

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

VOLUME 14
NOMOR 2
AGUSTUS 2016
ISSN: 1693-2242

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

Laboratorium Pusat MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta
Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126
Tel. & Fax. +62-271-663375
E-mail: unsjournals@yahoo.com
Online: <http://biosains.mipa.uns.ac.id/C/index.htm>

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso
Gut Windarsih
Ratna Setyaningsih
Solichatun
Suratman
Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

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

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

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

Kapasitas antioksidan minuman temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) menggunakan gula kristal putih, gula kristal merah, gula merah, dan gula aren

Antioxidant capacity of temulawak drink (*Curcuma xanthorrhiza*) with white crystal sugar cane, red crystal sugar cane, palm sugar, and arenga palm sugar

SETIYA NING RUM S, KAWIJI, SETYANINGRUM ARIVIANI

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

Manuskrip diterima: 2 Januari 2016. Revisi disetujui: 22 Juli 2016.

Abstract. Rum SSN, Kawiji, Setyaningrum A. 2016. *Antioxidant capacity of temulawak drink (Curcuma xanthorrhiza) with white crystal sugar cane, red crystal sugar cane, palm sugar, and arenga palm sugar. Biofarmasi 14: 39-46.* The aim of this study was to determine the antioxidant capacity of temulawak extract in water solution; to determine the antioxidant capacity of white crystal sugar cane, red crystal sugar cane, palm sugar, and arenga palm sugar which commonly used in making temulawak drink; to determine the synergic effect of sugar addition to temulawak drink product; and also to determine the sensory quality (colour, taste, and flavour) of temulawak drink produced by parameters. This research used Completely Randomized Design (CAD) with two factors, concentration of temulawak extract (10, 20, and 30 gr/litre), and the kind of sugar added (white crystal sugar cane, red crystal sugar cane, palm sugar, and arenga palm sugar) with 50 g/litre concentration of addition, respectively. This research was studied the antioxidant activity (radical DPPH scavenging activity), total phenol, and sensory analysis (Multiple Comparison Test). Statistical analysis was performed using SPSS 17.0 ($\alpha=0,05$). This study showed that the radical DPPH scavenging activity and total phenol were increase due to the increase of temulawak extract concentration. It might be due to water-soluble phenol compound like xanthorrhizol extracted more largely. Radical DPPH scavenging activity and total phenol of sugars were significantly different which from the highest to the lowest palm sugar, arenga palm sugar (which usually used by people to make traditional health drink), red crystal sugar cane and white crystal sugarcane, respectively. Synergic effect of temulawak drink antioxidant capacity occurred due to the sugar addition. The study also showed that sensory quality of produced temulawak drink with all treatments was not significantly different.

Keywords: Antioxidant capacity, temulawak drink, total phenol

PENDAHULUAN

Temulawak merupakan salah satu rempah-rempah yang termasuk suku Zingiberaceae yang tumbuh di daerah tropik dan memiliki banyak khasiat serta manfaat. Temulawak dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional, untuk bahan pembuatan minuman, oleoresin dan zat pewarna (Afifah 2003). Beberapa penelitian yang telah dilakukan menemukan bahwa di dalam temulawak terdapat senyawa-senyawa kurkuminoid yang diketahui mempunyai potensi sebagai antioksidan, anti-inflamasi (Masuda et al. 1992, 1993), anti kanker, anti mutagen, dan hipokolesterolemik (Majeed et al. 1995). Menurut Majeed et al. (1995) kurkuminoid bersifat tidak larut dalam air tetapi larut dalam ethanol dan aseton. Pemanfaatan temulawak dalam bidang pangan antara lain sebagai minuman atau jamu dengan cara ekstraksi menggunakan air.

Di Jawa Tengah, tanaman bernama latin *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. ini dikenal sebagai bahan minuman eksotik dengan cita rasa khas. Minuman ini dibuat dengan mencampurkan ekstrak rimpang bersama gula, lalu diseduh dengan air panas akan menghasilkan sebuah rasa tersendiri (Kunia 2006).

Gula yang biasanya digunakan untuk pemanis minuman temulawak adalah gula pasir, gula merah, ataupun gula aren. Salah satu tahapan dalam pembuatan gula adalah proses kristalisasi. Kristalisasi adalah proses pembuatan gula dimana nira dipanaskan hingga mencapai kondisi lewat jenuh dan terbentuk kristal gula. Proses pemanasan nira menghasilkan karamel dan produk *maillard*. Produk *maillard* terbentuk karena gula reduksi dan asam amino dalam nira bereaksi saat pemanasan dan menghasilkan polimer nitrogen berwarna cokelat (melanoidin) (Anonim 2009) yang memiliki aktivitas antioksidan (Nursten 2005).

Tujuan penelitian ini adalah untuk (i) Menentukan kapasitas antioksidan ekstrak air rimpang temulawak; (ii) Menentukan kapasitas antioksidan gula kristal, gula merah, dan gula aren yang biasa digunakan pada pembuatan minuman temulawak; (iii) Mengetahui adakah efek sinergisitas dari penambahan gula terhadap kapasitas antioksidan minuman temulawak yang dihasilkan; (iv) mengetahui kualitas sensoris meliputi warna, rasa, dan aroma minuman temulawak yang dihasilkan.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan Pangan dan Hasil Pertanian, Laboratorium Pangan dan Gizi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret Surakarta pada bulan Maret sampai April 2010.

Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam pembuatan minuman temulawak antara lain temulawak, air, gula kristal merah, gula kristal putih, gula merah, dan gula aren. Sedangkan bahan-bahan yang digunakan dalam analisa antioksidan antara lain DPPH (Diphenyl picrylhydrazyl), methanol pro analyse, analisa total fenol dengan Folin-Ciocalteu, Na-karbonat alkali 2%, larutan fenol, dan aquades. Untuk uji organoleptik menggunakan air mineral.

Alat-alat yang digunakan dalam pembuatan minuman temulawak antara lain parutan, termometer, alat-alat gelas, timbangan, pisau, panci, saringan, sendok, sendok kayu, kompor, serbet, cawan atau piring-piring kecil. Sedangkan alat-alat yang digunakan dalam analisa antioksidan antara lain: spektrofotometer *thermo spectronic* GENESYS 20, kuvet, mikro pipet, pro pipet, *vortex*, timbangan analitik, dan alat-alat gelas. Untuk uji organoleptik menggunakan nampan, sloki, dan sendok.

Tahapan penelitian

Pembuatan ekstrak temulawak. Konsentrasi ekstrak rimpang temulawak yang dibuat adalah 10 g/L, 20 g/L, dan 30 g/L.

Pembuatan larutan gula untuk analisis kapasitas antioksidan. Gula yang digunakan antara lain gula kristal merah, gula kristal putih, gula merah, dan gula aren. Konsentrasi untuk masing-masing gula yang digunakan adalah 50 g/L.

Pembuatan minuman temulawak. Minuman temulawak dibuat dengan mengekstrak temulawak (10 g, 20 g, dan 30 g) ke dalam 1 liter air dan ditambahkan 50 g gula.

Penangkapan radikal bebas DPPH (Subagio dan Morita 2001). Antioksidan dalam minuman temulawak dianalisis menggunakan DPPH dan diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515-517 nm. Sampel diambil 1 ml dan disuspensikan menjadi 10 ml dalam methanol. Kemudian distirer selama ± 10 menit. Selanjutnya diambil 1 ml suspensi ditambah 0,5 ml reagen DPPH 0,5 mM dan didiamkan selama 20 menit setelah ditambahkan methanol sampai volume 5 ml dan digojoy/divortex selama ± 3 menit. Segera setelah itu ditera absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm.

$$\text{Aktivitas penangkapan radikal (\%)} = \left(1 - \frac{\text{absorbansisampel}}{\text{absorbansikontrol}} \right) \times 100\%$$

Kontrol = 4,5 ml methanol + 0,5 ml DPPH 0,5 mM.

Tabel 1. Formula minuman temulawak

Konsentrasi Temulawak	Jenis gula			
	Gula kristal putih	Gula kristal merah	Gula aren	Gula merah
10 g/L	10GKP	10GKM	10GA	10GM
20 g/L	20GKP	20GKM	20GA	20GM
30 g/L	30GKP	30GKM	30GA	30GM

Kadar total fenol (Plummer 1971; Senter et al. 1989). Kadar total fenol dianalisis menggunakan Folin-Ciocalteu dan ditera dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 750 nm. 1 ml larutan sampel ditambahkan 5 ml Na-karbonat alkali 2% dan dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya ditambah dengan 0,5 ml reagen Folin-ciocalteu (yang ditambah aquades hingga setengah bagian) lalu digojoy/divortex. Setelah dibiarkan selama 30 menit, absorbansinya ditera pada panjang gelombang 750 nm. Kadar total fenol bahan dihitung berdasarkan kurva standar yang didapat dari fenol 10-50 ppm.

Uji Organoleptik (Setyaningsih et al. 2008). Uji organoleptik dengan uji perbandingan jamak (*multiple comparison*) menggunakan 12 sampel dan 1 pembandingan (R) minuman temulawak dari sirup temulawak yang telah beredar dipasaran, serta 15 panelis agak terlatih. Parameter yang diujikan adalah warna, rasa, dan aroma. Panelis diminta untuk membandingkan kualitas sensoris sampel dengan pembandingan (R).

Rancangan penelitian dan analisis data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial, yang terdiri dari dua faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi ekstrak temulawak yang terdiri dari tiga taraf yaitu 10 g/L, 20 g/L, dan 30 g/L. Faktor kedua adalah macam gula yang terdiri dari empat taraf yaitu gula kristal merah, gula kristal putih, gula merah, dan gula palem dengan konsentrasi 50 g/L. Masing-masing dilakukan tiga kali ulangan sampel. Data hasil analisa pada penelitian ini diuji secara statistik menggunakan sidik ragam ANOVA dengan SPSS versi 16.0. Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada $\alpha=0,05$. Formulasi minuman temulawak dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kapasitas antioksidan

Dalam ekstrak air rimpang temulawak, yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa fenol yang larut air (Cowan, 1999) yaitu xanthorizol (Anonim 2010) yang merupakan antioksidan primer. Sedangkan pada gula, senyawa fenol yang diduga terdapat didalamnya adalah senyawa flavanoid dan benzoquinon yang merupakan produk- produk dari reaksi *Maillard* (Nursten 2005) yang terjadi selama proses pembuatan gula.

Menurut Pokorny (2001), mekanisme penghambatan oksidasi oleh antioksidan dengan dua cara, yaitu

pengikatan/ menangkap radikal bebas (antioksidan primer) dan mekanisme lain yang tidak langsung menangkap radikal bebas (antioksidan sekunder), seperti mengikat atau mengkelat logam, menangkap oksigen, deaktivasi oksigen singlet, konversi hydrogen peroksida menjadi non radikal. Sedangkan senyawa-senyawa fenolik mempunyai kapasitas sebagai antioksidan primer sehingga reaksi yang cepat dari radikal DPPH terjadi dengan beberapa fenol, oleh karena itu kapasitas antioksidan ekstrak air rimpang temulawak, berbagai jenis gula, dan minuman temulawak dalam penelitian ini diukur dengan analisis aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) dan kadar total fenol.

Kapasitas Anti Radikal (DPPH)

Hasil dari analisis kapasitas anti radikal ekstrak air rimpang temulawak menggunakan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) pada ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 10 g/L, 20 g/L, dan 30 g/L dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa konsentrasi temulawak berpengaruh terhadap kapasitas penangkapan radikal bebas (DPPH). Dari Tabel 2 dapat dilihat bahwa ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 30 g/L memiliki kapasitas anti radikal paling tinggi disbanding yang lain, yaitu berturut-turut ekstrak rimpang temulawak 30 g/L > 20 g/L > 10 g/L. Semakin besar konsentrasi temulawak yang digunakan maka semakin besar aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) karena semakin banyak temulawak yang digunakan maka senyawa fenolik yang terdapat dalam sistem juga semakin besar, sehingga kemungkinan terekstrak juga akan semakin tinggi (Anonim 2005).

Untuk mengetahui sejauh mana potensi anti radikal alami, digunakan kontrol positif BHT agar dapat dibandingkan dengan potensi anti radikal sintetis. Fungsi BHT adalah sebagai pemutus rantai radikal bebas (*free radical terminator*). BHT akan memberikan atom hidrogen sehingga terbentuk senyawa yang stabil. Kadar BHT yang digunakan adalah 200 ppm, hal ini mengacu pada batas maksimal penggunaan BHT (Kumalaningsih 2006).

Aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada ekstrak air rimpang temulawak pada konsentrasi 10 g/L, 20 g/L dan 30 g/L jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) BHT pada penggunaan dosis maksimum 200 ppm yaitu sebesar 73,66%.

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa jenis gula berpengaruh terhadap kapasitas penangkapan radikal bebas (DPPH). Jenis gula kristal putih memiliki kapasitas antioksidan yang sama dengan jenis gula kristal merah, tetapi berbeda dengan jenis gula aren dan gula merah. Sedangkan jenis gula aren dan gula merah menunjukkan aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) yang berbeda nyata.

Dari Tabel 3 diketahui bahwa aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) gula merah lebih besar dari jenis gula aren, sedangkan gula aren memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) lebih besar dari jenis gula kristal merah dan gula kristal putih.

Gula kristal putih dan gula kristal merah dibuat dari kristalisasi nira tebu yang memiliki komposisi sukrosa 8,4-

13,4%, gula invert 0,2-0,5%, asam organik (karbosiklik, amino) 0,15%, substansi organik (Protein, pati, lilin, lemak, fosfolipid) 11-19% (Hugot, 1986). Gula aren dibuat dari nira aren yang memiliki komposisi sukrosa 13,9-14,9%, karbohidrat 11,28%, dan protein 0,02%. Sedangkan gula merah dibuat dari nira kelapa yang memiliki komposisi sukrosa 12,03-14,85%, karbohidrat 14,35%, dan protein 0,17% (KSU Sukajaya 2005). Pada pembuatan gula melalui tahap evaporasi dengan suhu tinggi dimana dapat terbentuk produk-produk *maillard* didalamnya (Anonim 2009).

Maillard merupakan reaksi antara kompleks amino (sering kali asam amino, peptida, atau protein) dan kompleks karbonil (biasanya gula reduksi, meliputi glukosa, fruktosa, atau laktosa). Selain aktivitas antioksidan, produk-produk *Maillard* ditemukan memiliki efek antimutagenik, antibiotik, dan antialergenik (Nursten 2005).

Dalam proses pembuatan yang sama dengan komposisi kimia masing-masing nira yang berbeda, kemungkinan terbentuk lebih banyak produk *maillard* dari reaksi *maillard* pada gula merah daripada gula aren karena protein dalam nira aren lebih kecil daripada nira kelapa.

Selain pengaruh dari komposisi nira, kemungkinan proses pemurnian juga berpengaruh terhadap penurunan kapasitas antioksidan pada gula. Hal ini disebabkan karena penurunan kadar melanoidin (merupakan pigmen coklat dalam gula sebagai produk dari reaksi *maillard* yang memiliki kapasitas antioksidan) oleh proses pemurnian (Hastuti 2007).

Pada proses pengolahan nira tebu menjadi gula kristal merah, hanya melalui satu tahap pemurnian yaitu dengan penambahan kapur pada nira dan penyaringan sebelum nira masuk tahap penguapan (evaporasi). Sedangkan proses pengolahan gula kristal putih melalui dua tahap pemurnian yaitu saat pembentukan *raw sugar* dan setelah pelarutan kembali *raw sugar*. Proses pemurnian larutan *raw sugar* melalui dua tahap, yaitu tahap penambahan kapur dan larutan asam fosfat serta tahap penambahan karbon teraktivasi untuk menghilangkan warna sehingga gula kristal yang dihasilkan berwarna putih (Christy 2006). Pada proses pembuatan gula aren dan gula merah hanya melalui tahap pemanasan atau evaporasi tanpa melalui proses pemurnian khusus seperti pada proses pembuatan gula kristal. Hal ini berpengaruh terhadap penurunan kadar pigmen coklat pada gula yang merupakan melanoidin. Melanoidin adalah produk dari reaksi *maillard* yang memiliki kapasitas antioksidan. Oleh karena itu, kapasitas anti radikal gula merah dan gula aren lebih besar dari gula kristal putih dan gula kristal merah.

Berdasarkan hasil analisis data, kapasitas anti radikal gula kristal putih sama dengan kapasitas anti radikal gula kristal merah karena dibuat dari bahan yang sama dan keduanya melalui tahapan pemurnian. Aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada berbagai jenis gula dengan konsentrasi 50 g/L jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) BHT pada penggunaan dosis maksimum 200 ppm yaitu sebesar 73,66%.

Tabel 2. Hasil analisis kapasitas anti radikal ekstrak air rimpang temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH)

Sampel	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
Ekstrak air temulawak (10 g/L)	1,739a
Ekstrak air temulawak (20 g/L)	3,978b
Ekstrak air temulawak (30 g/L)	4,749c
BHT 200 ppm	73,66

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 3. Hasil analisis kapasitas anti radikal berbagai jenis gula dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH)

Sampel	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
Larutan gula kristal putih (50g/L)	0,169a
Larutan gula kristal merah (50g/L)	0,212a
Larutan gula aren (50g/L)	6,107b
Larutan gula merah (50g/L)	8,482c
BHT 200 ppm	73,66

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 4. Hasil analisis kapasitas anti radikal minuman temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) terhadap faktor konsentrasi temulawak

Konsentrasi temulawak (g/L)	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
10	11,259a
20	12,723b
30	13,709c
BHT 200 ppm	73,66

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 5. Hasil analisis kapasitas anti radikal minuman temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) terhadap faktor jenis gula

Jenis gula (g/L)	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
Kristal Putih	9,288a
Kristal Merah	10,644b
Gula Aren	14,702c
Gula Merah	15,621d
BHT 200 ppm	73,66

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 6. Hasil analisis kapasitas anti radikal minuman temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) dalam%

Konsentrasi temulawak	Jenis gula			
	Gula kristal putih	Gula kristal merah	Gula aren	Gula merah
10 g/L	7,761a	8,863b	13,740e	14,673f
20 g/L	9,415b	10,983c	14,504f	15,988g
30 g/L	10,687c	12,086d	15,861g	16,200g

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan terhadap kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) terhadap faktor konsentrasi temulawak pada Tabel 4 menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan pada masing-masing konsentrasi temulawak adalah berbeda nyata ($p < 0,05$) atau memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas pada minuman temulawak. Aktivitas penangkapan radikal bebas yang paling tinggi adalah pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak 30 g/L, sedangkan yang paling rendah adalah pada konsentrasi 10 g/L. Semakin tinggi konsentrasi temulawak maka semakin tinggi pula aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada minuman temulawak. Hasil ini sejalan dengan data pada Tabel 2. yang memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi temulawak maka aktivitas anti radikal ekstrak air yang dihasilkan juga semakin tinggi karena semakin banyak senyawa fenol yang terekstrak.

Hasil analisis data yang telah dilakukan pada kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode penangkapan radikal bebas (DPPH) terhadap faktor jenis gula pada Tabel 5 menunjukkan bahwa kapasitas antioksidan pada masing-masing jenis gula adalah berbeda nyata ($p < 0,05$) atau memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas pada minuman temulawak. Jenis gula kristal putih memberikan pengaruh yang paling lemah terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada minuman temulawak, selanjutnya adalah gula kristal merah, gula aren, dan yang memberikan pengaruh paling kuat terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada minuman temulawak adalah jenis gula merah. Hasil ini sejalan dengan data pada Tabel 3. yang memperlihatkan bahwa aktivitas anti radikal pada gula merah lebih besar dibandingkan gula aren, aktivitas anti radikal gula aren lebih besar daripada gula kristal merah dan gula kristal putih. Hal ini disebabkan karena semakin banyak melanoidin yang terdapat dalam gula, maka semakin besar pula kapasitas antioksidannya.

Hasil analisis data pada Tabel 6 menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara konsentrasi temulawak dengan jenis gula yang berpengaruh terhadap aktivitas anti radikal minuman temulawak yang dihasilkan. Pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak yang paling rendah dan penambahan jenis gula kristal putih memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) yang paling rendah, demikian seterusnya hingga pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak yang paling tinggi dan penambahan jenis gula merah memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) yang paling tinggi, berturut-turut yaitu 10 g/L temulawak dengan gula kristal putih < dari 10 g/L temulawak dengan gula kristal merah, 10 g/L temulawak dengan gula kristal merah = 20 g/L temulawak dengan gula kristal putih < 30 g/L temulawak dengan gula kristal putih. 30 g/L temulawak dengan gula kristal putih = 20 g/L temulawak dengan gula kristal merah < 30 g/L temulawak dengan gula kristal merah < 10 g/L temulawak dengan gula aren < 20 g/L temulawak dengan gula aren. 20 g/L temulawak dengan gula aren = 10 g/L temulawak dengan gula merah < 30 g/L temulawak dengan

gula aren. 30 g/L temulawak dengan gula aren = 20 g/L temulawak dengan gula merah dan 30 g/L temulawak dengan gula merah. Aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada minuman temulawak dengan berbagai konsentrasi dan berbagai jenis gula jauh lebih rendah bila dibandingkan dengan aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) BHT pada penggunaan dosis maksimum 200 ppm yaitu sebesar 73,66%.

Total fenol

Komponen fenol yang terdapat dalam temulawak berupa phelandren, kamfer, borneol, xanthorizol, turmerol dan sineal (Rukmana, 1995). Menurut Dorman dan Deans (2000), senyawa fenol menunjukkan aktivitas antioksidan yang baik.

Dari hasil analisis data yang ditunjukkan pada Tabel 7 dapat diketahui bahwa konsentrasi temulawak memberikan pengaruh nyata terhadap kadar total fenol untuk masing-masing konsentrasi ekstrak air temulawak. Dari Tabel 7 dapat dilihat bahwa ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 30 g/L memiliki kadar total fenol yang lebih besar daripada ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 20 g/L, sedangkan ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 20 g/L memiliki kadar total fenol yang lebih besar daripada ekstrak air rimpang temulawak dengan konsentrasi 10 g/L. Dari Tabel 7 diketahui bahwa semakin besar konsentrasi temulawak yang digunakan memperlihatkan kadar total fenol yang semakin meningkat. Hal ini sejalan dengan data aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) dikarenakan semakin besar konsentrasi temulawak maka semakin banyak senyawa fenolik yang larut air dari temulawak.

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Senyawa fenol mudah larut dalam air karena sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne 1987).

