

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 4
NOMOR 2
AGUSTUS 2006
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126
Tel. & Fax. +62-271-663375
E-mail: unsjournals@yahoo.com
Online: www.unsjournals.com

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNG JAWAB:

Sutarno

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso
Ratna Setyaningsih
Solichatun
Suratman
Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

Prof. Dr. Dayar Arbain – Universitas Andalas Padang
Prof. Dr. dr. Santosa, M.S. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Prof. Dr. Syamsul Arifin Achmad – Institut Teknologi Bandung
Prof. Drs. Suranto, M.Sc., Ph.D. – Universitas Sebelas Maret Surakarta
Dr. Chaerul, Apt. – Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor
Dr. C.J. Sugiharjo, Apt. – Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
Dr. Ir. Supriyadi, M.Sc. – Balai Penelitian Tanaman Obat dan Rempah Bogor

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

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

Pengaruh variasi konsentrasi asam naftalen asetat (NAA) terhadap pertumbuhan dan kandungan minyak atsiri kalus melati (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)

The effect of naphthalene acetic acid (NAA) on growth and essential oil contents of jasmine callus (*Jasminum sambac* (L.) Ait.)

GENINGSIH WIDYAWATI¹, SOLICHATUN^{1,*}, SOERYA DEWI MARLIYANA²

¹ Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126. Tel./Fax. +62-271-663375, *email: olich@mipa.uns.ac.id.

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126. Tel./Fax. +62-271-663375.

Diterima: 13 Desember 2005. Disetujui: 11 Mei 2006.

Abstract. The objectives of the research was to determine the effect of naphthalene acetic acid (NAA) in variation concentration on the growth and the essential oil contents in *Jasminum sambac* (L.) Ait. callus. The research used a completely randomized design with one treatment due to NAA concentration, with five replications. The treatment was the application of NAA (0 mg/L; 0.5 mg/L; 1.0 mg/L; 1.5 mg/L; and 2.0 mg/L) on the MS media. The growth of *J. sambac* callus was examined after 5 weeks incubation. Essential oil contents of *J. sambac* callus were tested by Gas Chromatography (GC). The results of the research indicated that NAA did not give a significant influence on the growth and the essential oil contents of *J. sambac* callus.

Keywords: Callus, essential oil, growth, *Jasminum sambac* (L.) Ait., NAA

PENDAHULUAN

Indonesia terkenal sebagai salah satu negara penghasil minyak atsiri. Minyak atsiri merupakan salah satu produk agroindustri yang memiliki prospek cerah untuk dikembangkan. Hingga saat ini, terdapat 70 jenis minyak atsiri yang diperdagangkan di pasar dunia. Dari 70 jenis minyak atsiri tersebut, baru 25 jenis yang diproduksi dan diekspor Indonesia (Satuhu, 2004).

Minyak atsiri merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan. Metabolit sekunder adalah senyawa kimia yang dihasilkan suatu sel atau organ suatu organisme, tetapi tidak dimanfaatkan secara langsung sebagai sumber energi oleh sel atau organ yang membuatnya. Senyawa ini mempunyai peranan penting dalam kehidupan tanaman yang bersangkutan. Namun, kebutuhan tumbuhan akan metabolit sekunder tidak terlalu esensial dibandingkan dengan metabolit primer seperti protein, karbohidrat, dan lemak. Oleh karena itu, sintesis metabolit sekunder sering dijumpai dalam jumlah sedikit dalam tubuh tumbuhan (Sumarno, 1992).

Bunga melati (*Jasminum sambac* (L.) Ait.) memiliki nilai ekonomi yang tinggi sebagai bahan baku industri minyak wangi, kosmetik, pewangi, penyedap teh, cat, tinta, pestisida, dan industri tekstil. Meskipun peluang pasar bunga melati di dalam dan di luar negeri cukup besar, produksi bunga melati di Indonesia baru mampu memenuhi

sekitar 20% dari kebutuhan bunga melati di pasaran dunia (Rukmana, 1997).

Komponen penyusun minyak bunga melati adalah golongan ester (*benzyl benzoat*, *indole*, *methyl anhranilate*, *methyl jasmonat*), alkohol (*benzyl acetate benzyl alcohol*), keton (*cis-jasmone*), dan fenol (*eugenol*). Jika dianalisis, kandungan komponen minyak melati asli berbeda dengan minyak melati sintetis. Ciri-ciri minyak melati alami adalah adanya komponen *cis-jasmone*. Komponen ini terdapat dalam jumlah sekitar 34,13% dari seluruh komponen yang ada dan dapat dideteksi dengan analisis kimia (Satuhu, 2004).

Pemanfaatan teknologi kultur in vitro yang sebelumnya digunakan untuk pemuliaan dan perbanyakan tanaman, dewasa ini mulai diarahkan untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder dalam jumlah besar dan dalam waktu singkat. Pemanfaatan teknologi ini sekaligus dapat menjawab permasalahan keterbatasan lahan untuk penanaman tumbuhan sumber metabolit sekunder, dan menjaga kestabilan biodiversitas, karena sering dijumpai adanya eksploitasi plasma nutfah sumber obat dari alam (Heble, 1996).

Aplikasi teknik kultur in vitro untuk menghasilkan metabolit sekunder dari kalus mempunyai beberapa keuntungan, diantaranya menghemat waktu dan tenaga (Hendaryono dan Wijayani, 1994). Keuntungan lainnya adalah tidak tergantung musim, dapat diproduksi dalam jumlah cukup banyak

dengan kondisi terkontrol, dan dapat diproduksi sesuai dengan kebutuhan (Suryowinoto, 1996).

Menurut Kyte dan Kleyn (1996), salah satu metode yang sering digunakan dalam berbagai penelitian untuk merancang suatu reaksi metabolisme dalam sel, termasuk untuk memacu produksi metabolisme sekunder, adalah melalui kultur kalus. Beberapa penelitian telah berhasil meningkatkan produksi metabolit sekunder dalam kultur kalus dengan pemberian zat pengatur tumbuh. Auksin dapat diberikan secara tunggal maupun dikombinasikan dengan sitokinin untuk menginduksi kalus. Menurut Chang et al. dalam Suryowinoto (1996), penggunaan asam naftalenasetat atau *naftalene acetic acid* (NAA) untuk menginduksi kalus pada eksplan yang selanjutnya akan dianalisis kandungan metabolit sekundernya, memberikan efek yang lebih baik dibanding dengan auksin sintetik jenis lain. Hal ini disebabkan karena NAA tidak menimbulkan mutasi genetik yang dapat menyebabkan tidak stabilnya produksi metabolit sekunder. Menurut Hrazdina (1992), NAA yang ditambahkan ke dalam media dapat merangsang pembelahan sel dan sintesis protein, sehingga akan memacu pertumbuhan kalus yang nantinya akan mempengaruhi produksi minyak atsiri. Hingga saat ini, belum banyak dilakukan penelitian tentang produksi metabolit sekunder pada tanaman melati. Dari penelitian tersebut diharapkan akan diperoleh tanaman melati yang mempunyai kandungan minyak melati yang semakin meningkat (Gunawan, 1990; Nurmaeli, 1997).

Menurut Hendaryono dan Wijayani (1994), pemberian auksin pada jaringan akan menimbulkan pengaruh yang berbeda-beda. Pada umumnya, penambahan auksin pada konsentrasi yang semakin tinggi justru bersifat menghambat pertumbuhan. Berdasarkan permasalahan tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengkaji pengaruh NAA terhadap pertumbuhan kalus dan produksi minyak atsiri melati (*J. sambac*) yang ditanam pada media MS dengan metode kultur kalus.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah daun *J. sambac* pada urutan ketiga dari pucuk, bahan kimia untuk sterilisasi (akuades, etanol 70%, klorok 50%), bahan perlakuan (NAA), bahan ekstraksi kalus (etanol), dan media induksi kalus (media MS dengan 0,5 mg/L NAA dan 0,5 mg/L kinetin).

Cara kerja

Penelitian ini disusun berdasarkan rancangan acak lengkap (RAL) dengan satu faktor yaitu konsentrasi NAA dengan 5 variasi konsentrasi yaitu 0 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 1,5 mg/L; dan 2,0 mg/L, masing-masing perlakuan dengan 3 ulangan.

Peralatan disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 20 menit. Media inisiasi kalus yang digunakan berupa media dasar MS ditambah dengan zat pengatur tumbuh

0,5 mg/L NAA + 0,5 mg/L kinetin, sedangkan media perlakuan berupa media dasar MS ditambah dengan NAA pada konsentrasi 0 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 1,5 mg/L; dan 2 mg/L.

Eksplan disterilisasi secara kimiawi dengan menggunakan akuades, etanol 70%, klorok 50%, dan akuades 3 kali (masing-masing selama 5 menit). Eksplan kemudian ditanam pada media inisiasi kalus selama 4 minggu untuk mendapatkan kalus, selanjutnya kalus dipindah ke media perlakuan hingga kalus berumur 5 minggu.

Pengamatan terhadap tekstur dan warna kalus dilakukan pada saat pembentukan kalus dan akhir perlakuan. Pengukuran terhadap berat basah kalus, berat kering kalus, dan laju pertumbuhan relatif kalus dilakukan pada akhir perlakuan. Kadar minyak atsiri melati diketahui dengan cara: sampel kalus yang sudah dikeringkan diekstraksi dengan 1 ml etanol, kemudian kandungan minyak atsirinya diuji dengan kromatografi gas Hitachi 263-50 GC Japan pada temperatur kolom 120-210°C, temperatur blok injektor dan temperatur blok detektor *Flame Ionization Detector* (FID) 235°C, kecepatan alir gas pembawa (N₂) 30 ml/menit, dan *Stationary Phase* Carbowax 20 M.

Analisis data

Analisis kuantitatif meliputi berat basah kalus, laju pertumbuhan relatif kalus, berat kering kalus, dan kandungan minyak atsiri melati pada setiap perlakuan. Data tersebut dianalisis dengan ANAVA dan dilanjutkan dengan uji DMRT pada taraf uji 5%, selanjutnya dilakukan analisis korelasi. Sementara itu, warna dan tekstur kalus dianalisis secara deskriptif. Data kromatogram dari kromatografi gas (GC) digunakan untuk menentukan konsentrasi relatif dari minyak atsiri melati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kalus pada media inisiasi

Pada media inisiasi kalus, penggunaan kombinasi ZPT berupa auksin (NAA) dan sitokinin (kinetin) dengan konsentrasi yang seimbang sebanyak 0,5 mg/L mampu menginduksi pembentukan kalus yang berasal dari eksplan berupa potongan daun *J. sambac*. Eksplan yang telah ditanam pada media inisiasi mulai tumbuh membentuk kalus rata-rata pada hari ke-9 setelah penanaman.

Kalus yang muncul pertama kali dalam media inisiasi berwarna putih bening dengan tekstur remah. Perubahan warna dari eksplan yang awalnya berwarna hijau menjadi putih bening disebabkan oleh adanya proses degradasi klorofil (Santoso dan Nursandi, 2002). Hal ini sesuai dengan penelitian Lestari dan Purnamaningsih (2001) tentang mikropropagasi daun dewa, bahwa terjadi perubahan warna dari hijau menjadi kecokelatan atau putih kekuningan. Menurut Giulano et al. dalam Santosa dan Nursandi (2002), proses degradasi klorofil dapat terjadi melalui hilangnya rantai fitol oleh enzim klorofilase, sehingga

terbentuk klorofilin/klorofilid dan dapat juga terjadi akibat fotooksidasi, sehingga Mg^{2+} hilang dan terbentuk phaeophytin. Kemudian setelah kalus mengalami pertumbuhan membesar, warnanya menjadi putih kekuningan dengan tekstur remah.

Kalus pada media perlakuan

Tekstur dan warna kalus pada media perlakuan di akhir pengamatan disajikan pada Tabel 1. Tabel tersebut menunjukkan bahwa pasca perlakuan setelah disubkultur dalam media perlakuan selama 5 minggu, kenampakan visual yang langsung dapat diamati pada kalus adalah warna dan tekstur kalus. Warna dan tekstur kalus mengalami perubahan dari putih kekuningan dengan tekstur remah menjadi kuning kecokelatan dengan tekstur kompak. Perubahan warna tersebut disebabkan oleh semakin dewasanya umur sel atau jaringan kalus dan menandakan terjadinya reaksi enzimatik yang mengarah pada sintesis senyawa fenol yang disebut *browning* (pencokelatan) (Santosa dan Nursandi, 2002). Terbentuknya kalus yang bertekstur remah ini juga dipacu oleh adanya hormon auksin endogen yang diproduksi secara internal oleh eksplan yang telah tumbuh membentuk kalus tersebut.

Berat basah kalus

Untuk mengetahui pertambahan volume dan massa sel dapat ditentukan dengan mengukur berat segar (berat basah) tanaman (Salisbury dan Ross, 1995). Data berat basah kalus *J. sambac* disajikan pada Tabel 2. Peningkatan berat basah kalus menunjukkan telah berlangsungnya proses pertumbuhan sel dalam kalus. Menurut Wattimena (1991), peningkatan berat basah terjadi akibat meningkatnya proses pengambilan air oleh sel. Pengukuran berat basah kalus pada akhir pengamatan dilakukan segera setelah dipanen sebelum layu akibat kehilangan air (Lakitan, 1995).

Tabel 1. Warna dan tekstur kalus *J. sambac* pada media perlakuan.

Media perlakuan	Morfologi kalus	
	Warna	Tekstur
A ₁	Kuning kecokelatan	Kompak
A ₂	Kuning kecokelatan	Kompak
A ₃	Kuning kecokelatan	Kompak
B ₁	Putih kecokelatan	Remah
B ₂	Putih kecokelatan	Remah
B ₃	Putih kecokelatan	Remah
C ₁	Putih kecokelatan	Agak remah
C ₂	Putih kecokelatan	Agak remah
C ₃	Putih kecokelatan	Agak remah
D ₁	Kuning kecokelatan	Kompak
D ₂	Kuning kecokelatan	Kompak
D ₃	Kuning kecokelatan	Kompak
E ₁	Kuning kecokelatan	Kompak
E ₂	Kuning kecokelatan	Kompak
E ₃	Kuning kecokelatan	Kompak

Keterangan: Penambahan NAA pada konsentrasi: A = 0 mg/L, B = 0,5 mg/L, C = 1 mg/L, D = 1,5 mg/L, E = 2 mg/L. Angka 1, 2, dan 3 yang mengikuti huruf merupakan ulangan.

Tabel 2. Berat basah kalus, laju pertumbuhan relatif, berat kering kalus, dan kadar minyak atsiri kalus *J. sambac* setelah diinkubasi selama 5 minggu pada media perlakuan.

Parameter	Penambahan NAA (mg/L)				
	0	0,5	1	1,5	2
Berat basah kalus (g)	3,95 ^a	2,33 ^a	3,65 ^a	3,53 ^a	3,31 ^a
Laju pertumbuhan relatif (g/hari)	0,08 ^a	0,03 ^a	0,08 ^a	0,07 ^a	0,07 ^a
Berat kering kalus (g)	0,21 ^a	0,15 ^a	0,23 ^a	0,18 ^a	0,20 ^a
Minyak atsiri kalus (%)	53,40 ^a	59,61 ^a	64,08 ^a	67,45 ^a	75,30 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.

Tabel 2 menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak berpengaruh terhadap berat basah kalus *J. sambac*. Tidak adanya pengaruh pemberian NAA terhadap berat basah kalus diduga disebabkan kandungan hormon endogen pada sel-sel kalus sudah cukup untuk memicu pembentukan kalus. Hal ini seperti yang dikemukakan oleh Katuuk (1989) bahwa tanaman yang mampu memproduksi auksin endogen tidak memerlukan penambahan auksin sintetik dalam media. Dalam kondisi yang berlebih, auksin justru dapat menghambat pertumbuhan kalus. Hendaryono dan Wijayani (1994) juga mengemukakan bahwa pada kadar tinggi, auksin justru lebih bersifat menghambat daripada merangsang pertumbuhan.

Laju pertumbuhan relatif kalus

Laju pertumbuhan relatif kalus dihitung dari selisih berat basah kalus pasca perlakuan dengan berat basah kalus awal perlakuan selama waktu perlakuan (Sitompul dan Guritno, 1995). Tabel 2 menunjukkan bahwa semua perlakuan tidak berpengaruh terhadap laju pertumbuhan relatif kalus *J. sambac*, hal ini terbukti dari hasil analisis ANAVA yang menunjukkan tidak berbeda nyata antar perlakuan pada uji DMRT 5%. Menurut Lakitan (1995), pengaruh zat pengatur tumbuh tergantung pada kondisi anatomi dan fisiologi dari sel yang dipengaruhi dan tidak semua sel menjadi target hormon tertentu. Menurut Sriyanti dan Wijayani (1994), jenis dan kombinasi zat pengatur tumbuh yang ditambahkan pada media kultur jaringan sangat tergantung pada jenis tanaman.

Berat kering kalus

Pertumbuhan kalus selain ditentukan oleh peningkatan berat basah kalus juga ditentukan oleh berat kering kalus. Menurut Gardner *et al.* (1991), pengukuran terhadap berat basah kalus kurang mewakili parameter pertumbuhan karena angkanya berfluktuasi, bergantung pada kondisi kelembapan tanaman, sedangkan angka pengukuran terhadap berat kering kalus tidak berfluktuasi, karena berat kering kalus bersifat konstan. Menurut Tanimoto dan Harada (1985), berat kering kalus merupakan salah satu faktor pertumbuhan yang bersifat *plastic extension*, artinya pertumbuhan yang tidak dapat balik. Tabel 2 menunjukkan bahwa berat kering kalus ternyata tidak berbeda nyata antar perlakuan.

Umumnya berat kering kalus akan meningkat dengan banyaknya senyawa metabolit yang terkandung dalam sel-sel kalus tersebut, sedangkan berat basah kalus akan meningkat karena banyaknya air dan metabolit yang terkandung dalam sel kalus (Wattimena *et al.*, 1992).

Kandungan minyak atsiri kalus

Pengukuran kandungan minyak atsiri kalus *J. sambac* dilakukan terhadap komponen dominan yang merupakan komponen utama minyak atsiri melati tersebut, analisis yang dilakukan yaitu dengan membandingkan waktu retensi dan analisis kuantitatif dengan penghitungan luas area puncak tertinggi (Sastrohamidjojo, 1996). kandungan minyak atsiri kalus daun *J. sambac* disajikan pada Tabel 2. Data yang diperoleh menunjukkan tidak adanya beda nyata kandungan minyak atsiri kalus *J. sambac* pada tiap perlakuan, hal ini berarti pemberian NAA tidak berpengaruh terhadap kandungan minyak atsiri kalus. Dari data pada Tabel 2, terlihat bahwa kandungan minyak atsiri semakin meningkat dengan semakin meningkatnya penambahan NAA. Hal tersebut diduga terjadi karena NAA yang ditambahkan pada media oleh sel kalus tidak hanya digunakan untuk mengaktifkan enzim-enzim yang bekerja dalam pertumbuhan kalus, tetapi juga digunakan untuk mengaktifkan enzim-enzim yang bekerja dalam metabolisme minyak atsiri melati.

Kandungan minyak atsiri *J. sambac* memiliki nilai korelasi yang rendah terhadap laju pertumbuhan serta berat kering dan berat basah kalus yaitu kurang dari 0,5. Nilai positif pada hasil analisis uji korelasi terhadap laju pertumbuhan dan berat kering kalus menunjukkan bahwa jika laju pertumbuhan dan berat kering kalus mengalami peningkatan maka kandungan minyak atsiri kalus juga akan meningkat. Namun, berat basah kalus bernilai negatif, sehingga dapat disimpulkan bahwa jika berat basah kalus menurun maka kandungan minyak atsiri meningkat. Hal ini menunjukkan adanya kompetisi antara mekanisme pembentukan metabolit primer dan metabolit sekunder. Menurut Manuhara (1995), pada kondisi pertumbuhan kalus yang terhambat akan lebih banyak diproduksi metabolit sekunder sebagai manifestasi untuk pertahanan diri.

KESIMPULAN

Pemberian NAA pada berbagai konsentrasi (0 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 1,5 mg/L; 2 mg/L) memberikan pengaruh yang tidak signifikan terhadap pertumbuhan dan kandungan minyak atsiri pada kalus *J. sambac*. Disarankan agar masa inkubasi kalus diperpanjang, sehingga pengaruh penambahan NAA dalam media dapat lebih terlihat. Selain itu juga disarankan untuk dilakukan induksi pembentukan organ (organogenesis), sehingga

dapat diketahui pengaruh diferensiasi sel terhadap kandungan minyak atsiri melati.

DAFTAR PUSTAKA

- Gardner, F.P., R.B. Pearce, and R.L. Mitchell. 1991. *Fisiologi Tanaman Budidaya*. Penerjemah: Susilo, H. dan Subiyanto. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Gunawan, S.A. 1990. *Melati*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Heble, M.R. 1996. Production of secondary metabolites through tissue cultures and its prospect for commercial use. In: Islam, A.S. (ed). *Plant Tissue Culture*. New York: Timber Press Inc.
- Hendaryono, D.P.S. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan. Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman secara Vegetatif-Modern*. Yogyakarta: Kanisius.
- Hrazdina, G. 1992. Compartmentation in aromatic metabolism. In: Stafford, A.H. and K.R. Ibrahim (eds.). *Phenolic Metabolism in Plant*. New York: Plenum Press.
- Katuuk, J. 1989. *Teknik Kultur Jaringan dalam Mikropropagasi Tanaman*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, Direktorat Pendidikan Tinggi Proyek Pengembangan Lembaga Pendidikan Tenaga Kependidikan.
- Kyte, L. and J. Kleyn. 1996. *Plant from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*. 3rd edition. Washington: Timber Press Inc.
- Lakitan, B. 1995. *Fisiologi Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman*. Jakarta: Raja Grafindo.
- Lestari, E.G. dan R. Purnamaningsih. 2001. Mikropropagasi daun dewa (*Gynura pseudochina*) melalui tunas adventif. *BioSMART* 3(2): 18-22.
- Manuhara, Y.S.W. 1995. Pengaruh manipulasi media terhadap kandungan alkaloid vinkristin kalus daun *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Berkala Penelitian Hayati PBI Komisariat Surabaya* 1: 1-7.
- Nurmaeli, R.E. 1997. *Mikrostek Tanaman Melati (Jasminum sambac (L.) W. Ait.)*. [Skripsi]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Rukmana, R. 1997. *Usaha Tani Melati*. Yogyakarta: Kanisius.
- Salisbury, F.B. dan C.W. Ross. 1995. *Fisiologi Tumbuhan*. Jilid 3. Penerjemah: Lukman, D.R. dan Sumaryono. Bandung: Penerbit ITB.
- Santosa, U. dan F. Nursandi. 2002. *Kultur Jaringan Tanaman*. Malang: Penerbit UMM.
- Sastrohamidjojo, H. 1996. *Sintesis Bahan Alam*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Satuhu, S. 2004. *Melati: Penanganan Segar dan Pembuatan Minyak Bunga Melati*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Sitompul, M.S. dan B. Guritno. 1995. *Analisis Pertumbuhan Tanaman*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Sriyanti, D.P. dan A. Wijayani. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Sumarno. 1992. *Petunjuk Laboratorium: Analisis Metabolit Sekunder dengan HPLC*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Suryowinoto, M. 1996. *Pemuliaan Tanaman Secara In Vitro*. Yogyakarta: Kanisius.
- Tanimoto and H. Harada. 1985. Hormon Regulation of Flowering. In: Purohit, S.S. (ed.). *Hormonal Regulation of Plants Growth and Development*. The Haag: Martinus Nijhoff Publisher.
- Wattimena, G.A. 1991. *Zat Pengatur Tumbuh Tanaman*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Wattimena, G.A., L.W. Gunawan, M.A. Mattjik, E. Syamsudin, N.M.A. Wiendi, dan A. Ernawati. 1992. *Bioteknologi Tanaman*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh ekstrak rimpang temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)

Inhibition of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* by rhizome extract of temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.))

UMI LESTARI, ARTINI PANGASTUTI, ARI SUSILOWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A, Surakarta 57126. Tel./Fax. +62-271-663375.

Diterima: 28 Desember 2005. Disetujui: 10 Maret 2006.

Abstract. Conventional treatment of infectious diseases is based on compounds that kill or inhibit the growth of bacteria. A major concern with this approach is the frequent development of resistance to antimicrobial compounds. The discovery of communication (quorum sensing system) regulating bacterial virulence opens up ways to control certain bacterial infectious without interfering the growth. The fish pathogen *Aeromonas hydrophila* produces quorum sensing signal, *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* (C4-HSL). C4-HSL regulates exoprotease synthesis, a virulence factor of *A. hydrophila*. Expression of exoprotease can be blocked by using quorum sensing inhibitor. The purpose of this study was to investigate the inhibiting effect of *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.) extract to exoprotease production of *A. hydrophila*. Extraction was conducted by using n-hexane, ethyl acetate and ethanol. The qualitative exoprotease assay result showed that n-hexane extract of *C. xanthorrhiza* had not effect on growth and exoprotease production of *A. hydrophila*. Meanwhile, 4% of ethyl acetate and ethanol extract of *C. xanthorrhiza* can inhibit exoprotease production without affecting *A. hydrophila* growth. The quantitative exoprotease assay result showed that 4% of ethyl acetate and ethanol extract can inhibit the exoprotease production by 93,9% and 95,6%. The growth of *A. hydrophila* was not affected by this extract.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.), exoprotease production, inhibit

PENDAHULUAN

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit pada ikan (Swann and White, 2002). Penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* dinamakan *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) (Roberts, 1993). *Aeromonas hydrophila* ditemukan paling banyak di perairan tawar. Hampir seluruh ikan air tawar rentan terhadap penyakit yang diakibatkan oleh bakteri ini (Noga, 1995). Menurut Afrianto (1992), penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* pada ikan budi daya menimbulkan kerugian yang sangat besar, sehingga perlu adanya penanganan yang efektif.

Salah satu faktor virulensi ekstraseluler yang disekresikan oleh *A. hydrophila* adalah enzim eksoprotease. Enzim ini bersifat proteolitik karena dapat mendegradasi albumin, kasein, fibrinogen, dan gelatin, sehingga *A. hydrophila* berpotensi sebagai patogen pada ikan (Schotts *et al.*, 1985). Menurut Ellis *et al.* (1981), aktivitas enzim eksoprotease berkorelasi dengan terjadinya infeksi.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu molekul sinyal *N-butanoyl-L-homoserine lactone* (C4-HSL). Senyawa ini juga berfungsi sebagai alat komunikasi interseluler pada bakteri yang disebut sistem *quorum sensing*. Melalui sistem *quorum sensing*, bakteri dapat mendeteksi

keberadaan bakteri lain serta jumlahnya di lingkungan dan sebaliknya. Ketika hanya satu sel yang mensekresikan molekul C4-HSL ke lingkungan maka konsentrasinya sangat rendah, namun apabila populasi bakteri telah mencapai kepadatan tertentu atau telah memenuhi *quorum* maka C4-HSL yang disekresikan ke lingkungan juga meningkat sehingga mampu mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang berperan sebagai faktor virulensi (De Kievit and Iglewski, 2000).

Sebelum ditemukan sistem *quorum sensing* yang berperan dalam ekspresi faktor virulensi, pencegahan infeksi dilakukan dengan menggunakan senyawa antibiotik yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri tersebut (Hentzer and Givskov, 2003). Penggunaan senyawa tersebut secara terus-menerus dapat meningkatkan frekuensi mutasi yang dapat menghasilkan generasi bakteri yang resistan (Lewis, 2001). Dengan pengetahuan mengenai sistem *quorum sensing*, dapat dikembangkan suatu cara pengendalian bakteri penyebab penyakit pada ikan yang tidak hanya terbatas pada pemberantasan bakteri atau antibiosis. Pengendalian infeksi dapat dilakukan dengan mencegah pengumpulan massa bakteri atau dengan merusak sistem komunikasi interseluler bakteri dan membiarkan bakteri tetap hidup bersama selama perilakunya tidak destruktif

(Suwanto, 2005).

