

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 1
NOMOR 1
PEBRUARI 2003
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126.

Tel./Faks. +6271-663375

Tel. +6271-646994 Psw. 387

Faks. +6271-646655.

E-mail: biology@mipa.uns.ac.id.

Online: www.biology.uns.ac.id.

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

Purin Candra Purnama

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso

Ratna Setyaningsih

Solichatun

Suratman

Surya Dewi Marlina

Tetri Widiyani

Venty Suryanti

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

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

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

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

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

Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L.

The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on callus growth and production flavonoid content on culture callus Acalypha indica L.

BEKTI RAHAYU, SOLICHATUN*, ENDANG ANGGARWULAN

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: olich@mipa.uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 19 Oktober 2002. Disetujui: 11 Nopember 2002.

Abstract. The Objectives of the research were to study the effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on callus initiation and growth, as well as on flavonoid content on *Acalypha indica* callus. The outline of the research was that *Acalypha indica* as a medicinal plant potentially to be developed by *in vitro* culture method. The addition of 2,4-D in culture medium could induce cell proliferation, meanwhile, it also affects callus growth and production. Completely randomized design with three replicates was used in this study. Data collected were analyzed using ANOVA and followed by DMRT with 5% confidence level. The research consists of two experiments. *Firstly*, to study the effect of medium Murashige and Skoog's composition on callus production. The media used in this experiment were medium MS and medium MS with 2,4-D 0,5 mg/L and kinetin 0,5 mg/L. *Secondly*, to study the effect of 2,4-D on callus growth with 4 concentrations (0 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L and 3 mg/L). The research variables were initiation time, weight change, texture and color of callus. Chlorophyll content was analyzed spectrophotometrically, but flavonoid content was analyzed using thin layer chromatography (TLC). The research on callus production stage indicated that 0,5 mg/L 2,4-D and 0,5 mg/L kinetin were better than 0 mg/L 2,4-D and 0 mg/L kinetin, and resulted in highest weight change at eight weeks (920 mg). Additional amount of 3 mg/L of 2,4-D resulted in the best growth of callus indicated by highest addition of weight (10160 mg) at eight weeks. The chlorophyll analysis showed that 0 mg/L 2,4-D produced highest chlorophyll content of 3,74 μ mol. The callus chlorophyll content would lower with rising 2,4-D concentration. The flavonoid analysis using TLC was negative on callus.

Key words: *Acalypha indica* L., 2,4-D, callus culture, callus growth, flavonoid.

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman sebagai bahan obat, terutama obat tradisional telah lama dilakukan masyarakat Indonesia. Tanaman *Acalypha indica* termasuk dalam famili Euphorbiaceae merupakan tanaman obat yang potensial dikembangkan. Daunnya yang berkhasiat obat sering digunakan untuk obat pencahar (cuci perut), peluruh batu ginjal, diabetes militus, serta anti biotik (Duryatmo, 2000; Heyne, 1987). Khasiat suatu tanaman berasal dari senyawa kimia yang terdapat di dalamnya. *A. indica* mengandung beberapa senyawa kimia yaitu flavonoid, saponin, tanin, dan minyak atsiri (Hutapea, 1993). Dari beberapa senyawa kimia tersebut, flavonoid diduga mempunyai peranan yang penting sebagai bahan obat. Sejauh ini penelitian mengenai induksi pembentukan dan pertumbuhan kalus serta kandungan flavonoid *A. indica* melalui teknik kultur *in vitro* belum banyak dilakukan.

Pembentukan dan pertumbuhan kalus dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya komposisi media tumbuh. Pertumbuhan dan perkembangan eksplan dipengaruhi oleh komposisi media yang digunakan (Gati dan Mariska, 1992). Media yang biasa digunakan dalam kultur *in vitro* adalah media

Murashige dan Skoog (MS). Media ini mempunyai konsentrasi garam organik yang lebih tinggi dibanding media lain (Husni, 1997). Salah satu komponen yang sering ditambahkan dalam media adalah auksin dan sitokinin. Pemakaian keduanya dalam konsentrasi tepat dapat mengatur arah dan kecepatan pertumbuhan jaringan (Gati dan Mariska, 1992; Indrayanto, 1988).

Dalam kultur *in vitro* tahap pertama yang perlu dilakukan yaitu menginduksi kalus dari eksplan. Pembentukan dan pertumbuhan kalus dapat dipacu dengan pemberian zat pengatur tumbuh, baik auksin maupun dikombinasikan dengan sitokinin. Teknik kultur *in vitro* juga dapat diaplikasikan untuk memproduksi senyawa kimia alami. Keuntungannya antara lain dapat diperoleh hasil secara cepat, seragam, dan tidak membutuhkan lahan yang luas (Indrayanto, 1988). Untuk meningkatkan produksi senyawa kimia pada kalus, maka dapat dilakukan manipulasi terhadap media kultur, misalnya dengan penambahan zat pengatur tumbuh tertentu (Toruan *et al.*, 1990).

Zat pengatur tumbuh auksin yang sering ditambahkan dalam media kultur adalah asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) (Syahid dan Hernani, 2001). Zat pengatur tumbuh ini bersifat stabil karena tidak mudah mengalami kerusakan oleh

cahaya maupun pemanasan pada waktu sterilisasi (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Penambahan 2,4-D dalam media akan merangsang pembelahan dan pembesaran sel pada eksplan sehingga dapat memacu pembentukan dan pertumbuhan kalus serta meningkatkan senyawa kimia alami flavonoid.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober 2001 s.d April 2002, di Sub-Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

Bahan yang diperlukan meliputi bahan tanaman berupa daun *Acalypha indica* L. muda dan bahan kimia yang meliputi akuades, deterjen cair, alkohol absolut, Natrium hipoklorit (NaClO), media dasar Murashige dan Skoog (MS), agar, asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D), kinetin, aseton 80%, amoniak, toluen, etil asetat, dan metanol. Adapun alat-alat yang digunakan meliputi botol kultur, cawan petri, skalpel, pinset, aluminium foil, autoklaf, laminar air flow cabinet (LAFC), magnetic stirrer, lampu bunsen, pH meter, mortar, tabung reaksi, kuvet, spektrofotometer, kertas saring Whatman no. 42, mikro pipet, lempeng silika gel 254, sentrifus, dan vortek.

Penelitian ini meliputi dua kegiatan yang dilakukan secara bertahap, yaitu pembentukan kalus dan penumbuhan kalus. Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan satu faktor yaitu asam 2,4-diklorofenoksi asetat dengan tiga taraf yang meliputi D₀ (konsentrasi 2,4-D 0 mg/L), D₁ (konsentrasi 2,4-D 1 mg/L, D₂ (konsentrasi 2,4-D 2 mg/L), dan D₃ (konsentrasi 2,4-D 3 mg/L) masing-masing dengan tiga ulangan.

Pelaksanaan penelitian meliputi pembentukan kalus yaitu: daun *A. indica* disterilkan dengan alkohol 5% selama 5-10 detik kemudian direndam dalam kloroks 5% selama 5-10 menit dan dibilas sebanyak tiga kali dengan akuades. Eksplan yang sudah steril dipotong dengan ukuran 1 x 1 cm², kemudian ditanam dalam media pembentukan kalus, dan disimpan dalam rak kultur di ruang inkubasi dengan suhu ± 25°C, selama delapan minggu. Intensitas cahaya yang diberikan sebesar 20 watt selama 24 jam per hari. Penanaman kalus pada media perlakuan yaitu kalus yang diperoleh dipotong ± 500 mg dan ditanam dalam media perlakuan.

Parameter yang diamati pada uji sterilisasi berupa kemungkinan adanya kontaminasi yang diamati secara langsung dengan melihat ciri-ciri umum koloni mikroorganisme. Pada tahap pembentukan kalus parameter yang diamati meliputi saat muncul kalus, tekstur dan warna kalus, serta pertambahan berat basah kalus, sedang pada tahap pertumbuhan kalus parameter yang diamati meliputi berat basah dan berat kering kalus, tekstur dan warna kalus, kandungan klorofil dan kandungan flavonoid.

Analisis data dilakukan dengan menggunakan analisis varian (ANOVA) taraf 5% dan apabila terdapat beda nyata dilanjutkan dengan uji Duncan (DMRT) taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sterilisasi eksplan

Dari berbagai metode sterilisasi eksplan yang dilakukan diperoleh sterilan terbaik yaitu alkohol 10% selama 10 detik dan kloroks 5% selama 5 menit (Tabel 1.). Metode sterilisasi terbaik ditandai dengan rendahnya tingkat kontaminasi dan tingginya tingkat kesegaran jaringan. Metode ini digunakan pada perlakuan selanjutnya.

Tabel 1. Uji sterilan pada eksplan daun *A. indica*.

No	Sterilan	Kesegaran jaringan	Jenis kontaminan
1	Alkohol 50%, 10 detik Kloroks 10%, 10 menit	-	-
2	Alkohol 25%, 10 detik Kloroks 10%, 10 menit	-	Jamur ++ Bakteri +
3	Alkohol 10%, 10 detik Kloroks 5%, 10 menit	-	Jamur ++ Bakteri +
4	Alkohol 10%, 10 detik Kloroks 5%, 5 menit	++	-
5	Alkohol 5%, 5 detik Kloroks 5%, 10 menit	+	Jamur + Bakteri ++

Keterangan: Kesegaran jaringan: (-) tidak segar, (+) (kurang segar), ++ (segar). Jumlah kontaminan: (++) sedang, (+) sedikit, (-) tidak ada.

Induksi pembentukan kalus

Pemunculan kalus

Hasil pengamatan terhadap saat muncul kalus dari eksplan yang ditanam pada media A dan media B disajikan pada Tabel 2. Dari hasil sidik ragam, antara media A dan media B terdapat beda nyata untuk saat muncul kalus. Kalus muncul pada permukaan eksplan dan dari luka irisan secara serentak, ditandai dengan membengkaknya eksplan dan munculnya bintik-bintik putih. Pada media A kalus muncul 14,33 hari setelah dikulturkan. Pada media B kalus muncul lebih cepat yaitu 8,33 hari setelah dikulturkan. Asam 2,4-diklorofenoksiasetat (2,4-D) pada konsentrasi 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L mampu merangsang pembelahan sel daun dan melakukan proses dediferensiasi untuk membentuk kalus lebih cepat. Hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Gati dan Mariska (1992), 2,4-D efektif untuk memacu pembentukan kalus karena aktivitasnya yang kuat untuk memacu proses dediferensiasi sel, menekan organogenesis serta menjaga pertumbuhan kalus. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keberadaan kinetin pada konsentrasi 0,5 mg/L dalam media mendukung pembentukan kalus. Hal ini didukung pendapat Dixon dalam Setiti dkk, (1996) yang mengemukakan bahwa media dengan penambahan sitokinin akan menaikkan proliferasi kalus.

Tabel 2. Saat muncul kalus dan pertambahan berat basah kalus *A. indica* pada media induksi pembentukan kalus.

Media	Rerata muncul kalus (hari)	Pertambahan berat basah kalus (mg)
Media A: MS dasar tanpa penambahan auksin dan kinetin	14,33 ^a	220 ^a
Media B: MS dasar dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L	8,33 ^b	920 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%.

Pada media A, meskipun tanpa penambahan zat pengatur tumbuh eksplan mampu membentuk kalus. Kalus yang muncul diduga disebabkan jaringan yang dikultur mempunyai auksin endogen yang cukup untuk membentuk kalus, meskipun tanpa penambahan auksin dari luar, selain itu juga disebabkan jaringan mempunyai kambium. Hal ini sesuai dengan pendapat Gunawan dalam Zulkarnain dan Hadiyono (1997) yang mengemukakan bahwa salah satu faktor penentu pada inisiasi kalus adalah ada atau tidaknya kambium pada eksplan. Bila eksplan mengandung kambium maka kalus dapat terbentuk.

Dari media A dan media B, munculnya kalus secara cepat ini diduga karena daun *A. indica* tipis dan tidak memiliki lapisan lilin, sehingga memudahkan eksplan untuk menyerap unsur hara dari media. Kalus merupakan proliferasi massa jaringan yang belum terdiferensiasi, sehingga semakin luas permukaan irisan eksplan maka kalus yang terbentuk semakin banyak dan cepat (Hendaryono dan Wijayani, 1994).

Pertambahan berat basah kalus

Pertambahan berat basah kalus pada media A dan media B disajikan pada Tabel 2. di atas. Pada media A pertambahan berat kalus yaitu 220 mg, sedang pada media B lebih tinggi yaitu 920 mg. Dari hasil pengamatan saat muncul kalus dan pertambahan berat basah kalus, diketahui bahwa media MS dengan penambahan zat pengatur tumbuh 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L lebih baik dari pada media MS tanpa penambahan ZPT untuk memacu pembentukan kalus. Dari hasil ini, maka media B dipilih sebagai media dasar pada perlakuan selanjutnya.

Tekstur dan warna kalus

Warna kalus yang dihasilkan dari media pembentukan kalus (media A dan media B) yaitu putih dan hijau. Kalus muda berwarna putih, kemudian warnanya akan berubah menjadi hijau dengan bertambahnya umur. Perbedaan warna kalus ini disebabkan adanya perubahan pigmentasi (Harjoko, 1999).

Kalus yang dihasilkan pada media A bertekstur agak remah pada bagian atas, sedang bagian bawahnya bertekstur kompak. Demikian pula pada media B, kalus bertekstur remah pada bagian atas

dan bagian bawahnya bertekstur kompak (Tabel 3.). Kalus yang remah dapat diperoleh dengan cara melakukan sub kultur berulang-ulang dengan media padat. Pembentukan kalus dipengaruhi oleh zat-zat tertentu dalam media seperti zat pengatur tumbuh. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Torrey dan Shigemura dalam Street (1972) pada tanaman *Pea* bahwa konsentrasi 2,4-D dan ekstrak khamir yang tinggi akan menghasilkan kalus bertekstur remah (*friable*).

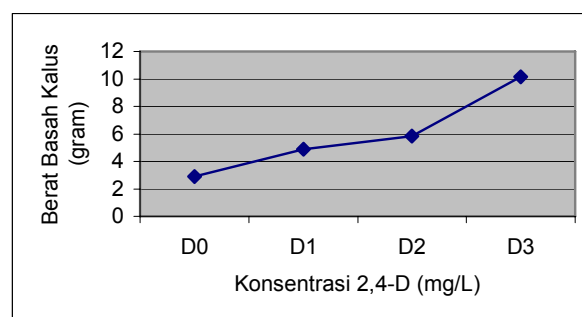
Tabel 3. Tekstur dan warna kalus *A. indica* pada media induksi pembentukan kalus.

Media	Tekstur dan warna kalus
Media A: MS dasar tanpa penambahan auksin dan kinetin	Agak remah (atas), kompak (bawah), hijau muda, putih
Media B: MS dasar dengan penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L	Remah (atas), kompak (bawah), hijau muda, putih

Pertumbuhan kalus

Berat basah kalus

Data hasil pengamatan berat basah kalus dan hasil analisis sidik ragam berat basah kalus disajikan pada Tabel 4. Dari Tabel ini dapat diketahui bahwa penambahan 2,4-D pada masing-masing konsentrasi menyebabkan terjadinya beda nyata terhadap berat basah kalus *A. indica* pada masing-masing perlakuan. Dari rata-rata berat basah setiap perlakuan, perlakuan D₃ memberikan nilai tertinggi diantara perlakuan yang lain yaitu 10160 mg, sedangkan perlakuan D₀ mempunyai nilai rata-rata terendah yaitu 2900 mg. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang digunakan, maka semakin meningkat berat basah kalus (Gambar 1.). Berat basah kalus yang besar ini disebabkan karena kandungan airnya yang tinggi. Berat basah yang dihasilkan sangat tergantung pada kecepatan sel-sel tersebut membelah diri, memperbanyak diri dan dilanjutkan dengan membesarnya kalus.



Gambar 1. Hubungan konsentrasi 2,4-D terhadap berat basah pada kalus *A. indica*.

Zat pengatur tumbuh auksin dan sitokinin yang diberikan pada perbandingan yang tepat dapat menginisiasi pembelahan sel dan meningkatkan pertumbuhan sel. Hal ini terjadi pada perlakuan D₃.

Pengaruh auksin terhadap pertumbuhan jaringan diduga menginduksi sekresi ion H^+ keluar melalui dinding sel. Pengasaman dinding sel menyebabkan K^+ diambil, pengambilan ini mengurangi potensial air dalam sel; akibatnya air mudah masuk ke dalam sel dan sel akan membesar (Harjoko, 1999; Maftuchah dkk, 1998).

Pada perlakuan D_0 (kombinasi 2,4-D 0,5 mg/l + kinetin 0,5 mg/l) rata-rata berat basah yang diperoleh paling rendah yaitu 2900 mg. Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi kedua ZPT pada taraf konsentrasi tersebut kurang tepat untuk pertumbuhan kalus. Kecepatan sel membelah diri dipengaruhi oleh kombinasi auksin dan sitokinin dalam konsentrasi tertentu, selain itu juga tergantung pada jenis tumbuhan faktor-faktor lain seperti jenis media, ketersediaan unsur hara makro/mikro, karbohidrat, adanya bahan tambahan seperti air kelapa dan juga faktor-faktor fisik seperti cahaya, pengocokan, suhu, dan pH media (Gunawan, 1991).

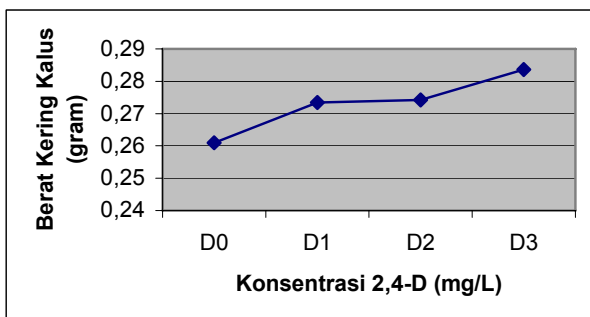
Berat kering kalus

Selain didasarkan pada berat basah, pertumbuhan kalus juga didasarkan pada berat keringnya. Dari hasil sidik ragam dapat diketahui bahwa pemberian ZPT auksin 2,4-D berpengaruh tidak nyata terhadap berat kering kalus. Dari rata-rata berat kering kalus maka penambahan 2,4-D 3 mg/L menunjukkan berat kering yang paling tinggi yaitu 280 mg. Pada konsentrasi 0 mg/L 2,4-D berat keringnya paling rendah yaitu 260 mg. Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D, maka berat kering kalus semakin tinggi. Rata-rata berat kering kalus 8 minggu setelah tanam disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata berat basah dan berat kering kalus *A. indica* 8 minggu setelah tanam (mg).

Perlakuan	D_0	D_1	D_2	D_3
Berat Basah	2900 ^a	4880 ^a	5850 ^a	10160 ^b
Berat Kering	260 ^a	270 ^a	270 ^a	280 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama dalam satu baris tidak berbeda nyata dengan DMRT taraf 5%. D_0 : konsentrasi 2,4-D 0 mg/L, D_1 : konsentrasi 2,4-D 1mg/L, D_2 : konsentrasi 2,4-D D_3 : konsentrasi 2,4-D 3 mg/L yang ditambahkan dalam media kultur.



Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi 2,4-D terhadap berat kering pada kalus *A. indica*.

Dari Gambar 2 dapat diketahui peningkatan berat kering kalus. Peningkatan ini disebabkan meningkatnya aktivitas kalus pada masing-masing perlakuan. Di dalam sel, 2,4-D diduga mempengaruhi metabolisme RNA, yang mengontrol metabolisme protein, yang kemungkinan dilakukan pada proses transkripsi molekul RNA (Maftuchah dkk, 1998). Kenaikan sintesis protein menyebabkan bertambahnya sumber tenaga untuk pertumbuhan.

Penggunaan auksin 2,4-D dapat memacu pertumbuhan kalus. Hal ini ditunjukkan dengan terjadinya pertambahan ukuran dan berat kering kalus yang tidak dapat balik. Pertumbuhan berkaitan dengan pertambahan volume dan jumlah sel, pembentukan protoplasma baru, pertambahan berat dan selanjutnya meningkatkan berat keringnya. Bahan kering ini terdiri dari bahan-bahan organik dan mineral yang penting untuk pertumbuhan kalus.

Kandungan klorofil dan karotenoid kalus

Pengukuran kandungan klorofil dan karotenoid dilakukan setelah panen. Kandungan klorofil yang diukur ialah kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total. Hasil analisis sidik ragam kandungan klorofil a, klorofil b, klorofil total dan karotenoid kalus *A. indica* menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan berpengaruh nyata (Tabel 5.).

Tabel 5. Rata-rata kandungan klorofil a, klorofil b, klorofil total dan karotenoid kalus *A. indica*. (μmol)

Kandungan	Perlakuan			
	D_0	D_1	D_2	D_3
Klorofil a	1,49 ^a	1,39 ^b	0,60 ^c	0,28 ^d
Klorofil b	2,24 ^a	2,15 ^b	1,80 ^c	0,28 ^c
Klorofil Total	3,74 ^a	3,54 ^b	2,46 ^c	1,97 ^d
Karotenoid	3,37 ^a	2,73 ^b	2,18 ^c	1,60 ^d

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama pada satu baris, tidak berbeda nyata dengan DMRT 5%.

Dari Tabel 5. diketahui bahwa kandungan klorofil a pada setiap perlakuan menunjukkan perbedaan dengan kontrol (D_0) dan terjadi penurunan yang besar dengan bertambahnya 2,4-D yang digunakan. Penurunan kandungan klorofil a berpengaruh terhadap penurunan kandungan klorofil b dan klorofil total. Klorofil a merupakan pigmen yang mampu mengkatalisis fotosintesis secara langsung. Klorofil a berperan dalam reaksi konversi energi radiasi menjadi energi kimia. Pigmen-pigmen lain seperti klorofil b dan karotenoid juga menyerap cahaya tetapi energi yang diserap ditransfer ke klorofil a kemudian baru digunakan

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa penambahan 2,4-D dalam media, pada semua konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap kandungan klorofil total (Tabel 5.). Secara visual hal ini juga dapat dibedakan dari warnanya, dengan meningkatnya konsentrasi auksin warna kalus semakin menguning. Hal ini berkaitan dengan berkurangnya pigmen klorofil pada kalus.

Dari Tabel 5. rata-rata pada setiap perlakuan menunjukkan bahwa kandungan klorofil tertinggi diperoleh pada perlakuan D₀ yaitu 3,74 μmol , sedang nilai terendah pada perlakuan D₃ yaitu 1,97 μmol . Semakin tinggi konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mempengaruhi penurunan kandungan klorofil dan karotenoid. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa kenaikan kadar auksin akan menurunkan kandungan klorofil (Kismonohadi, 1989). Penurunan kandungan klorofil ini diduga terjadi karena pengaruh auksin pada metabolisme karbohidrat. Audus (1963) mengemukakan bahwa penggunaan 2,4-D pada tanaman dapat mengganggu metabolisme karbohidrat. Sintesis klorofil dipengaruhi oleh karbohidrat yang merupakan zat pokoknya (Miller, 1959). Apabila metabolisme karbohidrat terganggu maka sintesis klorofil juga akan terganggu. Penurunan kandungan klorofil juga diikuti dengan penurunan karotenoid pada kalus.

Tekstur dan warna kalus pada media

Tekstur kalus *A. indica* pada media perlakuan menunjukkan hasil yang sama dengan media pembentukan kalus, yaitu kalus bersifat remah. Adapun warna kalus yang dihasilkan disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Tekstur dan warna kalus *A. indica* 8 minggu setelah tanam pada media perlakuan.

Perla- kuan	Tekstur kalus		Warna kalus	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
D0	Remah	Remah	Hijau, putih	Hijau, putih, kuning, putih kekuningan, kuning
D1	Remah	Remah	Hijau, putih	Hijau, putih, kuning
D2	Remah	Remah	Hijau, putih	Hijau, putih, kuning
D3	Remah	Remah	Hijau, putih	Putih, putih kekuningan, kuning, kuning- kecoklatan, coklat

Meningkatnya konsentrasi 2,4-D yang ditambahkan dalam media mengakibatkan warna kalus cenderung menguning. Hal ini tampak pada perlakuan D₃ dengan konsentrasi 2,4-D 3 mg/L, warna kalus yang dihasilkan yaitu putih, putih kekuningan, kuning, kuning kecoklatan dan coklat. Perubahan ini diduga karena adanya perubahan pigmentasi pada kalus yaitu berkurangnya pigmen hijau (klorofil). Pada perlakuan D₃ ini kalus menampakkan adanya pencoklatan. Hal ini diduga karena kalus terlalu lama berada dalam media kultur dan tidak segera disubkultur, sehingga kalus kehabisan nutrisi pada medianya untuk pertumbuhan.

Analisis kandungan flavonoid kalus *A. indica*

Analisis kandungan flavonoid pada kalus *A. indica* dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menunjukkan tidak adanya flavonoid, karena bercak warna kuning sebagai indikator adanya flavonoid tidak tampak pada *plate*, kecuali pada totalan ekstrak daun yang digunakan sebagai pembanding. Hal ini menunjukkan bahwa hasilnya negatif atau tidak ditemukan senyawa flavonoid (Tabel 7).

Tabel 7. Hasil analisis kandungan flavonoid kalus *A. indica* dengan kromatografi lapis tipis (KLT).

Perlakuan	Flavonoid
D ₀	-
D ₁	-
D ₂	-
D ₃	-
Ekstrak daun	+

Keterangan: (-): tidak mengandung flavonoid (+): mengandung flavonoid.

Dari semua konsentrasi asam 2,4-diklorofenoksiasetat yang digunakan pada media ternyata tidak berpengaruh terhadap kandungan senyawa flavonoid. Hal ini diduga 2,4-D yang ditambahkan dalam media seluruhnya digunakan untuk meningkatkan pembentukan dan pertumbuhan ukuran kalus, sehingga untuk pembentukan flavonoid berkurang atau tidak ada. Dalam sintesis flavonoid auksin berfungsi untuk meningkatkan kerja enzim fenilalanin amonia liase (PAL) yang menghasilkan sinamat dari fenilalanin. Jalur berikutnya yaitu pembentukan flavonoid dari malonil Co-A, apabila auksin berkurang maka pembentukan flavonoid juga berkurang. Robbins *et al.*, (1992) mengemukakan bahwa untuk menghasilkan senyawa fenol secara *in vitro* selain diperlukan penambahan zat pengatur tumbuh, juga perlu ditambahkan unsur lain seperti kasein hidrolisis, asam amino, dan NH₄NO₃ untuk membantu pertumbuhan kalus dan produksi senyawa kimia. Dalam kultur kalus *Liquidambar styraciflua* penambahan unsur-unsur tersebut efektif untuk pertumbuhan dan meningkatkan kandungan fenolnya.