Dari hasil analisis data yang ditunjukkan pada Tabel 8 dapat diketahui bahwa berbagai jenis gula menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap kadar total fenol untuk masing-masing jenis gula tersebut. Pada Tabel 8, jenis gula merah menunjukkan kadar total fenol yang lebih besar daripada gula aren, gula aren menunjukkan kadar total fenol yang lebih besar daripada gula kristal merah dan gula kristal putih. Hasil ini sejalan dengan data aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada gula kristal merah, gula kristal putih, gula aren, dan gula merah. Senyawa fenol yang terdapat dalam gula diduga adalah senyawa flavanoid dan benzoquinon. Menurut Harborne (1987), flavonoid dalam tumbuh-tumbuhan berada sebagai campuran, jarang sekali dijumpai dalam bentuk tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas. Dalam tumbuhan, flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida.

Sedangkan menurut Nursten (2005), Benzoquinon dapat berperan sebagai komponen dikarbonil dari reaksi Strecker, dan dapat terlibat dalam produksi melanoidin.

Benzoquinon dalam sistem tumbuhan biasanya berasal dari polifenol dan terkenal sebagai penyusun intermediet dalam pencoklatan enzimatis. Sebuah modifikasi teori lignin dari pembentukan substansi makhluk hidup adalah teori polifenol, teori yang mempertimbangkan interaksi pembentukan quinon berasal dari polifenol atau lignin dengan ikatan amino.

Gula kristal merah memiliki kadar total fenol yang lebih tinggi dari gula kristal putih tetapi memiliki kapasitas anti radikal yang sama. Hal ini disebabkan karena tidak semua senyawa fenolik memiliki kapasitas sebagai antioksidan (Tranggono, 1990). Senyawa fenol yang terdapat dalam gula diduga adalah senyawa flavanoid dan benzoquinon. Menurut Harborne (1987), flavonoid dalam tumbuh-tumbuhan berada sebagai campuran, jarang sekali dijumpai dalam bentuk tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas. Dalam tumbuhan, flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida.

Sedangkan menurut Nursten (2005), Benzoquinon dapat berperan sebagai komponen dikarbonil dari reaksi Strecker, dan dapat terlibat dalam produksi melanoidin. Benzoquinon dalam sistem tumbuhan biasanya berasal dari polifenol dan terkenal sebagai penyusun intermediet dalam pencoklatan enzimatis. Sebuah modifikasi teori lignin dari pembentukan substansi makhluk hidup adalah teori polifenol, teori yang mempertimbangkan interaksi pembentukan quinon berasal dari polifenol atau lignin dengan ikatan amino.

Gula kristal merah memiliki kadar total fenol yang lebih tinggi dari gula kristal putih tetapi memiliki kapasitas anti radikal yang sama. Hal ini disebabkan karena tidak semua senyawa fenolik memiliki kapasitas sebagai antioksidan (Tranggono, 1990). Senyawa fenol yang terdapat dalam gula diduga adalah senyawa flavanoid dan benzoquinon. Menurut Harborne (1987), flavonoid dalam tumbuh-tumbuhan berada sebagai campuran, jarang sekali dijumpai dalam bentuk tunggal dalam jaringan tumbuhan. Disamping itu, sering terdapat campuran yang terdiri atas flavonoid yang berbeda kelas. Dalam tumbuhan, flavonoid terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida.

Sedangkan menurut Nursten (2005), Benzoquinon dapat berperan sebagai komponen dikarbonil dari reaksi Strecker, dan dapat terlibat dalam produksi melanoidin. Benzoquinon dalam sistem tumbuhan biasanya berasal dari polifenol dan terkenal sebagai penyusun intermediet dalam pencoklatan enzimatis. Sebuah modifikasi teori lignin dari pembentukan substansi makhluk hidup adalah teori polifenol, teori yang mempertimbangkan interaksi pembentukan quinon berasal dari polifenol atau lignin dengan ikatan amino.

Gula kristal merah memiliki kadar total fenol yang lebih tinggi dari gula kristal putih tetapi memiliki kapasitas anti radikal yang sama. Hal ini disebabkan karena tidak semua senyawa fenolik memiliki kapasitas sebagai antioksidan (Tranggono 1990).

Tabel 7. Hasil analisis kapasitas antioksidan ekstrak air rimpang temulawak dengan pengukuran kadar total fenol

Sampel	Kadar total fenol (%)
Ekstrak air temulawak (10 g/L)	0,096a
Ekstrak air temulawak (20 g/L)	0,116b
Ekstrak air temulawak (30 g/L)	0,126c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 8. Hasil analisis kapasitas antioksidan ekstrak air rimpang temulawak dan berbagai jenis gula dengan pengukuran kadartotal fenol

Sampel	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
Larutan gula kristal putih (50g/L)	0,0032a
Larutan gula kristal merah (50g/L)	0,0089b
Larutan gula aren (50g/L)	0,1996c
Larutan gula merah (50g/L)	0,2760d

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 9. Hasil analisis kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode pengukuran kadar total fenol terhadap faktor konsentrasi temulawak

Konsentrasi temulawak (g/L)	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
10	0,375a
20	0,493b
30	0,662c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 10. Hasil analisis kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode pengukuran kadar total fenol terhadap faktor jenis gula

Jenis gula (50 g/L)	% aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH)
Kristal Putih	0,330a
Kristal Merah	0,373b
Gula Aren	14,702c
Gula Merah	0,504c

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Tabel 11. Hasil analisis kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode pengukuran kadar total fenol dalam%

Konsentrasi temulawak	Jenis gula			
	Gula kristal putih	Gula kristal merah	Gula aren	Gula merah
10 g/L	0,208a	0,225b	0,315c	0,752i
20 g/L	0,310c	0,382d	0,497f	0,783j
30 g/L	0,472e	0,512g	0,699h	0,801k

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Hasil analisis kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode pengukuran kadar total fenol terhadap faktor konsentrasi temulawak pada Tabel 9 menunjukkan bahwa kadar total fenol pada masing-masing konsentrasi temulawak adalah berbeda nyata ($p < 0,05$). Kadar total fenol yang paling tinggi pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak 30 g/L, sedangkan yang paling rendah pada konsentrasi temulawak 10 g/L. Semakin tinggi konsentrasi temulawak maka semakin tinggi pula kadar total fenol pada minuman temulawak. Hasil ini sejalan dengan data pada Tabel 7. yang memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi temulawak maka kadar total fenol ekstrak air yang dihasilkan juga semakin tinggi.

Hasil analisis kapasitas antioksidan minuman temulawak dengan metode pengukuran kadar total fenol terhadap faktor jenis gula pada Tabel 10 menunjukkan bahwa kadar total fenol pada minuman temulawak dengan berbagai jenis gula adalah berbeda nyata ($p < 0,05$). Jenis gula kristal putih memberikan pengaruh yang paling lemah terhadap kadar total fenol pada minuman temulawak, selanjutnya adalah gula kristal merah, gula aren, dan yang memberikan pengaruh paling kuat terhadap kadar total fenol pada minuman temulawak adalah jenis gula merah, berturut-turut yaitu 10 g/L temulawak dengan gula kristal putih < 10 g/L temulawak dengan gula kristal merah < 20 g/L temulawak dengan gula kristal putih. 20 g/L temulawak dengan gula kristal putih = 10 g/L temulawak dengan gula aren < 20 g/L temulawak dengan gula kristal merah < 30 g/L temulawak dengan gula kristal putih < 20 g/L temulawak dengan gula aren < dari 30 g/L temulawak dengan gula kristal merah < 30 g/L temulawak dengan gula aren < 10 g/L temulawak dengan gula merah, 20 g/L temulawak dengan gula aren = 10 g/L temulawak dengan gula merah < 20 g/L temulawak dengan gula merah < 30 g/L temulawak dengan gula merah.

Hasil analisis data menunjukkan bahwa terdapat interaksi antara konsentrasi temulawak dengan jenis gula pada minuman temulawak yang dihasilkan. Pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak yang paling rendah dan penambahan jenis gula kristal putih memiliki kadar total fenol yang paling rendah, demikian seterusnya hingga pada minuman temulawak dengan konsentrasi temulawak yang paling tinggi dan penambahan jenis gula merah memiliki kadar total fenol yang paling tinggi.

Sinergisme

Menurut Tranggono (1990), sinergisme dapat diartikan sebagai peranan gabungan antara dua atau lebih agensi sedemikian rupa sehingga total pengaruh yang lebih besar dari penjumlahan pengaruh masing-masing agensi bila tanpa dilakukan penggabungan.

Dari hasil analisis data yang ditunjukkan pada Tabel 12 dapat diketahui bahwa terjadi sinergisme antara aktivitas penangkapan radikal bebas temulawak dengan berbagai jenis gula terhadap minuman temulawak sehingga menghasilkan aktivitas penangkapan radikal bebas pada minuman temulawak 2-6 kali lebih tinggi dari penjumlahan aktivitas penangkapan radikal bebas pada temulawak saja dan berbagai jenis gula saja.

Tabel 12. Hasil analisis anti radikal (DPPH) ekstrak air rimpang temulawak, berbagai jenis gula, dan minuman temulawak

Sampel	Aktivitas anti radikal (%)
Ekstrak air rimpang temulawak	
10 g/L	1,739
20 g/L	3,978
30 g/L	4,749
Berbagai jenis gula	
Gula Kristal Putih (GKP)	0,169
Gula Kristal Merah (GKM)	0,212
Gula Aren (GA)	6,107
Gula Merah (GM)	8,482
Minuman temulawak	
10 g/L+GKP	7,761
10 g/L+GKM	8,863
10 g/L+GA	13,740
10 g/L+GM	14,673
20 g/L+GKP	9,415
20 g/L+GKM	10,983
20 g/L+GA	14,504
20 g/L+GM	15,988
30 g/L+GKP	10,687
30 g/L+GKM	12,086
30 g/L+GA	15,861
30 g/L+GM	16,200

Tabel 13. Hasil analisis kadar total fenol ekstrak air rimpang temulawak, berbagai jenis gula, dan minuman temulawak

Sampel	Kadar total fenol (%)
Ekstrak air rimpang temulawak	
10 g/L	0,096
20 g/L	0,116
30 g/L	0,126
Berbagai jenis gula	
Gula Kristal Putih (GKP)	0,0032
Gula Kristal Merah (GKM)	0,0089
Gula Aren (GA)	0,1996
Gula Merah (GM)	0,2760
Minuman temulawak	
10 g/L+GKP	0,208
10 g/L+GKM	0,225
10 g/L+GA	0,315
10 g/L+GM	0,752
20 g/L+GKP	0,310
20 g/L+GKM	0,382
20 g/L+GA	0,497
20 g/L+GM	0,783
30 g/L+GKP	0,472
30 g/L+GKM	0,512
30 g/L+GA	0,699
30 g/L+GM	0,801

Demikian pula dari hasil analisis data yang ditunjukkan pada Tabel 13 dapat diketahui bahwa terjadi sinergisme antara kadar total fenol temulawak dengan kadar total fenol berbagai jenis gula terhadap minuman temulawak yang

dihasilkan sehingga kadar total fenol pada minuman temulawak 2-5 kali lebih tinggi dari penjumlahan kadar total fenol pada temulawak saja dan berbagai jenis gula saja. Sinergisme dalam minuman temulawak dengan berbagai jenis gula dapat terjadi karena menurut Gordon (1990), senyawa fenolik yang merupakan antioksidan primer bersifat sinergis dengan senyawa fenolik dan beberapa senyawa antioksidan primer lain serta beberapa senyawa antioksidan sekunder seperti asam sitrat, asam askorbat, dan esternya, oleh karena itu senyawa fenolik dalam temulawak bersinergis dengan senyawa fenolik dalam gula sehingga menghasilkan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dari penjumlahannya.

Kualitas sensoris minuman temulawak

Uji organoleptik adalah salah satu cara yang dapat digunakan untuk mengetahui kualitas sensoris terhadap suatu produk dengan menggunakan kepekaan alat indera manusia. Jenis uji organoleptik yang digunakan pada penelitian minuman temulawak adalah uji perbandingan jamak (*multiple comparison test*). Uji perbandingan jamak (*multiple comparison test*) digunakan untuk mengetahui apakah ada perbedaan diantara satu atau lebih contoh dengan dengan contoh baku (kontrol) dan untuk memperkirakan besarnya perbedaan yang ada (Setyaningsih 2008). Tujuan dari penggunaan uji perbandingan jamak (*multiple comparison test*) adalah untuk mengetahui kualitas sensoris terhadap minuman temulawak yang meliputi penilaian terhadap warna, rasa, dan aroma dibandingkan dengan minuman temulawak dari sirup temulawak yang dijual di pasaran. Pengujian ini dilakukan oleh 15 orang panelis agak terlatih.

Warna

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan SPSS menunjukkan bahwa penggunaan berbagai konsentrasi temulawak dan berbagai jenis gula tidak berpengaruh nyata terhadap warna minuman temulawak sehingga warna dalam minuman temulawak yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi temulawak dan jenis gula yang digunakan. Temulawak memiliki bau aromatik khas dengan rasa tajam dan pahit, serta memiliki karakteristik warna kuning kejinggaan sampai coklat (Anonim 2005)

Rasa

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan SPSS menunjukkan bahwa penggunaan berbagai konsentrasi temulawak dan berbagai jenis gula tidak berpengaruh nyata terhadap rasa minuman temulawak sehingga rasa pada minuman temulawak yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi temulawak dan jenis gula yang digunakan.

Aroma

Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan SPSS menunjukkan bahwa penggunaan berbagai konsentrasi temulawak dan berbagai jenis gula tidak berpengaruh terhadap aroma minuman temulawak. Aroma dalam minuman temulawak yang dihasilkan tidak dipengaruhi oleh konsentrasi temulawak dan jenis gula yang digunakan.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah (i) Semakin besar konsentrasi temulawak yang digunakan maka semakin besar aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) dan kadar total fenol karena semakin banyak terekstrak senyawa-senyawa fenolik larut air yaitu xanthorrhizol yang bekerja sebagai antioksidan; (ii) Aktivitas penangkapan radikal bebas (DPPH) pada gula kristal putih dan gula kristal merah berbeda secara signifikan dengan gula aren dan gula merah yaitu berturut-turut dari yang paling tinggi ke rendah gula merah, gula aren, gula kristal merah dan gula kristal putih. (iii) Kadar total fenol pada gula kristal putih, gula kristal merah, gula aren, dan gula merah berbeda secara signifikan yaitu berturut-turut dari yang paling tinggi ke rendah gula merah, gula aren, gula kristal merah, gula kristal putih. (iv) Terjadi efek sinergisitas dari penambahan gula terhadap kapasitas antioksidan minuman temulawak yang dihasilkan, terbukti dengan peningkatan kapasitas antioksidan minuman temulawak bila dibandingkan dengan penjumlahan kapasitas antioksidan ekstrak air temulawak saja dan kapasitas antioksidan gula saja. (v) Hasil analisis kualitas sensoris minuman temulawak terhadap warna, rasa, dan aroma tidak berbeda nyata dengan kontrol minuman temulawak yang dibuat dari sirup temulawak yang dijual di pasaran. (vi) Minuman temulawak dengan ekstrak temulawak 30 g/L menggunakan gula merah memiliki kapasitas antioksidan tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afifah E. 2003. Khasiat dan Manfaat Temulawak Rimpang Penyembuh Aneka Penyakit. PT Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Anonim. 2005. Gerakan Nasional Minum Temulawak. Info POM (Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia). Vol. 6, No. 6, November 2005.
- Anonim. 2009. Sugar Food-Info of Wageningen University Netherlands. <http://www.food-info.net/>. (Diakses tanggal 10 November 2009).
- Anonim. 2010. Curcumin Tincture (tinctura *Curcuma xanthorrhiza*). <http://pdf-search-engine.com/curcuminoid-compounds-curcuma-xanthorrhiza-pdf.html>. (Diakses tanggal 10 Juli 2010).
- Christy D. 2006. Seri Penemuan: Penemuan Gula. PT Elex Media Komputindo Kelompok Gramedia, Jakarta.
- Cowan MM. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews Vol.12 No.4.
- Dorman HJD, Deans SG. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oil. J Appl Microbiol 88: 308-316.
- Gordon MH. 1990. The mechanism of antioxidants action in vitro. In: Hudson BJF (ed). Food Antioxidants. Elsevier, London.
- Harborne BJ. 1987. Metode Fitokimia, Penerbit ITB, Bandung.
- Hastuti P. 2007. Komposisi Bahan Makanan dan Sifatnya. <http://images.gizikesehatan07.multiply.multiplycontent.com/>. (Diakses tanggal 7 November 2009).
- Hugot E. 1986. Hand Book of Cane Sugar Engineering, 3rd ed. Elsevier Amsterdam.
- KSU Sukajaya. 2005. Pengolahan, Produksi, dan Pemasaran Gula Aren. Bahan Presentasi, Rangkasbitung. Banten
- Kumalaningsih S. 2006. Antioksidan Alami. Trubus Agrisrana. Surabaya.
- Kunia K. 2006. Temulawak, Ginsengnya Indonesia. Pusat Bioteknologi ITB, Bandung.
- Majeed M, Vladimir B, Uma S, Rjendran R. 1995. Curcuminoids Antioxidant Phytonutrients. Nutriscience. Publ. Inc. Piscataway, New Jersey.
- Masuda T, Isobe J, Jitoe A, Nakatani N, Yonemori S. 1993. Antioxidative and Anti-inflammatory Curcumin-related Phenolics from Rhizomes of *Curcuma domestica*. Phytochem. 32 (6): 1557-1560.
- Masuda T, Isobe J, Jitoe A, Nakatani N. 1992. Antioxidative curcuminoids from rhizomes of *Curcuma xanthorrhiza*. Phytochem. 31 (10): 3645-3647.
- Nursten H. 2005. The Maillard Reaction, Chemistry, Biochemistry and Implications. Royal Society of Chemistry; Atheneum Press Ltd, Cambridge, UK.
- Plummer DT. 1971. An introduction of Practical Biochemistry. McGraw Hill Book Co. Ltd. Maidenhead Berkshire, UK.
- Pokorny J, Yanishlieva N, Gordon M. 2001. Antioxidant in Food. CRC Press Cambridge. UK.
- Rukmana R. 1995. Temulawak Tanaman Rempah dan Obat. Kanisius, Yogyakarta.
- Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. 1989. Phenolic compounds of the mesocarp of crethaven peaches during storage and ripening. J. Food Sci. 54: 1259-1260 and 1268.
- Setyaningsih D, Apriyantonno A, Sari MP. 2008. Analisis Sensori untuk Agroindustri. Bogor
- Subagio A, Morita N. 2001. No effect of esterification with fatty acid on antioxidant activity of lutein. Food. Res Intl 34:315-320.
- Tranggono. 1990. Bahan Tambahan Pangan (Food Additives). PAU PG. UGM, Yogyakarta.

Uji berbagai konsentrasi ekstrak mahkota dewa dan meniran serta penambahan pupuk organik cair pada pertumbuhan tunas pegagan (*Centella asiatica*) secara in vitro

An examination on various concentrations of mahkota dewa and meniran extract and liquid organic fertilizer in *Centella asiatica* shoot growth in vitro

VENI SISKAYANTI, RETNA BANDRIYATI ARNIPUTRI, PRASWANTO

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

Manuskrip diterima: 4 Maret 2016. Revisi disetujui: 9 Juni 2016.

Abstract. Siskayanti V, Arniputri RB, Praswanto. 2016. An examination on various concentrations of mahkota dewa and meniran extract and liquid organic fertilizer in *Centella asiatica* shoot growth in vitro. *Biofarmasi* 14: 47-55. *Centella* (*Centella asiatica* L.) is one plant utilized as the traditional medicine because it has many benefits, one of which is to fulfill the brain requirement. The aims of this research was to know of media type, mahkota dewa and meniran extract, concentration of meniran, concentration of mahkota dewa, and concentration of liquid organic fertilizer what as well as shoot growth of *Centella* using tissue culture and filtering (2k design) that is expected it can be screened of the basic media types, organic material types (mahkota dewa and meniran extract), meniran concentration, mahkota dewa concentration and liquid organic fertilizer concentration. This research was taken place in Plant Physiology and Biotechnology Laboratory of Agriculture Faculty of Sebelas Maret University, from November 2010 to June 2011. This research used 2k design with RAL environment. Factor 1: Media type (½ MS and MS); Factor 2: Concentration of liquid organic fertilizer (2 mL/L and 20 mL/L); Factor 3: Concentration of *meniran* 5 mL/L and 25 mL/L; and Factor 4: Concentration of mahkota dewa (5 mL/L and 25 mL/L). Thus, there is 24 = 16 treatment combinations, each of which is repeated three times. The variables observed are shoot emerging duration, shoot number, shoot height, and leaves number. The data were analyzed descriptively. The result of research showed that basic media MS, that basic media MS, POC 20 mL/L, and *meniran* extract 5 mL/L provided the best explants growth of *Centella* through in vitro.

PENDAHULUAN

Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb.) merupakan salah satu tanaman yang dapat tumbuh dimana saja, seperti di kebun, sawah ataupun pinggiran jalan dan ternyata tanaman ini telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Secara empirik *C. asiatica* dapat menggantikan ginkgo biloba sebagai pemenuh kebutuhan otak hingga juga bisa menyembuhkan beberapa penyakit seperti disentri ataupun tuberculosius. Penemuan terbaru yaitu tanaman ini pun juga mampu menghambat virus HIV yang dapat mempertahankan kekebalan tubuh si penderita.

Hal tersebut menarik perhatian industri farmasi maupun perusahaan jamu untuk dapat mengembangkan serta memanfaatkan *C. asiatica* tetapi saat ini, tanaman tersebut yang dikembangkan secara konvensional belum mampu memenuhi kebutuhan dalam skala besar. Kebutuhan *C. asiatica* yang harus dipenuhi pada sebuah perusahaan jamu tiap tahunnya adalah sebanyak 25 ton, tetapi saat ini, per tahun baru bisa terpenuhi 4 ton saja (Pusat Studi Biofarmaka-IPB Bogor 2010).

Kultur jaringan merupakan salah satu alternatif budidaya tanaman untuk menghasilkan tanaman dalam skala besar sebab dengan teknik ini, lingkungan tumbuh in

vitro terkendali sehingga tanaman yang ingin dikembangkan tidak harus bergantung musim dan bebas penyakit. Penambahan ekstrak tanaman atau sering disebut dengan penambahan bahan organik pada media tanam yang mengandung antibiotik mampu menekan pertumbuhan bakteri yang berkembang biak serta membantu pertumbuhan eksplan yang ditanam.