Sistem *quorum sensing* dapat dijadikan target terapi antimikrobal. Penghambatan komunikasi antar sel tersebut dapat menurunkan patogenisitas suatu bakteri (De Kievit and Iglewski, 2000). Beberapa senyawa diketahui dapat menghambat sistem *quorum sensing*. Ekstrak alga *Flustra foliacea* dapat menghambat aktivitas molekul *N-Acyl-Homoserine Lactone* pada *Pseudomonas aeruginosa* tanpa mengganggu pertumbuhannya. Akibatnya, produksi enzim eksoprotease *P. aeruginosa* menurun (Peters *et al.*, 2003). Senyawa furanon yang diisolasi dari alga *Delisea pulchra* juga dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada bakteri *Vibrio fischeri* dan *Vibrio harveyi* (Rice *et al.*, 1999). Selain itu, senyawa *curcumin* yang diisolasi dari *Curcuma domestica* juga dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum* (Rukayadi and Hwang, 2004). Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai dasar pencarian obat atau senyawa yang dapat menghambat sistem *quorum sensing* tanpa harus membunuh bakteri.

Rimpang temu lawak (*Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.)) mengandung berbagai senyawa yang berpotensi sebagai agen kemoterapeutik. Salah satu senyawa tersebut adalah *curcumin* yang telah terbukti mampu menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum*. Pengetahuan tersebut dapat dijadikan sebagai dasar untuk dilakukan penelitian untuk menghambat sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* dengan menggunakan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*.

Penghambatan sistem *quorum sensing* pada *A. hydrophila* dapat dibuktikan dengan adanya penurunan produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan mengukur aktivitasnya. Oleh karena itu perlu diadakan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease dari *A. hydrophila* setelah pemberian agen kemoterapeutik berupa ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol. Pelarut-pelarut tersebut digunakan untuk mengekstrak senyawa-senyawa non polar, semi polar, dan polar yang terkandung pada rimpang *C. xanthorrhiza*.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol, serta mengetahui jenis ekstrak yang memiliki kemampuan paling besar dalam menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juni sampai November 2005 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (a) alat untuk ekstraksi yaitu blender, timbangan elektrik, *rotary evaporator*, *hot plate*, *freezer*, erlenmeyer, *beaker glass*, *aluminium foil*, dan kertas saring; (b) alat untuk pemeliharaan kultur, pengukuran pertumbuhan, dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease, yaitu spektrofotometer, *shaker*, mikropipet dan tip, *laminar air flow*, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, erlenmeyer, pinset, kertas saring, dan *hot plate*; serta (c) alat sterilisasi berupa *autoclave*.

Sementara itu, bahan yang digunakan meliputi: (a) rimpang *C. xanthorrhiza* yang diperoleh dari daerah Wonogiri; (b) kultur murni *A. hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Penyakit Ikan (Fish Disease) Jurusan Teknologi Perikanan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, *A. hydrophila* diisolasi dari ikan lele (*Clarias batrachus*) yang sakit; (c) medium *Luria-Bertani broth* (LB Broth), *Luria-Bertani* agar (LB), *azocasein*, susu skim, *Trichloro Acetic Acid* (TCA), NaOH, dan *buffer* fosfat pH 7; serta (d) pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol.

Cara Kerja

Pembuatan Serbuk Rimpang *C. xanthorrhiza*

Rimpang *C. xanthorrhiza* dicuci bersih, kemudian diiris tipis dan dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung. Irisan rimpang yang sudah kering diblender menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk akan digunakan untuk pembuatan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol.

Pembuatan Ekstrak Rimpang *C. xanthorrhiza*

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol yang bersifat non polar, semi polar, dan polar. Serbuk rimpang *C. xanthorrhiza* dilarutkan dalam n-heksan (100 mg serbuk/100 ml n-heksan), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya, ampas dilarutkan dalam pelarut etil alkohol, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya, ampasnya dilarutkan dengan etanol, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Masing-masing filtrat dipekatkan dalam *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Harmani dkk., 2001).

Pemeliharaan Kultur

Aeromonas hydrophila ditumbuhkan pada medium agar miring NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah tumbuh sebagai biakan, *A. hydrophila* pada agar miring disimpan pada lemari pendingin (4°C) sebagai stok biakan.

Pengujian Kualitatif Produksi Enzim Eksoprotease

Medium yang digunakan adalah *Luria-Bertani* (LB) agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium dilakukan dengan menggunakan

autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim dilakukan pada suhu 110°C selama 30 menit.

Selanjutnya disiapkan cawan petri berisi 16 ml medium dan ditambah dengan ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak etanol rimpang *C. xanthorrhiza* dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% serta konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif, dengan asumsi pada variasi konsentrasi tersebut produksi enzim eksoprotease dapat terhambat tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Adapun untuk kontrol positif, pada medium LB agar ditambah dengan pelarut n-hexan, etil asetat, dan etanol.

Isolat *A. hydrophila* diinokulasikan pada cawan petri yang telah berisi medium padat dengan menggunakan jarum ose dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening pada medium. Zona bening terbentuk karena adanya aktivitas proteolitik dari enzim eksoprotease (Swift *et al.*, 1999).

Pengukuran Pertumbuhan Bakteri dan Pengujian

Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan mengukur aktivitas enzim tersebut. Pengujian aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prinsip pengujian aktivitas enzim eksoprotease berdasarkan pada pendapat Hanlon and Hodges (1981), yaitu kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis *azocasein*. Residu *azocasein* yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim protease akan diendapkan oleh *trichloro acetic acid* (TCA). Endapan dipisahkan dan filtrat akan membentuk warna apabila direaksikan dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm.

Pengujian secara kuantitatif hanya dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik, ditandai dengan adanya pengurangan luas zona bening jika dibandingkan dengan kontrol. Isolat *A. hydrophila* berumur 24 jam ditumbuhkan pada 200 ml LB broth yang telah ditambah dengan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*, dan untuk kontrol negatif tidak ditambah dengan ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*, sedangkan untuk kontrol positif pada medium LB broth ditambah dengan pelarut, selanjutnya isolat diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan *shaker*.

Mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam, 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai OD (*optical density*). Setelah diukur pertumbuhannya, suspensi bakteri disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Satu mililiter filtrat kemudian dimasukkan ke tabung reaksi yang telah berisi 3 ml larutan *buffer* fosfat (pH 7). Campuran ini kemudian dihangatkan hingga suhunya mencapai 37°C. Sementara itu, 2 ml *azocasein* dipanaskan pada

penangas air hingga suhunya mencapai 37°C dan ditambahkan ke dalam campuran filtrat dan *buffer* fosfat, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya, campuran filtrat ditambah dengan 4 ml *trichloro acetic acid* (TCA) sehingga terbentuk endapan kuning yang dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kertas Whatman no. 1 atau disentrifugasi. Lima mililiter filtrat diambil dan ditambah dengan 5 ml larutan NaOH 0,5 M sebelum diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm.

Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan kenaikan pengukuran absorbansi sebesar 0,01 setiap jam pada kondisi pengukuran. Unit aktivitas enzim eksoprotease yang digunakan dalam penelitian ini dinyatakan dalam U/ml, dan ditetapkan dengan rumus:

$$U/ml = (\text{absorbansi}/0,01) \times 2 = \text{unit aktivitas/ml sampel}$$
 (Hanlon and Hodges, 1981).

Analisis Data

Hasil pengukuran aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* dinyatakan dalam unit aktivitas/ml sampel (U/ml) pada masing-masing perlakuan, kemudian dibandingkan dengan aktivitas enzim eksoprotease pada kontrol dan penurunannya yang dinyatakan dalam persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari ikan lele (*C. batrachus*) yang sakit. Dengan demikian, diharapkan *A. hydrophila* telah memproduksi faktor-faktor virulensi, di antaranya enzim eksoprotease. Menurut de Figueiredo and Plumb dalam Angka (2001), isolat *A. hydrophila* yang diisolasi dari ikan sakit lebih virulen daripada isolat yang diisolasi dari perairan.

Besarnya jumlah enzim yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme tidak dapat diukur secara langsung. Jumlah enzim yang diproduksi tersebut biasanya sangat kecil. Menurut Murray *et al.* (1997), aktivitas katalisis yang dimiliki oleh suatu enzim memungkinkan untuk mengukur jumlah enzim yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme.

Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Secara kualitatif, produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dari terbentuknya zona bening pada medium di sekitar biakan *A. hydrophila*. Medium yang digunakan adalah medium Luria Bertani Agar (LB Agar) yang ditambah dengan 2% susu skim. Aktivitas katalisis dari enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona bening. Menurut Poernomo dan Purwanto (2001), enzim eksoprotease akan menghidrolisis ikatan peptida protein susu skim menjadi bentuk yang lebih sederhana, yaitu asam amino. Selanjutnya, asam

amino akan masuk ke dalam sel bakteri dan digunakan sebagai nutrisi. Meskipun secara umum enzim eksoprotease berperan dalam penyediaan nutrisi, namun menurut Leung and Stevenson (1988), pada *A. hydrophila* enzim eksoprotease berperan penting dalam menyebabkan kerusakan jaringan pada ikan. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara kuantitatif, produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya dalam mendegradasi senyawa *azocasein*. Pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dapat dilakukan dengan metode spektrofotometri. Menurut Hanlon and Hodges (1981), dari nilai absorbansi filtrat hasil degradasi *azocasein* oleh enzim eksoprotease dapat diperoleh nilai unit aktivitas enzim.

Penghambatan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila*

Sintesis enzim eksoprotease *A. hydrophila* diregulasi oleh sistem *quorum sensing* (Swift *et al.*, 1999). Penghambatan sistem *quorum sensing* dapat menyebabkan produksi enzim eksoprotease menurun, akibatnya patogenisitas *A. hydrophila* juga akan berkurang. Penghambatan sistem *quorum sensing* dapat dijadikan sebagai suatu cara baru untuk mencegah penyakit yang disebabkan oleh bakteri tanpa harus menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Menurut Peters *et al.* (2003), pencegahan penyakit yang diakibatkan oleh bakteri dengan cara menghambat sistem *quorum sensing* dapat mengurangi berkembangnya resistensi bakteri oleh zat-zat antimikrobia.

Menurut Hentzer and Givskov (2003), sistem *quorum sensing* dapat dijadikan target penghambatan senyawa-senyawa kemo-terapeutik. Pada penelitian ini, senyawa kemo-terapeutik yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease adalah ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*. Rimpang *C. xanthorrhiza* mengandung berbagai jenis senyawa aktif yang pengelompokannya didasarkan pada tingkat kepolaran senyawa-senyawa aktif tersebut. Menurut Chu (2005), ada tiga jenis kelompok senyawa aktif dalam rimpang *C. xanthorrhiza*, yaitu senyawa polar, senyawa semipolar, dan senyawa nonpolar. Untuk mendapatkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza*, dilakukan ekstraksi bertingkat dengan menggunakan pelarut nonpolar, semipolar, dan polar yaitu n-hexan, etil asetat, dan etanol. Salah satu senyawa semipolar yang diduga dapat menghambat sistem *quorum sensing* adalah *curcumin*. Pada penelitian yang dilakukan oleh Rukayadi and Hwang (2004) membuktikan bahwa *curcumin* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum* yang memiliki molekul sinyal C4-HSL.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Swift *et al.* (1999), penghambatan sistem *quorum sensing* untuk mengontrol virulensi dan mencegah infeksi *A.*

hydrophila dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa analog C4-HSL pada kultur *A. hydrophila*. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dari tidak terbentuknya atau berkurangnya luas zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*, sedangkan secara kuantitatif, produksi enzim eksoprotease dianggap terhambat apabila nilai unit aktivitas enzim mengalami penurunan. Selama proses pengujian aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif, pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* harus dilakukan, karena terkait dengan tujuan dari penelitian ini yaitu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya.

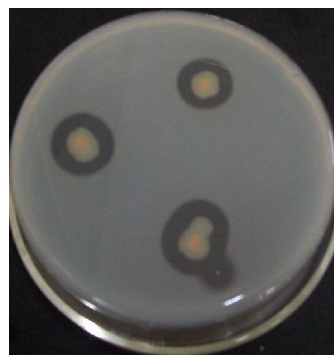
Pada penelitian ini, apabila secara kualitatif salah satu jenis ekstrak dapat menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa menghambat pertumbuhannya maka dilanjutkan dengan uji kuantitatif untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzimnya.

Penghambatan Produksi Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* secara Kualitatif

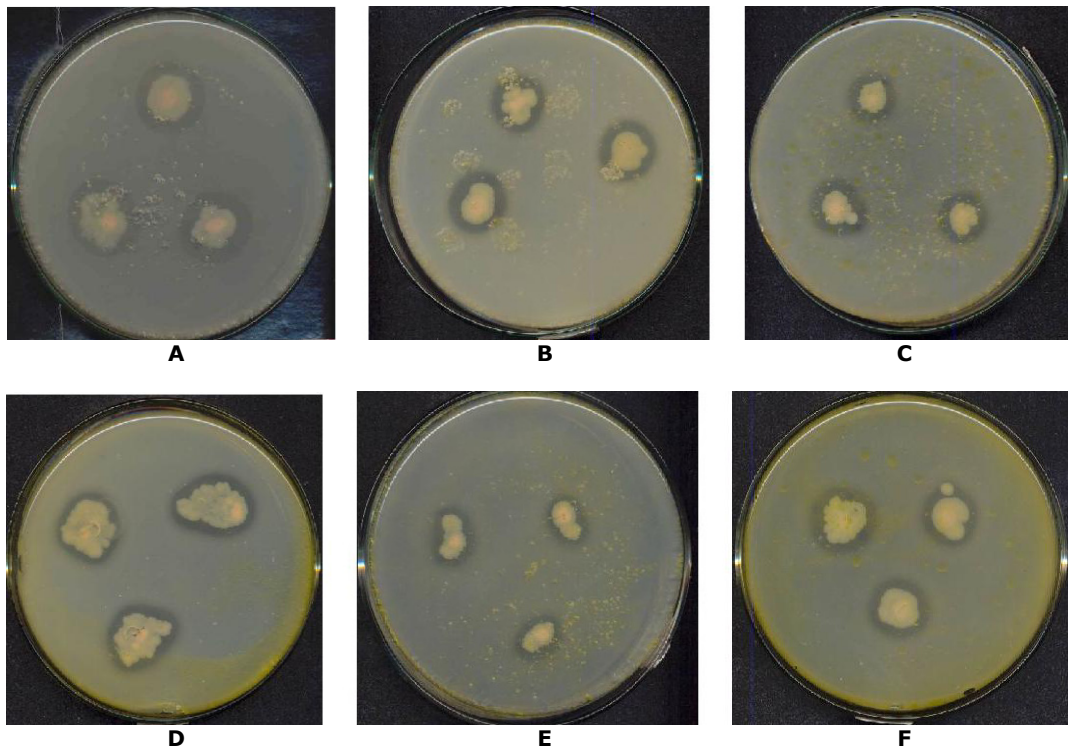
Pelarut n-hexan

Pelarut n-hexan merupakan pelarut nonpolar yang dapat melarutkan senyawa-senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan yang bersifat nonpolar. Senyawa metabolit sekunder nonpolar yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* meliputi minyak atsiri yang terdiri atas 1-cyclo-isoprene myrcene (85%), *aromatic sesquiterpene phenol*, dan *xanthorrhizol* (20%) (Chu, 2005).

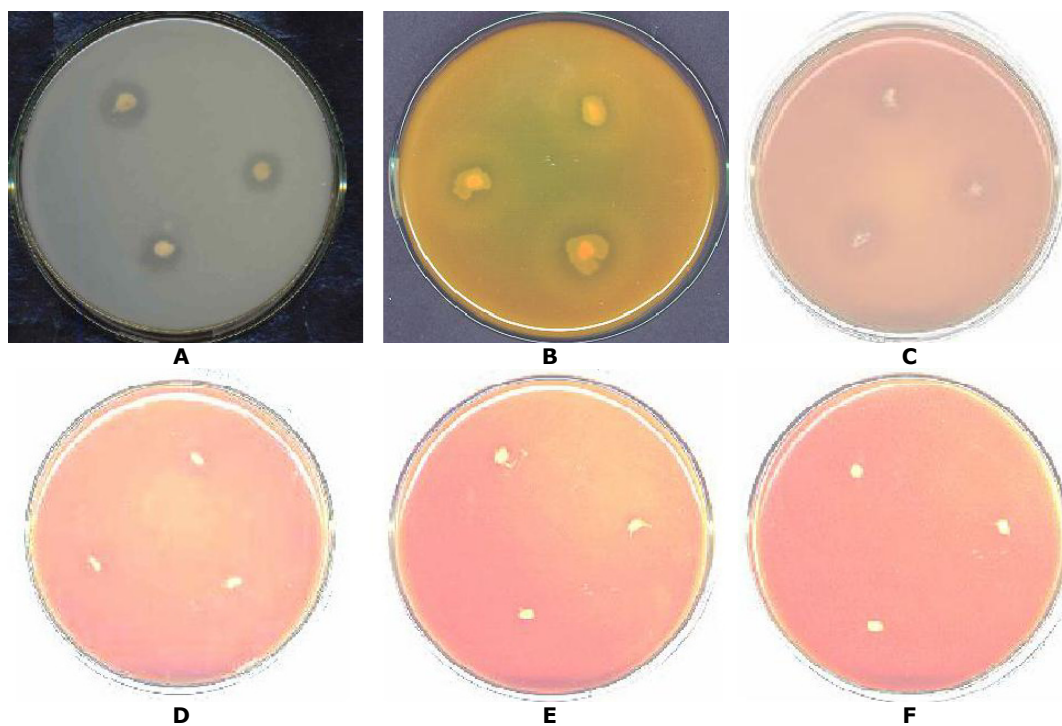
Diameter zona bening dan diameter isolat *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 1. Dari Tabel 1 terlihat bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% tidak menghambat produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini dapat dilihat dari tetap terbentuknya zona bening pada medium LB agar di sekitar biakan *A. hydrophila*, seperti pada Gambar 2.



Gambar 1. Produksi enzim eksoprotease menyebabkan terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*.



Gambar 2. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan. A = Kontrol positif (n-hexan), B = +2% ekstrak, C = +4% ekstrak, D = +6% ekstrak, E = +8% ekstrak, dan F = +10% ekstrak



Gambar 3. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat. A = Kontrol (etil asetat), B = +2% ekstrak, C = +4% ekstrak, D = +6% ekstrak, E = +8% ekstrak, dan F = +10% ekstrak

Dari Gambar 2 terlihat bahwa ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% serta kontrol positif (4% n-hexan), tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini dapat diketahui dengan tetap terbentuknya zona bening pada medium LB agar di sekitar biakan *A. hydrophila*. Diameter zona bening paling kecil terbentuk pada pemberian 8% ekstrak yaitu sebesar 10 mm. Diameter zona bening berkurang karena diameter isolat *A. hydrophila* juga mengalami pengurangan maka dianggap ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan pada variasi konsentrasi 2% hingga 10% tidak menghambat produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*, sehingga tidak dilanjutkan pada uji kuantitatif untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan tidak menghambat aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*. Tidak terhambatnya aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila* diduga karena senyawa-senyawa aktif nonpolar yang terkandung dalam ekstrak tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing*. Selain itu, ekstrak yang bersifat nonpolar memungkinkan ekstrak tidak dapat larut sempurna dengan medium, sehingga tidak terjadi proses penghambatan aktivitas enzim eksoprotease dan pertumbuhan *A. hydrophila*.

Pelarut Etil Asetat

Senyawa semipolar yang terkandung dalam rimpang *C. xanthorrhiza* diantaranya *curcumin* (62%) dan *desmethoxycurcumin* (38%). Untuk dapat melarut-

kan kedua senyawa tersebut, harus dilakukan proses ekstraksi dengan menggunakan pelarut semipolar. Salah satu jenis pelarut semipolar yang biasa digunakan dalam proses ekstraksi adalah etil asetat. Diameter zona bening dan diameter isolat *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 2.

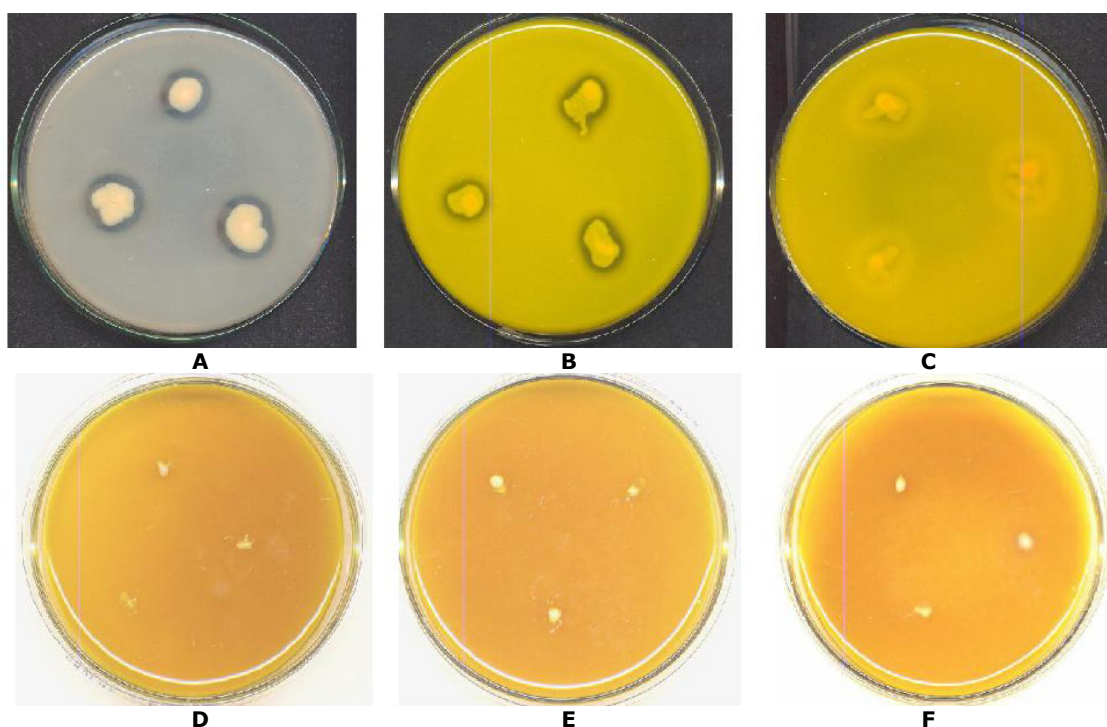
Tabel 1. Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut n-hexan.

Konsentrasi Ekstrak (%)	Diameter Isolat (mm)	Diameter Zona Bening (mm)
0	14,8	21,0
2	14,2	18,5
4	11,0	13,0
6	17,5	23,5
8	10,0	12,0
10	14,0	20,0

Tabel 2. Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat.

Konsentrasi Ekstrak (%)	Diameter Isolat (mm)	Diameter Zona Bening (mm)
0	11,0	13,0
2	12,5	14,0
4	7,0	-
6	5,0	-
8	5,0	-
10	5,0	-

Keterangan: - = Tidak terbentuk zona bening



Gambar 4. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol. A = Kontrol positif (etanol), B = +2% ekstrak, C = +4% ekstrak, D = +6% ekstrak, E = +8% ekstrak, F = +10% ekstrak.

Curcuma xanthorrhiza dengan pelarut etil asetat mampu menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa disertai penghambatan pertumbuhan. Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dapat dilihat pada Gambar 3. Dari Gambar 3 dapat dilihat bahwa ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10% mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sekaligus menghambat produksi enzim eksoprotease. Terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila* dapat dilihat dari kecilnya diameter koloni yaitu hanya sekitar 5 mm atau sama dengan diameter isolat awal yaitu sebelum diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, sedangkan penghambatan produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dari tidak terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*. Pada konsentrasi 2%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh dan memproduksi enzim eksoprotease. Pada konsentrasi 4%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh namun tidak terbentuk zona bening.

Penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga karena senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak juga semakin meningkat. Pada konsentrasi 4%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh, namun aktivitas enzim eksoprotease mengalami penurunan. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya penghambatan sistem *quorum sensing* yang meregulasi sintesis enzim eksoprotease oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak yaitu *curcumin*. Menurut Rukayadi and Hwang (2004), *curcumin* dapat menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum* yang memiliki molekul sinyal berupa C4-HSL atau sama dengan molekul sinyal pada *A. hydrophila*. Penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* oleh ekstrak pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%, diduga karena adanya *curcumin* yang juga berperan sebagai senyawa antibakteri. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Negi et al. (1999) menunjukkan bahwa *curcumin* dapat menghambat pertumbuhan *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Pelarut etanol

Etanol merupakan senyawa yang dapat melarutkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, kumarin, antraknon, dan steroid. Etanol bersifat polar sehingga mampu melarutkan senyawa-senyawa polar pada rimpang *C. xanthorrhiza* yang diantaranya adalah zat tepung, gula, dan polisakarida. Diameter zona bening dan diameter isolat *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 3. Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol mampu menghambat produksi enzim eksoprotease tanpa disertai penghambatan pertumbuhan.

Tabel 3. Diameter zona bening dan diameter isolat pada pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol.

Konsentrasi Ekstrak (%)	Diameter Isolat (mm)	Diameter Zona Bening (mm)
0	12,0	15,0
2	11,5	14,0
4	10,5	10,0
6	5,0	-
8	5,0	-
10	5,0	-

Keterangan: - = Tidak terbentuk zona bening

Penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol dapat dilihat pada Gambar 4. Dari Gambar 4 terlihat bahwa pemberian ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol menyebabkan penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%. Penghambatan produksi enzim eksoprotease dapat dilihat dari tidak terbentuknya zona bening di sekitar biakan *A. hydrophila*, sedangkan penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* dapat dilihat dari tidak bertambahnya diameter isolat *A. hydrophila* yaitu 5 mm atau sama dengan diameter isolat awal sebelum diinkubasi. Pada konsentrasi 4%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh tetapi terjadi penurunan aktivitas enzim eksoprotease, karena diameter zona bening yang terbentuk di sekitar biakan *A. hydrophila* lebih kecil dibandingkan dengan kontrol (etanol), yaitu hanya 10 mm, dan jika dibandingkan dengan diameter zona bening pada kontrol yaitu sebesar 15 mm. Pada konsentrasi 2%, *A. hydrophila* tetap dapat tumbuh dan tetap memproduksi enzim eksoprotease, sehingga terbentuk zona bening dengan diameter 14 mm di sekitar biakan bakteri.

Senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease adalah senyawa gula. Menurut Secades and Guijjarro (1999), glukosa dan senyawa gula lainnya dapat menghambat produksi enzim eksoprotease pada *Yersinia ruckeri*. Produksi enzim eksoprotease pada *Y. ruckeri* juga diregulasi oleh sistem *quorum sensing* tipe *LuxIR*.

Penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* terjadi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Hal ini diduga karena senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak juga semakin meningkat. Pada konsentrasi 6%, 8%, dan 10%, pertumbuhan *A. hydrophila* terhambat. Senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol adalah senyawa gula. Menurut Jawetz et al. (1996), senyawa gula memiliki gugus polar yang dapat menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri, akibatnya pertumbuhan bakteri menjadi terhambat.

Penghambatan Aktivitas Enzim Eksoprotease *Aeromonas hydrophila* secara kuantitatif

Uji kuantitatif dilakukan untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*. Terdapat dua macam pengukuran pada uji kuantitatif yaitu pengukuran aktivitas enzim eksoprotease dalam mendegradasi *azocasein*, dan pengukuran nilai *Optical Density* (OD) untuk mengetahui pertumbuhan *A. hydrophila*. Uji kuantitatif hanya dilakukan pada perlakuan yang secara kualitatif menunjukkan penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya. Dari uji kualitatif diketahui bahwa 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dan etanol mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tanpa menghambat pertumbuhannya, sehingga uji kuantitatif hanya dilakukan pada kedua perlakuan tersebut.

Kurva pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*

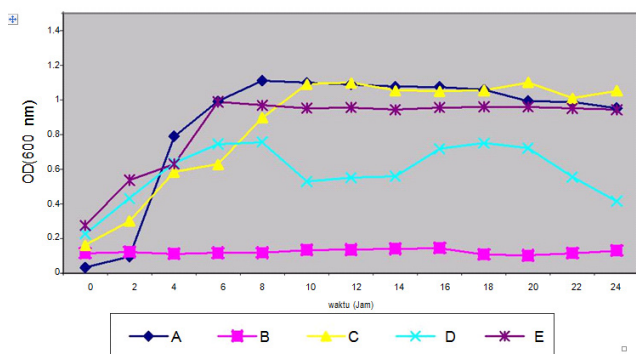
Pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dalam penelitian ini digunakan untuk mengetahui bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan karena terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*. Penghambatan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh terhambatnya sistem *quorum sensing* yang meregulasi sintesis enzim tersebut oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza*, sehingga produksi enzim eksoprotease juga mengalami penurunan.