KESIMPULAN

Penambahan 2,4-D 0,5 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L pada media Murashige dan Skoog (MS) dapat memacu pembentukan kalus *Acalypha indica*, dan penambahan 3 mg/L 2,4-D efektif untuk memacu pertumbuhan kalus *Acalypha indica*, ditandai dengan kenaikan berat basahya yaitu 10.160 gram dan berat kering 280 gram. Penambahan 2,4-D dengan konsentrasi 1 mg/L, 2 mg/L dan 3 mg/L pada media kultur kalus *Acalypha indica* belum mempengaruhi kandungan flavonoidnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Audus, L.J. 1963. *Plant Growth Substances*. New York: CRC Press, Inc.
- Duryatmo, S. 2000. Anting-anting lawan tanding sakit gula. *Trubus* 31 (373): 51-52.
- Gati, E dan I. Mariska. 1992. Pengaruh auksin dan sitokinin terhadap kalus **Mentha piperita** Linn. *Buletin Littri* 3: 1-4.
- Gunawan, L.W. 1991. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: PAU Bioteknologi IPB.
- Harjoko, D. 1999. *Pengaruh Macam-macam Auksin terhadap Poliploidisasi Kalus Tanaman Semangka pada Kultur in Vitro*. Surakarta: Fakultas Pertanian UNS.
- Hendaryono, D.P dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid II. Jakarta: Departemen Kehutanan.
- Husni, A. 1997. Perbanyakan dan penyimpanan tanaman Inggu melalui kultur jaringan. *Plasma Nutfah* 11 (1): 9-23.
- Hutapea, J.R. 1993. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* (II). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Indrayanto, G. 1988. *Kultur Jaringan Tanaman, Suatu Petunjuk Praktik untuk Bidang Farmasi*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Kismonohadi. 1989. *Pedoman Kuliah Biosintesis Alkaloid*. Yogyakarta: PAU Bioteknologi UGM.
- Maftuchah, Ardiana, H.K dan Joko, B.S. 1998. Induksi kalus **Artemisia (Artemisia vulgaris L.)** melalui kultur *in vitro*. *Tropika* 6 (2): 135-141.
- Miller, E.C. 1938. *Plant Physiology*. Second Edition. New York: Mc. Graw Hill Book Company, Inc.
- Robbins, M.P., T.R. Carron and P.Morris. 1992. Transgenic **Lotus corniculatus**: a model system for modification and genetic manipulation of condensed tannin biosynthesis. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks. (ed.) *Plant Polyphenols*. New York: Plenum Press.
- Setiti, E.W.U., Sri Puji A.W. dan T. Sudarti. 1996. Peranan media dan ZPT untuk induksi dan diferensiasi kalus pada budidaya jaringan melon. *Jurnal Hortikultura* 5 (5): 76-79.
- Street, H.E. 1972. *Plant Tissue and Cell Culture*. London: Blackwell Scientific.
- Syahid, S.F. dan Hernani. 2001. Pengaruh zat pengatur tumbuh terhadap pembentukan dan pertumbuhan serta kandungan sinensetin dalam kalus pada tanaman kumis kucing (**Orthosiphon aristatus**). *Jurnal Littri* 4: 99-103.
- Toruan, N.S., Solahudin, L. Winata, D. Sastra-pradja, dan K. Padmawinata. 1990. Pengaruh 2,4-D, kolesterol dan radiasi Co-60 terhadap pertumbuhan dan kandungan diosgenin dalam kultur jaringan **Costus speciosus**. *Forum Pasca Sarjana* 13 (1): 1-14.
- Zulkarnain dan Hadiyono. 1997. Mikropropagasi tanaman nenas (**Ananas comosus L. Merr.**) menggunakan tunas aksilar mahkota bunga sebagai material awal. *Buletin Agronomi Universitas Jambi* 1 (2): 65-69.

Sifat Fisik dan Kandungan NaCl Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) secara Oral

Physical characteristics and NaCl content of urine white male rat (Rattus norvegicus L.) after orally intakes of cogon grass rhizome (Imperata cylindrica L.) extract

SURATMAN, SHANTI LISTYAWATI*, SUTARNO

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: shant_l@mipa.uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 11 Agustus 2002. Disetujui: 15 Pebruari 2003.

Abstract. The aims of this research were to find out the effects of orally intakes of cogon grass rhizome (*Imperata cylindrica* L.) extract on physical characteristics and NaCl content of urine, and the dosage of the extract that able to significantly change the physical characteristics and the content of NaCl on the urine white males rat (*Rattus norvegicus* L.). Complete Randomized Design with six groups and five replications to each group was used in this study. The treatment applied for those groups were: aquadest 2 ml/200 g BW, HCT 0,32 mg/200 g BW, CMC 2% 2 ml/200 g BW, the cogon grass rhizome extract 5 mg/200 g BW, the cogon grass rhizome extract 10 mg/200 g BW and the cogon grass rhizome extract 20 mg/200 g BW for groups I to VI respectively. The parameters used for the physical characteristics of the urine were volume, color, clearness, pH, density and urine sediments. Analysis of NaCl content was done by Fantus method. Data collected were then analyzed using ANOVA and continued with DMRT test at the level of 5% significance. The result showed that orally intakes of cogon grass rhizome extract at all level dosages (5 mg/200 g BW, 10 mg/200 g BW and 20 mg/200 g BW) were significantly increased the volume of urine and reduced of NaCl content, but no effect on pH and density of the urine. Orally intakes of cogon grass rhizome extract have also resulted in changing of color, clearness and amount of urine sediment components.

Key words: Cogon grass, rhizome extract, male rat, urine, physical properties, NaCl.

PENDAHULUAN

Krisis ekonomi berkepanjangan yang dialami bangsa Indonesia sejak tahun 1997 berdampak negatif pada setiap bidang kehidupan masyarakat, khususnya kesehatan, dimana kualitas kesehatan masyarakat cenderung menurun akibat tingginya harga obat-obatan modern yang hampir seluruh bahan bakunya merupakan bahan impor. Hal ini mendorong masyarakat kembali berpaling pada pengobatan tradisional atau alternatif. Pada saat ini, berbagai jenis produk obat tradisional baik konvensional (produk yang terdiri dari satu atau beberapa bahan obat, diolah dan dikemas secara tradisional dalam bentuk serbuk), maupun fitofarmaka (produk yang telah diproses dengan teknologi sederhana hingga berbentuk infus, dekokta, dan ekstrak) telah dipasarkan dan beredar luas di masyarakat. Sehingga penelitian bahan obat tradisional banyak dikembangkan oleh lembaga pemerintah dan profesi untuk menggali potensi sumber daya alam, terutama sumber daya nabati Indonesia yang dikenal kaya akan keanekaragaman hayati (Loedin, 1999; Soedarso, 1999; Sidik, 1999).

Ilalang atau alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) merupakan salah satu gulma utama dalam dunia pertanian. Pemberantasan gulma ini tidak mudah

karena pertumbuhan yang relatif cepat dan adanya rimpang di dalam tanah sebagai sumber bibit tanaman baru (Atjung, 1982). Di balik sifatnya yang merugikan tersebut, sebagian masyarakat memanfaatkan bagian rimpang tanaman ini untuk bahan obat tradisional (Soerjani, 1970). Sehingga pada saat ini rimpang alang-alang dijual di berbagai pasar swalayan dalam kemasan ikatan kecil sebesar 100 g (Chairul, 2000). Rimpang alang-alang berbentuk bulat, panjang, halus, mirip batang bambu kecil, warna putih kekuningan, rasa sedikit manis, dan bersih (Nugroho dkk., 1997).

Air rebusan rimpang alang-alang dapat memperbaiki kerja ginjal yang terganggu, menurunkan suhu badan akibat sakit, menanggulangi gangguan infeksi pada ginjal, serta sebagai obat diuretik (Nugroho dkk., 1997). Menurut Wijayakusuma dan Dalimarta (1997) air rebusan rimpang alang-alang digunakan untuk obat anti hipertensi melalui efek diuretiknya. Adanya manitol, glukosa, dan sukrosa dapat menyebabkan diuresis. Menurut Katzung (1995), apabila sejumlah besar zat tersebut berada dalam tubulus ginjal, maka reabsorpsi air akan terhambat. Tanzil (1992) menyatakan bahwa diuretik adalah obat yang dapat meningkatkan produksi urin dan garam natrium, dan natrium dikeluarkan bersama klorida dalam bentuk NaCl.

Efek utama diuretik adalah mengurangi reabsorpsi natrium dan klorida serta air pada tubuli ginjal, sehingga meningkatkan kandungan NaCl dan volume urin.

Penelitian efek diuretik suatu bahan dapat dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan, terutama tikus (*Rattus norvegicus* L.) (Domer, 1971). Berdasarkan penelitian Chairul (2000), pemberian ekstrak rimpang alang-alang dengan dosis 10 mg/200 g bb pada tikus putih jantan dapat memberikan efek antipiretik yang setara dengan pemberian parasetamol 40 mg/200 g bb. Hal ini diduga akibat adanya efek diuretik dari unsur-unsur makro terutama kalium (K⁺) dan senyawa-senyawa gula (glukosa, sukrosa, dan manitol) yang terkandung di dalamnya.

Untuk meningkatkan pelayanan kesehatan dan pemerataan penggunaan obat-obatan tradisional maka perlu dijelaskan manfaatnya secara ilmiah (Dzulkarnaen, 1989). Dalam pengobatan tradisional, rimpang alang-alang telah digunakan sebagai obat diuretik. Penelitian eksperimental ini bertujuan membuktikan sejauh mana pengaruh dan efektivitas rimpang alang-alang sebagai obat diuretik.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Mei 2002 di Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dan Sub Lab Biologi Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta.

Bahan dan alat

Material penelitian berupa rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) diperoleh dari pasar swalayan "Hero" di Surakarta, sedangkan etanol diperoleh dari Sub. Lab Biologi Laboratorium Pusat MIPA UNS Surakarta. Carboxymethylcellulose (CMC) 2% digunakan sebagai kontrol ekstrak yang juga berfungsi sebagai pelarut ekstrak rimpang alang-alang, sedangkan hidroklorotiazid (HCT) digunakan sebagai diuretik pembanding. Bahan yang digunakan untuk analisis sifat fisik dan kandungan NaCl urin meliputi akuades, larutan kalium kromat 20%, dan larutan perak nitrat (AgNO₃) 2,9%.

Alat-alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, pisau, corong, blender, gelas ukur, pipet ukur, oven, kertas saring, *magnetic stirrer*, *hot plate*, desikator *rotary evaporator* (*vacuum evaporator*), kandang metabolik, *canule*, *centrifuge*, lemari es, tabung reaksi, tabung *effendorf*, pipet tetes, labu Erlenmeyer, gelas piala, pH meter, kantung plastik, botol plastik, gelas ukur, mikroskop, gelas obyektif, gelas penutup dan kertas saring.

Cara kerja

Persiapan hewan percobaan. Sebelum digunakan untuk percobaan, tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan diadaptasikan terlebih dahulu selama 7 hari dalam kandang metabolik dengan

tujuan untuk membiasakan terhadap lingkungan dan perlakuan baru yang akan diberikan.

Persiapan simplisia dan pembuatan ekstrak.

Rimpang alang-alang dibersihkan dan dimasukkan ke dalam oven bersuhu 37-40°C sampai kering. Setelah kering, rimpang tersebut dipotong kecil-kecil dan digiling dengan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk halus. Serbuk halus kemudian dimaserasi dengan alkohol 96% selama 24 jam. Setelah itu filtratnya disaring hingga tetes terakhir dan dipekatkan dengan *vacuum evaporator/rotary evaporator* pada suhu 50-60°C hingga diperoleh ekstrak lembek yang kemudian dikeringkan dalam desikator (Chairul, 2000).

Pembuatan larutan percobaan. Ekstrak kasar rimpang alang-alang dibuat larutan percobaan dengan dosis bervariasi menurut Chairul (2000) yaitu 5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb dalam bentuk suspensi dengan menggunakan CMC 2% sebanyak 2 ml/200 g bb. Menurut Chairul (2000), larutan CMC 2% ini dibuat dengan melarutkan 2 gram CMC dalam akuades hingga mengembang dan digerus hingga homogen dan ditambahkan air suling hingga volume 100 ml. Menurut Hamzah dkk. (1993), larutan HCT dibuat dengan melarutkan 0,32 mg HCT/200 g bb ke dalam akuades sebanyak 2 ml/200 g bb.

Perlakuan terhadap hewan percobaan. Dalam penelitian ini, digunakan tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) jantan sebanyak 30 ekor yang terbagi dalam 6 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Percobaan diuretik dilakukan dengan cara Taylor dan Topliss dalam Hamzah dkk. (1993) dan hewan percobaan dipuaskan terlebih dahulu selama 16 jam sebelum perlakuan dengan tetap memberikan minum secara *ad libitum*, kemudian setiap kelompok mendapat perlakuan sebagai berikut:

- I Akuades 2 ml/200 g bb sebagai kontrol
- II Larutan HCT 0,32 mg/200 g bb
- III Larutan CMC 2% 2 ml/200 g bb
- IV Ekstrak rimpang alang-alang 5 mg/200 g bb
- V Ekstrak rimpang alang-alang 10 mg/200 g bb
- VI Ekstrak rimpang alang-alang 20 mg/200 g bb

Pengumpulan sampel urin. Sampel urin dikumpulkan setiap 2 jam sekali selama 8 kali pengambilan, yaitu pada jam ke-0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14. Sampel urin yang terkumpul kemudian dianalisis sifat fisik dan kandungan NaCl-nya.

Analisis sifat fisik urin. Urin ditampung dengan plastik di bawah kandang metabolik kemudian dipindahkan ke dalam gelas ukur untuk mengetahui volumenya. Warna dan kejernihan urin dapat diuji dengan cahaya tembus yang dapat dilakukan dengan mengisi $\frac{3}{4}$ tabung reaksi dan ditinjau dalam sikap serong (Gandasoebrata, 1992). Warna dan kejernihan urin diuji sewaktu urin dalam keadaan segar sedangkan penetapan pH urin menggunakan pH meter. Menurut Gandasoebrata (1992) untuk penetapan pH ini, urin harus benar-benar segar atau diawetkan supaya jangan terjadi

amonias oleh perombakan ureum. Penetapan berat jenis urin dilakukan dengan metode penimbangan karena sampel urin yang terlalu sedikit (Dawiesah, 1989).

Pada pemeriksaan sedimen, 0,5-1,0 ml sampel urin dimasukkan ke dalam tabung *effendorf* dan dipusingkan dengan *centrifuge* selama 5 menit pada kecepatan 1500-2000 rpm kemudian dengan menggunakan pipet, dua tetes dari sedimen ditaruh terpisah di atas sebuah kaca obyek dan ditutup dengan kaca penutup pada masing-masing tetes sedimen tersebut. Kondensor mikroskop diturunkan atau cukup dengan dikecilkan untuk memeriksa sedimen itu dengan menggunakan lensa obyektif kecil (10 x) yang kemudian dilanjutkan dengan lensa obyektif besar (40 x) (Gandasoebrata, 1992).

Analisis kandungan NaCl urin. Penetapan jumlah natrium dan klorida dalam bentuk NaCl secara cepat dilakukan menurut metode Fantus. Menurut Gandasoebrata (1992) pada cara ini dilakukan titrasi memakai perak nitrat dengan ion chromat sebagai indikatornya. Perhitungan: Jumlah tetes larutan perak nitrat yang dipakai untuk titrasi sama dengan jumlah gram NaCl per liter urin.

Analisis data

Dalam penelitian ini digunakan rancangan percobaan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan enam macam perlakuan dengan lima kali ulangan pada masing-masing perlakuan. Data yang diperoleh dari pengamatan dianalisis dengan menggunakan Anava (Analisis sidik ragam) yang kemudian dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis sifat fisik urin

Volume urin

Pengukuran jumlah urin bermanfaat untuk ikut menentukan adanya gangguan faal ginjal dan kelainan dalam keseimbangan cairan tubuh (Gandasoebrata, 1992). Volume urin berkaitan erat dengan penggunaan diuretik karena dapat menyebabkan terjadinya diuresis. Menurut Siswandono dan Soekardjo (1995) diuretik adalah senyawa atau obat yang dapat meningkatkan volume urin. Istilah diuresis sendiri mempunyai dua pengertian, pertama menunjukkan adanya penambahan volume urin yang diproduksi dan yang kedua menunjukkan jumlah pengeluaran zat-zat terlarut dalam urin.

Berdasarkan analisis sidik ragam ternyata perlakuan pemberian akuades 2 ml/200 g bb dan CMC 2% 2 ml/200 g bb berpengaruh secara tidak nyata terhadap perubahan rerata volume urin tikus putih jantan sedangkan pemberian diuretik HCT 0,32 mg/200 g bb dan ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis (5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb) berpengaruh secara nyata terhadap perubahan rerata volume urin. Secara umum, pemberian diuretik HCT dan ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat

dosis dapat menyebabkan terjadinya peningkatan rerata volume urin tikus putih jantan (Tabel 1.). Menurut Tanzil (1992), diuretik HCT merupakan salah satu derivat dari diuretik tiazid dengan kerja utamanya adalah dengan menghambat reabsorpsi aktif Na^+ disertai Cl^- dan air pada tubulus ginjal. Dengan demikian, hambatan ini akan menghasilkan peningkatan volume urin dan meningkatnya kehilangan Na^+ dan Cl^- .

Tabel 1. Perubahan rerata volume urin tikus putih jantan setelah pemberian akuades, HCT, CMC dan ekstrak rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) (ml).

Jam ke-	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
0	0,750 ^{Ba}	0,720 ^{Ca}	0,741 ^{Aa}	0,701 ^{Ba}	0,854 ^{Ba}	0,853 ^{Ba}
2	1,059 ^{Ab}	1,837 ^{Ba}	0,921 ^{Ab}	1,003 ^{Bb}	1,039 ^{Bb}	1,253 ^{Ba}
4	1,216 ^{Aa}	2,097 ^{Aa}	1,099 ^{Aa}	1,196 ^{Ba}	1,067 ^{Ba}	2,043 ^{Aa}
6	1,672 ^{Aa}	0,817 ^{Cb}	0,811 ^{Ab}	1,276 ^{Ba}	1,057 ^{Ba}	2,094 ^{Aa}
8	1,855 ^{Aa}	0,810 ^{Ca}	1,613 ^{Aa}	2,479 ^{Aa}	2,881 ^{Aa}	2,624 ^{Aa}
10	1,098 ^{Ab}	0,748 ^{Cb}	0,651 ^{Ab}	1,439 ^{Ba}	1,445 ^{Aa}	2,393 ^{Aa}
12	0,846 ^{Ab}	0,885 ^{Cb}	1,042 ^{Ab}	1,373 ^{Ba}	1,455 ^{Aa}	2,955 ^{Aa}
14	0,820 ^{Ab}	0,791 ^{Cb}	0,744 ^{Ab}	0,855 ^{Bb}	1,122 ^{Ba}	1,321 ^{Ba}

Keterangan Tabel 1-4.: Angka yang diikuti oleh huruf besar yang sama pada satu kolom tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5 %. Angka yang diikuti oleh huruf kecil yang sama pada satu baris tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.

Pemberian ekstrak rimpang alang-alang dapat menyebabkan terjadinya peningkatan rerata volume urin karena adanya kandungan glukosa, sukrosa dan manitol yang diduga dapat berperan sebagai diuretik osmotik. Menurut Ganong (1998), diuresis osmotik disebabkan oleh pemberian senyawa-senyawa seperti manitol dan polisakarida sejenis yang dapat difiltrasi tetapi tidak dapat direabsorpsi oleh tubulus ginjal. Diuresis osmotik dapat disebabkan pula oleh zat-zat yang jumlahnya melebihi kapasitas tubulus ginjal untuk mereabsorpsinya, misalnya glukosa.

Warna urin

Warna urin terutama disebabkan oleh pigmen yang terlarut di dalamnya dan zat warna normal urin sendiri berasal dari metabolisme endogen yang berasal dari pemecahan zat warna empedu. Dapat dikatakan secara umum bahwa warna urin tergantung kadar zat terlarut di dalamnya (Dawiesah, 1989). Menurut Gandasoebrata (1992), biasanya warna normal urin berkisar antara kuning muda dan kuning tua.

Perlakuan pemberian CMC 2% 2 ml/200 g bb hanya sedikit mempengaruhi perubahan warna urin sedangkan pemberian akuades 2 ml/200 g bb, diuretik HCT 0,32 mg/200 g bb dan ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis (5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb) dapat menyebabkan terjadinya perubahan warna urin dari kuning menjadi kuning muda hingga tak berwarna .

Dengan demikian, pemberian akuades, diuretik HCT dan ekstrak rimpang alang-alang dapat menyebabkan terjadinya perubahan warna urin

karena bahan-bahan tersebut berpotensi untuk dapat menyebabkan terjadinya diuresis. Menurut Gandasoebrata (1992) pada umumnya warna urin ditentukan oleh besarnya diuresis dan makin besar diuresis maka makin muda warna urin itu.

Kejernihan urin

Pemeriksaan kejernihan urin dapat digunakan untuk memberikan fakta tentang kerja ginjal dan saluran urin. Kejernihan urin juga terkait erat dengan volume dan berat jenis urin sebab kejernihan urin dapat mencerminkan adanya zat-zat terlarut di dalam urin tersebut. Makin besar diuresis maka makin rendah berat jenis urin dan makin jernih pula urin tersebut. Menurut Dawiesah (1989) urin normal segar terlihat jernih tembus terang penuh, sedangkan Gandasoebrata (1992) menyatakan bahwa tidak semua macam kekeruhan bersifat abnormal karena urin normalpun akan menjadi agak keruh jika dibiarkan sehingga penting untuk menentukan apakah urin itu telah keruh pada waktu dikeluarkan atau jika dibiarkan kemudian.

Pemberian ekstrak rimpang alang-alang dengan berbagai tingkat dosis dapat menyebabkan terjadinya perubahan kejernihan urin dan secara umum terjadi perubahan kejernihan urin dari agak keruh hingga menjadi jernih. Perubahan kejernihan urin setelah pemberian ekstrak rimpang alang-alang diduga berhubungan dengan diuresis yang berupa efek peningkatan volume urin dan efek penurunan berat jenis urin. Makin besar peningkatan volume urin maka makin rendah kadar zat terlarut di dalamnya sehingga makin jernih urin tersebut. Perlakuan pemberian akuades 2 ml/200 g bb dan diuretik HCT 0,32 mg/200 g bb juga dapat menyebabkan terjadinya perubahan kejernihan urin dari agak keruh hingga menjadi jernih. Hal disebabkan bahan-bahan tersebut juga dapat berpotensi menimbulkan terjadinya diuresis. Semakin besar diuresis maka makin kecil kadar zat terlarut di dalamnya dan makin jernih urin tersebut. Sebaliknya, pemberian CMC 2% 2 ml/200 g bb pada tikus putih jantan tidak banyak menyebabkan perubahan kejernihan urin karena pemberian CMC 2% ternyata tidak berpengaruh nyata terhadap diuresis.

Derajat keasaman (pH) urin

Derajat keasaman (pH) menyatakan konsentrasi ion hidrogen (H^+) yang sebenarnya berhubungan dengan pengaturan keseimbangan asam dan basa di dalam cairan tubuh. Menurut Guyton (1997) ginjal mengatur konsentrasi ion H^+ terutama dengan meningkatkan atau menurunkan konsentrasi ion bikarbonat (HCO_3^-) di dalam filtrat glomerulus. Proses sekresi ion H^+ dimulai dengan karbondioksida (CO_2) di dalam sel epitel tubulus dan CO_2 di bawah pengaruh enzim karbonat anhidrase akan bergabung dengan air (H_2O) membentuk asam karbonat (H_2CO_3) yang kemudian berdisosiasi menjadi ion HCO_3^- dan ion H^+ . Ion H^+ ini kemudian disekresikan dengan transpor aktif menuju ke dalam lumen tubulus ginjal.

Analisis sidik ragam menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan tidak berpengaruh nyata terhadap perubahan rerata pH urin tikus putih pada seluruh waktu pengamatan (Tabel 2.). Menurut Ganong (1998), sekresi asam oleh ginjal dapat berubah sesuai dengan perubahan konsentrasi CO_2 , kadar K^+ , kadar karbonat anhidrase dan kadar hormon aldosteron.

Tabel 2. Perubahan rerata pH urin tikus putih jantan setelah pemberian aquades, HCT, CMC dan ekstrak rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L.).

Jam ke-	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
0	5,10 ^{Aa}	6,06 ^{Aa}	5,13 ^{Aa}	4,19 ^{Aa}	5,18 ^{Aa}	6,60 ^{Aa}
2	6,63 ^{Aa}	6,70 ^{Aa}	5,63 ^{Aa}	6,18 ^{Aa}	6,70 ^{Aa}	6,72 ^{Aa}
4	5,70 ^{Aa}	7,12 ^{Aa}	5,73 ^{Aa}	6,19 ^{Aa}	5,21 ^{Aa}	6,71 ^{Aa}
6	5,74 ^{Aa}	6,20 ^{Aa}	4,74 ^{Aa}	6,19 ^{Aa}	6,20 ^{Aa}	6,72 ^{Aa}
8	6,68 ^{Aa}	4,76 ^{Aa}	6,19 ^{Aa}	6,24 ^{Aa}	5,73 ^{Aa}	6,71 ^{Aa}
10	4,76 ^{Aa}	4,73 ^{Aa}	6,17 ^{Aa}	5,75 ^{Aa}	5,68 ^{Aa}	6,70 ^{Aa}
12	6,22 ^{Aa}	6,68 ^{Aa}	6,68 ^{Aa}	5,74 ^{Aa}	6,72 ^{Aa}	7,20 ^{Aa}
14	5,74 ^{Aa}	5,72 ^{Aa}	4,79 ^{Aa}	6,21 ^{Aa}	6,66 ^{Aa}	6,24 ^{Aa}

Konsentrasi CO_2 di dalam plasma merupakan faktor terpenting dalam menentukan kecepatan sekresi ion H^+ jika dibandingkan dengan faktor-faktor lainnya. Hal ini disebabkan reaksi kimia untuk sekresi ion H^+ harus dimulai dengan CO_2 sehingga makin besar konsentrasi CO_2 di dalam plasma maka makin cepat pula proses tersebut dan makin besar pula kecepatan sekresi ion H^+ .

Dengan demikian, adanya kandungan ion K^+ di dalam plasma setelah pemberian ekstrak rimpang alang-alang tidak berpengaruh secara nyata terhadap perubahan asam basa urin. Begitu juga dengan aktivitas penghambatan enzim karbonat anhidrase yang relatif lemah akibat pemberian diuretik HCT juga tidak berpengaruh nyata terhadap perubahan pH urin tikus putih jantan.

Berat jenis urin

Berat jenis urin sangat erat berkaitan dengan diuresis, makin besar diuresis makin rendah berat jenis urin. Tingginya berat jenis urin menunjukkan kepekatan urin, jadi bertalian dengan faal pemekat ginjal (Gandasoebrata, 1992). Tanpa diketahuinya berat jenis, maka sulit untuk menaksir jumlah bahan diekskresi serta menyimpulkan besarnya kelainan dan taksiran jumlah zat tersebut (Dawiesah, 1989).

Berdasarkan analisis sidik ragam ternyata perlakuan pemberian akuades 2 ml/200 g bb, CMC 2% 2 ml/200 g bb dan ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis (5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb) tidak berpengaruh secara nyata terhadap penurunan berat jenis urin tikus putih jantan pada seluruh waktu pengamatan, sedangkan pemberian diuretik HCT 0,32 mg/200 g bb dapat berpengaruh nyata terhadap penurunan berat jenis urin pada seluruh waktu pengamatan (Tabel 3.).

Tabel 3. Perubahan rerata berat jenis urin tikus putih jantan setelah pemberian aquades, HCT, CMC dan ekstrak rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) (g/cm³).

Jam ke-	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
0	1,022 ^{Aa}	1,021 ^{Aa}	1,022 ^{Aa}	1,025 ^{Aa}	1,013 ^{Aa}	1,014 ^{Aa}
2	1,011 ^{Ab}	1,008 ^{Bd}	1,019 ^{Aa}	1,019 ^{Aa}	1,011 ^{Ab}	1,009 ^{Ac}
4	1,009 ^{Ad}	1,007 ^{Bf}	1,011 ^{Ab}	1,010 ^{Ac}	1,012 ^{Aa}	1,008 ^{Ae}
6	1,009 ^{Aa}	1,018 ^{Aa}	1,019 ^{Aa}	1,009 ^{Aa}	1,012 ^{Aa}	1,008 ^{Aa}
8	1,008 ^{Aa}	1,014 ^{Aa}	1,011 ^{Aa}	1,008 ^{Aa}	1,007 ^{Aa}	1,008 ^{Aa}
10	1,009 ^{Aa}	1,021 ^{Aa}	1,023 ^{Aa}	1,012 ^{Aa}	1,011 ^{Aa}	1,008 ^{Aa}
12	1,015 ^{Aa}	1,016 ^{Aa}	1,012 ^{Aa}	1,011 ^{Ab}	1,011 ^{Ab}	1,007 ^{Ac}
14	1,013 ^{Ac}	1,015 ^{Ab}	1,017 ^{Aa}	1,013 ^{Ac}	1,009 ^{Ad}	1,009 ^{Ad}

Diuretik HCT dapat menyebabkan terjadinya diuresis melalui hambatan terhadap reabsorpsi Na⁺ dan Cl⁻ serta air pada tubulus ginjal sehingga dapat meningkatkan volume urin yang diekskresikan. Menurut Gandasoabrata (1992), berat jenis urin sangat erat berhubungan dengan diuresis, makin besar diuresis makin rendah berat jenis urin.