Komponen lain seperti senyawa nitrogen organik, berbagai asam organik, metabolit dan ekstrak tambahan tidak mutlak tetapi dapat menguntungkan ketahanan sel dan perbanyakan (Wetter et al. 1991). Pada tahun 1937, Robbins dan White (1937), melakukan percobaan kultur jaringan dengan menambahkan ekstrak ragi kedalam medium. Hasil percobaan ini menunjukkan bahwa ekstrak ragi dapat memperbaiki pertumbuhan akar. Penelitian lain juga menambahkan bahan organik pada kultur anggrek yang menggunakan penambahan air kelapa. Air kelapa juga mengandung zeatin dan ribozeatin (kelompok zat tumbuh sitokinin) yang mempunyai kemampuan dalam merangsang pembelahan dan diferensiasi sel, terutama dalam hal pembentukan pucuk tanaman dan pertumbuhan akar (Hess 1975 dalam Widiastoety et al. 1997).

Ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dan mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) juga

merupakan bahan organik. Hal terpenting dalam penggunaan kedua tanaman tersebut karena keduanya mengandung alkaloid yang dapat menekan pertumbuhan bakteri maupun infeksi jamur dan diharapkan senyawa ini dapat dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman.

Pertumbuhan tanaman yang diawali dari pembentukan tunas dalam teknik kultur jaringan membutuhkan penambahan nutrisi. Nutrisi yang dibutuhkan tanaman, tentu saja yang dapat memacu pertumbuhan tanaman tersebut untuk kemunculan tunas dan juga yang mengandung unsur makro serta mikro, biasanya nutrisi dalam kultur jaringan didapat dari penambahan hormon dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Namun ternyata penggunaan pupuk organik cair juga dapat menggantikan peran dari hormon maupun ZPT sebab pupuk organik cair telah mengandung unsur makro mikro maupun hormon.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis media dasar, jenis bahan organik (ekstrak mahkota dewa dan meniran), konsentrasi meniran, konsentrasi mahkota dewa, konsentrasi pupuk organik cair yang paling baik untuk perkembangan kultur tunas pegagan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan bulan November 2010-Juni 2011 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan dan Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bahan dan alat

Bahan tanaman yang akan digunakan sebagai eksplan adalah bagian mata tunas tanaman pegagan. Bahan kimia yang akan digunakan dalam penelitian ini meliputi media *Murashige and Skoog* (MS), aquades, chrox, fungisida, bakterisida, deterjen, spirtus, dan alkohol 70 %. Selain itu juga menggunakan ekstrak tanaman antibiotik yaitu mahkota dewa dan meniran. Serta menggunakan pupuk organik cair untuk kebutuhan unsur hara bagi tanaman pegagan.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Botol kultur; *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC); Timbangan analitik; Plastik PP 0,4; pH meter; Autoklaf dan Thermoshaker.

Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan metode screening yaitu 2k dengan rancangan lingkungan RAL yang disusun secara faktorial dengan 4 faktor yang masing-masing mempunyai 2 taraf perlakuan, yaitu: (i) Faktor 1: Media dasar *Murashige and Skoog* (MS) = $\frac{1}{2}$ MS dan MS; (ii) Faktor 2: Konsentrasi pupuk organik cair = 2 mL/L dan 20 mL/L; (iii) Faktor 3: Konsentrasi meniran = 5 mL/L dan 25 mL/L; (iv) Faktor 4: Konsentrasi mahkota dewa = 5 mL/L dan 25 mL/L. Maka ada 24 = 16 kombinasi perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali (Tabel 1).

Tabel 1. Kombinasi perlakuan

		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	1	5	9	13
	25 mL/L	2	6	10	14
Mahkota dewa	5 mL/L	3	7	11	15
	25 mL/L	4	8	12	16

Cara kerja

Pembuatan larutan stok

Pembuatan larutan stok yaitu dengan menimbang bahan-bahan kimia, hara makro, maupun hara mikro sesuai komposisi media MS untuk dibuat larutan stok. Kemudian bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades dan diaduk sampai homogen dengan *magnetic stirrer*, kemudian dimasukkan dalam botol yang diberi label pada tiap botolnya sesuai dengan perlakuan dan disimpan dalam lemari pendingin.

Pembuatan ekstrak

Ekstrak tanaman antibiotik menggunakan tanaman mahkota dewa dan meniran. Pengambilan tanaman dari lapang juga harus memperhatikan kualitas tanamannya, yaitu tanaman yang berwarna hijau segar, tidak terlalu banyak serangan hama. Kemudian tanaman dicuci bersih hingga tidak ada kotoran yang tertinggal. Setelah itu ditimbang sebanyak 80 g berat segar. Lalu tanaman tersebut direndam dengan menggunakan fungisida selama 10 menit dan dilanjutkan direndam pada deterjen selama 5 menit. Setelah itu dibilas dengan air mengalir hingga bersih lalu dibilas pula dengan aquades steril. Setelah semua tanaman telah bersih, masing-masing tanaman baik meniran maupun biji mahkota dewa yang sudah ditimbang sebanyak 80 g, lalu di blender dengan menambahkan aquades sebanyak 200 mL. Setelah itu diambil ekstrakanya.

Pembuatan media tanam

Pembuatan media dengan mengambil dan menakar masing-masing larutan stok sesuai dengan perlakuan dan ukuran yang telah ditentukan serta menambahkan ekstrak dan pupuk organik cair sesuai perlakuan kemudian memasukkannya ke dalam labu takar. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan aquades sampai volume larutan mencapai 1 liter. Kemudian ditambahkan gula sebanyak 30 g. Larutan dimasukkan dalam beker glass dan diaduk serta dididihkan dengan menggunakan magnetik stirer dan hot plate.

Langkah selanjutnya yaitu pengukuran pH larutan. pH media diatur pada kisaran 5,6-5,8. Apabila pH terlalu rendah ditambahkan dengan NaOH dan bila pH terlalu tinggi ditambahkan dengan HCl. Setelah pH telah sesuai, kemudian larutan ditambahkan bahan pematat media yaitu agar-agar sebanyak 8 g. Setelah semua larutan terlarut, maka tahap selanjutnya adalah menuangkan larutan tersebut ke botol-botol kultur, kurang lebih 25 mL setiap botolnya.

Botol ditutup dengan plastik PP dan kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, pada tekanan 1,5 kg/cm³ selama 45 menit. Setelah selesai, botol diangkat dari autoklaf dan di tempatkan di ruang inkubasi supaya media menjadi padat. Apabila media telah memadat, maka penanaman eksplan dapat dilakukan.

Sterilisasi alat

Alat-alat yang harus disterilkan diantaranya adalah botol kultur, petridish, skalpel, dan pinset. Alat-alat tersebut dicuci sampai bersih dengan menggunakan sabun cuci kemudian dikeringkan. Setelah kering dibungkus dengan kertas koran (kecuali botol kultur) lalu dimasukkan ke dalam autoklaf pada tekanan 1,5 Psi (kg/cm²), pada suhu 121°C selama 45 menit.

Sterilisasi eksplan dan penanaman

Bahan tanaman yang digunakan sebagai eksplan adalah mata tunas tanaman pegagan. Eksplan dicuci dengan deterjen sampai bersih dan dibilas dengan air mengalir, kemudian digojog dalam campuran larutan Agrept dan Dithane selama 12 jam dengan shaker dan dibilas dengan air mengalir. Lalu direndam dalam larutan detergen selama 5 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dibilas dengan aquades steril. Eksplan yang telah steril dibawa ke dalam LAFC dan disterilisasi dalam larutan clorox yang telah dicampur aquades dengan perbandingan 1:2 selama 5 menit dan dibilas aquades steril.

Penanaman eksplan dilakukan di dalam LAFC (*Laminar Air Flow Cabinet*) yang telah dibersihkan terlebih dahulu dengan alkohol 70 % dan ruang LAFC disemprotkan dengan *atolinuseartau* spirtus. Kemudian ekspl dikeluarkan dari botol dengan menggunakan pinset panjang yang telah direndam dalam alkohol dan dibakar diatas lampu bunsen, eksplan siap ditanam dalam botol kultur dan kemudian ditutup kembali dengan plastik pp 0,4. Botol-botol yang telah selesai diberi label sesuai dengan perlakuan dan tanggal penanaman.

Pemeliharaan

Pemeliharaan dilakukan untuk meminimalisasi risiko kontaminasi dengan cara menyemprotkan spirtus ke botol-botol kultur setiap 2 hari sekali serta mengeluarkan botol-botol kultur yang terkontaminasi dari ruang inkubasi.

Variabel pengamatan

Saat muncul tunas

Pengamatan munculnya tunas dilakukan setiap hari pada tiap–tiap botol kultur dengan menghitung berapa hari tunas sudah mulai muncul atau tumbuh.

Jumlah tunas yang Terbentuk

Pengamatan jumlah tunas dilakukan setiap hari pada tiap–tiap botol kultur dengan menghitung berapa jumlah tunas yang sudah muncul pada setiap botol.

Tinggi tunas

Tinggi diamati pada akhir pengamatan, dengan mengukur tinggi dari pangkal batang hingga ujung daun tertinggi.

Jumlah daun

Jumlah daun diamati pada akhir pengamatan, dilakukan dengan menghitung jumlah buku yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Saat Muncul tunas

Munculnya tunas merupakan faktor penting dalam budidaya secara in vitro untuk mengetahui perkembangan dan pertumbuhan eksplan. Tunas terbentuk dari hasil diferensiasi sel eksplan. Semakin cepat muncul tunas makasemakin cepat pula dihasilkan bahan untuk perbanyak tanaman. Pada dasarnya induksi tunas dipengaruhi oleh penggunaan zat pengatur tumbuh salah satunya adalah sitokinin (Wattimena 1991), namun pada penelitian ini tidak menggunakan zat pengatur tumbuh, melainkan menggunakan pupuk organik cair. Dan menggunakan penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa sebagai fitohormon yang berfungsi untuk pertahanan anti bakteri. Rata- rata saat muncul tunas eksplan pegagan tiap kombinasi perlakuan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. menunjukkan bahwa rata-rata saat muncul tunas tercepat dari eksplan pegagan yaitu pada kombinasi No 1. yang merupakan kombinasi antara penggunaan media dasar ½ MS serta penambahan POC 2 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L muncul pada 7,6 HST. Hal ini dapat terjadi karena diduga adanya penambahan pupuk organik cair sebanyak 2 mL/L, meskipun hanya menggunakan ½ MS sudah dapat memunculkan tunas pegagan. Pupuk organik cair juga mengandung hormon (zat pengatur tumbuh) seperti sitokinin, auksin dan giberelin yang dapat membantu pertumbuhan tanaman (Suskendriyati 2003).

Hal lain terjadi pada kombinasi no.12 yang mengalami kelambatan dalam memunculkan tunas yaitu 33 HST. Kombinasi perlakuan no.12 terdiri dari MS, POC 2 mL/L dan ekstrak mahkota dewa 25 mL/L. Hal ini diduga penambahan ekstrak mahkota dewa menghambat pertumbuhan tunas yang akan muncul. Menurut Sevon dan Candentey (2002) senyawa yang terkandung dalam mahkota dewa seperti alkaloid dan saponin dapat menghambat pembelahan sel. Pada Tabel 2. dapat dilihat bahwa untuk semua kombinasi perlakuan yang diberikan penambahan ekstrak mahkota dewa mengalami pertumbuhan yang lama hingga tidak tumbuh tunas sama sekali dibandingkan dengan yang menggunakan ekstrak meniran yaitu pada kombinasi no. 3, 4, 7, 8, 11, 12, 15 dan 16. Histogram pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas Gambar 1.

Pada Gambar 1. dapat dilihat bahwa penambahan ekstrak meniran lebih banyak memunculkan tunas eksplan pegagan yaitu 54% dibandingkan ekstrak mahkota dewa yang hanya 12% seperti yang telah dipaparkan sebelumnya bahwa ternyata mahkota dewa memiliki senyawa yang dapat menghambat pembelahan sel yang menyebabkan pertumbuhan tunas juga terganggu. Sedangkan pada tanaman meniran terdapat senyawa filantin yang dapat membantu dalam pertumbuhan tunas (Putra 2010). Hal ini

berarti penambahan ekstrak meniran dapat memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan tunas eksplan pegagan.

Pada penelitian ini, kemunculan tunas tidak hanya berasal dari faktor penambahan bahan organik yaitu ekstrak meniran maupun mahkota dewa tetapi juga pengaruh dari media dasar dalam penanaman eksplan pegagan itu sendiri. Media dasar yang digunakan yaitu MS (Murashige and Skoog) dengan taraf $\frac{1}{2}$ MS serta MS. Media MS merupakan media dasar yang paling banyak digunakan, baik untuk tanaman herba maupun berkayu, selain itu juga modifikasi media MS juga banyak digunakan (Pierik 1987).

Pada Gambar 2 terlihat bahwa penggunaan media dasar dengan taraf MS lebih banyak dalam menghasilkan persentase keberhasilan tumbuh tunas eksplan pegagan dibandingkan dengan taraf $\frac{1}{2}$ MS yaitu nilai persentase untuk masing-masing taraf adalah MS sebesar 37% dan $\frac{1}{2}$ MS sebesar 29%. Hal ini menunjukkan bahwa eksplan pegagan yang dikulturkan lebih responsif terhadap penggunaan media dasar dengan taraf MS meskipun dengan menggunakan $\frac{1}{2}$ MS pun juga ada beberapa eksplan pegagan yang dapat muncul tunas tetapi membutuhkan waktu yang lama.

Pertumbuhan kemunculan tunas yang relatif banyak dengan menggunakan media dasar dengan taraf MS ini, disebabkan adanya kandungan total ion yang tinggi pada media dasar MS, khususnya NH_4 . Amonium dapat meningkatkan biosintesis sitokinin alami yang berperan dalam menstimulasi pertunasan (Hyndman et al. 1982). Maka penggunaan media dasar MS cocok untuk digunakan dalam menumbuhkan eksplan pegagan secara kultur jaringan, meskipun menggunakan taraf $\frac{1}{2}$ MS pun juga bisa tumbuh dengan waktu yang cukup lama.

Penambahan pupuk organik cair pada penelitian ini juga dijadikan salah satu faktor dalam mengkulturkan eksplan pegagan. Pupuk organik cair selain dapat memperbaiki sifat fisik, kimia, dan biologi tanah, membantu meningkatkan produksi tanaman, meningkatkan kualitas produk tanaman, mengurangi penggunaan pupuk anorganik dan sebagai alternatif pengganti pupuk kandang (Indrakusuma 2000). Pada penelitian ini, penggunaan pupuk organik berfungsi sebagai pengganti penggunaan zat pengatur tumbuh seperti auksin, sitokinin maupun giberelin serta unsur hara makro dan mikro.

Nutrisi sangat penting bagi pertumbuhan dan perkembangan tanaman, tanpa air dan mineral tanaman tidak dapat hidup (Arniputri 1993). Pada Gambar 3 terlihat bahwa pemberian POC (pupuk organik cair) dengan konsentrasi 2 mL/L dapat memberikan nilai persentase keberhasilan tumbuh tunas yang lebih besar dari pada POC konsentrasi 20 mL/L yaitu sebesar 37% sedangkan POC konsentrasi 20 mL/L hanya mampu memunculkan tunas sebesar 28%. Hal ini menunjukkan bahwa dengan pemberian POC 2 mL/L telah mampu memunculkan tunas eksplan pegagan. Menurut Parman (2007), POC mengandung unsur N (Nitrogen) yang berperan sebagai penyusun protein sedangkan fosfor dan kalsium berperan dalam memacu pembelahan jaringan meristem dan merangsang pertumbuhan akar dan perkembangan daun.

Pada penelitian ini juga menggunakan penambahan bahan organik yaitu ekstrak mahkota dewa dan meniran dengan masing-masing faktor, menggunakan 2 taraf yaitu konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas disajikan dalam Gambar 4.

Dari Gambar 4 dapat terlihat bahwa penambahan bahan organik, baik yang menggunakan ekstrak meniran ataupun mahkota dewa, ternyata pada konsentrasi 5 mL/L sudah dapat memberikan kemunculan tunas eksplan pegagan dibanding konsentrasi 25 mL/L. Penambahan ekstrak meniran dengan konsentrasi 5 mL/L, memunculkan tunas lebih banyak yaitu 75% dibandingkan dengan yang konsentrasi 25 mL/L yang 33%. Begitu juga halnya dengan penambahan ekstrak mahkota dewa dengan konsentrasi 5 mL/L dapat memunculkan tunas lebih banyak yaitu 17% daripada konsentrasi 25 mL/L yang hanya memunculkan tunas sebanyak 8%. Hal ini diduga penambahan konsentrasi yang terlalu banyak dapat menghambat pertumbuhan dari eksplan pegagan itu sendiri, sehingga konsentrasi 5 mL/L dirasa lebih baik daripada konsentrasi sebesar 25 mL/L. Hal lain dalam penggunaan bahan organik memang harus disesuaikan dengan jenis eksplannya terlebih dahulu.

Pada Gambar 5 menunjukkan bahwa pada 19 HST kombinasi antara penggunaan media dasar $\frac{1}{2}$ MS serta penambahan POC 2 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L muncul tunas ke dua. Kemunculan tunas eksplan pegagan secara kultur jaringan juga dipengaruhi oleh faktor eksplannya itu sendiri, maka sangat penting sekali dalam melakukan pemilihan eksplan yang baik dari lapang, sebelum dilakukan penanaman. Eksplan adalah bahan tanam yang kecil dan masih aktif untuk membelah. Maka dari itu dalam kultur jaringan tanaman pegagan, bagian yang digunakan sebagai eksplan yaitu tunas yang terbentuk karena pada bagian tersebut merupakan bagian yang masih aktif mengalami pembelahan sehingga memudahkan dalam terbentuknya tunas baru.

Jumlah tunas

Tunas adalah bagian dari tanaman yang tumbuh dalam rangka melangsungkan keturunan pada tanaman tersebut. Semakin banyak tunas yang terbentuk maka tahap multiplikasinya semakin tinggi maka dari itu jumlah tunas sangat penting dalam kultur jaringan tanaman. Pada variabel jumlah tunas ini, sangat terlihat perbedaannya pada penambahan pupuk organik cair (POC). Histogram faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk disajikan dalam Gambar 6.

Pada Gambar 6 terlihat bahwa penambahan POC sebanyak 20 mL/L memberikan pengaruh terhadap banyaknya jumlah tunas yang terbentuk yaitu 0,94 dibandingkan POC 2 mL/L yaitu hanya 0,83. Hal ini diduga karena dalam pembuatan media penanaman, POC terakumulasi dengan media dasar MS itu sendiri, yang mana media MS itu sendiri mengandung banyak unsur sama halnya dengan POC yang mengakibatkan terjadi kompetisi unsur. Menurut Suryanti (2011) bahwa pengaplikasian POC secara konvensional hanya

membutuhkan 2 mL/L untuk jenis tanaman herbaceous, hal ini berarti apabila POC diaplikasikan secara kultur jaringan harus membutuhkan konsentrasi yang lebih banyak dibanding budidaya secara konvensional.

Pada Tabel 3 dapat dilihat pada kombinasi no 13, yang terdiri dari media dasar MS; POC 20 mL/L; meniran 5 mL/L dapat membentuk tunas paling banyak dari kombinasi lainnya yaitu dengan nilai rata-rata sebesar 2,5. Hal ini diduga, pada kombinasi ini merupakan kombinasi yang tepat dengan penambahan konsentrasi dari MS, ekstrak meniran 5 mL/L serta POC 20 mL/L. Diketahui bahwa, dalam teknik kultur jaringan perlu memperhatikan konsentrasi yang tepat sebab media dasar seperti MS, membutuhkan bahan organik atau zat pengatur tumbuh untuk merangsang pertumbuhan dari tunas suatu eksplan (Wattimena 1991). Sedangkan kombinasi no 9, yang juga terdiri dari media dasar MS; meniran 5 mL/L; dan POC 2 mL/L, jumlah tunas yang terbentuk yaitu 2. Diduga penambahan POC dengan konsentrasi yang berbeda, dapat dilihat pada Tabel 3, bahwa dengan penambahan POC 20 mL/L jumlah tunas yang terbentuk lebih banyak dihasilkan.

Dalam perbanyakan secara *in vitro* beberapa metode dapat ditempuh melalui perbanyakan tunas aksilar dan adventif, baik secara langsung maupun tidak langsung. Secara tidak langsung, pembentukannya terjadi melalui tahap pembentukan kalus. Pada penelitian ini, muncul tunas tanpa diawali dengan pembentukan kalus terlebih dahulu. Dari Gambar 7 dapat terlihat perbedaan antara kombinasi no. 13 yang dapat membentuk tunas lebih banyak daripada kombinasi perlakuan no 9. Hal ini sesuai dengan pendapat Rao (1994) dan Poewowidodo (1992) yang mengatakan bahwa pupuk organik cair mengandung unsur kalium yang berperan penting dalam setiap proses metabolisme tanaman, yaitu dalam sintesis asam amino dan protein dari ion-ion ammonium serta berperan dalam memelihara tekanan turgor dengan baik sehingga memungkinkan lancarnya proses-proses metabolisme dan menjamin kesinambungan pemanjangan sel.

Jumlah tunas yang terbentuk juga dipengaruhi oleh adanya penambahan dari ekstrak meniran dan mahkota dewa yang juga dipengaruhi oleh konsentrasi penambahan dari kedua ekstrak tersebut. Histogram faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap jumlah tunas yang terbentuk disajikan pada Gambar 8.

Pada Gambar 8, terlihat bahwa penambahan ekstrak meniran lebih banyak menghasilkan terbentuknya tunas eksplan pegagan daripada ekstrak mahkota dewa. Nilai rata-ratanya adalah untuk ekstrak meniran yaitu 1,4 sedangkan ekstrak mahkota dewa hanya 0,37. Hal ini diduga ekstrak dari meniran bekerja secara optimal sehingga eksplan pegagan lebih responsif terhadap ekstrak tersebut. Hal ini berarti sesuai dengan Andini (2010) yang menyatakan bahwa tanaman meniran yang diekstrak akan bekerja secara optimal sebab mampu meningkatkan aktivitas sel yang membantu dalam pembelahan meristem sehingga meningkatkan pertumbuhan tanaman. Maka untuk membentuk jumlah tunas eksplan pegagan secara kultur jaringan, dapat menambahkan ekstrak meniran sesuai kebutuhan. Hal ini juga terjadi pada pemberian konsentrasi 5 mL/L ekstrak meniran yang meningkatkan hasil lebih

banyak daripada konsentrasi 25 mL/L. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran disajikan pada Gambar 9.

Terlihat pada Gambar 9, bahwa meniran 5 mL/L lebih banyak membentuk tunas yaitu 1,79 sedangkan meniran 25 mL/L hanya 1. Hal ini diduga penggunaan konsentrasi ekstrak meniran yang terlalu banyak menghambat metabolisme dan proses fisiologis pada tumbuhan yang mengakibatkan jaringan meristem tidak dapat menyerap nutrisi yang diberikan dengan baik. Hal yang sama juga terjadi pada ekstrak mahkota dewa.