Pengukuran nilai OD *A. hydrophila* dilakukan pada panjang gelombang 600 nm dan dilakukan tiap 2 jam sekali selama 24 jam. Dari pengukuran OD diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 5.

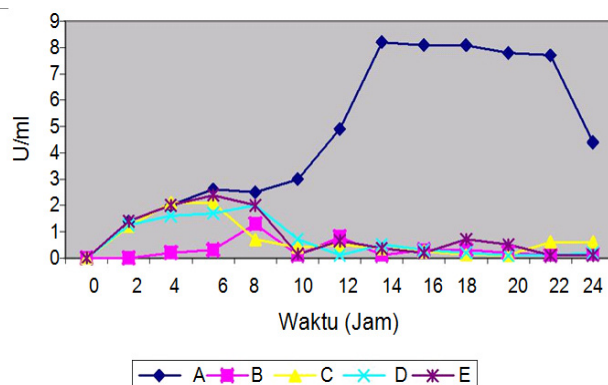
Dari kurva pertumbuhan *A. hydrophila* dapat diketahui bahwa dengan pemberian 4% ekstrak

rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* meskipun terjadi penurunan nilai OD jika dibandingkan dengan kontrol positif (4% etanol) dan kontrol negatif. Sementara itu, pemberian 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat menyebabkan pertumbuhan *A. hydrophila* menjadi terhambat jika dibandingkan dengan kontrol negatif, sedangkan pada kontrol positif (4% etil asetat) pertumbuhan *A. hydrophila* terhambat dengan nilai OD relatif sama dari jam ke-0 hingga jam ke-24. Penghambatan tersebut diduga disebabkan senyawa etil asetat dapat menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*, sedangkan ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat tidak menyebabkan penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila* karena kandungan etil asetat pada ekstrak relatif lebih sedikit setelah mengalami proses penguapan dengan *rotary evaporator*.

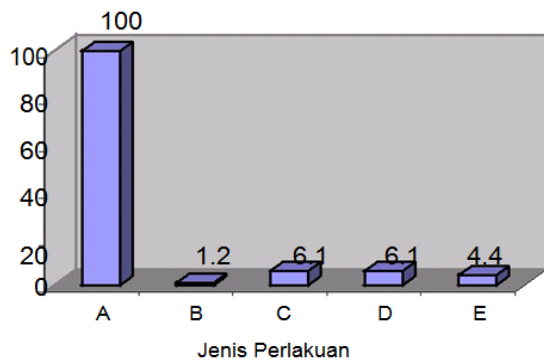
Gambar 5 menunjukkan fase-fase pertumbuhan *A. hydrophila* dengan pemberian 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dan etanol. Secara umum, fase lag terjadi pada jam ke-0 hingga jam ke-2, fase log terjadi pada jam ke-2 hingga jam ke-6, dan fase stationer terjadi pada jam ke-6 hingga jam ke-24. Menurut Schlegel and Schmidt (1994), pada fase lag, pertumbuhan bakteri berlangsung lambat karena bakteri harus beradaptasi dengan medium baru. Pada fase log, pertumbuhan bakteri berlangsung cepat karena ketersediaan nutrisi yang cukup. Selanjutnya pada fase stationer, pertumbuhan jumlah bakteri sangat sedikit karena ketersediaan nutrisi yang semakin terbatas. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila* selanjutnya dibandingkan dengan kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*, untuk memastikan bahwa penghambatan produksi enzim eksoprotease bukan disebabkan karena terjadinya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.



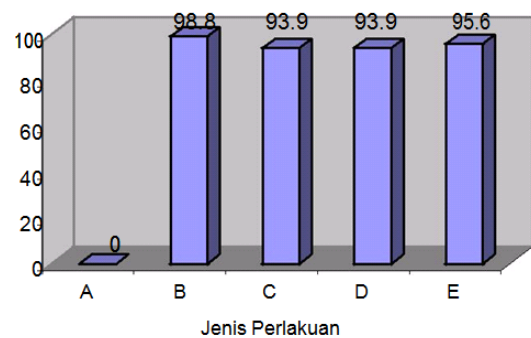
Gambar 5. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila* selama 24 jam. A = Kontrol negatif (tanpa pemberian pelarut), B = kontrol positif (4% etil asetat), C = kontrol positif (4% etanol), D = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat, dan E = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol



Gambar 6. Kurva produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. A = Kontrol negatif (tanpa pemberian pelarut), B = kontrol positif (4% etil asetat), C = kontrol positif (4% etanol), D = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat, serta E = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol.



Gambar 7. Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14.



Gambar 8. Persentase penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14. A = Kontrol negatif (tanpa pemberian pelarut), B = kontrol positif (4% etil asetat), C = kontrol positif (4% etanol), D = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat, dan E = +4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol.

Pengukuran nilai unit aktivitas enzim eksoprotease dilakukan bersamaan dengan pengukuran nilai OD *A. hydrophila*. Dari pengukuran unit aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* diperoleh kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* seperti pada Gambar 6. Dari Gambar 6, terlihat bahwa produksi enzim eksoprotease baru terdeteksi pada jam ke-2 atau pada saat *A. hydrophila* mengalami fase log, kecuali pada kontrol positif (4% etil asetat) produksi enzim baru terdeteksi pada jam ke-4. Menurut penelitian yang dilakukan oleh O'Reilly and Day (1983), aktivitas proteolitik pada *A. hydrophila* terdeteksi pada saat fase log. Produksi enzim eksoprotease tertinggi terjadi pada jam ke-14, atau pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stationer, sedangkan produksi enzim eksoprotease bersifat konstan pada jam ke-14 hingga jam ke-24. Produksi enzim eksoprotease tertinggi terjadi pada saat *A. hydrophila* memasuki fase stationer, hal ini diduga terkait dengan penyediaan nutrisi bagi *A. hydrophila*.

Dari kurva aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat bahwa 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dan etanol dapat menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini dapat diketahui dari menurunnya nilai unit aktivitas enzim. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (etil asetat dan etanol). Penghambatan produksi enzim eksoprotease mulai terjadi pada jam ke-8 atau pada saat *A. hydrophila* memasuki awal fase stationer.

Produksi enzim eksoprotease tertinggi pada kontrol negatif terjadi pada jam ke-14 dan produksi enzim pada jam tersebut dianggap 100%. Dengan demikian diperoleh persentase penurunan aktivitas enzim eksoprotease dari seluruh perlakuan. Nilai persentase diperoleh dengan membandingkan nilai unit aktivitas perlakuan dengan kontrol kemudian dikalikan 100%. Grafik Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-14 dan persentase penurunannya dapat dilihat pada

Gambar 7 dan 8.

Dari Gambar 8 dapat dilihat bahwa penghambatan aktivitas enzim eksoprotease terbesar terjadi pada kontrol positif (4% etil asetat) yaitu sebesar 98,8%. Aktivitas enzim eksoprotease terhambat diduga karena pertumbuhan *A. hydrophila* juga terhambat. Penghambatan terhadap aktivitas enzim eksoprotease juga terjadi pada kultur *A. hydrophila* yang ditambah dengan 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dan etanol tanpa menghambat pertumbuhannya. Persentase penurunannya masing-masing adalah 93,9% dan 95,6%.

Pada pemberian 4% ekstrak *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol menyebabkan aktivitas enzim eksoprotease menurun tanpa menghambat pertumbuhannya. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (4% etanol). Senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol yang diduga dapat menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* adalah gula, polisakarida, dan zat tepung. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Secades dan Guijjaró (1999), senyawa glukosa dan senyawa gula yang lain dapat menghambat produksi enzim eksoprotease *Yersinia ruckeri*. Produksi enzim eksoprotease pada bakteri gram negatif tersebut juga diregulasi oleh sistem *quorum sensing* tipe *LuxIR*. Penghambatan produksi enzim eksoprotease juga terjadi pada kontrol positif (4% etanol), sehingga diduga ada pengaruh pelarut terhadap proses penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Menurut Katri et al. (2003), etanol dan *erythromycin* atau kombinasi keduanya dapat menghambat produksi *pyocynin*, protease, hemolisin, dan lektin pada *Pseudomonas aeruginosa*. Produksi keempat senyawa tersebut juga diregulasi oleh sistem *quorum sensing*.

Pada kontrol positif (4% etil asetat), produksi enzim mengalami penurunan sebesar 98,8% dibandingkan dengan kontrol negatif. Produksi enzim eksoprotease menurun diduga karena pertumbuhan *A. hydrophila* juga terhambat,

sedangkan pada penambahan 4% ekstrak *C. Xanthorrhiza*, pertumbuhan *A. hydrophila* tidak terhambat, namun aktivitas enzim eksoprotease menurun sebesar 93,9% jika dibandingkan kontrol negatif. Penurunan aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* diduga disebabkan adanya senyawa *curcumin* pada ekstrak. Menurut Rukayadi and Hwang (2004), *curcumin* mampu menghambat sistem *quorum sensing* pada *Chromobacterium violaceum* meskipun mekanisme penghambatannya belum diketahui.

KESIMPULAN

Terdapat penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh 4% ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etil asetat dan etanol. Ekstrak yang memiliki kemampuan terbesar dalam menghambat produksi enzim eksoprotease adalah ekstrak rimpang *C. xanthorrhiza* dengan pelarut etanol yaitu sebesar 95,6%, meskipun demikian diduga terdapat pengaruh pelarut terhadap penghambatan produksi enzim tersebut.

Diharapkan ada penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa pada ekstrak *C. xanthorrhiza* yang berperan dalam menghambat aktivitas enzim eksoprotease serta analisis ekspresi gen untuk mengetahui secara pasti mengenai adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* oleh ekstrak *C. xanthorrhiza*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. dan E. Liviawaty. 1992. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Angka, S.L. 2001. *Studi Karakterisasi dan Patologi Aeromonas hydrophila Pada Ikan Lele Dumbo (Clarias gariepinus)*. Makalah Falsafah Sains. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Chu, J.H.K. 2005. *Curcuma xanthorrhiza*. <http://www.thedao.com/temulawak.htm>.
- De Kievit, T.R. and B.H. Iglewski. 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationship. *Infection and Immunity* 68: 4839-4849.
- Ellis, A.E., T.S. Hasting, and A.L.S. Munro. 1981. The role of *Aeromonas salmonicida* extracellular product in the pathology of furunculosis. *J. Fish. Dis.* 4: 41-51.
- Harmani, M.J. Djas, dan N. Said. 2001. Penapisan hayati antimikrobia ekstrak buah pisang batu (*Musa brachicarpa*). *Jurnal Natural* 1(1): 34-37.
- Hanlon, G. and N.A. Hodges. 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of *Bacillus licheniformis* on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J. Bacteriol.* 162(2): 427-431.
- Hentzer, M. and M. Givskov. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 112: 1300-1307.
- Jawetz, E., J. Melnick, and E. Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Katri, N.M., N. Garber, N. Gilboa-Garber. 2003. Submic erythromycin-ethanol combination effect on *Pseudomonas Aeruginosa* virulence in absence and presence of choline. *Abstract of The Second Annual Meeting of The Israel Association of Veterinary Microbiology and Immunology* 59: 1-2.
- Leung, K.Y. and R.M.W. Stevenson. 1988. Tns-induced protease deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* 56: 2639-2644.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 45: 999-1007.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. 1997. *Biokimia* (Diterjemahkan oleh: Hartono, A.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha, L.J.M. Rao, and K.K. Sakhariah. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: A by product from curcumin manufacture. *J. Agric. Food. Chem.* 47(10): 4297-4300.
- Noga, E.J. 1995. *Fish disease: Diagnosis and treatment*. Missouri: The C.V. Mosby Company.
- O'Reilly and D.F. Day. 1983. Effect of cultural conditions of protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(3): 1132-1135.
- Peters, L., G.M. Konig, A.D. Wright, R. Pukall, E. Stackebrandt, L. Eberl, and K. Riedel. 2003. Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(6): 3469-3475.
- Poernomo, A.T. dan D.A. Purwanto. 2001. *Karakterisasi Enzim Proteolitik Bacillus subtilis FNCC 0059*. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Rice, S.A., M. Givskov, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. 1999. Bacterial signal and antagonist: The interaction between bacteria and higher organism. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1(1): 23-31.
- Robert, R.J. 1993. Motile septicemia. In: Inglis, V., R.J. Robert, and N.R. Bromage. *Bacterial Disease of Fish*. Boston: Blackwell Scientific Publications.
- Rukayadi, Y. and J.K. Hwang. 2004. Inhibition of quorum sensing for the control of bacterial infection. *Buku Panduan dan Kumpulan Abstrak Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia*.
- Schlegel, H.G. and K. Schmidt. 1994. *Mikrobiologi Umum*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Shotts, E.B., T.C. Hsu, and W.D. Waltman. 1985. Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathology* 20: 37-44.
- Secades, P. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular proteases from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 3969-3975.
- Suwanto, A. 2005. *Strategi Baru Mengendalikan Penyakit Infeksi*. <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0211/081/iptek/mema36.htm>.
- Swann, L.D. & White, M.R. 1991. Diagnosis and treatment of *Aeromonas hydrophila* infection of fish. Urbana, IL: Illinois-Indiana Sea Grant Program.
- Swift, S., A.V. Karlyshev, E.L. Durant, M.K. Winson, S.R. Chhabra, S. Macintyre, and G.S. Stewart. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: Identification of the *LuxRI* homologs *AhyRI* and *AsaRI* and their cognate *N-Acyl-Homoserine Lactones* signal molecules. *J. Bacteriol.* 179(17): 5271-5281.
- Swift, S., M.J. Lynch, L. Fish, D.F. Kirke, J.M. Tomas, G.S.A.B. Stewart, and P. Williams. 1999. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of eksoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 4: 18-28.

Penurunan produksi enzim eksoprotease *Aeromonas hydrophila* oleh ekstrak buah tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Reduction of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila* by tomato fruits extract (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

NUR AINI, SUTARNO, ARI SUSILOWATI

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A
Surakarta 57126. Tel./Fax. +62-271-663375

Diterima: 11 Oktober 2005. Disetujui: 24 Agustus 2006.

Abstract. *Aeromonas hydrophila* is pathogenic bacteria in fish. One of its virulence factors is exoprotease. The production of exoprotease is controlled by a quorum sensing system. Quorum sensing is an intercellular communication of bacteria that using a signal molecule of C4-HSL. The exoprotease production of *A. hydrophila* can be blocked by using quorum sensing inhibitors. The inhibition of quorum sensing of *A. hydrophila* can be conducted by C4-HSL analogs molecules. In this research, the molecules that predicted as quorum sensing inhibitors and act as C4-HSL analog molecules were furanone from tomato fruits. The inhibition of quorum sensing of *A. hydrophila* could be shown by a reduction of exoprotease production. The aim of this research was to determine the reduction of exoprotease production of *A. hydrophila* by extracts of n-hexane, ethyl acetate and methanol of tomato fruits with the concentrations of 0%, 2%, 4%, 6% and 8%, respectively. The qualitative exoprotease assay result showed that n-hexane extract of tomato had no effect on growth and exoprotease production of *A. hydrophila*. As much as 4% of ethyl acetate extract of tomato fruits could inhibit exoprotease production, but affect *A. hydrophilla* growth. Meanwhile, 4% methanol extract of tomato fruits could inhibit exoprotease production, without affect *A. hydrophilla* growth. The quantitative exoprotease assay result showed that 4% of methanol extract could inhibit exoprotease production by 71.68% without affect the growth of *A. hydrophila*.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, exoprotease production, quorum sensing, reduction, tomato fruits

PENDAHULUAN

Aeromonas hydrophila ditemukan paling banyak di perairan air tawar, bersifat patogen terhadap ikan, dan hampir semua ikan air tawar rentan terhadap serangan bakteri ini (Noga, 1995). *Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit *Motile Aeromonad Septicemia* (MAS) (Fryer and Bartholomew, 1996). Di Jawa, bakteri ini secara luas menyebabkan kematian pada ikan budi daya, yang dilaporkan pertama kali pada tahun 1980 dan mengakibatkan kerugian sangat besar pada perikanan air tawar (Afrianto dan Liviawati, 1992). Oleh sebab itu, perlu adanya tindakan penanganan yang efektif untuk mengatasi patogenisitas dari *A. hydrophila*.

Aeromonas hydrophila mampu menghasilkan endotoksin dan produk ekstraseluler seperti hemolisin, sitotoksin, enterotoksin, leukosidin, dan protease (Allan dan Stevenson, 1981). Enzim eksoprotease merupakan faktor virulensi utama yang bersifat proteolitik dan dapat mendegradasi jaringan otot, sehingga dapat merusak jaringan tubuh inang dan menimbulkan infeksi pada jaringan inang tersebut (Secades and Guijarro, 1999).

Produksi eksoprotease *A. hydrophila* diatur oleh suatu molekul sinyal *N- Butanoyl-L-Homoserine Lactone* (C4-HSL). Molekul sinyal ini juga berfungsi sebagai alat komunikasi antar sel pada suatu populasi bakteri sehingga disebut sistem *quorum sensing* (Swift *et al.*, 1997). Dengan adanya molekul sinyal, bakteri mampu mengetahui kehadiran bakteri lain di lingkungannya. Konsentrasi molekul sinyal sebanding dengan jumlah bakteri yang ada. Semakin banyak populasi bakteri, semakin tinggi konsentrasi C4-HSL di lingkungan, dan apabila telah mencapai kepadatan tertentu, C4-HSL ini akan mengaktifkan gen penyandi enzim eksoprotease (Taga and Bassler, 2003). Dengan demikian, sistem *quorum sensing* tersebut merupakan target utama dalam upaya pengendalian infeksi *A. hydrophila*, yaitu dengan merusak sistem *quorum sensing*-nya, sehingga produksi enzim eksoprotease menurun dan patogenisitas *A. hydrophila* menurun tanpa harus membunuh bakteri tersebut.

Perusakan sistem *quorum sensing* dapat dilakukan oleh senyawa kemoterapeutik yaitu dengan menghambat aktivitas molekul sinyal C4-

HSL (Hentzer and Givskov, 2003). Dengan terhambatnya aktivitas C4-HSL maka produksi enzim eksoprotease menurun, sehingga patogenisitas *A. hydrophila* dapat diturunkan (Lynch, 2002).

Berdasarkan penelitian Rasmussen *et al.* (2000), halogen furanon yang merupakan metabolit sekunder dari makroalga laut *Delisea pulchra*, mampu menghambat molekul sinyal *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* pada *Serratia liquefaciens* sehingga menghambat motilitas *S. liquefaciens*. Furanon juga dapat menghambat *Acyl Homoserine Lactone* yang mengontrol produksi faktor virulensi dan patogenisitas *Pseudomonas aeruginosa* (Hentzer and Givskov, 2003). Selain sebagai metabolit sekunder pada *D. pulchra*, senyawa furanon tersebut juga terdapat secara alami sebagai senyawa cita rasa (*flavour compound*) pada tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Martinelli *et al.*, 2004; Buttery *et al.*, 2001). Hal ini menjadi dasar untuk melakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak buah tomat terhadap produksi C4-HSL *A. hydrophila*. Penghambatan C4-HSL pada *A. hydrophila* dapat dibuktikan dengan penurunan produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease dapat diketahui dengan cara mengukur aktivitasnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengukur aktivitas enzim eksoprotease dari *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak buah tomat dengan pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui adanya penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol buah tomat (*L. esculentum*) dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%, serta (2) mengetahui jenis dan konsentrasi ekstrak buah tomat yang tepat untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari sampai Juli 2006 di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan Bahan

Alat untuk ekstraksi: timbangan elektrik, blender, pisau (*cutter*), erlenmeyer, freezer, gelas beker, gelas ukur, aluminium foil, kertas saring, dan rotary evaporator.

Alat untuk pemeliharaan kultur *A. hydrophila*: tabung reaksi, inkubator, dan hot plate.

Alat untuk pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*: cawan petri, jarum ose, laminar air flow, bunsen Büchner, tabung reaksi, vortek, dan hot plate.

Alat untuk pengukuran pertumbuhan dan pengukuran aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*: spektrofotometer, kuvet, shaker, mikropipet dan tip, laminar air flow, gelas ukur,

erlenmeyer, hot plate, dan sentrifus.

Alat sterilisasi: autoklaf.

Bahan yang digunakan meliputi: buah tomat (*L. esculentum* var *commune*), kultur murni *A. hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Penyakit Ikan (*Fish Disease*) Jurusan Teknologi Perikanan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Medium Luria Bertani (LB) Agar, Luria Bertani (LB) Broth, azocasein (Sigma), susu skim, trichloroacetic acid (TCA), NaOH 0,5 M, dan buffer fosfat pH 8, serta pelarut n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak n-heksan, ekstrak etil asetat, dan ekstrak metanol buah tomat

Buah tomat yang masak dicuci bersih, kemudian diiris tipis dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C. Irisan buah tomat yang sudah kering diblender hingga menjadi serbuk dan disimpan dalam wadah tertutup. Serbuk dilarutkan dalam n-heksan (100 mg serbuk/100 ml n-heksan), dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak kemudian disaring dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan dalam rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak n-heksan buah tomat. Selanjutnya, ampas yang diperoleh dari penyaringan dilarutkan dalam etil asetat, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan dalam rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak etil asetat buah tomat, sedangkan ampasnya dilarutkan dalam metanol, dikocok, dan dibiarkan selama 24 jam. Filtrat dipekatkan dalam rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak metanol buah tomat.

Pemeliharaan Kultur *A. hydrophila*

Kultur *A. hydrophila* ditumbuhkan pada agar miring NA pada suhu 30°C.

Penentuan Kurva Standar *A. hydrophila*

Penentuan kurva standar dilakukan untuk mengetahui waktu yang tepat *A. hydrophila* mencapai kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml. Penentuan kurva standar bakteri dilakukan dengan cara memindahkan isolat bakteri berumur 24 jam ke dalam 200 ml medium LB Broth, kemudian diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan shaker. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 2 jam sekali mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam. Sebanyak 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai OD (*Optical Density*). Hubungan antara nilai OD dengan jumlah bakteri per ml didapatkan melalui pembuatan kurva standar dengan menentukan plot, antara nilai OD dengan jumlah sel bakteri per ml pada hitungan cawan. Dari kurva standar ini dapat diketahui nilai OD *A. hydrophila* yang memenuhi kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml.

Pengujian Kualitatif Aktivitas Enzim Eksoprotease

Uji ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif setelah perlakuan ekstrak buah tomat. Medium yang digunakan adalah Luria-Bertani (LB) Agar yang ditambah dengan 2% susu skim. Sterilisasi medium dilakukan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan sterilisasi susu skim dilakukan pada suhu 110°C selama 30 menit. Cawan petri diisi dengan 12 ml medium dengan penambahan ekstrak n-heksan, etil asetat, dan metanol buah tomat dengan konsentrasi 0% (kontrol), 2%, 4%, 6%, dan 8%. Isolat *A. hydrophila* yang telah ditumbuhkan dalam media LB Broth diinokulasikan pada cawan petri yang berisi medium LB Agar padat dengan menggunakan metode titik (*spot plate*) dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam. Masing-masing perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Aktivitas enzim eksoprotease dapat dilihat dengan adanya zona bening pada medium (Swift et al., 1999). Luas zona bening pada masing-masing perlakuan dihitung, kemudian dibandingkan dengan luas zona bening pada kontrol.

$$\text{Luas zona bening} = \pi R^2 - \pi r^2$$

Keterangan:

R = jari-jari lingkaran total (koloni bakteri + zona bening) (dalam cm)

r = jari-jari lingkaran koloni bakteri (dalam cm)

n = 3,14

Luas zona bening dalam cm²

Pengukuran Pertumbuhan *A. hydrophila*

Uji ini dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak buah tomat. Isolat *A. hydrophila* berumur 24 jam ditumbuhkan pada 200 ml LB Broth yang telah diberi ekstrak buah tomat, selanjutnya diinkubasi pada suhu 30°C dan dikocok dengan *shaker*. Pengukuran pertumbuhan bakteri dilakukan setiap 2 jam sekali mulai jam ke-0 dan selanjutnya setiap 2 jam selama 24 jam, yaitu 10 ml suspensi bakteri diambil dan diukur pertumbuhannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm sehingga diketahui nilai OD (*Optical Density*). Sebagai kontrol, dilakukan pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dalam medium LB Broth yang tidak diberi perlakuan ekstrak buah tomat.

Pengujian Kuantitatif Aktivitas Enzim Eksoprotease

A. hydrophila

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif pada perlakuan ekstrak buah tomat. Prinsip pengujian aktivitas enzim eksoprotease berdasarkan metode Hanlon dan Hodges (1981), yaitu kemampuan enzim eksoprotease untuk menghidrolisis *azocasein*. Residu *azocasein* yang tidak dapat terhidrolisis oleh enzim eksoprotease akan diendapkan oleh *trichloro acetic acid* (TCA). Endapan selanjutnya dipisahkan dari filtrat. Filtrat akan membentuk warna apabila direaksikan dengan

NaOH. Intensitas warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm. Pengujian secara kuantitatif hanya dilakukan pada ekstrak yang menunjukkan pengurangan aktivitas proteolitik terbesar yang ditunjukkan dengan luas zona bening paling kecil dibandingkan kontrol pada pengujian secara kualitatif aktivitas enzim eksoprotease. Sebanyak 10 ml suspensi bakteri yang telah diukur pertumbuhannya disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit. Filtratnya diambil sebanyak 1 ml, lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 ml larutan *buffer* fosfat (pH 8). Campuran ini kemudian diletakkan di atas penangas air hingga suhunya mencapai 37°C. Setelah itu, ditambahkan 2 ml *azocasein* yang sebelumnya telah dipanaskan pada penangas air hingga suhunya mencapai 37°C, lalu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 4 ml *trichloro acetic acid* (TCA) 10%, sehingga terbentuk endapan kuning yang dipisahkan dengan disentrifugasi. Filtrat sebanyak 5 ml diambil, lalu ditambah dengan 5 ml larutan NaOH 0,5 M dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm. Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan. Satu unit aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan kenaikan pengukuran absorbansi sebesar 0,01 setiap jam pada kondisi pengukuran. Unit aktivitas enzim eksoprotease yang digunakan dalam penelitian ini dinyatakan dalam U/ml, dan ditetapkan dengan rumus: unit aktivitas enzim/ml sampel (U/ml) = (absorbansi/0,01) x 2 (Hanlon and Hodges, 1981).

Analisis Data

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat dari aktivitas enzim eksoprotease secara kualitatif dan kuantitatif. Hasil pengujian kualitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang dinyatakan dalam luas zona bening (dalam cm²) pada masing-masing perlakuan dibandingkan dengan luas zona bening pada kontrol. Perlakuan yang mempunyai luas zona bening terkecil dilanjutkan pada pengujian kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease.

Hasil pengukuran aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* berupa unit aktivitas enzim/ml sampel (U/ml) pada perlakuan yang menunjukkan aktivitas enzim eksoprotease terendah dibandingkan dengan aktivitas enzim eksoprotease pada kontrol dan penurunannya dinyatakan dalam persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan *A. hydrophila* yang Memenuhi *Quorum Sensing*

Aeromonas hydrophila mempunyai faktor virulensi utama berupa produksi enzim eksoprotease yang diatur oleh sistem *quorum sensing*. Dengan demikian untuk mendeteksi

adanya produksi enzim eksoprotease, sistem *quorum sensing* *A. hydrophila* harus berjalan terlebih dahulu. Sistem *quorum sensing* dapat berjalan apabila bakteri telah mencapai kepadatan tertentu. Pada *A. hydrophila*, dari kepadatan 10^7 - 10^8 CFU/ml, sistem *quorum sensing* mulai berjalan (Gram *et al.*, 1999). Dengan bekerjanya sistem *quorum sensing* maka *A. hydrophila* telah mampu memproduksi enzim eksoprotease. Dalam penelitian ini, penentuan kepadatan *A. hydrophila* yang mampu mencapai *quorum* dilakukan dengan cara membuat kurva standar *A. hydrophila*. Suspensi *A. hydrophila* diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm sehingga dihasilkan nilai OD yang kemudian dikorelasikan dengan jumlah bakteri pada hitungan cawan. Nilai OD dan jumlah bakteri dalam hitungan cawan dapat diikuti dalam Tabel 1.

