukosa ileum yang terjadi spontan dengan yang mendapat terapi ekstrak jahe. Namun, persentase rata-rata tinggi vili dan kedalaman kriptte yang lebih besar pada kelompok yang mendapat ekstrak jahe memberikan sinyal positif adanya pengaruh ekstrak jahe terhadap perbaikan mukosa ileum yang mengalami mukositis akibat kemoterapi. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati pengaruh yang terjadi pada setiap hari mulai dari hari pertama pemberian kemoterapi 5-FU sampai lebih dari sembilan hari, sehingga dapat diketahui kapan pengaruh ekstrak jahe mulai terjadi dan bagaimana pengaruhnya dalam memperbaiki mukositis saluran cerna khususnya pada pemberian 5-FU. Pemberian 5-FU dalam penelitian ini hanya pada hari pertama penelitian, padahal biasanya 5-FU diberikan dua kali dengan jangka waktu 24 jam (Verburg et al. 2001) sehingga hal ini dapat mempengaruhi hasil yang diperoleh. Dosis pemberian ekstrak jahe yang optimal juga perlu diidentifikasi. Pada penelitian klinis yang dilakukan oleh Chrubasik et al. (2005), dosis jahe yang diberikan sebagai antiemesis adalah 400 mg (tiga kali sehari selama dua minggu), sedangkan pada penelitian ini digunakan dosis manusia 500 mg (satu kali sehari) dan 1000 mg (satu kali sehari) (Ernst dan Pitler 2000).

Kelemahan lain dalam penelitian ini adalah pembuatan ekstrak jahe yang tidak sesuai dengan protokol. Ekstrak jahe yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari

pelarutan serbuk jahe dengan menggunakan *aquadest*. Proses ekstraksi yang benar ialah penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang diinginkan larut. Apabila yang diinginkan adalah ekstrak encer, maka dibuat sediaan cair dari obat-obat asal tumbuh-tumbuhan, mengandung alkohol sebagai pelarut atau sebagai pengawet atau sebagai keduanya dan sedemikian rupa dibuat supaya tiap ml mengandung bahan obat 1 g obat standar dari obat yang dihasilkan (Howard 1989).

Salah satu cara untuk pembuatan ekstrak adalah dengan menggunakan metode maserasi. Istilah maserasi berasal dari bahasa Latin *macerare*, yang artinya “merendam”. Merupakan proses yang paling tepat di mana obat yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat yang mudah larut akan melarut. Dalam proses maserasi, obat yang akan diekstraksi biasanya di tempatkan pada wadah atau bejana yang bermulut lebar, bersama menstrum yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat, dan isinya dikocok berulang-ulang, lamanya berkisar 2-14 hari. Maserasi biasanya dilakukan pada temperatur 15-20°C selama 3 hari sampai bahan-bahan yang larut dapat melarut (Howard 1989).

### KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak jahe tidak berpengaruh terhadap perbaikan kerusakan mukosa ileum tikus yang terpapar 5-FU.