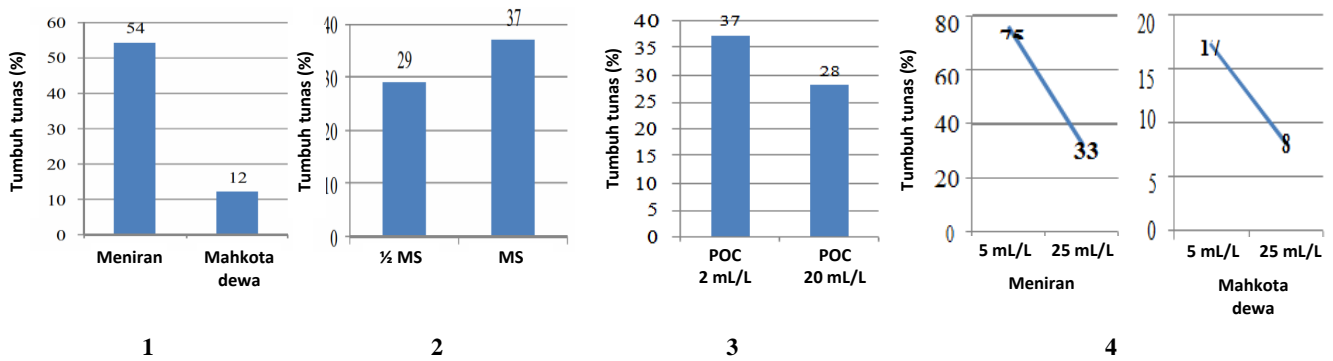
Pada Gambar 10. Konsentrasi 25 mL/L lebih sedikit membentuk tunas eksplan pegagan yaitu 0,25 sedangkan pada konsentrasi 5 mL/L lebih banyak yaitu 0,5. Sama halnya dengan ekstrak meniran, pada penambahan ekstrak mahkota dewapun, apabila penambahan ekstrak dengan konsentrasi yang terlalu banyak juga menghambat pertumbuhan tunas yang akan muncul.

Faktor media dasar juga memberikan pengaruh terhadap jumlah tunas yang terbentuk pada eksplan pegagan. Gambar 11, menunjukkan bahwa penggunaan media dasar MS lebih banyak membentuk tunas daripada $\frac{1}{2}$ MS dengan nilai rata-rata yaitu MS 1,1 dan $\frac{1}{2}$ MS 0,7. Yuniyati (2005) melaporkan bahwa media dasar $\frac{1}{2}$ MS lebih tepat untuk perkecambahan biji dan pertumbuhan protokorm anggrek *Dendrobium* hibrida. Sehingga untuk membentuk tunas pada tanaman herbaceous seperti pegagan membutuhkan konsentrasi penuh dari MS. Media MS mengandung unsur N yang banyak sehingga eksplan pegagan responsif dan dapat melakukan metabolisme dengan baik sehingga membentuk tunas anakan.

Tinggi tunas

Tinggi tunas merupakan variabel yang diamati pada akhir pengamatan, yaitu dengan mengukur tinggi tunas dari pangkal tunas yang muncul hingga tunas tertinggi. Semakin tinggi tunas merupakan salah satu keberhasilan dalam melakukan multiplikasi. Histogram faktor Media terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 12.

Pada Gambar 12 terlihat bahwa, pemberian konsentrasi media dasar MS lebih besar menunjukkan nilai rata-rata daripada $\frac{1}{2}$ MS yaitu 1,25 cm untuk $\frac{1}{2}$ MS dan 1,75 cm untuk MS. Hal ini diduga karena pada penggunaan media MS dengan komposisi yang penuh memberikan pengaruh yang baik sehingga eksplan pegagan dapat responsif untuk melangsungkan metabolisme dan tunas dapat berkembang dengan tinggi. Seperti halnya dengan variabel saat muncul tunas serta jumlah tunas yang terbentuk, pemberian MS pun juga memberikan hasil yang lebih besar daripada $\frac{1}{2}$ MS. Media MS mengandung 40 mM N dalam bentuk NO_3 dan 29 mM N dalam bentuk NH_4^+ . Kandungan N ini, 15 kali lebih tinggi dari media tembakau Hildebrandt, dan 19 kali lebih tinggi dari media White. Kalium juga ditingkatkan sampai 20 mM, sedangkan P, 1,25 mM. Unsur makro lainnya konsentrasinya dinaikkan sedikit (Yuniyati 2005). Maka dengan penggunaan komposisi yang tepat pada media MS, dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman sehingga eksplan pegagan dapat tumbuh tinggi dengan maksimal.

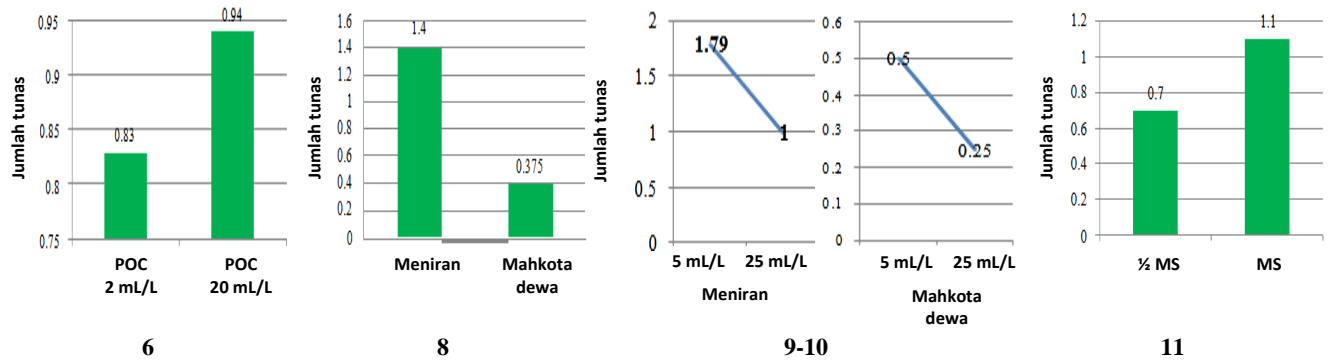


Gambar 1. Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkotadewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 2. Pengaruh faktor media dasar terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 3. Pengaruh faktor konsentrasi pupuk organik cair (POC) terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%)

Gambar 4. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap persentase keberhasilan tumbuh tunas (%) (a) Ekstrak meniran (b) Ekstrak mahkota dewa



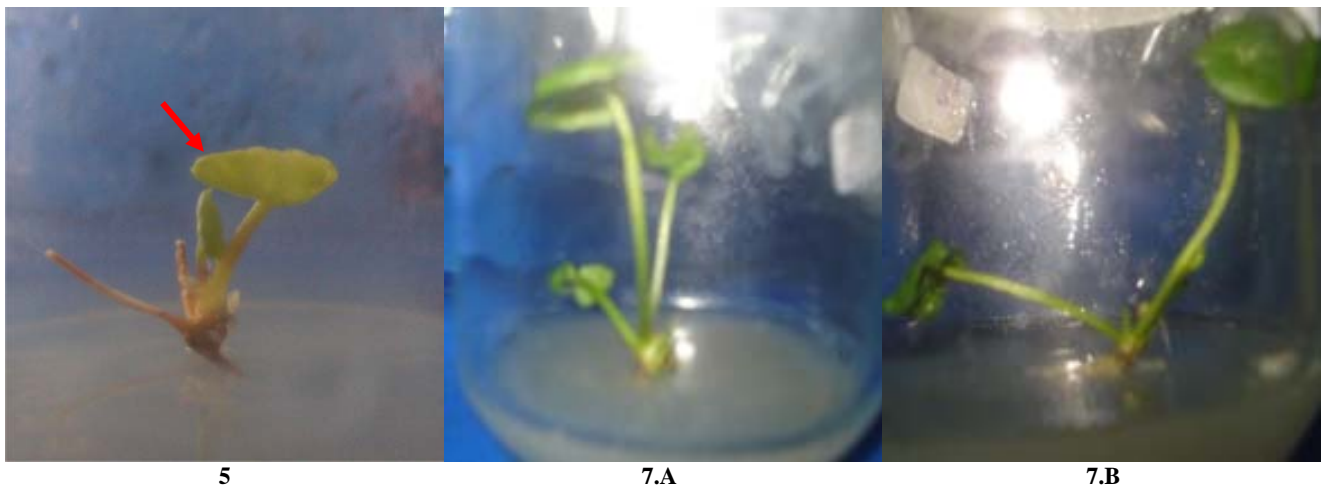
Gambar 6. Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 8. Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 9. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

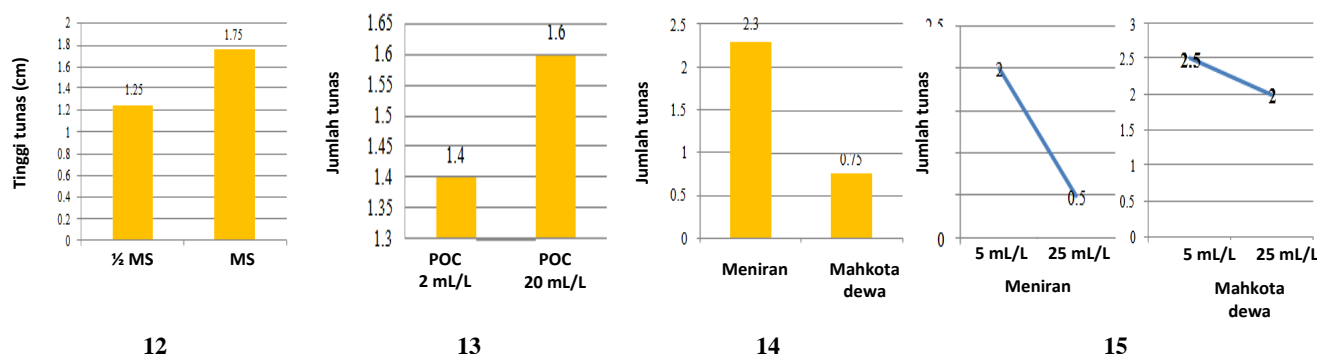
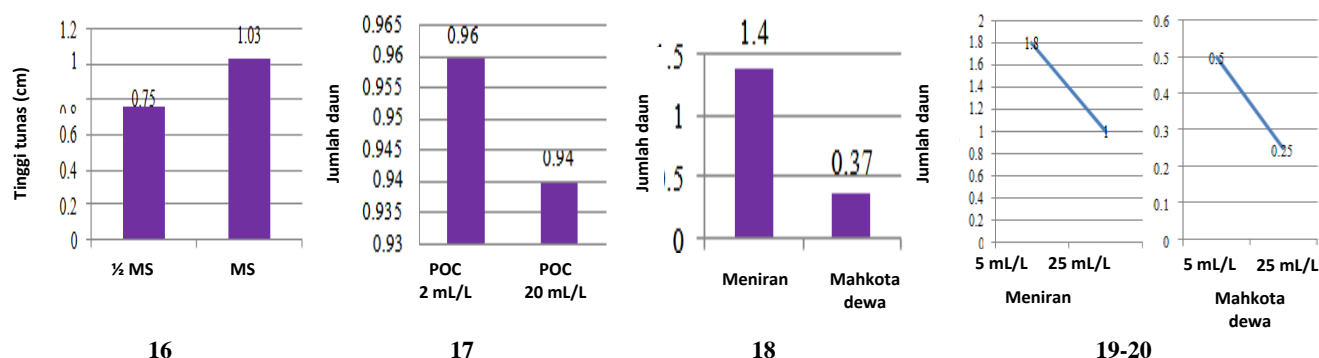
Gambar 10. Pengaruh konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk

Gambar 11. Pengaruh faktor media dasar terhadap rata-rata jumlah tunas yang terbentuk



Gambar 5. Tunas ke-2 kombinasi perlakuan No. 1, yang terbentuk pada 19 HST

Gambar 7. Tunas yang terbentuk pada 60 HST. A. Kombinasi perlakuan no. 13, B. Kombinasi perlakuan no. 9

**Gambar 12.** Pengaruh faktor media dasar terhadap rata-rata tinggi tunas (cm)**Gambar 13.** Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 14.** Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap tinggi tunas**Gambar 15.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/ ekstrak meniran terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 16.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata tinggi tunas**Gambar 17.** Pengaruh faktor media terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 18.** Pengaruh faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 19.** Pengaruh faktor penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun**Gambar 20.** Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun**Tabel 2.** Rata-rata saat muncul tunas eksplan pegagan (HST) tiap kombinasi

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	7,6	22	10,3	9
	25 mL/L	8	10	28	13
Mahkota dewa	5 mL/L	0	15	0	9
	25 mL/L	0	0	33	0

Keterangan: HST = hari setelah tanam

Tabel 4. Rata-rata tinggi tunas (cm) eksplan pegagan pada umur 60 HST tiap kombinasi perlakuan

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	2	2	3	3
	25 mL/L	2	2	2	2
Mahkota dewa	5 mL/L	0	2	0	2
	25 mL/L	0	0	2	0

Tabel 3. Rata-rata jumlah tunas eksplan pegagan yang terbentuk tiap kombinasi perlakuan pada umur 60 HST

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	1,66	1	2	2,5
	25 mL/L	1	1	1	1
Mahkota dewa	5 mL/L	0	1	0	1
	25 mL/L	0	0	1	0

Tabel 5. Rata-rata jumlah daun eksplan pegagan pada umur 60 HST tiap kombinasi perlakuan

Jenis bahan organik		$\frac{1}{2}$ MS		MS	
		POC 2 mL/L	POC 20 mL/L	POC 2 mL/L	POC 20 mL/L
Meniran	5 mL/L	2	1	1,7	2,5
	25 mL/L	1	1	1	1
Mahkota dewa	5 mL/L	0	1	0	1
	25 mL/L	0	0	1	0

Penambahan konsentrasi POC 20 mL/L juga memberikan pertumbuhan tinggi yang maksimal dibandingkan dengan POC 2 mL/L. Histogram faktor konsentrasi POC terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 13. Gambar 13, menunjukkan bahwa POC 20 mL/L memberikan nilai rata-rata tertinggi yaitu 1,6 cm daripada POC 2 mL/L hanya 1,4 cm. Hal ini diperkirakan bahwa pemberian pupuk organik cair dapat menyebabkan terdorongnya atau terpacunya sel diujung batang untuk segera mengadakan pembelahan dan pembesaran sel terutama didaerah meristematis. Hal ini sesuai dengan Suryanti (2011) yang menyatakan bahwa pemberian pupuk organik cair yang mengandung unsur N, P, K, Mg dan Ca akan menyebabkan terpacunya sintesis dan pembelahan dinding sel secara antiklinal sehingga akan mempercepat pertambahan tinggi tanaman.

Pada Gambar 14, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak meniran juga memberikan rata-rata tinggi tunas tertinggi daripada mahkota dewa yaitu sebesar 2,3cm dan nilai rata-rata ekstrak mahkota dewa yaitu 0,75cm. Penambahan ekstrak meniran juga didukung dengan konsentrasi 5 mL/L ekstrak meniran yang ditambahkan pada media penanaman. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan dalam Gambar 15.

Pada Gambar 15, menunjukkan nilai rata-rata dari ekstrak meniran 5 mL/L dan 25 mL/L yang ditambahkan pada eksplan pegagan yaitu masing-masing 2,5cm dan 2 cm. Itu berarti dengan hanya menambahkan ekstrak meniran 5 mL/L saja, sudah dapat memberikan tinggi tanaman yang maksimal pada eksplan pegagan, diduga karena konsentrasi yang terlalu tinggi dapat menjadi toksik terhadap tanaman, sehingga dapat menghambat pertumbuhan tanaman. Hal ini juga terjadi pada penambahan konsentrasi ekstrak mahkota dewa. Diketahui bahwa pada dasarnya tanaman mahkota dewa meskipun mengandung banyak senyawa yang bermanfaat bagi manusia yang dijadikan sebagai bahan obat tetapi juga bisa bersifat toksik bila salah cara pengolahan. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak mahkota dewa terhadap rata-rata tinggi tunas disajikan pada Gambar 16.

Gambar 16 menunjukkan nilai rata-rata konsentrasi 5 mL/L ekstrak mahkota dewa lebih tinggi daripada konsentrasi 25 mL/L yaitu 2 cm dan 0,5 cm. Terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi yang ditambahkan maka akan menghambat pertumbuhan. Hal ini diduga karena dalam pembuatan ekstrak mahkota dewa, menggunakan bagian biji yang diketahui bahwa pada biji mahkota dewa terdapat senyawa yang toksik yang dapat membunuh bakteri, sehingga adanya senyawa tersebut juga menghambat pembelahan dinding sel sehingga tanaman tidak dapat tumbuh optimal.

Pada Tabel 4, menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan yang menunjukkan pertumbuhan dengan tinggi tanaman yaitu pada kombinasi no. 13 dan kombinasi no. 9. Kombinasi no. 13 terdiri dari MS; POC 20 mL/L; Meniran 5 mL/L sedangkan kombinasi no. 9 terdiri dari MS; POC 2 mL/L; Meniran 5 mL/L. Tinggi tunas pada kombinasi no. 13 dan 9 mencapai 3 cm. Hal ini diduga karena kombinasi tersebut, terdiri dari penambahan yang

komplementer dalam menunjang pertumbuhan tinggi tunas eksplan pegagan. Meskipun penambahan konsentrasi POC berbeda, ternyata pertumbuhan tinggi tanaman menunjukkan nilai yang sama pada 60 HST. Diketahui bahwa media MS dengan komposisi yang penuh, dapat merangsang eksplan pegagan, sehingga responsif dalam perpanjangan sel-sel dan ditambah pula tambahan nutrisi yang berasal dari POC.

Jumlah daun

Daun merupakan salah satu organ penting bagi tumbuhan yang tumbuh dari batang, umumnya berwarna hijau dan berfungsi sebagai penangkap energi dari cahaya matahari melalui fotosintesis. Fotosintesis yaitu proses pembentukan karbohidrat dari CO₂ dan H₂O dengan bantuan sinar matahari. Semakin banyak jumlah daun, mengindikasikan pertumbuhan eksplan yang semakin baik.

Pada Tabel 5, menunjukkan bahwa untuk variabel jumlah daun terbanyak ada pada kombinasi perlakuan no. 13 yaitu sebanyak 2,5. Campuran dari MS; POC 20 mL/L; dan Meniran 5 mL/L, mampu merangsang eksplan pegagan sehingga dapat melakukan pertumbuhan dengan baik. Jumlah daun yang terbentuk dipengaruhi oleh adanya penambahan POC serta meniran yang ditambahkan pada media tanam, sehingga mendukung dalam pembentukan perkembangan daun.

Gambar 17, menunjukkan bahwa pada penggunaan media MS lah yang mampu membentuk jumlah daun terbanyak. Rata-rata jumlah daun dari MS 1,03 dan ½ MS 0,75. Kebutuhan eksplan akan unsur hara sangat bergantung pada jenis tanaman yang digunakan, ketersediaan unsur hara dalam jumlah optimal selama masa pertumbuhan berdampak terhadap peningkatan laju pertumbuhan. Unsur hara terutama N dimanfaatkan oleh tanaman untuk membentuk asam amino yang akan diubah menjadi protein. Pada proses pembelahan sel, protein merupakan sumber energi untuk terjadinya proses meiosis dan mitosis (Yuniyati 2005). Hal tersebut diduga juga mempengaruhi eksplan pegagan sehingga pada penggunaan media MS penuh, jumlah daun lebih banyak dari pada yang ½ MS. Faktor lainnya dalam membantu pertumbuhan jumlah daun pada eksplan pegagan yaitu penggunaan POC.

Pada Gambar 18 terlihat bahwa POC 2 mL/L memberikan jumlah daun terbanyak sebanyak 0,96 dibandingkan POC 20 mL/L hanya 0,94. Pada dasarnya POC mengandung unsur hara yang diperlukan oleh tumbuhan salah satunya adalah unsur nitrogen. Unsur hara nitrogen dan unsur hara mikro tersebut berperan sebagai penyusun klorofil sehingga meningkatkan aktivitas fotosintesis tersebut akan menghasilkan fotosintat yang mengakibatkan perkembangan pada jaringan meristematis daun (Poewowidodo 1992). Hal ini tidak sesuai pada eksplan pegagan, meskipun pada konsentrasi 20 mL/L jumlah daun tetap muncul tetapi tidak sebanyak POC 2 mL/L, diduga karena terlalu banyak penggunaan konsentrasi unsur hara, kemungkinan akan bersifat toksik pada tumbuhan sehingga mengganggu aktivitas fotosintesis.

Selain itu pula, pada penelitian ini, nutrisi yang ditambahkan tidak hanya berasal dari POC saja melainkan juga berasal dari penambahan bahan organik yaitu ekstrak meniran dan mahkota dewa.

Pada Gambar 19 menunjukkan bahwa ekstrak meniran memberikan jumlah daun yang lebih banyak daripada ekstrak mahkota dewa yaitu sebanyak 1,4 dan ekstrak mahkota dewa 0,37. Hal ini diduga adanya senyawa dalam mahkota dewa yang menghambat pembentukan daun, sehingga eksplan pegagan tidak dapat merespon ekstrak mahkota dewa dengan baik. Sama halnya dengan variabel yang lain, pada jumlah daun penambahan ekstrak meniran dengan konsentrasi yang rendah, mampu membentuk daun lebih banyak. Grafik konsentrasi 5 mL/L dan 25 mL/L ekstrak meniran dan mahkota dewa terhadap rata-rata jumlah daun disajikan dalam Gambar 20.

Dari Gambar 20 terlihat bahwa penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa yang menggunakan konsentrasi yang rendah menunjukkan nilai rata-rata yang lebih besar dari pada konsentrasi yang tinggi yaitu untuk ekstrak meniran dan mahkota dewa konsentrasi 5 mL/L masing-masing bernilai 1,8 dan 0,5. Sedangkan untuk konsentrasi 25 mL/L penambahan ekstrak meniran dan mahkota dewa masing-masing, yaitu: 1 dan 0,25. Hal ini diduga penambahan konsentrasi yang terlalu tinggi, kemungkinan bersifat toksik terhadap beberapa eksplan pegagan sehingga seharusnya metabolisme dan proses fotosintesis yang akan membentuk fotosintat terhambat sehingga sel tumbuhan yang seharusnya membentuk jaringan dengan sempurna juga terhambat dan daunpun tidak terbentuk. Bahan organik dapat merangsang pertumbuhan tanaman secara signifikan apabila, menggunakan konsentrasi yang tepat sebab apabila konsentrasi berlebih bagi tanaman, maka akan menghambat metabolisme tanaman (Bowo 2010).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diambil kesimpulan bahwa penggunaan media dasar MS, penambahan pupuk organik cair 20 mL/L dan ekstrak meniran 5 mL/L dapat memberikan pertumbuhan yang paling baik dalam pengembangan kultur jaringan tanaman pegagan (*Centella asiatica* L.)