Dari nilai OD dan jumlah bakteri hasil hitungan cawan, selanjutnya dibuat kurva standar *A. hydrophila*, sehingga didapatkan persamaan $Y = 2,947X + 5,7774$ yang diperoleh melalui analisis regresi linier sederhana (Gambar 1).

Berdasarkan kurva standar tersebut, kepadatan *A. hydrophila* sebesar 10^7 - 10^8 CFU/ml dicapai pada nilai OD lebih besar atau sama dengan 0,415. Dari hasil tersebut, maka inokulum yang digunakan untuk perlakuan adalah inokulum yang mempunyai nilai OD lebih besar atau sama dengan 0,415.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* secara Kualitatif

Enzim eksoprotease merupakan enzim protease yang disekresikan oleh *A. hydrophila* ke lingkungan. Enzim eksoprotease ini merupakan faktor virulensi utama pada bakteri patogen sehingga perlu diturunkan produksinya. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dikontrol oleh suatu sistem komunikasi bakteri yang disebut sistem *quorum sensing*, dengan molekul sinyal berupa C4-HSL.

Untuk menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilakukan dengan cara menghambat sistem *quorum sensing*-nya.

Dalam penelitian ini, senyawa yang diduga mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila* adalah senyawa furanon dalam buah tomat. Senyawa furanon mempunyai struktur mirip dengan molekul sinyal C4-HSL sehingga berperan sebagai C4-HSL analog dan mampu mengganggu *quorum sensing*. Untuk mendapatkan senyawa yang terkandung dalam buah tomat, pada penelitian ini dilakukan ekstraksi bertingkat buah tomat menggunakan pelarut nonpolar, semipolar, dan polar yaitu n-heksan, etil asetat, dan metanol.

Uji kualitatif produksi enzim *A. hydrophila* dilakukan dengan metode titik (*spot plate*) pada media Luria Bertani (LB) Agar yang ditambah 2% susu skim dan pada perlakuan ditambah dengan ekstrak buah tomat dengan berbagai variasi konsentrasi. Inokulum yang digunakan adalah inokulum *A. hydrophila* yang telah mencapai kepadatan 10^7 dari hasil pembuatan kurva standar *A. hydrophila* (Gambar 1). Media Luria Bertani digunakan dalam uji kualitatif produksi enzim

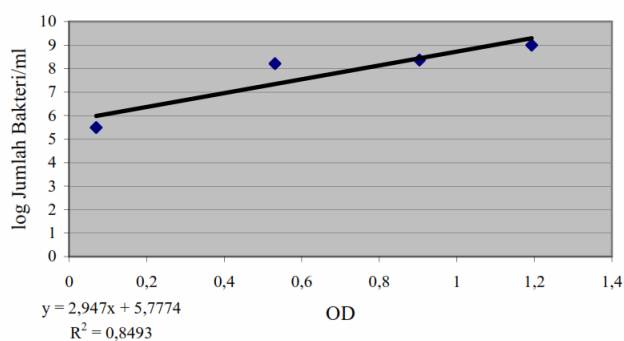
eksoprotease karena Luria Bertani mengandung tripton (asam amino triptofan) sehingga dapat memacu aktivitas enzim proteolitik. Penambahan susu skim dimaksudkan untuk menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease melalui terbentuknya zona bening di sekitar koloni bakteri *A. hydrophila*. Zona bening ini menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoprotease yang menghidrolisis ikatan peptida protein susu skim menjadi asam amino (Poernomo dan Purwanto, 2001). Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kualitatif dapat diketahui dengan tidak adanya zona bening atau terjadinya pengurangan luas zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*.

Apabila produksi enzim eksoprotease secara kualitatif terhambat oleh salah satu jenis ekstrak tanpa menghambat pertumbuhan bakteri maka dilanjutkan dengan uji kuantitatif produksi enzim eksoprotease untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak n-heksan Buah Tomat (*L. esculentum*)

Pelarut n-heksan merupakan pelarut nonpolar yang digunakan untuk melarutkan senyawa nonpolar dalam buah tomat. Kandungan nonpolar dalam buah tomat antara lain likopen yang termasuk golongan karotenoid (Sauriasari, 2006). Ekstrak n-heksan buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Pada semua konsentrasi ekstrak masih terdapat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Hal ini ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* yang menunjukkan adanya aktivitas enzim eksoprotease dalam menghidrolisis ikatan peptida susu skim. Berkurangnya zona bening diikuti juga dengan pengurangan koloni bakteri yang tumbuh (Gambar 2).

Bakteri tetap tumbuh yang ditunjukkan dengan diameter koloni *A. hydrophila* yang cukup besar dan mampu memproduksi enzim eksoprotease, terbukti dengan terukurnya luas zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening setelah perlakuan dengan ekstrak n-heksan buah tomat dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Kurva standar *A. hydrophila*.

Tabel 1. Nilai OD dan jumlah bakteri *A. hydrophila* pada hitungan cawan.

Jam ke-	Optical Density (OD)	Jumlah Bakteri/ml	Log Jumlah Bakteri
4	0,0697	$3,1 \times 10^5$	5,49136
6	0,5310	$1,6 \times 10^8$	8,21085
8	0,9040	$2,3 \times 10^8$	8,36173
10	1,1930	$9,9 \times 10^8$	8,99564

Tabel 2. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak n-heksan tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,380	0,110
4%	0,425	0,149
6%	0,316	0,081
8%	0,250	0,077

Tabel 3. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak etil asetat buah tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,483	0,322
4%	0,320	-
6%	0,233	-
8%	0,225	-

Keterangan: Tanda (-) menunjukkan tidak adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Tabel 4. Diameter koloni *A. hydrophila* dan luas zona bening pada perlakuan dengan ekstrak metanol buah tomat (*L. esculentum*).

Konsentrasi ekstrak	Rata-rata Diameter Koloni (cm)	Rata-rata Luas Zona Bening (cm ²)
Kontrol (0%)	0,467	0,429
2%	0,367	0,264
4%	0,308	0,048
6%	0,236	-
8%	0,216	-

Keterangan : Tanda (-) menunjukkan tidak adanya zona bening di sekitar koloni bakteri.

Pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* mengalami penurunan, namun penurunan produksi enzim eksoprotease dan pertumbuhannya relatif kecil. Hal ini diduga karena senyawa-senyawa aktif nonpolar yang terkandung dalam ekstrak buah tomat tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Ekstrak yang bersifat nonpolar menyebabkan ekstrak tersebut kurang larut dalam media LB Agar yang menggunakan pelarut air yang bersifat polar. Dalam ekstrak n-heksan buah tomat diduga senyawa furanon tidak terekstrak sehingga tidak

mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*, akibatnya perlakuan ekstrak n-heksan buah tomat ini tidak dilanjutkan pada pengukuran pertumbuhan bakteri dan pengujian kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Etil Asetat Buah Tomat (*L. esculentum*)

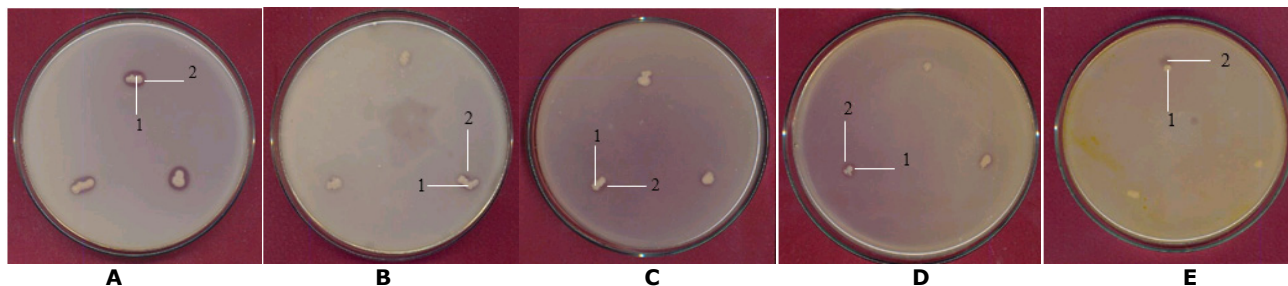
Etil asetat merupakan pelarut semipolar yang digunakan untuk melarutkan senyawa nonpolar dalam buah tomat. Ekstrak etil asetat buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Produksi enzim eksoprotease setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat mengalami penghambatan sejalan dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Hal ini dapat terlihat dari terbentuknya zona bening yang ada di sekitar koloni bakteri. Demikian juga dengan pertumbuhan *A. hydrophila*, semakin tinggi konsentrasi ekstrak, pertumbuhan *A. hydrophila* semakin terhambat. Adapun produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan Gambar 3.B, apabila dilihat dari koloni bakteri yang tumbuh dan zona bening yang terbentuk dapat dikatakan bahwa pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease pada konsentrasi 2% relatif sama dengan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease pada kontrol *A. hydrophila*. Hasil ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut belum mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Pada konsentrasi ekstrak 4% (Gambar 3.C) menunjukkan adanya penghambatan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* yang ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* meskipun hanya terjadi sedikit penurunan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Sementara itu pada konsentrasi 6% (Gambar 3.D) dan 8% (Gambar 3.E) tidak memperlihatkan adanya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila* yang menunjukkan tidak terdapatnya produksi enzim eksoprotease. Adanya penghambatan pertumbuhan dan produksi enzim eksoprotease secara rinci dapat dilihat dari hasil pengukuran diameter koloni dan luas zona bening pada Tabel 3.

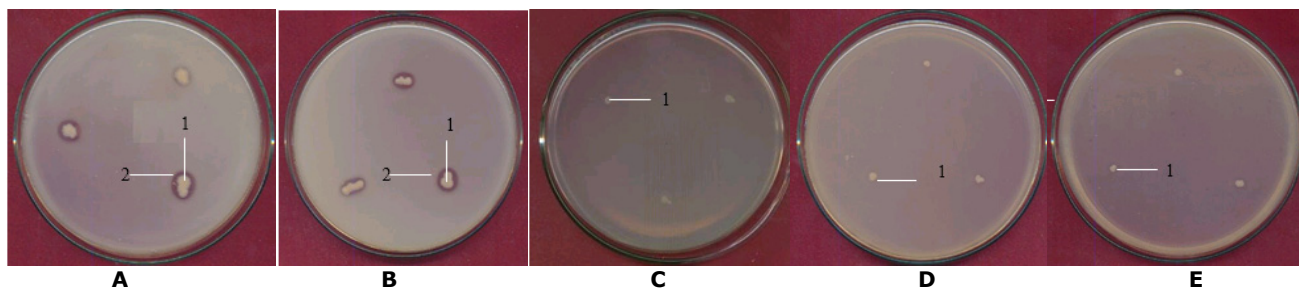
Pada Tabel 3 terlihat bahwa pada kontrol dan perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 2%, diameter koloni cukup besar yaitu 0,467 dan 0,483 dengan diameter zona bening yang juga cukup besar. Berbeda dengan konsentrasi 4%, meskipun diameter koloni yang dihasilkan relatif besar ternyata tidak terdapat zona bening di sekitar koloni bakteri. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Terhambatnya produksi enzim eksoprotease pada pemberian ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% diduga disebabkan oleh kandungan semipolar buah tomat mampu

menghambat *quorum sensing* *A. hydrophila*. Semakin besar konsentrasi ekstrak, semakin kecil diameter bakteri yang terbentuk. Hal ini terlihat pada konsentrasi ekstrak 6% dan 8% yang mempunyai diameter relatif kecil. Diameter koloni yang kecil tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Dengan demikian terjadinya penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh adanya

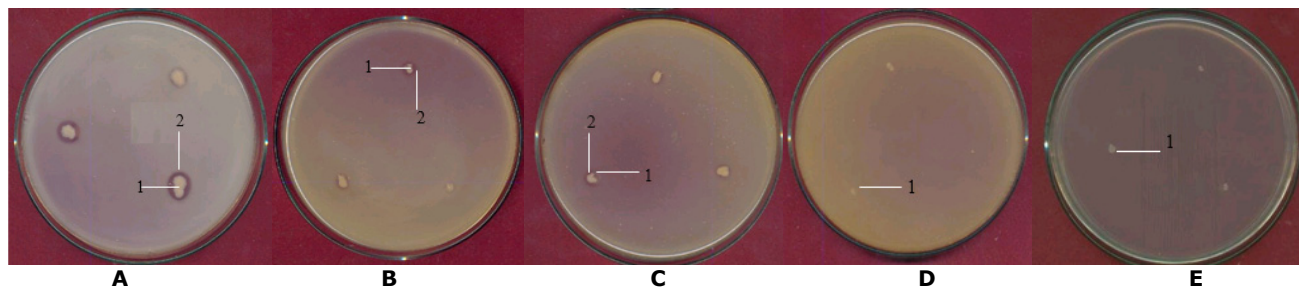
penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Senyawa semipolar buah tomat diduga bersifat antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* sehingga menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat dengan konsentrasi 4% dilanjutkan pada uji pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.



Gambar 2. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak n-heksan buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah ekstrak n-heksan buah tomat 8%.



Gambar 3. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 8%.



Gambar 4. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat. 1 = Koloni bakteri, 2 = zona bening (zona bening di sekitar koloni bakteri menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*), a = kontrol (media LB Agar), b = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 2%, c = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 4%, d = LB Agar ditambah dengan ekstrak n-heksan buah tomat 6%, dan e = LB Agar ditambah ekstrak n-heksan buah tomat 8%.

Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Metanol Buah Tomat (*L. esculentum*)

Metanol merupakan pelarut polar, sehingga mampu melarutkan senyawa furanon dalam tomat. Ekstrak metanol buah tomat diduga mengandung senyawa furanon yang mempunyai aktivitas sebagai penghambat sistem *quorum sensing* (*quorum sensing inhibitor*) sehingga mampu menghambat produksi enzim eksoprotease yang merupakan faktor virulensi *A. hydrophila*.

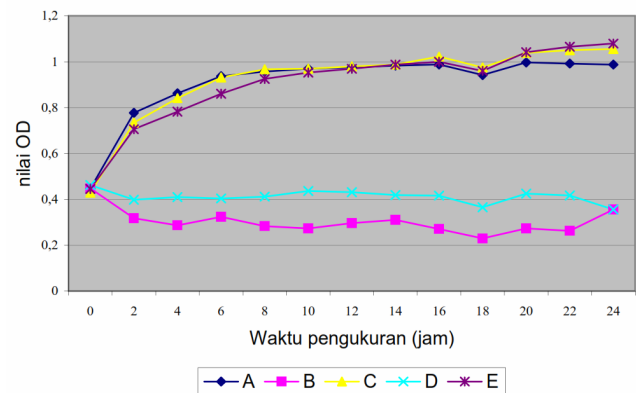
Ekstrak metanol buah tomat ditambahkan pada media Luria Bertani Agar dengan variasi konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, dan 8%. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat ini juga menunjukkan adanya penurunan. Semakin besar konsentrasi ekstrak yang ditambahkan, semakin kecil produksi enzim eksoprotease yang dihasilkan. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak metanol buah tomat dapat dilihat pada Gambar 4.

Dari Gambar 4.A dapat diketahui bahwa pada kontrol terjadi produksi enzim eksoprotease yang cukup besar yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Pada konsentrasi 2% (Gambar 4.B) masih menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease, terlihat dengan terbentuknya zona bening di sekitar koloni *A. hydrophila*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak 2% belum mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Pada konsentrasi ekstrak 4% (Gambar 4.C) masih menunjukkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, namun sangat sedikit dibandingkan dengan kontrol. Pada konsentrasi ekstrak 4%, tidak tampak adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri, sedangkan pada konsentrasi 6% (Gambar 4.D) dan 8% (Gambar 4.E), tidak terlihat adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang menunjukkan tidak terjadi produksi enzim eksoprotease. Koloni bakteri yang tumbuh relatif kecil yang menunjukkan terjadinya aktivitas penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*.

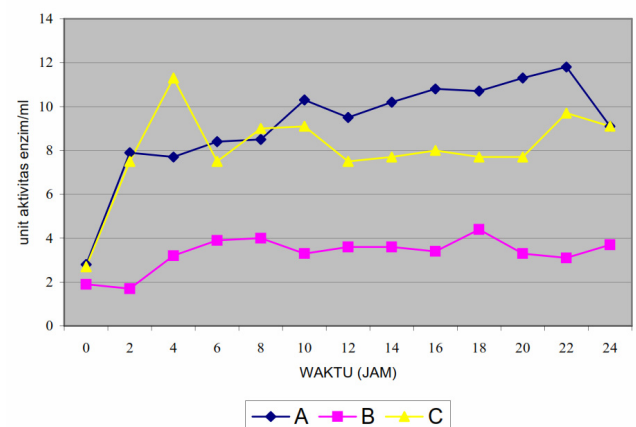
Berdasarkan hasil pengukuran diameter koloni bakteri dan luas zona bening seperti yang disajikan pada Tabel 4, dapat dilihat bahwa pada konsentrasi ekstrak 4%, produksi enzim eksoprotease relatif kecil, yaitu sebesar 0,048 cm², apabila dibandingkan dengan kontrol yang mempunyai luas zona bening 0,429 cm². Adanya penurunan produksi enzim eksoprotease tersebut tidak disertai dengan aktivitas penghambatan pertumbuhan, terlihat dari diameter zona bening yang relatif besar. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tersebut mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*.

Pada Tabel 4 juga menunjukkan bahwa pada konsentrasi 6% dan 8% tidak menunjukkan adanya produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, namun disertai aktivitas penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini terlihat dari diameter koloni *A. hydrophila* yang kecil, sehingga terjadinya aktivitas penghambatan produksi enzim diduga disebabkan

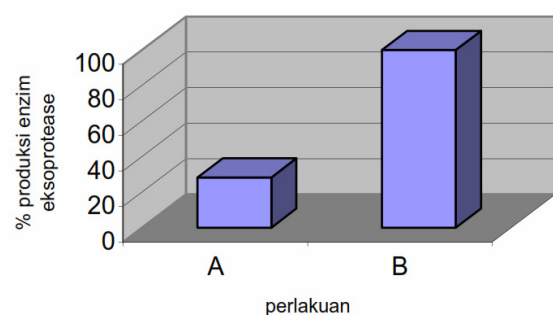
oleh terhambatnya pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.



Gambar 5. Kurva pertumbuhan *A. hydrophila*. A = Kontrol negatif (media LB Broth), B = kontrol positif (media LB Broth + pelarut etil asetat 4%), C = kontrol positif (media LB Broth + pelarut metanol 4%), D = media LB Broth + ekstrak etil asetat buah tomat 4%, serta E = media LB Broth + ekstrak metanol buah tomat 4%.



Gambar 6. Kurva produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. A = Kontrol ditambah dengan pelarut metanol sebesar 4%, B = perlakuan dengan penambahan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%, serta C = kontrol.



Gambar 7. Produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada jam ke-4. A = Perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%, B = kontrol.

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada penelitian ini diduga disebabkan oleh adanya penghambatan sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*. Berdasarkan penelitian Swift *et al.* (1999), penghambatan *quorum sensing* dapat dilakukan dengan menambahkan senyawa analog C4-HSL pada kultur *A. hydrophila*. Penghambatan *quorum sensing* dapat dilakukan oleh senyawa yang mirip dengan molekul sinyal sebagai *quorum sensing inhibitors* (QSI). Pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat yang telah dilakukan, senyawa yang diduga mampu menghambat sistem *quorum sensing* *A. hydrophila*, sehingga mampu menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, adalah senyawa furanon dalam ekstrak buah tomat.

Dalam buah tomat, furanon terdapat dalam bentuk *furaneol* (4-hidroksi-2,5-dimetil-3-(2H)-furanon) (Buttery *et al.*, 2001). Berdasarkan hasil penelitian Rasmussen *et al.* (2000), halogen furanon yang merupakan metabolit sekunder dari makroalga laut *Delisea pulchra* mampu menghambat molekul sinyal *N-Butanoyl-L-Homoserine Lactone* pada *Serratia liquefaciens* sehingga menghambat motilitas *Serratia liquefaciens*.

Senyawa yang bertindak sebagai QSI mampu menghambat *quorum sensing* dalam konsentrasi yang relatif kecil (Hentzer and Givskov, 1999). Apabila diberikan dalam konsentrasi yang lebih besar, senyawa QSI bersifat sebagai antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Rasch *et al.*, 2004). Dalam penelitian ini terbukti bahwa pada konsentrasi 4%, senyawa dalam ekstrak metanol buah tomat mampu menurunkan produksi enzim eksoprotease tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Pada saat ekstrak metanol buah tomat diberikan pada konsentrasi lebih besar, yaitu 6% dan 8%, terjadi aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease, namun disertai penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Dengan demikian, berdasarkan prinsip *quorum sensing inhibitors* (QSI) yang mampu menghambat faktor virulensi bakteri, dalam penelitian ini adalah produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*, tanpa menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri maka perlakuan yang dilanjutkan ke tahap pengujian produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif adalah ekstrak metanol buah tomat dengan konsentrasi 4%. Penelitian ini terfokus pada senyawa QSI, bukan pada antibakteri karena pada umumnya senyawa antibakteri mempunyai dampak negatif yaitu munculnya resistensi bakteri dan timbulnya strain bakteri yang baru, sehingga penggunaan senyawa antibakteri menjadi kurang efektif.

Pertumbuhan *A. hydrophila* pada Perlakuan Ekstrak Buah Tomat (*L. esculentum*)

Pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak buah tomat dapat diketahui dengan membuat kurva pertumbuhan. Pengukuran pertumbuhan digunakan untuk mengetahui bahwa aktivitas penghambatan produksi enzim

eksoprotease *A. hydrophila* tidak disebabkan oleh terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila*, namun disebabkan oleh terhambatnya sistem *quorum sensing* yang mengontrol sintesis enzim eksoprotease tersebut. Pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* hanya dilakukan pada perlakuan yang menunjukkan penurunan produksi enzim eksoprotease secara kualitatif tanpa terhambat pertumbuhannya yaitu pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan ekstrak etil asetat tomat sebesar 4%.

Gambar 5 menunjukkan pertumbuhan *A. hydrophila* setelah perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4%. Selain itu, dilakukan juga pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila* dengan penambahan pelarut etil asetat dan metanol ke dalam media LB cair untuk mengetahui pengaruh pelarut yang digunakan untuk mengekstrak buah tomat terhadap pertumbuhan *A. hydrophila*. Secara umum, kurva pertumbuhan menunjukkan pertumbuhan bakteri yang terdiri dari fase lag, fase eksponensial, dan fase stasioner.

Berdasarkan Gambar 5, fase lag tidak begitu kelihatan. Hal ini diduga disebabkan bakteri sudah mampu beradaptasi dengan media cair yang digunakan. Pada fase lag, sel bakteri mengalami perubahan dalam komposisi kimiawi dan bertambah ukurannya, namun belum ada penambahan populasi bakteri. Pada fase eksponensial, terjadi penambahan massa sel dengan cepat (Pelzar and Chan, 1992). Fase eksponensial *A. hydrophila* pada penelitian ini berlangsung pada jam ke-0 sampai jam ke-10. Pada fase stasioner, terjadi penumpukan produk beracun dan terjadi kekurangan nutrient, sehingga beberapa sel mati, sedangkan sel-sel yang lain tetap tumbuh, sehingga jumlah sel hidup menjadi tetap (Pelzar and Chan, 1992). Pada penelitian ini fase stasioner berlangsung pada jam ke-12 sampai jam ke-24.

Pada perlakuan ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dan kontrol positif yang ditambah pelarut metanol, pertumbuhan *A. hydrophila* berlangsung dengan normal, tidak terjadi penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*, terlihat dengan nilai *Optical Density* (OD) yang relatif sama dengan kontrol. Sementara itu pada kontrol yang ditambah pelarut etil asetat, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *A. hydrophila*. Etil asetat mengandung asam asetat. Asam mampu menyebabkan denaturasi protein sel bakteri, sehingga terjadi koagulasi protein sel bakteri dan akhirnya bakteri mati, kemudian sel bakteri menjadi menggumpal dan cenderung turun ke bawah dasar erlenmeyer saat pengukuran pertumbuhan *A. hydrophila*. Pada perlakuan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4%, terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Hal ini diduga terjadi akibat adanya kandungan senyawa semipolar dalam buah tomat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Sehubungan dengan terhambatnya pertumbuhan *A. hydrophila* setelah penambahan ekstrak etil asetat buah tomat sebesar 4% maka perlakuan ini tidak

dilanjutkan ke tahap uji kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila*.

Penurunan Produksi Enzim Eksoprotease *A. hydrophila* secara Kuantitatif

Di dalam sel, jumlah enzim yang tersedia hanya sedikit, sehingga pengukuran kadar enzim dalam ekstrak jaringan akan menjadi sangat sulit. Oleh karena itu, pengukuran produksi enzim dalam suatu ekstrak jaringan atau cairan biologik lain dilakukan dengan mengukur aktivitas katalisis enzim. Jumlah molekul atau massa enzim yang ada sukar ditentukan, sehingga hasil pengukurannya dinyatakan dalam bentuk unit aktivitas enzim (Murray *et al.*, 1997).

Pengukuran produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif hanya dilakukan pada perlakuan yang menunjukkan penurunan aktivitas proteolitik pada uji kualitatif dan tidak menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*. Hal ini sesuai dengan prinsip *quorum sensing inhibitors* yang mampu menghambat ekspresi gen penyandi faktor virulen, tanpa menghambat pertumbuhan bakteri itu sendiri. Pada penelitian ini, hanya ekstrak metanol buah tomat 4% yang diuji secara kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease.

Uji aktivitas enzim eksoprotease *A. hydrophila* secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan *azocasein* sebagai substratnya. *Azocasein* akan dihidrolisis oleh enzim eksoprotease menjadi peptida dan asam amino yang akan membentuk warna apabila ditambah dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk dapat diukur nilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm.

Produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat sebesar 4% dibandingkan dengan kontrol untuk mengetahui persentase penurunan produksi enzim eksoprotease. Untuk memastikan bahwa penurunan produksi enzim eksoprotease disebabkan oleh kandungan senyawa dalam buah tomat dan bukan pelarut metanol, dilakukan juga uji aktivitas enzim eksoprotease secara kuantitatif pada media LB broth dengan penambahan pelarut metanol sebesar 4%. Adapun produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* selama 24 jam dapat dilihat pada Gambar 6.

Berdasarkan Gambar 6, produksi enzim eksoprotease sudah terdeteksi sejak jam ke-0. Hal ini terjadi karena kepadatan bakteri pada jam tersebut telah memenuhi *quorum* untuk berjalannya *quorum sensing A. hydrophila* (Gambar 5). Produksi enzim eksoprotease cenderung stabil setelah jam ke-12 (fase stasioner). Pada kontrol yang ditambah pelarut metanol tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan produksi enzim eksoprotease. Pelarut metanol tidak menghambat produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* karena metanol tidak mampu menghambat sistem *quorum sensing A. hydrophila*. Pada penelitian Rasmussen *et al.* (2005), pelarut metanol tidak menunjukkan aktivitas sebagai *quorum sensing inhibitors*.

Pada pemberian ekstrak metanol buah tomat, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* (Gambar 6). Produksi enzim eksoprotease pada perlakuan tersebut dibandingkan dengan kontrol untuk memperoleh persentase penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila*. Pada kontrol, produksi enzim eksoprotease terbesar terjadi pada jam ke-4 dan hasil ini dianggap 100%, sehingga penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dihitung dengan membandingkan produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat dengan kontrol pada jam ke-4. Persentase produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 7.

Penurunan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* pada pemberian ekstrak metanol buah tomat 4% sebesar 71,68%. Adanya penurunan produksi enzim eksoprotease ini diduga disebabkan oleh adanya aktivitas senyawa furanon dalam ekstrak metanol buah tomat yang bertindak sebagai C4-HSL analog. Senyawa furanon mempunyai struktur mirip dengan C4-HSL sehingga berkompetisi dengan C4-HSL untuk berikatan dengan protein *LuxR* dan menghambat induksi gen penyandi enzim eksoprotease (Manifield *et al.*, 1999). Gao *et al.* (2003) dan Bauer and Robinson (2002) menyebutkan bahwa tanaman tomat mengeluarkan senyawa yang mampu meniru aktivitas molekul sinyal AHL pada sistem *quorum sensing* bakteri, dan mempunyai efek yang spesifik terhadap *quorum sensing* bakteri.