### DAFTAR PUSTAKA

- Afzal M, Al-Hadidi D, Menon M, Pesek J, Dhani MS. 2001. Ginger: an ethnomedical, chemical and pharmacological review. *Drug Metab Drug Interact* 18: 159-190.
- Baydar M, Dikilitas M, Sevinc A, Aydogdu I. 2005. Prevention of oral mucositis due to 5-fluorouracil treatment with oral cryotherapy. *J Natl Med Assoc* 97(8): 1161-1164.
- Chrubasik S, Pittler MH, Roufogalis BD. 2005. Zingiberis rhizome: a comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 12: 684-701.
- Ernst E, Pittler MH. 2000. Efficacy of ginger for nausea and vomiting: a systematic review of randomized clinical trials. *Br J Anaesth* 84: 367-371.
- Howard C. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Penerbit UI press. Jakarta.
- Levy ASA, Simon O, Shelly J, Gardener M. 2006. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. *BMC Pharmacol* 6: 12.
- Nicola P, Romani C, Cupelli L, Scaramucci L, Tendas A, Dentamaro T, Amadori S, de Fabritiis P. 2007. Mucositis in patients with hematologic malignancies: an overview. *Haematologica* 92: 222-231.
- Purawisastra S. 2001. *Penelitian Pengaruh Isolat Galaktomannan Kelapa terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Serum Kelinci*. Litbang Depkes RI, Jakarta
- Rosen LS, Abdi E, Davis ID, Gutheil J, Schnell FM, Zalberg J, Cesano A, Gayko U, Chen M, Clarke S. 2006. Palifermin reduces the incidence of oral mucositis in patients with metastatic colorectal cancer treated with fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 24: 5194-5200.
- Shirasaka T, Yamamitsu S, Tsuji A, Taguchi T. 2000. Conceptual changes in cancer chemotherapy: from an oral fluoropyrimidine prodrug, UFT, to a novel oral fluoropyrimidine prodrug, S-1, and low-dose FP therapy in Japan. *Invest New Drugs* 18: 315-329.
- Smith C, Crowther C, Willson K, Hotham N, McMillian V. 2004. Randomized Controlled Trial of Ginger to Treat Nausea and Vomiting in Pregnancy. *Obstet Gynecol* 103: 639-45.
- Surh YJ. 2002. Anti-tumor promoting potential of selected spice ingredients with antioxidative and anti-inflammatory activities: a short review. *Food Chem Toxicol* 40: 1091-1097.
- Tavakkolizadeh S, Shen R, Abraham P, Kormi N, Seifert P, Edelman ER, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. 2000. Glucagon-like peptide 2: a new treatment for chemotherapy-induced enteritis. *J Surg Res* 91: 77-82.
- Verburg M, Renes IB, Meijer HP, Taminiau JA, Büller HA, Einerhand AW, Dekker J. 2000. Selective sparing of goblet cells and paneth cells in the intestine of methotrexate-treated rats. *Am J Physiol* 279: G1037-1047.
- Verburg M, Renes IB, Nispen DJPM, Ferdinandusse S, Jorritsma M, Buller HA, Einerhard AWC, Dekker J. 2001. Specific Responses in Rat Small Intestinal Epithelial mRNA Expression and Protein Levels During Chemotherapeutic Damage and Regeneration. *J Histochem Cytochem* 50(11): 1525-1536.
- Young HY, Luo YL, Cheng HY, Hsieh WC, Liao JC, Peng WH. 2005. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J Ethnopharmacol* 96: 207-210.

# Pengendalian hama ulat grayak (*Spodoptera litura*) pada tanaman tembakau Deli (*Nicotiana tabaccum*) dengan pestisida nabati dari kulit kayu mindi (*Melia azedarach*)

## Control of *Spodoptera litura* pests on Deli tobacco plants (*Nicotiana tabaccum*) with natural pesticides from *Melia azedarach* bark extract

RIDWANTI BATUBARA, AFIFUDDIN DALIMUNTE

Fakultas Kehutanan, Universitas Sumatera Utara. Jl. Tridharma Ujung No. 1, Kampus USU, Padang Bulan, Medan 20155, Sumatera Utara

Manuskrip diterima: 9 September 2015. Revisi disetujui: 20 Januari 2016.

**Abstract.** Batubara R, Dalimunte A. 2016. Control of *Spodoptera litura* pests on Deli tobacco plants (*Nicotiana tabaccum*) with natural pesticides from *Melia azedarach* bark extract. *Biofarmasi* 14: 33-37. The objective of this study was to assay the potential of mindi bark extract (*Melia azedarach* L.) as a natural pesticide on ulat grayak (*Spodoptera litura* Fab.) in Deli tobacco pest (*Nicotiana tabaccum* L.) in various solvents and concentrations. In this study, mindi bark was powdered and extracted using various solvents, i.e. methanol, acetone, and akuadest. Five concentration levels of 0%, 1%, 2%, 3% and 4% were prepared, then tested in the laboratory for the ability to eradicate ulat grayak and phytochemically tested for extractive chemical (or secondary metabolite) content. The difference of mindi bark extract from different solvents significantly affect on ulat grayak mortality; on the other hand, the concentration and interaction between solvent type and concentration did not significantly affect on ulat grayak mortality. The mindi bark extract contains alkaloids and little saponins in acetone extract.

**Keywords:** Concentration, mindi bark extract, mortality, *Spodoptera litura*, solvent

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu penghasil tembakau dengan mutu yang terbaik. Salah satu tembakau yang terkenal di pasar global adalah tembakau Deli (*Nicotiana tabaccum* L.) yang merupakan komoditas daerah Sumatera Utara. Mutu tembakau Deli belum tertandingi oleh tembakau-tembakau dari daerah lain, baik dari dalam maupun dari luar negeri. Karena beberapa faktor, terjadi penurunan produksi tembakau antara lain hama dan penyakit yang tidak terkontrol pada bibit tembakau. Hama yang paling banyak menyerang tanaman tembakau Deli adalah ulat grayak (*Spodoptera litura* Fabricius, 1775) (Erwin 2000). Tanpa perhatian serius dari berbagai pihak, keberadaan tembakau Deli yang khas akan menurun reputasinya sehingga Indonesia akan kehilangan salah satu produk kebanggannya.

