

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 11
NOMOR 2
AGUSTUS 2013
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126

Tel. & Fax. +62-271-663375

E-mail: unsjournals@yahoo.com

Online: <http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm>

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso

Ratna Setyaningsih

Solichatun

Suratman

Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang

Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung

Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta

Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor

Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

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

Pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan pemberian ekstrak etil asetat rimpang temu ireng (*Curcuma aeruginosa*)

Infection prevention of *Aeromonas hydrophila* bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by providing ethyl acetate extract of temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) rhizome

DINA SELVIA SARI, ARTINI PANGASTUTI, ELISA HERAWATI

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

Manuskrip diterima: 13 Februari 2013. Revisi disetujui: 6 Juni 2013.

Abstract. Sari DS, Pangastuti A, Elisa Herawati E. 2013. Infection prevention of *Aeromonas hydrophila* bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by providing ethyl acetate extract of temu ireng (*Curcuma aeruginosa*) rhizome. *Biofarmasi* 11: 31-35. In tilapia aquaculture, some diseases can disturb the growth and production of fish. *Aeromonas hydrophila* is one of the pathogenic bacteria that can cause a disease in tilapia. *Aeromonas hydrophila* uses a quorum sensing system and the virulence of organisms as a controller to other organisms. The one of infection prevention effort of *A. hydrophila* that efficient enough is to use a compound of natural ingredients, i.e. *Curcuma aeruginosa* rhizome. The purpose of this study was to determine the optimal concentration of ethyl acetate extract of *Curcuma aeruginosa* rhizome that needed to prevent the infection of *A. hydrophila* bacterial in tilapia. The method used in this study was an immersion method. Tilapia was soaked in water mixed with *A. hydrophila* and the ethyl acetate extract of *C. aeruginosa* rhizome with the concentrations of 0 mL/L, 10 mL/L, 20 mL/L, 30 mL/L, 40 mL/L, 50 mL/L and control for 90 minutes. At the end of the study, it was observed for the fish behavior after immersion, the reaction of fish, the type and morphology of fish, and the number of bacteria in the water conservancy. The results showed that the *A. hydrophila* infection could be prevented by using the ethyl acetate extract of the *C. aeruginosa* rhizome with the concentration of 40 mL/L. During immersion, tilapia was get an experience stress, often to the surface of water, and then quietly at the bottom of aquarium. The response to eat of tilapia decreased by 50% after soaking, but after 2-3 days of immersion time, the fish feeding was normally again.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Curcuma aeruginosa*, fish disease, *Oreochromis niloticus*

PENDAHULUAN

Penyakit pada ikan merupakan salah satu masalah serius yang dihadapi oleh para pembudi daya ikan karena berpotensi menimbulkan kerugian yang sangat besar. Kerugian yang terjadi dapat berupa peningkatan kematian ikan. Selain itu, serangan penyakit juga dapat menyebabkan penurunan kualitas ikan, sehingga secara ekonomis berakibat pada penurunan harga jual ikan (Mariyono dan Agus 2005). Munculnya penyakit pada ikan merupakan hasil interaksi antara tiga komponen dalam ekosistem perairan, yaitu inang (ikan) yang lemah, keberadaan organisme patogen, serta kualitas lingkungan yang buruk (Samsundari 2006). Penyakit pada ikan disebabkan antara lain oleh parasit, bakteri, ataupun jamur (Syawal dan Hidayah 2008).

Aeromonas hydrophila merupakan salah satu jenis bakteri patogen yang dapat menimbulkan penyakit pada ikan (Giyarti 2000). Bakteri ini menyerang berbagai spesies ikan air tawar, salah satunya adalah ikan nila (*Oreochromis niloticus*). Bakteri *A. hydrophila* menggunakan sistem *quorum sensing* sebagai pengontrol virulensinya terhadap organisme lain, sehingga sistem *quorum sensing* dapat dijadikan sebagai target untuk agen

kemoterapeutik (Rasch et al. 2004). Menurut Kievit dan Iglewski (2000), *A. hydrophila* yang bersifat virulen dapat dijadikan nonvirulen dengan menghambat sistem *quorum sensing*-nya. Hal ini dapat dijadikan sebagai upaya pencegahan infeksi kronis yang merusak tanpa menggunakan agen yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, seperti antibiotik dan bahan kimia. Penggunaan antibiotik maupun bahan kimia secara terus-menerus dapat mengakibatkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik, selain itu juga dapat merusak lingkungan perairan serta meracuni ikan, sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif (Irawan et al. 2003).

Usaha penanganan penyakit akibat infeksi bakteri *A. hydrophila* yang cukup efisien antara lain dengan menggunakan bahan alami yang ada di lingkungan. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi bakteri pada ikan adalah temu ireng (*Curcuma aeruginosa*). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dapat menghambat sistem *quorum sensing* bakteri *A. hydrophila* karena mengandung senyawa antibakteri (Triyana 2010). Rimpang temu ireng mengandung minyak atsiri, saponin, flavonoid, polifenol, dan kurkumin yang berpotensi sebagai penghambat sistem *quorum sensing*

pada bakteri (Philip et al. 2009). Oleh karena itu, penelitian mengenai tanaman obat sebagai penghambat sistem *quorum sensing* bakteri perlu dilakukan sebagai alternatif untuk mengatasi infeksi tanpa menggunakan agen yang menyebabkan resistensi bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi optimal ekstrak etil asetat rimpang temu ireng untuk mengatasi infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan November 2010 sampai Januari 2011 di Sub-Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah rimpang temu ireng yang diperoleh dari Balai Pembibitan Tanaman Obat (BPTO) Tawangmangu dan pelarut etil asetat. Bahan yang digunakan pada perlakuan perendaman yaitu bibit ikan nila dengan panjang 5-7 cm yang diperoleh dari Balai Pembibitan Ikan Air Tawar Janti, kultur murni bakteri *A. hydrophila* yang diisolasi dari ikan nila sakit yang diperoleh dari Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan, Universitas Gadjah mada.

Sementara itu, alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah pisau (*cutter*), neraca analitik, stoples kaca, *rotary evaporator*, gelas beker, Erlenmeyer, gelas ukur, kertas saring, pengaduk, *waterbath*, dan corong kaca. Alat untuk pemeliharaan kultur adalah *Bunsen burner*, *laminair airflow*, gelas ukur, *freezer*, *hotplate*, tabung reaksi, jarum ose, dan gelas beker. Pada perlakuan perendaman, alat yang digunakan meliputi akuarium ukuran 40 cm x 40 cm x 40 cm, *aerator*, selang, termometer, pH-meter, dan DO-meter. Alat untuk penghitungan jumlah koloni bakteri yaitu *scalpel*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, *colony counter*, dan jarum ose. Adapun alat yang digunakan untuk sterilisasi adalah *autoclave*.

Tahapan penelitian

Pembuatan ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Rimpang temu ireng dicuci sampai bersih, kemudian diiris tipis (3-5 mm). Sebanyak 2 kg rimpang temu ireng yang telah diiris, direndam dalam pelarut etil asetat sebanyak 4 L dan dibiarkan selama 72 jam. Maserat disaring dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etil asetat rimpang temu ireng.

Persiapan akuarium dan aklimatisasi

Akuarium dibersihkan terlebih dahulu dan dikeringkan, kemudian diisi air setinggi 30 cm dari dasar akuarium (sebanyak 35 L). Pada setiap akuarium dimasukkan sebanyak 15 ekor ikan nila, kemudian dilakukan aklimatisasi selama 4 hari.

Perlakuan perendaman

Dalam penelitian ini digunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri atas 7 perlakuan (Tabel 1).

Tabel 1. Jenis perlakuan

Kode	Perlakuan
A	Kontrol, perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i>
B	Perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi 10 mg/L
C	Perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi 20 mg/L
D	Perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi 30 mg/L
E	Perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi 40 mg/L
F	Perendaman ikan nila sehat dengan bakteri <i>A. hydrophila</i> dan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi 50 mg/L
G	Kontrol, ikan nila sehat tanpa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dan bakteri <i>A. hydrophila</i>

Pada masing-masing perlakuan, jumlah ikan nila sehat yang dimasukkan berjumlah 15 ekor dan bakteri *A. hydrophila* yang dimasukkan sebanyak 106 koloni/L, kemudian dilakukan perendaman selama 90 menit. Setelah perendaman, ikan nila dipindahkan ke dalam akuarium yang berisi air bersih untuk pemeliharaan. Kemudian dilakukan pengamatan tingkah laku ikan nila, seperti cara berenang dan kecepatan berenang, serta parameter kualitas air dalam akuarium pemeliharaan seperti suhu air, nilai pH, dan kadar oksigen terlarut serta jumlah koloni bakteri dalam akuarium pemeliharaan selama 4 minggu.

Pengamatan dan perhitungan jumlah koloni bakteri

Pengamatan dimulai dari hari pertama saat aklimatisasi sampai akhir penelitian. Pengamatan yang dilakukan meliputi tingkah laku ikan, reaksi ikan setelah perendaman, morfologi luar tubuh dan insang ikan, serta perhitungan jumlah koloni bakteri. Pengamatan terhadap jumlah koloni bakteri yang terdapat dalam air pemeliharaan dilakukan setelah perendaman selesai yaitu pada minggu ke-4. Pengamatan terhadap jumlah koloni bakteri dilakukan dengan menggunakan media *Luria-Bertani agar* (LA). Sampel yang digunakan untuk perhitungan jumlah bakteri adalah air yang digunakan untuk memelihara ikan nila. Sampel dibuat dalam pengenceran berseri kemudian dimasukkan ke dalam media LA dan diratakan. Setelah sampel diratakan, sampel diinkubasi selama semalam pada suhu 30°C, selanjutnya dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri dengan menggunakan *colony counter*.

Analisis data

Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yang meliputi tingkah laku, reaksi ikan setelah perendaman, dan morfologi ikan. Data kuantitatif berupa

jumlah koloni bakteri *A. hydrophila* dianalisis dengan menggunakan analisis Anava untuk mengetahui pengaruh pada tiap perlakuan, jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf uji 5% untuk mengetahui beda nyata antarperlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila dengan menggunakan senyawa bahan alam yaitu berupa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng. Pencegahan infeksi bakteri tersebut dapat dilakukan dengan menghambat sistem *quorum sensing* bakteri. *Quorum sensing* merupakan suatu proses komunikasi antar sel bakteri dengan menggunakan *autoinducer* sebagai bahasanya. Banyak jenis bakteri menggunakan sistem *quorum sensing* untuk mengontrol virulensinya terhadap organisme lain. Bakteri patogen dapat menyebabkan infeksi jika populasinya telah mencapai *quorum* tertentu. Penghambatan sistem *quorum sensing* bertujuan untuk merusak sistem komunikasi bakteri, sehingga massa bakteri tidak berkumpul, namun bakteri akan tetap hidup. Penghambatan sistem *quorum sensing* dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa dari bahan alam.

Pengaruh ekstrak etil asetat rimpang temu ireng terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang temu ireng segar. Rimpang temu ireng yang digunakan adalah rimpang berumur 10-12 bulan dan berwarna oranye kekuningan. Rimpang yang dipanen pada umur tersebut biasanya menghasilkan kadar senyawa aktif yang tinggi dan berkhasiat (Sembiring 2007).

Konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 30 mg/L, 40 mg/L, dan 50 mg/L. Konsentrasi ini diperoleh setelah dilakukan uji pendahuluan (LC_{50}) untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat. Melalui uji pendahuluan, diketahui bahwa konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng di atas 50 mg/L dapat menyebabkan kematian pada ikan lebih dari 50% jumlah total ikan, sehingga selanjutnya digunakan konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng di bawah 50 mg/L.

Bakteri *A. hydrophila* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan nila sakit, sehingga bakteri yang digunakan merupakan strain virulen. Salah satu faktor virulensi pada bakteri *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease (Khajanchi et al. 2009). Faktor virulensi tersebut berkaitan dengan kepadatan sel yang tinggi pada fase eksponensial/fase stasioner.

Bakteri *A. hydrophila* dapat menginfeksi ikan nila sampai menyebabkan kematian massal pada ikan nila yang terinfeksi. Penggunaan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng ditujukan untuk mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila. Pencegahan infeksi bakteri *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan menghambat sistem *quorum sensing* bakteri dengan memanfaatkan senyawa

bahan alam, salah satunya berupa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng.

Penggunaan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng didasarkan pada hasil penelitian terdahulu yang melaporkan bahwa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dapat menghambat sistem *quorum sensing* bakteri *Cromobacterium violaceum*. Hal ini ditunjukkan oleh hilangnya kemampuan bakteri *C. violaceum* untuk memproduksi pigmen violacein. Produksi pigmen *violacein* pada *C. violaceum* diatur melalui mekanisme *quorum sensing* dengan molekul sinyal (*autoinducer*) (Triyana 2010).

Bakteri *A. hydrophila* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kesamaan dengan bakteri *C. violaceum* yang digunakan pada penelitian sebelumnya. Kedua bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram negatif yang menggunakan molekul sinyal sebagai bahasanya. Perbedaan antara kedua bakteri tersebut terdapat pada molekul sinyal yang digunakan, dimana bakteri *A. hydrophila* menggunakan molekul sinyal berupa molekul C4-HSL, sedangkan bakteri *C. violaceum* menggunakan molekul sinyal berupa C6-HSL (Gera dan Srivastava 2006). Berdasarkan persamaan dan perbedaan tersebut, ekstrak etil asetat rimpang temu ireng digunakan untuk menghambat sistem *quorum sensing* bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Philip et al. (2009), dilaporkan bahwa ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*. Rimpang temu ireng mengandung minyak atsiri, saponin, flavonoid, dan polifenol. Senyawa flavonoid pada rimpang temu ireng memiliki aktivitas antioksidan. Antioksidan dapat mencegah teroksidasinya sel tubuh oleh oksigen aktif, seperti superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil serta radikal bebas lainnya, sehingga tubuh terhindar dari penyakit-penyakit degeneratif (Saad 2006).

Perlakuan perendaman ikan nila dalam air yang sudah dicampur dengan larutan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng pada berbagai konsentrasi dan bakteri *A. hydrophila* dilakukan selama 4 minggu. Setelah proses perendaman tersebut, dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak tidak selalu dapat mencegah infeksi bakteri. Jika konsentrasi ekstrak terlalu tinggi dapat berpengaruh negatif, tidak hanya terhadap bakteri saja tetapi juga pada ikan (Herawati 2003).

Berdasarkan data yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng 40 mg/L merupakan konsentrasi paling optimal untuk mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila. Hal ini terjadi karena pada konsentrasi tersebut, tingkat kematian ikan nila sangat rendah, yaitu 5 ekor dengan jumlah koloni bakteri dalam air sebanyak $0,8 \times 10^8$ CFU/ml. Adapun pada konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng di bawah 40 mg/L dapat menyebabkan kematian dan pertumbuhan koloni bakteri dalam jumlah yang lebih tinggi. Demikian juga pada konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng 50 mg/L, ikan nila mati sebanyak 7 ekor dengan jumlah koloni bakteri $0,6 \times 10^8$ CFU/ml. Data jumlah ikan nila yang mati disajikan pada Gambar 1.

Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin kecil jumlah koloni bakteri pada air pemeliharaan ikan. Namun, terlalu tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan dapat meracuni ikan dan menyebabkan bakteri menjadi resisten, sehingga perlu dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang tepat untuk digunakan.

Berdasarkan hasil analisis data statistik untuk data jumlah bakteri total dalam air pemeliharaan, dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang nyata antara masing-masing perlakuan dengan kontrol dan ikan nila sehat, sehingga dapat disimpulkan bahwa jumlah bakteri dalam air pemeliharaan tidak berpengaruh pada kematian ikan nila. Hal ini dikarenakan tidak semua bakteri yang berada di dalam air pemeliharaan merupakan bakteri patogen. Adapun berdasarkan hasil analisis statistik untuk angka kematian ikan, dapat diketahui bahwa tidak ada perbedaan nyata antara masing-masing perlakuan dengan kontrol dan berbeda nyata antara kelompok perlakuan dengan ikan nila sehat. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng yang diberikan pada masing-masing perlakuan.

Pengamatan tingkah laku dan respons ikan nila

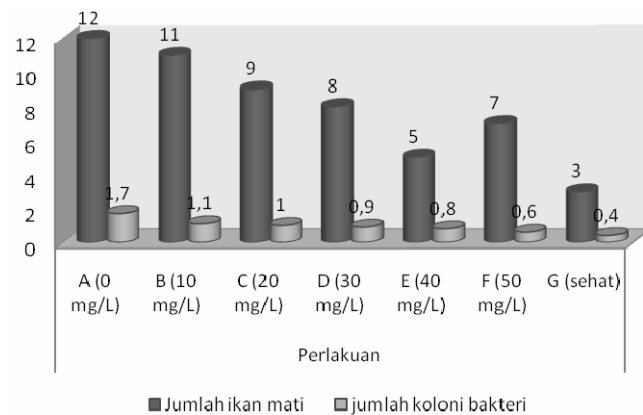
Pengamatan terhadap tingkah laku dan respons ikan nila dilakukan sebelum perlakuan, setelah perlakuan, maupun pada saat pemeliharaan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ikan nila yang diberi perlakuan perendaman selama 90 menit dalam akuarium yang sudah dicampur dengan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng pada berbagai konsentrasi dan bakteri *A. hydrophila* dapat mengalami stres selama beberapa saat, seperti cara berenang menjadi tidak teratur dan frekuensi pernapasan menjadi sangat cepat. Pada awal perendaman, ikan nila berenang di tengah, kemudian ikan nila sering berenang ke permukaan untuk mencari oksigen (udara), selain itu ikan juga lebih banyak diam di dasar permukaan akuarium. Menurut pendapat Febriani (2008), hal ini dapat dijelaskan bahwa ikan yang diberi perlakuan perendaman dengan menggunakan ekstrak tanaman akan mengalami stres dengan cara berenang secara tidak teratur, sering muncul ke permukaan, dan selanjutnya diam di dasar akuarium.

Setelah perlakuan perendaman, ikan nila kemudian dipindah ke dalam akuarium pemeliharaan. Pada hari pertama setelah perendaman, ikan nila dalam akuarium pemeliharaan lebih banyak diam dan kecepatan berenangnya menurun drastis, sehingga ikan lebih sering diam di dasar akuarium. Namun, setelah 3 atau 4 hari dari waktu perendaman, ikan nila mulai aktif bergerak kembali, begitu juga dengan kecepatan ikan berenang menjadi semakin cepat.

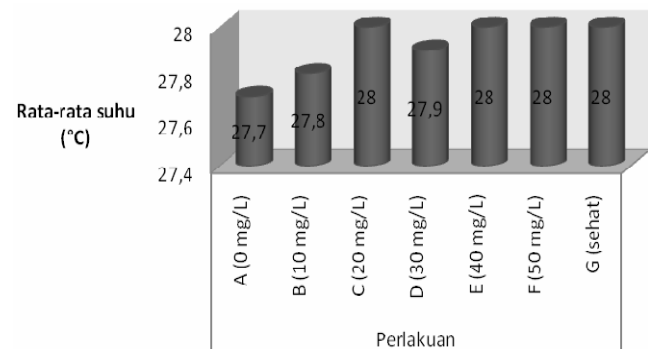
Respons lain yang diamati adalah nafsu makan ikan nila setelah perlakuan. Setelah perlakuan perendaman selama 90 menit dengan menggunakan ekstrak etil asetat rimpang temu ireng, nafsu makan ikan mengalami penurunan secara drastis hingga 50%, dimana pada awalnya ikan lahap ketika diberi pakan kemudian menjadi tidak nafsu makan sama sekali. Penurunan nafsu makan tersebut dapat menurunkan kondisi ikan dan menyebabkan kematian. Namun setelah 2-3 hari dari waktu perendaman dengan ekstrak etil asetat

rimpang temu ireng, nafsu makan ikan mulai pulih dan ikan makan secara normal kembali.

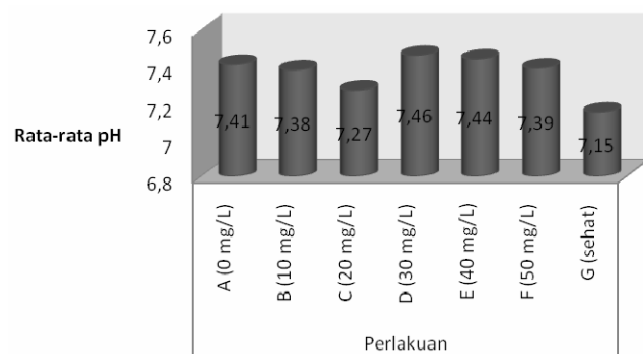
Respons makan ikan yang kembali normal (lahap) tersebut menunjukkan terjadinya tahapan penyembuhan. Selain tingkah laku dan respons makan ikan, juga dilakukan pengamatan terhadap warna insang. Penampakan luar insang ikan nila yang sehat berwarna merah segar, sedangkan ikan nila yang sakit cenderung terlihat pucat. Hal ini menunjukkan bahwa ikan nila sedang sakit atau terserang penyakit, terutama parasit.



Gambar 1. Diagram jumlah kematian ikan nila selama 4 minggu dan jumlah koloni bakteri *A. hydrophila* pada tempat pemeliharaan ikan nila



Gambar 2. Diagram rata-rata suhu pada akuarium pemeliharaan ikan nila



Gambar 3. Diagram rata-rata pH pada akuarium pemeliharaan ikan nila

Parameter kualitas air

Ikan nila dikenal sebagai ikan yang sangat tahan terhadap perubahan lingkungan. Ikan nila dapat hidup di lingkungan air tawar, air asin, ataupun air payau. Kadar garam air yang disukai antara 0-5 ppt (Suyanto 1994). Ikan nila yang masih kecil lebih rentan terhadap perubahan lingkungan dibandingkan dengan ikan yang sudah dewasa. Ikan yang masih kecil (benih ikan) lebih rentan terhadap penyakit akibat mikroorganisme seperti bakteri, jamur, ataupun parasit, sehingga benih ikan lebih sering mengalami kematian massal akibat penyakit dibandingkan dengan ikan yang sudah dewasa. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kualitas air yang meliputi suhu, DO, dan pH. Hasil pengukuran kualitas air disajikan pada Gambar 2.

Rata-rata suhu pada akuarium pemeliharaan berkisar antara 27,5-28°C, rata-rata pH berkisar antara 7,15-7,5, sedangkan rata-rata DO berkisar antara 6-7 ppm (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa kualitas air pada akuarium pemeliharaan dalam kondisi baik dan kisarannya berada pada kondisi yang layak untuk kehidupan dan pertumbuhan ikan nila. Menurut Dana dan Angka (1990), nilai pH air tempat hidup ikan nila berkisar antara 6-8,5 dengan suhu optimal antara 25-30°C, dan menurut Supriyanto et al. (2007), kadar oksigen terlarut (DO) optimal lebih dari 5 ppm. Kondisi lingkungan yang baik dan layak pada tempat hidup ikan nila akan sangat berpengaruh terhadap tingkat kelangsungan hidup ikan nila.

Berdasarkan hasil pengukuran parameter kualitas air pemeliharaan pada penelitian ini, kondisi lingkungan pemeliharaan dapat dikategorikan baik dan layak, sehingga ikan nila dapat hidup dengan baik. Namun pada pemeliharaan ikan nila masih terjadi kematian, hal ini dapat disebabkan oleh adanya serangan bakteri *A. hydrophila* yang menginfeksi ikan nila dan menyebabkan ikan nila mati. Demikian juga dengan adanya ekstrak etil asetat rimpang temu ireng dengan konsentrasi yang terlalu tinggi (50 mg/L) juga memberikan pengaruh buruk pada lingkungan dan ikan nila.

KESIMPULAN

Konsentrasi ekstrak etil asetat rimpang temu ireng sebesar 40 mg/L merupakan konsentrasi optimal yang dapat digunakan untuk mencegah infeksi bakteri *A. hydrophila* pada ikan nila.

DAFTAR PUSTAKA

- Dana D, Angka SL. 1990. Masalah penyakit parasit dan bakteri pada ikan air tawar serta cara penanggulangannya. Prosiding Seminar Nasional II Penyakit Ikan dan Udang. Balai Penelitian Perikanan Air Tawar, Bogor.
- Febriani. 2008. Penggunaan khamir laut sebagai biokatalisator dalam pembuatan silase ikan peperek (*Leiognathus splendens*) dan silase keong mas (*Pomacea* sp.). Prosiding Bidang Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan. Seminar Nasional Perikanan dan Kelautan dan Konferensi Nasional. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, 8 November 2008.
- Gera C, Srivastava S. 2006. Quorum-sensing: The phenomenon of microbial communication. *Curr Sci* 90(5): 666-677.
- Giyarti D. 2000. Efektivitas Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.), Sambaloto (*Andrographis paniculata* [Burm. f.] Nees) dan Sirih (*Piper betle* L.) terhadap Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Patin (*Pangasius hypophthalmus*). [Skripsi]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Herawati RI. 2003. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Terhadap Interleukin-3 pada Tikus. [Skripsi]. Universitas Airlangga, Surabaya.
- Irawan GDE, Winarno K, Susilowati A. 2003. Pengaruh ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap penurunan mortalitas lele dumbo (*Clarias gariepinus*) akibat infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Enviro* 3(1): 28-35.
- Khajanchi BK, Jian S, Elena VK et al. 2009. N-acylhomoserine lactones involved in quorum sensing control the type VI secretion system, biofilm formation, protease production, and in vivo virulence in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology* 155: 3518-3531.
- Kievit TR, Iglewski BH. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infect Immun* 68(9): 4839-4849.
- Mariyono, Agus S. 2005. Teknik pencegahan dan pengobatan penyakit bercak merah pada ikan air tawar yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian* 7(1).
- Philip K, Malek SNA, Sani W et al. 2009. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Malaysia. *Am J Appl Sci* 6(8): 1613-1617.
- Rasch M, Buch C, Austin B et al. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortality caused by vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss wal-baum*). *Syst Appl Microbiol* 27(3): 350-359.
- Samsundari S. 2006. Pengujian ekstrak temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang ikan mas (*Ciprinus carpio*). *Gamma* 2(1): 71-83.
- Sembiring B. 2007. Teknologi penyiapan simplisia terstandar tanaman obat. *Warta Puslitbangun* Vol. 13, No. 2.
- Supriyanto C, Samin, Zainul K. 2007. Analisis cemaran logam berat Pb, Cu, dan Cd pada ikan air tawar dengan metode spektrometri nyala serapan atom. Prosiding Seminar Nasional. Pusat Teknologi Nuklir, Yogyakarta.
- Suyanto SR. 1994. Nila. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Syawal H, Hidayah S. 2008. Pemberian ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* L.) untuk meningkatkan kekebalan ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang dipelihara dalam keramba. *Biodiversitas* 9(1): 44-47.
- Triyana SF. 2010. Skrining Ekstrak Etil Asetat dan Etanol Sepuluh Tanaman Obat sebagai Penghambat *Quorum Sensing Chromobacterium violaceum*. [Skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Uji aktivitas antifungi ekstrak etanol daun cabai jawa (*Piper retrofractum*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*

Antifungal activity test of *Piper retrofractum* leaf ethanol extract on *Candida albicans* growth

EVI ROSYIDA SARI, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI

Jurusan D3 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Surakarta

Manuskrip diterima: 9 April 2013. Revisi disetujui: 16 Agustus 2013.