KESIMPULAN

Terjadi penurunan produksi enzim eksoprotease setelah pemberian ekstrak metanol buah tomat sebesar 4%. Ekstrak metanol buah tomat tersebut mampu menurunkan produksi enzim eksoprotease *A. hydrophila* sebesar 71,68%, tanpa menghambat pertumbuhan *A. hydrophila*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afianto, E.A. dan E. Liviawaty. 1992. *Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Allan, B.J. and R.M. Stevenson. 1981. Extracellular virulence factors of *A. hydrophila* in fish infection. *Can. J. Microbiol.* 27: 1114-1122.
- Bauer, W.D. and J.B. Robinson. 2002. Disruption of bacterial quorum sensing by other organism. *Current Opinion Biotechnology* 13: 234-237.
- Buttery, R.G., G.R. Takeda, M. Naim, H. Rabinowitch, and Y. Nam. 2001. Analysis of furaneol in tomato using dynamic headspace sampling with sodium sulfate. *J. Agric. Food. Chem.* 49: 4349-4351.
- Fryer, J.L. and J.L. Bartholomew. 1996. Established and emerging infectious disease of fish. *ASM News* 62: 592-594.
- Gao, M., M. Teplitski, J.B. Robinson, and W.D. Bauer. 2003. Production of substances by **Medicago**

- truncatula** that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 16(9): 827-834.
- Gram, L., A.B. Christensen, L. Ravn, S. Molin, and M. Givskov. 1999. Production of acylated homoserine lactones by psychrotrophic members of the Enterobacteriaceae isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3458-3463.
- Hanlon, G. and N.A. Hodges. 1981. Bacitracin and protease production in relation to sporulation during exponential growth of **Bacillus licheniformis** on poorly utilized carbon and nitrogen sources. *J. Bacteriol.* 162(2): 427-431.
- Hentzer, M. and M. Givskov. 2003. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infection. *J. Clint. Invest.* 112: 1300-1307.
- Lynch, M.J. 2002. The regulation of biofilm development by quorum sensing in **Aeromonas hydrophila**. *Environ. Microbiol.* 4: 18-28.
- Manefield, M., R. de Nys, N. Kumar, R. Read, M. Givskov, P. Steinberg, and S. Kjelleberg. 1999. Evidence that halogenated furanones from **Delisea pulchra** inhibit Acylated Homoserine Lactone (AHL) mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiol.* 145: 283-291.
- Martinelli, D., G.U. Sequin, H. Brandl, R. Bachosen. 2004. Effect of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in **Chromobacterium violaceum**. *BMC Microbiol.* 4: 25.
- Murray, R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V.W. Rodwell. 1997. *Biokimia* (Diterjemahkan oleh: Hartono, A.). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Noga, E.J. 1995. *Fish Disease: Diagnosis and Treatment*. St. Louis, Missouri: The C.V. Mosby Company.
- Pelzar, J.M. and E.C.S. Chan. 1992. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Purnomo, A.T. dan D.A. Purwanto. 2001. *Karakterisasi Enzim Proteolitik Bacillus subtilis FNCC 0059*. Surabaya: Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.
- Rasch, M., C. Buch, B. Austin, W.J. Slierendrecht, K.S. Ekmann, J.L. Larsen, C. Johansen, K. Riedel, L. Eberl, M. Givskov, and L. Gram. 2004. An inhibitor of bacterial quorum sensing reduces mortality caused by vibriosis in rainbow trout (**Oncorhynchus mykiss**, Walbaum). *Syst. Appl. Microbiol.* 24(3): 350-359.
- Rasmussen, T.B., M. Manefield, J.B. Anderson, L. Eberl, U. Anthoni, C. Christophersen, P. Steinberg, S. Kjelleberg, and M. Givskov. 2000. How **Delisea pulchra** furanones affect quorum sensing and swarming motility in **Serratia liquefaciens** MG1. *Microbiol.* 146: 3237-3244.
- Rasmussen, T.B., T. Bjarnsholt, M.E. Skindersoe, M. Hentzer, P. Kristoffersen, M. Kote, J. Nielson, L. Eberl, and M. Givskov. 2005. Screening for quorum sensing inhibitors by use of a novel genetic system the quorum sensing selector. *J. Bacteriol.* 185(5): 1755-1814.
- Sauriasari, R. 2006. Mengenal dan menangkal radikal bebas. *Berita Iptek*. www.beritaiptek.com.
- Secades, D. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular proteases from fish pathogen **Yersinia ruckeri** and effect of cultures condition and production. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 3969-3975.
- Swift, S., A.V. Karlyshev, L. Fish, E.L. Durant, M.K. Winson, S.R. Chhabra, P. Williams, S. Macintyre, and G.S. Stewart. 1997. Quorum sensing in **Aeromonas hydrophila** and **Aeromonas salmonicida** identification of the *LuxRI* homologs and *AsaRI* and their cognate N-acyl homoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* 179(17): 5271-5281.
- Swift, S., M.J. Lynch, L. Fish, D.F. Leink, J.M. Thomas, C.J.A.B. Stewart, P. Williams. 1999. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of eksoprotease production in **Aeromonas hydrophila**. *Infect. Immun.* 4: 18-28.
- Taga, M.E. and B.L. Bassler. 2003. Chemical communication among bacteria. *PNAS* 100(2): 14549-14554.

Efek antipiretik ekstrak daun kemangi (*Ocimi sancti folium*) pada tikus putih

The antipyretic effect of basil leaf extract (*Ocimi sancti folium*) in rats

ANDINA WIDIASTUTI, YUL MARIYAH, SUHARSONO

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

Diterima: 30 November 2005. Disetujui: 12 Februari 2006.

Abstract. Basil leaves are believed by community to reduce the fever. This study aimed to determine the effect of antipyretic and the effectiveness of basil leaf extract (*Ocimi sancti folium*) in rats. This research was a laboratory experimental research by using a random sampling technique. The experimental animal used was Wistar rats aged less than 2 months, as much as 20 rats divided into 4 groups. Group 1 as a negative control group was given aquadest of 2.5 ml, while groups 2, 3 and 4 as test groups were each given basil extract by 3.15 mg/100 gr BB, 6.30 mg mg/100 gr BB and 12.60 mg/100 gr BB, respectively, dissolved in 2.5 ml of aquadest. To increase the temperature, it was injected vaccine DPT 0.2 cc intra-muscular. The temperature measurement is conducted by using a digital thermometer. The data obtained were analyzed by using Statistical Package for Social Sciences 11.5 (SPSS 11.5) with Univariate Analysis of Variance method followed by Post Hoc test. The result of one factor analysis from Univariate Analysis of Variance test showed that the average of rats rectal temperature was significantly different for each test group and for each time range of temperature measurement, each of them was 0.034 and 0.005 with a significant level (α) = 0.05. From the result of analysis by using Post Hoc Test, there was a significant difference between dose group of 3.15 mg/100 gr BB with a dose group of 12.60 mg/100 gr BB and between the time of temperature measurements of 120 minutes and 180 minutes. At first dose and 180th minute, it was obtained a lowest rectal rats temperature. The results showed that the basil leaf extract had an antipyretic effect on rats. The optimal effectiveness evidenced by a lowest average rectal temperature was achieved by a dose of 3.15 mg/100 gr BB at 180th minute.

Keywords: Antipyretic effect, basil leaf extract, white mice

PENDAHULUAN

Prevalensi sakit penduduk di Indonesia dalam sebulan sebesar 21%, dimana terendah di Provinsi Lampung (12%). Gejala utama sakit antara lain 29,1% demam, 19,2% batuk, dan 16,8% pilek (Sudibyo *et al.*, 1999). Sejak zaman Hipocrates, kondisi demam sudah diketahui sebagai salah satu gejala penyakit (Nelwan, 1996). Meskipun demam hanya merupakan salah satu gejala penyakit, demam sering dialami oleh masyarakat (Wahjoedi *et al.*, 1981). Untuk mengatasi keluhan tersebut, tindakan pertama yang sering dilakukan adalah pengobatan sendiri (Sudibyo *et al.*, 1999). Pengobatan sendiri adalah upaya pengobatan terhadap gejala sakit menggunakan obat, obat tradisional, atau cara tradisional tanpa petunjuk ahlinya (Sudibyo *et al.*, 2003).

Obat tradisional, baik berupa jamu ataupun tanaman obat, masih digunakan hingga saat ini, terutama oleh masyarakat kelas menengah ke bawah. Hal ini dibuktikan dengan hasil survei Departemen Kesehatan yang dilakukan di Jawa dan Lampung (Sardjono, 1989). Penggunaan obat tradisional ataupun jamu oleh masyarakat di

Indonesia pada umumnya dan di Jawa khususnya sudah sangat luas (Salma, 1985). Dari hasil survei terhadap kesehatan rumah tangga yang dilakukan pada tahun 1980 dan 1985 diketahui bahwa penggunaan obat tradisional tidak berkurang, dimana penggunaan obat tradisional untuk pengobatan sendiri berturut-turut sebesar 19,6% dan 18,8% (Dzulkarnain *et al.*, 1992).

Hingga saat ini, penggunaan obat tradisional sebagian besar masih ditangani oleh masyarakat sendiri, dalam arti jenis obat ditentukan sendiri, diramu dan dibuat sendiri, dan digunakan sendiri (Djilantik, 1983). Pengetahuan tentang khasiat obat tradisional lebih banyak didasarkan pada pengalaman empiris yang diperoleh secara turun-temurun, sehingga untuk menentukan efektivitas obat tradisional dalam menyembuhkan penyakit masih dipertanyakan (Lestari, 2001).

Hingga saat ini, masyarakat Indonesia masih terus berupaya dalam meningkatkan pemanfaatan tanaman obat. Pengetahuan tentang tanaman obat harus dapat dipertanggungjawabkan dengan didukung oleh data ilmiah (Pudjiastuti dan Hendarti, 1999). Dari berbagai tanaman obat di Indonesia, dikenal beberapa jenis tanaman yang telah

digunakan secara empiris untuk mengatasi gejala demam (Wahjoedi *et al.*, 1981).

Bahan-bahan tanaman yang bersifat antipiretik berpotensi untuk menurunkan suhu normal tubuh. Demikian juga bahan-bahan tanaman yang mempengaruhi susunan syaraf pusat atau metabolisme hewan dapat mempengaruhi suhu normal tubuh, sehingga jenis-jenis tanaman obat yang sudah dikenal masyarakat berpotensi menurunkan suhu normal tubuh (Wahjoedi *et al.*, 1978).

Kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan salah satu jenis tumbuhan obat berharga dalam melawan berbagai macam penyakit. Kemangi memiliki beberapa aplikasi pengobatan, antara lain stomatik, antihelmintik, antipiretik, penyakit peredaran darah, asma, serta bronkitis. Ekstrak daun kemangi mampu menghambat inflamasi, baik akut maupun kronis pada hewan percobaan, serta mempunyai efek analgesik dan antipiretik, sehingga dapat menyebabkan penghambatan pada biosintesis prostaglandin (Wohlmuth, 2004).

Daun kemangi mengandung tanin 4,6%, flavonoid, steroid/triterpenoid, dan minyak atsiri 2%. Efek flavonoid terhadap berbagai macam organisme sangat bervariasi dan dapat menjelaskan suatu jenis tumbuhan yang mengandung flavonoid dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Flavonoid dapat menghambat jalur lipo-oksigenase yang merupakan tahapan pertama dalam sintesis hormon eikosanoid, seperti prostaglandin dan tromboksan (Robinson, 1991). Daun kemangi mengandung senyawa-senyawa yang mampu menghambat sintesis prostaglandin, hal ini diperkuat oleh hasil penelitian terbaru yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang diisolasi dari daun kemangi, diantaranya eugenol, asam rosmarinik, flavonoid *cirsilineol*, *cirsimaritin*, *isothymonin*, dan *apigenin*, dapat menghambat enzim utama yang berperan dalam biosintesis prostaglandin, yaitu siklo-oksigenase (Wohlmuth, 2004).

Peningkatan suhu tubuh pada kondisi patologi diawali dengan pelepasan suatu zat pirogen endogen atau sitokin interleukin-1 (IL-1) yang memacu pelepasan prostaglandin yang berlebihan di daerah preoptik hipotalamus. Selain itu, prostaglandin E2 terbukti menimbulkan demam setelah diinfuskan ke ventrikel serebral atau disuntikkan ke daerah hipotalamus. Obat mirip aspirin dapat menekan efek zat pirogen endogen dengan menghambat sintesis prostaglandin (Wilmana, 1995). Berdasarkan uraian tersebut, pemberian intragastrik ekstrak daun kemangi berpotensi untuk menurunkan demam.

Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui ada tidaknya efek antipiretik ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada tikus putih, serta (2) mengetahui efektivitas ekstrak daun kemangi sebagai antipiretik pada tikus putih.

BAHAN DAN METODE

Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Bahan dan Alat

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi yang diperoleh dari BPTO Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar. Ekstrak kental daun kemangi diperoleh dari ekstraksi daun kemangi dengan pelarut etanol. Ekstrak kental kemudian diencerkan dengan akuades dan dibuat 3 dosis. Bahan lain yang digunakan yaitu vaksin DPT 0,2 cc yang disuntikkan secara intramuskular pada masing-masing hewan uji, alkohol sebagai disinfektan, dan akuades. Sementara itu, alat-alat yang digunakan meliputi kandang tikus, *becker glass*, spuit pencekok/oral 1 ml, termometer digital, *stopwatch*, dan kapas/tisu steril.

Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan untuk percobaan berupa tikus putih galur Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Hewan uji berumur kurang lebih 2 bulan dengan catatan berat badan masing-masing, sebanyak 20 ekor yang dibagi menjadi 4 kelompok dan masing-masing terdiri atas 5 ekor tikus putih yang dipilih dengan metode *simple random sampling*.

Klasifikasi Variabel

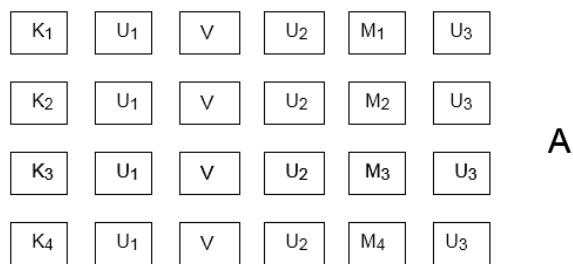
Variabel independen berupa kelompok dosis ekstrak daun kemangi, sedangkan variabel dependen berupa suhu rektal tikus putih. Sementara itu, variabel pengganggu meliputi: (1) variabel pengganggu yang terkendali yaitu berupa tingkat stres terhadap kondisi tempat percobaan, serta (2) variabel pengganggu yang tidak terkendali yaitu variasi kepekaan tikus putih terhadap zat dan obat yang digunakan, kondisi lambung tikus putih, pirogen endogen, serta absorpsi senyawa dan obat pada saluran pencernaan tikus putih.

Definisi Operasional Variabel

Ekstrak kental daun kemangi merupakan sediaan kental yang dibuat dari hasil ekstraksi simplisia tanaman kemudian diuapkan pelarutnya (Voight, 1994). Sementara itu, efek antipiretik dihitung dari nilai rata-rata penurunan suhu rektal tikus putih yang diukur setiap 30 menit hingga pada pengukuran menit ke-180.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium. Rancangan percobaan yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. K₁ = Kelompok kontrol negatif, K₂ = kelompok uji dosis 1, K₃ = kelompok uji dosis 2, K₄ = kelompok uji dosis 3, U₁ = pengukuran suhu awal rektal, V = pemberian vaksin DPT 0,2 cc intra-muskular, U₂ = pengukuran suhu rektal 5 menit sebelum perlakuan M, M₁ = pemberian akuades, M₂ = pemberian ekstrak daun kemangi dosis 1, M₃ = pemberian ekstrak daun kemangi dosis 2, M₄ = pemberian ekstrak daun kemangi dosis 3, U₃ = pengukuran suhu rektal setelah perlakuan dengan interval 30 menit hingga 180 menit, A = analisa data dengan uji statistik *Univariate Analysis of Variance* dan *Post Hoc Test*.

Perhitungan Dosis Ekstrak Daun Kemangi

Dosis ekstrak daun kemangi yang biasa digunakan oleh masyarakat adalah 500 mg. Faktor konversi manusia dengan berat badan (BB) 70 kg ke tikus putih dengan berat badan 200 g adalah 0,018 (Ngatidjan, 1990). Berat rata-rata masyarakat Indonesia sekitar 50 kg (Imono dan Nurlaila, 1986).

$$\begin{aligned}\text{Dosis ekstrak} &= (500 \text{ mg} \times (70/50) \times 0,018) / 200 \text{ g tikus} \\ &= 12,60 \text{ mg} / 200 \text{ g tikus} \\ &= 6,30 \text{ mg} / 100 \text{ g BB tikus}\end{aligned}$$

Dosis ekstrak untuk tikus putih:

$$\text{Dosis 1} = 3,15 \text{ mg} / 100 \text{ g BB}$$

$$\text{Dosis 2} = 6,30 \text{ mg} / 100 \text{ g BB}$$

$$\text{Dosis 3} = 12,60 \text{ mg} / 100 \text{ g BB}$$

Dosis ekstrak daun kemangi:

$$\text{Dosis 1} = 3,15 \text{ mg} / 2,5 \text{ ml}$$

$$\text{Dosis 2} = 6,30 \text{ mg} / 2,5 \text{ ml}$$

$$\text{Dosis 3} = 12,60 \text{ mg} / 2,5 \text{ ml}$$

Perhitungan pembuatan larutan ekstrak daun kemangi:

$$\begin{aligned}\text{Pembuatan larutan CMC Na 1\% sebagai pelarut} \\ &= 1 \text{ g CMC Na} / 100 \text{ ml air}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Pembuatan larutan stok konsentrasi 1\%:} \\ &= 1 \text{ g ekstrak} / 100 \text{ ml pelarut} \\ &= 1000 \text{ mg ekstrak} / 100 \text{ ml pelarut}\end{aligned}$$

Misal berat tikus putih = A g BB, maka:

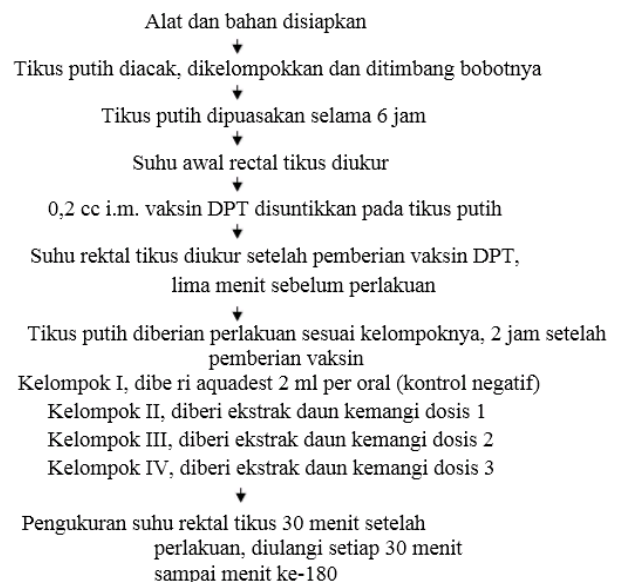
$$\begin{aligned}\text{Dosis I} &= 3,15 \text{ mg} / 100 \text{ g BB} \times A \text{ g BB} \\ &= B \text{ mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume} &= \text{massa} / \text{konsentrasi ekstrak} \\ &= B \text{ mg} / (1000 \text{ mg ekstrak} / 100 \text{ ml pelarut}) \\ &= C \text{ ml} \rightarrow \text{tambahkan air hingga } 2,5 \text{ ml}\end{aligned}$$

Cara Kerja

Sebelum perlakuan, hewan uji diadaptasikan

dalam ruangan percobaan selama lebih kurang 18 jam, kemudian dipuasakan selama 6 jam sebelum perlakuan. Hewan uji kemudian dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri atas 5 ekor tikus putih. Suhu rektal tikus putih terlebih dahulu diukur untuk mengetahui suhu normal baru, kemudian tikus disuntik dengan vaksin DPT 0,2 cc intra-muskular. Untuk mengetahui peningkatan suhu akibat penyuntikan vaksin, lima menit setelah perlakuan diberikan, suhu rektal diukur kembali. Dua jam setelah pemberian vaksin, masing-masing kelompok diberi perlakuan yang berbeda, yaitu: (1) kelompok 1 diberikan akuades sebagai kontrol, (2) kelompok 2 diberikan ekstrak daun kemangi dosis 1, (3) kelompok 3 diberikan ekstrak daun kemangi dosis 2, dan (4) kelompok 4 diberikan ekstrak daun kemangi dosis 3. Tiga puluh menit sejak perlakuan, suhu rektal diukur kembali hingga menit ke-180 dengan interval 30 menit untuk mengetahui penurunan suhu tubuh tikus. Skema cara kerja percobaan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema cara kerja percobaan.

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dianalisis dengan menggunakan *Statistical Package for Social Sciences 11.5* (SPSS 11.5) dengan metode *Univariate Analysis of Variance* yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* pada tingkat signifikansi (α) = 0,05 atau tingkat kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Pada percobaan efek antipiretik daun kemangi pada tikus putih diperoleh hasil sebagai berikut.

Univariate Analysis of Variance

Analisis data dengan menggunakan uji *Univariate Analysis of Variance* dilakukan untuk menguji rata-rata suhu rektal tikus putih pada tiap kelompok berbeda secara signifikan atau tidak, dan untuk menguji variansi populasi yang diuji memiliki variansi yang sama atau tidak. Hasil uji *Univariate Analysis of Variance* yang diperoleh adalah sebagai berikut:

Levene's Test of Equality of Error Variance

Levene's Test of Equality of Error Variance merupakan uji asumsi dari Anova yang mengasumsikan bahwa variansi populasi yang diuji memiliki variansi yang sama. Hasil uji variansi populasi memperlihatkan nilai probabilitas *Levene Test* sebesar 0.042. Oleh karena nilai probabilitas di bawah 0,05 maka dapat disimpulkan bahwa keempat variansi populasi (akuades, dosis 1, dosis 2, dan dosis 3) memiliki variansi yang berbeda. Hasil uji ini tidak memenuhi asumsi dari Anova. Namun demikian, untuk analisis selanjutnya dianggap bahwa keempat kelompok tersebut mempunyai variansi yang sama.

Tests of Between-Subjects Effect

Analisis Satu Faktor

Perbedaan suhu rektal tikus oleh perbedaan kelompok sebagai berikut: 1) H_0 : Keempat kelompok memiliki rata-rata populasi yang identik; 2) H_1 : Keempat kelompok memiliki rata-rata

populasi yang tidak identik; 3) Keputusan: Nilai probabilitas untuk variabel kelompok sebesar 0,034. Oleh karena nilai probabilitas $<0,05$ maka H_0 ditolak, hal ini berarti dapat disimpulkan bahwa rata-rata suhu rektal tikus berbeda secara nyata (signifikan) untuk tiap kelompok.

Perbedaan suhu rektal tikus oleh perbedaan waktu pengukuran suhu sebagai berikut: 1) H_0 : Keenam waktu memiliki rata-rata populasi yang identik; 2) H_1 : Keenam waktu memiliki rata-rata populasi yang tidak identik; 3) Keputusan: Nilai probabilitas untuk variabel waktu sebesar 0,005. Oleh karena nilai probabilitas $<0,05$ maka H_0 ditolak, hal ini berarti dapat disimpulkan bahwa rata-rata suhu rektal tikus berbeda secara nyata (signifikan) untuk tiap waktu pengukuran suhu.

Analisis Dua Faktor

Interaksi antara kelompok dengan waktu sebagai berikut: 1) H_0 : Tidak ada interaksi antara kelompok dengan waktu, 2) H_1 : Terdapat interaksi antara kelompok dengan waktu; 3) Keputusan: Nilai probabilitas untuk variabel kelompok dengan waktu sebesar 0,853. Oleh karena nilai probabilitas $>0,05$ maka H_0 diterima, hal ini berarti dapat disimpulkan bahwa tidak terdapat interaksi antara kelompok dengan waktu dalam mempengaruhi hasil pengukuran suhu rektal tikus. Setelah uji *Tests of Between-Subjects Effect* dilakukan maka dilanjutkan dengan *Post Hoc Tests* untuk mengetahui kelompok dosis dan waktu yang paling efektif.

Tabel 1. Hasil pengukuran suhu rektal tikus putih sebelum dan sesudah perlakuan

Perlakuan	Tikus ke-	U_1	U_2	Suhu rektal tikus ($^{\circ}\text{C}$)					
				Menit ke-30	Menit ke-60	Menit ke-90	Menit ke-120	Menit ke-150	Menit ke-180
Akuades	1	38,3	37,6	38,3	38,3	38,4	39,1	38,3	38,0
	2	39,1	36,5	38,3	38,3	38,3	38,2	38,0	36,5
	3	37,3	37,4	37,8	37,6	38,0	38,2	38,2	37,2
	4	38,0	38,2	38,0	37,7	37,8	38,3	38,0	37,6
	5	38,7	38,1	38,8	38,7	38,6	38,6	38,6	39,2
Dosis 1	1	38,4	37,9	37,3	38,0	38,1	38,1	37,8	37,6
	2	37,8	37,8	37,9	38,0	38,3	37,8	37,6	36,9
	3	38,3	37,6	37,7	37,7	38,2	38,5	38,8	38,4
	4	37,9	37,9	37,6	38,0	37,1	38,4	37,6	37,3
	5	37,9	38,1	37,9	38,0	38,7	38,8	38,6	38,0
Dosis 2	1	37,3	37,6	37,6	37,7	38,5	38,4	38,2	37,2
	2	38,4	37,4	38,3	38,2	38,1	38,4	38,2	37,0
	3	37,6	37,8	38,1	38,2	38,4	39,1	38,0	38,0
	4	38,6	38,0	37,8	38,1	38,4	38,3	38,6	38,2
	5	37,8	38,2	38,4	38,1	38,4	38,1	37,1	38,1
Dosis 3	1	38,3	37,5	37,8	37,6	38,3	38,3	38,6	38,8
	2	37,6	38,3	37,9	38,0	38,3	38,1	37,7	37,7
	3	37,9	37,9	38,9	38,9	39,1	39,1	38,7	38,8
	4	38,0	38,0	38,1	38,4	38,1	38,3	37,9	38,1
	5	37,8	38,0	38,4	38,3	38,9	38,3	37,4	38,6

Keterangan: U_1 = Pengukuran suhu awal rektal, U_2 = pengukuran suhu rektal 5 menit sebelum perlakuan (2 jam setelah penyuntikan DPT 0,2 cc i.m.)

Tabel 2. Levene's Test of Equality of Error Variance.

F	df1	df2	Sig.
1,687	23	96	0,042

Tabel 3. Tests of between-subjects effect.

Variabel independen	Sig.
Kelompok	0,034
Waktu	0,005
Kelompok dan waktu	0,853

Tabel 4. Multiple comparisons pada variabel independen dari masing-masing kelompok dosis.

Kelompok (I)	Kelompok (J)	Mean Difference (I-J)	Sig.
Akuades	Dosis 1	0,207	0,403
	Dosis 2	0,057	0,974
	Dosis 3	-0,150	0,670
Dosis 1	Akuades	-0,207	0,403
	Dosis 2	-0,150	0,670
	Dosis 3	-0,357*	0,037
Dosis 2	Akuades	-0,057	0,974
	Dosis 1	-0,150	0,670
	Dosis 3	-0,207	0,403
Dosis 3	Akuades	0,150	0,670
	Dosis 1	0,357*	0,037
	Dosis 2	0,207	0,403

Tabel 5. Multiple comparisons pada variabel independen waktu.