Salah satu cara untuk mengantisipasi hama adalah dengan cara mengendalikan dan menjaga tanaman dari serangan hama. Pengendalian hama tembakau yang umum dilakukan adalah dengan menyemprotkan pestisida pada tanaman. Penggunaan pestisida kimia selain harganya mahal juga berbahaya bagi lingkungan. Untuk itu diperlukan alternatif pestisida kimia yaitu pestisida alami. Pestisida alami dapat dibuat dari ekstraktif beberapa jenis tumbuhan. Daun dan biji tanaman mindi (*Melia azedarach* L.) telah dilaporkan dapat digunakan sebagai pestisida nabati untuk mengatasi serangan hama ulat grayak (Sinaga 2009). Kulit kayu mindi juga telah diuji coba sebagai bahan

alami pengendali rayap tanah *Coptotermes curvignathus* Holmgren (Falah et al. 2004).

Berdasarkan hal diatas maka dirasa perlu untuk mengendalikan hama ulat grayak pada tanaman tembakau Deli dengan memanfaatkan zat ekstrak kulit kayu mindi sebagai pestisida alternatif. Mengingat serangan hama ini pada tanaman khas Sumatera Utara (tembakau Deli) sangat merugikan dan pengendalian hama ini sampai saat ini masih ditekankan pada pestisida yang bukan berasal dari bahan alami.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji kandungan fitokimia kulit kayu mindi dan menguji kemampuan zat ekstrak kulit kayu mindi sebagai pestisida alami ulat grayak pada berbagai pelarut dan konsentrasi.

### BAHAN DAN METODE

#### Lokasi dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium (Lab.) Kimia Bahan Alam, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, serta Lab. Teknologi Hasil Hutan, Departemen Kehutanan, Fakultas Pertanian, Universitas Sumatera Utara, Medan, Sumatera Utara. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei hingga November 2009.

### Prosedur

Bahan penelitian berupa kulit kayu mindi yang segar, dikeringkan sampai kering udara, kemudian bahan dihaluskan atau ditumbuk menggunakan tumbukan atau blender untuk mendapatkan serbuk. Serbuk disaring dengan ukuran 40-60 mesh dan selanjutnya di ukur kadar airnya.

Serbuk yang telah kering diambil sebanyak 500 g, masing-masing diekstraksi dengan pelarut aseton, metanol dan akuades dengan metode perendaman pada suhu ruangan selama 2 hari dengan perbandingan jumlah serbuk dan pelarut 1:3 dalam stoples, campuran ini diaduk dengan selang waktu 2 jam menggunakan batang pengaduk, hasil ekstraksi tersebut disaring menggunakan kertas saring, hasil saringan dimasukkan dalam botol, residunya direndam kembali selama 2 hari. Kegiatan perendaman dan penyaringan ini diulang sebanyak 3 kali. Hasil masing-masing ekstraksi tersebut kemudian dievaporasi sampai volumenya 100 mL. Dari ekstraksi diambil 10 mL, kemudian dievaporasi sampai kering setelah itu baru dioven untuk mengetahui kadar ekstraknya.

Tahap selanjutnya, setelah dilakukan ekstraksi bertahap dan diperoleh padatan ekstraktif yang dilakukan dengan pengeringan oven pada suhu 35°C adalah pembuatan konsentrasi larutan zat ekstraktif menggunakan pelarut aseton, metanol dan akuades. Masing-masing hasil ekstraksi (kulit dan daun) dibuat 5 taraf konsentrasi larutan ekstraktif, yaitu: 0%, 1%, 2%, 3%, 4%. Penentuan konsentrasi larutan berdasarkan pada volume semprot.

Pada tahap penyemprotan sebelum dilakukan aplikasi penyemprotan, ulat grayak sebanyak 15 ekor dan daun tembakau segar diletakkan pada stoples, ditutup dengan kain kasa dan dibiarkan selama 1 hari, setelah 1 hari dilakukan penyemprotan dengan larutan yang telah disiapkan.

Perhitungan larva ulat grayak yang mati dilakukan setiap dua hari setelah penyemprotan yang akan diamati selama kurang lebih 12 hari. Perhitungan nilai mortalitas menggunakan rumus:

$$K_i = \frac{M_i}{15} \times 100\%$$

$K_i$  = Persen kematian ulat grayak pada contoh uji

$M_i$  = Jumlah mortalitas ulat grayak pada contoh uji

Pengujian fitokimia yang dilakukan adalah pengujian triterpenoid, saponin, flavonoid dan alkaloid. Pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan.