DAFTAR PUSTAKA

- Andini AP. 2010. Pengaruh Pemberian Simunox Terhadap Kadar Interferon Gamma (IFN-) pada Mencit Swiss. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran UNDIP, Semarang.
- Arniputri RB. 1993. Studi Beberapa Jenis Substitusi Agar dan Pengaruhnya Terhadap Empat Jenis Tanaman Penguji dalam Kultur Jaringan. Program Pasca Sarjana IPB, Bogor.
- Bowo T. 2010. Pembentukan Tunas Lengkeng Dataran Rendah (*Dimorcarpus longan* Lour) pada Berbagai Konsentrasi BA dan Bahan Organik Secara In vitro. [Skripsi]. Fakultas Pertanian, UNS, Surakarta.
- Hyndman SL, Hasegawa PM, Bressand KA. 1982. Stimulation of root initiation from cultured rose through the use concentration of mineral salt. *Hort Sci* 17 (1): 82-83.
- Indrakusuma. 2000. Proposal Pupuk Organik Cair Supra Alam Lestari. PT Surya Pratama Alam, Yogyakarta.
- Parman S. 2007. Pengaruh Pemberian Pupuk Organik Cair Terhadap Pertumbuhan dan perkembangan. *Anatomi dan Fisiologi* 15 (2):-.
- Pierik RLM. 1987. In vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands.
- Poewowidodo. 1992. Telaah Kesuburan Tanah. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Pusat Studi Biofarmaka-IPB. 2010. Pasar Domestik dan Ekspor Produk Tanaman Obat. Biofarmaka, IPB, Bogor.
- Putra DP. 2010. Isolasi Senyawa Filantin dari Daun Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). [Skripsi]. Fakultas Farmasi UMS, Surakarta.
- Rao S. 1994. Mikroorganisme dan Pertumbuhan Tanaman. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Robbins WJ, White VB. 1937. Effect of Extracts from the corn plant on growth of excised root tips. *Bot Gaz* 98: 520-534.
- Sevon N, Candentey KM. 2002. *Agrobacterium rhizogenes* Mediated transformation root culture as a source of alkaloid. *Planta Medica* 68: 859-950.
- Suryanti. 2011. Aplikasi POC. www.indofarm.com. Diakses 5 Juni 2011.
- Suskendriyati H, Solichatun, Setyawan AD. 2004. Pertumbuhan dan produksi saponin kultur kalus *Talinum paniculatum* Gaertn dengan variasi pemberian sumber karbon. *BioSmart* 6 (1): 19-23.
- Wattimenna G.A, Wiendi NMA, Gunawan LW. 1991. Zat Pengatur Tumbuh Bioteknologi Tanaman. PAU Biotek IPB, Bogor.
- Wetter LR, Constabel F. 1991. Metode Kultur Jaringan Tanaman. ITB Press, Bandung.
- Widiastoety D, Kusumo S, Syafni. 1997. Pengaruh tingkat ketuaan air kelapa dan jenis kelapa terhadap pertumbuhan plantlet anggrek *Dendrobium*. *J Hort* 7 (3):768-772.
- Yuniyati N. 2005. Pengaruh Konsentrasi Media MS dan NAA Terhadap Pengakaran *Alocasia suhirmaniana* Secara In vitro. [Skripsi]. Jurusan Budidaya Pertanian, FP, IPB, Bogor.

Efek ekstrak batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap kadar gula darah tikus putih yang diinduksi aloksan

The effect of *Averrhoa bilimbi* stem extract on the blood glucose level of white rats induced by alloxan

CAHYANING GUSTI AGRIANI, KISRINI, RUBEN DHARMAWAN

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

Manuskrip diterima: 5 Februari 2016. Revisi disetujui: 7 Juli 2016.

Abstract. Agriani CN, Ksirini, Dharmawan R. 2016. The effect of *Averrhoa bilimbi* stem extract on the blood glucose level of white rats induced by alloxan. *Biofarmasi* 14: 56-62. The purpose of this research is to find out the effect of belimbing wuluh stem (*Averrhoa bilimbi* L.) extract due to the blood glucose level in white rats (*Rattus norvegicus*) induced by alloxan. This research is a laboratory experiment using experimental control group pre-post test design. Subjects of this research are 25 white male rats (*Rattus norvegicus*), 2 months of age and 200 g of body weight. Subjects were divided into five groups. All groups were induced by 25 mg/200 g body weight/day of alloxan for three days. On the day of fourth, blood sample was collected from orbital vein of white rats for the measurement of the first blood glucose level (T1). Furthermore, the positive control group received 12,6 mg/200 g body weight/day of metformin, then the first, second, and third group received of each 25, 50, and 100 mg/200 g body weight/day of belimbing wuluh stem extract. On the fifteenth day of treatment, blood samples were collected again from the orbital vein of white rats for the measurement of the second blood glucose level (T2). The measurement of blood glucose was using spectrophotometer with the Glucose GOD PAP method. Then the data were analyzed by using *One way* ANOVA. Blood glucose rate after induction has subtracted from blood glucose rate after drug given. After that the data would be change in to mean data that represents as: negative control group = 24,4; positive control group 103,4; first given drug group = 83,4; second given drug group = 102,4; and third given drug group = 102,2 (in mg/100 mL unit). The statistical analysis by using *One way* ANOVA shows a significant difference in blood glucose level among the five groups of treatment with $p\text{-value} = 0,000$. Post Hoc Test shows that the first, second, and third group have the same effectively as the positive control group to decrease the blood glucose level with $p > 0,05$.

Keywords: Alloxan, belimbing wuluh stem extract, blood glucose level

PENDAHULUAN

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik dengan gejala hiperglikemia (kadar gula darah lebih dari normal) yang disebabkan oleh gangguan sekresi insulin, gangguan kerja insulin, atau keduanya (ADA 2004). Hiperglikemia yang terjadi biasanya berhubungan dengan kerusakan sel-sel beta pankreas penghasil insulin. Kerusakan ini dapat disebabkan oleh kegemukan, faktor genetik, infeksi virus seperti virus *Coxsackie*, reaksi autoimun berupa serangan antibodi terhadap sel-sel beta, zat diabetogenik seperti streptozotocin dan aloksan, serta radikal bebas (Roivainen et al. 2000; Szkudelski 2001; Koczwara et al. 2004; Robertson et al. 2004). Hiperglikemia yang berlangsung kronis diasosiasikan dengan kerusakan mikrovaskular maupun makrovaskular yang kemudian menyebabkan kerusakan jangka panjang, disfungsi, dan kegagalan berbagai organ tubuh terutama mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah (Nagappa et al. 2003; ADA 2004; Gustaviani 2006).

Penatalaksanaan diabetes melitus ialah dengan diet diabetes, latihan fisik, penyuluhan kesehatan masyarakat, cangkok pankreas, dan penggunaan obat antihiperglikemik. Obat antihiperglikemik di antaranya berasal dari golongan

sulfonilurea dan biguanid. Akan tetapi, pada penggunaan jangka panjang, obat-obat ini akan menimbulkan efek samping (Tjokroprawiro 2003; Utami 2003; Walujani 2003). Penggunaan insulin juga dilaporkan dapat menimbulkan efek samping jangka panjang seperti resistensi insulin, anoreksia nervosa, atrofi otak, dan perlemakan hati (Yaryuya-Tobias 2001).

Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) telah merekomendasikan dan mendorong penggunaan terapi alternatif terutama di negara di mana akses untuk perawatan diabetes konvensional tidak memadai. Hingga saat ini, sekitar 1200 jenis tanaman terapeutik digunakan untuk menurunkan kadar gula darah pada diabetes. Namun, perlu penelitian lanjutan untuk mengetahui efektivitas tanaman-tanaman itu. Salah satu tanaman terapeutik tersebut ialah tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) (Sudarsono et al. 2002; Fallah-Hosseini 2006).

Penelitian Armenia et al. (2004) dan Agustin (1982) membuktikan bahwa pemberian jus buah belimbing wuluh dapat menurunkan kadar gula darah mencit dan marmut diabetes baik pada kelompok yang diinduksi aloksan maupun yang dibebani glukosa. Pada penelitian yang dilakukan Damayanti (1995) terbukti bahwa infusa daun belimbing wuluh mampu menurunkan kadar gula darah

pada tikus putih jantan diabetes yang diinduksi aloksan. Pada penelitian lain, ekstrak etanol daun belimbing wuluh terbukti mempunyai efek hipoglikemik, hipotrigliseridemic, antilipid peroksidatif dan antiatrogenik pada tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin (Pushparaj 2000). Dalam penelitian tersebut di atas dilaporkan bahwa kandungan daun dan buah belimbing wuluh yang berperan dalam penurunan kadar gula darah ialah flavonoid, saponin, dan tannin. Pada bagian batang belimbing wuluh terdapat saponin dan tannin (Sudarsono 2002).

Tanaman belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) secara umum mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, fenol, kumarin, minyak atsiri, asam oksalat, dan pektin. Tannin berfungsi untuk menghambat asupan glukosa di usus (Suryowiyoto 2005). Alkaloid tannin merupakan suatu polifenol tanaman yang larut air (polar) dan dapat mendenaturasi protein (Westendarp 2006). Saponin lebih bersifat hidrofobik (nonpolar). Saponin mampu menghambat transport glukosa dari lambung ke usus halus (Widowati 2006). Penarikan zat-zat tersebut dari tanaman dapat dilakukan dengan ekstraksi. Dalam penelitian ini dipilih metode ekstraksi perkolasi dengan etanol 70% sebagai pelarut. Karena etanol 70% adalah pelarut yang bersifat semi polar diharapkan zat-zat seperti saponin dan tannin dapat tersari berdasarkan sifat kepolaran masing-masing.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap kadar gula darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan.

BAHAN DAN METODE

Metodologi penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *pre and post test control group design*.

Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi dan Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta, sedangkan ekstraksi batang belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu, Universitas Gajah Mada (LPPT-UGM), Yogyakarta.

Subjek penelitian

Subjek penelitian ini diambil dari populasi yaitu sekelompok tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang mempunyai kriteria jenis kelamin jantan, galur Wistar, sehat, umur rata-rata 2 bulan, dan berat badan rata-rata 200 g yang dikembangkan di Laboratorium Farmasi dan Biologi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi, Surakarta. Dari populasi tersebut, diambil 25 ekor tikus dengan teknik *simple random sampling* berdasar rumus Federer. Jika terdapat 5 kelompok maka jumlah sampel minimal adalah:

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

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan (Federer 1955)

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

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

$$4n-4 > 15$$

$$4n > 19$$

$$N > 4,75$$

Alat dan bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan elektronik, kandang tikus, spuit injeksi, beker *glass* ukuran 100 mL, sonde lambung, dan spektrofotometri. Bahan yang dibutuhkan adalah ekstrak batang belimbing wuluh etanol 70%, nacl 0,9%, aloksan, metformin, cmc (*carboxymethyl cellulose*) 1%, akuades, alkohol.

Cara kerja

Pembuatan ekstrak batang belimbing wuluh

Pengambilan bahan. Batang belimbing wuluh adalah batang dari tanaman belimbing wuluh yang diambil dari percabangan pertama dari batang utama. Ekstrak batang belimbing wuluh merupakan ekstrak dari batang belimbing wuluh yang diekstrak dan didapat langsung dari LPPT UGM Yogyakarta.

Pembuatan serbuk batang. Belimbing wuluh, Batang belimbing wuluh dicuci bersih pada air mengalir untuk menghilangkan semua kotoran yang melekat. Kemudian, dikeringkan dalam almari pengering pada suhu 400°C, untuk mencegah terjadinya pembusukan oleh bakteri atau oleh cendawan, serta lebih mudah dihaluskan (untuk diserbuk). Batang belimbing wuluh yang telah kering, dihaluskan menjadi serbuk, diayak lalu ditimbang.

Pembuatan ekstrak batang belimbing wuluh. Ekstraksi dilakukan di LPPT UGM Yogyakarta. Bahan serbuk yang telah ditimbang dibasahi dengan pelarut dalam jumlah kecil tetapi tepat agar serbuk mengembang sempurna. Kemudian, serbuk tersebut dimasukkan ke dalam perkolator secara merata dan ditata agar tidak berongga atau bercelah. Dalam keadaan celah perkolator bagian bawah terbuka, pelarut yaitu etanol 70% ditambahkan sedikit demi sedikit ke atas perkolator hingga pelarut mencapai bagian bawah. Kemudian celah ditutup dan dilakukan maserasi (perendaman). Untuk mendapat ekstraksi optimum dapat dilakukan selama beberapa hari. Hasil akhir ekstrak berbentuk gel.

Pembuatan larutan uji yang digunakan

Mengacu pada penelitian sebelumnya, Pembuatan larutan uji ialah sebagai berikut, Dosis I ekstrak batang belimbing wuluh: 25 mg/2 mL/200 g BB tikus/ hari dibuat sebanyak 100 mL sehingga dibutuhkan ekstrak batang belimbing wuluh sebanyak 25 mg x 100/2 = 1250 mg. Kemudian ekstrak dilarutkan dalam 100 mL air dengan *suspending agent Carboxymethyl cellulose* (CMC) 1%.

Dosis II (50 mg/200 g BB) dan dosis III (100 mg/200 g BB) juga dilakukan dengan cara yang sama.

Pembuatan larutan metformin

Pada penelitian ini digunakan metformin dengan dosis 12,6 mg/200 g BB tikus. Pemberian dilakukan secara per oral dengan volume 2 mL (Suhardjono 1995). Pembuatan larutan Metformin adalah sebagai berikut, 12,6 mg/4 mL/200 g BB tikus/ hari dibuat sebanyak 100 mL sehingga dibutuhkan metformin sebanyak $12,6 \text{ mg} \times 100/4 = 315 \text{ mg}$. Kemudian dilarutkan dalam 100 mL air dengan *suspending agent* CMC 1%.

Langkah penelitian

Tikus putih ditimbang dan diuji homogenitasnya dengan penyeragaman galur, berat badan, jenis kelamin, dan umur. Tikus putih sebanyak 25 ekor dikelompokkan dalam 5 kelompok penelitian dengan masing-masing berjumlah 5 ekor. Semua kelompok tersebut kemudian diadaptasi selama 4 hari dengan pemberian makanan dan minuman dua kali sehari yaitu pada pagi dan sore hari

Pada hari ke-1 dilakukan pengukuran kadar gula darah puasa yang diambil melalui vena orbita sebanyak 1,5 mL yang ditampung dalam gelas ukur yang kemudian diukur dengan spektrofotometri. Setelah pengambilan darah, hewan uji dalam semua kelompok diinduksi menggunakan aloksan secara subkutan dosis 25 mg/200 g BB tikus yang dilarutkan dalam 2 mL aquabides pada hari ke-1 hingga hari ke-3. Pada hari ke-4, dilakukan pengambilan darah kedua. Sebelum tindakan ini dilakukan, tikus dipuasakan selama 10 jam dengan tetap diberi air minum. Pada hari ke-4 hingga ke-13, dilakukan pemberian larutan uji pada masing-masing kelompok: KKN (diberi air yang dilarutkan dengan *suspending agent* CMC 1% sebanyak 2 mL secara per oral). KKP (diberi metformin dosis 12,6 mg/200 g BB tikus yang dilarutkan dalam air dengan *suspending agent* CMC 1% sebanyak 2 mL secara per oral). KP I (diberi ekstrak batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dosis 25 mg/200 g BB tikus yang dilarutkan dalam air dengan *suspending agent* CMC 1% sebanyak 2 mL secara per oral). KP II (diberi ekstrak batang belimbing wuluh dosis 50 mg/200 g BB tikus yang dilarutkan dalam air dengan *suspending agent* CMC 1% sebanyak 2 mL secara per oral). KP III (diberi ekstrak batang belimbing wuluh dosis 100 mg/200 g BB tikus yang dilarutkan dalam air dengan *suspending agent* CMC 1% sebanyak 2 mL secara per oral). Pada hari ke-14, dilakukan pengambilan darah ketiga. Sebelum tindakan ini dilakukan, tikus dipuasakan selama 10 jam dengan tetap diberi air minum.

Cara mengukur kadar gula darah dengan spektrofotometer metode Glucose GOD PAP, Pengambilan darah tikus dilakukan dengan menggunakan mikropipiler melalui vena orbitalis. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan untuk mendapatkan serumnya. Tabung reaksi yang berisi darah tanpa antikoagulan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar, kemudian disentrifus dengan kecepatan 1500 rpm selama 15 menit. Serum di atas sel-sel darah yang menggumpal selanjutnya diambil dengan pipet mikro dan dimasukkan ke dalam tabung ependorf. Kemudian dilakukan pengukuran

kadar gula darah menggunakan reagen (kit). Dengan menggunakan kit Glucose GOD, kuvet I sebagai blanko diberi 10 µl akuades dan 1000 µl reagen. Kuvet II dan selanjutnya diberi 10 µl sampel dan 1000 µl reagen. Kemudian, masing-masing kuvet dicampur dan diinkubasi 10 menit pada suhu 37 °C. Setelah itu ditentukan *Optical density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500 nm. Hasil yang didapat kemudian dikalikan faktor konversi sebesar 0,05551 untuk mendapatkan kadar gula darah. Kadar normal gula darah pada tikus adalah 60-90 mg/dl (Mitruka dan Rawnsley 1981).

Data analisis

Teknik analisis data yang digunakan tergantung pada hasil distribusi data. Jika distribusi data yang didapatkan normal, maka teknik analisa data yang digunakan adalah uji *One way* ANOVA, di mana jika hasil uji Anova signifikan maka dilanjutkan dengan *post hoc* *LSD test*. Namun jika distribusi data didapatkan hasil *skewed*, maka teknik analisis data yang akan digunakan adalah uji Kruskall Wallis. Uji *One way* ANOVA adalah uji untuk membandingkan perbedaan *mean* pada kelima kelompok sekaligus sehingga dapat diketahui apakah kelima kelompok memiliki *mean* selisih kadar gula darah yang berbeda secara signifikan atau tidak. Uji *Post Hoc* *LSD* adalah uji untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok perlakuan (Arif dan Mochammad 2008; Dahlan 2008).

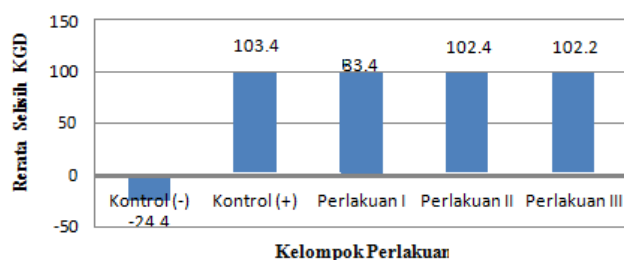
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil penelitian pengaruh pemberian ekstrak batang belimbing wuluh terhadap kadar gula darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan dapat dilihat dalam Tabel 1 dan Gambar 1. Tabel dan gambar tersebut menunjukkan bahwa rerata selisih kadar gula darah paling tinggi terdapat pada kelompok kontrol (+) sebesar 103,40 mg/100 mL. Rerata selisih kadar gula darah paling rendah didapatkan pada kelompok kontrol (-) sebesar -24,40 mg/100 mL. Rerata selisih kadar gula darah kelompok perlakuan 1 sebesar 83,40 mg/dl, kelompok perlakuan 2 sebesar 102,40 mg/dl dan kelompok perlakuan 3 sebesar 102,20 mg/dl. Dari ketiga kelompok perlakuan, kelompok perlakuan 1 memiliki rerata selisih kadar gula darah paling rendah dan kelompok perlakuan 2 memiliki rerata selisih kadar gula darah paling tinggi.

Tabel 1. Rerata hasil pengukuran selisih kadar gula darah pada setiap kelompok perlakuan

Kelompok	N	Rerata ± SD (U/L)
Kelompok kontrol negatif	5	24,40 ± 16,056 α
Kelompok kontrol positif	5	103,40 ± 8,620 β
Kelompok perlakuan 1	5	83,40 ± 15,598 β
Kelompok perlakuan 2	5	102,40 ± 8,204 β
Kelompok perlakuan 3	5	102,20 ± 23,784 β



Gambar 1. Rerata selisih kadar gula darah (KGD) tikus putih

Sebelum dilakukan uji *One way* ANOVA, dari data penelitian harus diketahui apakah terdistribusi secara normal dan memiliki varian data yang sama. Uji normalitas data dilakukan dengan Saphiro Wilk tes. Kriteria ujinya adalah bila nilai signifikansi (p) lebih besar dari 0,05 maka data terdistribusi secara normal. Sebaliknya, bila nilai p lebih kecil dari 0,05 maka data tidak terdistribusi secara normal. Hasil analisis (perhitungan tidak ditunjukkan), dapat diketahui kelima kelompok sampel mempunyai nilai p masing-masing sebesar 0,283; 0,828; 0,392; 0,507 dan 0,868. Nilai p lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi secara normal.

Syarat selanjutnya sebelum dilakukan uji *One way* ANOVA adalah varian data harus sama. Oleh karena itu perlu dilakukan uji kesamaan varian (*Homogeneity of variances*). Uji kesamaan varian ini dilakukan dengan uji Levene (*Levene test*). Kriteria ujinya adalah varian dikatakan sama bila nilai signifikansinya (p) lebih besar dari 0,05. Sebaliknya, varian dikatakan tidak sama, bila nilai p lebih kecil dari 0,05. Hasil analisis (perhitungan tidak ditunjukkan), nilai p adalah 0,232. Nilai ini lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa varian datanya sama.

Data terdistribusi secara normal dan varian datanya sama maka dapat dilakukan uji *One way* ANOVA. Kriteria ujinya adalah nilai data diantara variasi dalam perlakuan dikatakan ada perbedaan yang nyata, bila nilai p lebih kecil dari 0,05. Sebaliknya tidak ada perbedaan yang nyata bila nilai p lebih besar dari 0,05. Hasil analisis (perhitungan tidak ditunjukkan), diketahui bahwa nilai p sebesar 0,000. Nilai ini lebih kecil dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan ada perbedaan nilai selisih kadar gula darah yang nyata diantara kelima kelompok perlakuan yang diteliti.