Pemberian ekstrak rimpang alang-alang tidak berpengaruh nyata terhadap penurunan berat jenis urin, sebab pada perlakuan ini di samping terjadi peningkatan volume urin juga terjadi peningkatan jumlah zat terlarut yang tidak direabsorpsi oleh tubulus ginjal. Menurut Guyton (1997), permeabilitas membran tubulus ginjal untuk reabsorpsi manitol dan sukrosa adalah nol yang berarti bahwa bila zat-zat ini telah difiltrasi ke dalam glomerulus, seratus persen dari jumlah yang memasuki glomerulus akan keluar bersama urin. Hal yang sama juga berlaku bagi glukosa apabila jumlahnya melebihi kapasitas tubulus ginjal untuk mereabsorpsinya sehingga sebagian glukosa juga akan ikut terlarut dan diekskresikan bersama urin.

Sedimen urin

Pemeriksaan sedimen urin merupakan salah satu pemeriksaan laboratorium yang sangat diperlukan untuk melengkapi pemeriksaan fisik urin yang dapat membantu untuk menegakkan diagnosis suatu penyakit (Rosihan, 1997). Pemeriksaan sedimen dapat memberikan data mengenai saluran urin mulai dari ginjal sampai pada ujung uretra yang tidak mungkin diperoleh dengan pemeriksaan lain. Adanya unsur-unsur sedimen tersebut dibenarkan dengan pemeriksaan mikroskopik sedimen (Gandasoebrata, 1992).

Semua kelompok perlakuan tidak berpengaruh terhadap perubahan jumlah eritrosit dan kristal kalsium oksalat dalam sedimen urin. Dengan demikian, pemberian ekstrak rimpang alang-alang juga tidak menyebabkan terjadinya perubahan jumlah eritrosit dan kristal kalsium oksalat yang dikeluarkan bersama urin. Hal ini disebabkan jumlah eritrosit yang dapat dikeluarkan bersama urin hanya dalam jumlah terbatas dan hanya dalam keadaan tertentu seperti radang, jumlahnya dapat meningkat tajam. Menurut Gandasoabrata (1992) adanya kristal kalsium oksalat sebenarnya tidak ada hubungan langsung dengan adanya batu kencing tetapi kristal ini merupakan zat sampah

metabolisme yang normal. Kristal ini sangat sering dilihat dalam sedimen urin dan tidak mempunyai arti apapun juga.

Pemberian akuades, diuretik HCT, dan ekstrak rimpang alang-alang dengan berbagai tingkat dosis ternyata dapat menurunkan jumlah leukosit dan silinder yang dikeluarkan bersama urin. Hal ini disebabkan bahan-bahan tersebut dapat berpotensi untuk menimbulkan diuresis dan semakin besar diuresis maka makin rendah berat jenis sehingga kadar zat terlarut di dalamnya juga akan menurun.

Analisis kandungan NaCl urin

Na⁺ difiltrasi dalam jumlah besar tetapi ia akan mengalami transpor secara aktif di semua bagian nefron kecuali pada bagian ansa Henle yang tipis. Dalam keadaan normal, 96% sampai 99% Na⁺ yang difiltrasi akan direabsorpsi. Sebagian besar Na⁺ akan direabsorpsi bersama-sama dengan klorida (Cl⁻) tetapi sejumlah kecil akan direabsorpsi secara aktif dalam hubungannya dengan sekresi K⁺ (Ganong, 1998). Klorida dikeluarkan dalam bentuk NaCl dan hampir seluruhnya berasal dari NaCl makanan, jadi pengeluarannya tergantung pada banyaknya NaCl yang masuk (Setyawan dan Sutarno, 1999).

Berdasarkan analisis sidik ragam, ternyata perlakuan pemberian akuades 2 ml/200 g bb dan CMC 2% 2 ml/200 g bb berpengaruh secara tidak nyata terhadap perubahan rerata kandungan NaCl urin tikus putih jantan, sedangkan pemberian diuretik HCT 0,32 mg/200 g bb dan ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis (5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb) berpengaruh nyata terhadap perubahan rerata kandungan NaCl urin.

Diuretik HCT dapat menyebabkan terjadinya peningkatan rerata kandungan NaCl urin tikus putih jantan pada 4 jam pengamatan pertama (Tabel 4.) akibat adanya hambatan reabsorpsi Na⁺ dan Cl⁻ pada tubulus ginjal. Hal ini akan meningkatkan jumlah Na⁺ yang diekskresikan lewat urin bersama Cl⁻ dalam bentuk NaCl.

Tabel 4. Perubahan rerata kandungan NaCl urin tikus putih jantan setelah pemberian aquades, HCT, CMC dan ekstrak rimpang alang-alang (*Imperata cylindrica* L.) (g/l)

Jam ke-	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
0	7,00 ^{Aa}	4,46 ^{Ba}	7,66 ^{Aa}	7,20 ^{Aa}	5,80 ^{Aa}	5,26 ^{Aa}
2	5,26 ^{Aa}	6,00 ^{Aa}	4,80 ^{Aa}	6,20 ^{Aa}	4,46 ^{Aa}	3,26 ^{Bb}
4	4,80 ^{Ab}	8,66 ^{Aa}	4,66 ^{Ab}	5,20 ^{Ab}	4,00 ^{Ab}	3,26 ^{Bb}
6	5,26 ^{Aa}	5,66 ^{Aa}	5,66 ^{Aa}	4,26 ^{Ba}	4,20 ^{Aa}	3,26 ^{Ba}
8	3,66 ^{Aa}	4,66 ^{Aa}	4,66 ^{Aa}	5,06 ^{Aa}	4,26 ^{Aa}	3,66 ^{Ba}
10	5,66 ^{Aa}	3,66 ^{Ba}	4,20 ^{Aa}	3,26 ^{Ba}	3,26 ^{Aa}	4,26 ^{Aa}
12	4,20 ^{Aa}	4,00 ^{Ba}	4,66 ^{Aa}	3,20 ^{Ba}	2,66 ^{Bb}	2,46 ^{Bb}
14	4,66 ^{Aa}	4,66 ^{Aa}	5,66 ^{Aa}	4,20 ^{Ba}	3,66 ^{Aa}	3,80 ^{Ba}

Pemberian ekstrak rimpang alang-alang dapat menyebabkan terjadinya penurunan rerata kandungan NaCl urin tikus putih jantan (Tabel 4.) akibat adanya kandungan ion K⁺ dalam ekstrak rimpang alang-alang yang berhubungan erat

dengan reabsorpsi Na^+ dan Cl^- . Peningkatan ion K^+ dalam plasma setelah pemberian ekstrak rimpang alang-alang diduga dapat menyebabkan terjadinya peningkatan konsentrasi aldosteron di dalam darah yang bersirkulasi. Menurut Ganong (1998) hormon mineralokortikoid seperti aldosteron dapat menaikkan reabsorpsi Na^+ dalam hubungannya dengan sekresi K^+ dan H^+ pada tubulus ginjal. Hal ini akan menyebabkan konsentrasi Na^+ yang direabsorpsi akan meningkat demikian pula dengan pengangkutan aktif ion Cl^- juga akan meningkat sehingga Na^+ dan Cl^- yang diekskresikan lewat urin menurun.

KESIMPULAN

Perlakuan pemberian ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis (5 mg/200 g bb, 10 mg/200 g bb dan 20 mg/200 g bb) berpengaruh secara nyata terhadap peningkatan volume urin dan penurunan kandungan NaCl urin pada tikus putih jantan tetapi tidak berpengaruh secara nyata terhadap perubahan pH urin dan penurunan berat jenis urin pada tikus putih jantan. Secara umum terjadi perubahan warna urin dari kuning hingga menjadi tidak berwarna dan perubahan kejernihan urin dari agak keruh hingga menjadi jernih setelah perlakuan pemberian ekstrak rimpang alang-alang pada tikus putih jantan dengan berbagai tingkat dosis. Pemberian ekstrak rimpang alang-alang pada berbagai tingkat dosis juga tidak menyebabkan perubahan jumlah eritrosit dan kristal kalsium oksalat tetapi dapat menyebabkan penurunan jumlah leukosit dan silinder pada sedimen urin.

DAFTAR PUSTAKA

- Atjung, K. 1982. *Tumbuhan Obat-obatan di Indonesia*. Jakarta: Kurnia Esa.
- Chairul. 2000. Pengaruh pemberian ekstrak alkohol akar ilalang (*Imperata cylindrica* L.) terhadap penurunan suhu tubuh tikus putih jantan. *Berita Biologi* 5 (2): 247-254.
- Dawiesah, S.I. 1989. *Petunjuk Laboratorium, Penentuan Nutrien dalam Jaringan dan Plasma Tubuh*. Yogyakarta: PAU-Pangan dan Gizi UGM.
- Gandasoebrata, R. 1992. *Penuntun Laboratorium Klinik*. Jakarta: PT. Dian Rakyat.
- Ganong, W. F. 1998. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi XVI. Penerjemah: Widjajakusuma, M.D. Jakarta: EGC.
- Guyton, A. C. 1997. *Fisiologi Manusia dan Mekanisme Penyakit III*. Penerjemah: Andrianto, P. Jakarta: EGC.
- Hamzah, Retno. L., Soebagyo, Widayat, A. Machin, dan Dyatmiko. 1993. Efek peluruh kemih tiga ekstrak meniran pada tikus. *Warta Tumbuhan Obat Indonesia* 2 (4): 22
- Loedin, A.A. 1999. Peran riset dalam pendayagunaan potensi obat tradisional sebagai unsur dalam sistem pelayanan kesehatan masyarakat. *Makalah pada Seminar Nasional Pendayagunaan Potensi Obat-obat Tradisional Indonesia, Jakarta, 9 Maret 1999*. Jakarta: BPP Teknologi.
- Nugroho, E., I. Whendratno, Suhartanto, Modyland dan E. Kusuma. 1997. *Tumbuh-Tumbuhan Berkhasiat Obat*. Semarang: Eka Offset.
- Rosihan, A. 1997. Peran Laboratorium rujukan dalam efisiensi biaya dan kualitas pelayanan medika. *Jurnal Kedokteran dan Farmasi* 8: 646-647
- Setyawan, A.D. dan Sutarno. 1999. *Petunjuk Praktikum Biokimia*. Surakarta: Jurusan Biologi FMIPA UNS.
- Sidik. 1999. Potensi, peran dan peluang Pusat Penelitian Obat Tradisional Universitas Pajajaran dalam pengembangan tanaman obat tradisional Indonesia. *Makalah pada Seminar Nasional Pendayagunaan Potensi Obat-obat Tradisional Indonesia, Jakarta, 9 Maret 1999*. Jakarta: BPP Teknologi.
- Soedarso, S. A. 1999. Peluang obat tradisional dalam sistem pelayanan kesehatan. *Makalah pada Seminar Nasional Pendayagunaan Potensi Obat-obat Tradisional Indonesia, Jakarta, 9 Maret 1999*. Jakarta: BPP Teknologi
- Soerjani, M. 1970. Ilalang (*Imperata cylindrica* L.), pattern of growth as related to its problem control. *Biotrop Bulletin* 1: 88
- Sunaryo. 1995. Diuretik dan antidiuretik. *Dalam: Farmakologi dan Terapi*. Jakarta: Gaya Baru.
- Tanzil, S. 1992. Diuretika. *Catatan Kuliah Farmakologi I*. Jakarta: EGC.
- Wijayakusuma, H. dan S. Dalimarta. 1997. *Ramuan Tradisional untuk Pengobatan Darah Tinggi*. Jakarta: Penebar Swadaya.

Pengaruh Vitamin C terhadap Perbaikan Spermatogenesis dan Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus L.*) Setelah Pemberian Ekstrak Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)

The effect of vitamin C toward the improvement of spermatogenesis and spermatozoa quality on mice (*Mus musculus L.*) after the addition of tobacco extract (*Nicotiana tabacum L.*)

TITISARI NUGRAHENI, OKID PARAMA ASTIRIN, TETRI WIDIYANI*

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

* Korespondensi: tetri_w@yahoo.com. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 13 Pebruari 2003. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. The aim of this research was to describe the ability of vitamin C in improving the spermatogenesis and spermatozoa quality of mice after the treatment of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) extract. The framework of the research was that it was already known that vitamin C was one of the anti-oxidant, which was able to counter free radical of the nicotine obtained in tobacco extract in improving the spermatogenesis. The research would be conducted by grouping the mice into 6 groups, and each group consists of 4 repetitions in 35 days. The first group was as control, the second group was treated with C vitamin in the dosage of 0.024 mg/g of body weight, the third group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight, the fourth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,012 mg/g of body weight, the fifth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,024 mg/g of body weight, and the sixth group was treated with tobacco extract in the dosage of 0,121 mg/g of body weight and C vitamin of 0,036 mg/g of body weight. Based on the data analysis, it can be concluded that tobacco extract treatment could decrease spermatogenesis quality and spermatozoa quality of mice (*Mus musculus L.*). C Vitamin could improve spermatogenesis and spermatozoa quality of mice after tobacco extract treatment. The optimal dosage of C vitamin treatment to improve the spermatogenesis and the quality of spermatozoa after the addition of tobacco extract treatment was 0,024 mg/g of weight.

Keywords: vitamin C, tobacco extract, spermatogenesis, spermatozoa.

PENDAHULUAN

Panati (1989) menyatakan bahwa dua dari setiap sepuluh pasangan suami istri infertil, sedangkan Aesoph (1998) menjelaskan bahwa 10-15% pasangan suami istri infertil. Menurut Aesoph (1998) angka itu akan meningkat karena bertambahnya abortus, meningkatnya penyakit-penyakit kelamin, dan penggunaan IUD yang dapat menyebabkan kerusakan dan infeksi rahim, sehingga mempersulit pembuahan, serta bertambahnya wanita yang menunda kehamilan dan menurunnya kemampuan reproduksi wanita pada pertengahan usia 20-an tahun.

Harapan dan penyembuhan baru bagi pasangan-pasangan yang tidak mempunyai anak merupakan perhatian utama dalam kemajuan-kemajuan medis di bidang seksologi selama tahun 1980-an. Menurut Panati (1989) perawatan ini ditujukan tidak hanya untuk para wanita, tetapi juga para pria, karena diketahui bahwa para suami menyebabkan hampir sepertiga masalah infertilitas. Hal ini disebabkan antara lain sperma terlalu sedikit, sperma tidak dapat mencapai sel telur, dan sperma dengan kepala abnormal, sehingga tidak mampu menembus membran sel telur. Salah satu penyebab infertilitas

tersebut adalah rokok. Pada saat ini ditemukan banyak perokok aktif yang mengabaikan efek negatif dari rokok tersebut. Vicizian (1968) dalam Crenshaw dan Goldberg (1996), menjelaskan bahwa motilitas sperma menurun dari 69% pada non perokok menjadi 57% pada perokok yang mengkonsumsi 10 batang rokok per hari.

Vitamin C dipercaya sebagai salah satu vitamin untuk mencegah penyakit manusia, antara lain asma, penderita alergi, diabetes, dan kolesterol tinggi (Anonim, 1996). Mayes (1997) menjelaskan bahwa konsumsi harian sejumlah 1 gram atau lebih besar telah digunakan oleh beberapa orang sebagai pencegahan terhadap pilek. Argumen utama yang digunakan oleh pelopor vitamin C, yaitu Linus Pauling adalah bahwa 10 mg/hari mencegah scorbut (Amstrong, 1995). Freeman (dalam Amstrong, 1995) menjelaskan bahwa para ahli patologi Inggris menemukan pemakaian 400 mg vitamin C pada 30 pria dan wanita sehat selama 6 minggu dapat melindungi DNA dari kerusakan. Selain itu menurut Aesoph (1998) vitamin C dipercaya dapat meningkatkan kualitas sperma pada perokok. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian yang lebih mendalam untuk mengetahui sejauh mana vitamin C dapat memperbaiki kualitas sperma.

BAHAN DAN METODE

Bahan penelitian

Hewan percobaan. Mencit jantan (*Mus musculus* L.) umur 60-90 hari dengan berat 33,5-43,2 gram sebanyak 24 ekor diperoleh dari Unit Pelayanan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta.

Vitamin C. Asam askorbat murni merek Merck dengan berbagai variasi dosis

Ekstraksi tembakau. Daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) urutan ke 3-5 dari bawah varietas Vorstenlanden umur 4 bulan yang diperoleh dari PTP XIX Klaten, aseton, alkohol, asam asetat, NH_4OH , dan akuades.

Uji kualitas spermatozoa dan pembuatan preparat histologi testis. Kloroform teknis untuk pembiusan, larutan fiksatif bouin, alkohol 70%, alkohol absolut 96%, akuades, pewarna Hematoxylin-Eosin, toluol, xylol, Meyers albumin, Canada Balsem, larutan NaCl 0,9%, pewarna supravital neutral red, dan parafin.

Cara kerja

Persiapan. Sebelum diteliti, mencit diaklimatisasi di laboratorium selama satu minggu untuk menyesuaikan diri dengan lingkungannya.

Preparasi tembakau. Ekstraksi tembakau merujuk metode Harborne (1987) yaitu dengan cara: daun tembakau kering angin yang telah dibuat serbuk diekstraksi dengan asam asetat 10% dalam etanol, kemudian dibiarkan sampai sekurang-kurangnya 24 jam. Lalu ekstrak dipisahkan sampai seperempat volume asal dan alkaloid diendapkan dengan meneteskan NH_4OH pekat. Kemudian endapan dikumpulkan dengan pemusingan, dicuci dengan NH_4OH 1%. Ekstrak dapat dilarutkan dalam akuades.

Tahap perlakuan. Penelitian dilakukan dengan menggunakan mencit jantan umur 60-90 hari sebanyak 24 ekor. Penelitian dibagi dalam 5 kelompok dan kontrol. Setiap kelompok terdiri dari 4 ekor mencit yang diperlakukan secara oral selama 35 hari dengan *canule* masing-masing 1ml per hari.

- I Mencit tanpa perlakuan sebagai kelompok kontrol (0 mg/g bb)
- II Mencit dengan perlakuan vitamin C dosis 0,024 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- III Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau 0,121 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- IV Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,012 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- V Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,024 mg/g bb dilarutkan dalam akuades
- VI Mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb dan vitamin C dosis 0,036 mg/g bb dilarutkan dalam akuades

Pembuatan preparat histologis testis. Sebelum pembuatan preparat histologis, testis diambil dengan cara mengambil potongan testis kanan kemudian ditimbang dan dari potongan

tersebut dibuat preparat irisan dengan metode parafin menggunakan pewarna HE menurut Suntoro (1980) dan diamati di bawah mikroskop meliputi penghitungan jumlah sel spermatogonia, spermatisit, spermatid, jumlah lapisan sel epitel serta mengamati morfologi susunan sel-sel spermatogenik tiap tubulus seminiferus.

Pengambilan epididimis. Setelah diperlakukan selama 35 hari, mencit dibedah dan diambil epididimisnya untuk analisis kualitas spermatozoa. Pengambilan epididimis dilakukan dengan mengangkat cauda epididimis, dipotong-potong dan direndam dalam larutan NaCl 0,9% pada suhu 37-40°C untuk memperoleh suspensi sperma.

Pemeriksaan kualitas spermatozoa

Kecepatan gerak spermatozoa. Penentuan kecepatan gerak spermatozoa dengan menggunakan metode Partodihardjo (1982), yaitu dengan alat bantu bilik hitung Haemositometer Neubauer. Ditentukan spermatozoa yang memiliki pergerakan normal (gerak progresif). Dengan menggunakan *stop watch*, ditentukan lama waktu yang diperlukan oleh spermatozoa tersebut untuk bergerak secara lurus menempuh jarak antara 2 sisi bujursangkar kecil. Waktu yang digunakan spermatozoa untuk menempuh jarak tertentu dikonversikan ke dalam mikrometer/detik.

Motilitas spermatozoa. Pemeriksaan motilitas sperma dilakukan dengan cara meneteskan 1 tetes suspensi sperma pada gelas benda, kemudian diperiksa di bawah mikroskop dengan perbesaran 400X. Pada setiap bidang pandang diamati pola pergerakan individual tiap-tiap spermatozoa. Dengan alat bantu hitung (*handcounter*), dari 100 ekor spermatozoa, dihitung persentasenya berdasarkan pola pergerakan masing-masing, terutama gerak progresif.

Viabilitas dan morfologi spermatozoa. Pengamatan dilakukan dengan meneteskan 1 tetes suspensi sperma pada gelas benda lalu ditetesi dengan pewarna *Neutral red* kemudian ditutup dengan gelas penutup, diamati di bawah mikroskop cahaya dalam perbesaran kuat (400X). Dengan alat bantu hitung pada setiap bidang pandang diamati spermatozoa yang hidup dan yang mati, lalu dihitung persentase masing-masing. Untuk mengetahui bentuk-bentuk morfologi spermatozoa yang normal dan abnormal dipergunakan sediaan apus spermatozoa yang sebelumnya dipergunakan dalam pengamatan viabilitas.

Pengamatan morfologi meliputi 2 variabel yaitu: morfologi spermatozoa normal dan abnormal, serta persentasenya. Perhitungan spermatozoa dilakukan dengan mikroskop cahaya perbesaran kuat (400X), diamati bentuk spermatozoa normal, dan bentuk-bentuk abnormalitasnya berdasarkan kategori Hafez (1987), meliputi: abnormalitas primer, sekunder dan aglutinasi spermatozoa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Spermatogenesis

Pengamatan pengaruh vitamin C terhadap spermatogenesis dengan pemberian ekstrak tembakau

ini dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif dengan cara membuat sediaan awetan histologi testis terlebih dahulu. Pengamatan kualitatif yaitu membandingkan struktur histologi tubulus seminiferus testis pada semua perlakuan. Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan menghitung jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer, spermatid dan lapisan sel.

Tabel 2. Jumlah rata-rata sel spermatogenik mencit per tubulus seminiferus setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Rerata sel			
	Spermatogonia	Spermatosit primer	Spermatid	Lapisan sel
I	42,25 ± 2,16 ^b	31,25 ± 1,48 ^b	75,25 ± 3,56 ^b	5,75 ± 0,43 ^b
II	41,50 ± 2,69 ^b	32,75 ± 1,92 ^b	77,50 ± 2,50 ^b	6,00 ± 0,77 ^b
III	35,75 ± 1,09 ^a	26,50 ± 1,80 ^a	63,50 ± 4,27 ^a	4,50 ± 0,50 ^a
IV	39,25 ± 2,16 ^{ab}	31,25 ± 1,30 ^b	72,75 ± 3,34 ^b	5,50 ± 0,50 ^{ab}
V	41,00 ± 2,00 ^b	32,75 ± 2,86 ^b	75,00 ± 3,08 ^b	6,25 ± 0,86 ^b
VI	41,25 ± 1,48 ^b	32,50 ± 2,29 ^b	74,25 ± 3,56 ^b	6,25 ± 0,86 ^b

Keterangan: huruf yang berbeda di belakang angka menunjukkan beda nyata.

Berat testis

Berat testis dianalisis dengan menimbang testis kanan. Parameter berat organ merupakan indikator yang baik untuk menunjukkan aktivitas pertumbuhan sel dan aktivitas sekresi endokrin. Testis merupakan tempat pembentukan spermatozoa dari sel-sel germinativum primitif (spermatogenesis) dan terdapat sel-sel interstitium Leydig yang mensekresikan testosteron ke dalam darah.

Rata-rata berat testis mencit pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 1. Dari Tabel 1 dapat diketahui bahwa terdapat kecenderungan penurunan berat testis setelah perlakuan ekstrak tembakau akan tetapi setelah dilakukan analisis statistik dapat diketahui bahwa penurunan tersebut tidak signifikan. Hal ini berarti ekstrak tembakau mengakibatkan terjadinya atrofi testis meskipun tidak berbeda nyata. Pada kelompok III teramati bahwa perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb menyebabkan penurunan berat testis sebesar 0,09 gram dibandingkan kelompok kontrol. Penambahan vitamin C tidak mempengaruhi berat testis secara nyata, tetapi terjadi peningkatan berat pada kelompok IV dan V dibanding kelompok III walaupun peningkatannya tidak sebesar kelompok kontrol. Analisis data penelitian diduga bahwa vitamin C berfungsi untuk melindungi testis dari kerusakan, bahkan juga meningkatkan berat testis walaupun tidak nyata seperti yang terlihat pada kelompok II terjadi peningkatan berat dibandingkan kelompok I (kontrol). Defisiensi vitamin atau malnutrisi akan mengakibatkan terganggunya fungsi testis (Turner dan Bagnara, 1988).

Tabel 1. Berat rata-rata testis kanan setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Berat rata-rata testis (gram) + SD
I	0,1546 + 0,015 ^a
II	0,1580 + 0,024 ^a
III	0,1321 + 0,014 ^a
IV	0,1309 + 0,015 ^a
V	0,1457 + 0,063 ^a
VI	0,1370 + 0,012 ^a

Keterangan: huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak berbeda nyata.

Jumlah lapisan sel

Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau 0,121 mg/g bb jumlah

lapisan sel mengalami penurunan dibanding kelompok kontrol, sedangkan kelompok perlakuan II, IV, V dan VI tidak mengalami penurunan ataupun peningkatan yang berarti dibandingkan kelompok kontrol, akan tetapi mengalami peningkatan dibandingkan kelompok III. Analisis jumlah lapisan sel diketahui bahwa terdapat perbedaan yang nyata pada taraf 5%. Hal ini berarti bahwa ekstrak tembakau mempengaruhi spermatogenesis mencit khususnya jumlah lapisan sel, sedangkan vitamin C memperbaiki spermatogenesis dengan meningkatkan dan mempertahankan jumlah lapisan sel.

Jumlah spermatogonia

Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok I sebagai kontrol mempunyai rata-rata jumlah spermatogonia terbesar yaitu 42,25, sedangkan kelompok II, IV, V dan VI tidak menunjukkan perbedaan yang berarti, tetapi pada kelompok III mempunyai jumlah sel spermatogonia terkecil yaitu 35,75. Hal ini berarti ekstrak tembakau menurunkan jumlah sel spermatogonia, sedangkan pemberian vitamin C dapat meningkatkan jumlah spermatogonia. Analisis spermatogonia dapat diketahui bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata.

Jumlah spermatosit primer

Pengamatan spermatosit ini dipilih spermatosit primer karena pada tubulus seminiferus spermatosit primer tampak paling besar, dengan sitoplasma banyak, inti besar, dan mengandung benang-benang tipis atau kumpulan kromatin yang kasar, sedangkan spermatosit sekunder sulit dilihat karena umur selnya sangat pendek dan pembelahannya menjadi spermatid berlangsung sangat singkat (Junquiera dkk., 1995).

Tabel 2 menunjukkan bahwa terjadi penurunan jumlah spermatosit primer pada kelompok III dibandingkan kelompok kontrol, kemudian meningkat kembali pada kelompok IV, V dan VI. Uji Anava didapatkan hasil yang berbeda nyata pada taraf 5 %, kemudian dilanjutkan dengan uji BNT dan dapat diketahui bahwa antara kelompok I, II, IV, V, dan VI tidak berbeda nyata. Kelompok III mempunyai jumlah rata-rata spermatosit primer terkecil sebesar 26,5. Hal ini berarti penambahan vitamin C dalam berbagai tingkatan dosis tidak mempengaruhi jumlah sel spermatosit primer secara nyata, tetapi nikotin yang terkandung dalam

ekstrak tembakau berpengaruh terhadap jumlah spermatis primer.