Abstract. Sari ER, Nugraheni ER. 2013. Antifungal activity test of *Piper retrofractum* leaf ethanol extract on *Candida albicans* growth. *Biofarmasi* 13: 36-42. *Candida albicans* is a pathogenic microbe infecting vagina, thrush (fungal infection on mouth cavity) and paronichia (the presence of pus on nail pad). The less effective treatment system, and the incidence of toxicity on several antifungal lead to the selection of alternative medication (treatment) from the secondary metabolite compounds of flavonoid, alkaloid and saponin existing in java chili (*Piper retrofractum* Vahl) leaf. This research aimed to examine the antifungal activity of javanese chili (*Piper retrofractum* Vahl) leaf ethanol extract on *Candida albicans*, as well as to determine the antifungal properties of antifungal activity of javanese chili leaf ethanol extract. The extract was obtained by maceration using 70% ethanol. The ethanol extract obtained was 57.895 gram with the specimen of 7.61% (b/w). The result of phytochemical screening showed the presence of flavonoid, saponin and alkaloid compounds, all of those were antifungal. The examination of antifungal activity of javanese chili leaf ethanol extract was performed by using a diffusion method and the concentration series of 10-100% by adding DMSO as a diluent and it was performed with 3 times of repetition. The result of DDH was analyzed using CRD (Completely Random Design) with one-way ANOVA at a confidence interval of 95% and LSD to find out the significant difference between the concentration series. The result of antifungal activity examination showed that the ethanol extract at 40% concentration provided more effective DDH on *C. albicans* of $5.54 \pm 0,64$ mm. The result of examination was processed by using one-way ANOVA and LSD indicating a significant difference ($p < 0.05$) between the concentration series. At 40% concentration, the antifungal examination was performed on *C. albicans*. The result showed that the javanese chili leaf ethanol extract was a fungistatic against the tested fungus.

Keywords: Antifungal, *Candida albicans*, javanese chili (*Piper retrofractum* Vahl) leaf, DDH

PENDAHULUAN

Candida albicans merupakan spesies jamur yang paling sering menyebabkan infeksi jamur pada manusia. Apabila ditinjau dari insidennya, infeksi *C. albicans* meningkat 87% dalam kurun waktu 9 tahun, yaitu dari tahun 1980 sampai 1989. Infeksi *C. albicans* pada tubuh manusia dapat meningkat apabila sistem pertahanan tubuh menurun, permukaan kulit yang lembap akibat terpapar oleh keringat, air, urin, atau saliva, serta konsumsi obat antibiotik oral secara rutin. Berdasarkan laporan Magdalena (2009), ditemukan *C. albicans* dalam jumlah besar pada saluran pencernaan setelah pemberian antibiotika oral, misalnya tetrasiklin. *Candida albicans* dapat menyebar ke organ lain apabila imunitas seluler menurun.

Saat ini, obat-obatan antifungi yang tersedia di pasaran semakin banyak. Penggunaan beberapa obat antifungi yang kurang efektif, serta terjadinya toksisitas terhadap beberapa produk antifungi yang tersedia mendorong penelitian untuk mencari senyawa yang bersifat antifungi dari tanaman. Hal ini dikarenakan penggunaan obat yang berasal dari bahan alam diyakini dapat menimbulkan efek samping yang minimal dan efek terapeutik maksimal. Dari penelitian sebelumnya, diperoleh hasil bahwa serasah *Piper betle*

Linn. memiliki aktivitas antibiotik (Nurkanto 2010). Dari penelitian tersebut, disebutkan juga bahwa tanaman dari famili Piperaceae merupakan tanaman yang dikenal luas telah digunakan sebagai bahan obat dan tersebar luas di hutan hujan tropis Indonesia. Tanaman obat yang dipilih sebagai alternatif antifungi untuk mengatasi infeksi *Candida albicans* diantaranya cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl) dengan bagian tanaman yang dimanfaatkan berupa daun. Daun cabai jawa diduga memiliki aktivitas antifungi terhadap *C. albicans*, sehingga mendorong untuk dilakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antifungi dari ekstrak tanaman tersebut yang meliputi daya hambat dan jenis hambatan. Selain itu, diharapkan juga dapat dilihat lebih lanjut kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun cabai jawa (Amalia et al. 2011).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antifungi dari ekstrak etanol daun cabai jawa (*P. retrofractum*) terhadap pertumbuhan jamur *C. albicans*, menentukan sifat antifungi ekstrak etanol daun cabai jawa terhadap pertumbuhan jamur *C. albicans*, dan mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol daun cabai jawa yang berperan sebagai antifungi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Isolasi dan pemurnian senyawa pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta dan Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Determinasi jenis tumbuhan dilakukan di Bagian Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dan Laboratorium Morfologi Sistematis Tumbuhan, Universitas Setia Budi, Surakarta. Analisis spektroskopi UV dilakukan di Laboratorium Kimia Dasar, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Analisis spektroskopi inframerah dilakukan di Laboratorium Kimia Organik FMIPA UGM, Yogyakarta, sedangkan analisis ¹³C NMR APT, ¹H NMR, dan NMR dua dimensi dilakukan di Pusat Penelitian Kimia, LIPI Serpong, Tangerang Selatan. Penelitian ini dilakukan selama 11 bulan dari bulan Mei 2009 sampai Maret 2010.

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, Erlenmeyer 50 mL dan 250 mL, gelas ukur 10 mL dan 50 mL, gelas beker 5 mL, cawan petri, pipet volum 2 mL, oven (*Celculture CO₂ Incubator*), neraca timbang, *incubator (Incubator Hotcold-M)*, spatula logam, pelubang gabus (perforator), pipet mikro 100 µl, autoklaf, *shaker*, batang *drigalsky*, *Laminar Air Flow (LAF) (SWCJ JB Vertikal)*, jarum ose, tip kuning 200 µl, *rotary evaporator (RE 200B)*, *waterbath (Haake DL 30)*, lemari pendingin, dan jangka sorong.

Sementara itu, bahan yang digunakan yaitu daun cabai jawa yang diambil dari Desa Pulosari, Kecamatan Papar, Kabupaten Kediri, Jawa Timur. Bahan kimia yang digunakan yaitu pelarut organik etanol 70% (Brataco Chemika), etanol 96% (Pro-Analisis), akuades, dimetil sulfoksida (DMSO), SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) (E. Merck), antibiotik kloramfenikol, antijamur kandistatin, HCl 2 N, serbuk Mg, larutan amil alkohol, gelatin, dan pereaksi Wagner. Jamur yang digunakan adalah *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Metodologi penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dalam laboratorium. Metode yang digunakan untuk mengekstraksi kandungan kimia dalam daun cabai jawa adalah metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstrak etanol daun cabai jawa yang diperoleh digunakan untuk pengujian aktivitas antijamur. Ekstrak etanol daun cabai jawa yang mempunyai aktivitas antijamur selanjutnya dilakukan skrining fitokimia. Ekstrak etanol yang memiliki aktivitas antijamur tertinggi dilakukan uji daya hambat terhadap jamur uji *C. albicans* dengan kontrol antifungi nistatin.

Cara kerja

Determinasi tanaman

Tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl). Determinasi

dilakukan berdasarkan pengamatan ciri morfo-fisiologis tumbuhan.

Pembuatan serbuk simplisia

Daun yang sudah dipanen selanjutnya dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan, dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C selama ±2x24 jam. Selanjutnya, daun yang sudah kering dihancurkan dengan menggunakan blender hingga berbentuk serbuk.

Ekstraksi maserasi serbuk simplisia dengan pelarut etanol

Serbuk simplisia sebanyak 760 gram diekstraksi dengan metode maserasi (perendaman bahan) menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 4,5 liter. Maserasi dilakukan selama 4x24 jam dengan dilakukan pengadukan beberapa kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya secara vakum menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan kecepatan putar 5 rpm sampai berbentuk ekstrak kental. Apabila masih terdapat sisa pelarut maka ekstrak dikeringanginkan dengan menggunakan *waterbath* hingga seluruh pelarut menguap dan diperoleh ekstrak etanol daun cabai jawa.

Pembuatan seri konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa

Ekstrak kental daun cabai jawa dibuat 10 seri konsentrasi (10-100%) dengan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). Setiap seri konsentrasi dibuat dengan menambahkan pelarut DMSO ke dalam beberapa gram ekstrak kental daun cabai jawa, sampai volumenya 2 mL. Jumlah ekstrak yang digunakan dalam penelitian ditunjukkan dalam Tabel 1.

Pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol

Seri konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa yang sudah dibuat kemudian diuji aktivitas antijamurnya untuk menentukan ekstrak yang aktif.

Persiapan alat dan bahan. Pada pengujian aktivitas antijamur diperlukan persiapan awal yaitu mensterilkan alat dan bahan yang akan digunakan, meliputi cawan petri, gelas ukur, tabung reaksi, gelas beker, tip kuning, pipet, Erlenmeyer, batang pengaduk, akuades, dan pelarut DMSO. Semua alat dan bahan tersebut disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

Tabel 1. Jumlah ekstrak yang digunakan dalam pembuatan stok konsentrasi ekstrak daun cabai jawa

Konsentrasi ekstrak (% b/v)	Berat ekstrak etanol daun cabai jawa (g)	DMSO (mL)
10	0,2	ad 2
20	0,4	ad 2
30	0,6	ad 2
40	0,8	ad 2
50	1,0	ad 2
60	1,2	ad 2
70	1,4	ad 2
80	1,6	ad 2
90	1,8	ad 2
100	2,0	ad 2

Pembuatan media Sabouraud Dextrose Agar (SDA). Media agar dibuat dengan melarutkan 65 gram SDA ke dalam 1 L akuades panas. Serbuk SDA dilarutkan sedikit demi sedikit hingga menjadi larutan yang homogen kemudian ditambahkan suspensi antibiotik kloramfenikol sebanyak 0,1 mL tiap 50 mL media. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Media yang sudah disterilisasi dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL untuk dibuat agar miring dan digunakan untuk pembedihan jamur uji.

Penyediaan jamur uji. Jamur uji dibiakkan dalam agar miring yang telah disiapkan kemudian diinkubasi pada suhu 24-27°C.

Penyediaan suspensi jamur uji. Jamur berumur 4 hari (untuk metode penanaman gores silang) diambil sebanyak 1 ose dan disuspensikan ke dalam NaCl 0,9% steril sebanyak 10 mL. Suspensi jamur selanjutnya diinkubasi pada suhu kamar dengan cara di-*shaker* pada kecepatan putaran 120 rpm selama 24 jam. Suspensi jamur yang semula jernih akan berubah menjadi keruh, yang menunjukkan adanya pertumbuhan jamur setelah masa inkubasi, kemudian suspensi jamur diukur densitasnya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm hingga diperoleh adsorbansi 0,5.

Pengujian aktivitas antijamur. Pengujian aktivitas antijamur bertujuan untuk mengetahui aktivitas penghambatan ekstrak daun cabai jawa terhadap *C. albicans* dengan menggunakan metode difusi agar (dengan menggunakan lubang/metode perforasi). Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan menggunakan media SDA yang sudah disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Media SDA didiamkan hingga suhu mencapai kisaran 40-50°C, kemudian media dituang ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL. Media SDA didinginkan pada suhu ruang hingga memadat, lalu dilakukan penanaman jamur uji dengan menggunakan metode *spread plate*.

Penanaman jamur uji dilakukan dengan menggunakan metode *spread plate* melalui tahapan-tahapan sebagai berikut. Suspensi jamur yang sudah dibuat sebelumnya diambil sebanyak 50 µl dengan menggunakan mikropipet kemudian diteteskan pada bagian tengah permukaan agar yang sudah memadat. Tetesan suspensi jamur tersebut kemudian diratakan dengan menggunakan batang *drigalsky* steril dengan sesekali cawan petri diputar agar penyebaran jamur uji lebih merata.

Media padat yang sudah bercampur dengan jamur uji dibuat sumuran dengan menggunakan pelubang gabus (perforator) berdiameter 6 mm. Pada sumuran tersebut dilakukan berbagai uji, untuk mengetahui aktivitas penghambatan larutan uji terhadap jamur uji serta seri konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa. Larutan uji yang digunakan adalah kontrol pelarut DMSO, etanol 70%, dan nistatin 1000 unit. Masing-masing larutan uji dari seri konsentrasi ekstrak diinjeksikan sebanyak 20 µl ke dalam lubang sumuran (*hold*), kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 24-25°C dalam inkubator. Pengamatan hasil inkubasi dilakukan terhadap adanya koloni jamur uji dan zona bening di sekitar sumuran yang menandakan adanya

efek penghambatan larutan uji dan seri konsentrasi ekstrak terhadap jamur uji. Zona bening yang ada merupakan zona hambat pertumbuhan jamur uji, dapat diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong.

Untuk penentuan uji daya hambat atau daya bunuh suatu ekstrak yang memiliki efek penghambatan paling optimal terhadap jamur uji, dilakukan dengan mengambil 1 ose bagian zona hambat terbesar yang terbentuk dari aktivitas penghambatan suatu seri konsentrasi ekstrak, kemudian ditanam dalam media SDA dengan menggunakan metode penanaman gores silang. Sebagai pembanding, dapat ditanam zona bening yang terbentuk dari produk obat antijamur (nistatin) dengan menggunakan metode yang sama dan dilakukan inkubasi selama 5 hari pada suhu 24-25°C dalam inkubator. Hasil pengamatan berupa ada atau tidak adanya koloni jamur yang terbentuk dalam media SDA. Apabila hasil menunjukkan terdapat koloni jamur yang terbentuk maka aktivitas penghambatan suatu seri konsentrasi ekstrak yang memiliki zona bening terbesar hanya bersifat fungistatik, artinya ekstrak hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur uji, bukan membunuh jamur uji.

Skrining fitokimia/uji tabung ekstrak etanol daun cabai jawa

Uji saponin. Ekstrak dilarutkan dalam akuades lalu dipanaskan dengan penangas air. Setelah dingin, larutan dalam tabung reaksi dikocok kuat-kuat selama 30 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang konsisten selama beberapa menit dan dengan penambahan 1 tetes HCl encer masih terbentuk busa.

Uji flavonoid. Ekstrak ditambahkan dengan serbuk Mg dan HCl 1 N kemudian dipanaskan di atas penangas air. Setelah itu, ekstrak ditambahkan dengan amil alkohol dan dikocok hingga tercampur rata. Hasil positif ditandai dengan terariknya warna kuning-merah pada lapisan alkohol.

Uji alkaloid. Ekstrak ditambahkan dengan HCl 2 N sampai 5 mL di dalam tabung reaksi, dikocok, kemudian dipanaskan di atas penangas air sampai mendidih. Dari hasil pemanasan, terbentuk dua lapisan. Lapisan bening (lapisan atas) diambil kemudian ditetesi dengan pereaksi Wagner. Hasil positif ditunjukkan oleh terbentuknya endapan berwarna cokelat.

Analisis data

Dari uji aktivitas antijamur pada seri konsentrasi ekstrak dan larutan uji didapatkan data diameter zona hambat dari seri konsentrasi ekstrak tertentu. Dalam uji aktivitas antifungi ekstrak etanol daun cabai jawa terhadap pertumbuhan *C. albicans*, juga dilakukan skrining fitokimia, dan diperoleh data golongan senyawa tertentu yang diduga bersifat sebagai antifungi. Pada tahap pengujian aktivitas antijamur ini diketahui ekstrak yang menunjukkan aktivitas antijamur tertinggi berdasarkan diameter zona hambat. Ekstrak dengan aktivitas antijamur tertinggi tersebut selanjutnya dilakukan uji daya hambat. Data diameter zona hambat dari variasi konsentrasi ekstrak hasil pengujian aktivitas antijamur dilakukan analisis data dengan *One-Way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi sampel

Hasil determinasi menunjukkan bahwa daun yang diteliti merupakan jenis *Piper retrofractum* Vahl.

Preparasi bahan

Daun cabai jawa basah yang sudah dipanen sebanyak 1550 gram dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 2 hari. Pengeringan dilakukan pada suhu <50°C, karena pengeringan yang dilakukan pada suhu yang terlalu tinggi dalam waktu yang lama dapat menyebabkan simplisia yang diperoleh ditumbuhi kapang (Sirait 1985). Pengeringan simplisia dalam oven bertujuan untuk mempercepat penghilangan air dan mendapatkan bahan dengan kadar air yang rendah, sehingga bahan tidak menjadi busuk selama proses penyimpanan. Dari proses pengeringan tersebut diperoleh simplisia sebanyak 760 gram.

Simplisia kemudian dihaluskan dengan menggunakan *blender*, sehingga diperoleh serbuk daun cabai jawa. Simplisia dihancurkan dengan tujuan untuk memperluas luas permukaan jaringan tanaman agar sel yang mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antijamur dapat diikat oleh pelarut dan senyawa tersebut dapat larut sebanyak mungkin dalam pelarut. Serbuk daun cabai jawa selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi.

Maserasi simplisia

Serbuk daun cabai jawa diekstraksi dengan metode maserasi (perendaman bahan) menggunakan pelarut etanol 70% selama 4x24 jam sambil beberapa kali diaduk. Maserasi dipilih karena ekstraksi ini tidak melibatkan pemanasan, sehingga perubahan-perubahan senyawa dapat dihindari. Selain itu, proses maserasi juga mempunyai keuntungan dibandingkan dengan metode lain, yaitu dengan metode maserasi akan diperoleh ekstrak dalam jumlah banyak serta terhindar dari perubahan senyawa-senyawa tertentu akibat pemanasan (Pratiwi 2008 dalam Kusuma 2010).

Maserasi berupa serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan, sehingga interaksi pelarut dengan senyawa yang akan diambil lebih efektif dan senyawa dapat terekstrak sempurna. Pengadukan secara berkala selama proses maserasi bertujuan untuk menghindari mengendapnya serbuk, sehingga dapat mempersulit pelarut untuk menembus bahan dan mengakibatkan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam bahan tidak dapat terekstrak secara sempurna karena serbuk simplisia yang digunakan dalam jumlah banyak. Etanol 70% dipilih sebagai pelarut dalam proses maserasi karena etanol merupakan salah satu pelarut yang tidak toksik/tidak beracun, selain itu juga mempunyai kemampuan dapat melarutkan hampir semua metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia, sehingga diharapkan senyawa-senyawa yang bersifat antijamur dapat terekstrak dalam etanol (Depkes RI 1986).

Maserat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Tujuan digunakan *rotary evaporator* adalah untuk memisahkan metabolit sekunder dengan pelarut etanol, sehingga diperoleh ekstrak kental

yang mengandung senyawa-senyawa aktif sebagai antifungi. Dari proses ekstraksi metode maserasi dihasilkan ekstrak etanol kental berwarna hijau kecokelatan sebanyak 57,895 gram dengan rendemen 7,61%. Ekstrak kental yang diperoleh dari ekstraksi maserasi ini, kemudian dilakukan uji aktivitas antijamur.

Pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol

Ekstrak etanol kental yang didapatkan dari ekstraksi maserasi, kemudian dilakukan pengujian aktivitas antijamur untuk mengetahui apakah ekstrak etanol mempunyai aktivitas antijamur atau tidak. Uji aktivitas antijamur ekstrak etanol dilakukan terhadap jamur *C. albicans*. Penelitian ini menggunakan metode difusi agar dengan metode penanaman jamur *spread plate*. Teknik penanaman *spread plate* dilakukan dengan tujuan supaya jamur uji dapat tersebar merata dalam media agar.

Semua peralatan dan media yang digunakan harus dalam kondisi steril. Proses sterilisasi dilakukan dengan sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit (untuk peralatan) atau 15 menit (untuk media). Proses pelaksanaan uji juga dilakukan secara aseptis di dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang telah dipapari UV terlebih dahulu selama 1-2 jam sebelum digunakan serta disemprot dengan alkohol 70% sebagai disinfektan.

Ekstrak etanol dibuat dalam beberapa konsentrasi dengan melarutkannya dalam pelarut dimetil sulfoksida (DMSO). DMSO digunakan sebagai kontrol pelarut yang tidak memiliki aktivitas biologi, karena DMSO merupakan pelarut polar aprotik, tidak berwarna, serta dapat melarutkan senyawa polar dan nonpolar yang mempunyai rentang yang luas dari pelarut organik seperti halnya air. DMSO memiliki titik didih yang tinggi sehingga menguap secara perlahan pada tekanan udara normal dan titik bekunya tetap tinggi, selain itu DMSO tidak aktif sebagai antijamur yang telah dilakukan dan dibuktikan dalam penelitian Harliana (2006).

Metode difusi dipilih sebagai metode yang digunakan sebagai uji aktivitas antijamur karena metode ini memberikan akurasi yang tinggi dan lebih mudah mengukur luas daerah hambat yang terbentuk akibat efek penetrasi senyawa aktif sampai ke bawah media agar. Pada media agar dibuat lubang sumuran dengan diameter 6 mm, kemudian diinjeksikan ekstrak etanol dengan berbagai seri konsentrasi sebanyak 20 µl pada tiap lubang sumuran, sehingga dapat diketahui aktivitas antijamur yang dimiliki pada setiap seri konsentrasi yang dibuat yang ditunjukkan dengan diameter zona bening.

Hasil pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol ditunjukkan pada Tabel 2, yang ditunjukkan dengan adanya diameter zona hambat terhadap jamur uji. Berdasarkan hasil pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa ekstrak etanol daun cabai jawa mempunyai aktivitas antijamur sedang terhadap *C. albicans*. Pada Tabel 2 juga dapat diketahui bahwa aktivitas antifungi ekstrak etanol daun cabai jawa paling optimum pada konsentrasi 40%. Diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa

antifungi pada media SDA. Kecepatan difusi tersebut menjadi salah satu penyebab dikarenakan dengan semakin besar konsentrasi ekstrak etanol maka viskositas/kekentalan ekstrak juga semakin besar (Harliana 2006).

Dari Gambar 1 dilakukan analisis statistik sehingga diketahui bahwa hasil paling optimum diperoleh pada konsentrasi 40%. Diameter zona hambat tidak selalu meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa, hal ini diduga terjadi akibat adanya perbedaan kecepatan difusi senyawa antifungi pada media SDA. Kecepatan difusi tersebut menjadi salah satu penyebab bahwa dengan semakin besar konsentrasi ekstrak etanol maka terdapat perbedaan daya hambat antar konsentrasi ekstrak terhadap jamur uji. Metode analisis yang digunakan adalah analisis statistik parametrik *One-Way* ANOVA. Sebelum dilakukan analisis data dengan uji ANOVA, data terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan homogenitas data. Dari hasil uji normalitas menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov didapatkan nilai signifikansi diameter hambat *C. albicans* 0,951 ($p > 0,05$) yang artinya data terdistribusi normal, kemudian data diuji homogenitasnya. Dari hasil uji homogenitas diperoleh signifikansi sebesar 0,450 ($p > 0,05$) yang artinya bahwa varian data sudah homogen. Dari hasil tersebut maka pada data daya hambat bakteri dapat dilakukan pengujian lebih lanjut dengan menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Pengaruh adanya batas maksimum konsentrasi ekstrak etanol yang terdapat dalam tiap sumuran dapat diketahui dengan analisis data *One-Way* ANOVA. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa mulai dari konsentrasi ekstrak 10% untuk tiap sumuran sampai konsentrasi ekstrak 70% untuk tiap sumuran berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans* yang ditandai dengan beda nyata yang signifikan ($p < 0,05$).

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa adanya batas maksimum konsentrasi ekstrak etanol dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* selanjutnya dianalisis lebih lanjut dengan uji LSD untuk mengetahui konsentrasi yang berbeda nyata dan tidak berbeda nyata pengaruhnya terhadap diameter daya hambat ekstrak. Dari hasil uji LSD dibuat tabel yang menunjukkan perbedaan pengaruh tiap konsentrasi ekstrak yang disajikan pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak 40% lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*. Pernyataan ini didukung oleh hasil pada Tabel 3 bahwa pada konsentrasi 40% menunjukkan notasi huruf yang berbeda pada hampir seluruh konsentrasi yang berarti konsentrasi ekstrak 40% memiliki diameter daya hambat yang berbeda nyata terhadap hampir keseluruhan konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa.

Pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol daun cabai jawa terhadap pertumbuhan *C. albicans*, menggunakan salah satu produk obat antifungi paten sebagai kontrol/pembanding yaitu nistatin. Nistatin merupakan antifungi yang efektif bekerja pada khamir dari genus *Candida* (Ridawati et al. 2011). Nistatin merupakan salah satu antibiotik turunan polien yang dapat menghambat pertumbuhan jamur dengan menyerang ergosterol, suatu komponen membran jamur

C. albicans, tetapi tidak menghambat pertumbuhan bakteri karena membran bakteri tidak mengandung ergosterol (Muriana et al. 2011). Proses infeksi *C. albicans* pada tubuh manusia, bermula dari dinding sel dari *C. albicans* yang melekat pada sel kulit. Dinding sel *C. albicans* terdiri dari enam lapisan dari luar ke dalam, yaitu *fibrillar layer*, *mannoprotein*, β -glucan, β -glucan-chitin, *mannoprotein*, dan membran plasma. Perlekatan lapisan dinding sel melibatkan ligan dan reseptor pada permukaan sel yang akan diserang, sehingga terjadi perubahan bentuk dari khamir menjadi filamen yang kemudian diikuti dengan pembentukan lapisan biofilm. Lapisan biofilm tersebut digunakan *C. albicans* untuk mempertahankan diri dari obat-obatan antifungi.

Pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol daun cabai jawa tersebut merupakan pengujian pada tahap awal. Ekstrak etanol daun cabai jawa yang positif memiliki aktivitas antijamur dengan daerah zona hambat yang besar selanjutnya dilakukan pengujian daya hambat atau daya bunuh.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antijamur ekstrak etanol daun cabai jawa dan kontrol terhadap jamur *Candida albicans* dengan metode difusi agar (perforasi)

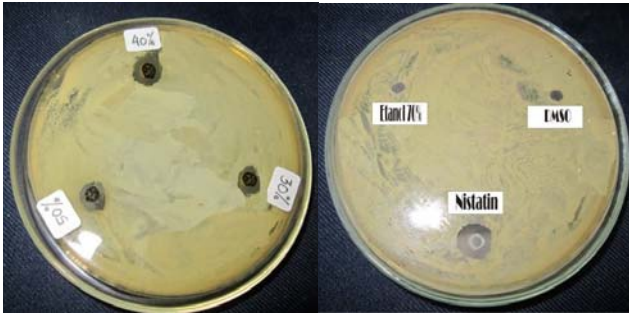
Konsentrasi	Daerah Diameter Hambat (DDH) terhadap pertumbuhan <i>C. albicans</i>
10%	2,11±0,45
20%	2,97±0,93
30%	4,39±0,45
40%	5,54±0,64
50%	4,89±1,02
60%	3,96±0,36
70%	3,48±0,59
80%	3,17±0,58
90%	2,76±0,57
100%	2,04±0,56
Kontrol nistatin	8,59
Kontrol DMSO	0
Kontrol etanol 70%	0

Keterangan: Hasil pengujian 3 kali pengulangan

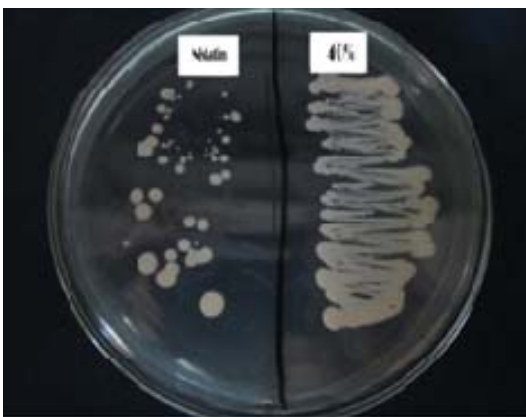
Tabel 3. Notasi LSD pengaruh ekstrak etanol daun cabai jawa terhadap jamur uji *Candida albicans*

Konsentrasi	Diameter Daya Hambat (DDH) <i>Candida albicans</i> (mm)
10%	2,11 ^a
20%	2,97 ^{abg}
30%	4,39 ^c
40%	5,54^d
50%	4,89 ^{cd}
60%	3,96 ^{bci}
70%	3,48 ^{bc}
80%	3,17 ^{abh}
90%	2,77 ^{ab}
100%	2,04 ^{ae}

Keterangan: Angka yang diikuti dengan notasi huruf yang sama tidak berbeda nyata pada uji LSD.



Gambar 1. Diameter daya hambat terbesar ekstrak etanol daun cabai jawa



Gambar 2. Daya hambat nistatin dan konsentrasi ekstrak etanol daun cabai jawa 40% terhadap pertumbuhan *C. albicans*

Penentuan daya hambat ekstrak etanol daun cabai jawa dan nistatin

Uji daya hambat atau daya bunuh merupakan suatu penentuan apakah ekstrak etanol daun cabai jawa yang memiliki aktivitas antijamur terbesar dan antifungi nistatin memiliki kemampuan membunuh jamur uji atau hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur uji. Ekstrak etanol daun cabai jawa yang memiliki daerah zona bening terbesar adalah pada konsentrasi 40% (b/v).

Dari hasil pengujian, bagian zona bening ekstrak etanol konsentrasi 40% beserta antijamur nistatin ditanam kembali pada media agar SDA dan tumbuh koloni jamur lagi. Hasil pada Gambar 2 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun cabai jawa pada konsentrasi 40% dan antifungi nistatin hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*. Hasil yang menunjukkan bahwa nistatin sebagai kontrol antifungi bersifat fungistatik (dapat menghambat pertumbuhan *C. albicans*) sesuai dengan hasil penelitian Muriana et al. (2011), dan pada ekstrak etanol daun cabai jawa pada konsentrasi 40% juga bersifat fungistatik. Ekstrak etanol daun cabai jawa pada konsentrasi tersebut bersifat fungistatik karena pada saat ditanam kembali pada media SDA yang baru, baik kontrol antifungi maupun konsentrasi ekstrak etanol, tumbuh koloni jamur *C. albicans*.

Mekanisme kerja antifungi diantaranya adalah dengan menimbulkan gangguan pada membran sel. Gangguan ini terjadi karena adanya ergosterol dalam sel jamur. Ergosterol merupakan komponen sterol yang sangat penting dan sangat mudah diserang oleh antibiotik turunan polien. Kompleks polien-ergosterol yang terjadi dapat membentuk suatu pori dan melalui pori tersebut konstituen esensial sel jamur seperti ion K, fosfat anorganik, asam karboksilat, asam amino, dan ester fosfat bocor keluar hingga menyebabkan kematian sel jamur. Mekanisme kerja antifungi yang lain yaitu dengan menghambat biosintesis ergosterol dalam sel jamur. Mekanisme kerja antifungi tersebut yaitu dengan menimbulkan ketidakteraturan membran sitoplasma fungi dengan cara mengubah permeabilitas membran dan mengubah fungsi membran dalam proses pengangkutan senyawa esensial yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolik, sehingga menghambat biosintesis ergosterol dari sel jamur (Rochani 2009).

Berdasarkan perbandingan jumlah koloni jamur *C. albicans* yang terbentuk, kemampuan untuk menghambat pertumbuhan jamur uji ekstrak etanol pada konsentrasi 40% dengan nistatin menunjukkan bahwa nistatin lebih optimal dalam menghambat pertumbuhan jamur uji. Hal ini dikarenakan nistatin merupakan senyawa kimia tunggal sebagai antifungi, sedangkan ekstrak etanol daun cabai jawa hanya berupa hasil maserasi yang masih banyak mengandung senyawa kimia lain. Semakin sedikit jumlah koloni jamur yang dihasilkan pada perlakuan ekstrak etanol daun cabai jawa terhadap nistatin dalam uji daya hambat atau daya bunuh maka semakin besar peluang ekstrak menjadi sumber antifungi.

Pengujian golongan senyawa yang bersifat antijamur dengan uji fitokimia/uji tabung

Pada ekstrak etanol daun cabai jawa dilakukan pengujian golongan-golongan senyawa dengan uji fitokimia. Uji fitokimia dimaksudkan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak yang memiliki aktivitas antijamur. Pengujian dilakukan terhadap senyawa yang ada secara teori dan hasil penelitian sebelumnya sebagai senyawa aktif yang terkandung dalam daun cabai jawa, seperti golongan senyawa alkaloid, saponin, dan flavonoid.

Tabel 4. Hasil pengujian golongan senyawa ekstrak etanol daun cabai jawa

Kandungan senyawa	Teori	Hasil uji	Kesimpulan
Alkaloid	Terbentuknya suatu endapan	Warna jingga dan terbentuk suatu endapan	+
Saponin	Adanya buih yang stabil setinggi ± 1 cm	Terbentuk buih yang konsisten	+
Flavonoid	Tertariknya warna kuning-merah pada lapisan alkohol	Terjadi perbedaan warna antara lapisan alkohol dan air	+

Keterangan: + = mengandung golongan senyawa yang dimaksud

Ekstrak etanol daun cabai jawa dapat memberikan hasil uji yang positif untuk sebagian besar golongan senyawa yang diujikan. Hal ini dikarenakan senyawa kimia alkaloid, saponin, dan flavonoid bersifat semipolar hingga polar, sehingga dapat larut dalam pelarut etanol 70% yang merupakan pelarut polar. Beberapa golongan senyawa hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun cabai jawa yang memiliki kemampuan sebagai antijamur ditunjukkan pada Tabel 4.

Alkaloid mampu menghambat pertumbuhan mikroba dengan mengganggu sintesis DNA (Cowan 1999). Gugus flavonoid dapat bertindak sebagai antijamur karena mempunyai gugus fenol yang dapat mendenaturasi protein dan merusak membran sel yang bersifat *irreversible* (tidak dapat diperbaiki kembali) (Pelczar dan Chan 1986). Semakin bersifat lipofilik suatu flavonoid maka akan semakin mudah melekat pada dinding sel jamur dan dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel (Walson dan Preedy 2007). Adapun untuk senyawa saponin dapat berfungsi seperti detergen yang dapat berikatan dengan molekul hidrofilik dan molekul-molekul lipofilik (nonpolar), sehingga mampu merusak sel jamur (Mariana et al. 1996).

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun cabai jawa (*Piper retrofractum* Vahl.) mempunyai aktivitas penghambatan, pada uji zona hambat menunjukkan aktivitas paling optimal pada konsentrasi 40%. Ekstrak etanol daun cabai jawa bersifat fungistatik terhadap pertumbuhan *C. albicans*. Ekstrak etanol daun cabai jawa mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin yang berfungsi sebagai antijamur.

DAFTAR PUSTAKA

- Amalia L, Gana SA, Yulinah SE. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antifungi Minyak Atsiri Tanaman Beberapa Suku Piperaceae. Fakultas Farmasi, ITB, Bandung.
- Cowan MM. 1999. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4): 564-582.
- Depkes RI. 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Harliana D. 2006. Aktivitas Antijamur Ekstrak Rimpang Temu Glenyeh. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Kusuma DF. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Magdalena M. 2009. *Candida albicans*. Universitas Sumatera Utara Press, Medan.
- Muriana, Oesman F, Bahri S et al. 2011. Antifungal activity from side of *Cerbera odollan* against *Candida albicans*. *Natural* 11(1): 11-14.
- Nurkanto A. 2010. Eksplorasi mikroba dari tumbuhan marga Piperaceae yang berfungsi sebagai *drug discovery* senyawa antikanker dan antimikrobakteria. Laporan Akhir Kegiatan Program Insentif Penelitian dan Rekayasa LIPI. Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Jakarta.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1986. *Microbiology*. McGraw-Hill Book Company, New Delhi.
- Pratiwi ST. 2008. Mikrobiologi farmasi. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Ridawati, Laksmejenie BS, Djuwita I. 2011. Aktivitas antifungal minyak atsiri jinten putih terhadap *Candida parapsilosis* SS25, *C. orthopsilosis* NN14, *C. metapsilosis* MP27, dan *C. etchellsii* MP18. *Makara Sains* 15(1): 56-82.
- Rochani N. 2009. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Candida albicans* serta Skrining Fitokimianya. [Skripsi]. Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Sirait. 2007. Penuntun fitokimia dalam farmasi. Penerbit ITB, Bandung.
- Walson RR, Preedy VR. 2007. *Botanical medicine in clinical practice*. Cromwell Press, Cambridge.

Perbedaan kadar *caffeic acid phenethyl ester* pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air

The difference of *caffeic acid phenethyl ester* level in ethanol extract propolis and water extract propolis

RIANI DWI HASTUTI, DIDING PRASETYO, SRI HARTATI HADINOTO

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

Manuskrip diterima: xxxxx. Revisi disetujui: 26 Juli 2012.

Abstract. *Hastuti RD, Prasetyo D, Hadinoto SH. 2013. The difference of caffeic acid phenethyl ester level in ethanol extract propolis and water extract propolis. Biofarmasi 11: 43-47.* Propolis is a natural product derived from plant resin collected by honeybees and its composition has wide range of biological activity. CAPE is the ester of caffeic acid, a derivative of phenolic acid, a flavonoid-like compound, one of the major components of propolis. CAPE is reported can protect nephrotoxicity due to cisplatin induction, inhibiting the growth of various types of abnormal cells, having an anti-inflammation activity, antioxidant activity, cyclooxygenase activity, vasodilatation activity in rat aorta, potential inhibitor of nitric oxidant, inhibitor oxidative process, and effectively suppress the growth of cataract in rat. Propolis can not be used as raw material, and it must be purified by extraction with solvent. Different solvents may extract different compounds, influencing its activity. The purpose of this research was to determine the difference levels of CAPE in ethanol extract propolis and water extract propolis. This research was a pure experimental research using the post-test only design. The sample of this research was raw propolis taken from bees farming in Gejen RT. 03 RW. 02, Kerjo, Karanganyar. Sampling was performed by a purposive sampling. Sample was extracted with a maceration method with the solvents of ethanol and water. In each extract propolis was made five samples. The determination of the level of CAPE on propolis was performed by using UV-Vis spectrophotometry with Prussian Blue method. The data of the level of CAPE was analyzed by the statistical test of independent t-test. The results showed that the average of CAPE level in ethanol extract propolis was $12.268 \pm 0.658 \mu\text{g/mL}$ and the average of CAPE level in water extract propolis was $5.564 \pm 0.332 \mu\text{g/mL}$, with $p=0.125$ ($p>0.05$). There was no significant difference between extract ethanol propolis and water extract propolis.

Keywords: CAPE, propolis, Prussian blue method, UV-Vis spectrophotometry

PENDAHULUAN

Propolis adalah produk alami yang berasal dari resin tumbuhan yang dikumpulkan oleh lebah madu. Propolis telah secara luas digunakan dalam pengobatan tradisional dan terbukti memiliki berbagai aktivitas biologi, antara lain antimikrobal, antiprotozoal, antiparasit, antiinflamasi, antiagen penyebab ulserasi, antitumor, antioksidatif, antiviral, dan hepatoprotektif. Selain untuk pengobatan tradisional, baru-baru ini propolis populer dimanfaatkan sebagai suplemen makanan di banyak negara dan dipercaya dapat meningkatkan kesehatan dan mencegah penyakit (Bankova et al. 2000; Banksnota et al. 2001; Lotfy 2006; Marcucci 1995).

Komposisi propolis terutama tergantung pada keberadaan tumbuh-tumbuhan di daerah mana propolis dikumpulkan, waktu dikumpulkan, dan secara sekunder tergantung pada jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi (Bankova et al. 2000; Mishima 2005). Akibatnya, terdapat lebih dari 160 senyawa yang diidentifikasi dalam propolis, diantaranya senyawa aromatik, *prenylated p-coumaric acid*, derivat *acetophenone*, *caffeoylquinic acid*, *lignan*, *diterpenic acid*, *triterpene*, *monoterpene*,

sesquiterpene, gula, serta asam fenolik dan flavonoid sebagai komponen utama (Bankova et al. 1998).

Cuppert dalam Widjaja (2008) menyatakan bahwa *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE) adalah ester asam *caffeic*, turunan asam fenolik. CAPE memiliki struktur mirip flavonoid dan merupakan salah satu komponen utama pada propolis. CAPE dilaporkan dapat melindungi nefrotoksitas akibat induksi *cisplatin* (Ozen et al. 2004) dan menghambat pertumbuhan berbagai jenis sel yang abnormal (Khayyal et al. 1993). Selain itu, CAPE juga memiliki sifat antiinflamasi (Marquez et al. 2004), aktivitas antioksidan, aktivitas siklooksigenase (Rossi et al. 2002), dan aktivitas vasodilatasi pada aorta tikus (Cicala et al. 2003). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa CAPE terbukti berperan sebagai inhibitor potensial nitrit oksida (Nagaoka et al. 2003), inhibitor proses oksidatif (Frenkel et al. 1993), dan efektif menekan pertumbuhan katarak pada tikus.

Propolis tidak dapat digunakan sebagai bahan mentah dan harus dimurnikan melalui ekstraksi menggunakan pelarut (Pietta et al. 2002). Cunha dalam Sforzin (2011) menyatakan bahwa ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda akan menghasilkan komponen yang berbeda serta mempengaruhi aktivitasnya. Propolis biasanya

diekstrak dengan menggunakan air dan etanol pada berbagai konsentrasi sebagai pelarut. *Isosakuranetin*, *kuersetin*, dan *kaempferol* kebanyakan diekstrak dari campuran propolis dengan etanol 60%. Etanol 70% umumnya digunakan untuk mengekstrak *pinocembrin* dan *sakuranetin*. Etanol 80% digunakan untuk mengekstrak *kaempferide*, *acacetin*, dan *isorhamnetin* dari propolis. Propolis yang diekstrak dengan etanol 60-80% sangat menghambat pertumbuhan mikroba dan yang diekstrak dengan etanol 70-80% mempunyai aktivitas antioksidan terbesar. Adapun 80% ekstrak etanol propolis sangat menghambat aktivitas enzim *hyaluronidase* (Park dan 1998). Sementara itu, propolis ekstrak air dapat menghambat pertumbuhan lini sel yaitu McCoy, HeLa, SP2/0, HEP-2, dan BHK21 serta menstimulasi pertumbuhan sel normal yaitu limfosit, ginjal, hati, dan limpa tikus (Najafi et al. 2007). Konsentrasi tertinggi senyawa fenolik diperoleh dengan menggunakan pelarut etanol pada konsentrasi yang lebih rendah dan konsentrasi propolis mentah yang lebih tinggi (Cottica et al. 2011).

Meskipun etanol merupakan pelarut yang paling umum digunakan, propolis ekstrak etanol memiliki beberapa kelemahan, seperti memiliki bau yang kuat, rasa yang tidak enak, dan konsentrasi etanol yang tinggi (Ghisalberti 1979; Burdock 1998), sehingga studi tentang propolis ekstrak air terus meningkat. Propolis ekstrak air memiliki aktivitas antioksidan yang baik terkait dengan tingginya kandungan senyawa fenolik. Di sisi lain, Demestre et al. (2008) melaporkan bahwa CAPE memiliki kelarutan yang rendah terhadap air, namun dapat dibuat lebih larut dengan penambahan lemak.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan kadar CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

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

Alat dan bahan

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini yaitu labu takar 10 ml, 100 ml, dan 250 ml, erlenmeyer tutup 100 ml dan 250 ml, gelas beker 250 ml, pipet tetes, mikropipet 0-10 μ l, 10-100 μ l, dan 100-1000 μ l, botol timbang, spektrofotometer, kertas saring, kain lap, sabun cuci, dan sikat tabung.

Sementara itu, bahan yang dibutuhkan meliputi CAPE (1×10^{-3} sampai dengan $2,98 \times 10^{-3}$ M), asam asetat, etanol 80%, *aquabidest*, HCl 0,1 M, $K_3Fe(CN)_6$ 0,0008 M/0,1 M HCl, $FeCl_3$ 0,1 M/0,1 M HCl, dan propolis mentah.

Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni.

Subjek penelitian

Subjek dari penelitian ini berupa propolis mentah yang diperoleh dari peternakan lebah di daerah Gejen RT 03 RW 02 Kerjo, Karanganyar.

Teknik sampling

Teknik sampling yang dilakukan adalah *purposive sampling*. Pemilihan subjek penelitian didasarkan atas sifat-sifat tertentu yang berkaitan dengan karakteristik populasi. Karakteristik populasi harus sudah diketahui terlebih dahulu dari penelitian-penelitian sebelumnya (Taufiqqurohman 2009).

Cara kerja

Tahap persiapan

Pembuatan propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Propolis dibuat berdasarkan metode Gonzalez (2003) yang telah dimodifikasi. Ekstrak dibuat dengan mengambil 0,1 g propolis kering dan ditambah dengan 30 ml air. Kemudian ekstrak dimaserasi selama 12 jam, selanjutnya sampel dimasukkan ke dalam *shaker* dan disentrifugasi dengan kecepatan 50 rpm selama 30 menit pada suhu 30°C. Supernatan yang didapat kemudian difiltrasi 5 jam kemudian. Prosedur yang sama kemudian diulang sebanyak 5 kali. Modifikasi yang dilakukan adalah dengan memperpanjang lama perendaman menjadi 24 jam dan tidak menggunakan *shaker* pada proses pengadukan.

Tahap pelaksanaan percobaan dan pengukuran hasil

Pengukuran kadar CAPE propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air dilakukan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta dengan menggunakan spektrofotometer menurut metode *Prussian blue* yang dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut. Standar CAPE (284,31 g/mol) ditentukan dengan membagi CAPE standar menjadi enam kelompok ukuran yaitu 0, 4, 8, 12, 16, dan 20 μ l. Masing-masing kelompok ukuran CAPE standar ditambahkan 400 μ l $K_3Fe(CN)_6$ 0,0008 M/0,1 M HCl dan 400 μ l $FeCl_3$ 0,1 M/0,1 M HCl, setelah itu dikocok dan ditunggu selama 7 menit kemudian diamati absorbansi warna pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm. Nilai absorbansi dicatat kemudian data diubah ke dalam bentuk grafik CAPE standar, dimana sumbu x menunjukkan nilai CAPE standar dan sumbu y menunjukkan nilai absorbansi. Sampel propolis dibagi menjadi dua kelompok yaitu propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air. Masing-masing propolis diambil sebanyak 10 μ l kemudian diencerkan dengan etanol 80%, setelah itu ditambahkan dengan 400 μ l $K_3Fe(CN)_6$ 0,0008 M/0,1 M HCl dan 400 μ l $FeCl_3$ 0,1 M/0,1 M HCl hingga volumenya menjadi 10 ml lalu dikocok dan ditunggu selama 7 menit, kemudian diamati absorbansi warna pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 700 nm. Nilai absorbansi dicatat kemudian data dipindahkan ke dalam bentuk grafik CAPE standar untuk menentukan nilai CAPE yang terdapat dalam sampel propolis. Tahap-tahap pengukuran nilai absorbansi tersebut kemudian diulang sebanyak tiga kali untuk tiap

sampel propolis. Nilai rata-rata kadar CAPE dari tiap sampel propolis dihitung kemudian dibandingkan kadar CAPE antara propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air.

Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis dengan uji-t tidak berpasangan dengan menggunakan program *SPSS 17.0 for Windows* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata kadar CAPE antara propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air (Dahlan 2007).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penentuan kadar CAPE pada sampel digunakan CAPE standar dalam pelarut etanol 80% dengan konsentrasi 0; 2,5; 5; 7,5; 10; dan 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dan dalam pelarut air dengan konsentrasi 0; 2,5; 5; 10; 20; dan 30 $\mu\text{g/mL}$. Pada saat CAPE standar direaksikan dengan reagen *Prussian blue* dihasilkan larutan berwarna hijau. Semakin tinggi konsentrasi CAPE standar maka warna larutan yang dihasilkan semakin pekat. Hal ini menunjukkan bahwa CAPE standar memiliki kemampuan mereduksi.

CAPE standar yang telah direaksikan dengan reagen *Prussian blue* kemudian diamati nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 700 nm. Ketika direaksikan dengan reagen *Prussian blue*, warna yang dihasilkan adalah warna hijau. Warna yang dihasilkan oleh seluruh sampel terlalu pekat, sehingga perlu dilakukan pengenceran agar dapat dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran absorbansi larutan CAPE standar menggunakan pelarut etanol 80% disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan hasil pengukuran CAPE standar, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi antara absorbansi (A) dan konsentrasi propolis (C). Pembuatan kurva kalibrasi tersebut bertujuan untuk membantu menentukan kadar CAPE yang terdapat dalam sampel propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air dengan menggunakan persamaan regresi dari kurva kalibrasi. Adapun hasil pengukuran absorbansi larutan CAPE standar menggunakan pelarut air dapat dilihat pada Tabel 1.

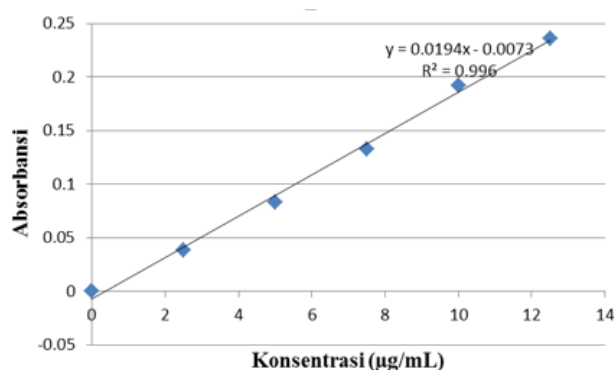
Gambar 1 dan 2 memperlihatkan bahwa nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi propolis yang mengikuti persamaan regresi linier. Dari pengukuran kadar CAPE standar dengan pelarut etanol didapatkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 0,0194x - 0,0073$ dan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,996. Adapun dari hasil pengukuran kadar CAPE standar dengan pelarut air didapatkan kurva kalibrasi dengan persamaan regresi $y = 0,0132x - 0,0013$ dan harga koefisien korelasi (r) sebesar 0,9987. Nilai (r) yang mendekati 1 membuktikan bahwa persamaan regresi tersebut bersifat linier. Persamaan ini digunakan sebagai standar untuk pengukuran kadar CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air.

Berdasarkan persamaan regresi yang didapat dari pengukuran nilai absorbansi CAPE standar pada pelarut etanol 80% maka dapat ditentukan konsentrasi CAPE pada

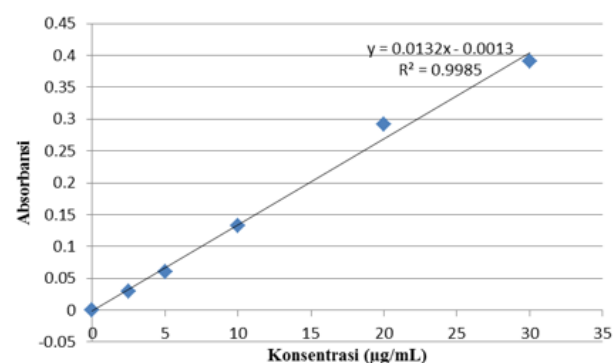
Tabel 2. Adapun pada konsentrasi CAPE dengan pelarut air didapatkan hasil seperti yang disajikan pada Tabel 2. Perbandingan konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air disajikan pada Tabel 3.

Konsentrasi rata-rata CAPE pada propolis ekstrak etanol berdasarkan data yang diperoleh adalah sebesar 12,268 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi rata-rata CAPE pada propolis ekstrak air sebesar 5,564 $\mu\text{g/mL}$. Dari hasil tersebut terlihat bahwa konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol lebih tinggi daripada propolis ekstrak air. Selanjutnya, data tersebut diuji menggunakan uji-t tidak berpasangan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata konsentrasi CAPE yang signifikan antara dua kelompok data.

Tahapan pertama dalam analisis data penelitian yaitu dilakukan uji normalitas pada data yang diperoleh untuk mengetahui sebarannya normal atau tidak. Sebaran data yang normal merupakan syarat mutlak dilakukan uji-t tidak berpasangan. Normalitas sebaran data dapat diketahui dengan menggunakan uji Shapiro-Wilk karena jumlah sampel kurang dari 50. Pada uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan nilai $p=0,481$ untuk ekstrak etanol dan $p=0,101$ untuk ekstrak air. Oleh karena nilai $p>0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa distribusi atau sebaran data bersifat normal. Oleh karena syarat distribusi atau sebaran data terpenuhi maka uji hipotesis yang dipakai adalah uji-t tidak berpasangan.



Gambar 1. Kurva kalibrasi CAPE standar dengan pelarut etanol 80%.



Gambar 2. Kurva kalibrasi CAPE standar dengan pelarut air.