### Analisis data

Analisis data dilakukan untuk menghitung perbedaan pengaruh perlakuan ekstrak kulit kayu mindi dengan perbedaan pelarut dan konsentrasi. Analisis menggunakan statistik Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan 2 faktor. Untuk mengetahui pengaruh dari faktor perlakuan yang dicoba, dilakukan analisis keragaman dengan kriteria uji jika  $F_{hitung} \leq F_{tabel}$  maka  $H_0$  diterima dan jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$  maka  $H_0$  ditolak. Untuk mengetahui taraf perlakuan mana yang berpengaruh di antara faktor

perlakuan maka pengujian dilanjutkan menggunakan Uji Jarak Berganda Duncan (Duncan Multi Range Test).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kandungan zat ekstrak kulit kayu mindi sebagai bahan pestisida nabati

Kandungan ekstrak kulit kayu mindi dapat dilihat pada Tabel 1. Kandungan ekstrak kulit kayu mindi yang tertinggi didapat pada pelarut metanol. Namun pada ketiga pelarut tidak jauh berbeda berada pada kisaran 3-4%. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi jumlah zat ekstraktif antara lain: jenis kayu, bagian yang digunakan, umur pohon, tempat tumbuh, genetika, jenis pelarut, proses ekstraksi dan ukuran serbuk. Menurut Sjöström (1995), bagian-bagian yang berbeda dari pohon yang sama, yaitu: batang, cabang, akar, kulit kayu dan daun, berbeda kadar maupun komposisi zat ekstraktifnya. Pada pinus, kayu teras secara khas mengandung ekstraktif jauh lebih banyak daripada kayu gubal. Maka dalam penelitian ini jenis pelarut dan konsentrasi dijadikan pembeda perlakuan, sebab semua faktor sama.

Syafii (2000) mengatakan banyaknya zat ekstraktif yang dapat diekstrak dari dalam kayu tergantung berbagai macam faktor, yaitu jenis kayu, jenis pelarut, proses ekstraksi, ukuran serbuk dan kadar air serbuk. Jenis, pelarut, proses ekstraksi, ukuran serbuk dalam pelaksanaan penelitian ini adalah sama. Secara fisik penampakan serbuk kulit kayu mindi keras dan sangat lambat dalam menyerap pelarut, faktor fisik dan kemampuan menyerap pelarut ini juga menjadi faktor yang mempengaruhi kandungan ekstraktif yang didapat, terutama pada pelarut akuades sangat lambat dalam menyerap pelarut.

Menurut Browning (1963), kadar ekstraktif yang diperoleh tergantung pada pengeringan dan pengondisian serbuk kayu sebelum diekstrak. Kadar air serbuk mempengaruhi proses ekstraksi. Banyaknya zat ekstraktif yang dapat larut dalam pelarut polar biasanya lebih sedikit, namun adanya proses pengeringan serbuk sebelum ekstraksi, menyebabkan jumlah bahan yang dapat terlarut lebih banyak.

### Uji fitokimia kulit kayu mindi

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa kulit kayu mindi hanya mengandung senyawa alkaloid dan sedikit saponin pada pelarut aseton, berbeda dengan daun mindi yang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan saponin pada semua pelarut (Sinaga 2009). Hasil pengujian selengkapnya ditunjukkan pada Tabel 2, 3, 4 dan 5.

**Tabel 1.** Kandungan ekstrak kulit kayu mindi

Pelarut	Berat padatan hasil ekstraksi (g)	Kandungan hasil ekstraksi (ekstraktif) (%)
Aseton	16,15	3,23
Metanol	17,70	3,54
Akuades	15,23	3,04

**Tabel 2.** Hasil pengujian senyawa alkaloid pada kulit kayu kayu mindi

Pelarut	Pereaksi	Hasil pengamatan (perubahan warna)	Hasil pengujian
Metanol	Bouchardart	Endapan coklat	+++
	Meyer	Endapan putih kekuningan	++
	Dragendorff	Endapan merah kecoklatan	+++
Aseton	Bouchardart	Endapan coklat	+++
	Meyer	Endapan putih kekuningan	+
	Dragendorff	Endapan merah kecoklatan	+++
Akuades	Bouchardart	Endapan coklat	+++
	Meyer	Endapan putih kekuningan	+
	Dragendorff	Endapan merah kecoklatan	+++

Keterangan: -= tidak ada; + = ada sedikit; ++ = banyak; +++ = paling banyak

**Tabel 3.** Hasil pengujian senyawa flavonoid pada kulit kayu mindi

Pelarut	Pereaksi	Hasil pengamatan (perubahan warna)	Hasil pengujian
Metanol	FeCl <sub>3</sub> (1%)	Endapan biru tua	-
	Mg-HCl (encer)	Larutan coklat muda	-
Aseton	FeCl <sub>3</sub> (1%)	Larutan coklat kehijauan	-
	Mg-HCl (encer)	Larutan coklat muda	-
Akuades	FeCl <sub>3</sub> (1%)	Endapan abu-abu	-
	Mg-HCl (encer)	Endapan putih kekuningan	-