Jumlah spermatid

Analisis jumlah spermatid dapat diketahui terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok perlakuan. Tabel 2 menunjukkan bahwa kelompok II cenderung mengalami peningkatan daripada kelompok I, tetapi pada kelompok III terjadi penurunan yang besar dibanding kelompok I, sedangkan kelompok IV, V, dan VI mempunyai jumlah spermatid yang hampir sama dengan kelompok I.

Analisis data Tabel 2. menunjukkan bahwa nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau diduga mempengaruhi pembentukan spermatid yaitu cenderung menurunkan jumlah spermatid, dengan cara menghambat pembentukan spermatid, sedangkan dengan adanya penambahan vitamin C 0,024 mg/g bb tanpa ekstrak tembakau akan meningkatkan jumlah spermatid tetapi pada penampakan histologi tubulus seminiferus testis terbentuk spermatozoa yang tidak utuh strukturnya.

Secara keseluruhan hasil analisis spermatogenesis secara kuantitatif yang meliputi jumlah spermatogonia, spermatis primer dan spermatid membuktikan bahwa pemberian vitamin C dalam beberapa dosis setelah pemberian ekstrak tembakau akan meningkatkan jumlah sel spermatogenik dan mempertahankan nilainya. Apabila tanpa pemberian vitamin C sama sekali seperti pada kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb mempunyai kualitas spermatogenesis yang terburuk. Menurut Sagi (1994) secara garis besar aktifitas testis dalam kaitannya dengan spermatogenesis dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal antara lain temperatur tubuh, lokasi testis dan kontrol hipofisis. Faktor eksternal yang mempengaruhi adalah rangsang psikis, dan perubahan-perubahan lingkungan seperti temperatur lingkungan, makanan, zat-zat kimia tertentu, dan kontak-kontak sosial. Dalam hal ini zat kimia yang mempengaruhinya yaitu nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau. Nikotin tersebut akan mempengaruhi kerja sistem saraf pusat dengan cara menghambat kerja *GnRH* sehingga pembentukan FSH dan LH terhambat. Sementara itu FSH bekerja memacu sel Sertoli untuk menghasilkan *Androgen Binding Protein (ABP)*. FSH tampaknya mengawali proses proliferasi spermatogenesis dan testosteron yang berdifusi dari sel interstitial diperlukan untuk pematang akhir spermatozoa (Guyton, 1991). Dengan terhambatnya pembentukan FSH dan LH maka spermatogenesis berjalan tidak normal. Sedangkan vitamin C sebagai antioksidan akan memperbaiki spermatogenesis mencit setelah pemberian ekstrak tembakau dengan cara melindungi otak dan cairan otak melawan radikal bebas (Spector, 1978, dalam Briggs, 1981) yang mungkin ditimbulkan oleh nikotin sehingga reaksi berantai akan terhenti sehingga sistem saraf pusat akan terlindungi dari

kerusakan dan kelenjar hipofisis akan memproduksi hormon-hormon seperti FSH dan LH dengan normal.

Dari pengamatan secara kualitatif yaitu dengan cara membandingkan struktur histologi tubulus seminiferus testis dapat diketahui bahwa pada kelompok I yaitu kelompok kontrol membrana basalis dan tahapan perkembangan serta susunan sel spermatogeniknya ke arah lumen tubulus tampak jelas, dan padat. Lumennya penuh dengan spermatozoa. Hal ini berarti spermiogenesis berjalan normal.

Pada kelompok II lamina basalis dipenuhi dengan spermatogonia yang tampak jelas, susunan sel spermatogeniknya tampak padat, rapat dan kompak berjajar menuju ke lumen, lapisan selnya tersusun panjang, lumennya sempit dengan spermatozoa yang belum terlihat jelas strukturnya, hal ini kemungkinan karena pembentukan spermatozoa terhambat, walaupun spermatid yang terbentuk sangat banyak.

Kelompok III terjadi kerusakan walaupun spermatogonia tampak jelas berderet di lamina basalis tetapi susunan antar sel-sel spermatogeniknya renggang, tidak rapat, jumlah lapisan sel menuju lumen pendek. Lumen tampak lebar walaupun di dalamnya terdapat sel-sel spermatozoa yang berjumlah sedikit tetapi ekor tampak terpisah dengan kepala, antar tubulus seminiferus saling berlekatan. Hal ini kemungkinan nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau mempengaruhi spermatogenesis dengan cara nikotin akan merangsang susunan saraf pusat yang memproduksi FSH, sehingga keseimbangan FSH akan terganggu dan mengakibatkan terhambatnya spermatogenesis. Jika proses spermatogenesis terganggu maka spermatozoa yang dihasilkan menjadi tidak sempurna baik jumlah spermatozoa yang dihasilkan, morfologi normal spermatozoa ataupun gangguan fungsi fisiologis spermatozoa yang mengakibatkan terjadinya penurunan kualitas spermatozoa.

Kelompok IV tubulus seminiferus dengan susunan sel spermatogenik yang tampak lebih jelas daripada kelompok III, yaitu mempunyai struktur sel spermatogenik yang rapat, padat dan kompak dengan lumen yang lebih sempit berisi spermatozoa dengan struktur yang terlihat jelas berderet menuju lumen. Sel spermatogonia terlihat berderet di lamina basalis, lapisan selnya lebih tinggi. Terlihat pula sel Leydig yang nampak besar dan jelas kemungkinan terjadi peningkatan aktivitas sel Leydig, maka testosteron yang terbentuk pun semakin besar yang menyebabkan kapasitas spermatozoa dapat berjalan normal akan tetapi tidak diketahui besarnya peningkatan testosteron karena tidak dapat ditentukan aktivitas fungsional sel Leydig secara akurat (Turner dan Bagnara, 1988), sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Dawbroski dalam Azwar (2001) mengamati ikan trout bahwa kadar testosteron serum pada perlakuan vitamin C di atas dosis *NRC (National Research Council)* lebih tinggi dibandingkan induk yang menerima pakan dengan dosis vitamin C di bawah rekomendasi *NRC*. Hal ini diduga

penambahan vitamin C dosis 0,012 mg/g bb pada mencit yang diberi perlakuan ekstrak tembakau berfungsi sebagai antioksidan yaitu memperbaiki spermatogenesis

Kelompok V dan VI tubulus seminiferus terlihat hampir sama dengan kelompok IV dan kontrol, susunan sel-sel spermatogoniknya tersusun padat, rapat dan kompak, dengan lumen yang sempit penuh sel spermatozoa. Sel spermatogoninya tampak rapat, spermatosit primernya tampak jelas, sel Leydig tampak berkelompok memadat dan besar begitu pula sel sertoli tampak jelas. Pada kelompok VI lumen terlihat mampat dengan spermatozoa yang tampak jelas struktur kepala dan ekor yang mengarah ke lumen, hal ini berarti semakin tinggi penambahan vitamin C akan meningkatkan aktivitas spermiogenesis.

Kualitas spermatozoa

Kualitas spermatozoa mencit setelah pemberian vitamin C dengan pemberian ekstrak tembakau dapat diketahui dari kecepatan gerak, morfologi, motilitas baik, buruk dan imotil serta viabilitas.

Kecepatan gerak spermatozoa

Analisis kecepatan gerak spermatozoa diperoleh data yang berbeda nyata pada tiap kelompok yang kemudian dilanjutkan dengan uji BNT. Tabel 3 menunjukkan bahwa mulai dari kelompok II sampai dengan kelompok VI terjadi penurunan kecepatan gerak spermatozoa yang signifikan dibanding kelompok I (kontrol), penurunan terbesar pada kelompok III yaitu perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb. Sedangkan penambahan vitamin C setelah pemberian ekstrak tembakau mengakibatkan peningkatan kecepatan gerak spermatozoa, meskipun peningkatan yang terjadi belum mencapai kelompok kontrol. Hal ini berarti ekstrak tembakau menurunkan kecepatan gerak spermatozoa sebesar 29,8%, sedangkan pemberian vitamin C cenderung meningkatkan kecepatan gerak spermatozoa. Adapun penurunan kecepatan gerak spermatozoa kemungkinan disebabkan oleh nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau yang akan mengganggu kontraksi fibril-fibril yang berada dalam ekor spermatozoa sehingga gerakan ekor spermatozoa menjadi berkurang maka gerakannya menjadi lebih lambat, sedangkan dengan adanya penambahan vitamin C sebesar 0,024 mg/grbb akan mencegah kerusakan kontraksi fibril-fibril sehingga gerakan ekor spermatozoa tetap normal.

Tabel 3. Rata-rata kecepatan gerak spermatozoa mencit setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Kelompok	Kecepatan gerak ($\mu\text{m}/\text{dt}$) \pm SD
I	188,25 \pm 30,76 ^c
II	176,25 \pm 23,73 ^b
III	132,00 \pm 12,73 ^a
IV	136,00 \pm 13,19 ^a
V	158,50 \pm 24,12 ^{ab}
VI	137,25 \pm 9,96 ^a

Motilitas spermatozoa

Analisis spermatozoa dengan motilitas baik dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antar kelompok perlakuan. Tabel 4 menunjukkan terjadinya penurunan persentase motilitas baik yang terbesar adalah pada kelompok III dibandingkan kelompok kontrol, hal ini diduga disebabkan karena ekstrak tembakau mengandung nikotin yang akan merusak membran tipis sitoplasma di kepala sehingga gerakan spermatozoa menjadi buruk, sedangkan penambahan vitamin C pada mencit dengan perlakuan ekstrak tembakau akan berfungsi sebagai antioksidan dengan cara melindungi membran sitoplasma di kepala sehingga mempertahankan gerakan spermatozoa tetap progresif seperti kelompok kontrol, yang diketahui dari peningkatan persentase motilitas baik pada kelompok IV dan V dibanding kelompok III. Keadaan ini secara otomatis akan meningkatkan atau mempertahankan potensial fertilitas karena adanya perbaikan kualitas spermatozoa.

Tabel 4. Persentase rata-rata motilitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Motilitas (%)	Baik \pm SD	Buruk \pm SD	Imotil + SD
I	44,25 \pm 4,01 ^c	28,00 \pm 4,18 ^a	27,75 \pm 3,34 ^a
II	35,75 \pm 3,77 ^{ab}	37,25 \pm 3,27 ^b	27,00 \pm 4,95 ^a
III	34,25 \pm 4,32 ^a	31,50 \pm 4,39 ^{ab}	35,00 \pm 7,28 ^a
IV	38,75 \pm 3,03 ^{abc}	28,75 \pm 3,27 ^a	32,00 \pm 5,00 ^a
V	42,50 \pm 4,39 ^{bc}	29,25 \pm 4,14 ^a	28,25 \pm 2,86 ^a
VI	37,50 \pm 5,89 ^{abc}	34,00 \pm 4,06 ^{ab}	28,50 \pm 3,20 ^a

Keterangan: huruf yang berbeda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata, huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Viabilitas spermatozoa

Analisis viabilitas diperoleh data persentase jumlah spermatozoa hidup dan mati, yang dapat dilihat dengan cara membuat preparat apus spermatozoa yang diwarnai *Neutral red*. Persentase spermatozoa yang mati yaitu yang menyerap zat warna ditentukan dengan menghitung dari 100 spermatozoa. Setelah dilakukan pewarnaan dapat dihitung spermatozoa yang hidup dan mati seperti terlihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Persentase rata-rata viabilitas sperma-tozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Viabilitas	Spermatozoa	
	hidup (%)	mati (%)
I	76,75 \pm 2,16 ^c	23,25 \pm 2,16
II	73,25 \pm 2,49 ^{bc}	26,75 \pm 2,38
III	59,50 \pm 5,50 ^a	40,50 \pm 5,50
IV	66,00 \pm 4,18 ^{ab}	34,00 \pm 4,18
V	66,50 \pm 3,64 ^{abc}	33,50 \pm 3,64
VI	72,00 \pm 4,12 ^{bc}	28,00 \pm 4,12

Keterangan: Huruf yang beda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata. Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Persentase jumlah spermatozoa hidup antar perlakuan terdapat perbedaan yang sangat nyata, kelompok kontrol mempunyai jumlah tertinggi, diikuti dengan kelompok II, VI. Kelompok V dan IV tidak berbeda nyata, dibandingkan kelompok kontrol kelompok III mempunyai jumlah spermatozoa hidup terkecil, mungkin disebabkan kepala spermatozoa tidak terlindungi oleh membran sitoplasma yang telah rusak akibat radikal bebas yang mungkin ditimbulkan oleh nikotin yang terkandung dalam ekstrak tembakau, sehingga akan menghisap zat warna.

Morfologi spermatozoa

Morfologi spermatozoa merupakan salah satu faktor penentu fertilitas spermatozoa. Bentuk-bentuk abnormalitas primer spermatozoa di dalam testis karena kesalahan spermatogenesis atau kesalahan spermiogenesis yang disebabkan karena keturunan, penyakit, defisiensi makanan, dan pengaruh-pengaruh lingkungan yang buruk. Spermatozoa yang memiliki abnormalitas morfologik kemungkinannya tidak subur (Salisbury dan Vandemark, 1985).

Morfologi spermatozoa dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif, secara kuantitatif yaitu dengan cara dari 100 spermatozoa dihitung morfologi spermatozoa normal dan abnormal, sedangkan secara kualitatif yaitu dengan mengamati spermatozoa abnormal dari masing-masing kelompok perlakuan.

Tabel 6 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat nyata antar kelompok perlakuan, kelompok III mempunyai persentase morfologi abnormal terbesar yaitu sebesar 78,25 sedangkan kelompok IV, V dan VI mengalami penurunan persentase abnormalitas spermatozoa dibanding kelompok III. Dari Tabel 6 dapat dilihat bahwa semakin besar pemberian vitamin C setelah pemberian ekstrak tembakau akan memperkecil abnormalitas spermatozoa.

Tabel 6. Persentase rata-rata abnormalitas spermatozoa setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Abnormalitas	Spermatozoa	
	normal (%) \pm SD	abnormal (%) \pm SD
I	54,50 \pm 2,87 ^c	45,50 \pm 2,87 ^a
II	33,25 \pm 3,02 ^b	66,75 \pm 3,03 ^c
III	21,75 \pm 2,38 ^a	78,25 \pm 2,38 ^d
IV	30,75 \pm 2,48 ^b	69,25 \pm 2,48 ^c
V	37,50 \pm 4,33 ^b	62,50 \pm 3,84 ^b
VI	39,25 \pm 3,11 ^b	60,75 \pm 3,11 ^b

Keterangan: huruf yang beda di belakang angka menunjukkan berbeda nyata. Huruf yang sama di belakang angka menunjukkan tidak beda nyata.

Spermatozoa normal memiliki kepala, leher, badan dan ekor. Kepala spermatozoa menciit berbentuk kait dan mempunyai panjang \pm 0,008 mm, adapun panjang keseluruhannya adalah \pm 0,1226 mm (Rugh, 1968). Abnormalitas dapat terjadi pada kepala, leher, badan, ekor atau

kombinasi pada bagian-bagian tersebut. Abnormalitas pada kepala meliputi kepala kembar, pipih, atau berbentuk buah "pear" bulat, mengerut, membesar, menyempit, memanjang, dan kepala kecil, pada leher terdiri atas leher patah dan bengkok, pada badan antara lain bengkok, patah, pendek membesar, filiform ganda, dan seperti benang, sedang pada ekor meliputi melingkar ganda, patah, menggeling, dan keriting (Salisbury dan Vandemark, 1985). Abnormalitas pada kelompok perlakuan vitamin C dan ekstrak tembakau dapat diketahui dari Tabel 7.

Analisis kualitas spermatozoa yang meliputi motilitas, viabilitas, dan kecepatan gerak menunjukkan bahwa kelompok III dengan perlakuan ekstrak tembakau dosis 0,121 mg/g bb merupakan spermatozoa dengan kualitas terburuk. Hal ini disebabkan karena tembakau mengandung nikotin, yang akan membentuk radikal bebas sehingga akan merusak membran sel spermatozoa dan menyebabkan gangguan gerak sperma sehingga lebih sulit untuk membuahi sel telur. Sedangkan pada kelompok V dan VI kualitas spermatozoa mendekati kelompok kontrol, jadi seiring dengan peningkatan penambahan vitamin C, maka abnormalitas spermatozoa menciit dapat dikurangi. Hal ini mungkin karena vitamin C sebagai antioksidan berfungsi untuk menanggulangi radikal bebas, sehingga membran sel spermatozoa akan tetap terlindungi.

Tabel 7. Abnormalitas spermatozoa menciit setelah pemberian ekstrak tembakau dan vitamin C selama 35 hari.

Bagian	Jenis abnormalitas	Kelompok
KEPALA	Macrocephalic	II, VI
	Microcephalic	III
	Kepala bulat	II, III, V
	Kepala salah bentuk	II, III, IV, V, VI
LEHER	Leher melekok	II, III, V
	Leher dan badan melekok	II, III, IV
	Penebalan leher	III
BADAN	Badan melipat	IV, V
	Badan melekok	III, V, VI
	Badan dan ekor melengkung	II, IV, V, VI
EKOR	Ekor keriting	II, III, IV, VI
	Ekor berganda	IV
	Ekor melipat	III, IV, VI

Secara keseluruhan dapat dikatakan bahwa penambahan vitamin C memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa. Hal ini menunjukkan bahwa vitamin C sebagai antioksidan berpengaruh positif dalam memelihara struktur dan perkembangan, serta fungsi sel-sel spermatogenesis, sehingga dengan adanya zat aktif tersebut maka jumlah sel-sel benih yang mengalami kegagalan perkembangan, degenerasi, kematian akibat radikal bebas dapat ditekan atau dikurangi.

KESIMPULAN

Ekstrak tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) menurunkan kualitas spermatogenesis mencit (*Mus musculus* L.) yang meliputi jumlah sel spermatogonia, spermatosit primer, spermatid, dan lapisan sel serta menurunkan kualitas spermatozoa yang meliputi viabilitas dan kecepatan gerak. Penambahan vitamin C dapat memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit setelah pemberian ekstrak tembakau. Dosis optimal vitamin C untuk memperbaiki spermatogenesis dan kualitas spermatozoa mencit adalah sebesar 0,024 mg/g bb.

DAFTAR PUSTAKA

- Aesoph, ND. 1998. *Coping with Male Infertility*. www.Health World Online.com. [26 Januari 2002].
- Amstrong, Fb. 1995. *Buku Ajar Biokimia*. Penerjemah: R.F. Maulany. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Anonim. 1996. *Natural Testosteron Enhancers*. www.smookersvitamins.com/sperm.htm. [4 Januari 2003].
- Azwar, Z.I. 2001. Pengaruh suplementasi askorbil-2-fosfat magnesium sebagai sumber vitamin C dalam ransum terhadap perkembangan gonad dan mutu telur ikan bandeng (**Chanos chanos** F.). *Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia* 7 (2): 40-47.
- Briggs, M. 1981. *Vitamins in Human Biology and Medicine*. Florida: CRC Press.
- Crenshaw, TL and Goldberg, JP. 1996. *Sexual Pharmacology Drug That Affect Sexual Function*. New York: W.W. Norton & Company Inc.
- Guyton, A.C. 1991. *Fisiologi Kedokteran*. Penerjemah: A. Dharma. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hafez, E.S.E. 1980. *Human Reproduction, Conception, and Contraception*. 2nd edition. Maryland: Harper and Row Publishers, Inc.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Junquiera, L.C., J. Carneiro, and R.O. Kelley, 1995. *Histologi Dasar*. Penerjemah: Tambayong, J. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Mayes, P.A. 1997. *Struktur dan Fungsi Vitamin Larut Air dalam Biokimia Harper*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Panati, C. 1989. *Terobosan dalam Bidang Pengobatan*. Bandung: Penerbit CV. Remadja Karya.
- Partodihardjo, S. 1982. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Jakarta: Penerbit Mutiara.
- Rugh, R. 1968. *The Mouse, Its Reproduction and Development*. New York: Burgess Publishing Company.
- Sagi, M. 1994. *Embriologi Vertebrata*. Yogyakarta: UGM Press.
- Salisbury, G.W. dan N.L. Vandemark. 1988. *Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi*. Penerjemah: Djanuar, R.. Yogyakarta: UGM Press.
- Suntoro, H.S. 1980. *Metode Pewarnaan*. Jakarta: Penerbit Bhartara Karya Aksara
- Turner, J. dan M. Bagnara. 1988. *Endokrinologi Umum*. Surabaya: Penerbit Universitas Airlangga.

Aktivitas Penghambatan Minyak Atsiri dan Ekstrak Kasar Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt dan *Myristica fattua* Houtt) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Xanthomonas campestris* Oammel asal Tanaman Brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)

The inhibition activity of essential oil and crude extract of nutmeg seed's (Myristica fragrans Houtt and Myristica fattua Houtt) on the growth of Xanthomonas campestris Oammel from broccoli (Brassica oleracea var. italica)

GALUH SARI KUSUMANINGRUM, SURANTO*, RATNA SETYANINGSIH

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

*Korespondensi: suranto@mipa.uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 22 Juli 2002. Disetujui: 11 Nopember 2002.

Abstract. The aims of this research were to study the inhibition activity of essential oil and crude extract of nutmeg seed (*Myristica fragrans* and *M. fattua*) on growth of *Xanthomonas campestris* which is pathogen to broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), to find out the best concentration of those substances to prevent *X. campestris* and to compare the inhibition activity of both substances on growth of *X. campestris*. The essential oil of nutmeg seed (*M. fragrans* and *M. fattua*) was obtained by Stahl distillation, while crude extract of the nutmeg seeds was extracted by methanol method. The method of this research was the *disk diffusion method* on nutrient agar. Paper disk was prestreaked on agar medium with *X. campestris* to be tested. Each petri disk was placed 5 paper disk dropped with the essential oil and the crude extract of the nutmeg seed in concentrations of 100%, 10%, 1% respectively, while for the comparison, the bactericide Agrept 0,2% was used. The parameters measured were the inhibition zone from the essential oil and the crude extract of the nutmeg seeds. The result of the analysis indicated that the essential oil of *M. fragrans* effectively inhibited *X. campestris* starting at concentration of 1%, the essential oil of *M. fattua* effectively inhibited *X. campestris* at concentration of 10% and the crude extract of *M. fragrans* effectively inhibited *X. campestris* at concentration of 100%. The crude extract of *M. fattua* was not effective in inhibiting the growth of *X. campestris*.

Key words: inhibition activity, nutmeg seed's, *Xanthomonas campestris*.

PENDAHULUAN

Brokoli atau kubis bunga hijau sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan atau sayur-sayuran. Varietas brokoli unggul umumnya mempunyai massa bunga berwarna hijau gelap atau hijau kebiru-biruan. Produksi brokoli di Indonesia relatif masih terbatas dibandingkan kubis bunga putih. Hal ini menyebabkan harga brokoli relatif lebih mahal, sehingga lebih banyak dikonsumsi oleh masyarakat kalangan menengah ke atas di kota-kota besar. Brokoli banyak dikonsumsi sebagai sayuran segar karena kaya akan vitamin dan mineral. Bahkan saat ini, brokoli diketahui berkhasiat mencegah dan menghambat perkembangan sel kanker (Dalimartha, 1999; Rismunandar, 1992).

Tingginya produksi brokoli sangat tergantung pada kualitas hasil panen, terutama pada massa bunganya. Penurunan kualitas brokoli umumnya disebabkan oleh serangan hama dan penyakit, sehingga mutu dan harganya merosot. Salah satu penyakit yang banyak menyerang tanaman ini dan bersifat sangat merugikan adalah penyakit "busuk hitam" yang disebabkan bakteri *Xanthomonas campestris* Oammel (Pracaya, 1999). Menurut Pantastico (1986) penyakit ini merupakan penyakit

pembuluh yang menyebabkan urat-urat daun menjadi hitam. Mengacu Pracaya (1999), gejala awalnya berupa bercak mirip huruf V berwarna kuning di bagian tepi ujung daun yang meluas menuju tulang daun tengah.

Berbagai langkah pengendalian terhadap penyakit "busuk hitam" telah dilakukan untuk meningkatkan produksi brokoli. Pengendalian ini dimaksudkan untuk mencegah penyebaran penyakit serta membasmi bakteri pada inang yang terinfeksi. Penerapan pengendalian penyakit dapat dilakukan secara fisik ataupun kimia, namun penerapan praktis berbagai teknik dan sarana ini seringkali mempunyai keterbatasan. Misalnya, pengendalian penyakit dengan bahan kimia seperti bakterisida sintetik seringkali berdampak negatif bagi kesehatan manusia dan lingkungan, selain itu harganya tergolong mahal.

Banyak penelitian menunjukkan adanya bahan-bahan alam alternatif yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Bahan ini diketahui memiliki daya hambat (bakteristatik) atau daya bunuh (bakterisida) terhadap penyakit yang menyerang tanaman, antara lain minyak atsiri dan ekstrak kasar tanaman rempah-rempah. Dalam tulisan ini minyak atsiri didefinisikan sebagai hasil proses

distilasi, adapun ekstrak kasar didefinisikan sebagai hasil proses ekstraksi dengan pelarut organik (Setyawan, 2002, komunikasi pribadi).

Sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Supriadi *et al.* (1999) minyak atsiri memiliki daya antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasarnya, hal ini kemungkinan karena senyawa aktif dalam minyak atsiri lebih banyak dibanding dalam ekstrak kasar. Minyak atsiri merupakan salah satu produk metabolisme sekunder, yang dihasilkan dari berbagai jaringan tanaman. Mengacu pada Kurniawati (1998) penelitian tentang minyak atsiri saat ini banyak diarahkan untuk memanfaatkannya sebagai antimikroba penyakit yang disebabkan oleh bakteri atau jamur.

Salah satu tanaman yang tergolong rempah-rempah dan penghasil minyak atsiri adalah tanaman pala, khususnya biji pala baik jenis *Myristica fragrans* Houtt maupun *Myristica fattua* Houtt. Menurut Stahl (1985) biji pala mengandung minyak atsiri yang terdiri dari miristisin dan monoterpena-monoterpena lain. Selanjutnya dinyatakan, kandungan minyak atsiri biji pala berkisar antara 5-15%. Mengacu pada Praptosuwiryo (2001) minyak atsiri biji pala diketahui memiliki aktivitas sebagai bakterisida.

Tujuan penelitian ini adalah (i) menguji aktivitas penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* terhadap pertumbuhan bakteri *X. campestris*, (ii) menemukan konsentrasi efektif penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* terhadap pertumbuhan bakteri *X. campestris*, serta (iii) membandingkan aktivitas penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* terhadap pertumbuhan bakteri *X. campestris*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah tanaman brokoli yang diambil dari Kopeng Salatiga, biji pala jenis *Myristica fragrans* Houtt dan *Myristica fattua* Houtt yang didapat dari Kebun Raya Bogor, medium nutrisi agar, akuades, metanol 80%, alkohol, spiritus, Agrept 0,2%. Peralatan yang digunakan adalah blender elektrik, cawan petri, tabung reaksi, seperangkat alat destilasi stahl, *vortex mixer*, *autoclave*, *vacum borner*, pipet, batang gelas, bunsen, inkubator, kapas, seperangkat alat kromatografi GC dan GC-MS, gelas ukur, erlenmeyer, timbangan, kompor listrik, gelas benda, mikroskop, jarum ose, pisau, aluminium foil, kertas steril bulat ϕ 6 mm.

Cara kerja

Pembuatan serbuk biji pala. Biji pala yang masih terbungkus tempurung berumur 5 bulan dicuci bersih dengan akuades. Biji pala dijemur di bawah sinar matahari tidak langsung dengan ditutupi kain hitam selama 2 minggu. Tempurung biji dipisahkan, untuk mengambil bijinya. Biji pala dipotong-potong 2 mm, kemudian diblender hingga

menjadi serbuk. Selanjutnya serbuk akan didistilasi dengan metanol untuk menghasilkan minyak atsiri dan diekstraksi dengan metanol pula untuk menghasilkan ekstrak kasar.