Waktu (I)	Waktu (J)	Mean Difference (I-J)	Sig.
Menit ke-30	Menit ke-60	-0,045	1,000
	Menit ke-90	-0,255	0,700
	Menit ke-120	-0,375	0,271
	Menit ke-150	-0,050	1,000
	Menit ke-180	0,185	0,902
Menit ke-60	Menit ke-30	0,045	1,000
	Menit ke-90	-0,210	0,843
	Menit ke-120	-0,330	0,419
	Menit ke-150	-0,005	1,000
	Menit ke-180	0,230	0,984
Menit ke-90	Menit ke-30	0,255	0,700
	Menit ke-60	0,210	0,843
	Menit ke-120	-0,120	0,984
	Menit ke-150	0,205	0,856
	Menit ke-180	0,440	0,123
Menit ke-120	Menit ke-30	0,375	0,271
	Menit ke-60	0,330	0,419
	Menit ke-90	0,120	0,984
	Menit ke-150	0,325	0,437
	Menit ke-180	0,560*	0,018
Menit ke-150	Menit ke-30	0,050	1,000
	Menit ke-60	0,005	1,000
	Menit ke-90	-0,205	0,856
	Menit ke-120	-0,325	0,437
	Menit ke-180	0,235	0,768
Menit ke-180	Menit ke-30	-0,185	0,902
	Menit ke-60	-0,230	0,784
	Menit ke-90	-0,440	0,123
	Menit ke-120	-0,560*	0,018
	Menit ke-150	-0,235	0,768

Tabel 6. Homogeneous subsets pada variabel independen dari masing-masing kelompok dosis.

Kelompok		Subset	
		1	2
Student-Newman-Keuls	Dosis 1	37,957	-
	Dosis 2	38,107	38,107
	Akuades	38,163	38,163
	Dosis 3	-	38,313
	Sig.	0,203	0,203
Scheffe	Dosis 1	37,957	-
	Dosis 2	38,107	38,107
	Akuades	38,163	38,163
	Dosis 3	-	38,313
	Sig.	0,403	0,403

Tabel 7. Homogeneous subsets pada faktor independen waktu.

Kelompok		Subset	
		1	2
Student-Newman-Keuls	Menit ke-180	37,860	-
	Menit ke-30	38,045	38,045
	Menit ke-60	38,090	38,090
	Menit ke-150	38,095	38,095
	Menit ke-90	-	38,300
	Menit ke-120	-	38,420
	Sig.	0,386	0,089
Scheffe	Menit ke-180	37,860	-
	Menit ke-30	38,045	38,045
	Menit ke-60	38,090	38,090
	Menit ke-150	38,095	38,095
	Menit ke-90	38,300	38,300
	Menit ke-120	-	38,420
	Sig.	0,123	0,271

Post Hoc Tests

Post Hoc Test dilakukan setelah uji Anova jika hasil uji Anova menunjukkan bahwa variabel independen (kelompok dan waktu) berpengaruh signifikan terhadap variabel dependen (suhu rektal tikus). Fungsi utama *Post Hoc Test* adalah untuk menentukan kelompok dan waktu yang terbaik berdasarkan kriteria tertentu.

Hasil uji Anova menunjukkan bahwa kelompok maupun waktu berpengaruh signifikan terhadap suhu rektal tikus. Artinya, rata-rata suhu rektal tikus berdasarkan kelompok berbeda secara nyata untuk tiap-tiap kelompok.

Hasil pengukuran suhu rektal tikus berdasarkan waktu juga memberikan hasil yang berbeda secara nyata untuk tiap-tiap waktu pengukuran. Oleh karena kedua variabel independen memberikan pengaruh yang signifikan terhadap variabel dependen (suhu rektal tikus) maka dapat ditentukan kelompok dan waktu yang terbaik.

Hasil uji *Post Hoc Tests* dapat dijelaskan sebagai berikut:

Multiple Comparisons

Tabel *Multiple Comparisons* dapat menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan atau tidak

signifikan antar kelompok uji yang ditunjukkan dengan tanda bintang (*) pada angka *Mean Difference* pada kelompok uji yang memiliki perbedaan signifikan. Hasil pada tabel *Multiple Comparisons* dari variabel independen kelompok dosis (Tabel 4) menunjukkan bahwa rata-rata suhu berbeda secara signifikan antara dosis 1 dengan dosis 3. Hal ini terlihat dari tanda bintang (*) yang terdapat pada kolom *Mean Difference* atau nilai signifikansi yang bernilai $<0,05$. Dosis 3 memberikan rata-rata suhu yang lebih tinggi dari dosis 1 dengan selisih sebesar $0,357^{\circ}\text{C}$.

Hasil pada tabel *Multiple Comparisons* dari variabel independen kelompok waktu (Tabel 5) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara menit ke-120 dengan menit ke-180. Menit ke-120 memberikan rata-rata suhu yang lebih tinggi dari menit ke-180 dengan selisih suhu $0,560^{\circ}\text{C}$.

Homogeneous Subsets

Tabel *Homogeneous Subsets* mengelompokkan populasi yang memiliki nilai rata-rata suhu yang tidak berbeda secara signifikan ke dalam satu kolom/subsets. Tabel *Homogeneous Subsets* dari variabel independen kelompok dosis (Tabel 6) menunjukkan bahwa hanya pada kelompok dosis 1 dan 3 yang terpisah dalam kolom/subsets yang berbeda. Hal ini berarti bahwa hanya kelompok dosis 1 dan 3 yang memiliki perbedaan rata-rata suhu secara signifikan. Suhu terendah dicapai pada kelompok dosis 1.

Tabel *Homogeneous Subsets* dari variabel independen waktu (Tabel 7) menunjukkan bahwa untuk variabel waktu terdapat perbedaan yang signifikan antara menit ke-120 dengan menit ke-180. Suhu terendah dapat dicapai pada menit ke-180.

Pembahasan

Berdasarkan hasil analisis data yang diperoleh, terdapat beberapa asumsi yang dapat dikemukakan, antara lain bahwa dengan menggunakan uji *Univariate Analysis of Variance* yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Tests* ternyata hipotesis dapat diterima. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun kemangi memiliki efek antipiretik terhadap tikus putih dan perbedaan dosis ekstrak daun kemangi menyebabkan adanya perbedaan efektivitas sebagai antipiretik pada tikus putih. Dengan menggunakan uji *Univariate Analysis of Variance* yang dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* dapat ditentukan kelompok dosis ekstrak daun kemangi dan waktu yang dibutuhkan untuk mampu menurunkan panas secara optimal.

Hasil analisis yang ditunjukkan dalam Tabel 2 menunjukkan bahwa keempat variansi populasi (akuades, dosis 1, dosis 2, dosis 3) memiliki variansi yang berbeda. Hasil ini tidak memenuhi asumsi berdasarkan *Analysis of Variance*. Namun demikian, untuk analisis selanjutnya dianggap keempat kelompok tersebut memiliki variansi yang sama.

Beberapa hasil studi empiris mengungkapkan bahwa kadar pemenuhan asumsi penelitian-penelitian yang sudah dilakukan bervariasi, mulai mendekati sempurna, sedikit menyimpang, sampai sangat menyimpang. Penyimpangan ringan dalam hal tertentu masih dapat diterima, misalnya pada uji Anova (Murti, 1996).

Hasil analisis yang ditunjukkan dalam Tabel 3 dengan menggunakan analisis satu faktor membuktikan bahwa rata-rata suhu rektal tikus putih memang berbeda secara nyata (signifikan) untuk tiap kelompok dan untuk tiap rentang waktu pengukuran suhu. Hasil penelitian menunjukkan perubahan suhu yang berbeda setelah diberikan perlakuan yang berbeda dalam tiap kelompok uji dalam rentang waktu tertentu. Setelah penyuntikan DPT, masing-masing kelompok uji diberikan 3 dosis yang berbeda yaitu dosis 1 sebesar $3,15 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$, dosis 2 sebesar $6,30 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$, dan dosis 3 sebesar $12,60 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$. Sebagai kontrol, satu kelompok uji diberikan akuades.

Hasil yang berbeda tersebut diduga disebabkan adanya efek perlakuan yang berbeda pada masing-masing kelompok. Perbedaan ini juga diduga dapat terjadi karena dipengaruhi oleh faktor individu dan faktor lingkungan, seperti makanan, diet, stres, dan kelelahan. Selain itu, faktor penyebab lainnya dapat berupa faktor patologis, yaitu faktor penyulit yang dapat meningkatkan efek obat, misalnya absorpsi yang berlebihan, kemudahan difusi, kondisi hati, serta kondisi ginjal (Lestari, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok dosis 1 sebesar $3,15 \text{ mg}/100 \text{ g BB}$ mempunyai efek yang signifikan dibandingkan kelompok dosis yang lain dalam menurunkan suhu tubuh tikus putih. Berdasarkan hasil uji *Post Hoc tests* diketahui adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok dosis 1 dengan kelompok dosis 3. Dosis III memberikan rata-rata suhu yang lebih tinggi dibanding dosis 1 dengan selisih sebesar $0,357^{\circ}\text{C}$. Hal ini dapat disimpulkan bahwa dosis 1 lebih efektif menurunkan panas tubuh dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, sedangkan dosis 3 memberikan efek paling minimal dalam menurunkan panas tubuh dibandingkan kelompok perlakuan lainnya.

Hasil penelitian juga menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara menit ke-120 dan menit ke-180. Menit ke-120 memberikan rata-rata suhu yang lebih tinggi dari menit ke-180 dengan selisih sebesar $0,560^{\circ}\text{C}$. Pada menit ke-180 terlihat suhu tubuh terendah dapat dicapai. Hal ini diduga pada waktu tersebut, ekstrak daun kemangi mencapai kadar tertinggi dalam darah sehingga dapat memberikan hasil paling optimal.

Dalam pemberian terapi yang rasional, dosis obat merupakan faktor terpenting, karena baik kekurangan atau kelebihan dosis dapat menghasilkan pengaruh yang tidak diinginkan, bahkan sering membahayakan (Lestari, 2002). Pemberian obat pada waktu yang tepat ditujukan agar efek yang diberikan optimal, efek samping minimal, dan tidak mengganggu kebiasaan penderita (Lestari, 2002).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian efek antipiretik ekstrak daun kemangi (*Ocimum sancti folium*) pada tikus putih dapat disimpulkan bahwa: (1) ekstrak daun kemangi memiliki efek antipiretik pada tikus putih, dan (2) perbedaan dosis ekstrak daun kemangi menunjukkan perbedaan efektivitas sebagai antipiretik pada tikus putih. Dosis 1 (3,15 mg/100 g BB) merupakan dosis yang paling efektif dibanding dosis yang lain untuk mencapai rata-rata suhu rektal tikus putih terendah yang dicapai pada menit ke-180.

DAFTAR PUSTAKA

- Djiantik. 1983. Peranan pengobatan tradisional pada upaya pelayanan kesehatan dalam sistem kesehatan nasional. *Pertemuan Ilmiah Pengobatan Tradisional Indonesia*. Lembaga Penelitian Pusat Penelitian Pengembangan Obat Tradisional. Surabaya: Universitas Airlangga.
- Dzulkarnain, B., Sa'roni, Pudjiastuti, dan Adjirni. 1992. Penggunaan tanaman sebagai obat di daerah Sulawesi Selatan dan Kalimantan Timur. *Buletin Penelitian Kesehatan* 20(4): 6.
- Imono, A.D. dan Nurlaila. 1986. *Obat Tradisional dan Fitoterapi Uji Toksikologi*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi, UGM.
- Lestari, H. 2001. Pemanfaatan obat tradisional dalam menangani masalah kesehatan. *Majalah Kedokteran Indonesia* 51(4): 139.
- Lestari, C.S., S. Rahayu, H. Rya, Suhardjono, Maisunah, dan S. Soewarni. 2002. *Seni Menulis Resep Teori dan Praktek*. Jakarta: PT Perca.
- Murti, B. 1996. *Penerapan Metode Statistik Non-Parametrik dalam Ilmu-ilmu Kesehatan*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama.
- Nelwan, R.H.H. 1996. Demam: Tipe dan pendekatannya. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Jilid I, Edisi 3. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran, UI.
- Ngatidjan. 1990. *Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Yogyakarta: Pusat Antar Universitas Bioteknologi, UGM.
- Pudjiastuti dan Hendarti, 1999. Penelusuran beberapa tanaman obat berkhasiat sebagai analgetik. *Media Litbang Kesehatan* 9(3): 18.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Edisi ke-6. Bandung: Penerbit ITB.
- Salma, S. dan M.H. Gani. 1985. Penanganan obat tradisional dalam rangka pemakaiannya secara medis. *Majalah Kedokteran Andalas* 9(2): 20.
- Sardjono, O.S. 1989. Penggunaan obat tradisional secara rasional. *Cermin Dunia Kedokteran* 59: 3.
- Sudibyo, S., S. Jamal, dan M.J. Herman. 1999. Peran warung dalam penyediaan obat dan obat tradisional untuk pengobatan sendiri di Kecamatan Tanjung Bintang, Lampung Selatan. *Buletin Penelitian Kesehatan* 27(2): 254-255.
- Sudibyo, S., S. Jamal, dan A.M. Loupatty. 2003. Beberapa faktor yang berhubungan dengan penggunaan obat tradisional dalam pengobatan sendiri di Indonesia. *Buletin Penelitian Kesehatan* 31(1): 25.
- Voight, R. 1994. *Buku Ajar Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Wahjoedi, B., B. Dzulkarnain, dan Z. Arifin. 1978. Pengaruh ekstrak tanaman obat asli terhadap suhu normal mencit. *Buletin Penelitian Kesehatan* 6(1): 53.
- Wahjoedi, B., B. Dzulkarnain, S. Bakar, P. Nurendah, dan Subanu. 1981. Efek antipiretik beberapa tanaman obat. *Buletin Penelitian Kesehatan* 9(2): 9.
- Wilmana, F. 1995. *Analgesik, Antipiretik, Antiinflamasi Non-steroid dan Obat Pira, Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-4. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia.
- Wohlmuth, H. 2004. *Sacred Basil, An Ayurvedic Adaptogen*. <http://www.botanicalpathways.com/issue%2011/Sacredbasel.html>.

Pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap struktur mikroanatomi hepar dan kadar serum glutamat piruvat transaminase pada tikus putih setelah pemberian CCl₄ secara oral

Effect of garlic extract (*Allium sativum*) on hepatic microanatomy structure and serum glutamate-pyruvate transaminase levels in rats after oral treatment of CCl₄

WIWIK YULIA TRISTININGRUM, MARTI HARINI, TETRI WIDIYANI

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

Diterima: 21 Januari 2005. Disetujui: 3 April 2006.

Abstract. Garlic (*Allium sativum* L.) is known to have various pharmacological activities, such as antidiabetic, antihypertensive, anti-cholesterol, anti-atherosclerosis, thrombocyte antiaggregation, initiate fibrinolysis, antiviral and antimicrobial, anticancer and antioxidant. The objectives of this research were to determine the effect of garlic extract (*Allium sativum* L.) on the microanatomy structure of liver and the serum glutamate-pyruvate transaminase (SGPT) levels in rats (*Rattus norvegicus* L.) after the oral treatment of carbon tetrachloride (CCl₄). The study was conducted by using 25 Wistar strain rat aged 2-3 months with body weight 200-250 grams divided into five groups, each group consisted of 5 rats as replicates which kept under the same conditions and treated for 28 days. The results showed that the treatment of garlic extract had an effect on the improvement of microanatomy structure of damaged liver cells in rats after oral treatment of carbon tetrachloride (CCl₄). The damage was in the form of fatty liver, pyknotic, karyorrhexis, karyolysis and central vein dilatation. The treatment of garlic extract also reduced the serum pyruvate-transaminase glutamate (SGPT) levels in rats after the oral treatment of carbon tetrachloride (CCl₄).

Keywords: *Allium sativum*, carbon tetrachloride, garlic extract, hepatic microanatomy, serum glutamate-pyruvate transaminase

PENDAHULUAN

Dalam kehidupan sehari-hari, manusia dan hewan terancam oleh paparan zat kimia berbahaya, baik secara langsung maupun tidak langsung. Penggunaan zat kimia oleh manusia saat ini tidak dapat dihindarkan, sehingga manusia harus sadar tentang bahaya yang ditimbulkan. Sebagai contoh zat kimia yang telah lama digunakan adalah karbon tetraklorida (Moslen, 2001).

Darmansyah (1995) menyebutkan karbon tetraklorida (CCl₄) merupakan pelarut organik yang bersifat toksik terhadap hepar, ginjal, dan jantung. Karbon tetraklorida (CCl₄) banyak dipakai sebagai pembersih dan pengurai yang berbahaya apabila terhirup, tertelan, atau meresap ke kulit (Meyers *et al.*, 1993). Beberapa penelitian sebelumnya telah memanfaatkan sifat hepatotoksik CCl₄ sebagai model kerusakan sel hepar untuk menguji kemampuan bahan alam, seperti ekstrak bawang merah, sebagai senyawa yang mampu memperbaiki kerusakan pada hepar (Ariyani, 2002). Hal ini disebabkan bawang merah mengandung senyawa *alliin*. Tanaman lain yang termasuk dalam Famili

Liliales adalah bawang putih (*Allium sativum* L.) yang diduga memiliki efek yang sama terhadap kerusakan sel hepar.

Sebagai tanaman obat tradisional, bawang putih mempunyai banyak manfaat. Bagian utama bawang putih yang berkhasiat sebagai obat adalah umbinya. Berbagai penelitian telah dikembangkan oleh para ilmuwan untuk mengeksplorasi potensi umbi bawang putih dan aktivitas biologisnya yang terkait dengan farmakologi, antara lain sebagai antidiabetes, antihipertensi, antikolesterol, antiathero-sklerosis, antiagregasi trombosit, pemacu fibrinolisis, antivirus, mikrobial, antikanker, dan antioksidan (Hernawan, 2002). Borek (2001) menyebutkan adanya aktivitas antioksidatif dari ekstrak umbi bawang putih, antara lain peningkatan enzim protektif yaitu superoksida dismutase, katalase, dan glutatone peroksidase pada sel endotel pembuluh darah; peningkatan sitoproteksi terhadap radikal bebas dan senyawa asing seperti *benzopyrene*, karbon tetraklorida, *acetaminophen*, *isoproterenol*, *doxorubicin*, dan *adrymiacin*; serta penghambatan peroksida pada lemak jantung, hepar, dan ginjal.

Salah satu penelitian mengenai manfaat senyawa *alliin* terhadap perbaikan kerusakan hepar dilakukan oleh Harahap dkk. (1995) yang menyimpulkan bahwa sari air bawang prei (*Allium fistulosum* L.) sebanyak 20 gr/kg BB tikus putih yang diberikan secara oral selama 8 hari ternyata mampu memberikan pengaruh protektif terhadap plasma dan hepar tikus putih yang terpapar CCl₄. Karbon tetraklorida ini dapat menyebabkan kerusakan yang akut pada hepar dan ginjal maksimum 24 sampai 48 jam setelah perlakuan. Tanda kerusakan hepar pada penelitian sudah tampak jelas sebelum timbul efek pada ginjal (Kaye *et al.*, 2000). Kelainan histologis yang terjadi meliputi degenerasi lemak pada hepar dan nekrosis pada sentrolobular (Goodman and Gilman, 1975).

Indikator terjadinya kerusakan pada hepar dapat diketahui secara biokimia dari kandungan serum glutamat piruvat transaminase (GPT). Kadar serum GPT akan meningkat apabila sel hepar mengalami kerusakan akut (Schiff and Leon 1989). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh protektif dari bawang putih yang mengandung senyawa *alliin* pada tikus putih jantan dengan mengamati struktur mikroanatomi hepar dan kadar serum glutamat piruvat transaminase.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap struktur mikroanatomi hepar dan kadar serum glutamat piruvat transaminase (GPT) tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah pemberian karbon tetraklorida (CCl₄) secara oral.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta untuk pemeliharaan dan perlakuan hewan uji, untuk pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Pusat Penelitian Obat Tradisional (PPOT) UGM, untuk penentuan kadar serum GPT dilakukan di Sub Laboratorium Pangan dan Gizi PAU UGM, untuk pemotretan preparat dilakukan di Laboratorium Anatomi, Fakultas Biologi UGM, dan untuk pengamatan preparat dilakukan di Sub Laboratorium Biologi, Laboratorium Pusat FMIPA UNS dari Desember 2004 hingga April 2005.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: (1) hewan uji, terdiri dari 25 tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* L.) strain Wistar umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram, ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) sebagai bahan hepatoprotektor, dan karbon tetraklorida (CCl₄) sebagai hepatotoksikan; (2) bahan untuk pembuatan preparat histologis metode parafin, terdiri dari formalin 10%, *xylol*, alkohol, parafin, *Hematoxylin-Eosin* (HE), *Meyers albumin*, *canada balsam*, kloroform, akuades, dan kertas saring; (3) pakan hewan uji, meliputi akuades dan *pellet*; serta

(4) bahan untuk pembuatan ekstrak bawang putih, yaitu etanol, asam asetat 10%, NH₄OH, dan reagen GPT (Merck) sebagai pelarut dalam penentuan kadar serum GPT pada hewan uji.

Sementara itu, alat yang digunakan terdiri dari: 1) kandang untuk aklimatisasi hewan uji; 2) alat untuk pembuatan ekstrak bawang putih, yaitu blender, tabung reaksi, *rotary evaporator*, *vacuum Bachman*, lemari pendingin, timbangan, kertas label, dan botol kaca; 3) alat untuk pembedahan, yaitu spuit injeksi, skalpel, dan alat bedah (*dissecting kit*); 4) alat untuk pembuatan preparat, yaitu spuit injeksi, skalpel, alat bedah (*dissecting kit*), mikrotom, gelas benda, gelas penutup, pipet, *hotplate*, kuas, botol flakon, *staining jar*, pinset, dan kertas label; 5) alat untuk penentuan kadar serum GPT, yaitu jarum *tuberculin*, tabung *eppendorf*, spektrofotometer vitalab mikro (*double beam Shimadzu*) dan sentrifus; serta 6) alat untuk pengamatan preparat, yaitu mikroskop cahaya, mikromilimeter, dan kamera.

Cara Kerja

Aklimatisasi tikus putih

Sebelum diberi perlakuan, tikus putih jantan diaklimatisasi dalam lingkungan laboratorium selama satu minggu dengan tujuan untuk beradaptasi terhadap lingkungan baru dan perlakuan yang akan diberikan. Makanan berupa *pellet* dan minuman diberikan secara teratur setiap pagi dan sore hari.

Persiapan bahan uji

Senyawa CCl₄ dipilih sebagai model kerusakan pada hepar tikus putih yang diberikan dalam bentuk cair sehingga tidak memerlukan pengenceran dengan senyawa lain. Loomis (1978) mengatakan bahwa penentuan dosis oral untuk semua kelompok perlakuan sebesar 3,6 ml/kg BB tikus. Dosis yang digunakan pada penelitian ini sebesar 40% dari LD50 yaitu 0,2 ml/200 gr BB.

Bawang putih diekstraksi menurut metode Harborne (1987) yaitu dengan cara bawang putih yang telah dibuat serbuk dan dikering angin, diekstraksi dengan asam asetat 10% dalam etanol, kemudian diendapkan selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh selanjutnya dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan tekanan vakum. Ekstrak yang dihasilkan disimpan dalam lemari pendingin agar diperoleh berat konstan, lalu ekstrak ditimbang sehingga didapatkan berat ekstrak. Selanjutnya, ekstrak diencerkan dengan akuades dalam 20% berat per volume sesuai dengan dosis yang digunakan.

Perlakuan

Penelitian dilakukan dengan menggunakan 25 ekor tikus putih strain Wistar usia 2-3 bulan dengan berat badan 200-250 gram yang dibagi dalam lima kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor sebagai ulangan, dipelihara dalam kondisi yang sama dan diperlakukan selama 28 hari. Semua tikus putih diberikan diet standar yang sama.

Pembagian kelompok perlakuan sebagai berikut: (1) kelompok I = diberi akuades 1 ml selama 28 hari; (2) kelompok II = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1 ml akuades selama 14 hari; (3) kelompok III = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,35 ml/200 gr BB ekstrak bawang putih selama 14 hari; (4) kelompok IV = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,5 ml/200 gr BB ekstrak bawang putih selama 14 hari; (5) kelompok V = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,65 ml/200 gr BB ekstrak bawang putih selama 14 hari.

Penentuan dosis untuk masing-masing perlakuan ditetapkan berdasarkan atas rata-rata berat badan hewan uji. Thomas (2000) menyatakan bahwa dosis minimal umbi bawang putih untuk manusia sebesar 15 gram, sehingga konversi perhitungan dosis sebesar 0,018. Dengan demikian, dosis untuk tikus putih adalah 0,27 gr/200 gr BB. Ekstrak dibuat dalam konsentrasi 20% b/v yang artinya mengandung 20 gr ekstrak per 100 ml akuades. Untuk 1 ml ekstrak mengandung 200 mg, sehingga pada dosis 270 mg/200 gr BB digunakan 1,35 ml/200 gr BB.

Pada hari ke-0, ke-15, dan ke-29, darah diambil melalui sinus orbital sebanyak 1 ml/ekor dan dimasukkan ke tabung mikrokapiler untuk penetapan kadar serum GPT. Darah kemudian disentrifus untuk diambil serumnya. Kadar serum GPT diukur berdasarkan metode Reitman dan Frankel (1967). Pengukuran dilakukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 340 nm. Pada hari ke-29, hewan uji dikorbankan, diambil heparnya, dan dibuat preparat histologis dengan metode parafin dan pewarnaan HE.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancang Acak Lengkap (RAL) dengan 5 taraf perlakuan dosis ekstrak umbi bawang putih dan masing-masing dilakukan dalam 5 kali ulangan. Pengambilan sampel serum GPT dilakukan pada hari ke-0, ke-15, dan ke-29.

Analisis Data

Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif yaitu berupa struktur mikroanatomi hepar. Sunityoso dkk. (1998) menyatakan persentase kerusakan sel hepar dapat diamati dengan menggunakan 3 kategori berdasarkan tingkat degenerasi hepar yang dilihat dari beberapa bidang pandang, yaitu: A = degenerasi <20%, B = degenerasi sebesar 20-40%, C = degenerasi >40%.

Sementara itu, data kuantitatif meliputi diameter vena sentralis dan rata-rata kadar serum GPT yang kemudian dianalisis menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dan dilanjutkan dengan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Struktur Mikroanatomi Hepar

Banyak penelitian dilakukan untuk mengetahui penyebab terjadinya kerusakan pada sel, terutama sel hepar, dan banyak juga penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi zat ataupun senyawa yang dapat berperan dalam proses regenerasi sel. Salah satu penyebab terjadinya kerusakan pada sel adalah adanya senyawa asing atau zat toksik. Jika suatu senyawa asing atau zat toksik diberikan pada suatu sel maka pengaruh pertama yang terjadi adalah kerusakan biokimiawi. Sel dapat atau tidak menunjukkan kelainan fungsi. Apabila terjadi kerusakan, sel memiliki cadangan yang cukup untuk bekerja tanpa mengalami gangguan fungsi yang berarti. Pengamatan terhadap struktur mikroanatomi penting dilakukan untuk mengamati perubahan-perubahan yang terjadi.

Pada penelitian ini dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh senyawa toksik karbon tetraklorida (CCl_4) terhadap struktur mikroanatomi hepar, yang kemudian dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis yang bervariasi. Dari hasil penelitian secara menyeluruh terhadap preparat histologi hepar, masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan. Hal ini disebabkan adanya perbedaan perlakuan pada masing-masing kelompok. Kelompok I adalah kelompok kontrol. Pada kelompok ini, hewan uji hanya diberi 1 ml akuades selama 28 hari tanpa perlakuan apapun. Kelompok II adalah kelompok hewan uji yang diberi perlakuan 0,2 ml karbon tetraklorida (CCl_4) selama 14 hari dan dilanjutkan 1 ml akuades selama 14 hari. Kelompok III adalah kelompok hewan uji yang diberi perlakuan 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,35 ml ekstrak bawang putih (EBP) selama 14 hari. Kelompok IV adalah kelompok hewan uji yang diberi perlakuan 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan dengan 1,5 ml EBP selama 14 hari. Adapun kelompok V adalah kelompok hewan uji yang diberi perlakuan 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,65 ml EBP selama 14 hari.

Untuk memudahkan pengamatan digunakan persentase degenerasi sel hepar dengan 3 kategori yang dilihat dari beberapa bidang pandang (Sunityoso dkk., 1998). Jumlah persentase tingkat degenerasi sel hepar dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari hasil penelitian yang disajikan pada Tabel 1 dapat diketahui bahwa kelompok I (kontrol), kelompok IV, dan kelompok V termasuk ke dalam kategori A yang berarti memiliki tingkat degenerasi kurang dari 20%, sedangkan kelompok II dan kelompok III termasuk ke dalam kategori C yang berarti memiliki tingkat degenerasi lebih dari 40%. Pengamatan dilakukan dengan membandingkan seluruh preparat mikroskopis satu dengan yang lain dalam beberapa bidang pandang. Parameter tingkat degenerasi yang diamati meliputi vena sentralis, sinusoid, degenerasi hidropik, degenerasi lemak, inti piknotik, karioreksis, dan kariolisis.