Keterangan: - = tidak ada (negatif); + = ada sedikit; ++ = banyak; +++ = paling banyak

**Tabel 4.** Hasil pengujian senyawa triterpenoid pada kulit kayu mindi

Pelarut	Hasil reaksi	Indikator senyawa	Hasil pengujian
Metanol	Coklat kehitaman	Merah/merah ungu	-
Aseton	Coklat muda	Merah/merah ungu	-
Akuades	Kuning	Merah/merah ungu	-

Keterangan: -= tidak ada; + = ada

**Tabel 5.** Hasil pengujian senyawa saponin pada kulit kayu mindi

Pelarut	Hasil reaksi	Indikator senyawa	Hasil pengujian
Metanol	Tidak ada busa	Buih/busa	-
Aseton	Ada sedikit busa	Buih/busa	+
Akuades	Tidak ada busa	Buih/busa	-

Keterangan: -= tidak ada; + = ada sedikit; ++ = banyak; +++ = paling banyak

Hasil uji alkaloid menggunakan pereaksi Bouchardart dan Dragendorff menunjukkan senyawa alkaloid pada ekstrak metanol, aseton dan akuades paling banyak. Pada pereaksi Meyer terjadi perubahan warna menjadi endapan putih kekuningan dan menghasilkan senyawa alkaloid dalam jumlah “sedang” pada ekstrak metanol, dan “sedikit” pada ekstrak aseton dan akuades.

Hasil uji flavonoid menggunakan pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1% terjadi perubahan warna menjadi endapan dengan warna yang berbeda-beda, namun hasilnya sama yaitu tidak mengandung senyawa flavonoid. Pada pereaksi Mg-HCl baik pada ekstrak metanol, aseton dan akuades juga tidak mengandung senyawa flavonoid.

Hasil uji triterpenoid menggunakan pereaksi Salkowsky terjadi perubahan warna menjadi coklat kehitaman, coklat muda dan kuning yang menunjukkan tidak ada senyawa triterpenoid pada ekstrak metanol, aseton dan akuades. Sehingga dapat disimpulkan kulit kayu mindi tidak mengandung senyawa triterpenoid.

Hasil uji saponin dengan penambahan akuades, dikocok menghasilkan busa hanya pada ekstrak aseton dengan jumlah sedikit. Pada ekstrak metanol dan akuades tidak menghasilkan busa (tidak mengandung senyawa saponin).

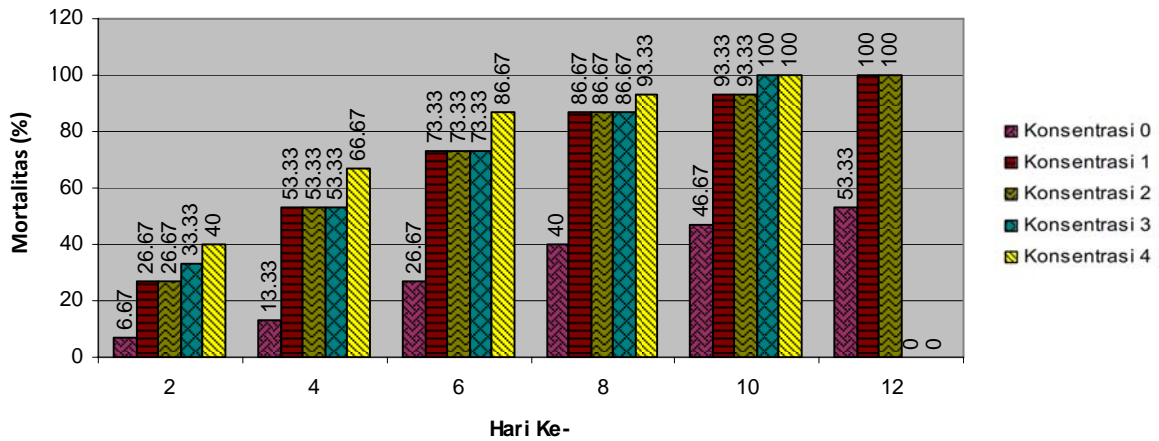
#### **Pengujian ekstrak kulit kayu mindi pada ulat grayak** *Perkembangan mortalitas larva pada pelarut aseton*

Perkembangan mortalitas larva *S. litura* pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi yang larut pada pelarut aseton ditunjukkan pada Gambar 1. Mortalitas sudah mulai terlihat pada hari kedua setelah aplikasi (pengujian). Mortalitas larva mencapai 100% untuk konsentrasi 3 dan 4% pada perlakuan setelah hari ke-10, sedangkan untuk konsentrasi 1% dan 2% mortalitas larva 100% terjadi pada hari ke-12. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi zat ekstrak yang disempatkan maka semakin tinggi pula mortalitas larva.