Setelah uji *One way* ANOVA menunjukkan ada perbedaan yang nyata, maka perlu dilakukan uji lanjutan (*Post Hoc Test*) untuk menentukan kelompok perlakuan yang mampu memberikan nilai selisih kadar gula darah terbaik (paling tinggi). *Post Hoc Test* yang sesuai adalah uji LSD (*Least Significance Difference*). Kriteria ujinya adalah pasangan perlakuan yang diuji dikatakan ada perbedaan nilai selisih kadar gula darah yang nyata bila nilai p lebih kecil dari 0,05. Sebaliknya, dikatakan tidak ada perbedaan nilai selisih kadar gula darah yang nyata, bila nilai p lebih besar dari 0,05. Hasil analisis (perhitungan tidak ditunjukkan), diketahui bahwa selisih kadar gula darah kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 berbeda secara nyata dengan selisih kadar gula darah

kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol batang belimbing wuluh dan metformin mempunyai efek menurunkan kadar gula darah pada tikus diabetes yang diinduksi dengan aloksan. Hasil analisis (perhitungan tidak ditunjukkan), diketahui bahwa nilai selisih kadar gula darah antara kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 tidak berbeda secara nyata satu sama lain ($p > 0,05$). Hal ini berarti dosis ekstrak batang belimbing wuluh pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 sama-sama mempunyai efek menurunkan kadar gula darah. Selanjutnya dapat dilihat bahwa selisih kadar gula darah kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 tidak berbeda secara nyata ($p > 0,05$). Hal ini berarti dosis ekstrak etanol batang belimbing wuluh pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 memiliki efektivitas yang sama dengan dosis metformin pada kelompok kontrol positif. Dengan melihat hal tersebut dapat disimpulkan bahwa kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 mempunyai efek menurunkan kadar gula darah yang sama efektivitasnya dengan dosis metformin karena nilai selisih kadar gula darah keempat kelompok tersebut tidak berbeda secara nyata ($p > 0,05$).

Pembahasan

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *pre-post test control group design* yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak batang belimbing wuluh terhadap kadar gula darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes yang diinduksi aloksan. Setelah diinduksi, dilakukan pengambilan sampel darah untuk pemeriksaan kadar gula darah. Data yang diperoleh merupakan data pertama (T1). Kemudian, dilakukan perlakuan pada tikus putih selama 14 hari dan pada hari ke-15 dilakukan pengambilan sampel darah kembali untuk pemeriksaan kadar gula darah. Data ini merupakan data kedua (T2). Selisih kadar gula darah dihitung berdasar kedua data tersebut (T1-T2). Setelah dilakukan analisis statistik melalui beberapa tahapan didapatkan hasil yang mendukung hipotesis peneliti bahwa ekstrak batang belimbing wuluh berpengaruh terhadap kadar gula darah tikus putih yang diinduksi aloksan.

Berdasarkan uji normalitas distribusi didapatkan bahwa nilai signifikansi (p) dari kelima kelompok perlakuan lebih besar dari 0,05 yang berarti data selisih kadar gula darah terdistribusi secara normal. Uji homogenitas dengan *Levene test* menunjukkan nilai p sebesar 0,232 (lebih besar dari 0,05) sehingga dapat diketahui bahwa varian data sama. Kemudian dari uji komparatif *One way* ANOVA didapatkan nilai p sebesar 0,000 (kurang dari 0,05) yang berarti terdapat perbedaan nilai selisih kadar gula darah yang nyata diantara kelima kelompok perlakuan yang diteliti. Dari hasil uji *One way* ANOVA tersebut dapat diketahui bahwa hipotesis alternatif yang diajukan peneliti dapat diterima sehingga untuk mengetahui lebih lanjut tentang kelompok perlakuan yang dapat memberikan hasil selisih kadar gula darah terbaik dilanjutkan dengan *Post Hoc Test* dengan uji *Least Significance Difference* (LSD). Dari *Post Hoc Test* uji LSD didapatkan perbedaan selisih kadar gula darah yang nyata antara kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 dengan kelompok

kontrol negatif (perhitungan tidak ditunjukkan). Perbedaan ini menunjukkan bahwa pemberian dosis metformin pada kelompok kontrol positif dan pemberian ekstrak batang belimbing wuluh pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 mampu menurunkan tingginya kadar gula darah akibat induksi aloksan pada tikus putih. Peningkatan kadar gula darah akibat induksi aloksan dapat dilihat dari rerata kelompok kontrol negatif yaitu sebesar -24,40 (perhitungan tidak ditunjukkan). Tingginya rerata selisih kadar gula darah pada kelompok kontrol negatif karena tikus putih pada kelompok ini hanya diberi aloksan tanpa diberi dosis metformin maupun ekstrak batang belimbing wuluh.

Aloksan merupakan senyawa hidrofilik dan tidak stabil secara cepat dapat merusak pankreas. Mekanisme kerjanya diawali pengambilan cepat oleh sel beta pankreas. Selanjutnya, aloksan mengalami siklus reduksi menjadi asam dialurat yang kemudian teroksidasi menjadi aloksan. Aloksan dan asam dialurat ini menentukan siklus redoks untuk membangkitkan radikal superoksida yang selanjutnya mengalami dismutasi menjadi hidrogen peroksida, berjalan spontan dan kemungkinan dikatalisis oleh superoksida dismutase. Salah satu target dari oksigen reaktif adalah DNA pulau Langerhans pankreas (Szkudelski 2001; Walde et al. 2002). Selain itu akibat aloksan, terjadi gangguan pada homeostatis kalsium intraseluler. Aloksan dapat meningkatkan konsentrasi ion kalsium bebas pada sel beta pankreas yang melalui mekanisme influks kalsium dari cairan ekstraseluler, mobilisasi kalsium dari simpanannya secara berlebihan, dan eliminasi yang terbatas dari sitoplasma. Influks kalsium mengakibatkan depolarisasi sel beta pankreas yang kemudian membuka kanal kalsium dan semakin menambah masuknya ion kalsium ke sel. Pada kondisi tersebut, konsentrasi insulin meningkat sangat cepat, dan secara signifikan mengakibatkan gangguan pada sensitivitas insulin perifer dalam waktu singkat. Selain kedua faktor tersebut di atas, aloksan juga diduga berperan dalam penghambatan glukokinase dalam proses metabolisme energi (Suharmiyati 2003; Szkudelski 2001).

Hasil *Post Hoc Test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan selisih kadar gula darah yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif dengan nilai p sebesar 0,000 (perhitungan tidak ditunjukkan). Hal ini disebabkan kelompok kontrol positif selain diinduksi dengan aloksan juga mendapatkan dosis metformin. Metformin merupakan salah satu dari tiga jenis golongan biguanid dengan mekanisme kerja menurunkan produksi glukosa di hepar dan meningkatkan sensitivitas jaringan otot dan adipose terhadap insulin. Efek ini terjadi karena adanya aktivasi kinase di sel (Suherman 2007).

Perbedaan selisih kadar gula darah yang bermakna juga terdapat antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 dengan nilai p yang sama pada setiap kelompok yaitu 0,000 (perhitungan tidak ditunjukkan). Perbedaan yang bermakna ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak batang belimbing wuluh pada kelompok perlakuan 1, 2 dan 3 dapat menurunkan peningkatan kadar gula darah pada tikus putih akibat induksi aloksan.

Ekstrak batang belimbing wuluh merupakan ekstraksi dari batang tanaman belimbing wuluh dengan menggunakan penyari etanol 70%. Batang belimbing

wuluh mengandung saponin, tannin, glukosid, kalsium oksalat, sulfur, peroksidase dan asam format (Sudarsono et al. 2002; Muhlisah 2004). Agen antihiperglikemik utama dalam batang tersebut ialah saponin dan tannin. Alkaloid tannin merupakan polifenol tanaman yang larut air (polar) dan dapat mendenaturasi protein (Westendarp 2006). Saponin lebih bersifat hidrofobik (nonpolar) (Widowati 2006). Etanol 70% merupakan pelarut semipolar sehingga diharapkan dapat menarik saponin dan tannin yang terkandung dalam batang belimbing wuluh (Harborne 1987). Tannin dan saponin memiliki peran sebagai agen antihiperglikemik dengan mekanisme sebagai berikut: tannin dapat mempresipitasi protein selaput lendir usus dan membentuk lapisan pelindung usus, sehingga menghambat asupan glukosa (Suryowinoto 2005), sedangkan saponin memanipulasi *glucose transporter-1* sehingga menghambat transpor glukosa dari lambung menuju usus halus dan *brush border* usus yang selanjutnya menghambat kenaikan kadar glukosa darah (Widowati 2006).

Aktivitas antihiperglikemik tannin dan saponin di dalam ekstrak batang belimbing wuluh dalam penelitian ini selaras dengan beberapa penelitian sebelumnya yang membuktikan aktivitas antihiperglikemik tannin dan saponin di dalam bagian lain tanaman belimbing wuluh. Dalam penelitian yang dilakukan Armenia et al. (2004) dan Agustin (1982) dilaporkan bahwa pemberian jus buah belimbing wuluh dapat menurunkan kadar gula darah mencit dan marmut diabetes baik pada kelompok yang diinduksi aloksan maupun yang dibebani glukosa. Buah belimbing wuluh dilaporkan mengandung alkaloid, saponin, kumarin, karoten, thiamin, riboflavin, niacin, pektin, minyak atsiri, dan asam oksalat baik dalam bentuk kalium oksalat ataupun dalam bentuk enzim isositrat liase (Galvao et al. 2001; Sudarsono et al. 2002). Penelitian lain yang dilakukan Damayanti (1995) melaporkan bahwa infusa daun belimbing wuluh mampu menurunkan kadar gula darah pada tikus putih jantan diabetes yang diinduksi aloksan. Pada penelitian lain, ekstrak daun belimbing wuluh terbukti mempunyai efek hipoglikemik pada tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin (Pushparaj 2000). Daun belimbing wuluh dilaporkan memiliki kandungan tannin, sulfur, asam format, peroksid, alkaloid, kumarin, pektin, minyak atsiri, flavonoid dan saponin (Sudarsono et al. 2002; Muhlisah 2004).

Hasil *Post Hoc Test* menunjukkan perbedaan selisih kadar gula darah yang tidak bermakna antara kelompok kontrol positif dengan kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 yang ditunjukkan dengan nilai p yang lebih besar dari 0,05 yaitu berturut-turut 0,055, 0,920, dan 0,904 (perhitungan tidak ditunjukkan). Hal ini menunjukkan bahwa efek antihiperglikemik dosis ekstrak batang belimbing wuluh pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 sama dengan efek antihiperglikemik dosis metformin pada kelompok kontrol positif.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa peningkatan dosis ekstrak tidak selalu diiringi dengan penurunan kadar gula darah yang signifikan. Hubungan dosis ekstrak dengan efek yang ditimbulkannya akan dijelaskan berdasarkan farmakodinamik obat. Suatu obat dapat menimbulkan efek

apabila terdapat ikatan dengan reseptor membentuk ikatan obat-reseptor. Menurut teori okupansi reseptor yang dikemukakan oleh Alfred Joseph Clark (Setiawati et al. 2007), hubungan dosis obat dengan efek yang ditimbulkan sebanding dengan jumlah reseptor yang diduduki oleh obat tersebut yang digambarkan sebagai grafik berbentuk hiperbola. Terdapat Emax yaitu efek maksimal yang ditimbulkan oleh suatu konsentrasi dosis yang tinggi. Jika Emax telah tercapai, peningkatan dosis obat tidak akan berarti lagi karena menurut prinsip teori okupansi reseptor, pada tahap ini semua reseptor yang ada telah diduduki oleh obat. Kemungkinan ketiga dosis pada penelitian ini telah menimbulkan Emax. Teori okupansi reseptor juga berlaku dalam efek samping obat. Semakin banyak dosis obat akan menimbulkan ikatan reseptor – zat dalam obat yang mampu menimbulkan efek yang tidak diinginkan. Sehingga semakin tinggi dosis akan semakin besar potensinya dalam menimbulkan efek samping. Selain itu, faktor lain seperti variasi kepekaan tikus putih terhadap senyawa saponin dan tannin dalam ekstrak batang belimbing wuluh dapat menyebabkan hasil tidak signifikan antara kelompok perlakuan 1, 2, 3, dan kontrol positif seperti dalam penelitian ini. Variasi ini bersifat individual dan mungkin tergantung pada sistem imun hewan uji dan kondisi psikologis hewan uji. Dalam penelitian ini, kedua hal tersebut termasuk dalam variabel luar yang tidak dapat dikendalikan. Selain itu terdapat faktor-faktor non teknis yang berpengaruh, yaitu keterampilan peneliti dalam melakukan sonde lambung, ketepatan dalam mengukur volume ekstrak yang akan diberikan dan ketelitian dalam mempertimbangkan pengaruh perbedaan berat badan tikus putih terhadap dosis yang diberikan.

Dari hasil tersebut, karena ketiga kelompok perlakuan memiliki efektivitas yang sama dengan metformin dalam menurunkan kadar gula darah, dapat disimpulkan bahwa dosis perlakuan I ialah yang paling efektif dibanding kelompok lainnya. Hal ini dikarenakan dengan penggunaan dosis terkecil, didapatkan hasil penurunan gula darah yang sama efektifnya. Selain itu, dengan penggunaan dosis terkecil dapat meminimalisasi efek samping dari obat. Selanjutnya hasil tersebut dapat dijadikan dasar sementara dalam menentukan dosis ekstrak batang belimbing wuluh yang paling efektif dalam menurunkan kadar gula darah tikus putih akibat induksi aloksan yaitu dengan menggunakan dosis sebesar 25 mg/200 g BB tikus/hari. Agar hasil ini dapat direkomendasikan ke manusia, maka dosis dikonversi dengan dikalikan faktor konversi dari tikus ke manusia. Menurut Suhardjono (1995) faktor konversi dari tikus dengan berat 200 g ke manusia dengan berat 70 kg adalah 56 sehingga dosis yang dibutuhkan menjadi 1400 mg/70 kg BB/hari.

KESIMPULAN

Ekstrak batang belimbing wuluh memiliki efek menurunkan kadar gula darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi aloksan

DAFTAR PUSTAKA

- ADA [American Diabetes Association]. 2004. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 23: 381-389.
- Agustin Y. 1982. Efek Hipoglikemik Perasan Buah Belimbing Wuluh Muda (*Averrhoa bilimbi* L.) pada Marmut. [Skripsi]. UGM, Yogyakarta.
- Arif TQ, Mochammad. 2008. Pengantar Metodologi Penelitian Untuk Ilmu Kesehatan. LPP UNS dan UNS Press, Surakarta.
- Armenia, Megawati, Rusdi. 2004. Efek penurunan gula darah air perasan buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) pada mencit diabetes yang diinduksi aloksan dan mencit yang dibebani glukosa. *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi* 9 (2): 63-69.
- Dahlan MS. 2008. Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan edisi 3. Salemba Medika, Jakarta.
- Damayanti, M. 1995. Pengaruh Pemberian Infus Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan UGM, Yogyakarta.
- Fallah-Hosseini H, Fakhrzadeh H, Larigani B, Sheikh Samani AH. 2006. Review on therapeutic plant used in diabetes. *J Medicinal Plants Persien* 5: 1-8.
- Galvao de Lima VLA, de Almedia Melo E, Santos Lima LD. 2001. Physicochemical characteristics of bilimbi (*Averrhoa bilimbi* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura* 23 (2): 421-424.
- Gustaviani R. 2006. Diagnosis dan klasifikasi diabetes melitus. In: Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiati S. (Ed). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran Edisi 9*. EGC, Jakarta.
- Koczwarza K, Bonifacio E, Ziegler AG. 2004. Transmission of maternal islet antibodies and risk of autoimmune diabetes in offspring of mothers with Type 1 Diabetes. *Diabetes* 53: 1-4.
- Mitruka BM, Rawnsley HM. 1981. *Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans 2nd Edition*. Year Book Medical Publishers Inc., Chicago.
- Muhlisah F. 2004. *Tanaman Obat Keluarga (TOGA)*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Nagappa AN, Thakurdesai, P A, Venkat Rao, N, Jiwan Singh. 2003. Antidiabetic activity of *Terminalia catappa* Linn fruits. *J Ethnopharmacol* 88: 45-50.
- Pushparaj P, Tan CH, Tan BK. 2000. Effects of *Averrhoa bilimbi* leaf extracts on blood glucose and lipid in Streptozotocin-diabetic Rats. *J Ethnopharmacol* 72 (1-2): 69-76.
- Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. 2004. α -Cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53: S119-S124.
- Roivainen M, Rasilainen S, Ylipaasto S, Nissinen R, Ustinov J, Bouwens L, Eizirik DCL, Hovi T, Otonkoski T. 2000. Mechanisms of Coxsackievirus-induced damage to Human Pancreatic β -Cells. *J Clin Endoc Metab* 85: 432-440.
- Setiawati A, Suyatna FD, Gan S. 2007. Pengantar Farmakologi dalam Farmakologi dan Terapi. Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.
- Sudarsono, Gunawan D, Wahyuno S, Donatus IA, Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II: Hasil Penelitian, Sifat-Sifat, Penggunaan*. Cet I. Pusat Studi Obat Tradisional, Yogyakarta.
- Suhardjono D. 1995. *Percobaan Hewan Laboratorium*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Suharmiyati. 2003. Pengujian bioaktivitas anti diabetes melitus tumbuhan obat. *Cermin Dunia Kedokteran* 140: 8-10.
- Suherman SK. 2007. Insulin dan antidiabetik oral. In: Gunawan SG (ed). *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Gaya Baru, Jakarta.
- Suryowiyoto S. 2005. Mengenal Beberapa Tanaman yang Digunakan Masyarakat Sebagai Antidiabetik untuk Menurunkan Kadar Gula dalam Darah. <http://www.pom.go.id/default.asp>. (24 Februari 2010)
- Szkudelski T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 50: 536-546.
- Tjokroprawiro A. 2003. *Diabetes Melitus: Klasifikasi, Diagnosis, dan Terapi*. Gramedia, Jakarta.
- Turner CD, Bagnara CD. 1988. *Endokrinologi Umum*. Terjemahan: Harsojo. Edisi ke-6. Airlangga University Press, Surabaya.
- Unger RH, Foster DW. 1992. *Diabetes Melitus*. In: Williams RH. (ed): *Williams Textbook of Endocrinology*. 8th ed. W.B. Saunders Company, USA.

- Utami P. 2003. Tanaman Obat Untuk Mengatasi Diabetes Melitus. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Walde SS, Dohle C, Schott-Ohly P, Gleichmann H. 2002. Molecular target structures in alloxan-induced diabetes in mice. *Life Sci* 71: 1681-1694.
- Walujani A. 2003. Ancaman Pandemi Diabetes di Abad Ini. Koran Kompas, Jakarta.
- Westendarp H. 2006. Effects of tannins in animal nutrition. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 113 (7): 264-268.
- Widowati W. 2006. Aktivitas antioksidan dalam menurunkan kadar gula darah. *Wahana Medica Rab Univ* 2: 2-12.
- Yaryura-Tobias JA, Pinto A, Neziroglu F. 2001. Anorexia nervosa, diabetes melitus, brain atrophy, and fatty liver. *Intl J Etiol Disorders* 30: 350-353.

Pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa*) dan uji stabilitas terhadap tipe basis yang digunakan

Preparation of essential oil ointment of lime leaves (*Citrus amblycarpa*) and stability test on base type used

NINDYA NARESWARI, ANANG KUNCORO

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

Manuscript received: 5 Desember 2016. Revision accepted: 1 April 2017.

Abstract. Nareswari N, Kuncoro A. 2016. Preparation of essential oil ointment of lime leaves (*Citrus amblycarpa*) and stability test on base type used. *Biofarmasi* 14: 63-68. Citrus lime has a content of volatile oil contained in the leaves and the skin. Essential oils from the leaves of citrus lime-containing β -pinene, linalool, citronellal, and geraniol citronellol. The yield of essential oil of citrus lime leaves 0,47% could inhibit the growth of bacteria *S.aureus* with KBM and the MIC values of 0,039% (v / v). This research is design experimental that used Pre Test Post Test Control Desain. The essential oil for skin medication has to be made in practical and stable preparation. Ointment is a semi-solid preparation which is easy to be applied and to be used as the external medicine. The use of essential oil of citrus lime leaf was made in ointment preparation with three varieties of basis, those are water-soluble basis, absorptive bases and base hydrocarbon, in order for the ointment to be easily applied into skin. The physical stability test series which consisted of the homogeneity, the organoleptic, the viscosity the adhesiveness, and the dispersiveness and the acidity level (pH) of the ointment preparation was tested for 8 weeks in order to investigate the most stable ointment basis out of the three formulae to make the ointment of the essential oil of citrus lime (*Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochse). Next, the stability of the ointment preparations was investigated from the data which contained the results of the observation from the first week to the eighth week. The data were analyzed statistically by using the Kolmogorov-Smirnov analysis technique. Finally, the data were analyzed by using the one-way Analysis of Variance (ANOVA) in order to investigate the effect of the difference in the basis of the ointment on the stability of the ointment preparations. The results of the research indicate that all three types of base oils used in ointment citrus lime leaves have a good physical stability test based on the results of the viscosity, the acidity level (pH), the dispersiveness and the adhesiveness.

Keywords: *Citrus amblycarpa*, essential oils, ointment stability, type of ointment base

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan yang berasal dari alam sebagai obat bukan hal yang baru. Sejak dahulu manusia mencoba mengobati penyakit yang dideritanya dengan menggunakan bahan alam. Pada saat ini banyak orang telah kembali pada pengobatan tradisional dengan menggunakan tanaman obat, baik untuk mengobati atau menjaga kesehatan. Trend gaya hidup yang mengarah kembali ke alam (*back to nature*) membuktikan bahwa hal-hal yang alami bukanlah yang ketinggalan jaman atau kampungan. Dalam dunia kedokteran banyak yang kembali mempelajari obat-obat tradisional, tanaman obat ditelaah dan dipelajari secara ilmiah. Hasilnya mendukung bahwa tanaman obat memang memiliki kandungan zat-zat atau senyawa yang secara klinis terbukti bermanfaat bagi kesehatan. Indonesia merupakan negara yang terkenal dengan keanekaragaman tanaman terutama hasil pertanian dan rempah-rempah. Hal ini didukung oleh keadaan geografis Indonesia yang beriklim tropis dengan curah hujan rata-rata tinggi sepanjang tahun. (Muhlisah, 2004).

Beberapa tanaman dari marga *Citrus*, suku Rutaceae seperti *C. limau*, dan *C. reticulo* telah dimanfaatkan

sebagai aromaterapi dengan efek antiseptik dan meringankan stress atau relaksasi (Keville 1999). Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap tumbuhan *Citrus* diantaranya adalah efek apoptosis pada *cell line* A549 kanker paru-paru dari nobeletinnya (Luo et al. 2008). Penelitian efek pencegahan 8 tanaman *Citrus* terhadap bahaya kanker lambung (Bae et al. 2008), juga penelitian mengenai efek ekstrak *C. aurantium* terhadap peningkatan anti oksidan dan penurunan kerusakan pada hepar (Jiao et al. 2007). Di Indonesia banyak terdapat tanaman *Citrus* yang lain, salah satunya adalah *Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochse (jeruk limau). Menurut Agusta (2000), kulit buah jeruk limau segar mengandung minyak atsiri yang komponen penyusunnya terdiri dari α -pinena, β -pinena, β -mirsena, linalool, limonena, mirsenol, kamfena hidrat, dan α -terpineol.