Hasil pengamatan secara menyeluruh terhadap preparat histologis hepar pada kelompok I sebagai kelompok kontrol memperlihatkan gambaran normal sel hepar (Gambar 1), yang menunjukkan bahwa kelompok I termasuk ke dalam kategori A. Setiap lobulus tersusun dari hepatosit dengan nukleus terpulas merah tua serta memiliki kromatin tersebar, jelas, dan menyerap kuat zat warna. Sel hepar tampak tersusun radier dalam lobulus. Lempeng sel beranastomosis bebas dan memiliki batas antar sel yang jelas. Sel hepar memiliki inti satu atau lebih yang dijumpai pada lempeng sel. Pada Gambar 1 terlihat nukleus hepatosit yang berinti dua. Sinusoid berisi darah yang bercampur dari vena porta dan arteri hepatis. Sel pembatas sinusoid sekurang-kurangnya terdiri dari tiga tipe sel, yaitu sel endotel, sel Kupffer, dan sel penimbun lemak (sel Ito). Pada Gambar 6 terlihat sel endotel. Sel endotel mempunyai inti kecil, memanjang, dan berwarna gelap dengan sitoplasma yang sangat tipis.

Hasil pengamatan secara mikroskopis terhadap kelompok II memperlihatkan kerusakan sel yang paling tinggi di antara kelompok perlakuan yang lain (Gambar 2). Pada kelompok II, hewan uji hanya diberi senyawa toksik CCl_4 selama 28 hari. Pemberian karbon tetraklorida menyebabkan terjadinya akumulasi zat toksik di dalam sel hepar dan menyebabkan terjadinya kematian sel pada sel hepar tikus. Jika suatu sel terkena paparan senyawa toksik secara terus-menerus maka sel tersebut akan mencapai suatu titik dimana sel tersebut tidak dapat melangsungkan metabolisme yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Pada Gambar 2 dijumpai banyak nukleus yang mati, perubahan ini dikenal sebagai nekrosis. Nukleus yang mati biasanya menyusut, batas sel yang tidak teratur, kromatin mengumpul sebagai globulus tunggal, dan inti tampak terpulas gelap. Proses ini dinamakan piknosis dan intinya disebut piknotik. Pada bagian lain juga terlihat kondisi sel yang intinya hancur yang diikuti dengan menyebarnya kromatin di dalam sel, kondisi ini disebut karioreksis. Akhirnya pada beberapa kondisi, nukleus yang mati kehilangan kemampuan untuk diwarnai dan menghilang (tidak tampak jelas), kondisi ini disebut kariolisis. Terjadinya dilatasi sinusoid disebabkan struktur hepatosit yang mengalami perubahan. Degenerasi sel dan nekrosis menyebabkan perubahan susunan sel, karena sel yang tidak mampu kembali ke kondisi semula menyebabkan terbentuknya ruang kosong sehingga sinusoid melebar. Pada preparat kelompok II, banyak dijumpai inti yang piknosis, karioreksis, dan kariolisis, sehingga termasuk ke dalam tingkat degenerasi sel hepar kategori C.

Pengamatan mikroskopis terhadap preparat kelompok III (Gambar 3) memperlihatkan adanya kerusakan sel yang cukup berarti. Pada kelompok III, hewan uji diberikan senyawa toksik CCl_4 0,2 ml selama 14 hari yang dilanjutkan dengan pemberian 1,35 ml/200 gr BB ekstrak bawang putih selama 14 hari. Pada sediaan kelompok III, sel hepar jelas terlihat mengalami degenerasi akibat pemberian

senyawa toksik CCl_4 0,2 ml selama 14 hari. Pada kelompok tersebut ditemukan adanya sel piknotik, karioreksis, dan kariolisis pada semua preparat meskipun lebih sedikit dibandingkan pada kelompok II. Pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis 1,35 ml/200 gr BB selama 14 hari berpengaruh terhadap sel hepar yang telah dirusak oleh CCl_4 . Senyawa toksik CCl_4 tidak menyebabkan degenerasi yang berakibat pada terhentinya proses fisiologis dalam sel hepar. Secara umum, seluruh preparat kelompok III memperlihatkan gambaran sel hepar yang telah mengalami sedikit regenerasi, hal ini ditandai oleh adanya sel-sel yang sedang mengalami mitosis. Senyawa organo-sulfur *alliin* yang terkandung di dalam ekstrak bawang putih turut berperan dalam perbaikan sel hepar yang rusak, sehingga tingkat degenerasi sel hepar dikelompokkan ke dalam kategori C.

Tabel 1. Rata-rata persentase tingkat degenerasi sel hepar tikus setelah pemberian CCl_4 yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis bervariasi.

Perlakuan	Kategori	Keterangan
Kelompok I	A	Kerusakan <20%
Kelompok II	C	Kerusakan >40%
Kelompok III	C	Kerusakan >40%
Kelompok IV	A	Kerusakan <20%
Kelompok V	A	Kerusakan <20%

Keterangan: I = Kelompok kontrol diberi 1 ml akuades setiap hari selama 28 hari, II = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari yang dilanjutkan 1 ml akuades selama 14 hari, III = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari yang dilanjutkan 1,35 EBP selama 14 hari, IV = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari yang dilanjutkan 1,5 ml EBP selama 14 hari, V = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari yang dilanjutkan 1,65 ml EBP selama 14 hari.

Tabel 2. Rata-rata diameter vena sentralis sel hepar tikus setelah pemberian CCl_4 yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bawang putih.

Kelompok Perlakuan	Diameter Vena Sentralis (mm)
Kelompok I	27,0±4,47 ^a
Kelompok II	90,0±6,12 ^e
Kelompok III	73,0±2,74 ^d
Kelompok IV	48,0±5,70 ^c
Kelompok V	36,0±4,18 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Kelompok I-V sama dengan Table 1.

Tabel 3. Rata-rata kadar serum GPT tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) setelah pemberian CCl_4 yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bawang putih.

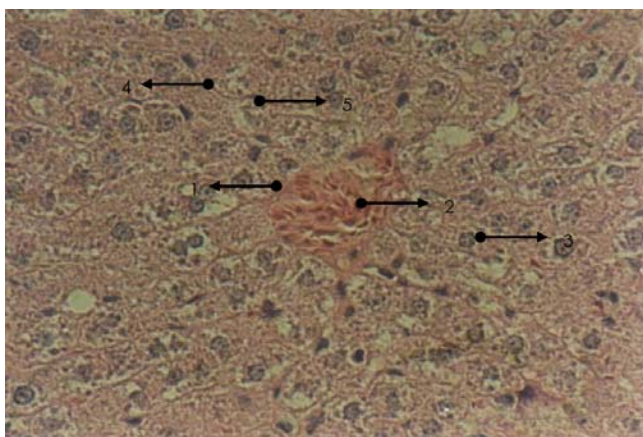
Perlakuan	Kadar Serum GPT (IU/Liter)		
	Hari ke-0	Hari ke-15	Hari ke-29
Kelompok I	22,530	22,642	22,668
Kelompok II	23,012	26,456	26,438
Kelompok III	22,828	26,620	24,662
Kelompok IV	22,774	26,488	23,068
Kelompok V	22,892	26,780	22,450

Keterangan: Kelompok I-V sama dengan Table 1.

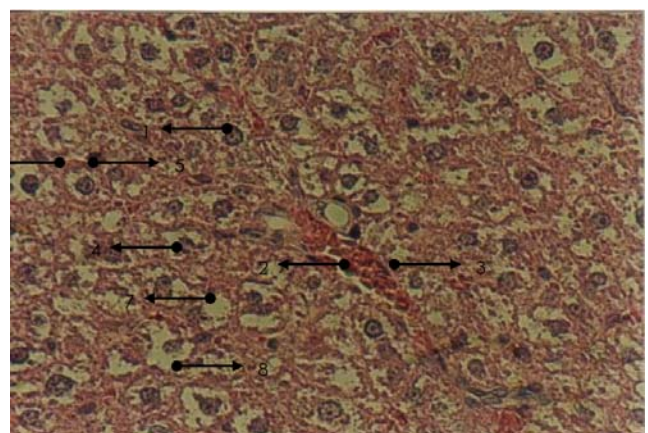
Hasil pengamatan mikroskopis terhadap preparat kelompok IV (Gambar 4) memperlihatkan adanya kerusakan sel yang cukup berarti, namun disertai adanya gambaran sel yang telah mengalami regenerasi, hal ini ditandai dengan lebih banyak ditemukan sel-sel yang mengalami mitosis. Pada kelompok IV, hewan uji diberikan senyawa toksik CCl_4 0,2 ml selama 14 hari dan dilanjutkan dengan pemberian 1,5 ml/200 gr BB selama 14 hari. Pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis yang lebih banyak dari kelompok III selama 14 hari memberikan pengaruh yang cukup signifikan terhadap regenerasi sel-sel hepar. Pada seluruh preparat kelompok IV masih terlihat adanya inti piknotik dan karioreksis meskipun jumlahnya lebih sedikit dibandingkan pada kelompok III. Dengan demikian, hasil pengamatan tersebut dapat dikelompokkan ke dalam tingkat degenerasi sel-sel

hepar kategori A.

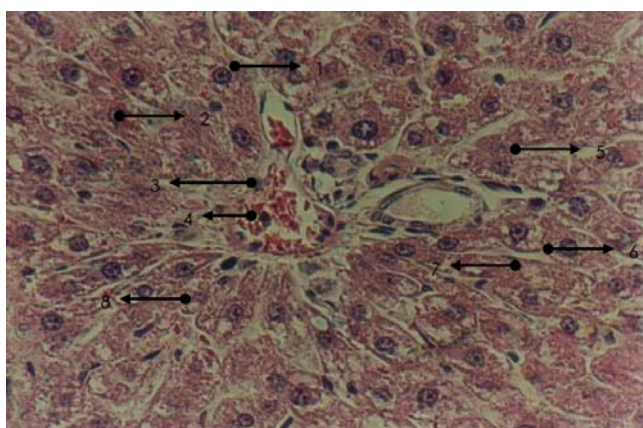
Hasil pengamatan mikroskopis pada preparat kelompok V memperlihatkan kondisi sel hepar yang mendekati kondisi normal (Gambar 5). Pada kelompok V, hewan uji diberikan senyawa toksik CCl_4 0,2 ml selama 14 hari yang dilanjutkan dengan pemberian 1,65 ml/200 gr BB ekstrak bawang putih selama 14 hari. Pemberian dosis ekstrak bawang putih yang lebih banyak dibandingkan kelompok IV juga memberikan regenerasi yang signifikan, hal ini ditandai oleh banyaknya gambaran nukleus hepatosit yang normal. Akibat pemberian senyawa toksik karbon tetraklorida masih terlihat pada beberapa bagian sel hepar. Dengan demikian, kondisi ini dapat dikelompokkan ke dalam degenerasi sel hepar kategori A.



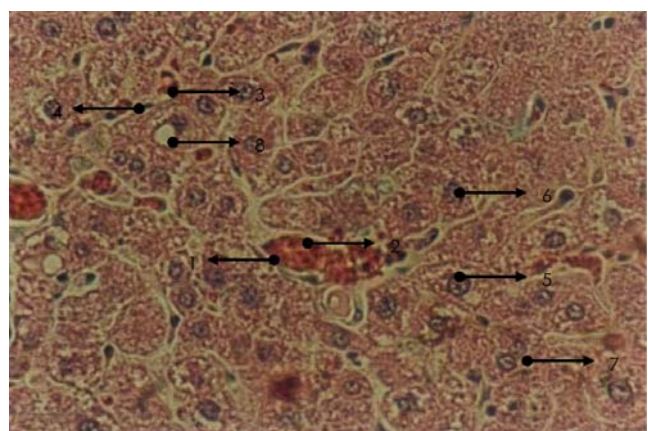
Gambar 1. Struktur mikroskopis jaringan hepar tikus pada kelompok kontrol yang diberi akuades selama 28 hari dengan perbesaran 400x dan pewarnaan HE. 1 = Vena sentralis, 2 = eritrosit, 3 = nukleus hepatosit, 4 = sinusoid, 5 = sel endotel.



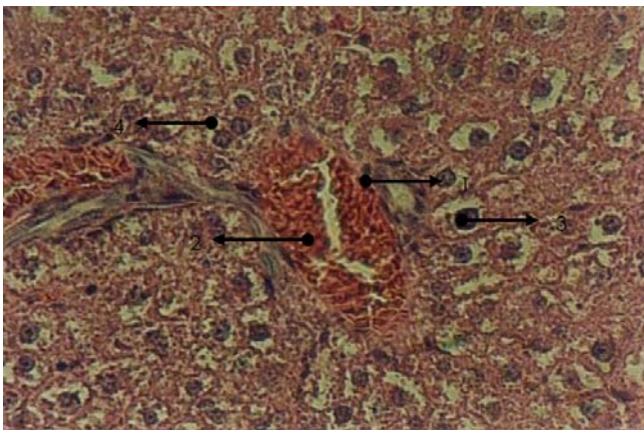
Gambar 3. Struktur mikroskopis jaringan hepar pada kelompok III yang diberi CCl_4 0,2 ml selama 14 hari dan dilanjutkan 1,35 ml EBP selama 14 hari dengan perbesaran 400x dan pewarnaan HE. 1 = Nukleus hepatosit, 2 = piknosis, 3 = vena sentralis, 4 = eritrosit, 5 = karioreksis, 6 = sinusoid, 7 = sel endotel, 8 = kariolisis.



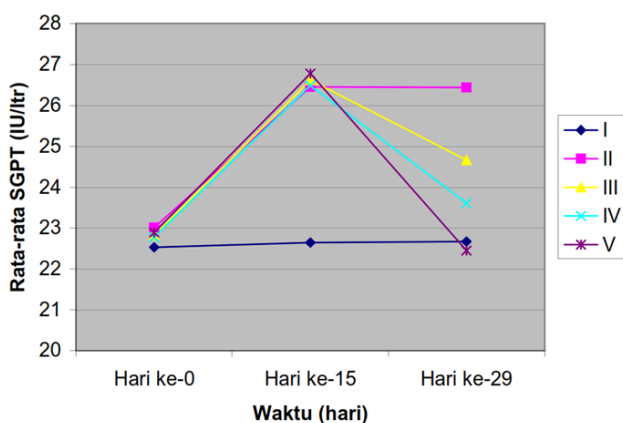
Gambar 2. Struktur mikroskopis jaringan hepar pada kelompok II yang diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1 ml akuades selama 14 hari dengan perbesaran 400x dan pewarnaan HE. 1 = Nukleus hepatosit, 2 = piknosis, 3 = vena sentralis, 4 = eritrosit, 5 = karioreksis, 6 = sinusoid, 7 = sel endotel, 8 = kariolisis.



Gambar 4. Struktur mikroskopis jaringan hepar pada kelompok IV yang diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,5 ml EBP selama 14 hari dengan perbesaran 400x dan pewarnaan HE. 1 = Nukleus hepatosit, 2 = piknosis, 3 = vena sentralis, 4 = eritrosit, 5 = karioreksis, 6 = sinusoid, 7 = sel endotel, 8 = kariolisis.



Gambar 5. Struktur mikroskopis jaringan hepar pada kelompok V yang diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan 1,65 ml EBP selama 14 hari dengan perbesaran 400x dan pewarnaan HE. 1 = Cabang vena porta, 2 = eritrosit, 3 = nukleus, 4 = sel mitosis.



Gambar 6. Rata-rata kadar SGPT tikus (*Rattus norvegicus* L.) setelah pemberian CCl_4 yang dilanjutkan dengan pemberian ekstrak bawang putih (EBP). I = Kelompok kontrol yang diberi 1 ml akuades setiap hari selama 28 hari, II = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan dengan 1 ml akuades selama 14 hari, III = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan dengan 1,35 ml EBP selama 14 hari, IV = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan dengan 1,5 ml EBP selama 14 hari, V = diberi 0,2 ml CCl_4 selama 14 hari dan dilanjutkan dengan 1,65 ml EBP selama 14 hari.

Vena Sentralis

Vena sentralis merupakan tempat berkumpulnya darah yang telah diproses dalam lobulus hepar. Darah yang masuk ke vena sentralis berasal dari sinusoid. Dari vena sentralis, darah akan mengalir ke pembuluh yang lebih besar yaitu vena hepatika. Dari vena hepatika, darah akan mengalir menuju ke vena kava inferior (Handoko, 2003).

Dari hasil pengamatan pada Tabel 2 menunjukkan adanya beda nyata antar kelompok perlakuan. Dari hasil uji ANOVA untuk pengamatan diameter vena sentralis, secara umum diketahui

adanya perbedaan yang sangat nyata antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Terjadinya dilatasi diameter vena sentralis disebabkan oleh sinusoid yang juga mengalami dilatasi. Pada preparat kelompok II terlihat banyak sinusoid yang membesar. Sel endotel terlihat jelas.

Serum Glutamat Piruvat Transaminase (GPT)

Transaminase adalah sekelompok enzim transferase yang merupakan katalisator dalam proses pemindahan gugus amino dari suatu asam α -amino ke asam α -keto. Terdapat dua transaminase yang sering digunakan dalam menentukan adanya kerusakan hepar, yaitu serum glutamat oksaloasetat transaminase (SGOT) dan serum glutamat piruvat transaminase (SGPT). Enzim GOT terdapat dalam sel-sel organ tubuh, terbanyak pada otot jantung, otot tubuh, sel-sel hepar, ginjal, dan pankreas, sedangkan GPT banyak terdapat dalam sel-sel tubuh, terutama sel-sel hati. Kenaikan kadar transaminase dalam serum antara lain disebabkan oleh sel-sel yang kaya akan transaminase mengalami nekrosis atau hancur. Enzim-enzim tersebut selanjutnya masuk dalam peredaran darah (Husadha, 1996).

Pada penelitian ini digunakan senyawa karbon tetraklorida yang merupakan zat toksik dan ekstrak bawang putih dalam dosis yang bervariasi untuk mengetahui adanya perbaikan pada sel-sel hepar setelah pemberian karbon tetraklorida. Dari hasil penelitian diketahui bahwa pemberian ekstrak bawang putih dapat menurunkan kadar serum glutamat piruvat transaminase (SGPT) darah tikus uji yang dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 6.

Dari Gambar 6 terlihat bahwa pada hari ke-0, seluruh kelompok hewan uji mempunyai nilai rata-rata kadar SGPT yang sama, yaitu sebesar 22,8 IU/liter. Pengambilan data SGPT dilakukan pertama kali pada hari ke-0 dengan asumsi sebagai kadar pembandingan awal hewan uji sebelum diberikan perlakuan. Hal ini diduga belum adanya perlakuan yang diberikan pada masing-masing kelompok.

Pengambilan data kedua dilakukan pada hari ke-15 untuk mengetahui pengaruh pemberian senyawa toksik CCl_4 yang diberikan selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan kadar SGPT dari seluruh kelompok hewan uji mengalami peningkatan yang tajam, kecuali pada kelompok I yang relatif konstan. Peningkatan tersebut mencapai nilai yang sama yaitu sebesar 26,5 IU/liter pada semua perlakuan. Dengan rata-rata nilai kadar SGPT sebesar 25,7972 IU/liter mengindikasikan terjadinya kerusakan pada hepar.

Selanjutnya, pada hari terakhir atau ke-29 dilakukan pengambilan data kembali. Tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bawang putih yang diberikan selama 14 hari setelah pemberian senyawa toksik karbon tetraklorida selama 14 hari. Data hasil penelitian menunjukkan kadar SGPT mengalami penurunan pada kelompok III, IV, dan V meskipun dengan nilai yang bervariasi. Pada kelompok III, rata-rata nilai kadar SGPT sebesar 24,662 IU/liter. Pada kelompok

IV, rata-rata nilai kadar SGPT sebesar 23,608 IU/liter. Pada kelompok V, rata-rata nilai kadar SGPT sebesar 22,45 IU/liter. Hal ini disebabkan oleh pengaruh pemberian ekstrak bawang putih dengan dosis yang bertingkat. Senyawa *alliin* yang terkandung di dalam ekstrak bawang putih berperan dalam perbaikan sel-sel hepar yang rusak akibat pemberian karbon tetraklorida. Sementara itu, pada kelompok II, rata-rata nilai kadar SGPT tidak mengalami penurunan yang berarti, yaitu sebesar 26,438 IU/liter dari sebelumnya 26,456 IU/liter, sehingga tidak terjadi perbaikan sel hepar.

Serum transaminase adalah indikator yang peka terhadap kerusakan sel-sel hepar. SGOT merupakan enzim sitosolik, sedangkan SGPT merupakan enzim mikrosomal. Kenaikan enzim-enzim tersebut meliputi kerusakan sel-sel hepar akibat virus, obat-obatan, atau toksin yang menyebabkan hepatitis, karsinoma metastatik, kegagalan jantung, dan penyakit hepar granulomatus atau disebabkan oleh alkohol. Kenaikan kembali atau bertahannya nilai aktivitas transaminase yang tinggi biasanya menunjukkan berkembangnya kelainan dan nekrosis hepar. Oleh karena itu, perlu adanya pemeriksaan secara berkelanjutan untuk mengevaluasi proses kerusakan hepar.

KESIMPULAN

Pemberian ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) berpengaruh terhadap perbaikan struktur mikroanatomi sel-sel hepar tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) yang rusak setelah pemberian karbon tetraklorida (CCl₄) secara oral. Kerusakan tersebut berupa perlemakan hepar, piknotik, karioreksis, kariolisis, dan dilatasi vena sentralis. Pemberian ekstrak bawang putih juga berpengaruh dalam menurunkan kadar serum glutamat piruvat transaminase (SGPT) pada tikus putih setelah pemberian karbon tetraklorida (CCl₄) secara oral.

DAFTAR PUSTAKA

Ariyani, A.D. 2002. *Pengaruh Pemberian Sari Bawang Merah (Allium ascalonicum L.) terhadap*

- Hepatotoksisitas Karbon Tetraklorida pada Tikus Putih*. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Kedokteran UNS.
- Borek, B. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutritional* 22(3166): 1010-1015.
- Darmansyah, I. 1995. *Dasar Toksikologi*. Edisi keempat. Jakarta: Penerbit Gaya Baru.
- Goodman, L.S. dan A. Gilman. 1975. *The Pharmacology Basic of Therapeutics*. New York: Mac Milan Publishing.
- Handoko, S.I. 2003. *Organ Hati*. www.klinikku.com/pustaka-/dasar/hati/organ%20hati-histologi.html.
- Harahap, I.P., M. Sadikin, Sunarti, dan Azizahwati. 1995. Bawang prei (*Allium fistulosum* L.) dan metabolisme: 8 pencegahan penurunan kandungan total senyawa – SH dalam plasma tikus keracunan CCl₄ oleh sari air bawang prei. *Majalah Kedokteran Indonesia* 45: 209-213.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Bandung: Penerbit ITB.
- Hernawan, U.E. 2002. Review bawang putih: Senyawa organo-sulfur dan aktivitas biologisnya. *Jurnal Biofarmasi* 1(1): 65-76.
- Husadha, Y. 1996. Fisiologi dan pemeriksaan biokimiawi hati. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Edisi ke-3. Jakarta: Balai Penerbit FKUI.
- Kaye, A.D., B.J. de Witt, M. Anwar, D.E. Smith, C.J. Feng, P.J. Kadawitzz, and B.D. Nossoman. 2000. Analysis of responses of garlic derivatives in the pulmonary vascular bed of the rat. *Journal Application Physiology* 89: 353-358.
- Loomis, T.A. 1978. *Toksikologi Dasar*. Alih Bahasa: Imono Argo Donatus. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Meyers, F.H., E. Jawetz, and A. Goldfien. 1993. *Toksikologi: Cara Mengatasi Berbagai Akibat Keracunan*. Jakarta: Andes Utama.
- Moslen, M.T. 2001. *Toxic Responses of The Liver*. New York: Mc Graw Hill.
- Reitman, S and S. Frankel. 1967. A colorimetric methode for the determination of Serum Glutamic Oxaloacetic and Glutamic Pyruvic Transaminase. *Jurnal of Clinical Pathology* 28: 57-63.
- Schiff, L. and W.J. Leon. 1989. *Disease of The Liver*. 2nd edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company.
- Sunityoso, S., D. Kusmana, Luthfirda, and D. Furqonita. 1998. Perubahan struktur histologik organ hati mencit (*Mus musculus* L.) yang dicekok minyak bekas gorengan. *Majalah Kedokteran Indonesia* 48(3): 115-120.
- Thomas, A.N.S. 2000. *Tanaman Obat Tradisional I*. Edisi ke-13. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.

Pengaruh ekstrak kencur (*Kaempferia galanga* L.) dan lama simpan terhadap cendawan terbawa benih dan viabilitas benih jeruk (*Citrus* sp.)

The effects of kencur (*Kaempferia galanga* L.) extract and storage period on seed borne fungi and citrus (*Citrus* sp.) seed viability

DEWI DEVY DAYUNI, WARSOKO WIRYOWIDODO, SALIM WIDONO

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

Diterima: 4 Januari 2006. Disetujui: 1 Juli 2006.

Abstract. The recalcitrant seeds need a high moisture level during in storage to prevent loss its viability. The storage at a high moisture level is a favorable condition for fungi growth and on the other hand, a low seeds moisture level will loss the seeds viability. The citrus seeds as one of recalcitrant seeds need a special condition in storage. The storage of citrus seeds by using kencur (*Kaempferia galanga* L.) extract can protect the seeds against fungi during storage and preserve its viability. The purpose of this research was to determine the best concentration of *K. galanga* extract which protects the citrus seeds against fungi as long as period storage, the kind of fungi and its percentage of infection, and the citrus seeds viability. This research was carried out in September until November in 2004 at Plant Pest and Disease Laboratory and Greenhouse of Agricultural Faculty of Sebelas Maret University. The citrus seed used was *Kepron* variety from Ponorogo. The research design was a Randomized Completely Block Design (RCBD), with the treatments: (1) included the seeds without being stored and without being given by *K. galanga* extract, (2) the seeds were stored for 2 weeks with 100%, 75%, and 50% *K. galanga* extract, (3) the seeds were stored for 4 weeks with 100%, 75%, and 50% *K. galanga* extract, (4) the seeds were stored for 6 weeks with 100%, 75%, and 50% *K. galanga* extract, and (5) the seeds were stored for 8 weeks with 100%, 75%, and 50% *K. galanga* extract. Data were analyzed by using F test with 5% and 1% significance levels. If there were real differences, it was continued to be tested by using a Duncan multiple range test with 5% significance level. The results of this research showed that *K. galanga* extract by 50% was the best concentration that protected the citrus seeds against fungi for 2 weeks of storage. The storage of citrus seeds with *K. galanga* extract more than 2 weeks decreased seeds viability. The dominant kinds of fungi that attack citrus seeds in the storage were *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp., obtained by using a *blotter test*.

Keywords: *Citrus*, *Kaempferia galanga*, seed borne fungi, seed viability, storage period

PENDAHULUAN

Buah jeruk merupakan buah yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Selain dapat dikonsumsi langsung, buahnya juga dapat dijadikan minuman penyegar serta banyak dimanfaatkan sebagai salah satu bahan suplemen tubuh. Kandungan vitamin C dalam buah jeruk sangat tinggi. Vitamin C inilah yang dimanfaatkan sebagai bahan suplemen tubuh yang bekerja menjaga keutuhan fungsi jaringan mesodermal yaitu kalogen tulang, gigi, dan pembuluh darah.

Selama ini, perbanyakan vegetatif dianggap relatif lebih menguntungkan dalam budi daya jeruk ataupun tanaman buah-buahan lainnya. Untuk menghasilkan bibit vegetatif yang baik diperlukan batang bawah dan batang atas yang juga berkualitas baik. Batang atas diperoleh dari cabang yang produktif dan sehat pada tanaman induk, sedangkan batang bawah diperoleh dari tanaman yang ditumbuhkan dari benih. Dengan harapan,

benih yang diperoleh akan tumbuh menjadi bibit yang mempunyai perakaran dalam dan kuat, sebagai salah satu syarat batang bawah (Wudianto, 2001).