Penyulingan minyak atsiri. Penyulingan minyak atsiri dilakukan dengan proses distilasi. Distilasi dimulai dengan memasukkan 100 g serbuk biji pala ke dalam labu yang telah diisi metanol 80%, kemudian dipanaskan selama 5-6 jam pada suhu 80°C hingga minyak atsiri menguap sempurna. Minyak atsiri yang diperoleh disimpan dalam botol gelap pada suhu 4°C. Minyak atsiri diencerkan dengan melarutkan 1 ml minyak atsiri ke dalam 99 ml metanol 80% untuk konsentrasi 1%, melarutkan 1 ml minyak atsiri ke dalam 9 ml metanol 80% untuk konsentrasi 10% dan tanpa penambahan metanol 80% untuk konsentrasi 100%, sehingga didapatkan konsentrasi akhir 1%, 10%, 100% (v/v) yang akan digunakan dalam uji aktivitas penghambatan bakteri (Supriadi *et al.*, 1999).

Pembuatan ekstrak kasar. Sebanyak 1 g serbuk biji pala masing-masing dilarutkan dalam 1 ml metanol absolut, dikocok agar tercampur sempurna kemudian dibiarkan selama 24 jam. Serbuk yang telah tercampur disaring dengan *vacum borner* dan diambil filtratnya. Filtrat diencerkan dengan melarutkan 1 ml ekstrak kasar ke dalam 99 ml metanol 80% untuk konsentrasi 1%, melarutkan 1 ml ekstrak kasar ke dalam 9 ml metanol 80% untuk konsentrasi 10% dan tanpa penambahan metanol 80% untuk konsentrasi 100%, sehingga didapatkan konsentrasi akhir 1%, 10%, 100% (v/v) yang akan digunakan dalam uji aktivitas penghambatan bakteri (Supriadi *et al.*, 1999).

Isolasi bakteri *X. campestris*. Bakteri *X. campestris* diisolasi dari tanaman brokoli sakit. Brokoli dicuci dengan akuades steril, kemudian dipotong-potong batang dan massa bunganya. Koloni bakteri yang terdapat dalam batang dan massa bunga disuspensikan ke dalam akuades steril dan ditumbuhkan di medium nutrisi agar. Koloni-koloni yang sesuai dengan sifat dari bakteri *X. campestris* dipisahkan secara goresan sehingga diperoleh biakan murni. Koloni-koloni bakteri *X. campestris* yang tumbuh kemudian diidentifikasi (Jutono, 1973).

Identifikasi bakteri. Identifikasi dilakukan dengan mengamati adanya koloni berbentuk bulat, cembung, berwarna kuning yang tumbuh di medium. Untuk mengamati morfologi sel bakteri *X. campestris* dilakukan pewarnaan Gram. Morfologi bakteri yang didapatkan, diamati secara mikroskopis dan diidentifikasi berdasarkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* edisi 9 tahun 1994 (Buchanan dan Gibbons, 1994). Uji biokimia terhadap bakteri *X. campestris* yang dilakukan adalah uji katalase dan uji fermentasi terhadap laktosa.

Penghambatan *X. campestris* oleh minyak atsiri dan ekstrak kasar biji pala. Pengujian aktivitas penghambatan bakteri dari minyak atsiri dan ekstrak kasar biji pala secara *in vitro* dengan menggunakan "Disk Diffusion Method" (Jacquelyn, 1999).

Minyak atsiri biji *M. fragrans* dan *M. fattua* dengan konsentrasi 100%, 10%, 1% (v/v) sebanyak 15 µl diteteskan pada kertas steril berdiameter 6 mm. Kertas uji diletakkan secara terpisah di permukaan medium nutrisi agar yang telah diinokulasi dengan bakteri *X. campestris* umur 24 jam. Sebagai kontrol digunakan kertas cakram yang ditetesi pelarut metanol 80% dan sebagai pembanding digunakan kertas cakram yang ditetesi Agrept 0,2% (0,002 g/ml metanol). Satu cawan petri diisi dengan 5 kertas cakram dengan konsentrasi 100%, 10%, 1%, 0% dan bakterisida pembanding. Masing-masing perlakuan ditempatkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas penghambatan bakteri diamati dengan mengukur lebar zona penghambatan di sekitar kertas cakram. Prosedur yang sama dilakukan terhadap ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua*.

Mengacu pada Nurnawati (1998), diameter zona penghambatan yang diperoleh dihitung luasnya dengan rumus:

$$L = \frac{\pi}{4} (d^2 - 36) \text{ mm}^2$$

L adalah luas zona penghambatan
d adalah diameter zona penghambatan

$$\pi = 3,14$$

Jumlah jenis dan kadar senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* diidentifikasi dengan kromatografi gas (GC), selanjutnya kelompok yang kadar komponen/senyawanya paling banyak, dalam hal ini minyak atsiri biji *M. fragrans*, diidentifikasi nama-nama senyawanya dengan kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS).

Analisis minyak atsiri dan ekstrak kasar biji pala. Analisis komponen-komponen dalam minyak atsiri dan ekstrak kasar dilakukan dengan metode kromatografi gas (GC). Kondisi operasi pada alat kromatografi gas adalah:

Jenis kolom	: HP5 non polar
Panjang kolom	: 30 meter
Suhu awal kolom	: 120 °C
Waktu awal	: 5 menit
Kenaikan	: 10 °C
Suhu akhir kolom	: 270 °C
Jenis detektor	: FID
Suhu detektor	: 270 °C
Suhu Injektor	: 260 °C
Gas pembawa	: Helium
Total flow	: 10

Split (Kpa)	: 60
Artunation	: 2 ⁴
Kec. kertas	: 1 cm/menit
Jumlah injeksi	: 1 µl

Analisis minyak atsiri biji *M. fragrans*. Jenis-jenis komponen yang teridentifikasi, dianalisis dengan metode kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS) (Mulyani *et al.*, 1990). Kondisi operasi alat kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS) adalah:

Jenis pengion	: EI (Elektron Impack)
Jenis kolom	: DB 1
Panjang kolom	: 30 meter
Suhu kolom	: 60 °C
Waktu awal	: 5 menit
Kenaikan	: 10 °C
Suhu akhir	: 280 °C
Gas pembawa	: Helium
Split (Kpa)	: 80
Suhu Injektor	: 290 °C
Suhu Detektor	: 290 °C

Untuk sistem analisis digunakan spektrometer massa yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram. Spektrum massa hasil analisis diidentifikasi dengan cara dibandingkan dengan data yang ada dalam pustaka (Agusta, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat bakteri *X. campestris*

Dari hasil isolasi bakteri pada tanaman brokoli sakit, diperoleh isolat *Xanthomonas campestris* Oammel yang membentuk koloni berwarna kuning, berbentuk bulat, dengan elevasi cembung, dan tepi licin serta mempunyai struktur dalam yang lembut dan rata. Adapun morfologi sel *X. campestris*, yang diamati dengan bantuan pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri ini bersifat Gram negatif, berbentuk batang pendek, berkapsula, dan tidak mempunyai spora (Tabel 1). Hal ini sejalan dengan penelitian Supriadi *et al.* (1997) yang telah mengisolasi bakteri *X. campestris* dari tanaman kapas, dan menyatakan bahwa sel *X. campestris* berbentuk batang pendek, membentuk rantai, dan bersifat Gram negatif. Selanjutnya menurut Jacquelyn (1999) *X. campestris* merupakan bakteri yang berkapsula dan tidak berspora.

Hasil uji katalase menunjukkan bahwa *X. campestris* merupakan bakteri aerob, sehingga menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron. Menurut Fardiaz (1992), oksigen berfungsi sebagai

Tabel 1. Karakteristik bakteri *X. campestris* pada brokoli.

Morfologi koloni					Bentuk Dasar Bakteri	Sifat Pengcatan Gram	Uji Biokimia	
Bentuk	Elevasi	Tepi	Struktur Dalam	Warna			Uji Katalase	Uji Fermentasi
Bulat	Cembung (convex)	Licin	Lembut, rata	Kuning	Batang pendek Berkapsula Tidak berspora	Gram negatif	Positif	Tidak fermentatif

akseptor hidrogen yang mengalami reaksi reduksi oleh dua elektron yang menghasilkan hidrogen peroksida (H_2O_2). Selanjutnya menurut Hadioetomo (1993) hidrogen peroksida sesungguhnya bersifat racun dan dapat merusak berbagai gugus fungsi biomolekul. Dari hasil penelitian diketahui, *X. campestris* mampu membentuk gelembung-gelembung oksigen. Hal ini menunjukkan kemampuannya untuk menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen, sehingga tidak bersifat racun.

Sedangkan hasil uji fermentasi terhadap laktosa menunjukkan bahwa *X. campestris* tidak bersifat fermentatif, terbukti dengan tidak terbentuknya gas pada tabung Durham setelah inkubasi pada suhu $37^{\circ}C$. Hal ini sejalan dengan penelitian Jovanoic *et al.* (1997) yang menyatakan bahwa isolat *X. campestris* dari tanaman kubis mempunyai tipe metabolisme glukosa bersifat oksidatif.

Penghambatan pertumbuhan *X. campestris*

Pengukuran luas zona penghambatan menunjukkan adanya perbedaan penghambatan terhadap *X. campestris* dengan pemberian minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* (Tabel 2.).

Tabel 2. Luas zona penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* terhadap *X. campestris* asal tanaman brokoli.

Konsentrasi (%)	<i>M. fragrans</i>		<i>M. fattua</i>	
	minyak atsiri	ekstrak kasar	minyak atsiri	ekstrak kasar
0	0 a	0 a	0 a	0a
1	116,7 b	40,29 a	63,84 a	41,34 a
10	150,45 b	75,36 a	133,70 b	61,75 a
100	401,65 d	235,76 c	221,10 c	73,79 a

Minyak atsiri biji *M. fragrans* mulai konsentrasi 1% sudah menunjukkan aktivitas penghambatan yang nyata terhadap kontrol. Sedangkan pada konsentrasi 10% dan 100% menunjukkan penghambatan yang lebih besar. Minyak atsiri biji *M. fattua* juga menunjukkan aktivitas penghambatan pada semua konsentrasi, tetapi berdasarkan taraf signifikansi DMRT 5%, konsentrasi 1% tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap kontrol. Aktivitas penghambatan yang ditunjukkan pada minyak atsiri biji *M. fattua* efektif pada konsentrasi 10% dan 100%.

Berdasarkan hasil pengukuran luas zona penghambatan, ekstrak kasar biji *M. fragrans* diketahui efektif hanya pada konsentrasi 100%. Pada konsentrasi 10% dan 1%, zona penghambatannya berturut-turut lebih kecil dan tidak menunjukkan pengaruh yang nyata terhadap kontrol. Ekstrak kasar biji *M. fattua* dalam berbagai konsentrasi kurang efektif menghambat pertumbuhan *X. campestris*. Luas zona penghambatan yang ditunjukkan pada konsentrasi 100%, 10% dan 1%, dengan signifikansi DMRT 5% hasilnya tidak berbeda nyata terhadap kontrol.

Aktivitas substansi antibakteri dari minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* memberikan hasil positif yaitu dengan terbentuknya zona jernih di sekitar kertas cakram. Daya difusi dari substansi antibakteri ke dalam medium agar menentukan penghambatan terhadap bakteri *X. campestris*. Menurut Davidson dan Parish (1989, dalam Djaafar *et al.*, 1996) ukuran zona jernih tergantung pada kecepatan difusi senyawa-senyawa antibakteri pada medium agar, yang mana semakin cepat difusi senyawa-senyawa antibakteri ke dalam medium agar, maka semakin luas zona penghambatan yang terbentuk.

Kandungan kimia

Adanya penghambatan minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* terhadap bakteri *X. campestris* disebabkan aktivitas senyawa-senyawa antibakteri yang terkandung dalam biji tersebut. Hasil analisis kromatografi gas (GC) minyak atsiri dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan *M. fattua* menunjukkan adanya berbagai jenis komponen kimia (data tidak ditunjukkan). Adapun hasil analisis kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS) minyak atsiri biji *M. fragrans* menunjukkan adanya enam senyawa dominan (Tabel 3.).

Tabel 3. Komponen kimia dari minyak atsiri biji *M. fragrans* yang teridentifikasi.

No.	RT	Jenis Senyawa	Area (%)
1.	16,030	miristisin	0,26
2.	18,148	bergamol	0,62
3.	20,067	safrol	1,37
4.	22,857	α -terpineol asetat	0,21
5.	26,030	eugenol	0,27
6.	28,206	metil eugenol	0,26
	Total		6,04*)

*) kadar pelarut metanol dan minyak atsiri berkadar rendah 93,06%.

Menurut Praptosuwirya (2001) biji pala memiliki aktivitas bakterisida karena adanya kandungan senyawa miristisin, senyawa hidrokarbon terpena, dan turunan fenilpropana. Hal ini juga diungkapkan oleh Agusta (2000) yang menyatakan bahwa komponen minyak atsiri biji pala antara lain senyawa miristisin dan safrol. Stahl (1985) menyatakan bahwa minyak atsiri biji pala terutama terdiri dari miristisin, safrol, eugenol, isoeugenol, hidrokarbon terpena, dan turunan fenilpropana.

Aktivitas penghambatan yang ditunjukkan oleh minyak atsiri biji *M. fragrans*, minyak atsiri biji *M. fattua*, ekstrak kasar biji *M. fragrans* dan ekstrak kasar biji *M. fattua* dapat disebabkan oleh adanya aktivitas kerja gabungan dari senyawa miristisin, bergamol, safrol, α -terpineol asetat, eugenol, dan metil eugenol yang terdapat di dalamnya, sehingga menunjukkan aktivitas penghambatan yang efektif. Mengacu pada Jawetz *et al.* (1982) aktivitas kerja gabungan dari beberapa senyawa antibakteri dapat lebih efektif dibandingkan dengan daya kerja masing-masing senyawa. Namun dimungkinkan juga, senyawa-senyawa antibakteri yang memiliki

prosentase terbesar dapat mempengaruhi keefektifan daya kerjanya. Di sisi lain aktivitas kerja gabungan dari beberapa senyawa antibakteri dapat juga kurang efektif dibandingkan dengan daya kerja masing-masing senyawa.

Mengacu pada Madigan *et al.* (1997) senyawa antibakteri yang berdifusi ke dalam medium agar dapat menyebabkan terhambatnya pembentukan dinding sel sehingga sel hanya dibatasi oleh membran sel yang tipis dan dapat lisis. Penghambatan juga dapat terjadi pada proses sintesis protein. Menurut Pelczar dan Chan (1988) proses penghambatan terhadap sintesis protein terjadi pada proses transkripsi dan translasi bahan genetik, dimana terjadi kesalahan penerjemahan, sehingga asam amino yang dihasilkan salah menempatkan diri dalam rantai peptida dan menghasilkan protein yang tidak berfungsi.

Penghambatan juga dapat terjadi terhadap enzim yang bekerja dalam sel. Menurut Pelczar dan Chan (1988) enzim merupakan sasaran potensial senyawa antibakteri. Penghambatan ini umumnya bersifat *irreversible* yaitu terjadi perubahan, sehingga enzim menjadi tidak aktif. Dengan terhambatnya atau terhentinya aktivitas enzim, mekanisme kerja enzim dapat terganggu, sehingga mempengaruhi pertumbuhan sel bakteri.

Dari hasil penelitian, didapatkan bahwa penggunaan bakterisida sintetik yaitu Agrept 0,2% tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan *X. campestris*. Hal ini kemungkinan disebabkan terjadinya resistensi sel bakteri terhadap senyawa kimia tersebut. Mengacu pada Schunack *et al.* (1990) bahwa resistensi alamiah dapat terjadi pada suatu jenis bakteri apabila bakteri tersebut terus menerus dipengaruhi oleh suatu kemoterapeutik tertentu. Bakteri tersebut kemungkinan mampu menginaktivasi zat itu secara enzimatik.

Pada kontrol metanol 80% yang digunakan dalam penelitian ini, tidak menunjukkan aktivitas bakterisida. Mengacu pada Siswandono dan Soekardjo (1995) metanol absolut diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Dalam penelitian ini konsentrasi metanol yang rendah (80%) terbukti tidak menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri, tetapi dalam penerapannya di lapangan masih perlu dicari konsentrasi aman yang tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman.

KESIMPULAN

Minyak atsiri biji *M. fragrans*, minyak atsiri biji *M. fattua* dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *X. campestris*. Minyak atsiri biji *M. fragrans* mulai menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *X. campestris* pada konsentrasi 1%, minyak atsiri biji *M. fattua* mulai konsentrasi 10%, dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* pada konsentrasi 100%. Minyak atsiri biji *M. fragrans* memiliki aktivitas penghambatan tertinggi dibandingkan minyak atsiri biji *M. fattua* dan ekstrak kasar biji *M. fragrans* terhadap pertumbuhan *X. campestris*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A. 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Buchanan, R.E and N.E. Gibbons. 1994. *Bergey's Manual Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Baltimore: The Williams and Wilkins Company.
- Dalimartha, S. 1999. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Kanker*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Davidson, P.M. and M.E. Parish. 1989. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. *Food Technology* 1: 148-155.
- Djaafar, T.F., E.S. Rahayu., D. Wibowo, dan S. Sudarmadji. 1996. Substansi antimikroba bakteri asam laktat yang diisolasi dari makanan hasil fermentasi tradisional Indonesia. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia* 6 (1): 15-21.
- Fardiaz, S. 1993. *Mikrobiologi Bahan Pangan*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Hadioetomo, R.S. 1993. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Jacquelyn, G.B. 1999. *Microbiology Principles and Explorations*. 4th Edition. New Jersey: Prentice Hall. Inc.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, and E.A. Adelberg. 1982. *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran* Penerjemah: G. Bonang. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Jovanoic, O., D. Antonijevic, and D. Jakovljevic. 1997. *Characteristics of Xanthomonas campestris cv. campestris Isolates Originating from Cabbage Plants*. <http://www.izbizs.co.yu/zastita4.html-11k>.
- Jutono. 1973. *Pedoman Praktikum Mikrobiologi untuk Universitas*. Yogyakarta: UGM Press.
- Kurniawati, I. 1998. *Efektivitas Minyak Atsiri Cengkeh (Eugenia aromatica Kuntze) sebagai Bahan Antimikroba*. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Biologi UGM.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, and Parker. 1997. *Biology of Microorganisms*. 8th Edition. New York: Prentice Hall.
- Mulyani, S., Amini, dan Sumarno. 1990. Analisis GC-MS dan daya antimikroba minyak atsiri temu giring (*Cucurma heyneana* Val. & van Zipj.). *Berkala Penelitian Pasca Sarjana UGM* 3 (1B):-
- Pantastico, E.R.B. 1986. *Fisiologi Pasca Panen Penanganan dan Pemanfaatan Buah-buahan dan Sayur-sayuran Tropika dan Sub Tropika*. Penerjemah: Kamariyani. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Pelczar, M.J dan E.C.S. Chan. 1988. *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*. Penerjemah: Ratna Siri H, Teja Imas S, S. Sutarni, Sri Lestari A. Jakarta: Penerbit UI.
- Pracaya. 1999. *Hama dan Penyakit Tanaman*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Praptosuwiryo, T. 2001. *Tantangan Pengembangan dan Fakta Jenis Tanaman Rempah*. Bogor: Yayasan Prosea Indonesia.
- Rismunandar. 1992. *Budidaya dan Tataniaga Pala*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Schunack, W., K. Mayer and M. Haake. 1990. *Senyawa Obat*. Edisi Kedua. Penerjemah: L. Wattimenna dan Soebito S. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Siswandono dan B. Soekardjo. 1995. *Kimia Medisinal*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopis*. Bandung: Penerbit ITB.
- Supriadi, E.M. Adhi., N. Hasnam, D. Febriyanti, S. Rahayuningsih, and Hasnam. 1997. *Characterization of Isolates of Xanthomonas campestris cv. malvacearum causes Bacterial Blight of Cotton in East Java*. <http://202.159.94.166/publ/ijll-2bl>
- Supriadi., C. Winarti, dan Hernani. 1999. Potensi daya antibakteri beberapa tanaman rempah dan obat terhadap isolat *Ralstonia solanacearum* asal jahe. *Hayati* 6 (2): 43-46.

REVIEW: Ellagitannin; Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi

REVIEW: Ellagitannin; biosynthesis, isolation, and biological activities

UDHI EKO HERNAWAN^{*}, AHMAD DWI SETYAWAN^{**}

Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta 57126.

Korespondensi: ^{*}udhi_z@myquran.com, ^{**}biodiv@uns.ac.id. Tel./Faks. +6271-663375.

Diterima: 14 Januari 2003. Disetujui: 28 Pebruari 2003.

Abstract. Ellagitannin is one of the bioactive groups produced by some of medicinal plants. Ellagitannin is a hydrolysable tannin compound biosynthesized via shikimic acid – gallic acid – pentagalloylglucose pathway. Ellagitannin can be isolated by cascade extraction procedures followed by column chromatography method and preparative HPLC method. The biological activities of ellagitannin are caused by molecular bond between ellagitannin and some other compound, especially protein that makes complex compound and changes physiological processes in cells or tissues of the living-thinks. Biological activities of ellagitannin included anti-diabetic, anti-microbes, anti-viruses, anti-hypertension, anti-oxidative, and anti-cancer or anti-tumor.

Key words: ellagitannin, biosynthesis, isolation, extraction, biological activities.

PENDAHULUAN

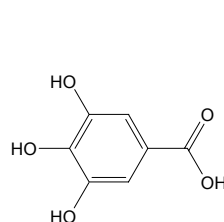
Pemanfaatan tumbuhan sebagai bahan utama dalam pengobatan telah menjadi bagian dari kebudayaan hampir setiap bangsa di dunia (Lee *et al.*, 2000). Sekitar 60% penduduk dunia hampir sepenuhnya menggantungkan diri pada tumbuhan untuk menjaga kesehatan (Farnsworth, 1994). Sedangkan menurut perkiraan WHO, lebih dari 80% penduduk negara-negara berkembang tergantung pada ramuan tradisional untuk mengatasi masalah kesehatan (Khan *et al.*, 2002). Peran tumbuhan sebagai bahan obat sama pentingnya dengan perannya sebagai makanan (Raskin *et al.*, 2002).

Tumbuhan menghasilkan berbagai macam senyawa aktif yang memberikan efek farmakologi. Umumnya, senyawa aktif tersebut tidak berperan penting dalam metabolisme tumbuhan, sehingga sering disebut sebagai metabolit sekunder (Stepp dan Moerman, 2001; Liu *et al.*, 1998). Metabolit sekunder telah lama diketahui sebagai sumber terapi medis yang efektif dan penting, misalnya sebagai obat anti-bakteri dan anti-kanker (Cragg, 1997). Senyawa ini secara terus menerus menjadi sumber utama berbagai obat berkhasiat penting (Harvey, 2000). Dalam praktek pengobatan tradisional, masyarakat telah memanfaatkan senyawa aktif dari berbagai tumbuhan dalam bentuk ramuan obat, untuk menyembuhkan penyakit. Senyawa aktif dalam tumbuhan telah menjadi sumber inspirasi untuk terapi penyakit yang sulit atau mahal pengobatannya (Raskin *et al.*, 2002).

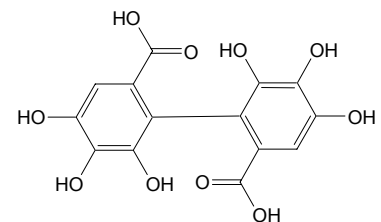
Senyawa aktif tumbuhan dapat dikelompokkan dalam empat golongan, yaitu: fenol, alkaloid, terpenoid, dan asam amino non protein. Penggolongan tersebut

didasarkan atas prekursor, struktur dasar dan jalur biosintesisnya (Edwards dan Gatehouse, 1999; Smith, 1976). Senyawa-senyawa tersebut memiliki variasi yang luas dalam diversitas kimia, distribusi dan fungsinya (Smith, 1976). Golongan fenol dicirikan oleh adanya cincin aromatik dengan satu atau dua gugus hidroksil. Kelompok fenol terdiri dari ribuan senyawa, meliputi flavonoid, fenilpropanoid, asam fenolat, antosianin, pigmen kuinon, melanin, lignin, dan tanin, yang tersebar luas di berbagai jenis tumbuhan (Harbone, 1996).

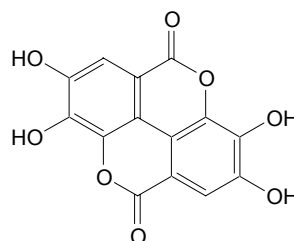
Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu taninterkondensasi (*condensed tannins*) dan tanin-terhidrolisis (*hydrolysable tannins*)



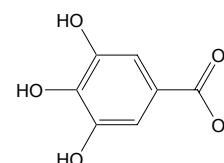
(1) asam galat



(2) asam heksahidroksidifenat



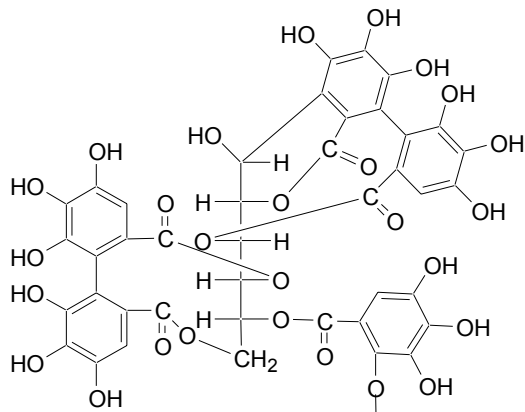
(3) asam elagat



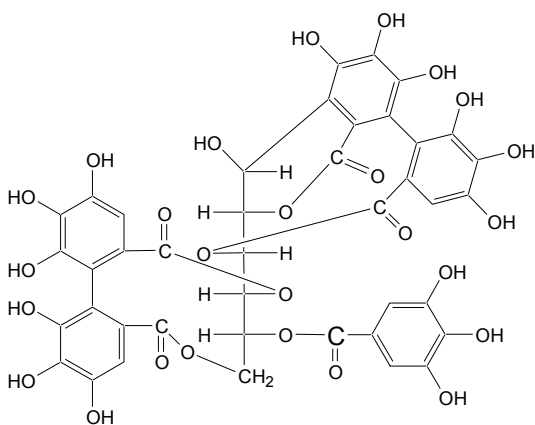
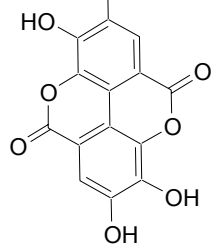
(4) galoil

(Hagerman *et al.*, 1992; Harbone, 1996).

Tanin-terhidrolisiskan merupakan derivat dari asam galat (1) yang teresterkan (Xu, 1991). Berdasarkan strukturnya, tanin ini dibedakan menjadi dua kelas yaitu, gallotanin dan ellagitanin. Perbedaan struktur keduanya adalah adanya ester asam heksahidroksidifenat (HHDP) (2) pada ellagitanin. Kedua ester asam tersebut berikatan dengan glukosa. Ellagitanin yang dihidrolisis akan menghasilkan asam elagat (3) (Harbone, 1996). Oksidasi perangkaian (*oxidative coupling*) pada gugus galoil (4) dari gallotanin akan menghasilkan ellagitanin (Gross, 1992).