Penelitian Mulyani (2009) menyatakan bahwa minyak atsiri daun jeruk limau (*C. amblycarpa*) lebih aktif terhadap *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan kulitnya. Rendemen minyak atsiri dari daun jeruk limau sebesar 0.47% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus* dengan nilai KBM dan KHM sebesar 0.039% (v/v). Pengujian dari Mulyani (2009) tentang minyak atsiri

daun jeruk limau ini belum dibuat dalam bentuk sediaan salep, sehingga perlu dikembangkan lagi agar lebih mudah diaplikasikan dalam kehidupan sehari-hari.

Sediaan yang cocok untuk sediaan topikal adalah salep (Ansel, 1989). Penggunaan salep dapat memungkinkan kontak dengan tempat aplikasi lebih lama sehingga pelepasan zat aktif minyak atsiri akan lebih maksimal. Selain itu sediaan salep juga lebih disukai karena lebih mudah, praktis, menimbulkan rasa dingin, melindungi daerah yang terluka dari udara luar dan mempermudah perbaikan kulit, menjadikan kulit lebih lembab atau untuk menghasilkan efek emolient serta menghantarkan obat pada kulit untuk efek khusus topikal atau sistemik (Tjay dan Rahardja 2008).

Pelepasan obat dari bentuk sediaan salep sangat dipengaruhi oleh faktor antara lain jenis basis salep, kelarutan, karakteristik dari obat, konsentrasi obat dalam basis, waktu difusi kekentalan dan viskositas (Tjay dan Rahardja 2008). Basis dan bahan pembantu salep harus memenuhi persyaratan umum yaitu tidak tersatukan dengan bahan pembantu lainnya dan juga dengan bahan obat yang digunakan dalam terapi salep. Basis salep biasanya memiliki daya sebar yang baik dan menjamin pelepasan bahan obat yang memuaskan (Voight 1995).

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian tentang pembuatan salep minyak atsiri yang dibuat dengan 3 macam basis salep yang berbeda. Salep minyak atsiri daun jeruk limau dibuat dengan basis larut air, basis serap dan basis hidrokarbon. Perbedaan basis ini dilakukan untuk mengetahui apakah ketiga basis tersebut mempunyai stabilitas fisik yang baik berdasarkan pengujian sifat fisik salep yang dilakukan selama 8 minggu. Basis salep yang paling stabil dalam uji sifat fisik selama 8 minggu merupakan basis salep yang baik untuk pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau. Pengujian iritasi salep dilakukan pada minggu ke 8 untuk mengetahui salep aman digunakan untuk sediaan topikal dan tidak terjadi iritasi.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui stabilitas tipe basis yang digunakan dalam salep minyak atsiri daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochse) dan mengetahui tipe basis salep yang paling baik ditinjau dari hasil uji stabilitas fisik.

BAHAN DAN METODE

Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode *Pre Test Post Test Control*. Dalam metode terdapat kelompok kontrol yang dipakai sebagai perbandingan terhadap kelompok yang diberi perlakuan eksperimental.

Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua laboratorium. Untuk penyulingan minyak atsiri dilakukan di laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta sedangkan untuk pembuatan dan uji sifat fisik salep dilakukan di laboratorium Farmasetika Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Daun jeruk limau segar 2 kg yang diambil dari tanaman berumur 6 bulan, dari daerah ceper, Klaten; Vaseline album; Parafin encer; Basis salep berupa lanolin (adepts lanae dan akuades; 75:25); Basis salep berupa unguentum simplex (cera flava dan minyak wijen; 30:70); Basis salep berupa PEG 400 dan PEG 4000 dengan perbandingan 70:30.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: Seperangkat alat destilasi uap air; Labu erlemeyer ukuran 1000 mL (*pyrex*); Corong pisah (*pyrex*); Gelas ukur 10 mL (*pyrex*); Timbangan digital (HWH); Kaca arloji; Kaca objek; Mortir dan stamper; Water bath (Termo star); pH meter (*Friwo inolab*); Alat uji daya sebar salep; Viskotester (*VT-04 E-RION CO*); Anak timbang 10 g, 20 g, 50 g, dan 500 g.

Cara kerja

Pembuatan minyak atsiri daun jeruk limau

Daun jeruk limau segar sebanyak 2 kg yang sudah dicuci bersih dimasukkan ke dalam dandang alat destilasi uap air seluruhnya. Alat destilasi dirangkai dengan pendingin (kondensor), kemudian dipanaskan dengan suhu yang sesuai. Air dialirkan pada kondensor dan dijaga agar air terus mengalir. Temperatur dijaga sehingga dihasilkan destilat minyak atsiri. Minyak atsiri kemudian ditambahkan dengan Na_2SO_4 anhidrat untuk memurnikan minyak atsiri dengan cara menarik air yang masih bercampur dengan minyak atsiri. Minyak atsiri yang sudah ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat kemudian disaring sehingga didapat minyak atsiri murni.

Penentuan bobot jenis minyak atsiri daun jeruk limau

Penentuan bobot jenis minyak atsiri dihitung dengan piknometer ukuran 10 mL. Berat piknometer kosong kemudian ditimbang dan dicatat beratnya. Timbang piknometer yang sudah berisi minyak atsiri daun jeruk limau dicatat beratnya. Piknometer yang sudah berisi air ditimbang dan dicatat beratnya. Bobot minyak atsiri dihitung dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Berat jenis minyak atsiri} = \frac{B-A}{C-A} = \dots \text{ g/mL}$$

Keterangan:

Berat pikno kosong	: A (g)
Berat pikno + minyak atsiri	: B (g)
Berat pikno + air	: C (g)

Penentuan indeks bias minyak atsiri daun jeruk limau

Penentuan indeks bias minyak atsiri menggunakan alat refraktometer. Tetesi refraktometer dengan akuades, kemudian bersihkan sisa akuades dengan tisu. Teteskan minyak atsiri daun jeruk limau pada permukaan kaca prisma pada refraktometer. Lihat ditempat yang bercahaya dan pada suhu ruangan sekitar 25-28°C. Akan terlihat berupa nilai indeks bias pada skala dalam refraktometer.

Penghitungan rendemen minyak atsiri

Penghitungan rendemen minyak atsiri dihitung dengan % v/b :

$$\% \text{ kadar minyak atsiri} = \text{Vol/M} \times 100\%$$

Keterangan:

Volume minyak atsiri : vol (mL)

Berat daun segar : M (g)

Perhitungan dosis minyak atsiri daun jeruk limau

Minyak atsiri daun jeruk limau aktif pada bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 0.039 % v/v (Mulyani, 2009). Hal ini berarti: $0.039 \% \text{ v/v} = 0.039 \text{ mL} / 100 \text{ mL} = 0.039 \text{ mL} / 92.8 \text{ g}$

Formulasi salep

Formulasi salep minyak atsiri daun jeruk limau ditunjukkan pada Tabel 1.

Pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis larut air

PEG 4000 dilelehkan diatas waterbath kemudian ditambahkan PEG 400 masukkan dalam mortir panas sekitar suhu 80°C, digerus sampai dingin dan terbentuk masa salep. Tambahkan minyak atsiri daun jeruk limau aduk sampai homogen. Masukkan dalam pot salep. Kemudian dilakukan uji sifat fisik salep yang dilakukan setiap satu minggu sekali selama 2 bulan.

Pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis salep hidrokarbon

Vaselin album dan paraffin cair dilebur diatas waterbath secara bersamaan sambil diaduk. Kemudian dituang dalam mortir panas sekitar suhu 80°C, digerus sampai homogen dan tambahkan minyak atsiri. Basis yang sudah dicampurkan minyak atsiri diaduk sampai homogen. Masukkan dalam pot salep. Kemudian dilakukan uji sifat fisik salep yang dilakukan setiap satu minggu sekali selama 2 bulan.

Pemeriksaan kestabilan fisik

Sediaan salep diamati secara organoleptis untuk mengetahui homogenitas, warna dan bau setiap minggu selama delapan minggu pada suhu kamar.

Tabel 1. Formulasi salep minyak atsiri daun jeruk limau

Bahan	Formula I	Formula II	Formula III
Minyak atsiri	0.01 mL	0.01 mL	0.01 mL
PEG 400	17.46 g	-	-
PEG 4000	7.48 g	-	-
Lanolin	-	14.9 g	-
Unguentum simplek	-	10.1 g	-
Paraffin cair	-	-	23.6 g
Vaselin album	-	-	1.3 g
Nipagin	0.025 g	0.025 g	0.025 g
Nipasol	0.025 g	0.025 g	0.025 g
Jumlah	25 g	25 g	25 g

Keterangan: (i) Formula I: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis larut air. (ii) Formula II: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis absorpsi / serap. (iii) Formula III: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis hidrokarbon.

Uji homogenitas

Sediaan diuji homogenitasnya dengan mengoleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan yang cocok. Diamati sediaan salep menunjukkan susunan yang homogen. Cara diatas diulangi masing-masing 3 kali (Anonim, 1979)

Uji daya sebar salep

Di timbang 0.5 g salep, kemudian diletakkan di tengah alat (kaca bulat). Ditimbang dahulu kaca yang satunya. Kaca di letakkan diatas massa salep dan dibiarkan selama 1 menit. Kemudian diukur berapa diameter salep yang menyebar (dengan mengambil panjang rata-rata diameter dari beberapa sisi). Ditambahkan 10 g beban tambahan, diamkan selama 1 menit dan dicatat diameter salep yang menyebar seperti sebelumnya. Diteruskan dengan menambah tiap kali dengan beban tambahan 10 g sampai salep tidak menyebar dan dicatat diameter salep yang menyebar. Uji ini diulang masing-masing 3 kali untuk tiap salep yang diperiksa.

Uji daya melekat salep

Salep diletakkan secukupnya diatas gelas objek yang telah diketahui luasnya. Diletakkan gelas objek yang lain diatas salep tersebut. Kemudian ditekan dengan beban 500 kg selama 5 menit. Dipasang gelas objek pada alat tes. Kemudian dilepaskan beban seberat 50 g dan dicatat waktunya hingga kedua gelas objek ini terlepas. Dilakukan tes untuk formula salep dengan masing-masing 3 kali percobaan.

Uji viskositas

Uji viskositas salep dilakukan dengan alat viskotester. Viskotester dipasang pada klemnya dengan arah horizontal atau tegak lurus dengan arah klem. Rotor kemudian dipasang viskotester dengan menguncinya berlawanan arah dengan jarum jam. Mangkuk diisi sampel salep yang akan diuji, rotor ditempatkan tepat berada ditengah-tengah yang berisi salep, kemudian alat dihidupkan dan ketika rotor mulai berputar jarum penunjuk viskositas secara otomatis akan bergerak menuju kekanan kemudian setelah stabil, viskositas dibaca pada skala dari rotor yang digunakan. Cara diatas diulangi masing-masing 3 kali.

Pemeriksaan pH

Sebanyak 0,5 g sediaan salep dilarutkan dalam 30 mL akuades. Diukur nilai pH-nya menggunakan pH meter sampai menunjukkan nilai pH yang konstan. Pemeriksaan pH dilakukan setiap minggu selama delapan minggu pada suhu kamar.

Uji iritasi

Uji iritasi dilakukan dengan mengoleskan salep ke kulit tangan sukarelawan. Dibiarkan selama 5 menit. Pengujian keamanan sediaan salep yang dibuat dilakukan terhadap dua puluh orang sukarelawan dengan uji tempel terbuka (*patch test*), yakni : Sejumlah sediaan uji dioleskan pada punggung tangan kanan sukarelawan dan dibiarkan terbuka selama 5 menit. Punggung tangan kanan diolesi sediaan basis salep. Selanjutnya perubahan warna yang terjadi pada punggung tangan kanan masing-masing sukarelawan

diamati. Jika tidak terjadi reaksi (tidak merah dan tidak bengkak) diberi tanda (-), jika terjadi reaksi (kulit memerah) diberi tanda (+), selanjutnya jika terjadi pembengkakan diberi tanda (++). Pada punggung tangan dilihat apakah tampak adanya iritasi (kemerahan) ada kulit yang dioleskan salep tersebut dibandingkan dengan kontrol yaitu punggung tangan kiri (Padmadisastra et al., 2007).

Analisis data

Data yang diperoleh dari uji sifat fisik salep dianalisis secara statistik untuk mengetahui data terdistribusi secara normal atau tidak menggunakan Kolmogorov-Smirnov. Hasil data yang diperoleh dilanjutkan dengan analisis ANOVA satu jalan dan Uji Tukey.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tanaman

Determinasi daun jeruk limau (*Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochs) dilakukan di Laboratorium Morfologi Sistematis Tumbuhan, Universitas Setia Budi, Surakarta, Jawa Tengah.

Hasil penentuan rendemen minyak atsiri

Daun jeruk limau segar sebanyak 2 kg (2.000 g) didestilasi dengan destilasi uap air dan didapat minyak atsiri 15 mL. Bobot jenis minyak atsiri daun jeruk limau didapat 0,928 g/mL. Rendemen minyak atsiri daun jeruk limau didapat sebesar 0,696 %.

Hasil uji sifat fisik salep minyak atsiri daun jeruk limau *Homogenitas salep*

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui homogenitas dari formula salep yang diteliti. Hasil uji homogenitas dari ketiga formula salep ditunjukkan pada Tabel 2.

Hasil pengujian homogenitas masing-masing formula salep saat dioleskan pada sekeping kaca menunjukkan hasil yang homogen yaitu olesan terlihat rata dan tidak ada perbedaan warna. Selama waktu delapan minggu, salep disimpan dalam suhu kamar dan saat diamati salep tetap homogen dan konsistensi bentuknya tidak mengalami perubahan yaitu tidak ada pemisahan komponen ataupun ketidakseragaman bentuknya. Hasil pengujian homogenitas ini sesuai dengan persyaratan Ekstra Farmakope Indonesia 1974 yaitu jika salep dioleskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lain yang cocok harus menunjukkan susunan yang homogen yang dapat dilihat dengan tidak adanya partikel yang bergerombol dan menyebar secara merata. Hal ini berarti ketiga tipe basis salep yang digunakan dalam pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau mempunyai homogenitas yang baik.

Uji viskositas salep

Viskositas merupakan tahanan dari suatu cairan untuk mengalir. Semakin besar tahanan, maka viskositasnya semakin besar. Hasil uji viskositas salep minyak atsiri daun jeruk limau ditunjukkan pada Tabel 2.

Data hasil viskositas ketiga formula tersebut kemudian diuji menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi secara normal atau tidak. Hasil yang diperoleh dari analisis Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa besarnya signifikan untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya yaitu sebesar 0.062, 0.061, dan 0.060 > 0.05 sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi secara normal. Selanjutnya, untuk mengetahui adanya pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap viskositas basis salep yang digunakan maka dilakukan uji ANOVA satu jalan. Hasil perhitungan analisis anova didapat nilai F hitung untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya masing masing sebesar 0.146, 0.131 dan 0.272 dengan nilai signifikansi masing-masing 0.931, 0.941 dan 0.704. Nilai F tabel (df 3-28) pada tingkat signifikansi 0,05 adalah 2.95. Nilai F hitung (0.931, 0.941, 0.704) < F tabel (2.95). Artinya tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap ketiga basis salep yang digunakan. Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Test yaitu metode Tukey. Dipilih metode tukey karena sebelumnya data dianalisa dengan ANOVA dimana jika data diuji menggunakan ANOVA selanjutnya diteruskan dengan uji Post Hoc Test metode Tukey. Salah satu fungsi uji Post Hoc Test adalah mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok variabel. Dari hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok variabel. Tidak adanya tanda bintang (*) pada *mean difference* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kontrol dan formula. Dapat disimpulkan tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap viskositas ketiga basis salep yang digunakan.

Uji organoleptis salep

Pengujian organoleptis salep minyak atsiri daun jeruk limau meliputi bentuk warna dan bau. Hasil uji organoleptis ditunjukkan pada Tabel 3. Hasil pengujian menunjukkan kestabilan warna, bau dan bentuk yang tidak mengalami perubahan selama 8 minggu. Dari hasil yang didapat, sediaan salep dengan basis larut air, adsorpsi dan hidrokarbon dapat dikatakan memiliki kestabilan yang cukup baik.

Uji pH

Pemeriksaan pH adalah salah satu bagian dari kriteria pemeriksaan sifat kimia dalam memprediksi kestabilan sediaan salep. Hasil pengamatan uji pH selama 8 minggu ditunjukkan pada Tabel 2. Dari Tabel 2 dapat dilihat tidak terjadi penurunan pH yang signifikan dari minggu ke minggu untuk masing-masing formula salep. Besarnya nilai pH telah memenuhi persyaratan nilai pH basis salep yang baik yaitu antara 5,5 hingga 7 (Troy et al. 2005). Penurunan yang terjadi karena ketidakstabilan suhu dan kondisi penyimpanan pada waktu pengamatan.

Uji pH penting dilakukan untuk mengetahui stabilitas pH salep dan pH harus sesuai dengan pH kulit supaya tidak terjadi iritasi pada kulit. Kestabilan pH harus stabil dari minggu ke minggu agar salep aman digunakan pada kulit.

Tabel 2. Hasil berbagai parameter salep minyak atsiri daun jeruk limau selama 8 minggu

Formula	Uji homogenitas	Uji viskositas	Uji pH	Daya Sebar	Daya Lekat	Uji Iritasi
		$\bar{x} \pm Sd$	$\bar{x} \pm Sd$	$\bar{x} \pm Sd$	$\bar{x} \pm Sd$	
I	Homogen	618.96 ± 2.944	7.26 ± 0.0185	2.44 ± 0.0259	6.26 ± 0.0185	(-)
II	Homogen	225 ± 8.9078	6.64 ± 0.0383	5.56 ± 0.0988	1.73 ± 0.0709	(-)
III	Homogen	311.46 ± 7.635	6.29 ± 0.0372	4.28 ± 0.0309	3.42 ± 0.0555	(-)

Tabel 3. Hasil uji organoleptis selama 8 minggu

Uji	Formula I	Formula II	Formula III
Warna	Putih	Agak kekuningan	Putih
Bau	Khas minyak atsiri	Khas minyak atsiri	Khas minyak atsiri
Bentuk	Konsistensi salep	Konsistensi salep	Konsistensi salep

Keterangan: (i) Formula I: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis larut air. (ii) Formula II: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis absorpsi / serap. (iii) Formula III: Salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan basis hidrokarbon. Masing-masing formula direplikasi 3 kali dengan kontrol negatif untuk tiap formula

Data hasil pH ketiga formula tersebut kemudian diuji menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi secara normal atau tidak. Hasil yang diperoleh dari analisis Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa besarnya signifikan untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya yaitu sebesar 0.061, 0.152, dan $0.053 > 0.05$ sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi secara normal. Selanjutnya, untuk mengetahui adanya pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap pH basis salep yang digunakan maka dilakukan uji ANOVA satu jalan. Hasil perhitungan analisis anova didapat nilai F hitung untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya masing masing sebesar 0.301, 0.506 dan 0.196 dengan nilai signifikansi masing-masing 0.824, 0.681 dan 0.898. Nilai F tabel (df 3-28) pada tingkat signifikansi 0,05 adalah 2.95. Nilai F hitung ($0.301, 0.506, 0.196 < F$ tabel (2.95). Artinya tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap ketiga basis salep yang digunakan. Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Test yaitu metode Tukey. Dipilih metode tukey karena sebelumnya data dianalisa dengan ANOVA dimana jika data diuji menggunakan ANOVA selanjutnya diteruskan dengan uji Post Hoc Test metode Tukey. Salah satu fungsi uji Post Hoc Test adalah untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok variabel. Dari hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok variabel. Tidak adanya tanda bintang (*) pada *mean difference* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kontrol dan formula. Dapat disimpulkan tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap pH ketiga basis salep yang digunakan.

Daya sebar salep

Daya sebar salep dapat didefinisikan sebagai kemampuan menyebarnya salep pada permukaan kulit yang akan diobati. Suatu sediaan salep diharapkan mampu menyebar dengan mudah ditempat pemberian, tanpa

menggunakan tekanan yang berarti. Semakin mudah dioleskan maka luas permukaan kontak obat dengan kulit semakin besar, sehingga absorpsi obat ditempat pemberian semakin optimal.

Daya menyebar berhubungan dengan viskositas, semakin besar viskositas salep maka daya penyebarannya menjadi semakin kecil. Permukaan penyebaran yang dihasilkan dengan peningkatan beban yang ditambahkan merupakan karakteristik daya sebar salep. Luas penyebaran berbanding lurus dengan kenaikan beban yang ditambahkan, semakin besar beban yang ditambahkan maka luas penyebarannya semakin lama.

Hasil uji daya sebar salep minyak atsiri daun jeruk limau ditunjukkan pada Tabel 2. Hasil pengujian menunjukkan bahwa luas penyebaran pada formula II memberikan hasil penyebaran yang paling besar, karena formula II memiliki viskositas yang paling rendah. Formula I memiliki daya sebar paling kecil karena formula I memiliki viskositas yang paling besar.

Data hasil penyebaran ketiga formula tersebut kemudian diuji menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi secara normal atau tidak. Hasil yang diperoleh dari analisis Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa besarnya signifikan untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya yaitu sebesar 0.052, 0.135, dan $0.052 > 0.05$ sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi secara normal. Selanjutnya, untuk mengetahui adanya pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap diameter penyebaran basis salep yang digunakan maka dilakukan uji ANOVA satu jalan. Hasil perhitungan analisis anova didapat nilai F hitung untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya masing masing sebesar 0.467, 1.031 dan 0.246 dengan nilai signifikansi masing-masing 0.708, 0.394 dan 0.864. Nilai F tabel (df 3-28) pada tingkat signifikansi 0,05 adalah 2.95. Nilai F hitung ($0.467, 1.031, 0.246 < F$ tabel (2.95). Artinya tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap diameter penyebaran ketiga basis salep yang digunakan.

Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Test yaitu metode Tukey. Dipilih metode tukey karena sebelumnya data dianalisa dengan ANOVA dimana jika data diuji menggunakan ANOVA selanjutnya diteruskan dengan uji Post Hoc Test metode Tukey. Salah satu fungsi uji Post Hoc Test adalah untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok variabel. Dari hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok variabel. Tidak adanya tanda bintang (*) pada *mean difference* menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kontrol dan formula. Dapat disimpulkan tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap diameter penyebaran ketiga basis salep yang digunakan.