Tabel 1. Nilai absorbansi CAPE standar dengan pelarut etanol 80% dan pelarut air

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi (A)	
	Pelarut etanol	Pelarut air
12,5	0,390	0,236
10,0	0,291	0,192
7,5	0,133	0,133
5,0	0,060	0,083
2,5	0,029	0,038
0,0	0,000	0,000

Tabel 2. Konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol 80%. Dan ekstrak air

Absorbansi (A)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ekstrak etanol 80%	Ekstrak air
0,214	5,52	11,42
0,223	6,13	11,85
0,230	5,25	12,24
0,244	5,48	12,93
0,243	5,48	12,90

Tabel 3. Perbandingan konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air

Etanol ($\mu\text{g/mL}$)	Air ($\mu\text{g/mL}$)
11,42	5,52
11,85	6,13
12,24	5,25
12,93	5,48
12,90	5,48

Tahapan berikutnya adalah uji varians data. Pada kotak *Levene's test* didapatkan nilai signifikansi $p=0,125$. Oleh karena nilai $p>0,05$ maka varians data pada kedua kelompok sama. Namun, varian data tersebut bukan merupakan syarat mutlak untuk dilakukan uji-t tidak berpasangan. Kemudian dilihat perbedaan rerata (*mean difference*). Perbedaan rerata menunjukkan hasil sebesar 6,704. Selanjutnya dilihat nilai $IK=95\%$. Nilai $IK=95\%$ berkisar antara 5,89441 dan 7,51359. Oleh karena nilai $p>0,05$ maka dapat disimpulkan tidak terdapat perbedaan rerata konsentrasi CAPE yang signifikan antara propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air.

Pembahasan

Propolis adalah produk alami yang berasal dari resin tumbuhan yang dikumpulkan oleh lebah madu. Komposisi propolis terutama tergantung pada keberadaan tumbuh-tumbuhan di daerah mana propolis dikumpulkan, waktu dikumpulkan, dan secara sekunder tergantung pada jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Propolis tidak dapat digunakan sebagai bahan mentah dan harus dimurnikan melalui ekstraksi dengan menggunakan pelarut (Pietta et al. 2002). Cunha dalam Sforcin (2011) menyatakan bahwa ekstraksi menggunakan pelarut yang

berbeda akan menghasilkan komponen yang berbeda serta mempengaruhi aktivitasnya. Kualitas ekstrak dipengaruhi oleh berbagai faktor, diantaranya bahan yang diekstrak, pelarut yang digunakan, dan prosedur ekstraksi.

Faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas ekstraksi di antaranya tipe ekstraksi, waktu ekstraksi, temperatur, pelarut alami, konsentrasi pelarut, serta polaritas. Dalam proses ekstraksi, pelarut berdifusi ke dalam material padat dan melarutkan komponen dengan polaritas yang sama (Prashant et al. 2011). Propolis biasanya diekstrak dengan menggunakan air atau etanol pada berbagai konsentrasi sebagai pelarut (Park dan Ikegaki 1998).

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata kadar CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air. Pada penelitian ini, faktor yang diteliti adalah jenis pelarut berupa etanol 80% dan air. Etanol merupakan pelarut yang termasuk dalam golongan alkohol yang memiliki sifat mampu melarutkan lebih banyak polifenol jika dibandingkan dengan air, karena alkohol lebih efektif dalam mendegradasi dinding sel yang bersifat nonpolar, sehingga polifenol dapat lepas. Adapun air merupakan pelarut universal yang biasanya digunakan untuk mengekstraksi zat-zat yang memiliki aktivitas antimikroba. Pada pelarut air, terdapat enzim polifenol oksidase yang dapat menyebabkan polifenol terdegradasi. Enzim tersebut tidak aktif dalam etanol maupun metanol.

Hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 3 menunjukkan bahwa konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol lebih tinggi daripada propolis ekstrak air. Hal ini sesuai dengan pernyataan Demestre et al. (2008) bahwa CAPE memiliki kelarutan yang rendah terhadap air.

Berdasarkan hasil analisis data penelitian menggunakan uji-t tidak berpasangan didapatkan $p=0,125$ ($p>0,05$). Hasil ini menunjukkan bahwa perbedaan rerata konsentrasi CAPE antara propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air tidak signifikan.

Kelemahan dalam penelitian ini yaitu penelitian ini menggunakan metode ekstraksi maserasi sederhana yang berakibat pada sedikitnya bahan aktif yang terekstrak dari propolis. Selain itu, penelitian ini tidak menggunakan metode isolasi spesifik untuk mengisolasi CAPE.

KESIMPULAN

Terdapat perbedaan konsentrasi CAPE pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air. Namun, perbedaan antara keduanya tidak signifikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Bankova V, Boudourova KG, Popov S et al. 1998. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie* 29: 361-367.
- Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. 2000. Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31: 3-15.
- Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 15: 561-571.
- Burdock GA. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol* 36: 347-363.

- Cicalaa C, Morelloa S, Iorioa C et al. 2003. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci* 73: 73-80.
- Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN et al. 2011. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. *J Braz Chem Soc* 22: 927-933.
- Dahlan MS. 2007. Statistika untuk kedokteran dan kesehatan: Deskriptif, bivariat, dan multivariat, dilengkapi "Aplikasi dengan menggunakan SPSS". Seri 1. Salemba Medika, Jakarta.
- Demestre M, Messerli SM, Celli N et al. 2008. CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester)-based propolis extract (Bio 30) suppresses the growth of Human Neurofibromatosis (NF) tumor xenografts in mice. *Phytother Res* 23 (2): 226-230.
- Frenkel K, Wei H, Bhimani R. 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Res* 53: 1255-1261.
- Ghisalberti EL. 1979. Propolis: A review. *Bee World*, 60:59-80.
- Gonzalez M, Guzman B, Rudyk R, Romano E, Molina MAA. 2003. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Lat Am J Pharm.*, 22 (3): 243-8.
- Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS. 1993. Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Drugs Exp Clin Res* 9: 197-203.
- Lotfy M. 2006. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pac J Cancer Prev* 7: 22-31.
- Marcucci MC. 1995. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 83-99.
- Marquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Munoz E. 2004. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappa B transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther* 308 (3): 993-1001.
- Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T. 2005. Antihypertensive effects of Brazilian propolis: Identification of caffeoylquinic acids as constituents involved in the hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 28 (10) 1909-914.
- Nagaoka T, Banskota AH, Tezuka Y, Midorikaka K, Matsushige K, Kadota S. 2003. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) analogues: Potent nitric oxide inhibitors from the Netherlands propolis. *Biol Pharm Bull* 26 (4): 487-491.
- Najafi MF, Vahedy F, Seyyedini M, Jomehzadeh HR, Bozary K. 2007. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. *Cytotechnology*, 54: 49-56.
- Ozen S, Akyol O, Iraz M, Sogut S, Ozugurlu F, Ozyurt H, Odaci E, Yildirim Z. 2004. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 24 (1): 27-35.
- Park YK, Ikegaki M. 1998. Preparation water and ethanolic extract of propolis and evaluation of preparations. *Bioschi Biotechnol Biochem* 62 (11): 2230-2232.
- Pietta PG, Gardana C, Pietta AM. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 (1): 7-20.
- Prashant T, Bimlesh K, mandeep K, Gupreet K, Harleen K. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. *International Pharmaceutica Scinecia* 1 (1): 98-106.
- Rossi A, Longo R, Russoc A, Borrellia F, Sautebina L. 2002. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia* 73 (1): 30-37.
- Sforcin J M, Bankova V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *J Ethnopharmacol* 133: 253-60
- Taufiqurohman MA. 2009. Pengantar Metodologi Penelitian untuk Ilmu Kesehatan. Safei I., Hastuti S., Saddhono K. (eds). Surakarta: UNS Press, pp: 58, 101-2.
- Widjaja A, Yeh T, Ju Y. 2008. Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester. *J Chinese Inst Chem Eng* 39: 413-18.

Uji toksisitas fraksi aktif ekstrak etanol daun ginje (*Thevetia peruviana*) dengan metode *Brine Shrimp Test* dan profil kandungan kimia fraksi teraktif

Toxicity test of active fraction from ethanol extract of ginje (*Thevetia peruviana*) leaves by *Brine Shrimp Test* method and chemistry compound profile of most active fraction

VIANA NINGSIH, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHANI, OKID PARAMA ASTIRIN

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

Manuskrip diterima: 4 April 2013. Revisi disetujui: 31 Juli 2013.

Abstract. Ningsih V, Nugraheni ER, Astirin OP. 2013. Toxicity test of active fraction from ethanol extract of ginje (*Thevetia peruviana*) leaves by *Brine Shrimp Test* method and chemistry compound profile of most active fraction. *Biofarmasi* 11: 48-57. Cancer is a major threat to human health. The treatment that been made such as dissection, radiation, and chemotherapy, did not give satisfactory results, even gave the considerable adverse side effects. Other alternative that selected is utilizing the natural materials from plant that expected to be companion chemotherapy. One of the plants as source of new drug potentially is ginje (*Thevetia peruviana* Merr). Previous studies reported that ethanol extract of ginje leaves have toxic effects below 1000 µg/mL. Therefore, it needs to be tested further to determine its potential as anticancer. This study aimed to determine the toxic effects of the active fractions of ethanol extract of ginje leaves by *Brine Shrimp Test* (BST) method and to determine the profile of active fraction of chemical constituents. Toxicity test was performed with *Brine Shrimp Test* (BST) method against *Artemia salina* Leach. Shrimp larva with a series concentrations extract of 62.5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL and 1000 µg/mL of each concentration were tested in 5 flacons. Each flacon contained 10 shrimp larva. The percentage of shrimp larva mortality was calculated after 24 hours of test and the data were analyzed by calculating the value of LC₅₀. The profile of the chemical contents of the most active fraction were identified by TLC and analyzed qualitatively. The results showed that the most active fraction in killing the larva of shrimp *Artemia* is the fraction I with the values of LC₅₀-24 hours was 44.67 µg/mL. The contents of chemical compounds contained in fraction I of leaf ethanol extract of ginje were terpenoid and phenolic groups.

Keywords: *Brine Shrimp Test* (BST), LC₅₀, *Thevetia peruviana*, TLC, toxicity

PENDAHULUAN

Penyakit kanker merupakan salah satu ancaman utama bagi kesehatan manusia, karena merupakan penyebab kematian kedua setelah penyakit jantung (Fitria dan Lenny 2009). Penanganan kanker pada umumnya dilakukan melalui proses pembedahan, radiasi, dan kemoterapi (Harwoko dan Utami 2011). Namun hingga saat ini, hasil yang diperoleh belum memuaskan, bahkan memberikan efek samping yang merugikan karena selektivitasnya masih rendah (Setyowati et al. 2007). Alternatif lain yang dipilih oleh sebagian penderita kanker diantaranya adalah dengan memanfaatkan bahan alam dari tumbuh-tumbuhan sebagai obat alternatif (Sukardiman et al. 2004). Kelebihan dari pengobatan dengan tanaman obat secara tradisional adalah efek sampingnya lebih kecil jika dibanding dengan pengobatan secara kimiawi (Thomas 1986).

Indonesia memiliki kurang lebih 30.000 jenis tumbuhan dan baru sekitar 7000 jenis yang telah diketahui sebagai tumbuhan berkhasiat obat (Sari 2006). Dengan demikian, upaya pencarian sumber obat baru dari tumbuh-tumbuhan sangat penting dilakukan.

Ginje (*Thevetia peruviana* Merr.), anggota famili Apocynaceae, merupakan salah satu jenis tanaman yang

berpotensi sebagai sumber obat baru. Tanaman ini biasa tumbuh di halaman rumah atau di pinggir-pinggir jalan sebagai tanaman hias (Mollah dan Islam 2007). Tanaman ini cukup melimpah, namun karena potensi dan khasiatnya belum banyak diketahui oleh masyarakat maka keberadaannya kurang diperhatikan. Ekstrak metanol daun *T. peruviana* mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, glikosida, minyak, tanin, dan fenol, dan tidak mengandung karbohidrat, protein, dan asam amino (Kumar et al. 2011). Senyawa alkaloid dan flavonoid berpotensi sebagai antikanker (Aryanti et al. 2005).

Semua bagian tanaman *T. peruviana* bersifat toksik, terutama getah dan minyak bijinya (Langford dan Boor 1996). Namun, pembuktian terhadap toksisitas tanaman ginje masih belum banyak dilakukan (Roberts et al. 2005). Uji sitotoksik dengan metode *Brine Shrimp Test* (BST) dapat digunakan untuk menemukan senyawa antikanker baru (Harborne 1987). Metode ini merupakan uji pendahuluan dengan menggunakan larva udang *Artemia salina* Leach sebagai hewan uji. Elhardallou (2011) menyatakan bahwa hasil uji toksisitas dengan metode BST terbukti memiliki korelasi positif dengan aktivitas antikanker pada manusia. Selain itu, metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Meyer

et al. 1982). Obat antikanker yang telah berhasil dikembangkan dari senyawa sitotoksik antara lain *vincristine* dan *vinblastine* yang berhasil diisolasi dari tanaman *Catharanthus roseus*, anggota famili Apocynaceae (Elhardalou 2011).

Pada penelitian Hasan et al. (2011) dilaporkan bahwa ekstrak etanol daun *T. peruviana* memiliki efek toksik terhadap larva udang *A. salina* dengan nilai LC_{50} sebesar 672,21 $\mu\text{g/mL}$. Menurut Meyer et al. (1982), suatu ekstrak dikatakan toksik pada uji BST jika nilai $LC_{50} < 1000$ $\mu\text{g/mL}$. Pada nilai LC_{50} tersebut, suatu ekstrak dapat dikembangkan menjadi obat kanker, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menguji potensinya. Dalam penelitian ini dilakukan proses fraksinasi untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang berperan dalam memberikan efek sitotoksitas. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi mengenai potensi tanaman *T. peruviana* sebagai kandidat antikanker.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek toksik dari fraksi aktif ekstrak etanol daun ginje (*T. peruviana*) dengan metode *Brine Shrimp Test* (BST) dan mengetahui profil kandungan kimia fraksi teraktif ekstrak etanol daun ginje.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari-Mei 2012 di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Pusat Sub-Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ginje (*T. peruviana*), etanol 70%, etil asetat, kloroform, metanol, pereaksi semprot Serum (IV) sulfat, Dragendorff, Liebermann-Burchard, dan FeCl_3 , telur *A. salina* Leach, garam laut, akuades, suspensi ragi (Fermipan®), CMC 0,1%, dan silika gel GF254.

Alat yang digunakan adalah *rotary evaporator*, oven, lampu UV, kertas saring (Whatman 42), peralatan gelas, plat KLT silika gel GF254, botol penyemprot, *aluminium foil*, pipa kapiler, bejana pengembang, gelas arloji, mikropipet 10-1000 μl , mikropipet 20-250 μl , mikropipet 0,2-2 μl , *vortex*, blender, neraca analitik, spatula, pipet tetes, flakon, kipas angin, aerator, sentrifuge, dan satu set peralatan KLTp (Kromatografi Lapis Tipis Preparatif).

Cara kerja

Persiapan sampel

Daun ginje segar sebanyak 1500 g dikumpulkan dari daerah Nogosari, Boyolali. Daun diambil pada ruas ke-10 hingga ruas ke-20 dari ujung daun. Tanaman ginje dideterminasi dan diidentifikasi di Laboratorium Biologi. Daun dicuci lalu dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan cara ditutup kain hitam, selanjutnya daun yang sudah kering dibuat serbuk dengan menggunakan blender.

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan secara maserasi dengan cara merendam serbuk daun ginje dengan etanol 70% hingga semua serbuk daun terendam selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah 24 jam, ekstrak tersebut disaring dan ampasnya direndam kembali dalam etanol 70% yang baru. Maserasi dan penyaringan dilakukan 3 kali. Masing-masing maserat yang telah disaring digabung dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C hingga diperoleh ekstrak kental berwarna hijau kehitaman, lalu ekstrak tersebut disimpan dalam eksikator untuk menghindari kontaminan dari luar.

Pencarian eluen terbaik

Pencarian eluen terbaik dilakukan dengan KLT. Plat KLT ukuran 1 cm x 10 cm disiapkan kemudian diberi tanda batas 1 cm dari bawah dan 1 cm dari atas dengan pencil, sehingga jarak pengembangan 8 cm. Sampel kemudian ditotolkan dengan pipa kapiler tepat di tengah-tengah garis bawah yang telah dibuat, setelah itu dibiarkan hingga kering. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah diisi dengan eluen. Eluen yang digunakan antara lain kloroform 100%, kloroform:metanol (9,5:0,5) dan (9:1) (Sriwahyuni 2010), kloroform: metanol (8:2) (Sriwahyuni 2010), kloroform: etil asetat: metanol (2:1:1), serta kloroform:etil asetat (3:1) dan (2:1).

Partisi

Mula-mula ekstrak etanol daun ginje dimasukkan ke dalam Eppendorf dan ditambah dengan pelarut secukupnya lalu dilakukan sentrifugasi dengan alat *sentrifuge* pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit, sehingga diperoleh bagian yang larut dan bagian yang tidak larut dalam pelarut. Jenis pelarut yang digunakan untuk partisi ditentukan dengan dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu dengan KLT untuk melihat pemisahan yang optimal. Jika spot yang terbentuk antara bagian yang larut dan bagian yang tidak larut tidak tumpang tindih maka pelarut tersebut digunakan untuk proses partisi lebih lanjut. Kedua bagian yang diperoleh kemudian diuapkan hingga kental dan tidak berbau pelarut lagi, lalu ekstrak dilakukan uji toksisitas dengan metode BST. Fraksi yang lebih aktif selanjutnya difraksinasi dengan KLT preparatif.

Fraksinasi dengan KLT preparatif

Persiapan plat KLTp. Satu set alat pembuatan plat kaca KLTp disiapkan, kemudian silika gel GF254 ditimbang kurang lebih sebanyak 15 gram untuk mendapatkan 2 plat kaca, lalu ditambah dengan akuades secukupnya (1:2) dan diaduk hingga rata. Kemudian silika tersebut dituang dalam cetakan lalu didorong hingga terbentuk plat kaca yang diinginkan. Dusahakan permukaan silika rata. Kemudian plat kaca dimasukkan ke dalam oven pada suhu 50°C kurang lebih selama 15 menit lalu dikeringkan kembali.

Sampel yang sudah disiapkan kemudian ditotolkan pada plat kaca KLTp dengan jarak 1 cm dari bawah dibuat memanjang seperti pita sepanjang plat kaca (20 cm). Penotolan diulang kurang lebih 3 kali, kemudian plat kaca dikeringkan lalu dimasukkan ke dalam *chamber* dan dielus

dengan fase gerak yang sesuai. Jarak pengembangan adalah 8 cm.

Pemisahan dilakukan dengan melihat hasil pengembangan di bawah UV. Pada paparan UV akan terbentuk noda-noda dengan pola tertentu. Noda yang terbentuk dengan nilai Rf yang sama ditandai lalu dikerok dan dikumpulkan menjadi satu fraksi.

Masing-masing fraksi yang diperoleh kemudian dimonitor profil kandungan kimianya dengan KLT. Berdasarkan hasil KLT, fraksi-fraksi dengan profil kromatogram yang hampir sama dijadikan satu. Fraksi hasil penggabungan tersebut selanjutnya diuji toksisitasnya dengan metode BST untuk mengetahui fraksi yang paling aktif.

Uji toksisitas dengan metode BST

Mula-mula dibuat larutan stok dengan cara melarutkan 500 mg sampel dalam 50 ml pelarut, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 10.000 µg/mL. Pelarut yang digunakan disesuaikan dengan sifat kelarutan sampel. Konsentrasi yang digunakan dalam uji toksisitas adalah 62,5; 125; 250; 500; dan 1000 µg/mL (Hasan et al. 2011). Larutan diambil dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam flakon. Kemudian flakon yang telah diisi dengan sampel diangin-anginkan hingga pelarut menguap dan tidak berbau pelarut lagi.

Telur *A. salina* ditetaskan dalam wadah yang telah berisi air laut pada kadar 3,8% (3,8 g garam laut dalam 100 ml akuades) dan diaerasi dengan aerator. Telur akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas (Maridass 2008).

Flakon yang telah diisi dengan sampel yang sudah diuapkan pelarutnya kemudian ditambahkan dengan CMC 0,1% 100 µl, kemudian ditambah dengan 2 ml air laut dan 1 tetes ragi fermipan (3 mg/5 ml). Kontrol uji dibuat dengan memasukkan CMC 0,1% sebanyak 100 µl dan ditambah dengan air laut dan ragi fermipan 1 tetes tanpa penambahan ekstrak. Kemudian flakon-flakon tersebut di-vortex kurang lebih selama 1 menit agar semua bahan tercampur rata. Lalu dimasukkan sebanyak 10 ekor larva *A. salina* umur 48 jam. Setelah 24 jam dihitung jumlah larva *A. salina* yang mati (tidak bergerak) kemudian dicari nilai LC₅₀-nya.

Penentuan golongan senyawa fraksi teraktif

Penentuan golongan senyawa fraksi teraktif dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Hasilnya dideteksi dengan sinar UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm serta beberapa deteksi semprot penampak bercak yang meliputi serium (IV) sulfat, Lieberman-Burchard, Dragendorff, dan FeCl₃. Setelah dilakukan penyemprotan, plat dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C selama 10-15 menit. Kemudian dilakukan penghitungan Rf.

Analisis data

Uji toksisitas dianalisis dengan menghitung jumlah *A. salina* yang mati setelah 24 jam perlakuan dengan rumus:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina mati}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Apabila terjadi kematian pada kontrol maka dapat dikoreksi dengan rumus Abbot's yaitu:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{jumlah larva } A. \text{ salina (Mati-kontrol)}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Dari hasil tersebut selanjutnya dihitung nilai LC₅₀ dengan mengubah persentase kematian menjadi nilai probit lalu dibuat kurva hubungan antara log konsentrasi dengan nilai probit dengan bantuan *Ms. Excel*, sehingga diperoleh persamaan garis liniernya.

Penentuan golongan fraksi teraktif dideteksi dengan kromatografi lapis tipis dengan fase gerak yang sesuai dan dideteksi dengan pereaksi semprot yang spesifik. Profil kromatografi lapis tipis hasil deteksi semprot spesifik dianalisis secara kualitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan bahan

Bahan utama berupa daun ginje segar diambil di daerah Nogosari, Boyolali sebanyak 1.500 g. Sebelumnya, sampel dideterminasi untuk menghindari kesalahan dalam penggunaan sampel. Bahan yang diperoleh selanjutnya dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan debu/kotoran yang menempel pada daun supaya tidak ikut terekstrak. Setelah itu, daun dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung dengan ditutup kain hitam. Hal ini bertujuan agar kandungan senyawa di dalam daun tidak rusak akibat paparan radiasi sinar UV yang terlalu tinggi. Pengeringan bahan bertujuan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik, sehingga dapat mencegah kerusakan bahan. Selain itu, menggunakan bahan dalam bentuk kering dapat memudahkan masuknya larutan pengestrak ke dalam sel dan menarik zat aktif yang terkandung di dalamnya secara sempurna (Djajanegara dan Wahyudi 2009) dan menghasilkan ekstrak yang lebih banyak jika dibanding dengan bahan yang masih segar (Cuellar et al. 2010). Daun yang sudah kering (simplisia) sangat mudah patah, berwarna hijau kecokelatan dan, setelah ditimbang diperoleh berat kering sebanyak 513,9 g.

Simplisia diblender hingga berbentuk serbuk (500 g). Pembuatan sediaan serbuk tersebut dimaksudkan untuk memperluas permukaan daun, sehingga ketika berinteraksi dengan pelarut, penetrasi pelarut ke dalam struktur seluler dari jaringan tanaman berlangsung lebih efektif. Hal ini akan mempermudah larutnya metabolit sekunder yang terkandung di dalam daun (Cannell 1998).

Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi atau perendaman. Metode maserasi dipilih karena metode tersebut lebih sederhana, mudah dikerjakan, dan biaya yang

diperlukan relatif murah (Djajanegara dan Wahyudi 2009). Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk daun ginje sebanyak 500 g dengan pelarut etanol 70% ($\pm 2,5$ liter) selama 24 jam. Etanol 70% digunakan sebagai pelarut karena mengikuti penelitian sebelumnya oleh Hasan et al. (2011) dan dikarenakan etanol merupakan senyawa polar, dimana berdasarkan sifat *like dissolve like*, pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non-polar akan melarutkan senyawa non-polar. Senyawa yang diduga berperan dalam memberikan efek toksik dalam penelitian ini adalah senyawa polar. Etanol 70% dianggap lebih optimal dibanding etanol 96% dalam proses penyarian. Hal ini dikarenakan etanol 70% lebih banyak mengandung air, sehingga proses ekstraksi juga lebih optimal (Djajanegara dan Wahyudi 2009). Selama proses ekstraksi, pelarut akan berdifusi ke dalam sel tanaman dan melarutkan senyawa yang sama polaritasnya (Prashant et al. 2011). Apabila telah terjadi keseimbangan antara konsentrasi di dalam dan di luar sel maka proses ekstraksi akan terhenti. Daftar beberapa pelarut beserta komponen aktif yang dilarutkan ditunjukkan pada Tabel 1.

Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali dengan pelarut baru. Hal ini bertujuan agar kandungan senyawa di dalam daun dapat tersari dengan optimal. Proses maserasi disertai juga dengan pengadukan agar terjadi interaksi yang merata antara cairan penyari dengan seluruh permukaan masing-masing serbuk. Selain itu menurut Cannell (1998), pengadukan bertujuan untuk meningkatkan efisiensi metode maserasi supaya kejenuhan pelarut terjadi lebih cepat dan maserat yang diperoleh lebih homogen. Kejenuhan terjadi apabila tidak ada perbedaan konsentrasi.

Penyaringan dilakukan sebanyak dua kali, yaitu tahap pertama dengan menggunakan kain dan tahap kedua dengan menggunakan kertas saring Whatman 42, hal ini bertujuan untuk mempercepat proses penyaringan dan memperoleh hasil saringan yang lebih murni. Filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C. Pemilihan suhu didasarkan pada titik didih pelarut (etanol 70%) yaitu 78°C. Jika penentuan suhu lebih dari titik didih dikhawatirkan kandungan senyawa dalam ekstrak akan rusak dan dapat ikut menguap bersama menguapnya pelarut. Dari proses ini diperoleh ekstrak kental daun ginje berwarna hijau kehitaman sebanyak 93,2 g. Dengan demikian, jika dibuat rendemen, konsentrasinya akan menjadi 18,1%. Hasil ini lebih tinggi jika dibanding dengan ekstrak etanol daun *A. Americana* yang mempunyai rendemen sebanyak 14,7% (Khade et al. 2011) dan ekstrak etanol daun *Annona muricata* 14,86% (Rachmani dan Suhesti 2012). Dengan demikian, proses ekstraksi dapat dikatakan sudah optimal.