(5) lagerstroemin

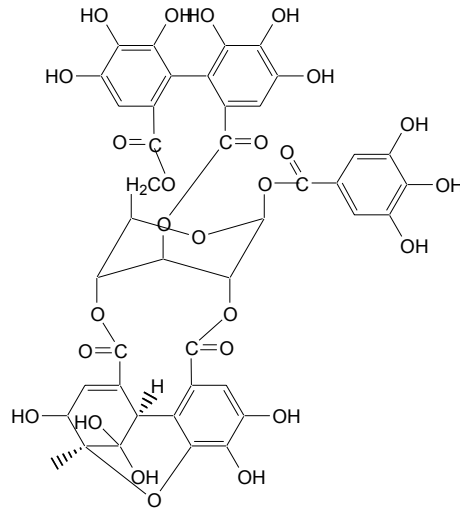


(6) casuarinin

Ellagitanin tersebar secara tidak merata pada dunia tumbuhan. Berbeda dengan tanin-terkondensasi yang tersebar luas di paku-pakuan, gymnospermae, dan angiospermae, ellagitanin hanya terdapat pada angiospermae, khususnya pada tumbuhan dikotil, terutama Hammamelidae, Dilleniidae, Rosidae, serta beberapa lainnya (Harbone, 1996,

Bruyne *et al.*, 1999). HHDP (2) merupakan contoh dari molekul ellagitanin yang paling sederhana (Gross, 1992). Sedangkan beberapa contoh ellagitanin yang strukturnya lebih kompleks misalnya, lagerstroemin (5) dari bungur (*Lagerstroemia speciosa*; Lythraceae), dan casuarinin (6) dari *Casuarina spinosa*. Terkadang suatu jenis ellagitanin hanya dapat ditemukan pada satu jenis tumbuhan saja, misalnya lagerstroemin, namun ada juga yang ditemukan pada lebih dari satu jenis tumbuhan, misalnya geraniin (7) yang dapat ditemukan pada Euphorbiaceae, Aceraceae, dan Cercidiphyllaceae (Xu *et al.*, 1991, Okuda *et al.*, 1992).

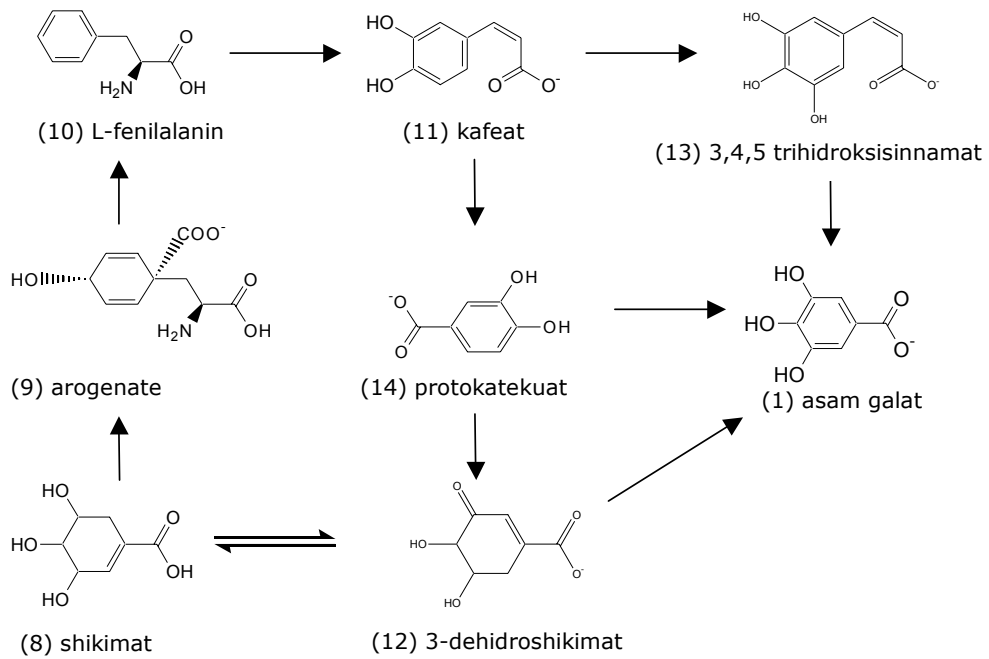
Seperti halnya dengan metabolit sekunder lainnya, sejauh ini ellagitanin diketahui tidak memiliki fungsi yang penting bagi metabolisme tumbuhan. Justru dalam hal fungsi morfologi dan ekologi, ellagitanin menunjukkan perannya (Gottlieb dan Borin 2000). Lepas dari fungsi tersebut, ellagitanin diketahui memiliki nilai tersendiri bagi manusia, khususnya dalam dunia kesehatan. Aktivitas biologis dan farmakologi yang telah diketahui antara lain, penghambatan karsinogenesis, anti-tumor, anti-virus, anti-oksidasi (peroksidasi lipida, lipoksigenase, oksidasi xanthin, dan oksidasi monoamin), anti hipertensi (Okuda *et al.*, 1992; Taylor, 2003), anti-bakteri dan jamur, anti-diabetes, dan anti-nematoda (Cowan, 1999; Hayashi *et al.*, 2002; Mori *et al.*, 2000).



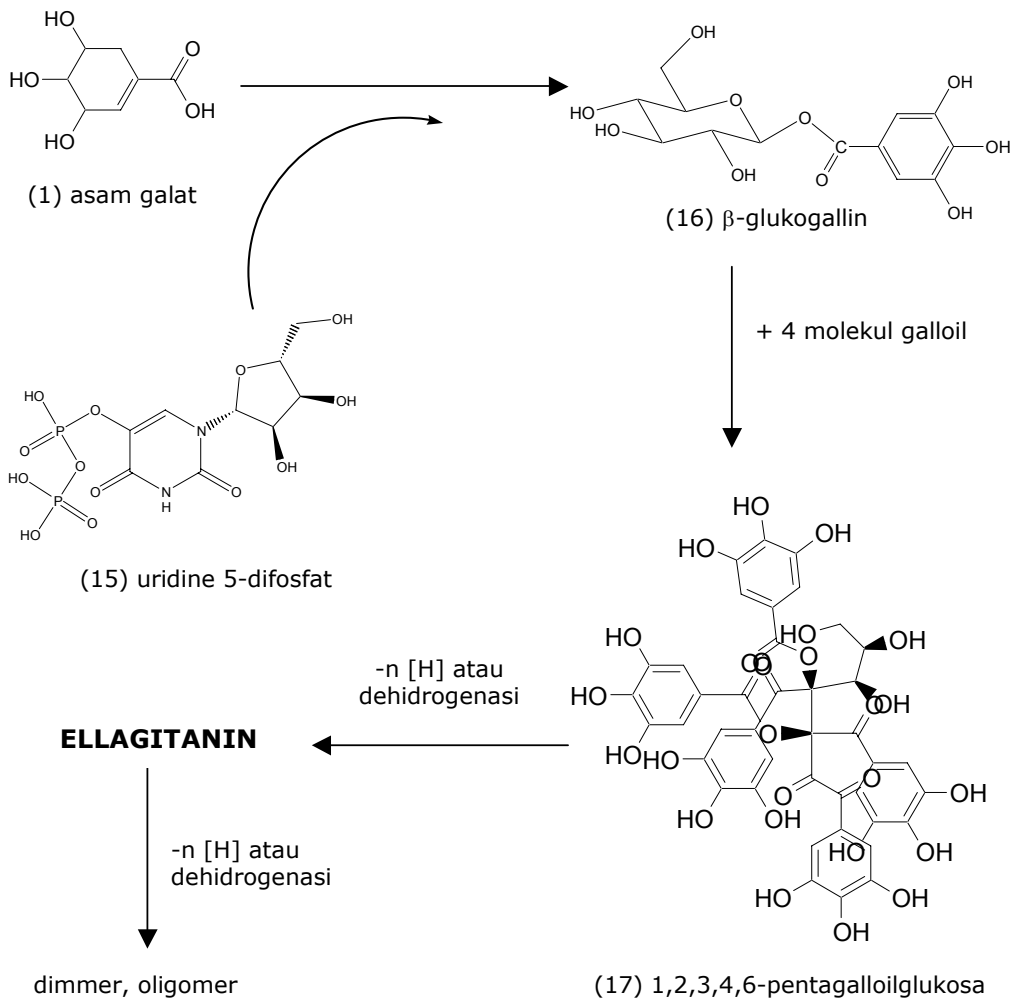
(7) geraniin

BIOSINTESIS ELLAGITANIN

Biosintesis ellagitanin secara mendetail ke setiap senyawa-senyawanya masih belum jelas. Gross (1992) menjelaskan secara garis besar pembentukan ellagitanin dari hasil-hasil penelitian sebelumnya. Umumnya penelitian tentang biosintesis ellagitanin dilakukan pada tumbuhan Oak (*Quercus rubra*), *Rhus sp.*, dan beberapa tumbuhan tertentu lainnya. Reaksi spesifik yang menuju ke senyawa ellagitanin tertentu berbeda-beda tergantung jenis



Gambar 1. Jalur pembentukan asam galat (Gross, 1992).



Gambar 2. Biosintesis ellagitanin (Gross, 1992).

senyawa dan tumbuhannya. Oleh karena itu, penelitian biosintesis ellagitanin sekarang mengalami perkembangan, tidak hanya difokuskan pada beberapa jenis tumbuhan di atas, namun sudah semakin meluas.

Jalur biosintesis ellagitanin, terdiri atas tiga tahapan reaksi. Tahap pertama adalah pembentukan asam galat (1), sebagai penyusun struktur primer ellagitanin (Gambar 1). Tahap ini diawali dari jalur shikimat (8) yang membentuk dua arah reaksi sintesis asam galat. Arah pertama melalui pembentukan L-fenilalanin (10) dengan perantara arogenate (9). Pembentukan asam sinamat dari L-fenilalanin (10) dihalangi oleh enzim L-AOPP (L-2-aminooxy-3-phenylpropionic acid), dan reaksi diarahkan pada senyawa kafeat (11). Arah reaksi kedua melalui pembentukan 3-dehidroshikimat (12) yang mengalami hidrogenasi pada atom C ke-3 sehingga terbentuk asam galat (Gross, 1992).

Tahap kedua adalah pembentukan pentagalloylglukosa yang diawali oleh reaksi asam galat (1) dengan uridin 5-difosfat glukosa (15) untuk membentuk β -glukogallin (16) (Gambar 2). Dengan penambahan 4 molekul galloil, β -glukogallin diubah menjadi 1,2,3,4,6-pentagalloylglukosa (17). Empat molekul galloil menggantikan atom H pada empat gugus hidroksil. Proses penggantian atom H tersebut dinamakan reaksi galloilasi. Reaksi ini berurutan mulai dari gugus hidroksil ke-1, lalu ke-6, ke-2, ke-3, dan yang terakhir ke-4. Reaksi ini membutuhkan enzim galloiltransferase (Gross, 1992).

Tahap terakhir merupakan tahap yang secara langsung menuju ke pembentukan senyawa-senyawa golongan ellagitanin (Gambar 2). Seperti telah disebutkan sebelumnya, biosintesis senyawa ellagitanin berbeda-beda tergantung jenis senyawa dan jenis tumbuhan penghasilnya. Senyawa ellagitanin dihasilkan dari oksidasi (atau lebih tepatnya dehidrogenasi/pelepasan atom H dari gugus OH) pentagalloylglukosa. Residu sederhana yang dihasilkan dari proses dehidrogenasi dua grup galloil dari pentagalloylglukosa adalah HHDP (2). Dehidrogenasi yang terjadi diikuti dengan reaksi perangkaian (*coupling*) antar atom C dua gugus galloil. Gallotanin yang mengalami oksidasi perangkaian C-C dan C-O pada gugus galloil yang berdekatan menghasilkan ellagitanin (Gross, 1992).

EKSTRAKSI DAN ISOLASI ELLAGITANIN

Bahan tumbuhan

Pada prinsipnya, semua bagian jaringan tumbuhan penghasil ellagitanin dapat digunakan sebagai sumber ekstrak ellagitanin, namun jenis dan kadar pada setiap jaringan cenderung berbeda-beda. Dalam menentukan bagian tumbuhan yang akan diekstraksi, perbandingan kadar senyawa pada setiap jaringan perlu dipertimbangkan. Selain itu, umur jaringan juga perlu diperhatikan. Umumnya, jaringan tua memiliki kandungan metabolit sekunder lebih banyak daripada jaringan muda.

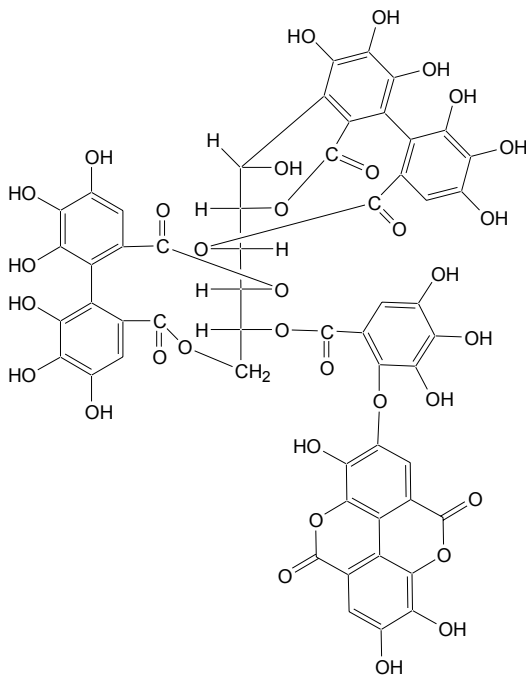
Tanin dapat diekstraksi dari seluruh bagian tumbuhan, meliputi daun, cabang, batang, akar, dan buah (Scalbert, 1991). Bagian yang kaya akan tanin, berbeda-beda tergantung jenis tumbuhannya, misalnya pada *Caesalpinia spinosa* organ buah memiliki kandungan tanin paling tinggi (Galvez *et al.* 1997), sedangkan pada pohon oak (*Quercus*) kandungan tanin banyak terdapat di batang (Helm, 2000). Umumnya ekstraksi tanin dilakukan dari daun dan batang tumbuhan. Jaringan yang diekstrak dapat berupa jaringan segar maupun yang sudah kering. Untuk analisis, sebaiknya digunakan jaringan segar (Scalbert, 1992). Namun, kadangkala hal itu tidak memungkinkan karena jauhnya jarak pengambilan sampel dengan laboratorium. Untuk itu sampel tumbuhan dapat dibekukan, dikeringbekukan, atau dikeringanginkan. Metode kering-beku merupakan cara yang paling aman untuk mencegah perubahan jaringan, yang berakibat pada perubahan kadar tanin. Metode ini dilakukan dengan menggunakan nitrogen cair.

Jika nitrogen cair tidak tersedia, maka alternatif yang mudah adalah dikeringanginkan. Titik uap senyawa ellagitanin sangat tinggi, misalnya pada lagerstroemin (5) di atas 250°C, namun proses pengeringan sebaiknya dilakukan pada suhu kamar atau kurang dari 40°C. Pada suhu lebih dari 40°C dapat terjadi penurunan kadar dan ekstraktibilitas tanin secara drastis. Jika pengeringan dilakukan dalam ruang yang kelembabannya tinggi, maka penggunaan kipas angin sangat disarankan. Hal ini akan mempercepat proses pengeringan dan mencegah molekul air bereaksi dengan molekul tanin melalui lukanluka pada jaringan.

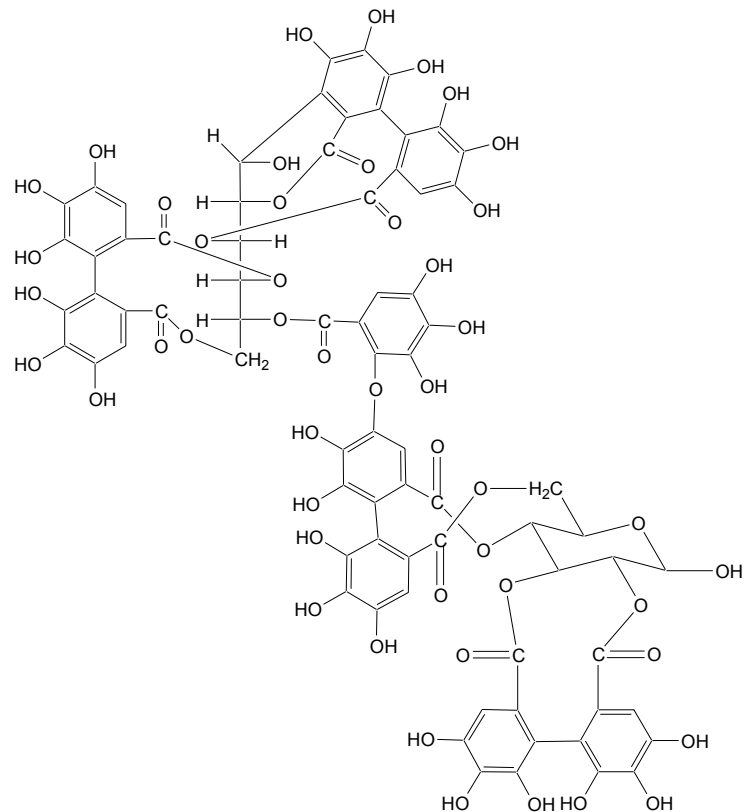
Ekstraksi dan Isolasi

Senyawa tanin umumnya dapat larut dengan pelarut dari polar sampai semipolar. Ekstraksi tanin dari jaringan tumbuhan dilakukan dengan menggunakan pelarut aseton 70% atau metanol 50% dalam air (FAO/IAEA, 2000). Lin *et al.* (2001) melakukan ekstraksi ellagitanin dari daun kering *Euphorbia tirucalli* dengan menggunakan pelarut aseton 60%. Sedangkan Machado *et al.* (2002) berhasil melakukan ekstraksi ellagitanin dari kulit buah delima segar (*Punica granatum*; Punicaceae) dengan etanol. Seperti yang dilakukan oleh Liu *et al.* (2001), jika menggunakan air sebagai pelarut, proses ekstraksi harus berlangsung pada kondisi air mendidih. Suhu panas dapat membantu ekstraktibilitas tanin terhadap pelarut air.

Prosedur ekstraksi biasa tidak cukup untuk mengisolasi ellagitanin. Proses ekstraksi umumnya dilakukan secara berulang dan bertahap. Sering kali, ekstraksi dengan aseton 70% dilakukan berulang sampai tiga kali dan dilanjutkan ke tahapan isolasi. Banyak pekerjaan isolasi ellagitanin mengharuskan penggunaan kromatografi kolom sebagai salah satu tahapan isolasi. Ellagitanin dapat terpisah dengan baik menggunakan kolom pemisah Sephadex LH-20, MCI-gel CHP 20P, atau ODS-AQ. Metanol dengan konsentrasi bertingkat merupakan eluen yang baik untuk memperoleh ellagitanin.



(18) flosin B



(19) reginin A

Isolasi lagerstroemin (5), flosin B (18), dan reginin A (19) dari bungur (*L. speciosa*) pertama kali menggunakan aseton 70% berulang tiga kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian disuspensikan dalam air dan dipartisikan dengan etil asetat, eter, dan butanol. Fraksi air yang terbentuk dipisahkan dengan menggunakan kolom pemisah Diaion HP-20 dengan eluen metanol. Proses isolasi berakhir dengan penggunaan instrumen HPLC-preparatif (*high performance liquid chromatography*). Kolom ODS-A, 2 x 15 cm, dengan eluen metanol 25%, CH₃CN 10 mM dan buffer fosfat pH 2 dapat memisahkan ellagitanin dengan baik (Hayashi *et al.*, 2002).

Pemisahan ellagitanin dari *P. granatum* dilakukan dengan kolom berurutan yaitu XAD-16 dan Sephadex LH-20 (eluen yang dipakai adalah metanol dengan konsentrasi bertingkat), setelah sebelumnya ekstrak etanol dipartisikan dengan heksana, butanol, dan etilasetat dan kloroform. Fraksi yang diperoleh dielusikan ke instrumen HPLC-preparatif fase balik, kolom RP-18, 2x25 cm menghasilkan α -punicalagin 20, β -punicalagin (21), α -punicalin 22 dan β -punicalin (23), dan asam elagat (3) (Machado *et al.*, 2001).

ANALISIS BIOKIMIA

Ellagitanin memberikan reaksi warna yang khas dengan asam nitrit (larutan NaNO₂ 10% dengan suhu rendah yang ditambahi asam asetat). Warna yang terbentuk merah yang kian lama berubah menjadi biru indigo. Prosedur sederhana ini biasa

digunakan untuk deteksi ellagitanin yang dipisahkan dengan menggunakan prosedur kromatografi kertas atau kromatografi lapis tipis (Harbone, 1996). Untuk analisis secara detail disarankan untuk tidak mengandalkan prosedur ini karena hanya cocok untuk deteksi pendahuluan.

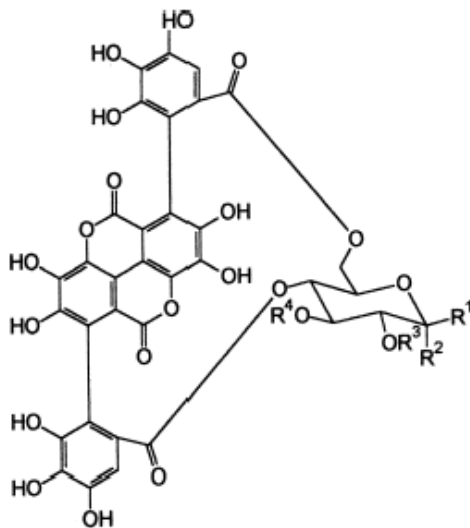
Teknik kromatografi lapis tipis (KLT) dua arah biasa digunakan untuk deteksi pendahuluan ellagitanin, jika hanya menggunakan KLT satu arah, hasil pemisahan kurang maksimal akibat adanya bercak-bercak yang masih menyatu. Lempeng yang digunakan dalam KLT adalah selulosa, misalnya MN300, dengan pengembang I dari asam asetat 2% v/v dan pengembang II dari campuran butanol: asam asetat: air (12:3:5). Penyemprot yang digunakan untuk ellagitanin adalah reagen vanillin/HCL dan reagen NaNO₂ (Harbone, 1996; FAO/IAEA, 2000).

Reagen vanillin/HCL dibuat dengan melarutkan 1 gram vanillin ke dalam 10 ml HCL 12 M. Setelah dibuat, hendaknya reagen ini langsung digunakan karena sifatnya yang tidak dapat bertahan lama. Jika disemprotkan ke spot ellagitanin, akan muncul warna merah. Reagen NaNO₂ dibuat dengan melarutkan 20 mg NaNO₂ dan beberapa tetes asam asetat glasial dalam 10 ml akuades yang telah didinginkan sampai mendekati titik beku. Untuk mengkondisikan lingkungan yang mendekati 0°C dapat digunakan nitrogen cair. Spot ellagitanin akan memberikan warna merah kecoklatan jika disemprot dengan reagen NaNO₂ (FAO/IAEA, 2000).

Analisis kuantitatif, sebagai lanjutan dari prosedur di atas, pun memanfaatkan prinsip yang

sama dengan reagen NaNO_2 . Sebanyak 0,5 ml ekstrak dicampur dengan 2,0 ml reagen NaNO_2 atau HNO_2 0,1 M pada suhu lingkungan rendah. Absorbansi diukur pada panjang gelombang 600 nm. Larutan standar yang digunakan adalah asam elagat (Harbone, 1996). Galvez (1997) menentukan kandungan asam elagat (3) dalam buah *Caesalpinia spinosa* dengan metode Hagerman dan Wilson (1990). Sebanyak 10 mg ekstrak dilarutkan dalam 1 ml H_2SO_4 2 N. Larutan dipanaskan 100°C selama 24 jam, kemudian didinginkan. Sebanyak 1 ml larutan tersebut ditambahkan dalam larutan piridin 1,1 ml dan 0,1 ml HCL. Pada suhu 30°C larutan ditambah 0,1 ml NaNO_2 1%. Absorbansi diukur pada 538 nm. Setelah 36 menit inkubasi pada suhu 30°C , dilakukan pengukuran absorbansi lagi. Selisih absorbansi sebanding dengan kandungan asam elagat dalam sampel. Kadar asam elagat dihitung dengan rumus $A_{538} = (0,3x \text{ mg kadar asam elagat}) - 0,04$.

Metode analisis dengan HPLC (*high performance liquid chromatography*) merupakan prosedur yang biasa ditempuh untuk menganalisis kandungan ellagitanin suatu tumbuhan obat. Prosedur ini cocok dilakukan karena kinerja HPLC yang baik untuk pemisahan senyawa-senyawa yang sulit menguap, termasuk di antaranya ellagitanin. Dengan waktu yang singkat dan persiapan yang tidak rumit, hasil pemisahan dapat segera diperoleh, untuk kemudian dianalisis baik kuantitatif maupun kualitatif. Meskipun membutuhkan biaya yang relatif mahal, setidaknya prosedur HPLC merupakan prosedur yang mutakhir dalam bidang fitokimia.



- (20) α -punicalagin R1=H, R2=OH, R3=R4=H
 (21) β -punicalagin R1=OH, R2=H, R3=R4=H
 (22) α -punicalin R1=H, R2=OH, R3=R4=HHDP
 (23) β -punicalin R1=OH, R2=H, R3=R4=HHDP

Metode standar yang biasa digunakan adalah kombinasi instrumen RP-HPLC (*Reverse Phase-HPLC*) atau HPLC-fase balik dengan detektor UV/Vis (*ultra violet/visible*) atau DAD (*diode array detector*). Panjang gelombang 280 nm merupakan panjang gelombang yang umum untuk deteksi

semua senyawa fenol dan turunannya (Salminen *et al.*, 1999). Asam elagat (3) dapat dideteksi pada panjang gelombang 260 nm (Rauha, 2001), α -punicalagin (20), β -punicalagin (21), α -punicalin (22), dan β -punicalin (23) dideteksi pada panjang gelombang 350 nm (Machado *et al.*, 2002).

Penentuan struktur ellagitanin hasil pemisahan didasarkan pada data spektrum MS (*mass spectrometric*) dan spektrum NMR (*nuclear magnetic resonance*). Dua instrumen tersebut menjadi standar dalam analisis struktur senyawa ellagitanin. Namun untuk pemula, membuat analisis spektrum MS dan NMR adalah pekerjaan yang relatif sulit. Teknik yang dapat digunakan untuk MS, misalnya FAB-MS (*fast atom bombardement-MS*) (Hatano *et al.*, 1992). Sedangkan untuk NMR baik H-NMR maupun C-NMR, antara lain COSY, NOESY, HMQC, dan HMBC (Lin *et al.*, 2001).

Perkembangan teknologi kromatografi saat ini telah memungkinkan kombinasi instrumen HPLC dengan MS. Dengan kombinasi HPLC-MS pekerjaan analisis struktur menjadi lebih mudah. Senyawa hasil pemisahan dari HPLC dapat secara langsung dianalisis spektrum massanya di instrumen MS. Terdapat beberapa pilihan teknik MS yang dapat dikombinasikan dengan HPLC, baik fase normal (NP) maupun fase balik (RP), antara lain API (*atmospheric pressure ionization*), APCI (*atmospheric pressure chemical ionisation*) (Rauha, 2001), dan ESI (*electrospray ionization*) (Salminen *et al.*, 2002) Teknik MS yang relatif sensitif adalah dengan MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight-MS*), namun sampai sekarang teknik ini belum memungkinkan untuk dikombinasikan dengan HPLC (Rauha, 2001).

AKTIVITAS BIOLOGI

Aktivitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari ikatan antara ellagitanin dengan protein, senyawa dengan berat molekul tinggi, senyawa sederhana, dan ion logam berat (Okuda *et al.*, 1992). Ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang dapat menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Berbagai penelitian telah dikembangkan untuk mengeksplorasi ellagitanin dan aktivitas biologinya. Pada tahun 1992, baru sekitar 90 senyawa ellagitanin yang diketahui memiliki aktivitas biologi (Okuda *et al.* 1992) dan diperkirakan masih banyak yang belum terungkap. Aktivitas biologi ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai anti-diabetes, anti-mikrobia, anti-virus, anti-hipertensi, anti-oksidan, dan anti-kanker/tumor. Dari sekian banyak penelitian yang telah dilakukan, belum ada yang menunjukkan efek toksik ellagitanin.

Anti-diabetes

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit fisiologis berupa perubahan homeostasis glukosa sehingga kadar glukosa dalam plasma darah mengalami kenaikan di atas normal. Kondisi ini sering disebut hiperglikemik (Maher, 2000).