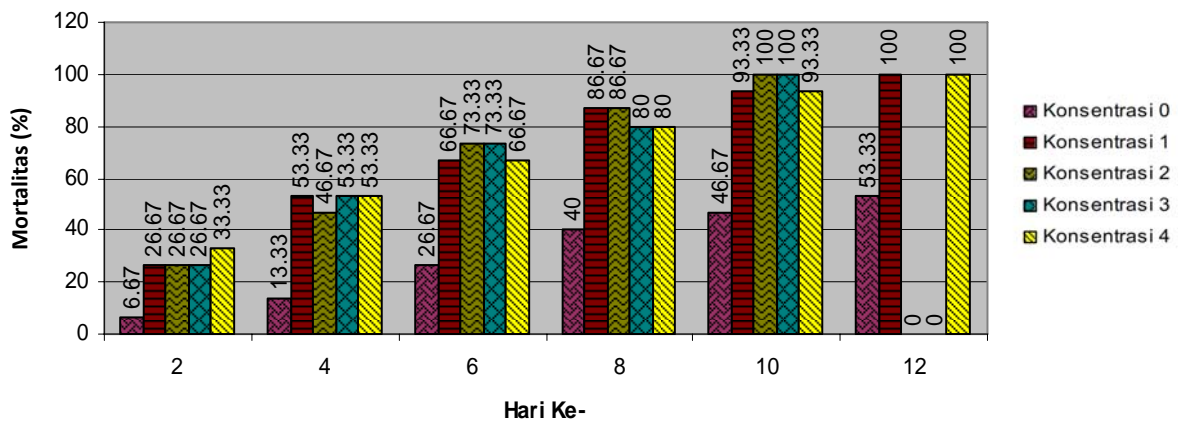
Pada ekstrak kulit kayu mindi dengan pelarut aseton memberikan efek peracunan (terhadap mortalitas larva) secara cepat, ekstrak kulit kayu mindi dengan konsentrasi rendah, sudah memberikan efek peracunan. Hal ini disebabkan faktor konsumsi larva, banyaknya daun yang dikonsumsi larva pada perlakuan ini menyebabkan mortalitasnya lebih cepat. Kematian larva karena pada saluran pencernaannya mengalami perubahan warna menjadi hitam (keracunan daun yang diberi ekstrak metanol). Hal ini sama seperti kematian yang dialami larva *Setothosea asigna* yang diberi perlakuan ekstrak daun mindi (Purba 1996). Mortalitas larva ulat grayak terus meningkat sampai hari ke-12 setelah aplikasi, dengan meningkatnya konsentrasi kulit kayu mindi.

#### *Perkembangan mortalitas larva pada pelarut metanol*

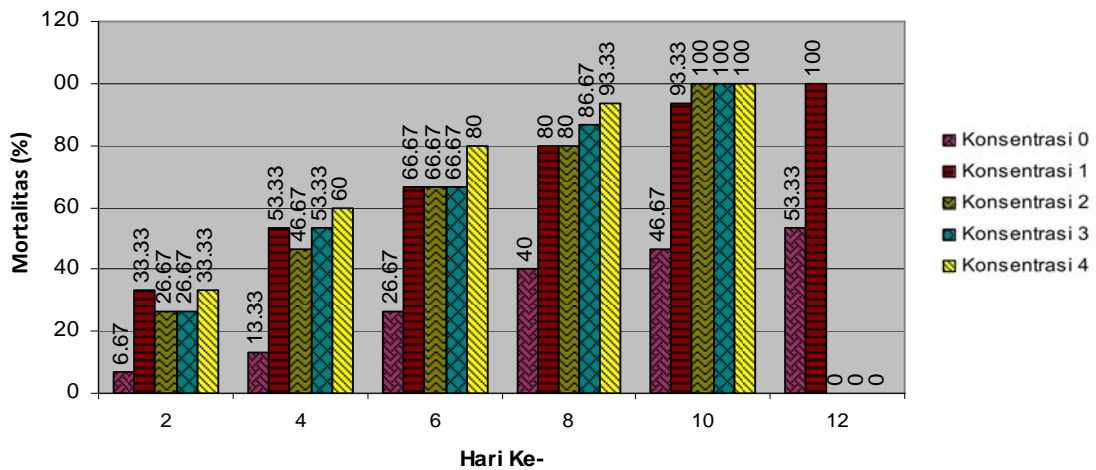
Mortalitas larva pada pengujian ekstrak kulit kayu mindi dengan pelarut metanol juga mulai terjadi pada hari kedua setelah aplikasi (pengujian). Mortalitas larva mencapai 100% untuk konsentrasi 2-3% pada perlakuan setelah hari ke-10, sedangkan untuk konsentrasi 1% dan 4% mortalitas larva 100% terjadi pada hari ke-12. Perkembangan mortalitas larva pada pelarut metanol ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 1. Perkembangan mortalitas larva *S. litura* pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi yang larut pada pelarut aseton