Pencarian eluen terbaik

Pencarian eluen terbaik dilakukan dengan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan berbagai eluen, baik eluen tunggal maupun campuran, dari senyawa polar, semipolar, maupun nonpolar. Pencarian eluen terbaik tersebut merupakan tahapan yang penting dilakukan, karena proses ini akan dijadikan dasar dalam tahap selanjutnya, terutama dalam identifikasi kandungan senyawa suatu ekstrak. Eluen terbaik merupakan eluen

yang dapat menghasilkan spot dengan kriteria sebagai berikut: warna jelas, jarak teratur (tidak tumpang tindih), dan nilai Rf pada spot berada di antara 0,2-0,8 (Rohman dan Gandjar 2008). Hasil pemisahan spot pada KLT diamati dengan lampu UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₅ nm, serta disemprot dengan serum (IV) sulfat untuk melihat adanya spot yang mungkin belum terlihat pada saat dipapar dengan UV, deteksi ini juga menunjukkan adanya senyawa organik dalam ekstrak. Jika pemisahan spot yang terbentuk pada KLT sudah baik maka eluen sudah dapat digunakan pada tahap berikutnya (tahap partisi dan fraksinasi). Eluen yang dapat memisahkan kandungan senyawa terbaik adalah eluen kloroform 100% (Gambar 1).

Kloroform dapat memisahkan spot dengan baik dikarenakan sifatnya yang kurang polar. Beberapa eluen yang telah dicoba yang sifatnya lebih polar, memberikan pemisahan spot yang masih tumpang tindih. Hal ini mengindikasikan bahwa senyawa di dalam ekstrak sangat polar, sehingga perlu eluen yang kurang polar untuk dapat memisahkan senyawa dengan baik. Spot yang pertama terikat pada plat KLT adalah paling polar dan semakin ke atas maka kepolaran spot/senyawa semakin berkurang.

Gambar 1 menunjukkan adanya pemisahan spot yang sudah tidak tumpang tindih. Pada deteksi UV₂₅₄ (Gambar 1A) terlihat ada 1 spot, pada deteksi dengan UV₃₆₅ (Gambar 1B) terlihat ada 3 spot, dan deteksi dengan serum (IV) sulfat (Gambar 1C) terlihat ada 3 spot. Spot-spot yang terbentuk antara deteksi satu dengan deteksi yang lain menunjukkan perbedaan profil dan mempunyai nilai Rf yang berbeda. Hal ini menunjukkan adanya beberapa golongan senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun ginje, namun belum dapat diketahui secara spesifik kandungan senyawa kimianya.

Partisi dan uji toksisitas

Partisi bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dan nonpolar. Dalam proses ini dilakukan uji pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan jenis pelarut yang digunakan, sehingga pemisahan senyawa lebih optimal. Hasil partisi dimonitor dengan KLT untuk melihat pemisahan spot antara bagian yang larut dalam pelarut dan bagian yang tidak larut dalam pelarut. Pemisahan yang paling baik adalah dengan pelarut etil asetat, karena antara bagian yang larut dan bagian yang tidak larut, penampakan spot sudah tidak tumpang tindih (Gambar 2). Tidak tumpang tindihnya spot yang terbentuk mengindikasikan bahwa pemisahan antara senyawa polar dan nonpolar sudah optimal. Bagian nonpolar sudah masuk ke dalam bagian yang tidak larut etil asetat dan bagian yang lebih polar masuk ke dalam bagian yang larut dalam etil asetat. Partisi dilakukan dengan melarutkan ekstrak etanol daun ginje sebanyak 90 g dalam 150 ml etil asetat menggunakan alat sentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit.

Bagian terlarut etil asetat yang diperoleh diuapkan dengan *waterbath* pada suhu 50°C untuk menghilangkan pelarutnya, sehingga diperoleh ekstrak menyerupai pasta. Bagian larut sebanyak 5 g dan bagian tidak larut sebanyak 17 g. Kedua bagian tersebut selanjutnya diuji toksisitasnya untuk melihat bagian yang lebih aktif.

Uji toksisitas hasil partisi dilakukan dengan metode

Brine Shrimp Test (BST) terhadap larva udang *A. salina* berumur 48 jam (Meyer et al. 1982). Keunggulan penggunaan *A. salina* untuk uji BST adalah peka terhadap bahan uji, siklus hidup lebih cepat, mudah dibiakkan, dan harganya relatif murah. Sifat peka *A. salina* disebabkan oleh kondisi membran kulitnya yang tipis, sehingga memungkinkan terjadinya difusi zat dari lingkungan yang mempengaruhi metabolisme dalam tubuhnya (Rahmawan 2011). Larva udang memberikan kemiripan respons dalam kaitannya dengan sistem yang terjadi pada mamalia, misalnya *DNA-dependent RNA polymerase* *A. salina* memiliki tipe yang sama dengan mamalia (Elhardallou 2011). Adapun hasil uji toksisitas bagian larut etil asetat dan bagian tidak larut etil asetat ditunjukkan pada Tabel 2.

Dari Tabel 2, bagian larut etil asetat memberikan persentase kematian yang lebih besar dibanding bagian yang tidak larut etil asetat. Hal ini berarti senyawa aktif yang berperan dalam membunuh larva udang terdapat dalam bagian larut etil asetat, sehingga bagian larut etil asetat diuji lebih lanjut. Mekanisme kematian larva berhubungan dengan adanya suatu senyawa bioaktif dalam menghambat daya makan larva (*antifeedant*). Cara kerja senyawa bioaktif tersebut bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Oleh karena itu, jika senyawa-senyawa tersebut masuk ke dalam perut larva maka akan mengganggu pencernaan larva, selain itu senyawa tersebut akan menghambat reseptor perasa pada mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan stimulus rasa, sehingga larva tidak dapat mengenali makanannya, akibatnya larva mati kelaparan (Nguyen dan Widodo 1999).

Dari hasil uji toksisitas selanjutnya dicari nilai LC_{50} untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan untuk uji toksisitas hasil fraksinasi. Setelah dilakukan perhitungan diperoleh nilai LC_{50} bagian larut etil asetat sebesar 187,23 $\mu\text{g/mL}$. Dengan demikian, untuk uji selanjutnya cukup digunakan dua konsentrasi di bawah nilai LC_{50} dan satu konsentrasi di atasnya yaitu 62,5; 125; dan 250 $\mu\text{g/mL}$, karena dengan konsentrasi sebesar 187,23 $\mu\text{g/mL}$ sudah mampu membunuh 50% hewan uji.

Fraksinasi dan uji toksisitas

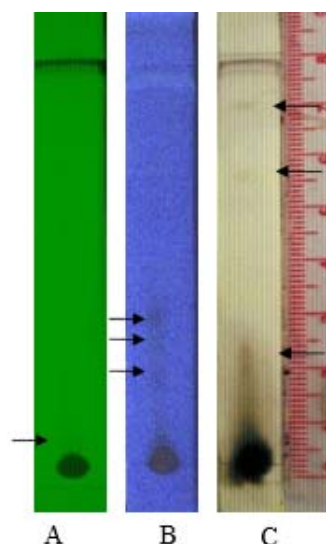
Fraksinasi dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTp). Hasilnya dideteksi di bawah lampu UV_{254} dan sinar tampak.

Pada Gambar 3, terlihat adanya pola-pola tertentu dengan warna yang berbeda. Pola-pola yang terbentuk dan mempunyai warna yang sama dikerok dan dikumpulkan menjadi satu fraksi. Pola-pola ini tidak membentuk garis lurus yang panjang tetapi bergelombang, sehingga sulit ditentukan nilai R_f -nya. Hal ini diduga disebabkan karena permukaan plat silika yang tidak rata atau proses penotolan yang kurang lurus, sehingga pola noda juga tidak lurus. Fraksi yang terbentuk disentrifugasi menggunakan pelarut etil asetat pada kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Hal ini bertujuan untuk memisahkan ekstrak hasil fraksinasi dengan silika gel sebagai pengikat ekstrak. Dari hasil fraksinasi, terbentuk 7 fraksi kemudian dimonitoring dengan KLT untuk melihat pemisahan kandungan senyawanya (Gambar 4).

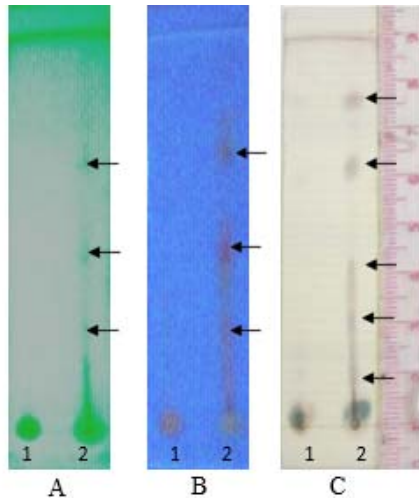
Hasil tersebut menunjukkan adanya fraksi yang mempunyai profil yang sama, yaitu fraksi 4-5 dan fraksi 6-7. Fraksi yang mempunyai profil hasil tersebut menunjukkan adanya fraksi yang mempunyai profil yang sama, yaitu fraksi 4-5 dan fraksi 6-7. Fraksi yang mempunyai profil dengan KLT untuk melihat profil kandungan senyawa kimianya (Gambar 5).

Hasil pada Gambar 5 menunjukkan adanya profil yang berbeda antara satu fraksi dengan fraksi yang lainnya setelah penggabungan. Hal ini berarti kandungan senyawa kimia dalam setiap fraksi sudah berbeda, sehingga selanjutnya dilakukan uji toksisitas untuk melihat fraksi yang paling aktif. Fraksi-fraksi ekstrak etanol daun ginje pada bagian yang larut etil asetat hasil penggabungan ditimbang dan diperoleh berat yaitu fraksi I sebanyak 86 mg, fraksi II sebanyak 63 mg, fraksi III sebanyak 77 mg, fraksi IV sebanyak 86 mg, dan fraksi V sebanyak 36 mg.

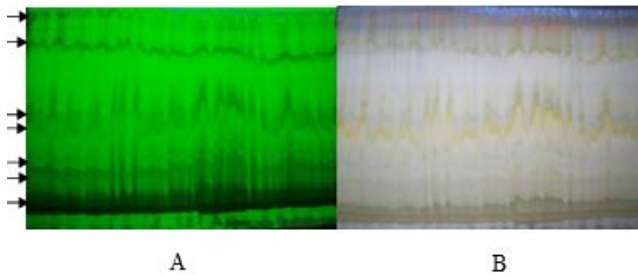
Uji toksisitas hasil fraksinasi menggunakan 3 konsentrasi yaitu 62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, dan 250 $\mu\text{g/mL}$. Adapun hasil uji toksisitas hasil fraksinasi disajikan dalam Tabel 3. Dari Tabel 3 dapat diketahui bahwa fraksi yang paling toksik adalah fraksi I, karena mempunyai persentase kematian yang paling besar. Semakin besar konsentrasi maka semakin besar kematian larva udang. Dari hasil tersebut selanjutnya ditentukan nilai LC_{50} dengan cara mencari linearitas antara log konsentrasi ekstrak dengan persentase kematian larva udang yang telah dikonversi ke dalam bentuk probit. Adapun persamaan linear dan nilai LC_{50} ditunjukkan pada Tabel 4. Kurva hubungan antara log konsentrasi dan nilai probit kematian larva *A. salina* ditunjukkan pada Gambar 6.



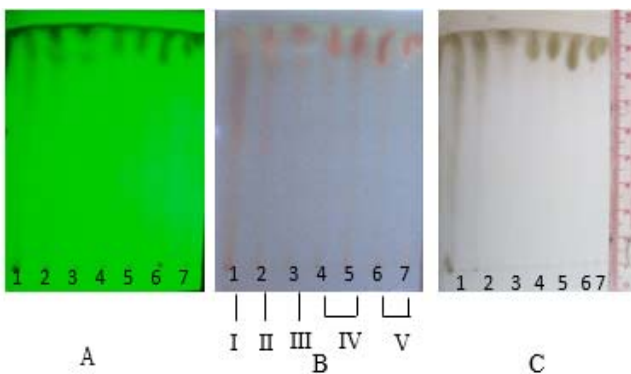
Gambar 1. Kromatogram ekstrak etanol daun ginje dengan deteksi UV_{254} (A) dan UV_{365} (B). Deteksi semprot serum (IV) sulfat. Fase diam = silika gel GF254, fase gerak = kloroform 100%, jarak pengembangan = 8 cm, spot ditunjukkan dengan tanda panah



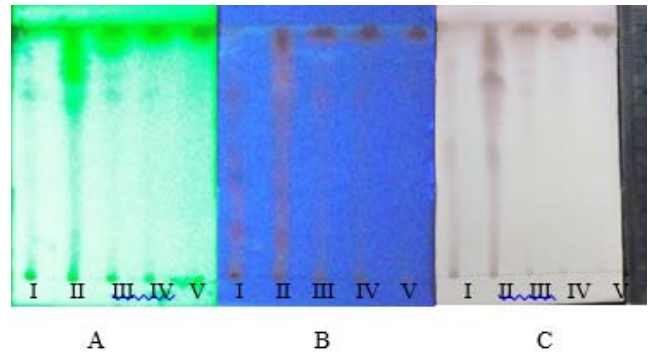
Gambar 2. Kromatogram hasil partisi dengan deteksi: (A) UV₂₅₄ asetat, (B) UV₃₆₅, (C) serum (IV) sulfat. 1 = Bagian tidak larut etil asetat, 2 = bagian larut etil asetat, fase diam = silika gel GF254, fase gerak = kloroform 100%, jarak pengembangan 8 cm, spot ditunjukkan dengan tanda panah



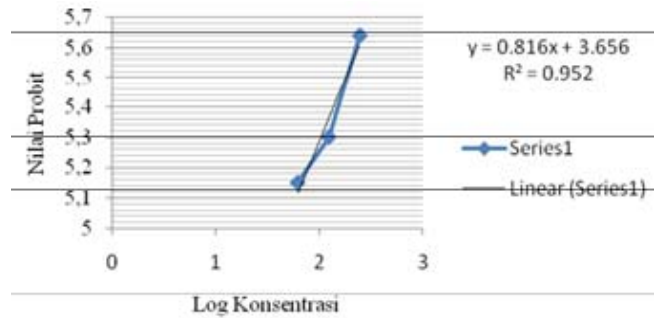
Gambar 3. Profil hasil fraksinasi dengan KLTP. (A) Deteksi UV₂₅₄, (B) deteksi Sinar tampak. Fase diam = silika gel GF254, fase gerak = kloroform 100%, jarak pengembangan = 8 cm



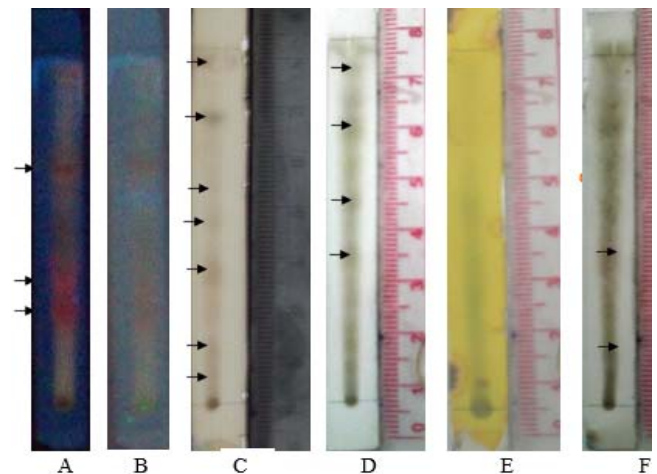
Gambar 4. Profil kromatografi lapis tipis tujuh fraksi hasil fraksinasi dengan deteksi (A) UV₂₅₄, (B) UV₃₆₅, (C) serum (IV) sulfat. Fase diam = silika gel GF254, fase gerak = kloroform 100%, jarak pengembangan = 8 cm



Gambar 5. Profil kromatografi lapis tipis lima fraksi hasil fraksinasi dengan deteksi (A) UV₂₅₄, (B) UV₃₆₅, (C) serum (IV) sulfat. Fase diam = silika gel GF254, fase gerak = kloroform 100%, jarak pengembangan = 8 cm



Gambar 6. Kurva regresi linear hasil uji toksisitas fraksi I hasil fraksinasi



Gambar 7. Profil kandungan kimia fraksi teraktif (fraksi I) ekstrak etanol daun ginje dengan beberapa deteksi penampak bercak. (A) UV₃₆₅, (B) UV₂₅₄, (C) serum (IV) sulfat, (D) FeCl₃, (E) Dragendorff, (F) Liebermann-Burchard. Fase diam = silika gel 60 GF, fase gerak = kloroform: etil asetat (1:3), jarak pengembangan = 7 cm

Tabel 1. Jenis pelarut dan komponen aktif yang dilarutkan dalam proses ekstraksi

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Eter	Aseton
Antosianin	Tanin	Antosianin	Terpenoid	Alkaloid	Fenol
Amilum	Polifenol	Terpenoid	Flavonoid	Terpenoid	Flavonol
Tanin	Poliasetil	Saponin		Kumarin	
Saponin	Flavonol	Tanin		Asam lemak	
Polipeptida	Terpenoid	<i>Xantoxilin</i>			
Lektin	Steroid	<i>Totarol</i>			
	Alkaloid	<i>Quassinoid</i>			
		Lakton			
		Flavon			
		<i>Phenone</i>			
		Polifenol			

Tabel 5. Hasil uji toksisitas ekstrak etanol daun ginje fraksi I-V dengan metode *Brine Shrimp Test* (BST)

Rf	Penampakan bercak					
	UV ₂₅₄	UV ₃₆₅	Serum (IV)	Sulfat FeCl ₃	Dragendorff	Liebermann-Burchard
0,07			Cokelat tua		-	Ungu
0,14			Merah bata		-	
0,29	Peredaman	Berpendar (merah)			-	
0,43	Peredaman	Berpendar (merah)	Cokelat tua	Hitam	-	
0,47			Merah bata		-	Ungu
0,57			Cokelat tua	Hitam	-	
0,71	Peredaman	Berpendar (merah)			-	
0,88			Cokelat tua		-	
0,93			Cokelat tua		-	

Tabel 2. Hasil uji toksisitas bagian larut etil asetat dan bagian tidak larut etil asetat ekstrak etanol daun ginje

Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata kematian (%) bagian larut	Rata-rata kelarutan (%) bagian tidak larut
62,5	42,00	39,33
125	46,00	43,33
250	50,00	46,66
500	59,33	54,66
1000	71,33	50,00
Rata-rata total	53,73	46,78

Tabel 3. Hasil uji toksisitas ekstrak etanol daun ginje fraksi I-V dengan metode *Brine Shrimp Test* (BST)

Fraksi	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-rata total
Fraksi I	62,5	56
	125	62
	250	74
Fraksi II	62,5	57
	125	59
	250	66
Fraksi III	62,5	53
	125	55
	250	62
Fraksi IV	62,5	34
	125	41
	250	69
Fraksi V	62,5	33
	125	39
	250	39

Tabel 4. Persamaan linear dan nilai LC₅₀-24 jam fraksi I hasil fraksinasi dari bagian larut etil asetat ekstrak etanol daun ginje

Log konsentrasi	Nilai probit	Persamaan linear	LC ₅₀ (µg/mL)
1,79	5,15	y = 0,816x + 3,656	
2,09	5,30	R ² = 0,952	44,67
2,39	5,64	y = 0,816x + 3,656	

Persamaan linear yang diperoleh digunakan untuk menghitung nilai LC₅₀ dengan cara memasukkan nilai y = 5 (nilai probit dari 50%), sehingga akan diperoleh nilai x sebagai log konsentrasi kematian larva udang, selanjutnya nilai x diubah menjadi bentuk antilog. Nilai akhir antilog tersebut merupakan nilai LC₅₀-nya. Nilai LC₅₀ yang diperoleh menunjukkan tingkat toksisitas suatu bahan uji. Semakin besar nilai LC₅₀ berarti toksisitas suatu bahan uji semakin kecil dan sebaliknya semakin kecil nilai LC₅₀ berarti toksisitas suatu bahan uji semakin besar.

Nilai LC₅₀ fraksi I sebesar 44,67 µg/mL. Menurut Meyer et al. (1982) dalam Sukandar et al. (2009), suatu ekstrak dianggap berpotensi sebagai antikanker jika memiliki toksisitas dengan nilai LC₅₀ kurang dari 1000 µg/mL. Dengan demikian, hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi I ekstrak etanol daun ginje bersifat toksik dan berpotensi sebagai antikanker.

Menurut Meyer et al. (1982), ekstrak atau fraksi senyawa yang memiliki harga $LC_{50} > 0-30 \mu\text{g/mL}$ berpotensi sebagai antikanker, $LC_{50} > 30-200 \mu\text{g/mL}$ berpotensi sebagai antibakteri, sedangkan $LC_{50} > 200-1000 \mu\text{g/mL}$ berpotensi sebagai pestisida. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang diketahui mempunyai aktivitas sebagai antimikroba juga berpotensi sebagai antikanker, karena diduga toksisitasnya juga dapat bekerja pada fase tertentu dari siklus sel kanker (Diastuti dan Suwandri 2009).

Nilai LC_{50} hasil fraksinasi lebih rendah daripada hasil partisi bagian larut etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa efek toksik hasil fraksinasi lebih besar dari hasil partisi dan menunjukkan juga bahwa fraksi I hasil fraksinasi mempunyai senyawa bioaktif yang lebih spesifik untuk mematikan larva udang, sehingga uji toksisitas dapat berlangsung lebih efektif. Nilai LC_{50} ($44,67 \mu\text{g/mL}$) fraksi I hasil fraksinasi bagian larut etil asetat memberikan nilai LC_{50} yang lebih besar jika dibandingkan dengan nilai LC_{50} fraksi etil asetat daun pecut kuda ($249,80 \mu\text{l/ml}$) (Indrayani 2006).

Uji BST menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif dengan uji sitotoksik pada beberapa ekstrak tanaman, seperti *Ocimum sanctum*, *Lagerstroemia reginae*, *Cissampelos pareira*, *Acaciaconccina*, *Punica granatum*, *Aconitum sp.*, *Rosadamascene*, *Cinchona sp.*, *Bacopa monnieri*, dan *Symplocos racemosa*, dengan tingkat kematian yang signifikan terhadap larva udang (Dahpour et al. 2012). Djajanegara dan Wahyudi (2009) juga membuktikan bahwa hasil uji pendahuluan dari ekstrak kloroform dan etanol daun *Annona* yang bersifat toksik terhadap larva udang ternyata juga toksik terhadap sel Hela dengan nilai LC_{50} sebesar $7,695 \mu\text{l/ml}$ dan $4,547 \mu\text{l/ml}$.

Deteksi kandungan senyawa

Kandungan senyawa yang terkandung dalam fraksi teraktif ekstrak etanol daun ginje (fraksi I) dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan hasilnya dilihat pada UV_{245} dan UV_{365} serta beberapa pereaksi penampak bercak, yaitu serum (IV) sulfat, Dragendorff, FeCl_3 , serta Liebermann-Burchard. Pereaksi semprot FeCl_3 digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol yang akan ditunjukkan dengan bercak berwarna hijau, merah ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harborne 1987). Liebermann-Burchard merupakan deteksi semprot golongan senyawa terpenoid, memberikan noda berwarna merah sampai ungu pada sinar visibel (Cannell 1998). Adapun reagen Dragendorff merupakan deteksi untuk senyawa alkaloid yang akan memberikan bercak berwarna jingga sampai cokelat (Wagner dan Bladt 1996). Profil KLT hasil fraksi I hasil fraksinasi ekstrak etanol daun ginje ditunjukkan pada Gambar 7.

Dari Tabel 5, hasil deteksi semprot serum (IV) sulfat memperlihatkan beberapa bercak berwarna cokelat tua (Gambar 7). Warna cokelat yang terbentuk disebabkan karena dalam serum (IV) sulfat terdapat H_2SO_4 10% yang bersifat reduktor dapat merusak gugus kromofor dari zat aktif simplisia, sehingga panjang gelombangnya akan bergeser ke arah yang lebih panjang, akibatnya noda menjadi tampak oleh mata setelah pemanasan (Ambarwati

2010). Deteksi ini menunjukkan adanya senyawa organik dalam ekstrak. Pada plat terlihat ada 7 spot, sehingga dapat diartikan pada plat tersebut mengandung banyak senyawa organik. Deteksi UV_{254} memperlihatkan adanya peredaman yang ditandai dengan beberapa spot/zona gelap pada latar belakang berfluoresensi hijau (Gambar 7). Hasil deteksi dengan sinar UV_{254} menunjukkan keberadaan suatu senyawa, sedangkan hasil deteksi dengan sinar UV_{365} (Gambar 7) memperlihatkan bercak terpendar berwarna merah. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki ikatan rangkap terkonjugasi yang panjang, sehingga dapat berpendar pada penyinaran UV gelombang panjang.

Adapun untuk deteksi senyawa secara spesifik dijelaskan sebagai berikut.

Deteksi Dragendorff

Deteksi Dragendorff merupakan deteksi senyawa alkaloid. Jika hasilnya positif maka akan muncul bercak berwarna jingga sampai cokelat (Wagner dan Bladt 1996). Pada plat yang telah disemprot dengan deteksi tersebut tidak menunjukkan terbentuknya bercak berwarna jingga atau cokelat, dan hanya terlihat adanya zona berwarna hijau dengan latar belakang kuning maka dapat disimpulkan bahwa fraksi I daun ginje tidak mengandung senyawa golongan alkaloid. Dengan demikian, hipotesis adanya alkaloid dalam fraksi teraktif ekstrak etanol daun ginje tidak terbukti.

Deteksi Liebermann-Burchard

Deteksi senyawa dengan Liebermann-Burchard menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid yang ditunjukkan dengan adanya noda berwarna merah sampai ungu pada sinar visibel (Cannell 1998). Pada plat setelah disemprot dan dipanaskan dengan oven pada suhu 110°C selama 10 menit, terlihat muncul spot berwarna ungu. Namun setelah beberapa saat, warna ungu pada plat sedikit memudar, sehingga spot terlihat kurang jelas. Spot berwarna ungu terlihat pada nilai R_f 0,14 dan 0,47, sehingga dapat disimpulkan bahwa fraksi I ekstrak etanol daun ginje positif mengandung senyawa terpenoid.