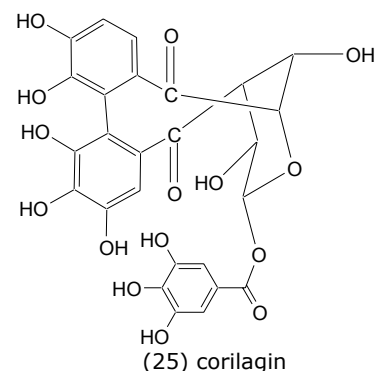
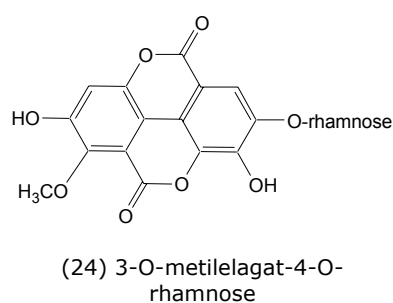
Berbagai jenis tumbuhan obat telah dimanfaatkan untuk terapi penyakit tersebut. Banyak penelitian telah sampai pada isolasi senyawa aktif tumbuhan yang mampu memberikan efek hipoglikemik atau anti-diabetes. Hayashi *et al.* (2002) berhasil mengisolasi lagerstroemin (5), flosin B (18), dan reginin A (19) dari daun kering bungur (*L. speciosa*) untuk uji anti-diabetes secara *in vitro*. Sebelumnya telah diketahui bahwa ekstrak daun bungur memiliki aktifitas hipoglikemik (Mishra *et al.* 1990; Kakuda *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001), yang mana ketiga senyawa ellagitanin tersebut diketahui berkaitan dengan efek hipoglikemik ekstrak daun bungur.

Efek hipoglikemik yang diberikan oleh ellagitanin daun bungur berupa peningkatan aktifitas transpor glukosa pada jaringan adiposa. Kemampuan lagerstroemin (5) dan flosin B (18) hampir setengah kali kemampuan insulin dalam meningkatkan kecepatan transpor glukosa. Bahkan reginin A (19) menunjukkan aktifitas yang hampir sama dengan insulin. Pada konsentrasi 0,04 mM, kecepatan transpor glukosa meningkat menjadi hampir 0,5 nmol/5 menit, padahal pada kontrol hanya 0,1 nmol/5 menit. Insulin sendiri meningkatkan transpor glukosa sampai 0,48 nmol/5 menit. Ini menunjukkan bahwa ellagitanin khususnya reginin A, dalam daun bungur cukup berpotensi untuk menggantikan peran hormon insulin (Hayashi, 2002).

Mekanisme peningkatan kecepatan transpor glukosa oleh ellagitanin tersebut diperkirakan melalui jalur yang sama dengan jalur kerja insulin. Perkiraan ini didasarkan pada fakta bahwa kerja ellagitanin dihambat oleh wortmanin (Hayashi *et al.*, 2002). Sedangkan wortmanin itu sendiri merupakan senyawa yang dapat menghambat (atau lebih tepatnya menutup jalur) kerja insulin (Standaert *et al.*, 1996).

Asam elagat (3) dalam daun meniran (*Phyllanthus niruri*; Euphorbiaceae) juga diketahui memiliki aktifitas hipoglikemik, baik pada hewan percobaan maupun penderita diabetes. Kandungan asam elagat (3) dalam tumbuhan tersebut menghambat kerja enzim aldose reduktase. Enzim ini bekerja pada jalur poliol (pembentukan sorbitol dan fruktosa dari glukosa). Pada penderita DM, proses perubahan glukosa menjadi fruktosa terganggu. Untuk mengembalikan keseimbangan metabolisme glukosa harus ada penghambatan kerja enzim aldose reduktase (Trueblood dan Ramasamy, 1998). Karena kerja enzim aldose reduktase dihambat oleh asam elagat (3) maka proses peningkatan kadar glukosa darah dapat menurun dan metabolisme glukosa menuju ke arah keseimbangan (Taylor, 2003; Shimizu *et al.*, 1989).

Rubus imperialis (Rosaceae) merupakan tumbuhan obat yang biasa digunakan sebagai bahan untuk terapi DM oleh penduduk Brazil (Kanegusuku *et al.*, 2002). Kandungan ellagitanin, 3-O-metilelagat-4-O-rhamnose (24), dalam



tumbuhan tersebut diperkirakan berkaitan dengan efek hipoglikemik yang diberikan oleh tumbuhan tersebut pada penderita diabetes. Kondisi hiperglikemia ini dapat menyebabkan aktivasi PKC (protein kinase C). Aktifnya PKC akan menginduksi berbagai penyakit kardiovaskuler dan komplikasi turunan diabetes lainnya (Koya dan King, 1998). Ellagitanin merupakan inhibitor PKC yang lebih kuat dibandingkan dengan gallotanin (Bruyne *et al.*, 1999). Oleh karena itu, ellagitanin juga dapat menurunkan resiko komplikasi yang diakibatkan oleh DM. Tanin merupakan senyawa yang berpotensi besar sebagai agen anti-mikrobia (Scalbert, 1991). Mekanisme anti-mikrobia tanin antara lain terjadi melalui inaktivasi adhesin mikrobia, penghambatan kinerja enzim, dan penghambatan transpor protein (Cowan, 1999).

Anti-mikrobia dan virus

Pengujian aktifitas anti-mikrobia terhadap *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Tricophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. terrestre*, *Penicillium italicum*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus nigricans*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Candidata krusei*, dan *Cryptococcus neoformans*, menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tanin-terhidrolisiskan dan flavonoid memiliki variasi aktifitas yang berbeda-beda tergantung jenis senyawa dan jenis mikrobia sasaran. Ellagitanin, corilagin (25), memiliki aktifitas yang sama dengan amfotericin B dan conazole terhadap *C. glabrata* (Latte dan Kolodziej, 2000).

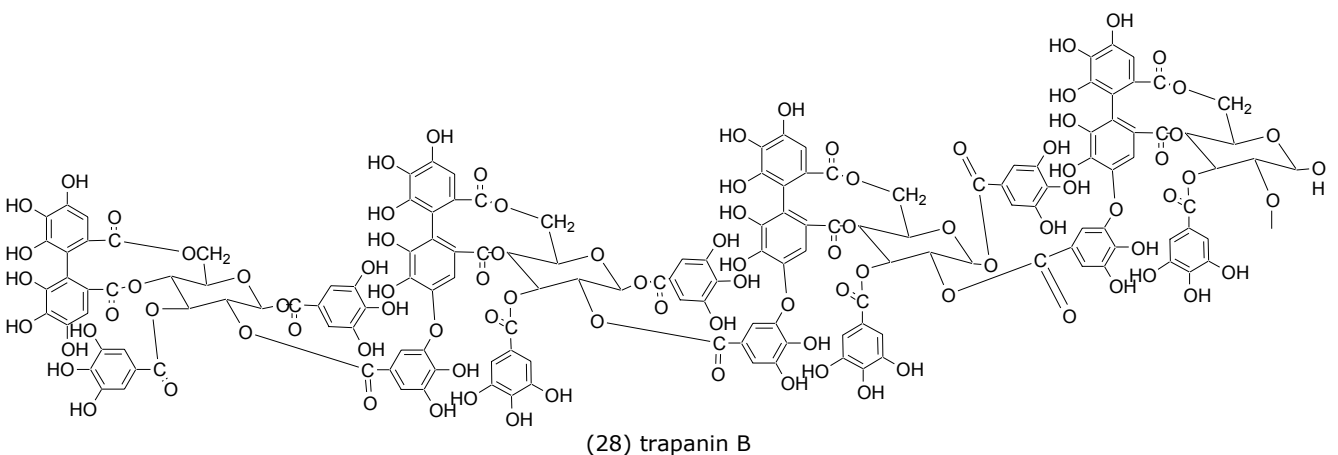
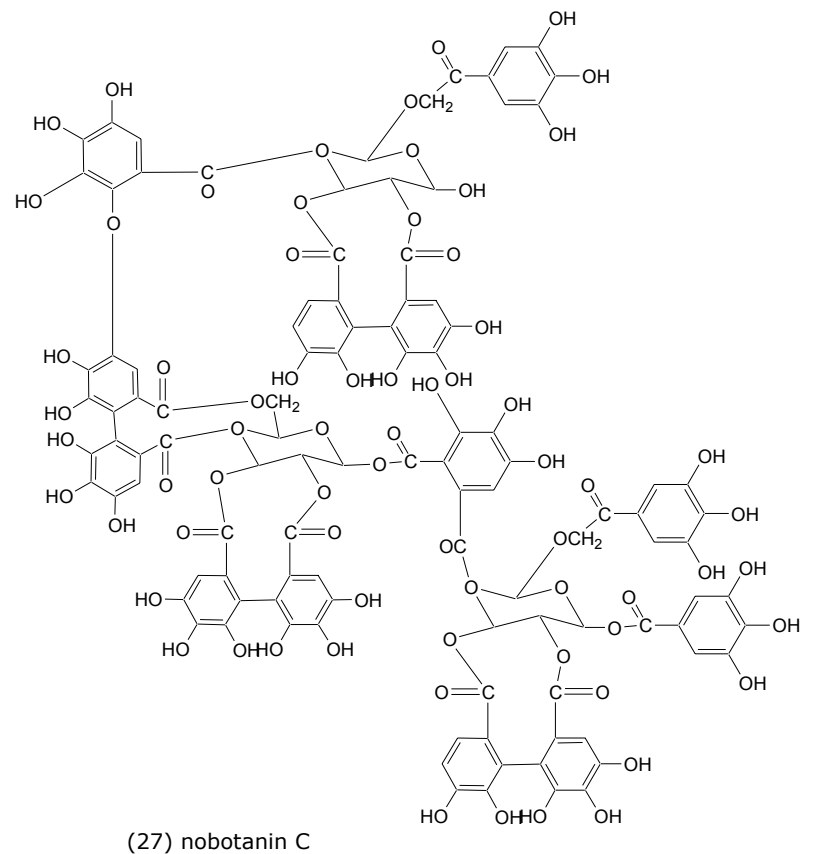
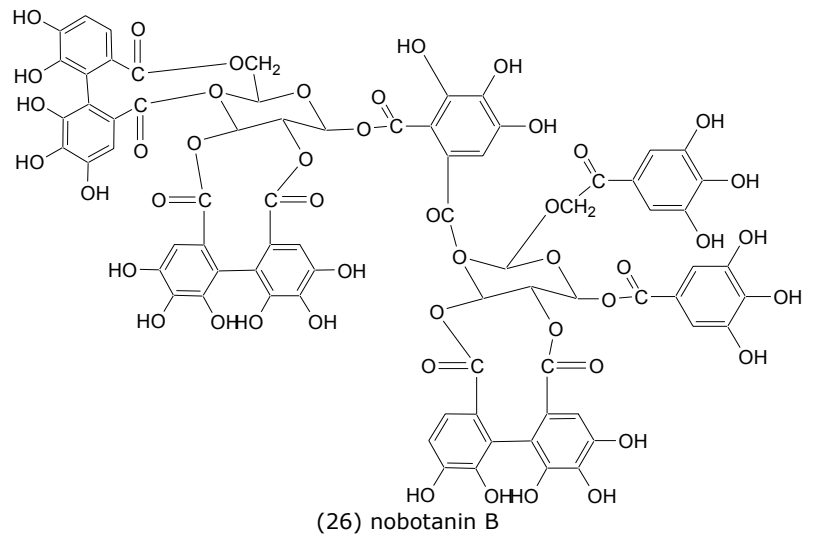
Punicalagin (20-21) dari delima mampu menghambat pertumbuhan beberapa strain *Staphylococcus aureus* yang telah resisten terhadap antibiotik. MIC (*minimum inhibitory concentration*) yang dibutuhkan untuk menghambat semua strain *S. aureus* adalah 61,5 µg/ml. Hal yang berbeda diperoleh pada punicalagin yang diekstrak dari *Terminalia citrina*. MIC yang dibutuhkan relatif lebih besar yaitu, 768 µg/ml (Machado *et al.*, 2002). Punicalagin (20-21) yang diekstrak dari *Combretum molle* (Combretaceae) mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (typus humanus ATCC 27294). Punicalagin diketahui lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* dibandingkan saponin yang diekstrak dari tumbuhan yang sama (Asres, *et al.*, 2001).

Aktifitas anti-virus dari ekstrak tumbuhan diketahui berkaitan dengan kelompok senyawa

polifenol, terutama flavonoid dan tanin, yang terkandung di dalamnya (Cowan, 1999). Senyawa ellagitanin baru, arjunin, dan empat senyawa lainnya, yakni asam elagat (3), pentagalloylglukosa (17), asam galat (1), dan HHDP (4) dari ekstrak daun *Terminalia arjuna* (Combretaceae) mampu menghambat pertumbuhan virus HIV-1. Arjunin memberikan efek penghambatan yang paling tinggi, lebih dari 70% pada konsentrasi 0,2 mg/ml (Kandil dan Nassar, 1998). Ellagitanin lainnya yang telah lebih dulu diketahui mempunyai aktifitas anti-HIV adalah nobotanin B (26) dan C (27), oenothin B (35), agrimoniin (33), coriariin A (39) dan trapanin B (28) (Okuda *et al.*, 1992).

Ekstrak kemloko (*Phyllanthus emblica*; Euphorbiaceae) juga berpotensi sebagai anti-HIV (Ogata *et al.*, 1992) Buah kemloko merupakan salah satu bahan ramuan obat tradisional "triphala" dari India, mengandung beberapa ellagitanin yang berpotensi sebagai anti-HIV/AIDS. Putranjivain A memberikan efek penghambatan HIV yang paling tinggi. Putranjivain A mampu menghambat kerja enzim reverse-transcriptase yang berperan penting dalam proses replikasi HIV (Wohlmuth, 2003).

Ellagitanin yang terkandung dalam tumbuhan kemloko diperkirakan mampu menghambat pertumbuhan virus hepatitis B (Taylor, 2003). Aktifitas anti-virus juga didapatkan pada tumbuhan *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae). Ekstrak daun *Geranium* yang mengandung kompleks polifenol, meliputi ellagitanin, gallotanin, flavonoid, dan asam fenolat dapat menghambat aktifitas reproduksi virus influenza dan herpes (Serkedjewa dan Manolova, 1992). Hal yang sama juga ditunjukkan oleh tumbuhan *Epilobium hirsutum* L.



(Onagraceae) (Ivancheva *et al.*, 1992). Galloilasi (penambahan gugus galloil), perbedaan ikatan interflavan, dan sifat tereokimia dari gugus hidroksil berpengaruh secara kuat terhadap aktifitas penghambatan pertumbuhan virus. Efek penghambatan ini berkaitan dengan pencegahan terbentuknya kompleks enzim-asam nukleat (Bruyne *et al.*, 1999).

Anti-hipertensi

Hipertensi merupakan salah satu bentuk penyakit kardiovaskuler. Penyakit ini dicirikan dengan tekanan darah penderita yang mengalami kenaikan di atas normal (Koya dan King, 1998). Geraniin (7), yang dapat ditemukan dalam familia Euphorbiaceae, dapat memberikan efek hipotensif (penurunan tekanan darah) secara signifikan. Tekanan sistolik penderita hipertensi dapat turun kembali normal setelah diberi ekstrak daun kemloko yang mengandung geraniin (7) (Taylor, 2003). Efek anti-hipertensi melalui vasodilatasi (pelebaran pembuluh darah) juga ditunjukkan oleh ellagitanin, lambertianin C dan sanguin H-6 (29) dalam ekstrak *Rubus idaeus* (Mullen *et al.*, 2002).

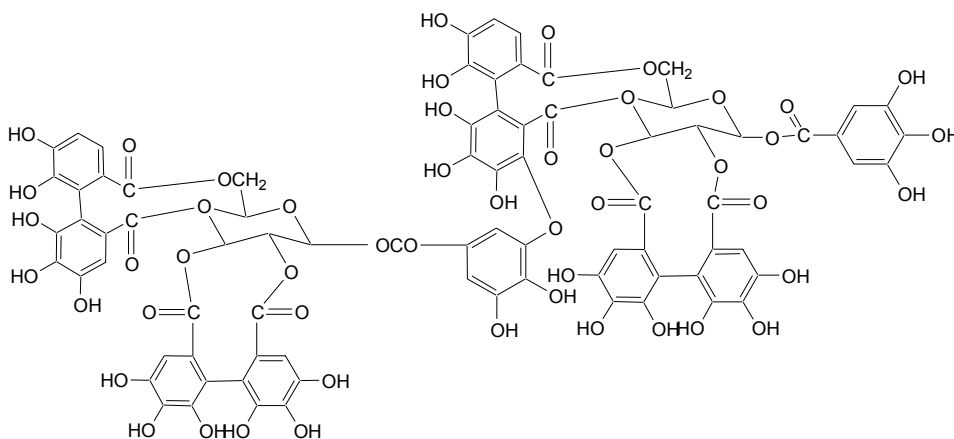
Mekanisme penurunan tekanan darah

diperkirakan berkaitan dengan pengaruh ellagitanin terhadap kesetimbangan ion Ca^{2+} sel. Ellagitanin mempengaruhi ketersediaan ion Ca^{2+} untuk kontraksi otot jantung dan polos. Konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler yang tinggi dapat menyebabkan naiknya tekanan darah atau hipertensi. Rauha (2001) menyebutkan bahwa beberapa senyawa ellagitanin dapat menghambat masuknya ion Ca^{2+} ke dalam sel, sehingga konsentrasi ion Ca^{2+} intraseluler dapat turun dan secara fisiologis diikuti dengan turunnya tekanan darah penderita hipertensi. Namun ada juga yang justru meningkatkan absorpsi ion Ca^{2+} ke dalam sel, seperti rugosin E (30) dari *Rosa rugosa* (Rosaceae), vescalagin (31), dan pedunculagin (32) yang mempengaruhi kesetimbangan Ca^{2+} intraseluler dalam sel platelet kelinci (Teng *et al.*, 1997).

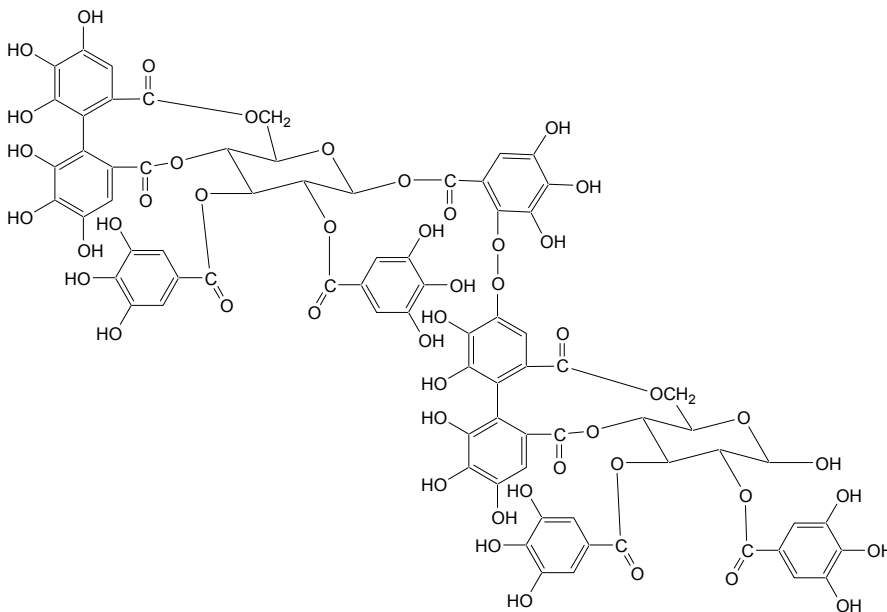
Anti-oksidan

Anti-oksidan merupakan senyawa yang jika berada pada konsentrasi yang relatif lebih rendah dibandingkan konsentrasi suatu substrat, maka akan teroksidasi lebih dulu, sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi substrat tersebut. Tanin dapat menghambat pembentukan oksigen aktif yang dapat menyebabkan oksidasi. Baik gallotanin maupun ellagitanin, merupakan senyawa anti-oksidan yang cukup berpotensi (Rauha, 2001; Okuda *et al.*, 1992). Aktifitas anti-oksidatif ellagitanin tersebut berkaitan dengan struktur kimianya. Naiknya jumlah gugus galloil, berat molekul, dan struktur ortohidroksil meningkatkan aktifitas anti-oksidatif tanin (Yokozawa *et al.*, 1998).

Dalam reviewnya, Okuda *et al.* (1992) menyebutkan aktifitas anti-oksidatif tanin, termasuk ellagitanin, antara lain penghambatan autooksidasi asam askorbat yang dikatalisi oleh ion Cu^{2+} , penghambatan autooksidasi metillinoleat dan peroksidasi lipida di mitokondria dan mikrosum hepar tikus, reduksi kandungan lipid peroksida dalam serum dan hepar tikus, efek proteksi kerusakan oksidatif lensa okuler, aktifitas antihepatotoksik pada kultur primer hepatosit tikus, penghambatan peroksidasi lipida-tergantung lipoksinase (*lipoxigenase-dependent* lipid



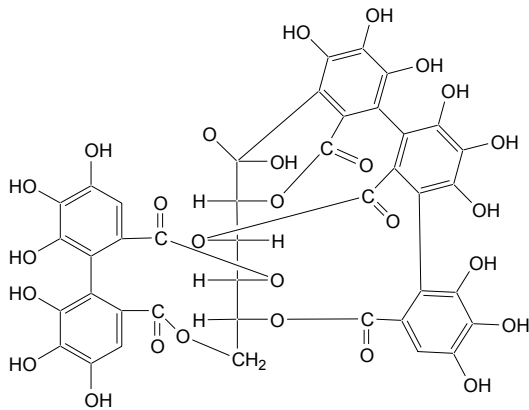
(29) sanguin H-6



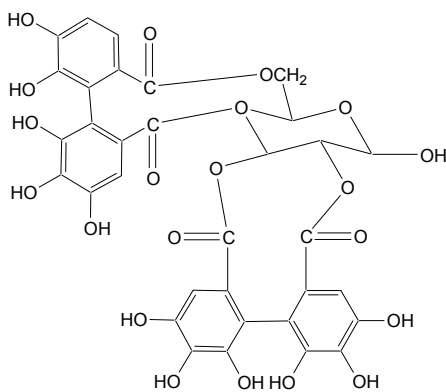
(30) rugosin E

peroksidation) efek penghambatan lipoksinase pada metabolisme arachidonat dalam leukosit, aktifitas anti-oksidatif pada monoamine oksidase dan xanthine oksidase, penghambatan anion radikal superoksida dan radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, dan penghambatan mutagen yang bekerja secara langsung (*direct-acting mutagens*).

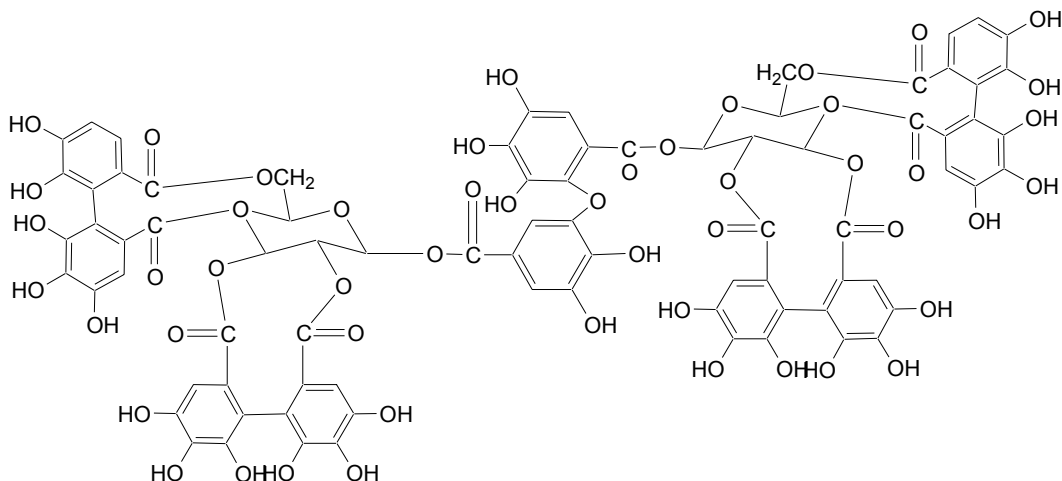
Emblicanin A dan B, punigluconin, dan pedunculagin (32) dalam buah *Phyllanthus emblica* mampu menghambat peroksidasi lipida yang diinduksi dengan radiasi sinar gamma pada



(31) vescalagin



(32) pedunculagin



(33) agrimoniin

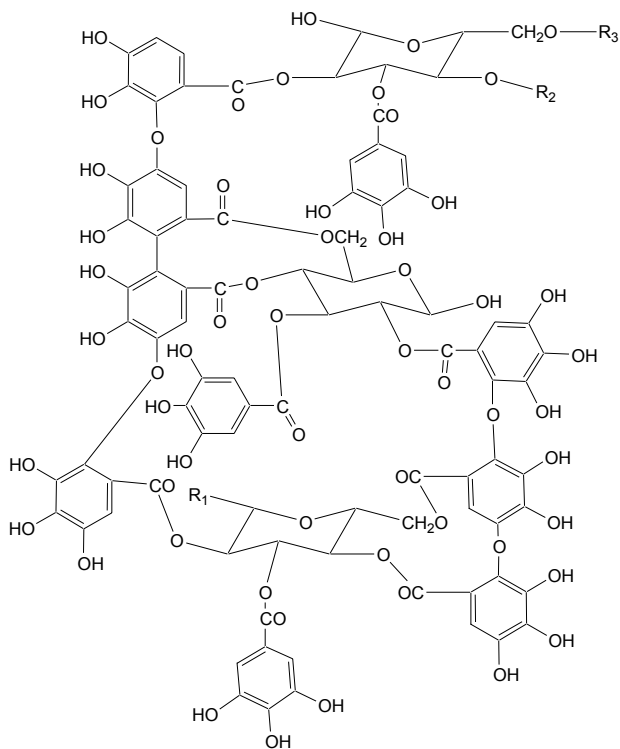
mikrosom hepar tikus. Ekstrak yang sama juga menghambat kerusakan enzim antioksidan superoksida dismutase yang diakibatkan oleh radiasi pada mitokondria hepar tikus. Perlakuan secara intraperitoneal pada tikus selama 7 hari menunjukkan peningkatan aktifitas enzim antioksidan superoksida dismutase, katalase dan glutation peroksidase dalam otak tikus. Peroksidasi lipida dalam otak tikus juga dapat terhambat aktifitasnya. Pada penelitian khusus untuk emblicanin A dan B, ditunjukkan adanya perlindungan hemolisis eritrosit yang diinduksi oleh oksigen radikal (Wohlmuth, 2003).

Lambertianin C dan sanguin H-6 (29) selain mempengaruhi kesetimbangan ion Ca^{2+} , juga memiliki aktifitas anti-oksidatif. Aktifitas tersebut akan semakin meningkat jika dua ellagitannin di atas bersama dengan asam askorbat (vitamin C) (Mullen *et al.*, 2002). Metil (S)-flavogallonat, bersama dengan asam gallat (1), asam elagat (3), punicalagin (20-21), dan sebelas senyawa fenol lainnya dalam ekstrak *Terminalia myriocarpa* mampu menghambat peroksidasi lipid dan pembentukan nitrogen oksida pada hepar tikus (Marzouk *et al.*, 2002).