Benih jeruk termasuk dalam golongan benih rekalsitran yang tidak memiliki masa dormansi dan mampu mempertahankan kadar air dalam benih tetap tinggi. Penurunan kadar air dalam benih rekalsitran ini dapat mengakibatkan benih kehilangan viabilitasnya, sehingga benih jeruk relatif sulit tumbuh jika dilakukan penyimpanan. Di sisi lain, kebutuhan batang bawah tidak hanya untuk memenuhi kebutuhan lokal saja, tetapi juga di luar daerah, baik antar pulau maupun antar negara. Biaya pengiriman bibit yang lebih besar dibandingkan pengiriman benih menjadi kendala dalam pengusaha batang bawah yang berkualitas. Salah satu upaya untuk mengatasi kendala ini, khususnya terhadap benih rekalsitran, adalah dengan melakukan penyimpanan yang baik untuk mempertahankan viabilitas benih tetap tinggi.

Menurut Sutopo (1985), kadar air yang tinggi di dalam benih dapat memperpendek umur simpan benih tersebut, tetapi hal ini tidak berlaku untuk benih jeruk (*Citrus* sp.) yang tergolong rekalsitran. Selain itu, benih dengan kadar air tinggi dapat merangsang pertumbuhan cendawan. Serangan cendawan terhadap benih dapat menyebabkan benih mengalami penurunan viabilitasnya sebelum ditanam, bahkan dapat menyebabkan benih tidak dapat lagi dikecambahkan. Oleh karena itu diperlukan pra-perlakuan benih untuk mencegah timbulnya cendawan sebelum dilakukan penyimpanan. Dalam hal ini, peranan fungisida dibutuhkan untuk melindungi benih dari gangguan cendawan.

Penggunaan fungisida kimiawi dapat bersifat toksik sehingga merusak benih. Selain itu, menurut Kardinan (2000), penggunaan fungisida kimiawi yang kurang bijaksana, sering merugikan terhadap lingkungan, beberapa kasus yang merugikan tersebut diantaranya keracunan, polusi lingkungan (kontaminasi air, tanah, udara), dan dalam jangka panjang dapat mengakibatkan kontaminasi terhadap manusia dan komponen kehidupan lainnya. Oleh karena itu, penggunaan fungisida nabati mulai diperhitungkan dengan tujuan untuk tetap melindungi benih dan tidak menimbulkan dampak negatif yang bersifat merugikan, baik terhadap benih maupun lingkungan. Salah satu bahan yang dapat dijadikan fungisida nabati adalah kencur, karena di dalamnya terkandung senyawa, seperti kurkumin dan kamper yang dapat menghambat pertumbuhan cendawan dan bakteri (Kusnaedi, 1999), serta minyak atsiri yang mampu menjaga kadar air dalam benih karena dapat menghambat penguapan air (Guenther, 1987).

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) mengetahui konsentrasi ekstrak kencur terbaik yang dapat melindungi benih jeruk dari serangan cendawan selama penyimpanan benih, (2) mengetahui lama penyimpanan benih jeruk yang telah diberi perlakuan ekstrak kencur, serta (3) mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kencur dan lama simpan terhadap jenis dan persentase infeksi cendawan terbawa benih serta viabilitas benih jeruk.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tanaman dan rumah kaca Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta yang dimulai pada bulan September sampai November 2004.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain benih jeruk, ekstrak kencur, kapas, abu gosok, aquadestilata, pasir, dan kertas buram. Sementara itu, alat-alat yang digunakan meliputi ember besar, gelas Aqua, plastik PP 3 mm, karet

gelang, parutan, saringan, petridish, pinset, oven, mikroskop, dan bak persemaian.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan 13 perlakuan dan setiap perlakuan diulang tiga kali. Masing-masing perlakuan diambil 40 benih jeruk untuk uji *blotter test* guna menentukan jenis cendawan yang menyerang benih dan diambil 60 benih jeruk untuk uji viabilitas benih. Adapun perlakuannya sebagai berikut:

- (a) P_0 = Kontrol, benih tanpa disimpan dan tanpa diberi perlakuan ekstrak kencur.
- (b) P_1 = Benih disimpan selama 2 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 100%.
- (c) P_2 = Benih disimpan selama 2 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 75%.
- (d) P_3 = Benih disimpan selama 2 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 50%.
- (e) P_4 = Benih disimpan selama 4 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 100%.
- (f) P_5 = Benih disimpan selama 4 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 75%.
- (g) P_6 = Benih disimpan selama 4 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 50%.
- (h) P_7 = Benih disimpan selama 6 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 100%.
- (i) P_8 = Benih disimpan selama 6 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 75%.
- (j) P_9 = Benih disimpan selama 6 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 50%.
- (k) P_{10} = Benih disimpan selama 8 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 100%.
- (l) P_{11} = Benih disimpan selama 8 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 75%.
- (m) P_{12} = Benih disimpan selama 8 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 50%.

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak kencur

Rimpang kencur diperoleh dari pasar dan dipilih rimpang yang berukuran sebesar ibu jari. Sediaan rimpang kemudian dikupas dan dibersihkan dengan air mengalir. Rimpang yang telah bersih diparut kemudian diperas dan disaring untuk diambil sarinya. Ekstrak kencur yang diperoleh kemudian diencerkan dengan menambahkan akuades sesuai konsentrasi perlakuan sebagai berikut: (1) konsentrasi 100% = 100% cairan ekstrak, (2) konsentrasi 75% = 75% cairan ekstrak dan 25% akuades, dan (3) konsentrasi 50% = 50% cairan ekstrak dan 50% akuades.

Persiapan benih jeruk

Buah jeruk berasal dari Ponorogo, Jawa Timur yaitu varietas keprok dan dipilih buah yang berukuran seragam. Benih diambil dari buah secara manual yaitu dengan cara mengupas buah dan mengeluarkan bijinya menggunakan tangan. Biji yang telah terkumpul dibersihkan dari lendirnya

dengan abu gosok, kemudian benih dicuci dengan air.

Penyimpanan benih

Penyimpanan benih jeruk dilakukan dengan cara sebagai berikut. Segumpal kapas dibasahi dengan cairan ekstrak kencur sesuai dengan perlakuan kemudian ditiriskan. Setelah kapas ditiriskan, benih dimasukkan ke dalam gelas Aqua sebagai pelapis wadah. Masing-masing gelas Aqua diisi 90 benih jeruk kemudian ditutup plastik dan diikat dengan karet gelang. Gelas-gelas Aqua yang telah diisi benih jeruk dimasukkan ke dalam ember yang telah diberi air dan diatur sedemikian rupa, sehingga gelas-gelas Aqua tersebut tidak bersinggungan langsung dengan air kemudian ember ditutup. Ember yang telah diisi gelas-gelas Aqua disimpan di tempat yang aman dari gangguan tikus dan hama lainnya.

Uji cendawan terbawa benih

Uji cendawan terbawa benih dilakukan dengan metode *blotter test* dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Tiga lembar kertas buram dicelupkan dengan akuades steril lalu ditiriskan, kemudian kertas buram dimasukkan ke dalam cawan petri steril sebagai dasar cawan petri. Benih yang telah diberi perlakuan ekstrak kencur satu demi satu, sebanyak 10 benih jeruk diletakkan di atas kertas buram dengan posisi 1 benih di tengah petri dan 9 benih diatur satu dengan lainnya terhadap lingkaran di tepi cawan petri. Setelah itu, benih diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap jenis dan persentase infeksi masing-masing cendawan yang menyerang benih dan dihitung persentase benih terinfeksi.

Selanjutnya dilakukan uji perkecambahan benih dengan tahapan-tahapan sebagai berikut. Bak persemaian diisi dengan pasir yang telah disterilkan. Kemudian, benih jeruk ditanam di bak persemaian. Benih yang disimpan selanjutnya dikecambahkan setiap dua minggu sekali.

Variabel Pengamatan

Jenis cendawan dan persentase infeksi

Cendawan yang tumbuh pada benih diamati dengan mikroskop cahaya untuk diketahui jenis dan persentase infeksinya. Jenis cendawan dapat diketahui dari bentuk dan warna spora, disamping itu digunakan juga sifat-sifat tubuh buah dari masing-masing tipe cendawan. Sementara itu, persentase infeksi dihitung dengan cara membandingkan jumlah jenis cendawan tertentu dengan jumlah benih yang diinkubasi kemudian dikalikan 100%.

Persentase benih terinfeksi

Persentase benih terinfeksi dihitung dengan cara membandingkan jumlah benih yang terinfeksi dengan jumlah benih yang diinkubasi kemudian dikalikan 100%.

Kecepatan tumbuh

Kecepatan tumbuh dilihat dari jumlah persentase kecambah normal setiap etmal (1 etmal = 24 jam). Pengamatan dilakukan setiap hari.

Keserempakan tumbuh

Keserempakan tumbuh diamati berdasarkan penilaian terhadap kecambah normal yang kuat atau lemah kemudian diukur panjang akar dan dirata-rata, serta diukur panjang hipokotilnya.

Daya berkecambah

Daya berkecambah dihitung dengan cara membandingkan jumlah kecambah normal pada hari ke-14 dan ke-21 dengan jumlah seluruh benih yang dikecambahkan kemudian dikalikan 100%.

Analisis Data

Data hasil pengamatan dianalisis dengan menggunakan sidik ragam dengan uji F pada taraf signifikansi 5% dan 1%. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan maka dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan pada taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Cendawan Terbawa Benih

Sutakaria (1984) menyatakan bahwa biji sejak terbentuk pada tanaman induknya hingga fase perkecambahan di persemaian untuk membentuk tanaman baru selalu menjadi sasaran serangan berbagai patogen. Hal ini disebabkan karena biji merupakan tempat penyimpanan cadangan makanan dan energi yang dapat digunakan oleh berbagai jasad renik untuk memenuhi keperluan hidupnya, sehingga infeksi yang ditimbulkan sering kali merusak biji.

Pengujian kesehatan benih dengan metode *blotter test* dapat mengidentifikasi dua jenis cendawan terbawa benih jeruk yaitu *Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp. (Tabel 1). Streets (1972) menyatakan bahwa ciri kedua cendawan tersebut sebagai berikut. *Penicillium* spp. memiliki konidiofor bercabang serta melingkar, baik tunggal maupun ganda, dan menyerupai bentuk percabangan semak-semak. Konidium dihasilkan di ujung dalam rangkaian-rangkaian, berbentuk bulat, berjumlah banyak, dan berwarna terang. Sementara itu, *Aspergillus* spp. memiliki konidiofor yang terbentuk secara bebas, bagian ujung menggembung. Pada bagian ujung tersebut terbentuk *phialid*, yaitu sel pembawa spora dengan ujung berbentuk tabung, secara langsung dan terdapat satu lapisan sel-sel dimana keseluruhannya berbentuk seperti kepala bulat. Seringkali konidiofor berwarna jika jumlahnya banyak serta terletak dengan sterigmata primer atau sekunder.

Tingginya persentase infeksi *Penicillium* spp. pada benih jeruk dalam penelitian ini disebabkan karena benih disimpan lama dalam suhu rendah dan kadar air benih yang tinggi, sehingga pertumbuhan

Penicillium spp. meningkat yang menyebabkan benih lebih cepat membusuk. Menurut Sutakaria (1984), *Aspergillus* spp. merupakan golongan cendawan yang dominan pada kelembapan ruang simpan yang rendah, kemudian disusul oleh *Penicillium* spp. Kedua cendawan tersebut bersifat halofilik yaitu dapat tumbuh pada benih dengan kadar air yang terlalu rendah. Selanjutnya, peningkatan kadar air dalam benih dapat

menyebabkan pertumbuhan cendawan lainnya seperti *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. ochraeus*, *Penicillium* spp., dan *A. flafus*. Cendawan-cendawan simpan tersebut tidak banyak dijumpai pada biji yang masih di lapang. Spora cendawan-cendawan tersebut dipancarkan melalui udara. Infeksi dapat terjadi melalui luka, bekas tangkai, atau melalui permukaan kulit biji yang utuh (Semangun, 1989).

Tabel 1. Rata-rata persentase infeksi cendawan *Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp. setelah uji *blotter test* pada benih jeruk yang telah diberi perlakuan penyimpanan dengan ekstrak kencur.

Konsentrasi Ekstrak Kencur (%)	Lama Simpan Benih (Minggu)	Persentase Infeksi (%)	
		<i>Aspergillus</i> spp.	<i>Penicillium</i> spp.
0	0	32,50	67,50
100	2	0	100
75	2	0	100
50	2	32,50	67,50
100	4	5,00	37,50
75	4	2,50	90,75
50	4	37,50	90,00

Tabel 2. Persentase benih jeruk yang sehat dan benih terinfeksi pada uji *blotter test* yang setelah perlakuan penyimpanan dengan ekstrak kencur.

Konsentrasi Ekstrak Kencur (%)	Lama Simpan Benih (Minggu)	Persentase Benih Sehat (%)	Persentase Benih Terinfeksi setelah Uji <i>Blotter Test</i> (%)
0	0	100	77,50
100	2	62,50	100
75	2	62,50	100
50	2	68,75	100
100	4	43,13	100
75	4	29,38	100
50	4	36,25	100
100	6	1,86	100
75	6	18,13	100
50	6	0	100
100	8	0	100
75	8	0	100
50	8	0	100

Tabel 3. Hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama simpan terhadap kecepatan tumbuh benih jeruk

Sumber	db	JK	KT	F Hitung	F Tabel	
						$\alpha = 5\%$ $\alpha = 1\%$
Total	20	33,920				
Kelompok	2	0,050	0,025	0,294 ^{ns}	4,75	9,33
Perlakuan	6	32,850	5,475	64,412**	3,00	4,82
Galat	12	1,02	0,085			

Keterangan: db = Derajat bebas, JK = jumlah kuadrat, KT = kuadrat tengah, ns = tidak berbeda nyata, ** = berbeda sangat nyata

Tabel 4. Hasil uji jarak berganda Duncan pengaruh ekstrak kencur dan lama simpan terhadap kecepatan tumbuh benih jeruk.

Konsentrasi Ekstrak Kencur (%)	Lama Simpan Benih (Minggu)	Purata Kecepatan Tumbuh (% Kecambah Normal Per Erial)
0	0	3,65 ^a
100	2	0,08 ^b
75	2	0,17 ^a
50	2	1,16 ^a
100	4	0 ^b
75	4	0 ^b
50	4	0,08 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan beda nyata antar perlakuan pada taraf signifikansi 5%.

Tabel 5. Hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama simpan terhadap daya berkecambah benih jeruk.

Sumber	db	JK	KT	F Hit	F Tabel	
						5% 1%
Total	20	8.666,67				
Kelompok	2	16,67	8,33	0,67 ^{ns}	4,75	9,33
Perlakuan	6	8.500	1.416,67	113,33**	3,00	4,82
Galat	12	150	12,50			

Keterangan: db = Derajat bebas, JK = jumlah kuadrat, KT = kuadrat tengah, ns = tidak berbeda nyata, ** = berbeda sangat nyata

Tabel 6. Hasil uji jarak berganda Duncan pengaruh lama simpan terhadap daya berkecambah benih jeruk.

Konsentrasi Ekstrak Kencur (%)	Lama Simpan Benih (Minggu)	Purata Daya Berkecambah (%)
0	0	60,00 ^a
100	2	1,67 ^b
75	2	6,67 ^b
50	2	11,67 ^a
100	4	0 ^b
75	4	0 ^b
50	4	1,67 ^b

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan beda nyata antar perlakuan pada taraf signifikansi 5%.

Tabel 7. Rekapitulasi hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama simpan terhadap panjang akar dan panjang hipokotil benih jeruk.

Sumber	Panjang Akar (cm)	Panjang Hipokotil (cm)
Kelompok	ns	ns
Perlakuan	ns	**

Keterangan: ns = Tidak berbeda nyata, ** = berbeda sangat nyata

Berbagai macam cendawan dapat menginfeksi benih dengan berbagai macam cara. Tempat terjadinya infeksi oleh cendawan dapat berlokasi di dalam embrio, di luar embrio, atau menempati seluruh jaringan biji (Sutakaria, 1984). Persentase benih jeruk terinfeksi dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pada Tabel 2 setelah benih jeruk diberi perlakuan 2 minggu penyimpanan dengan berbagai konsentrasi ekstrak kencur, persentase benih sehat masih lebih dari 50%. Meskipun setelah dilakukan uji *blotter test*, ternyata benih terinfeksi seluruhnya. Kemudian setiap 2 minggu, persentase benih sehat mengalami penurunan, dan pada minggu ke-8, benih sudah membusuk seluruhnya. Artinya, pengaruh ekstrak kencur yang diberikan dapat mengurangi kerusakan benih saat disimpan, karena pertumbuhan cendawan simpan (*Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp.) dapat ditekan.

Menurut Mugiono (2002), adanya *Aspergillus* sp. dalam penyimpanan, dikarenakan cendawan ini bersifat sangat saprofitik dan mempunyai daya adaptasi yang luas (kosmopolit). Keberadaan *Aspergillus* sp. memegang peranan sebagai cendawan patogenik yang dominan dan mampu menurunkan kualitas benih. Sementara itu, Murthy and Raveesha (1996) menyatakan bahwa cendawan yang terbawa benih kedelai di Karnataka adalah *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., dan *Rhizopus* sp. dan biasanya cendawan-cendawan ini merupakan cendawan yang berkembang saat penyimpanan.

Kecepatan Tumbuh

Hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan terhadap kecepatan tumbuh benih jeruk dapat dilihat pada Tabel 3 dan hasil uji lanjut jarak berganda Duncan dapat dilihat pada Tabel 4. Pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan yang menunjukkan hasil terbaik adalah pada konsentrasi ekstrak kencur 50% dengan lama penyimpanan 2 minggu (1,16% kecambah normal per etmal) dibanding benih jeruk yang diberi perlakuan ekstrak kencur 100% dan 75% dengan kecepatan tumbuh masing-masing 0,08% kecambah normal per etmal dan 0,17% kecambah normal per etmal. Hal ini juga terjadi pada benih jeruk yang disimpan selama 4 minggu dengan konsentrasi ekstrak kencur 50% menunjukkan hasil 0,08% kecambah normal per

Tabel 8. Hasil uji jarak berganda Duncan pengaruh lama simpan benih jeruk terhadap panjang hipokotil benih jeruk.

Konsentrasi Ekstrak Kencur (%)	Lama Simpan Benih (Minggu)	Purata Panjang Hipokotil (cm)
0	0	4,63 ^a
100	2	0 ^b
75	2	0,67 ^a
50	2	3,03 ^a

Keterangan: Angka-angka yang diikuti dengan huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan beda nyata antar perlakuan pada taraf signifikansi 5%.

etmal, sedangkan benih jeruk dengan konsentrasi ekstrak kencur 100% dan 75% tidak mengalami perkecambahan. Artinya, lingkungan simpan dengan pemberian ekstrak kencur 50% terhadap benih jeruk paling tidak sesuai bagi pertumbuhan cendawan *Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp., sedangkan kemunduran benih terjadi akibat penyimpanan, semakin lama benih jeruk disimpan, kecepatan tumbuh benih jeruk semakin rendah.

Daya Berkecambah

Hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan terhadap daya berkecambah benih jeruk dapat dilihat pada Tabel 5 dan hasil uji lanjut jarak berganda Duncan dapat dilihat pada Tabel 6. Berdasarkan tabel hasil sidik ragam pada Tabel 5, pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan berbeda sangat nyata terhadap daya berkecambah benih jeruk. Perlakuan ekstrak kencur 50% dengan lama penyimpanan 2 minggu menunjukkan hasil paling baik (11,67%) dibanding benih jeruk yang diberi perlakuan 100% ekstrak kencur (1,67%) dan 75% ekstrak kencur (6,67%). Pada lama penyimpanan 4 minggu, daya berkecambah benih jeruk terbaik juga diperoleh pada konsentrasi ekstrak kencur 50%, sedangkan pada konsentrasi ekstrak kencur 100% dan 75%, benih jeruk tidak mengalami perkecambahan. Artinya, semakin lama benih jeruk disimpan, daya berkecambah benih semakin menurun. Hal ini diduga karena belum tepatnya kondisi lingkungan simpan yang optimal untuk benih jeruk yang tergolong benih rekalsitran. Sutakaria (1984) berpendapat bahwa benih yang baru dipanen mempunyai potensi tinggi untuk berkecambah. Namun, potensi tersebut lambat laun akan menurun meskipun kondisi lingkungan tempat penyimpanan diatur dalam kondisi optimal. Hal ini disebabkan setelah benih dipanen masih terjadi berbagai proses seperti perubahan struktur protein, berkurangnya cadangan makanan, pembentukan asam lemak, aktivitas enzim, perubahan kromosom, dan respirasi (Justice and Bass, 1990).

Keserempakan Tumbuh

Rekapitulasi hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan terhadap panjang akar dan panjang hipokotil benih jeruk dapat dilihat pada Tabel 7 dan hasil uji lanjut jarak berganda

Duncan dapat dilihat pada Tabel 8. Pengaruh ekstrak kencur dan lama penyimpanan terhadap panjang akar menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antar perlakuan, sedangkan berdasarkan panjang hipokotil, perlakuan konsentrasi ekstrak kencur dan lama penyimpanan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Pada konsentrasi ekstrak kencur 50% dengan lama penyimpanan 2 minggu menunjukkan hasil terbaik (3,03 cm) dibanding benih jeruk yang diberi ekstrak kencur 100% (0 cm) dan 75% (0,67 cm). Artinya, semakin tinggi konsentrasi ekstrak kencur, pertumbuhan hipokotil semakin terhambat. Benih jeruk yang diujikan untuk keserempakan tumbuh setelah disimpan selama 4 minggu tidak mengalami pertumbuhan. Hal ini disebabkan banyaknya benih yang busuk akibat terinfeksi cendawan saat benih disimpan yang secara langsung merusak jaringan benih. Kerusakan benih jeruk diduga juga disebabkan oleh adanya senyawa toksin yang dihasilkan oleh cendawan dan konsentrasi ekstrak kencur terbaik yang mampu mempertahankan viabilitas benih. Sutopo (1985) menyatakan bahwa kerugian-kerugian yang dapat disebabkan oleh patogen terbawa benih antara lain menurunnya persentase perkecambahan yang disebabkan oleh benih busuk (*damping off*) pada kecambah akibat serangan patogen, menurunnya kualitas benih yang diakibatkan oleh kerusakan-kerusakan bentuk fisik dan warna benih, serta patogen-patogen tertentu tidak saja menurunkan kualitas benih, tetapi juga menyebabkan benih yang terinfeksi menjadi sangat beracun, sebagai contoh pada benih kacang tanah yang terinfeksi oleh *Aspergillus flavus* menyebabkan terbentuknya aflatoksin yang beracun.

Menurut Justice dan Bass (1990), peralihan dari kondisi hidup sampai mati pada benih dapat berlangsung dengan lambat atau cepat, tergantung pada jenis benih, berat benih, dan bagian benih yang terinfeksi; kelembapan udara; suhu lingkungan di lapang, sewaktu panen, dan sewaktu disimpan; serta durasi benih tercekam kondisi-kondisi yang merusak tersebut. Kondisi-kondisi itulah yang menentukan masa hidup benih yang sebenarnya, sehingga benih dapat mati hanya dalam waktu beberapa hari atau minggu setelah

masak, atau sebaliknya, benih tetap segar selama bertahun-tahun setelah masak.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa: (1) Konsentrasi ekstrak kencur 50% memberikan hasil terbaik yang dapat melindungi benih jeruk dari serangan cendawan selama penyimpanan benih dengan lama waktu simpan 2 minggu. (2) Jenis cendawan simpan yang dominan menyerang benih jeruk adalah *Aspergillus* spp. dan *Penicillium* spp. berdasarkan hasil uji *blotter test*. (3) Penyimpanan benih jeruk dengan pemberian ekstrak kencur melebihi 2 minggu mengakibatkan penurunan viabilitas benih.

DAFTAR PUSTAKA

- Guenther, E. 1987. *Minyak Atsiri*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Justice, O.L and L.N. Bass. 1990. *Prinsip Praktek Penyimpanan Benih*. Jakarta: Rajawali Press.
- Kardinan, A. 2000. *Pestisida Nabati: Ramuan dan Aplikasinya*. Yogyakarta: Penebar Swadaya.
- Kusnaedi. 1999. *Pengendalian Hama Tanpa Pestisida*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Mugiono. 2002. *Pengujian Potensi Minyak Sereh Wangi dan Minyak Cengkah untuk Mengendalikan Cendawan Patogenik Terbawa Benih Kedelai (*Glycine max* (L.) Merr.): *Aspergillus flavus* (L.) dan *Fusarium oxysporium* (S.). [Skripsi]*. Bogor: Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, IPB.
- Murthy, Y.L.K. and Raveesha KA. 1996. Seed mycoflora of soybean in Karnataka. *Plant Disease Research* 2(1): 78-82.
- Semangun, H. 1989. *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Streets, R.B. 1972. *Diagnosis Penyakit Tanaman*. Tuscon, Arizona, USA: The University of Arizona Press.
- Sutakaria, J. 1984. *Penyakit Benih*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sutopo, L. 1985. *Teknologi Benih*. Jakarta: Rajawali Press.
- Wudianto, R. 2001. *Membuat Setek, Cangkok, dan Okulasi*. Jakarta: Penebar Swadaya.

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 setelah penyebutan pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butilat hidroksitoluen (BHT), selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya, tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

Judul ditulis secara padat, jelas, dan informatif, maksimum 20 kata. Judul ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris untuk naskah dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris saja untuk naskah dalam bahasa Inggris. Judul 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 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 daripada pembahasan yang tidak tuntas. Naskah telaah pustaka tanpa sub judul Bahan dan Metode, serta Hasil dan Pembahasan. **Kesimpulan** (*Conclusion*) sebaiknya tetap diberikan meskipun biasanya sudah terungkap pada Hasil dan Pembahasan. **Ucapan Terima Kasih** (*Acknowledgments*) apabila diperlukan ditulis secara singkat. **Gambar dan Tabel** maksimum 3 halaman, dapat dibuat dengan tinta cina atau printer laser. Judul gambar ditulis di bawah gambar, sedangkan judul tabel ditulis di atas tabel. Foto dicetak pada kertas *glossy* dan diberi keterangan. Gambar berwarna dapat diterima apabila informasi ilmiah dalam naskah dapat hilang tanpa gambar tersebut. Setiap gambar dan foto

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

Pustaka dalam naskah ditulis dalam bentuk nama belakang penulis dan tahun. Pada kalimat yang diacu dari beberapa penulis, nama penulis diurutkan berdasarkan kebaruan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis dan diikuti dengan *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-infecting 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, Flo., 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 "I" (el) untuk "1" (satu) atau "O" (oh) untuk "0" (nol) perlu dihindari. Simbol α , β , χ , dan lain-lain dimasukkan melalui fasilitas insert, bukan mengubah jenis huruf. Kata-kata dan tanda baca sesudahnya tidak diberi spasi.

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

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

Pengaruh variasi konsentrasi asam naftalen asetat (NAA) terhadap pertumbuhan dan kandungan minyak atsiri kalus melati (<i>Jasminum sambac</i> (L.) Ait.)	41-44
• GENINGSIH WIDYAWATI, SOLICHATUN, SOERYA DEWI MARLIYANA	
Penghambatan produksi enzim eksoprotease <i>Aeromonas hydrophila</i> oleh ekstrak rimpang temu lawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.)	45-54
• UMI LESTARI, ARTINI PANGASTUTI, ARI SUSILOWATI	
Penurunan produksi enzim eksoprotease <i>Aeromonas hydrophila</i> oleh ekstrak buah tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	55-64
• NUR AINI, SUTARNO, ARI SUSILOWATI	
Efek antipiretik ekstrak daun kemangi (<i>Ocimum sanctum</i> L.) pada tikus putih	65-71
• ANDINA WIDIASTUTI, YUL MARIYAH, SUHARSONO	
Pengaruh ekstrak bawang putih (<i>Allium sativum</i>) terhadap struktur mikroanatomi hepar dan kadar serum glutamat piruvat transaminase pada tikus putih setelah pemberian CCl₄ secara oral	72-78
• WIWIK YULIA TRISTININGRUM, MARTI HARINI, TETRI WIDIYANI	
Pengaruh ekstrak kencur (<i>Kaempferia galanga</i> L.) dan lama simpan terhadap cendawan terbawa benih dan viabilitas benih jeruk (<i>Citrus</i> sp.)	79-84
• DEWI DEVY DAYUNI, WARSOKO WIRYOWIDODO, SALIM WIDONO	