Deteksi FeCl_3

Deteksi FeCl_3 merupakan deteksi senyawa fenol yang ditunjukkan dengan bercak berwarna hijau, merah ungu, biru, atau hitam yang kuat (Harborne 1987). Pada plat terlihat terbentuk adanya spot berwarna biru tua setelah disemprot dengan FeCl_3 dan dipanaskan dengan oven pada suhu 110°C selama 10 menit, sehingga fraksi I ekstrak etanol daun ginje positif mengandung senyawa golongan fenolik. Identifikasi kandungan senyawa dalam fraksi I dengan deteksi semprot spesifik menunjukkan adanya golongan senyawa terpenoid dan fenolik, namun masih dimungkinkan terdapat kandungan senyawa lain yang belum teridentifikasi, karena spot yang terbentuk cukup banyak, sehingga diperlukan uji lebih lanjut untuk mengidentifikasi kandungan senyawa kimia dalam fraksi I ekstrak etanol daun ginje. Menurut Diastuti et al. (2008), senyawa flavonoid, terpenoid, dan alkaloid yang terdapat pada fraksi kloroform dari ekstrak etanol kulit batang *R.*

mucronata, secara sinergis atau individual diduga mampu menghambat *cell cycle progression* dari sel myeloma. Penelitian oleh Harwoko dan Utami (2011) juga melaporkan bahwa kandungan senyawa kimia dari fraksi aktif (*n*-heksana:kloroform) dari ekstrak metanol kulit batang *R. mucronata* yang berpotensi sebagai antikanker adalah flavonoid (golongan senyawa fenol) dan terpenoid, serta memiliki aktivitas sitotoksik pada sel kanker myeloma dengan nilai LC₅₀ sebesar 15 µg/mL. Zat antikanker yang dihasilkan dari ekstrak tanaman mempunyai mekanisme kerja yang hampir sama dengan obat antikanker golongan antimikotika yang menghambat proses mitosis pada fase metafase. Zat aktif yang terdapat pada ekstrak tanaman obat tersebut akan terikat pada protein mikrotubular, tepatnya tubulin pada GTP, dan akan menghambat kemampuan tubulin untuk berpolimerasi membentuk mikrotubulus, sehingga menghambat pemisahan kromosom dan proliferasi sel (Djajanegara dan Wahyudi 2009).

Poon et al. (2004) melaporkan bahwa senyawa fenolik mempunyai sejumlah aktivitas biologis, termasuk antioksidan. Antioksidan mampu melindungi sel normal karena mampu menghambat oksidasi radikal bebas yang reaktif menjadi radikal bebas yang tidak reaktif dan relatif lebih stabil. Dengan menekan reaksi oksidatif radikal bebas, kerusakan mitokondria sebagai penyedia energi dalam sel dapat dicegah. Antioksidan dapat melindungi disfungsi mitokondria dan gangguan lain yang dapat menyebabkan penyakit.

Aktivitas antitumor dari flavonoid meliputi beberapa mekanisme, yaitu menghambat pertumbuhan sel, menghambat aktivitas protein kinase, menginduksi apoptosis, menghambat sekresi MMP, menghambat invasi sel tumor, menghambat penyebaran sel, dan antiangiogenesis (Kanaswami et al. 2005). Terpenoid merupakan kelompok senyawa fitokimia terbesar. Saat ini, terpenoid telah dieksplorasi sebagai agen antikanker dalam percobaan medis. Terpenoid secara selektif dapat membunuh sel kanker hati (Thoppil dan Bishayee 2011). Sebagian besar triterpenoid telah dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker tanpa merusak sel normal (Petronelli et al. 2009). Lu et al. (2010) melaporkan senyawa triterpenoid berupa friedelin dalam ekstrak *Caulis bambusae* mampu menghambat pertumbuhan 4 sel kanker, yaitu A375, L929, Hela, and THP-1.

KESIMPULAN

Fraksi teraktif ekstrak etanol daun ginje dengan metode BST adalah fraksi I yang memiliki efek toksik terhadap larva *Artemia salina* dengan nilai LC₅₀-24 jam sebesar 44,67 µg/mL dan kandungan senyawa yang terdapat dalam fraksi teraktif (Fraksi I) ekstrak etanol daun ginje adalah golongan terpenoid dan fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati N. 2010. Uji toksisitas Fraksi Daun Ambre (*Geranium radula* Cavan.) Terhadap *Artemia salina* Leach dan Profil Kandungan Kimia Fraksi Teraktif. [Skripsi]. Universitas sebelas Maret, Surakarta.
- Aryanti, Ermayanti TM, Mariska I et al. 2005. Isolasi senyawa antikanker dari akar berambut *Artemisia cina* dan aktivitas inhibisinya terhadap sel kanker mulut rahim. *Majalah Farmasi Indonesia* 16 (4): 192-196.
- Cannell RJP. 1998. How to approach the isolation of a natural product. In: Cannell RJP (ed). *Methods in Biotechnology*. Volume 4. Natural Products Isolation, Humana, Totowa, NJ.
- Cuéllar C, Armando, Okori et al. 2010. Preliminary phytochemical and antimicrobial evaluation of the fresh and dried whole plant extracts from *Commelina benghalensis*. *Rev Colombiana Cienc Anim* 2 (1): 104-116.
- Dahpour AA, Rahdari P, Sobati Z. 2012. Chemical composition of essential oil, antibacterial activity and brine shrimp lethality of ethanol extracts from *Sedum pallidum*. *J Med Plants Res* 6 (16): 3105-3109.
- Diastuti H, Suwandri S. 2009. Fraksinasi dan identifikasi senyawa antikanker ekstrak kulit batang *Rhizophora mucronata* serta uji toksisitasnya terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach). *Molekul* 4 (2): 54-61. DOI: 10.20884/1.jm.2009.4.2.63.
- Diastuti H, Warsinah, Purwati. 2008. Isolasi senyawa bioaktif pada tanaman *Rhizophora mucronata* sebagai bahan antikanker. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian UNSOED, Purwokerto.
- Djajanegara, Wahyudi. 2009. Pemakaian sel Hela dalam uji sitotoksitas fraksi kloroform dan etanol ekstrak daun *Annona squamosa*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 7 (1): 7-11.
- Elhardallou. 2011. Cytotoxicity and biological activity of selected Sudanese medicinal plants. *Research Journal of Medicinal Plant* 5 (3): 201-229.
- Fitria L. 2009. Uji aktivitas antikanker secara in vitro dengan sel murine P-388 senyawa flavonoid dari fraksi etil asetat akar tumbuhan tunjuk langit (*Helminthostachis Zeylanica* (Linn) Hook). *Jurnal Penelitian Sains* 12 (1).
- Harborne JB. 1987. Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. (Diterjemahkan oleh: Padmawinata K, Soediro I). ITB Press, Bandung.
- Harwoko, Utami ED. 2011. Aktivitas Sitotoksik Fraksi *n*-Heksana: Kloroform dari Ekstrak Metanol Kulit Batang Mangrove (*Rhizophora mucronata*) pada Sel Kanker Myeloma. Jurusan Farmasi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto.
- Hasan MM, Saha AK, Khan SA et al. 2011. Studies on the antiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Open Veterinary Journal* 1: 28-31.
- Indrayani L, Soetjipto H, Sihalale L. 2006. Skrining fitokimia dan uji toksisitas ekstrak daun pecutkuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) terhadap larva udang *Artemia salina* Leach. *Berk Penel Hayati* 12: 57-61.
- Kanaswami C, Lee LT, Lee PPH. 2005. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 19: 895-910.
- Khade KV, Dubey H, Tenpe CR et al. 2011. Anticancer activity of the ethanolic extracts of *Agave americana* leaves. *Pharmacologyonline* 2: 53-68.
- Kumar A, Singh S, Mahour K et al. 2011. Phytochemical analysis of some indigenous plants potent against ectoparasite. *Asian J Exp Biol Sci* 2 (3): 506-509.
- Langford SD, Boor PJ. 1996. Oleander toxicity: An examination of human and animal toxic exposures. *Toxicology* 109: 1-13.
- Lu B, Liu L, Zhen X et al. 2010. Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bambusae* in Taeniam). *Afr J Biotechnol* 9 (38): 6430-6436.
- Maridass M. 2008. Evaluation of brine shrimp lethality of *Cinnamomum* species. *Ethnobotanical Leaflets* 12: 772-775.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE et al. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.
- Mollah JU, Islam W. 2007. Toxicity of *Thevetia peruviana* (Pers) Schum. extract to adults of *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *J Agric Rural Dev* 5: 105-109.
- Nguyen HH, Widodo. 1999. *S. momordica* L. In: De Padua LSN, Bunyapraphatsana, Lemmens RHMJ (eds). *Medicinal and Poisonous*

- Plant Research of South-East Asia 12. Pudoc Scientific Publisher, Wageningen, The Netherland.
- Petronelli A, Pannitteri G, Testa U. 2009. Triterpenoids as new promising anticancer drugs. *Anticancer Drugs* (20): 880-892.
- Poon HF, Calabrese V, Butterfield DA. 2004. Free radicals and brain aging. *Clinical Geriatric Medical* (20): 329-359.
- Prashant T, Kumar B, Kaur M et al. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. *Int Pharm Sci* 1 (1): 98-106.
- Rachmani EPN, Suhesti TS. 2012. The breast of anticancer from leaf extract of *Annona muricata* againsts cell line in T47D. *International Journal of Applied Science and Technology* 2 (1): 157-164.
- Rahmawan AJ. 2011. Bioaktivitas Ekstrak Etanol Suren Beureum (*Toona Sinensis* Roemor) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. [Skripsi]. Departemen Hasil Hutan, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Roberts DM, Wijayaweera D, Eddleston M. 2005. Yellow oleander poisoning. *Anuradhapura Medical Journal* 4: 12-17.
- Rohman A, Gandjar IG. 2008. Kimia farmasi analisis. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Sari LK. 2006. Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanannya. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 3: 1-7.
- Setyowati EP, Jenie UA, Sudarsono et al. 2007. Isolasi senyawa sitotoksik spons Kaliapsis. *Majalah Farmasi Indonesia* 18 (4): 183-189.
- Sriwahyuni I. 2010. Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acaaypha indica* Linn) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina* Leach). [Skripsi]. UIN Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Sukandar D, Hermanto D, Lestari E. 2009. Uji potensi aktivitas antikanker ekstrak daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb) dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). *JKTI* 11 (1): 32-38.
- Sukardiman, Rahman A, Pratiwi NF. 2004. Uji praskrining aktivitas antikanker ekstrak eter dan ekstrak metanol *Marchantia cf. planiloba* Steph. dengan metode uji kematian larva udang dan profil densitometry ekstrak aktif. *Majalah Farmasi Airlangga* 4 (3).
- Thomas ANS. 1986. Tanaman obat tradisional. Kanisius, Yogyakarta.
- Thoppil RJ, Bishayee A. 2011. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. *World J Hepatol* 3 (9): 228-249.
- Wagner H, Bladt S. 1996. Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas, 2nd Edition. Springer-Verlag, Berlin, Hiedelberg, New York.

Perkecambahan dan pertumbuhan sawi hijau (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) setelah pemberian ekstrak kirinyuh (*Chromolaena odorata*)

The germination and growth of choi-sum (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) after siam weed (*Chromolaena odorata*) extract treatment

NESSYA DAMAYANTI, ENDANG ANGGARWULAN, SUGIYARTO

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

Manuskrip diterima: 11 Maret 2013. Revisi disetujui: 27 Juli 2013.

Abstract. Damayanti N, Anggarwulan E, Sugiyarto. 2013. The germination and growth of choi-sum (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) after siam weed (*Chromolaena odorata*) extract treatment. *Biofarmasi* 11: 58-68. Siam weed (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Rob.) has allelopathic agent potential. Allelochemical is released by siam weed possibly affect the seed germination and growth of choi-sum (*Brassica rapa* L. var. *parachinensis* L.H. Bailey). The aim of this research was to study the effect of siam weed extract on the seed germination and growth of choi-sum. This research used a completely randomized design (CDR) with two factors and three replications. The first factor was extract source, i.e. (i) leaf extract, (ii) stem extract and (iii) mixed extract. The second factor was extract concentration with five levels, i.e. 0% as control, 25%, 50%, 75% and 100%. The variables that measured including germination percentage, time to germination, height of plant, root length, leaf wide total, sum of leaves, fresh weight, dry weight, root-shoot ratio, chlorophyll and carotenoid content. The collected data were analyzed by analisis of varians and followed by Duncan Multiple Range Test with 5% of confidence level. The results showed that siam weed extract was not significantly affect the percentage germination but significantly affect the time to germination of choi-sum, whereas seeds began to germinate some of which on the second day and all the seeds germinated on the fifth day. The higher concentrations significantly affected the plant height and increased the root-shoot ratio, but it tended to lower the tested plant leaf area.

Keywords: *Brassica rapa* var. *parachinensis*, *Chromolaena odorata*, growth, seed germination

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara agraris yang sebagian wilayahnya terdiri atas lahan pertanian. Luasnya lahan pertanian tersebut didukung dengan iklim tropis yang sesuai untuk bercocok tanam sehingga mengakibatkan keanekaragaman tanaman, khususnya sayuran. Sayuran sangat baik untuk dikonsumsi karena bermanfaat bagi kesehatan masyarakat. Nilai gizi makanan dapat diperbaiki dengan mengonsumsi sayuran, karena sayuran merupakan sumber vitamin, mineral, protein nabati, dan serat (Rukmana 2002).

Sawi hijau (*Brassica rapa* L. var. *parachinensis* L.H. Bailey) merupakan salah satu jenis sayuran yang digemari masyarakat Indonesia. Sayuran ini mudah dibudidayakan dan dapat dikonsumsi segar atau diolah menjadi asinan (Haryanto 2003). Sawi hijau mengandung banyak antioksidan dan vitamin (Okorogbona et al. 2011). Menurut Cahyono (2003) dan Rukmana (2002), sawi hijau memiliki berbagai manfaat bagi kesehatan tubuh, seperti sebagai peluruh air seni, obat batuk, obat sakit kepala, pembersih darah, dan pencegah kanker. Begitu banyak manfaat dari sayuran tersebut, sehingga meningkatkan permintaan masyarakat terhadap sawi hijau. Oleh karena itu, untuk memenuhi kebutuhan konsumen, baik dari segi

kualitas maupun kuantitas, maka perlu dilakukan peningkatan produksi. Namun, peningkatan produksi sawi hijau mengalami hambatan karena pembudidayaan sawi hijau pada lahan yang luas tidak terlepas dari gangguan gulma seperti daun sendok dan kumis kucing. Keberadaan gulma tersebut dapat menurunkan produksi sawi hijau dan mengakibatkan kualitas sawi hijau menurun. Untuk itu perlu dilakukan suatu usaha seperti penyiangan atau penyemprotan herbisida. Penyiangan merupakan cara yang tidak efisien waktu dan tenaga, sedangkan herbisida sintetik mempunyai dampak negatif seperti pencemaran lingkungan, meninggalkan residu pada produk pertanian, dan mematikan hama (Sutedjo 1995).

Dampak negatif yang ditimbulkan oleh herbisida sintetik mendorong ilmuwan untuk mencari alternatif pengendalian gulma yang ramah lingkungan yang disebut bioherbisida. Upaya pengendalian gulma yang ramah lingkungan ini antara lain dengan memanfaatkan senyawa metabolit sekunder tumbuhan yang bersifat fitotoksik (alelokemi) (Einhellig 2002).

Kirinyuh (*Chromolaena odorata* (L.) R.M. King & H. Robinson) merupakan gulma yang dapat ditemukan di sekitar lahan kelapa sawit. Gulma ini memiliki berbagai macam potensi yaitu sebagai pupuk organik karena memiliki biomassa yang tinggi (Suntoro et al. 2001 dalam

Kastono 2005), sebagai pakan ternak karena mengandung banyak protein (Marthen 2007), sebagai biopestisida karena mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan limonen, serta sebagai bioherbisida karena memiliki aktivitas alelopati terhadap pertumbuhan gulma (Darana 2006).

Kastono (2005) melakukan penelitian mengenai respons pertumbuhan dan hasil kedelai hitam terhadap penggunaan pupuk organik dan biopestisida kirinyuh, dari penelitian tersebut dilaporkan bahwa pemberian takaran kompos kirinyuh 30 ton/ha memberikan hasil kedelai tertinggi yaitu 1,53 ton/ha, namun tidak berbeda nyata dengan takaran 10 dan 20 ton/ha. Hal ini menunjukkan bahwa dosis tersebut masih perlu ditingkatkan karena hasilnya masih menunjukkan pengaruh yang tidak signifikan.

Penelitian yang dilakukan oleh Haris et al. (2002) mengenai analisis hara nitrogen pada tanaman sawi dengan berbagai perlakuan pupuk, yaitu urea, kotoran ayam, pupuk hijau *Thitonia diversifolia*, kirinyuh, dan *Glyricidae sepium*, menunjukkan bahwa pupuk hijau kirinyuh meninggalkan residu tertinggi dan dapat memperbaiki kesuburan tanah tetapi kurang meningkatkan bobot segar total tanaman sawi dibandingkan pemberian pupuk hijau *T. diversifolia*. Percobaan menggunakan ekstrak daun kirinyuh untuk meningkatkan hasil berbagai jenis tanaman pangan seperti kedelai, buncis, lobak dan ragi (sejenis gandum yang dibudidayakan di India) dilakukan oleh Prawiradiputra (2007). Dalam percobaan tersebut, ekstrak daun kirinyuh yang disiramkan ke tempat tumbuh tanaman menunjukkan hasil yang baik pada hampir semua parameter yang diamati, seperti tinggi tanaman, bobot segar, panjang akar, dan hasil polong meskipun dalam skala laboratorium.

Berdasarkan dari uraian tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mempelajari potensi kirinyuh sebagai bioherbisida dalam budi daya sawi hijau. Kajian perkecambahan dan pertumbuhan sawi hijau dilakukan setelah pemberian ekstrak daun, batang, serta campuran keduanya.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari pengaruh ekstrak daun, batang, serta campuran keduanya terhadap perkecambahan sawi hijau dan mengetahui pengaruh ekstrak daun, batang, serta campuran keduanya terhadap pertumbuhan sawi hijau.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 5 bulan, mulai dari bulan Januari sampai Mei 2012, di Mojosoongo, Surakarta dan Laboratorium Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan plastik, kapas, polibag, timbangan analitik, oven, pisau, blender, penggaris, dan ember untuk uji perkecambahan dan pertumbuhan. Adapun untuk uji

klorofil dan karotenoid digunakan pipet, gelas ukur, erlenmeyer, mortar dan pestle, corong, kertas saring, tabung reaksi, kuvet, spektrofotometer, label, dan kamera digital untuk dokumentasi.

Sementara itu, bahan yang digunakan adalah daun dan batang kirinyuh (*C. odorata*) yang diambil dari kawasan Mojosoongo untuk dibuat ekstrak, biji sawi hijau (*B. rapa* var. *parachinensis*), media tanah, pasir, kompos, air, akuades, dan aseton 80% untuk analisis klorofil dan karotenoid.

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktor dan 3 ulangan. Adapun macam perlakuannya sebagai berikut. Faktor pertama adalah jenis ekstrak yang terdiri atas tiga jenis, yaitu ekstrak daun (E1), ekstrak batang (E2), dan campuran ekstrak daun dan batang (E3), sedangkan faktor kedua adalah konsentrasi ekstrak kirinyuh yang terdiri atas lima taraf, yaitu K1 (0%), K2 (25%), K3 (50%), K4 (75%), dan K5 (100%).

Cara kerja

Persiapan media tanam

Media tanam terdiri dari tanah, pasir, dan pupuk kompos dengan perbandingan 1:1:1, ketiganya dicampur kemudian dimasukkan ke dalam polibag, masing-masing polibag diisi media sebanyak 1 kg.

Persiapan ekstrak kirinyuh

Kirinyuh diambil dari tanah lapang di kawasan Mojosoongo. Bahan ini kemudian dicuci bersih dan ditiriskan, selanjutnya dikeringanginkan selama 24 jam di tempat terbuka tetapi tidak terkena sinar matahari secara langsung. Pembuatan ekstrak kirinyuh dilakukan berdasarkan metode yang dilakukan Teteki (2010). Daun dan batang kirinyuh dipisahkan kemudian dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 60°C, setelah kering dibuat serbuk dengan menggunakan blender. Bahan tersebut kemudian dilarutkan dalam akuades dengan perbandingan 10 g bahan dalam 100 ml pelarut dan di-shaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu ruang (25-27°C). Ekstrak yang terbentuk selanjutnya disaring dan diencerkan dengan akuades (v/v) menjadi konsentrasi 0%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Ekstrak tersebut siap digunakan untuk diberikan pada tanaman sawi. Untuk konsentrasi ekstrak 0% hanya digunakan akuades saja, sedangkan ekstrak dengan konsentrasi 100% tidak dilakukan pengenceran.

Persiapan benih sawi untuk pengujian perkecambahan

Cawan plastik disiapkan sebanyak 45 buah. Masing-masing cawan plastik dilapisi dengan satu lapis kapas. Benih sawi diletakkan dalam cawan plastik. Setiap cawan berisi 10 benih sawi.

Persiapan benih sawi untuk pengujian pertumbuhan

Benih sawi ditumbuhkan dalam polibag berisi 1 kg media selama 14 hari. Masing-masing polibag diisi dengan 1 benih.

Penanaman bibit sawi

Bibit sawi yang sudah berumur 14 hari siap diberi perlakuan. Tanaman disiram dengan air secara teratur setiap pagi. Pada pengujian perkecambahan, benih sawi yang sudah diletakkan dalam cawan plastik yang dilapisi kapas, diberi 10 ml ekstrak kirinyuh sesuai dengan taraf konsentrasi. Pemberian ekstrak dilakukan setiap 3 hari sekali sampai kecambah berumur 14 hari. Selama 14 hari, kecambah diamati pada hari ke berapa benih mulai berkecambah dan persentase benih yang berkecambah. Pada pengujian pertumbuhan, setelah berumur 14 hari, bibit sawi dalam polibag diberi ekstrak kirinyuh. Ekstrak kirinyuh sebanyak 10 ml dalam berbagai konsentrasi disiramkan di sekeliling tanaman uji dengan selang pemberian ekstrak seminggu 2 kali sampai 25 hari setelah masa tanam (Teteki 2010).

Perkecambahan

Variabel yang diamati dalam pengujian perkecambahan adalah waktu munculnya kecambah (hari) dan persentase perkecambahan tiap cawan yang dihitung dengan cara:

$$\text{Persentase perkecambahan} = \frac{\text{Jumlah benih yang tumbuh} \times 100\%}{\text{Jumlah semua benih}}$$

Pertumbuhan

Variabel pertumbuhan yang diamati meliputi tinggi tanaman, luas daun, jumlah daun, berat basah tanaman, berat kering tanaman, rasio akar-tajuk, panjang akar, kadar klorofil dan karotenoid.

Tinggi tanaman. Pengukuran tinggi tanaman dilakukan setiap 7 hari sekali dari tanaman uji berumur 14 hari sampai 25 hari setelah tanam (hst).

Luas daun. Pengukuran luas daun dilakukan pada saat tanaman berumur 25 hari. Pengukuran luas daun dilakukan berdasarkan metode gravimetri yaitu dengan membandingkan berat daun total dengan berat suatu sampel daun yang telah diketahui luasnya (Sitompul dan Guritno 1995).

Bila sampel daun diambil dari sejumlah daun maka luas daun dapat ditaksir dengan rumus sebagai berikut:

$$LD = \frac{Wr}{Wt \times LK}$$

Keterangan:

LD = luas daun (cm²)

Wr = berat kertas replika daun (g)

Wt = berat total kertas (g)

LK = luas total kertas (cm²)

Jumlah daun. Jumlah daun dihitung pada akhir penelitian yaitu 25 hst.

Berat basah tanaman. Berat basah tanaman ditimbang pada akhir penelitian yaitu 25 hst.

Berat kering tanaman. Berat kering tanaman (g/tanaman) dihitung setelah tanaman dikeringkan dalam oven dengan suhu 60°C sampai tercapai berat kering yang konstan.

Rasio akar-tajuk. Rasio akar:tajuk dilakukan dengan cara membandingkan antara berat kering akar dan tajuk.

Panjang akar. Panjang akar diukur dari ujung akar primer hingga pangkal akar. Pengukuran ini dilakukan pada akhir penelitian yaitu 25 hst.

Kadar klorofil dan karotenoid. Pengukuran kadar klorofil total dan karotenoid sawi hijau dilakukan menurut metode Hendry dan Grime (1993) yaitu sebagai berikut. Daun sawi hijau yang membentang sempurna diambil sebanyak 0,1 g, kemudian potongan daun tersebut dihancurkan dalam mortar dan ditambahkan 10 ml aseton 80%. Larutan didiamkan beberapa saat hingga klorofil larut, lalu disaring dengan kertas saring supaya sisa daun tertinggal. Sebanyak 3 ml filtrat dimasukkan ke dalam kuvet kemudian dimasukkan ke dalam spektrofotometer. Absorbansi (A) diukur pada panjang gelombang 480 nm, 645 nm, dan 663 nm. Konsentrasi dihitung dengan rumus (Hendry dan Grime 1993) sebagai berikut:

$$\text{Klorofil total} = 8,02 (A. 663) + 20,2 (A. 645) \text{ mg/l}$$

$$\text{Karotenoid} = \frac{\{(A480 + (0,114 \times A663)) - (0,638 \times A645)\} \times 3 \times 1000}{112,5 \times 100} \text{ umol}$$

Analisis data

Data dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA) untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kirinyuh terhadap perkecambahan dan pertumbuhan sawi hijau. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf 5%.

Tabel 1. Kombinasi pemberian ekstrak kirinyuh terhadap perkecambahan dan pertumbuhan sawi hijau

KE	K1	K2	K3	K4	K5
E1	E1K1	E1K2	E1K3	E1K4	E1K5
E2	E2K1	E2K2	E2K3	E2K4	E2K5
E3	E3K1	E3K2	E3K3	E3K4	E3K5

Keterangan: E = Jenis ekstrak yang terdiri atas tiga jenis yaitu ekstrak daun (E1), ekstrak batang (E2), dan campuran ekstrak daun dan batang (E3); K = konsentrasi ekstrak kirinyuh yang terdiri atas lima taraf konsentrasi, yaitu K1 (0%), K2 (25%), K3 (50%), K4 (75%), dan K5 (100%)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkecambahan

Perkecambahan dapat diartikan dimulainya proses pertumbuhan embrio dari benih yang sudah matang (Sutopo 2004). Benih dapat berkecambah apabila tersedia faktor-faktor pendukung selama terjadinya proses perkecambahan, seperti air, suhu, oksigen, cahaya, senyawa alelopati, dan medium (Kamil 1979). Proses penyerapan air oleh benih merupakan proses imbibisi yang disebabkan oleh perbedaan potensial air antara benih dengan media di sekitarnya (Lakitan 1993), sehingga kadar air dalam benih mencapai persentase tertentu (50-60%) dan akan meningkat lagi pada saat munculnya radikula sampai

jaringan penyimpan. Kecambah yang sedang tumbuh mempunyai kandungan air 70-90%. Akibat terjadinya imbibisi, kulit benih akan menjadi lunak dan retak-retak (Sutopo 2002). Parameter perkecambahan yang diamati dalam penelitian ini meliputi hari ke berapa benih berkecambah dan persentase benih yang berkecambah (Tabel 2).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh memberikan pengaruh yang nyata terhadap perkecambahan sawi hijau, dimana sebagian benih mulai berkecambah pada hari kedua dan setelah hari kelima semua benih berkecambah. Benih sawi hijau yang diberi ekstrak dengan konsentrasi tinggi (75% dan 100%), berbeda dengan benih yang diberi perlakuan konsentrasi yang lebih rendah, yaitu hanya beberapa benih yang berkecambah pada hari kedua. Hal ini diduga terjadi karena adanya hambatan penyerapan air.