Anti-kanker/tumor

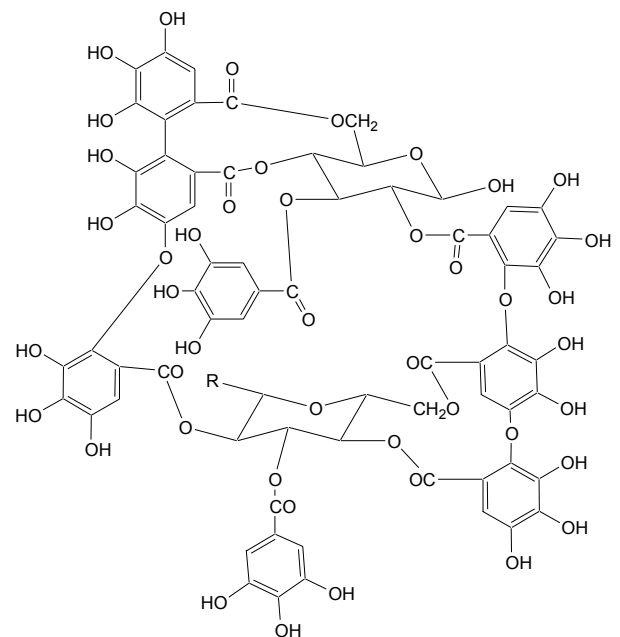
Kanker adalah sekumpulan sel yang mengalami pertumbuhan tak terkendali dan tak terorganisir. Di dalam tubuh sel kanker membentuk suatu badan yang disebut tumor. Kanker dapat timbul karena terjadinya kerusakan (lebih tepatnya mutasi) gen dalam sel (Snustad dan Simmon, 2000). Aktifitas anti-kanker suatu tanin terjadi melalui mekanisme penghambatan kerja enzim sel, pencegahan proses mutagenesis yang dapat menimbulkan kanker, dan pengaktifan makrofag sel kanker.

Ekstrak air buah *Phyllanthus emblica* dapat mencegah kerusakan kromosom akibat oksigen radikal yang dapat menimbulkan kanker pada tikus. Efek pencegahan ini berkaitan dengan aktifitas anti-oksidatif emblicanin A dan B dan pyrogallol dalam buah *Phyllanthus* (Wohlmuth, 2003). Agrimoniin (33) dari ekstrak *Agrimonia pilosa* diketahui memiliki aktifitas anti-tumor yang kuat. Dalam laboratorium,



(34) oenothein A, R1=OH, R2=(s)-HHDP, R3=(s)-HHDP

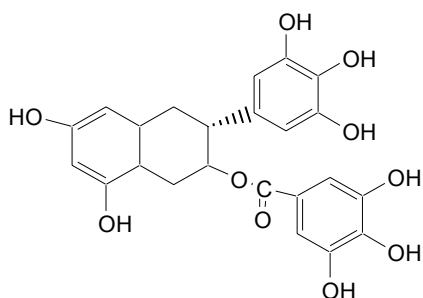
(37) woodfordin D, R2=(a)-O-galloil, R2=(s)-HHDP, R3=(s)-HHDP



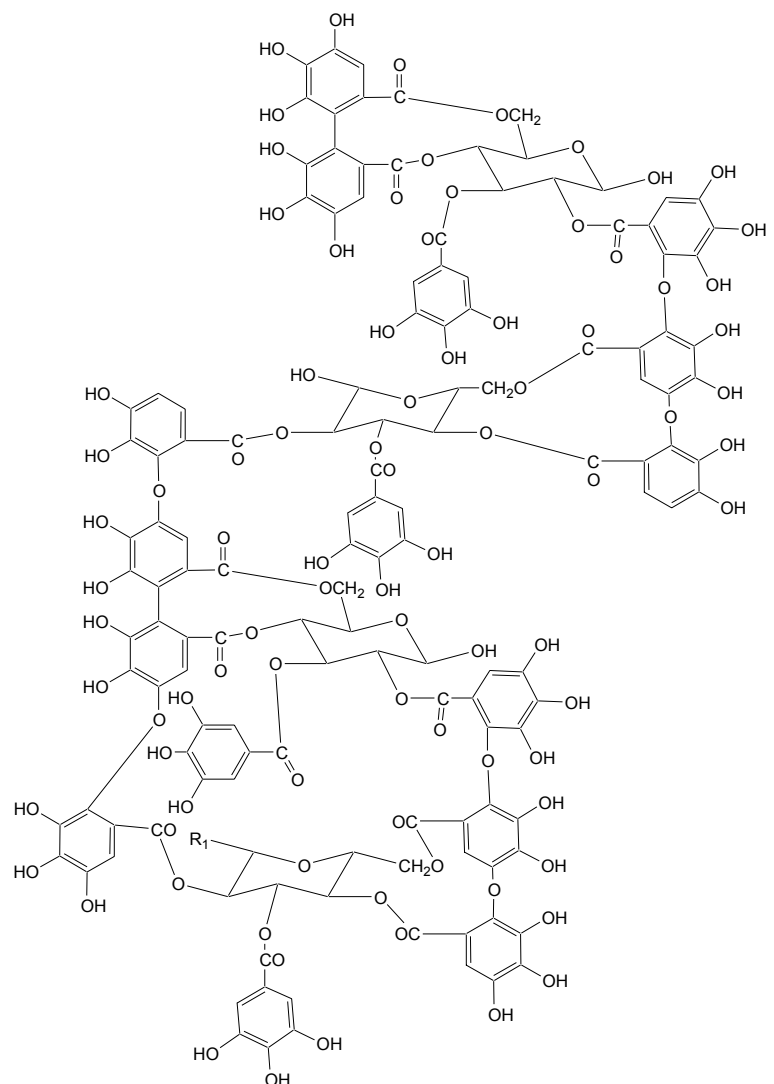
(35) oenothein B, R=OH

(36) woodfordin C, R=(a)-O-galloil

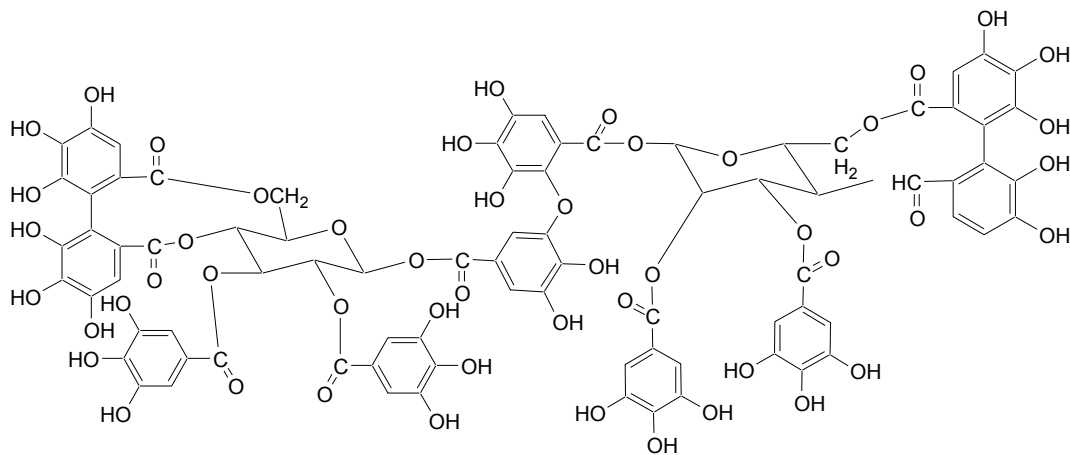
setelah perlakuan agrimoniin (33) (sebelum atau sesudah inokulasi intraperitoneal sel tumor) dapat menghambat pertumbuhan tumor secara signifikan. Ellagitanin lainnya, oenothein A (34) dan B (35), woodfordin C (36), D (37), dan F (38), coriariin (39) dan cornusin (40) juga memiliki aktifitas yang sama (Okuda *et al.*, 1992). Alienanin B dan stenophyllanin A dari *Coleogyne ramosissima* dan *Cowania mexicana* mampu menghambat aktivasi EBV-EA (*Epstein-Barr virus-early antigen*) yang dapat menginduksi kanker. Aktifitas dua ellagitanin tersebut lebih kuat jika dibandingkan dengan (-)-epigallocatechin gallat (41). Aktifitas pembentukan tumor pada kulit mencit juga dihambat oleh ellagitanin tersebut (Ito *et al.*, 1999).



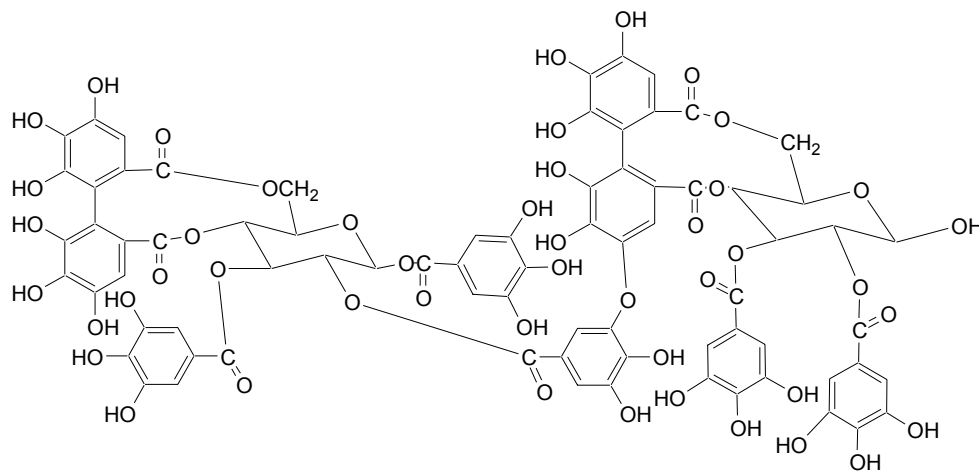
(41) (-)-epigallocatechin gallat



(38) woodfordin F



(39) coriariin A



(40) cornusiin

Ellagitanin oligomer makrosiklis, antara lain oenothetin B (35), woodfordin C (36) dan D (37) menunjukkan aktifitas sitotoksik terhadap sel kanker epithelium dan sel kelenjar saliva relatif lebih kuat daripada asam gallat (1) dan (-)-epigallocatechin gallat (41). Ellagitanin tersebut menginduksi kematian sel karena apoptosis melalui fragmentasi DNA dan pembelahan sitokeratin 18 (Sakagumi, 2000). Studi yang mendalam tentang ellagitanin dimer makrosirkuler, menunjukkan bahwa oenothetin B (33) berpotensi dalam menghambat kinerja poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG). Penghambatan tersebut dapat menyebabkan ekspresi gen MMTV (*mouse mammary tumor virus*) pada kultur sel 34I mengalami gangguan (Aoki *et al.*, 1995). Penghambatan PARG akan diikuti dengan penghambatan aktivitas poly(ADP-ribose)polimerase (PARP) dimana telah diketahui aktifitas PARP dapat menyebabkan kematian sel karena nekrosis. Penghambatan PARP dapat melindungi sel dari hidrogen peroksida (Virag dan Szabo, 2002).

KESIMPULAN

Ellagitanin termasuk dalam golongan senyawa tanin-terhidrolisiskan dengan jalur biosintesis asam shikimat – asam gallat – pentagalloylglukosa. Biosintesis ellagitanin secara spesifik masih belum jelas, sehingga perlu penelitian lanjut yang mengarah pada jalur-jalur biosintesis secara spesifik. Isolasi ellagitanin dapat dilakukan dengan ekstraksi bertahap dilanjutkan dengan kromatografi kolom dan HPLC-preparatif. Aktifitas biologi ellagitanin merupakan implikasi dari terbentuknya ikatan molekuler antara ellagitanin dengan senyawa lain terutama protein. Adanya ikatan tersebut membentuk kompleks senyawa yang menyebabkan perubahan fisiologis dalam sel atau jaringan makhluk hidup. Beragam penelitian telah dilakukan untuk mempelajari aktifitas biologi ellagitanin, namun diperkirakan masih banyak hal yang belum terungkap. Aktifitas biologis ellagitanin yang telah diketahui antara lain sebagai anti-diabetes, anti-mikrobia dan virus, anti-hipertensi, anti-oksidan, dan anti-kanker/tumor.

DAFTAR PUSTAKA

- Asres, K., F. Bucar, S. Edelsbrunner, T. Kartnig, G. Hoger, and W. Thiel. 2001. Investigation on antimycobacterial activity of some Ethiopian medicinal plants. *Phytoterapy Research* 15 (4): 323–326.
- Bruyne, T.D., L. Pieters, H. Deelstra, and A. Vlietinck. 1999. Condensed vegetable tannins: biodiversity structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 445–459.
- Cowan, MM. 1999. Plant products as anti-microbial agents. *Clinical Microbiology Review* 12 (4): 564–582.
- Cragg, G.M. 1997. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Product* 60: 52–60.
- Edwards, R and J.A. Gatehouse. 1999. Secondary metabolism. In Lea, P.J. and R.C. Leegood (ed.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- FAO/IAEA. 2000. *Quantification of Tannin in Tree Foliage: A Laboratory Manual for the FAO/IAEA Coordinated Research Project 'Use of Nuclear and Related Techniques to Develop simple Tannin Assays for Predicting and Improving the Safety and Efficiency of Feeding Ruminants on Tanniferous Tree Foliage'*. USA: Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture.
- Farnsworth, N.R. 1994. *Ethno-botany and the Search for New Drugs*. New York: John Wiley and Sons.
- Gottlieb, O.R and M.R.M.B. Borin. 2000. Medicinal Products: Regulation of Biosynthesis in Space and Time. *Mimeo Instituto de Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 95 (1): 115–120.
- Gross, G.G. 1992. Enzymes in the biosynthesis of hydrolyzable tannins. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Hagerman, A.E and T.H. Wilson. 1990. Quantitative Determination of Ellagic Acid. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 38 (8): 1678–1683.
- Hagerman, A.E., C.T. Robbins, Y. Weerasuriya, T.C. Wilson, and C. McArthur. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management* 45 (1): 57–62.
- Harbone, J.B. 1996. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (Phytochemical Methods)*. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soedino. Edisi ke-2. Bandung: Penerbit ITB.
- Harvey A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drugs Discovery Trends* 5 (7): 294–300.
- Hatano, T., A. Okonogi, and T. Okuda. 1992. Oligomeric hydrolyzable tannins from **Liquidambar formosa** and spectral analysis of the orientation of valemoyl groups in their molecules. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Hayashi, T., H. Maruyama, R. Kasai, K. Hattori, S. Takasuga, O. Hazeki, K. Yamasaki, and T. Tanaka. 2002. Ellagitannins from **Lagerstroemia speciosa** as activators of glucose transport in fat cells. *Planta Medica* 68: 173–175
- Helm, R.F. 2000. Heartwood formation in woody plants. *Biotech Times* 7 (2): 1–3.
- Ito, H., M. Miyake, E. Nitishitani, K. Mori, T. Hatano, T. Okuda, T. Konoshima, M. Takasaki, M. Kozuka, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, and T. Yoshida. 1999. Anti-tumor activity of polyphenols from **Cowania mexicana** and **Coleogyne ramisissima**. *Cancer Letters* 143 (1): 5–13.
- Ivancheva, S., N. Manolova, J. Serkedjieva, V. Dimov, and N. Ivanovska. 1992. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Kakuda, T., I. Sakane, T. Takihara, Y. Ozaki, H. Takeuchi, and M. Kuroyanagi. 1996. Hypoglycemic effect of extracts from **Lagerstroemia speciosa** L. leaves in genetically diabetic KK-Ay mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 60 (2): 204–208
- Kandil, F.E. and M.I. Nassar. 1998. A tannin anti-cancer promoter from **Terminalia arjuna**. *Phytochemistry* 47 (8): 1567–1568.
- Kanegusuku, M., J.C. Benassi, R.C. Pedrosa, S.A. Yunes, V.C. Filho, A.A. Maia, M.M. de Souza, F.D. Monache, and R. Niero. 2002. Cytotoxic, hypoglycemic activity, and phytochemical analysis of **Rubus imperialis** (Rosaceae). *Z. Naturforsch* 57c: 272–276.
- Khan, M.T.H., L. Lampronti, D. Martello, N. Bianchi, S. Jabbar, M.S.K. Choudhuri, B.K. Datta, and R. Gambari. 2002. Identification of pyrogallol as an anti-proliferative compound present in extracts from the medicinal plant **Emblica medicinalis**: effect on in-vitro cell growth of human tumor cell lines. *International Journal of Oncology* 20: 187–192.
- Koya, D. and G.L. King. 1998. Perspectives in diabetes: protein kinase activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 49: 859–866.
- Latte, K.P. and H. Kolodziej. 2000. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi, and yeasts. *Z. Naturforsch* 55c: 467–472.
- Lee, K.H., H.K. Wang, H. Itokawa, and S.L. Morris-Natschke. 2000. Current perspectives on Chinese medicines and dietary supplements in China, Japan and the United States. *Journal of Food and Drug Analysis* 8 (4): 219–228.
- Liu, Z., S.B. Carpenter, W.J. Bourgeois, Y. Yu, R.J. Constantin, M.J. Falcon, and J.C. Adam. 1998. Variation in the secondary metabolite camptothecin in relation to tissue age and season in **Camptotheca acuminata**. *Tree Physiology* 18: 265–270.
- Liu, F, J.K. Kim, Y. Li, X. Liu, J. Li, and X. Chen. 2001. An extract of **Lagerstroemia speciosa** L. has insulin-like glucose uptake-stimulatory and adipocyte differentiation-inhibitory activities in 3T3-L1 cells. *Journal of Nutrition* 131: 2242–2247.
- Machado T.B., I.C.R. Leal, A.C.F. Amaral, K.R.N. dos Santos, M.G. da Silva, and R.M. Kuster. 2002. Antimicrobial ellagitannin from **Punica granatum**. *Journal of Brazilian Chemical Society* 13 (5): 606–610.
- Maher, J. Timothy. 2000. Alpha-lipoic acid and Co-Q10 in diabetes mellitus. *Natural Healing Track* [July]: 2–7.
- Marzouk, M.S., S.A. El-Tommy, F.A. Moharram, N.M. Shalaby, A.A. Ahmad. 2002. Pharmacologically active ellagitannins from **Terminalia myriocarpa**. *Planta Medica* 68 (6): 523–527.
- Mishra, Y., M.S.Y. Khan, R. Zafar, and S.S. Agarwal. 1990. Hypoglycemic activity of leaves of **Lagerstroemia speciosa** (L) Pers. *Indian Journal of Pharmacology* 22: 174–176
- Mori, T., A.S.A. Mohamed, M. Sato, and T. Yamasaki. 2000. Ellagitannin toxicity in the free-living soil-inhabiting nematode, **Caenorhabditis elegans**. *Journal of Pesticide Science* 25: 405–409.
- Mullen, W., J. McGinn, M.E. Lean, M.R. MacLean, P. Gardner, G.G. Duthie, T. Yokota, A. Crozier. 2002. Ellagitannins, flavonoids, and other phenolics in red raspberries and their contribution to antioxidant capacity and vasorelaxation properties. *Agricultural Food Chemistry* 50 (18): 5191–5206.
- Ogata, T., H. Higuchi, S. Mochida, H. Matsumoto, A. Kato, T. Endo, A. Kaji, and H. Kaji. 1992. HIV-1 reverse

- transcriptase Inhibitors from **Phyllanthus niruri**. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8 (11): 1937-1944.
- Okuda, T., T. Yoshida, and T. Hatano. 1992. Pharmacologically Active Tannins Isolated from Medicinal Plants. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Raskin, I., D.M. Ribnicky, S. Komamytsky, N. Ilic, A. Poulev, N. Borisjuk, A. Brinker, D.A. Moreno, C. Ripoll, N. Yakoby, J.M. O'Neal, T. Cornwell, I. Pastor, and B. Fridlender. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends in Biotechnology* 20 (12): 522-531.
- Rauha, J.P. 2001. *The Search for Biological Activity in Finnish Plant Extracts Containing Phenolic Compounds*. [Dissertation]. Helsinki: Faculty of Science, University of Helsinki.
- Sakagami, H., Y. Jiang, K. Kusama, T. Atsumi, T. Ueha, M. Toguchi, I. Iwakura, K. Satoh, H. Ito, T. Hatano, and T. Yoshida. 2000. Cytotoxic activity of hydrolysable tannins against human oral tumor cell lines—a possible mechanism. *Phytomedicine* 7 (1): 39-47.
- Salminen, J.P., V. Ossipov, J. Lojonen, E. Haukioja, and K. Pihlaja. 1999. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of **Betula pubescens** by high-performance liquid chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 864 (2): 283-291.
- Salminen, J.P., V. Ossipov, and K. Pihlaja. 2002. Distribution of hydrolysable tannins in the foliage of Finnish birch species. *Z. Naturforsch* 57c: 248-256.
- Scalbert, A. 1991. Anti-microbial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875-3883.
- Scalbert, A. 1992. Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Serkedjieva, J. and N. Manolova. 1992. Plant polyphenolic complex inhibits the reproduction of influenza and herpes simplex viruses. In Hemingway, R.W. and P.E. Laks (ed.). *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, and Significance*. New York: Plenum Press.
- Shimizu, M., S. Horie, S. Terashima, H. Ueno, T. Hayashi, S. Suzuki, M. Yoshizaki, N. Morita. 1989. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. II. active components of a Paraguayan crude drug "parai-parai", **Phyllanthus niruri**. *Chemistry and Pharmacology Bulletin* 37 (9): 2531-2532.
- Smith PM. 1976. *The Chemotaxonomy of Plants*. London: Edward Arnold.
- Snustad, D.P., and M.J. Simmons. 2000. *Principles of Genetics*. 2nd edition. New York: John Wiley and Sons, Inc.
- Standaert, M.L., A. Avignon, K. Yamada, G. Bandyopadhyay, and R.V. Farese. 1996. The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin, inhibits insulin induced activation of phosphatidylcholine hydrolysis and associated protein kinase C translocation in rat adipocytes. *Biochemistry Journal* 313: 1039-1046.
- Stepp, J.R. and D.E. Moerman. 2001. The importance of weeds in ethno-pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 75: 19-23.
- Taylor, L. 2003. *Herbal Secrets of The Rainforest*. 2nd edition. Austin: Sage Press, Inc.
- Teng, C.M., Y.F. Kang, Y.L. Chang, F.N. Ko, S.C. Yang, F.L. Hsu. 1997. ADP-mimicking platelet aggregation caused by rugosin E, an ellagitannin isolated from **Rosa rugosa** Thunb. *Thrombocyte Haemost* 77 (3): 556-561.
- Trueblood, N. and R. Ramasamy. 1998. Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. *American Physiological Society* 1: 175-183.
- Virag, L and C Szabo. 2002. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. *Pharmacological Review* 54 (3): 375-429.
- Wohlmuth, H. 2003. Triphala—a short review. *Botanical Pathways* 16: 1-7.
- Xu, Y.M, T. Sakai, T. Tanaka, G. Nonaka, I. Nishioka. 1991a. Tanin and related compounds CVI: Preparation of aminoalditol derivatives of hydrolysable tannins having α and β -glucopyranose cores, and its application to the structure elucidation of new tanins, ruginin A and B, flosin A isolated from **Lagerstroemia flos-reginae** Retz. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39 (3): 639-646.
- Yokozawa, T., C.P. Chen, E. Dong, T. Tanaka, G.I. Nonaka, and I. Nishioka. 1998. Study of inhibitory effect of tannins and flavonoid against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (chemotherapy and metabolic inhibitors). *Biochemistry and Pharmacology* 56 (2): 213-222.

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. **Tatanama 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. Indek minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Naskah yang terlalu panjang dapat dibuat berseri, tetapi naskah demikian jarang diterbitkan jurnal ini. **Judul pelari** (*running title*) sekitar 5 kata. **Nama penulis** atau para penulis pada naskah kelompok ditulis secara lengkap dan tidak disingkat. **Nama dan alamat institusi** ditulis lengkap dengan nama dan nomor jalan (lokasi), kode pos, nomor telepon, nomor faksimili, alamat e-mail dan website. Pada naskah kelompok perlu ditunjukkan penulis untuk korespondensi beserta alamat dengan urutan seperti di atas. **Abstract** sebaiknya tidak lebih dari 200 kata, ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. **Kata kunci** (*Keywords*) sekitar 5 kata, meliputi nama ilmiah dan daerah (apabila ada), topik penelitian dan metode-metode khusus yang digunakan. **Pendahuluan** (*Introduction*) sekitar 400-600 kata, meliputi latar belakang, tinjauan pustaka dan tujuan penelitian. **Bahan dan Metode** (*Materials and Methods*) sebaiknya ditekankan pada cara kerja dan cara analisis data. **Hasil dan Pembahasan** (*Results and Discussion*) ditulis sebagai satu rangkaian, pada tulisan yang cukup panjang sebaiknya dibuat beberapa sub judul. Pembahasan merupakan jawaban pertanyaan *mengapa* dan *bagaimana* hasil penelitian dapat terjadi, bukan sekedar mengungkapkan kembali hasil penelitian dalam bentuk kalimat. Pembahasan yang lengkap dan menyeluruh lebih disukai dari pada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan, meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan terima kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul table 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 pustaka, naskah yang ditulis oleh dua penulis, maka nama keduanya disebutkan, sedang naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, maka hanya nama penulis pertama 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., K.H. Gough, D.D. Shukla, and C.K. Pallaghy. 1998. Coat protein sequence of Krish-infected strain of Johnson-grass mosaic potyvirus. *Archives of Virology* 143: 1015-1020.

Buku:

Sprent, J.I, and P. Sprent. 1990. *Nitrogen Fixing Organisms: Pure and Applied Aspects*. London: Chapman and Hall.

Bab dalam buku:

Baker, C.M.A. and C. Manwell. 1991. Population genetics, molecular markers and gene conservation of bovine breeds. In: Hickman, C.G. (ed.). *Cattle Genetic Resources*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.

Abstrak:

Liu, Q., S. Salih, J. Ingersoll, R. Meng, L. Owens, and F. Hammerschlag. 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, Fla., 23-26 July 2000.

Prosiding:

Alikodra, H.S. 2000. Keanekaragaman hayati bagi pembangunan daerah otonom. *Dalam: Setyawan, A.D. dan Sutarno (ed.). 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]. Jakarta: Universitas Indonesia.

Informasi dari Internet:

Rosauer, D. 1998. *Forest Disturbance and Succession*. <http://www.anu.edu.au/Forestry/silviculture/daniel/chapter1/1.1.html>

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

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

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

PENTING: Penulis atau para penulis dalam naskah kelompok setuju memindahkan hak cipta (*copyright*) naskah yang diterbitkan *Biofarmasi, Journal of Pharmacological and Biological Sciences* kepada Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta. Penulis tidak lagi diperkenankan menerbitkan naskah secara utuh tanpa ijin penerbit. Penulis atau pihak lain diperkenankan memperbanyak naskah dalam jurnal ini selama tidak untuk tujuan komersial. Untuk penemuan baru, penulis disarankan mengurus hak patennya sebelum mempublikasikan dalam jurnal ini.

- Pengaruh Asam 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) terhadap Pembentukan dan Pertumbuhan Kalus serta Kandungan Flavonoid Kultur Kalus *Acalypha indica* L.** 1-6
• BEKTI RAHAYU, SOLICHATUN, ENDANG ANGGARWULAN
- Sifat Fisik dan Kandungan NaCl Urin Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) Jantan setelah Pemberian Ekstrak Rimpang Alang-Alang (*Imperata cylindrica* L.) secara Oral** 7-12
• SURATMAN, SHANTI LISTYAWATI, SUTARNO
- Pengaruh Vitamin C terhadap Perbaikan Spermatogenesis dan Kualitas Spermatozoa Mencit (*Mus musculus* L.) Setelah Pemberian Ekstrak Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.)** 13-19
• TITISARI NUGRAHENI, OKID PARAMA ASTIRIN, TETRI WIDIYANI
- Aktivitas Penghambatan Minyak Atsiri dan Ekstrak Kasar Biji Pala (*Myristica fragrans* Houtt dan *Myristica fattua* Houtt) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Xanthomonas campestris* Oammel asal Tanaman Brokoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)** 20-24
• GALUH SARI KUSUMANINGRUM, SURANTO, RATNA SETYANINGSIH
- Ellagitinin: Biosintesis, Isolasi, dan Aktivitas Biologi** 25-38
• UDHI EKO HERNAWAN, AHMAD DWI SETYAWAN