Gambar 2. Perkembangan mortalitas larva *S. litura* pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi yang larut pada pelarut metanol



Gambar 3. Perkembangan mortalitas larva *S. litura* pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi yang larut pada pelarut akuades

Pada pengujian ekstrak kulit kayu mindi dengan pelarut metanol, penyebab kematian larva karena mengering dan ukurannya bertambah kecil. Hal ini disebabkan ekstrak mindi dengan pelarut metanol mengandung senyawa alkaloid yang paling banyak. Adanya senyawa yang bersifat racun di dalam ekstrak dengan aroma yang tidak enak menyebabkan larva mengurangi konsumsinya. Semakin banyak konsentrasi ekstrak yang diberikan, menyebabkan mortalitas larva terus meningkat. Selain alkaloid, di dalam kulit kayu mindi terdapat pula senyawa *aglikon quersetin* yang menyebabkan aroma tidak enak.

#### *Perkembangan mortalitas larva pada pelarut akuades*

Sama seperti pengujian dengan zat ekstrak yang terlarut pada pelarut aseton dan metanol, mortalitas larva *S. litura* pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi yang larut pada pelarut akuades sudah mulai pada hari ke-2. Mortalitas larva mencapai 100% untuk konsentrasi 2%, 3% dan 4% pada perlakuan setelah hari ke-10, sedangkan untuk konsentrasi 1% mortalitas larva 100% terjadi pada hari ke-12. Perkembangan mortalitas larva pada pelarut akuades ditunjukkan pada Gambar 3.

Berdasarkan hasil pengujian pada penelitian ini dapat diketahui bahwa kulit kayu mindi mengandung zat ekstraktif yang bersifat racun. Hal ini dibuktikan dari mortalitas yang terjadi pada larva *S. litura*. Hal lain yang mendukung adalah setelah melakukan uji fitokimia, menunjukkan adanya kandungan zat alkaloid (+) yang bersifat racun terhadap serangga dan organisme lainnya.

Pada pengujian dengan zat ekstraktif yang terlarut pada pelarut akuades sampai hari ke-12 larva berubah menjadi pupa tapi kondisinya cacat. Hal ini menunjukkan ekstrak kulit kayu mindi dengan konsentrasi yang lebih tinggi akan menyebabkan perkembangan larva abnormal. Menurut Fagoone dan Lauge (1981) senyawa *quersetin* pada tanaman mindi menyebabkan tidak sempurnanya proses eksidisis atau pergantian instar sehingga larva melepas kutikulya lama, terutama pada bagian kepala.

#### *Uji statistika mortalitas larva pada pengujian dengan ekstrak kulit kayu mindi*

Hasil uji statistika diperoleh bahwa menggunakan 3 jenis pelarut yang berbeda dan konsentrasi yang berbeda menunjukkan bahwa dari hari ke-2 aplikasi sampai hari ke-12 yang berbeda nyata hanya pada konsentrasi, sedangkan pada parameter jenis pelarut dan interaksinya tidak berbeda nyata. Hasil uji lanjut hari ke-2, ke-4, ke-8, ke-10 dan ke-12 konsentrasi 0% berbeda dengan 1-4%. Uji lanjut hari ke-6 menunjukkan konsentrasi 4% berbeda dengan semuanya, konsentrasi 1-3% berbeda dengan 0%. Hal ini semakin memperkuat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit kayu mindi, maka semakin beracun terhadap larva ulat *S. litura*.