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa rata-rata persentase perkecambahan sawi hijau tidak berbeda nyata, baik pada sumber ekstrak maupun konsentrasi ekstrak. Pemberian ekstrak kirinyuh dengan konsentrasi rendah tidak mempengaruhi perkecambahan sawi hijau (Tabel 2). Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pramiadi dan Suyitno (2000) tentang pemberian ekstrak daun *Gliricidea* terhadap perkecambahan benih sawi dan bayam, dimana konsentrasi ekstrak daun *Gliricidea* yang rendah (5% dan 10%) tidak mempengaruhi perkecambahan sawi dan bayam. Demikian juga halnya dengan hasil penelitian Ilory et al. (2010) yang menyatakan bahwa ekstrak segar kirinyuh, *Helianthus annuus*, dan *Tithonia diversifolia* pada kadar rendah tidak menghambat perkecambahan dan pertumbuhan *Vigna unguiculata*.

Pertumbuhan

Dalam arti sempit, pertumbuhan adalah proses pembelahan sel (peningkatan jumlah) dan pembesaran sel (peningkatan ukuran) yang membutuhkan sintesis protein dan merupakan proses yang tidak dapat balik. Apabila pertumbuhan meningkat maka menandakan bahwa proses fotosintesis juga mengalami peningkatan. Hasil fotosintesis berupa gula digunakan untuk membentuk bagian-bagian sel, seperti dinding sel, membran sel, maupun organel-organel sel. Sementara itu, dalam pengertian yang lebih luas, pertumbuhan merupakan perkembangan sel-sel baru, sehingga terjadi pertambahan ukuran dan diferensiasi jaringan (Noggle dan Fritz 1983; Sitompul dan Guritno 1995).

Variabel pertumbuhan yang diamati dalam penelitian ini meliputi tinggi tanaman, panjang akar, jumlah daun, luas daun, berat basah tanaman, berat kering tanaman, rasio akar-tajuk, kadar klorofil dan karotenoid (Tabel 3).

Tinggi tanaman

Tinggi tanaman merupakan ukuran yang sering diamati, baik sebagai indikator pertumbuhan maupun sebagai parameter yang digunakan untuk mengukur pengaruh lingkungan atau perlakuan yang diterapkan. Hal ini didasarkan pada kenyataan bahwa tinggi tanaman merupakan ukuran pertumbuhan yang paling mudah diamati. Sebagai parameter pengukuran terhadap pengaruh

lingkungan, tinggi tanaman sensitif terhadap faktor lingkungan tertentu (Sitompul dan Guritno 1995).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh berbeda nyata terhadap tinggi tanaman sawi hijau. Tanaman uji yang diberi perlakuan ekstrak kirinyuh memiliki rata-rata tinggi tanaman di atas kontrol. Pemberian ekstrak daun dan ekstrak batang pada konsentrasi 25% dan 50%, memberikan hasil tinggi tanaman yang relatif hampir sama. Pemberian ekstrak batang dengan konsentrasi yang semakin tinggi cenderung meningkatkan rata-rata tinggi tanaman uji, sedangkan pemberian ekstrak campuran tidak menunjukkan kecenderungan peningkatan tinggi tanaman seiring dengan kenaikan konsentrasi, tetapi pemberian ekstrak dengan konsentrasi 25% memberikan hasil tinggi tanaman terbaik dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini sesuai dengan pendapat Hanolo (1997) yang menyatakan bahwa pemberian konsentrasi ekstrak yang rendah secara rutin memberikan hasil tanaman yang memuaskan.

Susanto (2002) mengemukakan bahwa pemberian bahan organik harus disesuaikan dengan kebutuhan tanaman. Apabila bahan organik diberikan dalam jumlah yang berlebihan maka tindakan tersebut merupakan pemborosan dan dapat menyebabkan keracunan pada tanaman, sedangkan pemberian dosis yang kecil tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap hasil tanaman. Tersedianya unsur hara yang cukup dan seimbang untuk pertumbuhan tanaman menyebabkan proses pembelahan, pembesaran dan pemanjangan sel akan berlangsung cepat (Pracaya 2005).

Hanolo (1997) menyatakan bahwa unsur hara seperti nitrogen dapat memacu pembentukan asam-asam amino menjadi protein. Protein yang terbentuk digunakan untuk membentuk hormon pertumbuhan, yaitu hormon auksin, giberelin, dan sitokinin. Auksin mempengaruhi sintesis protein struktural untuk menyempurnakan struktur dinding sel kembali seperti semula setelah mengalami peregangan atau pembentangan, giberelin mampu merangsang pertumbuhan tinggi tanaman, dan sitokinin berperan dalam pembelahan sel pada ujung batang.

Hasil pengukuran tinggi tanaman sawi hijau yang diberi ekstrak kirinyuh pada berbagai sumber dan konsentrasi ekstrak apabila dibandingkan dengan tanaman kontrol menunjukkan hasil yang lebih baik. Hal ini dikarenakan nutrisi yang terkandung dalam ekstrak kirinyuh tersedia dengan baik dan mencukupi, sehingga sangat baik untuk pertumbuhan sawi hijau.

Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak daun kirinyuh memberikan pengaruh penghambatan pada konsentrasi 75%, sedangkan ekstrak batang memberikan pengaruh peningkatan seiring dengan semakin bertambahnya konsentrasi ekstrak dan sumber ekstrak. Jenis perlakuan yang memberikan hasil tertinggi terhadap tinggi tanaman adalah ekstrak campuran, sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan ekstrak daun cenderung menghambat pertumbuhan tinggi tanaman.

Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Suwal et al. (2010) tentang efek alelopati kirinyuh terhadap perkecambahan dan pertumbuhan padi, dimana ekstrak daun kirinyuh memberikan efek penghambatan terbesar

terhadap perkecambahan dan pertumbuhan padi dibandingkan ekstrak batang maupun ekstrak akar. Phan et al. (2001) menyatakan bahwa daun dari tanaman kirinyuh kaya akan flavonoid, yaitu tanin, *quercetin*, *sinensetin*, *sakuranetin*, *padmatin*, *kaempferol*, dan *salvagenin*. Menurut Putnam (1988), hampir semua senyawa tersebut diketahui berpotensi sebagai agen alelopati.

Menurut Rice (1984), efek penghambatan terhadap pertumbuhan tinggi tanaman disebabkan oleh adanya alelokemi yang dapat mempengaruhi aktivitas hormon, salah satunya yaitu asam indol asetat (IAA) atau auksin yang berperan dalam pembesaran sel pada tanaman. Menurut Sastroutomo (1990), alelokemi seperti senyawa fenolik dan glikosida flavonoid dalam kadar tinggi akan menguraikan IAA menjadi IAA oksidase, sehingga fungsi IAA sebagai pemanjang sel menjadi terganggu. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Batish et al. (2002) yang menyatakan bahwa salah satu senyawa yang terkandung dalam *Pharthenium hysterophorus* yaitu *parthenin*, termasuk dalam golongan flavonoid, yang dapat menghambat pertumbuhan tinggi tanaman pada *Avena fatua* dan *Bidens pilosa*.

Panjang akar

Panjang akar merupakan hasil perpanjangan sel-sel di belakang bagian meristem ujung akar. Peran utama akar adalah menyediakan air, mineral, dan bahan-bahan yang penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Tanaman yang tumbuh dalam kondisi kurang air akan membentuk akar lebih banyak dengan hasil yang lebih rendah daripada tanaman yang tumbuh dalam kondisi cukup air. Panjang akar perlu diamati karena panjang akar menggambarkan kemampuan serapan tanaman terhadap unsur hara. Panjang akar diukur dari pangkal batang hingga ujung akar (Gardner et al. 1991; Sitompul dan Guritno 1995).

Tabel 2. Pengaruh waktu dan konsentrasi ekstrak kirinyuh terhadap perkecambahan benih sawi hijau

Konsentrasi ekstrak	Waktu (hari)				
	1	2	3	4	5
E ₁ K ₁	0 ^{pde}	0 ^{qde}	9,67 ^{rde}	9,67 ^{rsde}	10 ^{sde}
E ₁ K ₂	0 ^{pde}	8,33 ^{qde}	9,33 ^{rde}	9,67 ^{rsde}	9,67 ^{sde}
E ₁ K ₃	0 ^{pbde}	5,33 ^{qbde}	8,67 ^{rbde}	9,67 ^{rsbcde}	9,67 ^{sbcde}
E ₁ K ₄	0 ^{pbde}	4,67 ^{qbde}	9,33 ^{rbde}	10 ^{rsbcde}	10 ^{sbcde}
E ₁ K ₅	0 ^{pb}	2 ^{qb}	8,67 ^{rb}	9,33 ^{rsb}	10 ^{sb}
E ₂ K ₁	0 ^{pcde}	7 ^{qcde}	9,33 ^{rcde}	9,67 ^{rsde}	9,67 ^{sde}
E ₂ K ₂	0 ^{pde}	7,67 ^{qde}	9,67 ^{rde}	9,67 ^{rsde}	10 ^{sde}
E ₂ K ₃	0 ^{pcde}	6,33 ^{qcde}	9,67 ^{rcde}	10 ^{rsde}	10 ^{sde}
E ₂ K ₄	0 ^{pbcd}	4 ^{qcd}	9,67 ^{rcd}	10 ^{rscd}	10 ^{scd}
E ₂ K ₅	0 ^{pb}	1,67 ^{qb}	8,67 ^{rb}	8,67 ^{rsb}	10 ^{sb}
E ₃ K ₁	0 ^{pe}	9,33 ^{qe}	10 ^{re}	10 ^{rse}	10 ^{se}
E ₃ K ₂	0 ^{pde}	7,67 ^{qde}	9,33 ^{rde}	9,67 ^{rsde}	10 ^{sde}
E ₃ K ₃	0 ^{pde}	6,67 ^{qde}	10 ^{rde}	10 ^{rsde}	10 ^{sde}
E ₃ K ₄	0 ^{pb}	3 ^{qb}	0 ^{rb}	9,33 ^{rsbc}	10 ^{sbc}
E ₃ K ₅	0 ^{pa}	0,33 ^{qa}	6,67 ^{ra}	8,33 ^{rsa}	9,67 ^{sa}

Keterangan: a-e = menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0,05) pada huruf berbeda dan pada kolom yang sama; p-s = menunjukkan perbedaan yang signifikan (p<0,05) pada huruf berbeda dan pada baris yang sama

Tabel 3. Pengaruh pemberian ekstrak kirinyuh terhadap parameter pertumbuhan sawi hijau

Sumber ekstrak	Konsentrasi ekstrak (%)				
	0	25	50	75	100
Persentase perkecambahan					
Daun	10,00	9,67	9,67	10,00	10,00
Batang	9,67	10,00	10,00	10,00	10,00
Campuran	10,00	10,00	10,00	10,00	9,67
Rata-rata tinggi tanaman (cm)					
Daun	13,83 ^{ab}	17,03 ^{bc}	16,90 ^{bc}	13,67 ^{ab}	15,77 ^{bc}
Batang	11,33 ^a	16,97 ^{bc}	16,47 ^{bc}	18,23 ^{cd}	18,77 ^{cd}
Campuran	18,10 ^{cd}	23,30 ^e	21,27 ^{de}	22,07 ^{de}	21,43 ^{de}
Rata-rata panjang akar (cm)					
Daun	5,17	8,00	5,50	5,83	3,83
Batang	9,33	7,33	7,83	6,17	6,67
Campuran	8,67	8,33	10,10	8,33	8,63
Rata-rata jumlah daun					
Daun	4,33	3,33	4,67	4,00	4,00
Batang	4,67	6,00	4,67	3,67	5,67
Campuran	5,67	5,67	6,00	5,67	6,00
Rata-rata luas daun (cm²)					
Daun	28,25 ^{ab}	45,16 ^c	22,63 ^{ab}	29,02 ^{ab}	31,02 ^b
Batang	15,70 ^a	24,26 ^{ab}	22,78 ^{ab}	35,65 ^{bc}	24,97 ^{ab}
Campuran	22,15 ^{ab}	33,63 ^{bc}	23,33 ^{ab}	34,78 ^{bc}	25,64 ^{ab}
Rata-rata berat basah (g)					
Daun	6,57	7,10	5,07	5,10	5,63
Batang	3,18	6,58	4,67	4,51	4,39
Campuran	4,97	8,45	5,21	5,63	5,70
Rata-rata berat kering (g)					
Daun	0,80	0,78	0,58	0,56	0,64
Batang	0,42	0,76	0,56	0,49	0,36
Campuran	0,48	0,69	0,44	0,52	0,43
Rata-rata rasio akar:tajuk					
Daun	0,18 ^{bcde}	0,16 ^{abcd}	0,3 ^f	0,18 ^{bcde}	0,2 ^{cde}
Batang	0,10 ^{ab}	0,12 ^{abc}	0,17 ^{abcde}	0,13 ^{abcd}	0,25 ^{ef}
Campuran	0,13 ^{abcd}	0,10 ^{ab}	0,09 ^a	0,21 ^{de}	0,17 ^{abcde}
Rata-rata kadar klorofil (mg/L)					
Daun	26,69	24,38	24,70	20,35	23,53
Batang	27,87	25,73	32,63	26,36	17,43
Campuran	24,28	24,95	21,53	32,94	27,84
Rata-rata kadar karotenoid (µmol/L)					
Daun	0,21	0,19	0,20	0,16	0,19
Batang	0,21	0,21	0,25	0,19	0,12
Campuran	0,19	0,18	0,15	0,22	0,19

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh terhadap rata-rata panjang akar sawi hijau tidak berbeda nyata. Meskipun demikian, pada perlakuan pemberian ekstrak daun kirinyuh terjadi penurunan panjang akar seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak. Konsentrasi ekstrak 25% memberikan hasil tertinggi, sedangkan konsentrasi 100% memberikan hasil terendah. Hal ini diduga karena ekstrak daun memiliki alelokemi seperti senyawa fenolik yang tinggi (Phan et al. 2001). Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Onwugbuta dan Enyi (2001) tentang efek alelopati

kirinyuh terhadap tomat, dimana dalam penelitiannya digunakan ekstrak daun kirinyuh dengan perbandingan konsentrasi 1 g : 140 ml air, 1 g : 80 ml air, dan 1 g : 40 ml air. Dari penelitian tersebut didapatkan hasil panjang akar tomat yang mengalami penurunan seiring dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Wu et al. (1998) yang menyatakan bahwa pertumbuhan akar *Poa annua* sangat terhambat oleh pemberian ekstrak daun *Buchloe dactyloides* yang banyak mengandung senyawa fenolik yang dapat mengganggu permeabilitas membran sel dan dapat menghambat kerja enzim, sehingga metabolisme di dalam sel menjadi terhambat (Harbone 1996).

Pada perlakuan pemberian ekstrak batang dengan berbagai konsentrasi menunjukkan hasil yang relatif hampir sama meskipun di bawah kontrol, sedangkan perlakuan pemberian ekstrak campuran pada konsentrasi 50% memberikan hasil tertinggi dan di atas kontrol.

Panjang akar dapat digunakan untuk menilai daya penyerapan unsur hara dan air, sehingga dapat mengetahui nilai potensi fotosintesis tajuk. Alelokemi menyebabkan berkurangnya laju penyerapan unsur hara oleh akar. Kekurangan hara tersebut dapat menghambat pembentukan zat pengatur tumbuh yang berperan dalam pembelahan dan pemanjangan sel di ujung akar yaitu sitokinin dan giberelin. Jika pembelahan dan pemanjangan sel pada akar terhambat maka pertambahan panjang akar pun terhambat. Konsentrasi ekstrak 0% menghasilkan panjang akar yang cukup tinggi. Hal ini disebabkan karena akar dapat mencari daerah penyerapan yang lebih luas, selain itu tidak adanya alelokemi menyebabkan akar tumbuh normal (Rice 1984).

Hasil penelitian serupa tentang alelokemi juga dilaporkan oleh Batish et al. (2002) yang menyatakan bahwa *parthenin*, senyawa dari *Pharthenium hysterophorus*, dapat menghambat pertambahan panjang akar *Avena fatua* dan *Bidens pilosa*.

Jumlah daun

Organ tanaman utama yang berperan dalam menyerap radiasi matahari adalah daun. Untuk memperoleh laju pertumbuhan tanaman yang maksimum, diperlukan cukup banyak daun untuk menyerap sebagian besar radiasi matahari yang jatuh ke atas tajuk tanaman (Gardner et al. 1991).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh terhadap rata-rata jumlah daun sawi hijau tidak berbeda nyata, hal ini berarti pemberian ekstrak kirinyuh dari berbagai sumber maupun konsentrasi tidak memberikan pengaruh terhadap jumlah daun tanaman uji. Pemberian perlakuan ekstrak dengan konsentrasi yang semakin tinggi tidak menunjukkan adanya penurunan jumlah daun pada tanaman uji.

Tanaman yang hanya dipanen bagian daunnya, seperti kubis, selada, sawi, kangkung, dan bayam, membutuhkan unsur hara seperti nitrogen, fosfor, dan kalium dalam jumlah tinggi, sehingga berguna untuk membentuk asam amino dan protein sebagai bahan dasar dalam menyusun daun (Haryanto 2003). Novizan (2005) juga menyatakan bahwa nitrogen, fosfor, dan kalium merupakan unsur hara yang berperan besar dalam menaikkan potensi

pembentukan daun. Menurut Suntoro et al. (2001) dalam Kastono (2005), kirinyuh mengandung unsur nitrogen, fosfor, dan kalium dalam jumlah yang cukup. Apabila unsur hara tersebut diberikan dalam jumlah banyak, tanaman akan tampak subur, ukuran daun menjadi lebih besar, dan batang menjadi lunak serta berair. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Nataniel et al. (2006) yang menyatakan bahwa perlakuan pemberian pupuk organik cair lamtoro dengan konsentrasi yang semakin tinggi pada tanaman sawi menghasilkan jumlah daun yang banyak. Hal ini disebabkan suplai nitrogen pada tanaman semakin banyak, sehingga proses pertumbuhannya semakin cepat.

Pemberian ekstrak di sekeliling tanaman dalam hal ini merupakan faktor luar (lingkungan) yang dapat mempengaruhi jumlah daun. Namun, pengaruh tersebut tidak terlalu nyata jika dibandingkan dengan faktor dari dalam (genetik) (Gardner et al. 1991).

Luas daun

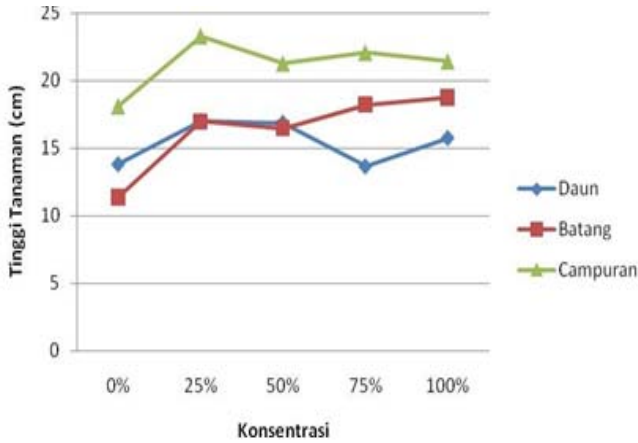
Selain jumlah daun, untuk mengetahui pertumbuhan suatu tanaman juga dapat dilihat dari luas daun yang merupakan salah satu komponen pertumbuhan yang penting. Permukaan daun yang luas dan datar memungkinkan daun untuk menangkap cahaya semaksimal mungkin dan meminimalkan jarak yang harus ditempuh oleh CO₂ dari permukaan daun ke kloroplas (Gardner et al. 1991).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh terhadap luas daun tanaman sawi hijau berbeda nyata yang berarti pemberian ekstrak kirinyuh mempengaruhi pertumbuhan luas daun tanaman uji. Pada pemberian ekstrak daun kirinyuh dengan konsentrasi yang semakin tinggi tidak menunjukkan adanya penurunan terhadap hasil luas daun, tetapi pemberian ekstrak pada konsentrasi 25% menghasilkan nilai luas daun tertinggi dibandingkan perlakuan yang lain. Pemberian ekstrak batang dan campuran dalam berbagai konsentrasi menghasilkan nilai rata-rata luas daun yang relatif sama. Pada kedua sumber ekstrak tersebut, konsentrasi 75% menghasilkan nilai luas daun tertinggi.

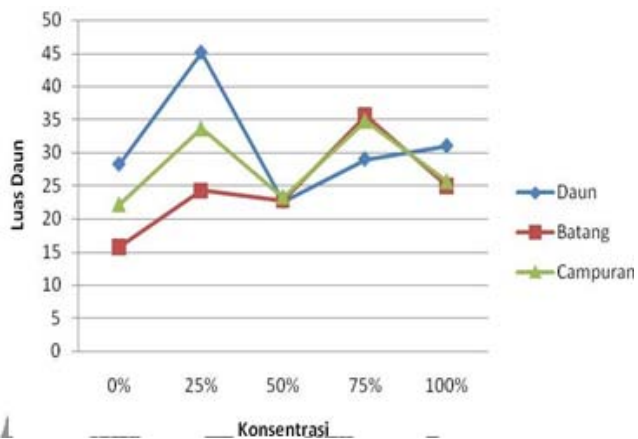
Pada fase vegetatif tanaman, luas daun akan semakin meningkat, sehingga tanaman akan semakin efisien dalam melakukan fotosintesis dan memanfaatkan unsur hara yang diambil bersama air yang akan digunakan untuk membentuk karbohidrat (Sumarni dan Rosliani 2001). Sarief (1989) menyatakan bahwa apabila unsur nitrogen yang tersedia lebih banyak serta dibantu kalium maka akan dihasilkan protein yang lebih banyak dan daun dapat tumbuh lebih lebar.

Gambar 2 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun kirinyuh pada konsentrasi 25% mampu meningkatkan luas daun tanaman sawi hijau dibandingkan pemberian konsentrasi yang tinggi. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Kastono (2005), yang menunjukkan bahwa perlakuan pemberian kompos kirinyuh pada kedelai hitam dengan tiga konsentrasi berbeda, yaitu 10 ton/ha, 20 ton/ha, dan 30 ton/ha, menghasilkan luas daun optimal pada konsentrasi 20 ton/ha meskipun tidak berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Diduga C/N rasio pada takaran kompos 20 ton/ha lebih optimum, sehingga bahan organik

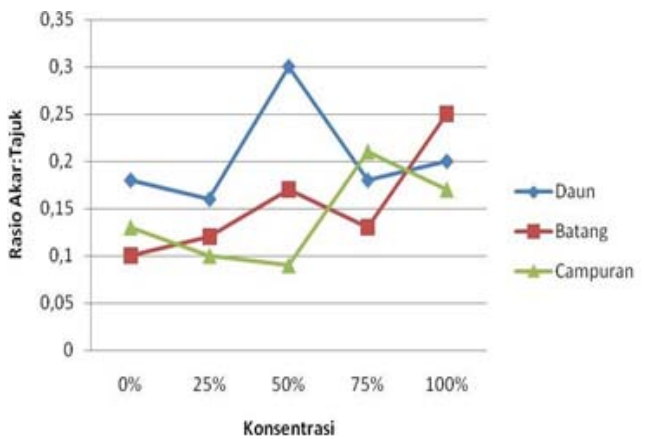
tersebut semakin cepat terdekomposisi dan tersedia bagi tanaman serta menunjang pertumbuhan tanaman, dalam hal ini adalah luas daun.



Gambar 1. Pengaruh pemberian ekstrak kirinyuh terhadap tinggi tanaman sawi hijau (cm)



Gambar 2. Pengaruh pemberian ekstrak kirinyuh terhadap luas daun sawi hijau (cm²)



Gambar 3. Pengaruh pemberian ekstrak kirinyuh terhadap rasio akar:tajuk sawi hijau

Pemberian ekstrak kirinyuh pada konsentrasi 50% dari berbagai sumber ekstrak menunjukkan rata-rata luas daun yang relatif hampir sama (Gambar 2), diduga konsentrasi tersebut mengandung unsur hara seperti nitrogen, fosfor, dan kalium dalam jumlah yang sama. Apabila ketiga unsur hara tersebut tersedia dalam jumlah sedikit maka protein yang dihasilkan sedikit dan daun tidak dapat tumbuh dengan maksimal.

Berat basah tanaman

Berat basah tanaman menunjukkan aktivitas metabolisme tanaman. Nilai berat basah dipengaruhi oleh kadar air jaringan, unsur hara, dan hasil metabolisme. Berat segar menggambarkan kandungan air dan kelembapan tanaman. Sekitar 500 g air diperlukan untuk menghasilkan 1 g bahan kering. Sekitar 1 g atau 10% air tersebut menjadi bagian terpadu tanaman dan sisanya hilang melalui stomata pada daun selama penyerapan karbon dioksida (Fitter dan Hay 1981; Salisbury dan Ross 1995; Sitompul dan Guritno 1995).

Hasil analisis varians terhadap berat basah tanaman sawi hijau tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata, hal ini berarti antara ekstrak daun, batang, maupun campuran tidak ada yang dominan dalam mempengaruhi berat basah tanaman sawi hijau. Konsentrasi ekstrak daun kirinyuh 25% pada masing-masing sumber ekstrak memberikan nilai tertinggi terhadap berat basah tanaman sawi hijau, sedangkan konsentrasi 50% sampai 100% memberikan hasil berat basah tanaman sawi hijau yang relatif hampir sama, kecuali pada pemberian ekstrak daun yang menghasilkan nilai berat basah di bawah kontrol. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Rizqiani et al. (2007), yaitu perlakuan pemberian pupuk organik cair pada tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan tiga konsentrasi yaitu 1%, 2%, dan 3% per polibag menghasilkan nilai berat basah optimal pada konsentrasi 2%. Hal ini diduga akibat pemberian hara pada tanaman yang tepat dan seimbang, sehingga dapat meningkatkan nilai berat basah tanaman.

Dwijoseputro (1994) menyatakan bahwa berat segar tanaman dipengaruhi oleh kandungan unsur hara dalam sel-sel jaringan tanaman. Pertumbuhan akar dan daun yang cepat menyebabkan penyerapan unsur hara, air, dan cahaya untuk proses fotosintesis lebih optimal, asimilat yang dihasilkan digunakan untuk perkembangan tanaman yang bertambah cepat, sehingga berat segar tanaman akan bertambah. Menurut Foth (1994), kelembapan tanah penting dalam mempengaruhi laju pergerakan dan fungsi ion ke dalam sel-sel akar, hal ini terkait dengan tingkat kelarutan hara di dalam tanah. Ketersediaan air yang meningkat dapat meningkatkan kelarutan N di dalam tanah, sehingga tanaman mendapatkan pasokan N yang cukup, akibatnya pertumbuhan vegetatif akan semakin lebat dan berat basah tanaman semakin meningkat. Ratna (2002) menyatakan bahwa dengan luas daun yang tinggi dapat membentuk dan menyimpan zat hara lebih banyak, sehingga terjadi peningkatan berat basah tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh berpengaruh nyata terhadap luas daun tanaman uji tetapi tidak berpengaruh nyata terhadap berat basah tanaman, hal

ini dikarenakan pemberian ekstrak kirinyuh cenderung menurunkan luas daun tanaman uji, sehingga fotosintat yang dihasilkan tidak mampu meningkatkan berat basah tanaman.

Pengaruh alelokemi dalam menurunkan berat basah tanaman diantaranya dengan menghambat pengikatan unsur hara dalam tanah, sehingga kemampuan sel akar dalam menyerap ion dari dalam tanah tidak maksimal. Hal tersebut menyebabkan pertumbuhan vegetatif tanaman menjadi terhambat karena sedikitnya hara yang diserap, sehingga berat basah menurun (Sastroutomo 1990).

Berat kering tanaman

Berat kering tanaman adalah hasil keseimbangan antara pengambilan CO₂ (fotosintesis) dan pengeluaran CO₂ (respirasi). Fotosintesis mengakibatkan meningkatnya berat kering tanaman akibat pengambilan CO₂, sedangkan proses katabolisme respirasi menyebabkan pengeluaran CO₂ dan mengurangi berat kering (Gardner et al. 1991).

Hasil analisis menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh dari berbagai sumber dan konsentrasi tidak mempengaruhi berat kering tanaman sawi hijau. Hal ini berarti ekstrak daun, batang, maupun campuran tidak ada yang lebih dominan dalam mempengaruhi berat kering tanaman sawi hijau, tetapi pemberian ekstrak dengan konsentrasi yang semakin tinggi menunjukkan adanya kecenderungan penurunan berat kering tanaman uji. Penurunan berat kering menunjukkan penghambatan tersebut disebabkan oleh adanya gangguan fisiologis dalam tubuh tanaman, seperti kerusakan struktur sel yang disebabkan oleh pemberian ekstrak kirinyuh. Walters dan Gilmore (1976) melaporkan bahwa efek alelopati dari *Festuca arundinaceae* Shreb. menyebabkan penurunan berat kering *Liquidambar styraciflua* L. dengan merusak kemampuan tanaman dalam menyerap fosfor dan nitrogen.

Rice (1984) menyatakan bahwa alelokimia secara tidak langsung dapat berpengaruh pada tanaman dengan menghambat mikroorganisme di dalam tanah yang berperan dalam fiksasi nitrogen dan menyebabkan tanaman kekurangan unsur tersebut. Ratna (2002) mengemukakan bahwa apabila unsur hara tersedia dalam kondisi seimbang maka dapat meningkatkan pertumbuhan vegetatif dan bobot kering tanaman. Akan tetapi, apabila ketersediaan unsur hara dalam kondisi kurang atau lebih maka akan dihasilkan bobot kering yang rendah. Selain itu, berat kering tanaman juga dipengaruhi oleh keseimbangan antara pengambilan CO₂ (fotosintesis) dan pengeluaran CO₂ (respirasi). Apabila respirasi lebih besar dibanding fotosintesis, berat kering tanaman akan berkurang. Penurunan berat kering tersebut sesuai dengan hasil penelitian Cahyanti et al. (2005), bahwa ekstrak akar dan pucuk dari *Acalypha indica* dapat menurunkan berat kering *Portulaca oleracea* pada konsentrasi 5000-10000 ppm. Begitu juga dengan Batish et al. (2002) yang melaporkan bahwa senyawa *parthenin* dari *Pharthenium hysterophorus* dapat menurunkan berat kering *Avena fatua* dan *Bidens pilosa*.

Rasio akar:tajuk

Rasio akar:tajuk merupakan perbandingan antara biomassa akar dibagi dengan biomassa tajuk. Rasio akar:tajuk dilakukan untuk mengetahui tingkat perkembangan tanaman, baik akar maupun daun, pada perlakuan yang diberikan. Menurut Fitter dan Hay (1981), rasio akar:tajuk merupakan sifat yang sangat plastis (mudah berubah). Rasio akar:tajuk meningkat akibat beberapa faktor, seperti rendahnya suplai air, rendahnya suplai nitrogen, rendahnya oksigen tanah, dan rendahnya suhu tanah. Rasio akar:tajuk merupakan indikator yang baik tentang pengaruh lingkungan terhadap pertumbuhan tanaman.

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh terhadap rasio akar:tajuk sawi hijau berbeda nyata. Pemberian ekstrak kirinyuh dalam berbagai sumber dengan konsentrasi yang semakin tinggi cenderung meningkatkan rasio akar:tajuk tanaman uji. Pemberian ekstrak daun kirinyuh pada konsentrasi 50% memberikan nilai tertinggi yang jauh di atas kontrol dan konsentrasi lainnya.

Gambar 3 menunjukkan bahwa sawi hijau yang diberi perlakuan ekstrak kirinyuh cenderung memiliki rasio akar:tajuk yang lebih tinggi apabila dibandingkan dengan kontrol. Nilai rasio akar:tajuk sawi hijau pada perlakuan ekstrak daun konsentrasi 50% menunjukkan hasil tertinggi dibandingkan konsentrasi lainnya, baik dari sumber ekstrak yang sama atau sumber ekstrak yang berbeda.

Berat kering tajuk lebih besar dibandingkan akar, karena fotosintat lebih banyak digunakan untuk perkembangan tajuk daripada perkembangan akar. Penyerapan garam mineral sebagian dikendalikan oleh tajuk. Tajuk akan merangsang akar untuk meningkatkan penyerapan garam mineral dan secara cepat menggunakan garam mineral tersebut dalam produk pertumbuhan (misalnya protein, asam nukleat, dan klorofil). Tajuk memasok karbohidrat melalui floem yang digunakan akar untuk melakukan respirasi yang akan menghasilkan ATP (Salisbury dan Ross 1995).

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kirinyuh yang diberikan melalui tanah menyebabkan semakin rendahnya suplai hara yang diserap oleh akar. Umumnya rasio akar:tajuk meningkat saat kondisi suplai air, suplai nitrogen, ketersediaan oksigen, dan temperatur tanah yang rendah. Tanaman dalam kondisi stres sering mengalokasikan hasil fotosintesisnya lebih besar ke dalam organ-organ dalam tanah dibandingkan saat kondisi lingkungan normal (Fitter dan Hay 1981). Hal itulah yang menyebabkan rasio akar:tajuk semakin meningkat seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan.

Kadar klorofil

Klorofil banyak terdapat di daun dan bagian tanaman lainnya dengan karakteristik berwarna hijau dan berperan dalam proses fotosintesis tanaman. Klorofil berada dalam kloroplas, tempat berlangsungnya fotosintesis. Pigmen-pigmen yang terdapat di dalam membran tilakoid akan menyerap cahaya yang berasal dari matahari atau sumber lain, kemudian mengubah energi cahaya menjadi energi kimia dalam bentuk adenosin trifosfat (ATP) (Lakitan

1993). Semakin banyak kandungan klorofil maka kemungkinan terjadinya proses fotosintesis akan berjalan lebih cepat, sehingga fotosintat yang dihasilkan pun lebih tinggi. Fotosintat digunakan untuk memenuhi kebutuhan tanaman, pertumbuhan, serta sebagai cadangan makanan.

Hasil analisis varian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh terhadap kadar klorofil tanaman sawi hijau tidak berbeda nyata, hal ini berarti bahwa pemberian ekstrak kirinyuh dari berbagai sumber dan konsentrasi tidak memberikan pengaruh terhadap kadar klorofil tanaman sawi hijau. Meskipun demikian, kadar klorofil tanaman sawi hijau dengan perlakuan pemberian ekstrak daun dalam berbagai konsentrasi menghasilkan nilai kadar klorofil di bawah kontrol. Hal ini diduga ekstrak daun memiliki senyawa alelopati yang mempengaruhi kadar klorofil tanaman uji. Pada perlakuan pemberian ekstrak batang dengan konsentrasi yang semakin tinggi cenderung menurunkan kadar klorofil tanaman uji, sedangkan pemberian ekstrak campuran konsentrasi 75% memberikan hasil tertinggi terhadap kadar klorofil tanaman sawi hijau. Diduga ekstrak campuran konsentrasi 75% mengandung unsur hara seperti N, Mg, dan Fe yang cukup, sehingga sintesis klorofil berlangsung dengan maksimal.

Alelokemi dari ekstrak yang diberikan melalui tanah dapat menghambat penyerapan unsur hara oleh akar, sehingga berpengaruh pada sintesis klorofil. Pembentukan klorofil dipengaruhi oleh adanya N, Mg, Fe, Mn, Cu, dan Zn. Kandungan nutrisi yang berkurang mempengaruhi fotosintesis, terutama dengan mempengaruhi peralatan fotosintesis (Gardner et al. 1991).

Rice (1984) menyatakan bahwa komponen alelopati diduga menghambat sintesis prekursor porfirin pada biosintesis klorofil. Yang et al. (2002) menduga bahwa penurunan klorofil yang disebabkan oleh alelokemi menghambat biosintesis klorofil atau merangsang mekanisme penurunan klorofil. Alelokemi terbukti menurunkan kandungan klorofil padi dan juga porfirin seiring dengan kenaikan konsentrasi yang berupa fenol. Senyawa fenol tidak berefek pada penurunan persentase Mg-Proto, tetapi dapat memperlambat sintesisnya dan meningkatkan protoporfirin IX (*Proto*) dan protoklorofilid (*Pchl_a*) secara berturut-turut. Penelitian Yang et al. (2004) menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenol dapat menurunkan kandungan klorofil pada *Oryza sativa* dengan cara menghambat biosintesis klorofil. Biosintesis tersebut terhambat akibat turunya kerja Mg-chetolase dalam menghasilkan Mg-proto. Terhambatnya biosintesis klorofil pada akhirnya akan menurunkan fotosintesis.

Viles dan Reese (1996) mengungkapkan bahwa senyawa yang terdapat pada *Echinacea angustifolia* dapat mempengaruhi kadar klorofil *Lactuca sativa*. Ekstrak akar dan pucuk *E. angustifolia* berupa gas dapat menurunkan kadar klorofil pada *L. sativa*. Ekstrak akar dan pucuk *E. angustifolia* yang berbentuk gas memiliki potensi alelopati lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak akar dan pucuk berbentuk cair. Menurut Einhellig (1995) pada tanaman *Glycine max*, kadar klorofil dan laju fotosintesisnya menurun akibat adanya asam fenolat.

Kadar karotenoid

Karotenoid merupakan pigmen alami berwarna kuning, oranye, dan merah yang tersebar luas pada jaringan fotosintesis tumbuhan. Fungsi karotenoid adalah sebagai pigmen tumbuhan dan pelindung kloroplas dari kerusakan saat penyerapan cahaya pada jaringan fotosintesis (Lea dan Leegood 1993).

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kirinyuh dari berbagai sumber dan konsentrasi terhadap kadar karotenoid tanaman sawi hijau tidak berbeda nyata. Kadar karotenoid semua tanaman yang diberi perlakuan memberikan nilai yang relatif hampir sama. Pemberian ekstrak daun dan batang dengan konsentrasi yang semakin tinggi cenderung menurunkan kadar karotenoid tanaman uji.

Alelokemi menyebabkan turunya aktivitas akar dalam menyerap hara, sehingga fotosintesis terganggu. Kedua hal tersebut lebih disebabkan karena rusaknya struktur sel yang didahului oleh rusaknya membran sel kemudian disusul oleh rusaknya organel-organel sel seperti kloroplas, mitokondria, dan nukleus. Rusaknya organel-organel tersebut juga didahului oleh rusaknya masing-masing membran kemudian strukturnya menjadi tidak jelas (Einhellig 2002). Karotenoid terdapat di membran plastida dan memiliki membran ganda. Salah satu jenis plastida yang terpenting adalah kloroplas. Kloroplas membentuk dan menampung karotenoid (Zaripheh dan Erdman 2002). Penurunan kadar karotenoid dapat disebabkan karena rusaknya kloroplas. Apabila kloroplas mengalami kerusakan maka biosintesis karotenoid dapat terhambat.

Biosintesis karotenoid dimulai dari pembentukan prenil pirofosfat pada plastida tumbuhan yang merupakan perintis biosintesis karotenoid. Prenil pirofosfat dibentuk oleh transferase prenil, setelah itu membentuk dimetilalil pirofosfat (DMAPP) menjadi isopentenil pirofosfat (IPP). Kemudian disintesis geranyl geranyl pirofosfat (GGPP). Kondensasi 2 molekul GGPP membentuk prefitoen pirofosfat sebagai suatu intermediet (sintesis fitoen). Fitoen dibentuk dengan pembuangan kelompok pirofosfat. Selanjutnya, konversi fitoen menjadi likopen yang membentuk berbagai macam karotenoid (Hirschberg et al. 1997; Sandmann 2000).

Hasil penelitian mengenai potensi alelopati dari ekstrak kirinyuh terhadap sawi hijau secara umum belum menunjukkan adanya efek penghambatan karena tidak semua variabel yang diamati terhambat pertumbuhannya. Meskipun demikian, terdapat kecenderungan penurunan nilai pada beberapa variabel seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak.

Ekstrak kirinyuh memang memiliki potensi alelopati karena memiliki beberapa senyawa metabolit sekunder, namun penghambatannya belum terlihat secara nyata. Pada pemberian ekstrak kirinyuh konsentrasi rendah, umumnya dihasilkan nilai pertumbuhan sawi hijau yang optimal, sedangkan pemberian ekstrak konsentrasi tinggi menyebabkan penghambatan pertumbuhan sawi hijau.

Hasil analisis varians menunjukkan bahwa ekstrak daun kirinyuh paling menghambat hampir seluruh variabel pertumbuhan tanaman sawi hijau apabila dibandingkan dengan ekstrak batang maupun ekstrak campuran. Hasil ini

serupa dengan penelitian yang dilakukan Suwal et al. (2010) tentang efek alelopati kirinyuh terhadap perkecambahan dan pertumbuhan padi, dimana ekstrak daun kirinyuh memberikan efek penghambatan terbesar pada perkecambahan dan pertumbuhan padi dibandingkan ekstrak batang maupun ekstrak akar. Phan et al. (2001) menyatakan bahwa daun dari tanaman tersebut kaya akan flavonoid, yaitu tanin, *quercetin*, *sinensetin*, *sakuranetin*, *padmatin*, *kaempferol*, dan *salvagenin*. Menurut Putnam (1988), hampir semua senyawa tersebut diketahui berpotensi sebagai agen alelopati.

Senyawa alelokemi mempunyai efek tidak spesifik terhadap spesies tertentu dan dapat berperan sebagaimana penghambatan yang dilakukan oleh herbisida (Wu et al. 1998). Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dikatakan bahwa tanaman kirinyuh berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai herbisida alami pada lahan budi daya sawi hijau. Namun, masih perlu diteliti lebih lanjut mengenai pengaruh ekstrak kirinyuh terhadap gulma yang umum tumbuh di lahan budi daya sawi hijau.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak kirinyuh tidak berpengaruh nyata terhadap persentase perkecambahan sawi hijau, tetapi berpengaruh nyata terhadap waktu perkecambahan sawi hijau, dimana sebagian benih mulai berkecambah pada hari kedua dan seluruh benih berkecambah pada hari kelima. Pemberian ekstrak kirinyuh dengan konsentrasi yang semakin tinggi meningkatkan tinggi tanaman dan rasio akar:tajuk, tetapi cenderung menurunkan luas daun tanaman uji. Pemberian ekstrak kirinyuh tidak berpengaruh nyata terhadap panjang akar, jumlah daun, berat basah, berat kering, kadar klorofil, dan karotenoid tanaman sawi hijau.

DAFTAR PUSTAKA

- Batish DR, Singh HP, Kohli RK et al. 2002. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. *Environ Exp Bot* 47(2): 149-155.
- Cahyanti ID, Anggarwulan E, Mudyantini W. 2005. Pertumbuhan, kadar klorofil dan nitrogen total gulma krokot (*Portulaca oleracea* Linn.) pada pemberian ekstrak anting-anting (*Acalypha indica* Linn.). *Biosmart* 7(1): 27-31.
- Cahyono B. 2003. Teknik dan strategi budidaya sawi hijau. Yayasan Pustaka Nusatama, Jakarta.
- Darana S. 2006. Aktivitas alelopati ekstrak daun kirinyuh (*Chromolaena odorata*) dan salira (*Lantana camara*) terhadap pertumbuhan gulma di perkebunan teh. *Jurnal Pusat Penelitian Teh dan Kina* 9(1): 2-8.
- Dwijoseputro. 1994. Pengantar fisiologi tumbuhan. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Einhellig FA. 1995. Allelopathy: Current status and future goals. In: Inderjit, Dakshini KMM, Einhellig FA (eds). *Allelopathy: Organisms Processes and Applications*. ACS Symposium Series 582. American Chemical Society, Washington DC.
- Einhellig FA. 2002. The physiology of allelochemical action: Clues and views. In: Reigosa MJ, Pedrol N (eds.). *Allelopathy from Molecules to Ecosystems*. Science Publisher New, Hampshire.
- Fitter AH, Hay RKM. 1981. Fisiologi lingkungan tanaman. (Diterjemahkan oleh: Andani S, Purbayanti ED). Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Foth HD. 1994. Dasar-dasar ilmu tanah. (Diterjemahkan oleh: Adisoemarto S). Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Gardner FP, Pearce RB, Mitchell RI. 1991. Fisiologi tanaman budidaya. (Diterjemahkan oleh: Susilo H). Universitas Indonesia Press, Jakarta.
- Hanolo W. 1997. Tanggapan tanaman selada dan sawi terhadap dosis dan cara pemberian pupuk cair stimulan. *Jurnal Agrotropika* 1(1): 25-29.
- Harbone JB. 1996. Metode fitokimia, penuntun cara modern menganalisa tumbuhan. (Diterjemahkan oleh: Padmawinata K, Soediro I). Penerbit ITB, Bandung.
- Haris A, Soemarno, Agustina L. 2002. Analisis perharan nitrogen tanaman sawi (*Brassica juncea* L.) pada berbagai perlakuan pupuk organik dan anorganik. Laporan Penelitian. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang.
- Haryanto E. 2003. Sawi dan selada. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Hendry GAF, Grime JP. 1993. *Methods in comparative plant ecology*. Chapman and Hall, London.
- Hirschberg J, Cohen M, Harker M et al. 1997. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plant and algae. *Chemistry* 69(10): 2151-2158.
- Ilory OJ, Otusanya OO, Adelusi AA et al. 2010. Allelopathic activities of some weeds in the Asteraceae family. *Int J Bot* 6: 161-163.
- Kamil. 1979. *Teknologi Benih 1*. Angkasa Raya. Anggota IKAPI, Padang.
- Kastono D. 2005. Tanggapan pertumbuhan dan hasil kedelai hitam terhadap penggunaan pupuk organik dan biopestisida gulma siam (*Chromolaena odorata*). *Ilmu Pertanian* 12(2): 103-116.
- Lakitan B. 1993. *Dasar-dasar fisiologi tumbuhan*. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lea PJ, Leegood RC. 1993. *Plant biochemistry and molecular biology*. John Wiley and Sons Ltd., London.
- Marthen LM. 2007. Pemanfaatan semak bunga putih (*Chromolaena odorata*) untuk peningkatan produksi tanaman dan ternak. Laporan Penelitian. Fakultas Peternakan Universitas Nusa Cendana, Kupang.
- Nataniel P, Robert L, Hamzah F. 2006. Pengaruh ekstrak daun lamtoro sebagai pupuk organik cair terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman sawi. *Jurnal Agrisistem* 2(2): 23-35.
- Noogler GR, Fritz GJ. 1983. *Introductory Plant Physiology*. Second edition. Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Novizan. 2005. *Petunjuk pemupukan yang efektif*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Okorogbona AOM, Van Averbek W, Ramusandiwa TD. 2011. Growth and yield response of chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis*) as affected by nutrient in air-dried and pulverized different types of animal manure using low biological activity soil. *World J Agric Sci* 7(1): 1-12.
- Onwugbuta, Enyi J. 2001. Allelopathic effects of *Chromolaena odorata* L. (R. M. King and Robinson – (Awolowo Plant)) toxin on tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill). *J Appl Sci Environ Manag* 5(1): 69-73.
- Phan TT, Wang L, See P et al. 2001. Phenolic compounds of *Chromolaena odorata* protect cultured skin cells from oxidative damage: Implication for cutaneous wound healing. *Biol Pharm Bull* 24: 1373-1379.
- Pracaya. 2005. *Bertanam sayur organik*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Pramiadi D, Suyitno AI. 2000. Uji daya alelopati ekstrak daun kleresede (*Gliricidia* sp.) melalui bioassay perkecambahan dengan biji sawi (*Brassica* sp.) dan biji bayam (*Amaranthus* sp.). Makalah. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Yogyakarta, Yogyakarta.
- Prawiradiputra BR. 2007. Kirinyuh (*Chromolaena odorata* (L.) R. M. King dan H. Robinson): Gulma padang rumput yang merugikan. *Wartazoa* 17(2): 12-18.
- Putnam AR. 1988. Allelopathy: Problem and opportunities in weed management. In: Altieri MA, Liebman M (eds). *Weed Management in Agroecosystem: Ecological Approaches*. CRC Press, Florida.
- Ratna DI. 2002. Pengaruh kombinasi konsentrasi pupuk hayati dengan pupuk organik cair terhadap kualitas dan kuantitas hasil tanaman teh (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) Klon Gambung 4. *Ilmu Pertanian* 10(2): 17-25.
- Rizqiani NF, Ambarwati E, Yuwono NW. 2007. Pengaruh dosis dan frekuensi pemberian pupuk organik cair terhadap pertumbuhan dan hasil buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) dataran rendah. *Jurnal Ilmu Tanah dan Lingkungan* 7(1): 43-53.
- Rice EL. 1984. *Allelopathy*. Second edition. Academic Press Inc., Orlando.
- Rukmana R. 2002. *Bertanam petsai dan sawi*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.

- Salisbury FB, Ross CW. 1995. Fisiologi tumbuhan. (Diterjemahkan oleh: Lukman DRD, Sumaryono). Penerbit ITB, Bandung.
- Sandmann G. 2000. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. Botanisches Institut, University Frankfurt, Frankfurt Germany.
- Sarieff ES. 1989. Kesuburan dan pemupukan tanah pertanian. Pustaka Buana, Bandung.
- Sastroutomo SS. 1990. Ekologi gulma. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Sitompul NM, Guritno B. 1995. Analisis pertumbuhan tanaman. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Sumarni N, Rosliani R. 2001. Media tumbuh dan waktu aplikasi larutan hara untuk penanaman cabai secara hidroponik. Jurnal Hortikultura 11(4): 237-243.
- Suntoro, Handayanto SE, Soemarno. 2001. Penggunaan bahan pangkasan kirinyu (*Chromolaena odorata*) untuk meningkatkan ketersediaan P, K, Ca, dan Mg. Agritivia 23(1): 20-26.
- Susanto R. 2002. Penerapan pertanian organik masyarakat dan pengembangan. Kanisius, Yogyakarta.
- Sutedjo MM. 1995. Pupuk dan cara pemupukan. PT. Rineka Cipta, Jakarta.
- Sutopo L. 2004. Teknologi benih. PT. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Suwal MM, Devkota A, Lekhak HD. 2010. Allelopathic effects of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson on seed germination and seedlings growth of paddy and Barnyard grass. Scientific World 8(8): 73-75.
- Teteki GS. 2010. Pengaruh ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) sebagai alelokemi terhadap perkecambah dan pertumbuhan bayam duri (*Amaranthus spinosus*) serta tomat (*Lycopersicon esculentum*). Laporan Penelitian. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Viles AL, Reese RN. 1996. Allelopathic potential of *Echinacea angustifolia* D.C. Environmental and Experimental Botany 36: 39-43.
- Walters DT, Gilmore AR. 1976. Allelopathic effects of fescue on the growth of sweetgum. J Chem Ecol 2: 469-479.
- Wu L, Guo X, Harivandi AM. 1998. Allelopathic effects of phenolic acids detected in buffalograss (*Buchloe dactyloides*) clippings on growth of annual bluegrass (*Poa annua*) and buffalograss seedlings. Environ Exper Bot 39: 159-167.
- Yang CM, Lee CN, Chou CH. 2002. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. Bot Bull Acad Sin 43: 299-304.
- Yang CM, Chang IF, Lin SJ et al. 2004. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: II. Simulation of consumption-orientation. Bot Bull Acad Sin 45(3): 119-125.
- Zaripheh S, Erdman JW. 2002. Factors in influences the bioavailability of xanthophylls. J Nutr 9(8): 531-534.

PEDOMAN UNTUK PENULIS

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

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telah disesuaikan, 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 telah ada tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

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

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

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

Jurnal:

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

Buku:

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

Bab dalam buku:

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

Abstrak:

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

Prosiding:

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

Skripsi, Tesis, Disertasi:

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

Informasi dari Internet:

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

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

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

Kemajuan Naskah. Pemberitahuan naskah dapat diterima atau ditolak akan diberitahukan sekitar satu bulan setelah pengiriman. Naskah dapat ditolak apabila materi yang dikemukakan tidak sesuai dengan misi jurnal, kualitas materi rendah, format tidak sesuai, gaya bahasa terlalu rumit, terjadi ketidakjajaran 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.

- Pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan pemberian ekstrak etil asetat rimpang temu ireng (*Curcuma aeruginosa*)** 31-35
- DINA SELVIA SARI, ARTINI PANGASTUTI, ELISA HERAWATI
- Uji aktivitas antifungi ekstrak etanol daun cabai jawa (*Piper retrofractum*) terhadap pertumbuhan *candida albicans*** 36-42
- EVI ROSYIDA SARI, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI
- Perbedaan kadar caffeic acid phenethyl ester pada propolis ekstrak etanol dan propolis ekstrak air** 43-47
- RIANI DWI HASTUTI, DIDING PRASETYO, SRI HARTATI HADINOTO
- Uji toksisitas fraksi aktif ekstrak etanol daun ginje (*Thevetia peruviana*) dengan metode Brine Shrimp Test dan profil kandungan kimia fraksi teraktif** 48-57
- VIANA NINGSIH, ESTU RETNANINGTYAS NUGRAHENI, OKID PARAMA ASTIRIN
- Perkecambahan dan pertumbuhan sawi hijau (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) setelah pemberian ekstrak kirinyuh (*Chromolaena odorata*)** 58-68
- NESSYA DAMAYANTI, ENDANG ANGGARWULAN, SUGIYARTO