Kematian larva yang diberi perlakuan ekstrak kulit kayu mindi baik dengan pelarut aseton, metanol maupun akuades menunjukkan gejala aktivitas makan yang berkurang, gerakan larva yang menjadi lambat, berubahnya warna larva menjadi coklat, coklat tua yang lama kelamaan menjadi berwarna hitam menunjukkan gejala yang sama

dengan hasil pengujian dengan insektisida kimiawi. Menurut Armaya (2005), pengujian insektisida karbamat (Lannate 25 WP) pada hama ulat *S. litura* mengakibatkan kematian larva dengan kondisi kering menghitam. Hasil penelitian ini menunjukkan kulit kayu mindi memiliki potensi untuk menggantikan insektisida kimiawi. Pengujian daun mindi dengan ekstrak etanol dengan perlakuan pemberian larutan daun mindi 200gr/liter air berpengaruh terhadap mortalitas *S. litura* (Sinaga 2009). Pengujian kulit kayu mindi sebagai insektisida pada rayap *Coptotermes curvignathus* Holmgren juga menunjukkan mortalitas yang tinggi terutama pada fraksi etil eter (Falah et al. 2004). Berbagai hasil penelitian ini mendukung bahwa mindi sangat berpotensi sebagai pestisida nabati.

## KESIMPULAN

Kandungan kimia ekstrak kulit kayu mindi adalah senyawa alkaloid dan sedikit saponin pada pelarut aseton. Ekstrak kulit kayu mindi pada perlakuan pelarut berpengaruh nyata terhadap mortalitas *Spodoptera litura*, namun pada perlakuan konsentrasi maupun interaksi jenis pelarut dan konsentrasi berpengaruh tidak nyata terhadap mortalitas *S. litura*.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada DP2M Dikti yang telah memberikan hibah penelitian demi terlaksananya penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Armaya D. 2005. Uji Efektivitas Beberapa Jenis Insektisida untuk Mengendalikan Hama Ulat *Spodoptera litura* F. Pada Tanaman Tembakau Deli (*Nicotiana tabacco* L.). Fakultas Pertanian USU, Medan.
- Browning BL. 1963. Method of Wood Chemistry. John Wiley and Son, New York.
- Erwin MS. 2000. Hama dan Penyakit Tembakau Deli. Balai Penelitian Tembakau Deli, PTPN II Persero. Medan.
- Falah S, Syafii W, Katayama T. 2004. Antitermic Activities of Extracts From The Bark Of Some Tropical Hardwoods. Proceedings on the Fifth International Wood Science Symposium. Kyoto, Japan, September 17-19, 2004.
- Fagoone I, Lauge D. 1981. Effects of azadirachtin and of a neem on food utilization by *Crocidolomia binotalis*. Proc. 2nd Int. Neem Conf. Ranschoolzhausen
- Purba H. 1996. Efikasi Ekstrak Nimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dan Mindi (*Meylia azedarach* Linn) terhadap *Setothosa asigna* van Eeka pada Kelapa Sawit di Laboratorium. Fakultas Pertanian USU. Medan.
- Sinaga R. 2009. Uji Efektivitas Pestisida Nabati terhadap Hama *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacco*). Fakultas Pertanian USU, Medan.
- Sjöström E. 1995. Kimia Kayu: Dasar-dasar dan Penggunaan. (Edisi 2, Terjemahan). Gajah Mada University, Yogyakarta.
- Syafii W. 2000. Sifat Anti-Rayap Zat Ekstraktif Beberapa jenis Kayu Daun Lebar Tropis. Buletin Kehutanan, Nomor 42. Fakultas Kehutanan, UGM, Yogyakarta.



## PEDOMAN UNTUK PENULIS

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

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

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

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

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

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

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

### Jurnal:

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

### Buku:

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

### Bab dalam buku:

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

### Abstrak:

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

### Prosiding:

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

### Skripsi, Tesis, Disertasi:

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

### Informasi dari Internet:

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

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

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

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

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

- Pengaruh metode ekstraksi oleoresin temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan pengeringan solar dryer terhadap kadar kurkuminoid, total fenol dan aktivitas antioksidan 1-9
- THERESIA AGNIEST PRICILLA VITANTI, KAWIJI, EDHI NURHARTADI
- Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro* 10-18
- SISKA DYAH KUSUMA PUTRI, ARI SUSILOWATI, RATNA SETYANINGSIH
- Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap *Bacillus cereus* dan *Pseudomonas aeruginosa* 19-24
- RUTH NOVA MARDIANA, NESTRI HANDAYANI
- Pengaruh ekstrak jahe terhadap perbaikan kerusakan mukosa ileum tikus yang terpapar 5-fluorourasil 25-32
- KHUSNUL DWI TYASARI, KIYATNO, BALGIS
- Pengendalian hama ulat grayak (*Spodoptera litura*) pada tanaman tembakau deli (*Nicotiana tabaccum*) dengan pestisida nabati dari kulit kayu mindi (*Melia azedarach*) 33-37
- RIDWANTI BATUBARA, AFIFUDDIN DALIMUNTE