Daya lekat salep

Pengujian daya lekat salep dilakukan untuk mengetahui kemampuan salep untuk menempel pada permukaan kulit. Semakin besar daya lekat salep maka absorpsi obat akan semakin besar karena ikatan yang terjadi antara salep dengan kulit semakin lama, sehingga basis dapat melepaskan obat lebih optimal. Hasil uji daya lekat salep minyak atsiri daun jeruk limau ditunjukkan pada Tabel 2.

Pada data pengamatan menunjukkan formula I memiliki daya lekat yang paling lama dibanding formula yang lainnya. Hal ini dikarenakan formula I juga memiliki viskositas yang besar, sehingga kemampuan melekatnya pada kulit juga semakin lama. Formula II memiliki daya melekat yang paling kecil. Hal ini dikarenakan formula I memiliki viskositas yang paling rendah.

Data hasil daya lekat ketiga formula tersebut kemudian diuji menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk mengetahui data terdistribusi secara normal atau tidak. Hasil yang diperoleh dari analisis Kolmogorov-Smirnov menunjukkan bahwa besarnya signifikan untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya yaitu sebesar 0.060, 1.175, dan 0.058 > 0.05 sehingga dapat disimpulkan data terdistribusi secara normal. Selanjutnya, untuk mengetahui adanya pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap daya lekat basis salep yang digunakan maka dilakukan uji ANOVA satu jalan. Hasil perhitungan analisis anova didapat nilai F hitung untuk Formula I, Formula II dan Formula III terhadap kontrolnya masing masing sebesar 0.115, 1.083 dan 0.520 dengan nilai signifikansi masing-masing 0.951, 0.373 dan 0.672. Nilai F tabel (df 3-28) pada tingkat signifikansi 0,05 adalah 2.95. Nilai F hitung (0.115, 1.083, 0.520) < F tabel (2.95). Artinya tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap daya lekat ketiga basis salep yang digunakan. Selanjutnya dilakukan uji Post Hoc Test yaitu metode Tukey. Dipilih metode tukey karena sebelumnya data dianalisa dengan ANOVA dimana jika data diuji menggunakan ANOVA selanjutnya diteruskan dengan uji Post Hoc Test metode Tukey. Salah satu fungsi uji Post Hoc Test adalah untuk mengetahui lebih lanjut perbedaan yang terjadi antar kelompok variabel. Dari hasil analisis menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok variabel. Tidak adanya tanda bintang (*) pada *mean difference* menunjukkan tidak ada perbedaan yang

signifikan antara kontrol dan formula. Dapat disimpulkan tidak ada pengaruh penambahan minyak atsiri daun jeruk limau terhadap daya lekat ketiga basis salep yang digunakan.

Uji Iritasi

Uji iritasi dilakukan pada akhir minggu ke delapan. Hasil uji iritasi ditunjukkan pada Tabel 2. Dari data hasil pengamatan, dapat diketahui bahwa setiap formula sediaan salep minyak atsiri daun jeruk limau dengan variasi basis salep tidak memberikan reaksi iritasi baik reaksi kemerahan maupun pembengkakan pada tangan kanan yang dioleskan dibandingkan dengan tangan kiri sebagai kontrol pada kulit sukarelawan sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan salep minyak atsiri daun jeruk limau aman untuk digunakan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan salep minyak atsiri daun jeruk limau aman untuk digunakan.

KESIMPULAN

Berdasarkan uji stabilitas salep yang dilakukan, ketiga tipe basis yang digunakan dalam salep minyak atsiri daun jeruk limau mempunyai stabilitas fisik yang baik; Formulasi pertama yaitu dengan menggunakan tipe basis salep larut air (campuran PEG 400 dan PEG 4000 70:30) merupakan tipe basis yang paling stabil untuk digunakan sebagai basis minyak atsiri daun jeruk limau karena mempunyai hasil yang paling kecil yaitu uji viskositas sebesar 2.944, uji pH sebesar 0.0185, uji daya sebar sebesar 0,0259 dan uji daya lekat sebesar 0,0185.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta A. 2000. Minyak Atsiri Tumbuhan Tropik Indonesia. Penerbit ITB, Bandung.
- Anonim. 1979. Farmakope Indonesia, edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Ansel HC. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Penerj.: Ibrahim F, Asmanizar, Aisyah I. Edisi ke-4. UI Press, Jakarta.
- Bae JM, Lee EJ, Guejati G. 2008. Citrus Fruit in take and Stomach Cancer Risk a Quantitative Systematic review. *Gastric Cancer* 2 (1): 23-32.
- Jiao S, Huang C, Wang H, Yu S. 2007. Effects of *Citrus aurantium* extract on Liver Antioxidant Defense Function in Experimental Diabetic Mouse. *Wei Sheng Yan Ju* 36 (6): 689-692.
- Luo G, Guan X, Zhou L. 2008. Apoptotic effect of *Citrus* fruit extract nobletin on Lung Cancer Cell Line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 1 (1): 76.
- Muhlisah F. 2004. Tanamaan Obat Keluarga. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Mulyani S. 2009. Analisis GC-MS dan daya anti bakteri minyak atsiri *Citrus amblycarpa* (Hassk) Ochse. Fakultas Farmasi UGM, Yogyakarta.
- Padmadisastra Y, Anggia S. 2007. Formulasi sediaan salep antikeloidall yang mengandung ekstrak terfasilitasi panas microwave dari herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban). *Jurnal Farmasi* 1 (1): 1-5.
- Tjay TH, Rahardja K. 2008. Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-Efek Sampingnya. Edisi Keenam. Penerbit PT. Elex. Media Komputindo, Jakarta.
- Voight R. 1995. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.

Keamanan teh gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dari pohon induksi melalui uji toksisitas subkronik oral 90 hari

The safety of tea agarwood (*Aquilaria malaccensis*) from tree induction through test of toxicity subchronic oral 90 days

RIDWANTI BATUBARA¹, SURJANTO², TAHAN MANGARANAP SIHOMBING¹, HERAWATY GINTING²

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

²Fakultas Farmasi, Universitas Sumatera Utara. Medan 20155, Sumatera Utara

Manuskrip diterima: 12 Juni 2016. Revisi disetujui: 4 Agustus 2016.

Abstract. Batubara R, Surjanto, Sihombing TM, Ginting H. 2016. The safety of tea agarwood (*Aquilaria malaccensis*) from tree induction through test of toxicity subchronic oral 90 days. *Biofarmasi* 14: 69-76. Subchronic toxicity test is a test to detect the toxic effect that arises after the administration of the test reparation with repeated doses were given orally to the tested animal for 28 or 90 days. Leaves agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk) is a tree from a tribe Thymelaeaceae, already started popular used the farmer agarwood in Langkat as a drink that in pour. The result of an interview with the farmer agarwood explained that consume tea from the leaves agarwood of this kind of have many benefits include improve canal. To that was done the research security against the tea leaves agarwood induction taken from agriculture agarwood in Langkat, Sumatera North through test toxic subchronic oral. This study aims to determine the symptoms of toxic posed by product tea agarwood induction. This study used laboratory animals that male mice and female mice were divided into 5 groups, namely the 130, 260, 390, 520 mg/kgBW and the control group. The observation of clinical symptoms indicate the presence of toxic symptoms of weakness, changes in fur and agitated at doses of 390 and 520 mg/kgBW in male mice and female mice, the observation macropathology organs alloxan still normal the red-brown, the surface of slippery and consistency chewy. Histopathological results showed hemoglia and dilation of the blood vessels in all groups. Results showed that mice were given tea steeping agarwood induction doses ranging from 130, 260, 390 and 520 mg/kgBW there are no mice died, so it can be concluded that the administration of agarwood tea steeping in mice does not cause toxic symptoms and safe for consumption.

Keywords: Agarwood, subchronic oral, toxicity

PENDAHULUAN

Berubahnya pola hidup masyarakat serta pola makan yang tidak benar dan pertambahan usia mengakibatkan pembentukan radikal bebas dalam tubuh. Padatnya aktivitas kerja cenderung menyebabkan masyarakat mengkonsumsi makanan yang serba instan dan menerapkan pola makan yang tidak sehat. Makanan yang tidak sehat akan menyebabkan akumulasi jangka panjang terhadap radikal bebas di dalam tubuh. Lingkungan tercemar, kesalahan pola makan dan gaya hidup, mampu merangsang tumbuhnya radikal bebas (*free radical*) yang dapat merusak tubuh (Mega dan Swastini 2010).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, akibatnya kerusakan sel dapat dihindari. Antioksidan berfungsi menetralkan radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapatkan pasangan elektron dan menjadi stabil. Keberadaan antioksidan dapat melindungi tubuh dari berbagai macam penyakit degeneratif dan kanker (Winarsi 2007).

Daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) sudah mulai populer dimanfaatkan masyarakat petani gaharu di Bohorok, Kabupaten Langkat sebagai minuman yang diseduh. Pemanfaatan daun gaharu yang digunakan sebagai minuman yang di seduh didukung hasil penelitian Surjanto et al. (2014) menunjukkan bahwa skrining fitokimia simplisia daun gaharu, ekstrak etanol daun gaharu dan ekstrak etanol simplisia memiliki golongan senyawa metabolit sekunder yaitu flavanoid, glikosida, tanin, dan steroid/triterpenoid yang berpotensi sebagai antioksidan. Hasil uji antioksidan juga menunjukkan baik daun tua maupun daun muda gaharu memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, begitu juga perbedaan umur daun gaharu juga tetap menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Hasil penelitian sebelumnya mendorong untuk pengembangan daun gaharu sebagai teh antioksidan. Dalam hal ini, salah satu informasi yang dibutuhkan adalah keamanan produk yang dibuat untuk manusia. Untuk itu perlu dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui tentang keamanan produk teh antioksidan daun gaharu secara non klinik, melalui uji toksisitas subkronik oral 90 hari.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli hingga November 2016. Pengambilan sampel dilakukan di pertanaman pohon gaharu di Langkat, Sumatera Utara. Pembuatan teh dan pengujian subkronik oral di Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Uji darah di Laboratorium Kesehatan Daerah dan Histopatologi Organ di Laboratorium Histopatologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatra Utara, Medan.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan adalah alat-alat gelas laboratorium, alat bedah (*Wells Spencer*), blender, lemari pengering, neraca digital, neraca hewan (*Presica Geniweigher GW-1500*), neraca kasar (ohaus), kandang mencit, dot, oral sonde, mikro tube, botol pot, gelas ukur, kaca arloji, batang pengaduk, botol vial, tisu, kertas saring, kertas perkamen, lemari pengering, lemari penyimpanan, sentrifuge, spuit dan kamera digital.

Bahan yang digunakan adalah daun gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) segar yang sudah di keringkan, Air panas, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 dan formaldehyd.

Prosedur

Pengambilan sampel tanaman

Pengambilan sampel dilakukan secara purposive yaitu tanpa membandingkan dengan tanaman yang sama dari daerah yang lain. Pengambilan sampel ini dilakukan berdasarkan pohon yang diinduksi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gaharu yang diinduksi yang diambil dari pertanaman pohon gaharu di Langkat, Sumatera Utara.

Pembuatan seduhan teh

Dibersihkan sampel daun gaharu dari kotoran yang menempel dengan air mengalir. Dilayukan dengan disebarkan di atas kertas perkamen hingga airnya terserap. Dilakukan pengeringan di lemari pengering pada temperatur $\pm 40^\circ\text{C}$ sampai kering (ditandai bila diremas rapuh). Diblender daun yang sudah kering. Ditimbang daun gaharu yang sudah diblender sesuai dengan dosis. Diseduh teh gaharu dengan air panas.

Hewan penelitian

Hewan percobaan yang digunakan adalah mencit jantan dan betina dengan berat 20-30 g berumur 2-3 bulan. Sebelum percobaan dimulai, hewan diaklimatisasi di ruang percobaan selama 2 minggu. Hewan dikelompokkan secara acak sedemikian rupa sehingga penyebaran berat badan merata untuk semua kelompok. Sebanyak 25 ekor mencit jantan dan 25 ekor mencit betina dibagi dalam 5 kelompok.

Pengelompokan hewan uji dan pemberian sediaan uji

Hewan uji yang digunakan yaitu mencit (*Mus musculus*) yang sehat sebanyak 25 ekor jantan dan 25 ekor betina yang dibagi ke dalam 4 kelompok perlakuan, tiap kelompok terdiri dari 10 ekor mencit, yaitu 5 ekor mencit jantan dan 5 ekor mencit betina. Kelompok 1, 2, 3, dan 4

sebagai kelompok perlakuan dan kelompok 5 sebagai kontrol.

Pembagian kelompok hewan uji sebagai berikut: (i) Kelompok 1: Perlakuan, diberikan ekstrak daun gaharu dengan dosis 130 mg/kg berat badan. (ii) Kelompok 2: Perlakuan, diberikan ekstrak daun gaharu dengan dosis 260 mg/kg berat badan. (iii) Kelompok 3: Perlakuan, diberikan ekstrak daun gaharu dengan dosis 390 mg/kg berat badan. (iv) Kelompok 4: Perlakuan, diberikan ekstrak daun gaharu dengan dosis 520 mg/kg berat badan. (v) Kelompok 5: Kontrol. Sediaan uji diberikan secara oral menggunakan oral sonde setiap hari selama tiga bulan (90 hari) dan dilakukan pengamatan.

Penetapan dosis

Dosis teh gaharu adalah 1 g. Faktor konversi dari manusia ke mencit, yaitu 0,0026, maka dosis sediaan uji untuk mencit adalah $= 2,6 \text{ g}/20 \text{ g bb mencit} = 0,13 \text{ g/kg bb mencit}$. Dosis ini ditetapkan sebagai dosis terendah yang akan diberikan. Penentuan dosis terbesar dilakukan dengan uji pendahuluan untuk mengetahui dosis terbesar yang dapat disondekan kepada mencit, diperoleh dosis 0,52 g/kg bb mencit. Untuk mendapatkan hasil yang baik digunakan dosis secara berturut-turut yang akan mengikuti progresi geometris yaitu:

$$Y_N = Y_1 \times R^{N-1}$$

Dimana:

Y_1 = Dosis pertama,

Y_N = Dosis ke-N,

R = Faktor geometris $\neq 0$ atau 1 kelipatan dosis.

Dengan memasukkan dosis terendah (dosis ke-1) dan dosis tertinggi (dosis ke-4) ke dalam persamaan, maka diperoleh faktor geometris $0,52 = 0,13 \times R^{4-1}$, sehingga diperoleh $R = 2$. Berdasarkan perhitungan tersebut, untuk mendapatkan 4 dosis digunakan kelipatan antar dosis sebesar 2, sehingga perhitungan dosis yang akan diberikan sebagai berikut: (i) Dosis 1 = 0,13 g/kg bb, (ii) Dosis 2 = $2 \times \text{dosis 1} = 0,26 \text{ g/kg bb}$, (iii) Dosis 3 = $3 \times \text{dosis 1} = 0,39 \text{ g/kg bb}$, (iv) Dosis 4 = $4 \times \text{dosis 1} = 0,52 \text{ g/kg bb}$.

Pengamatan toksisitas subkronik

Sediaan uji diberikan secara oral setiap hari selama 90 hari. Setelah diberikan sediaan uji, 1 jam kemudian dilakukan pengamatan selama 2 jam. Pengamatan yang terjadi berupa gejala-gejala toksik dan gejala klinis seperti perilaku fisik (tremor, salivasi, diare, lemas, gerak-gerik hewan seperti berjalan mundur dan menggunakan perut) (Rasyid et al. 2012). Adapun cara pengamatannya adalah sebagai berikut: (i) Salivasi. Pengeluaran salivasi mencit yang telah diberi seduhan teh gaharu dibandingkan dengan kontrol, menggunakan kertas saring. (ii) Diare. Pengeluaran feses mencit yang telah diberi ekstrak seduhan teh gaharu dibandingkan dengan kontrol, menggunakan kertas saring. (iii) Tremor. Hewan yang telah diberi ekstrak seduhan teh gaharu, diamati tremor atau tubuh hewan bergetar. (iv) Lemas. Hewan yang telah diberi seduhan teh gaharu diamati aktivitasnya secara umum. (v) Gerak-gerik

hewan. Hewan yang telah diberi seduhan teh gaharu diamati gerak- geriknya seperti berjalan mundur dan berjalan menggunakan perut.

Pengamatan berat badan

Monitoring berat badan dilakukan seminggu sekali. Hewan uji ditimbang untuk menentukan volume sediaan uji yang diberikan. Pada akhir penelitian, hewan yang masih hidup diotopsi (BPOM RI 2014).

Pengamatan kematian hewan

Kematian mencit diamati dari hari pertama sampai hari ke 90 dan mencit yang mati selama waktu pemberian sediaan uji segera diotopsi (BPOM RI 2014).

Pengamatan makroskopik organ hati dan ginjal

Mencit yang mati segera diotopsi dan dilakukan pengamatan terhadap organ hati. Pengamatan meliputi warna, permukaan dan konsistensi organ hati secara visual.

Pengamatan histopatologi organ

Organ yang diperiksa secara histopatologi adalah hati dan ginjal. Organ yang sudah dipisahkan segera dimasukkan dalam larutan dapar formalin 10% dan dibuat preparat histopatologi dengan pewarnaan hematoksin dan eosin kemudian diperiksa di bawah mikroskop.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi daun gaharu

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 90% yang bertujuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam serbuk daun gaharu. Hasil maserasi dari 100 g serbuk simplisia diperoleh ekstrak kental 2,02 g.

Uji toksisitas subkronik oral

Pengamatan terhadap uji toksisitas subkronik seduhan teh gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) dilakukan setiap hari selama 90 hari meliputi perilaku fisik, jumlah kematian hewan, jumlah makanan, berat badan, SGPT, SGOT, makropatologi dan gambaran histopatologi organ hati dan ginjal.

Gejala toksik

Hasil pengamatan yang dilakukan setiap hari selama 90 hari terhadapnya adanya kejang, salivasi, diare, lemas, perubahan bulu, gerak-gerak hewan seperti berjalan mundur dan berjalan dengan perut disajikan pada Tabel 1. Pada Tabel 1 disajikan bahwa pemberian seduhan teh gaharu tidak ditemukan adanya gejala toksik pada kelompok dosis 130 mg/kg bb, 260 mg/kg bb dan kelompok kontrol. Pada dosis 390 mg/kg bb terdapat gejala toksik yaitu lemas, perubahan bulu dan gelisah sedangkan pada dosis 520 mg/kg bb ditemukan gejala toksik yaitu terjadi lemas, perubahan bulu dan gelisah. Sifat toksik dari suatu senyawa

sangat ditentukan oleh dosis. Kenaikan dosis biasanya akan menyebabkan lebih banyak sistem organ yang dikenai dan akan memberikan efek kerja yang jauh berbeda. Jumlah individu yang menunjukkan efek toksik atau efek terapeutik tergantung dari dosisnya. Setelah dosis berada pada dosis toksik maka zat tersebut dapat menimbulkan keracunan (Wirasuta dan Niruni 2007).

Berat badan

Penimbangan berat badan dilakukan sekali dalam seminggu untuk menentukan volume sediaan yang diberikan dan melihat perubahan berat badan setiap minggunya selama tiga bulan (90 hari). Hasil pengamatan berat badan mencit jantan dan mencit betina setelah diberikan seduhan teh gaharu disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2 menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kenaikan berat badan mencit jantan dengan pemberian seduhan teh gaharu. Hal ini dapat dinyatakan bahwa pemberian seduhan teh gaharu tidak berpengaruh terhadap perkembangan berat badan mencit jantan. Parameter yang merupakan indikator sensitif untuk memenuhi toksisitas yaitu gejala klinis dan berat badan. Hewan uji diamati setiap hari untuk gejala klinis dan berat badan diukur skala berkala (Gupta dan Bhardwaj 2012).

Berdasarkan Tabel 3 menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara kenaikan berat badan mencit betina dengan pemberian seduhan teh gaharu pada minggu 1-10 ($p < 0,01$), sedangkan berat badan mencit betina pada minggu 11-13 menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kenaikan berat badan mencit betina dengan pemberian seduhan teh gaharu ($p > 0,01$). Hal ini dapat dinyatakan bahwa pemberian seduhan teh gaharu berpengaruh terhadap perkembangan berat badan mencit betina.

Kematian

Hasil pengamatan kematian mencit jantan dan mencit betina dapat disajikan pada Tabel 4. Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat bahwa pemberian seduhan teh gaharu selama 90 hari pada kelompok dosis 130 mg/kgBB, 260 mg/kgBB, 390 mg/kgBB, 520 mg/kgBB dan kelompok kontrol tidak terdapat mencit yang mati. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian seduhan teh gaharu tidak mengandung senyawa toksik karena tidak ada mencit yang mati. Efek toksik bertambah dengan naiknya dosis.

Dosis 2000 mg/kgBB merupakan konversi dosis maksimal pada manusia ke mencit berdasarkan ratio luas permukaan tubuh. Berdasarkan kesepakatan para ahli, bila pada dosis maksimal tidak ada kematian pada hewan coba, maka jelas senyawa tersebut termasuk dalam kriteria “*praktis tidak toksik*” (Iwuanyanwu et al. 2012).

Berat organ

Hasil pengamatan berat organ hati, ginjal kanan dan ginjal kiri dapat disajikan pada Tabel 5.

Tabel 1. Hasil pengamatan gejala toksik mencit jantan dan betina setelah diberikan seduhan teh gaharu

Kelompok Perlakuan	Kejang	Salivasi	Diare	Lemas	Perubahan bulu		Jalan mundur	Perilaku Jalan dengan perut	Gelisah
					Rontok	Warna			
Jantan									
Dosis 130 mg/kg bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dosis 260 mg/kg bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dosis 390 mg/kg bb	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Dosis 520 mg/kg bb	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Betina									
Dosis 130 mg/kg bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dosis 260 mg/kg bb	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dosis 390 mg/kg bb	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Dosis 520 mg/kg bb	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 2. Hasil rata-rata berat badan mencit jantan setelah diberikan teh gaharu

Minggu	Rata-rata berat badan (g) \pm SD				
	Dosis 130 mg/kg bb	Dosis 260 mg/kg bb	Dosis 390 mg/kg bb	Dosis 520 mg/kg bb	Kontrol
1	27,82 \pm 2,18	28,80 \pm 1,69	28,28 \pm 2,34	26,46 \pm 5,39	30,70 \pm 1,81
2	29,32 \pm 1,87	28,62 \pm 1,43	27,54 \pm 2,44	26,76 \pm 1,92	31,70 \pm 1,03
3	29,76 \pm 1,93	28,98 \pm 1,47	27,84 \pm 2,43	28,04 \pm 1,78	32,58 \pm 1,06
4	32,84 \pm 1,11	32,86 \pm 2,46	31,74 \pm 2,71	28,58 \pm 1,95	32,84 \pm 1,05
5	31,64 \pm 3,05	32,34 \pm 1,68	31,26 \pm 2,83	31,40 \pm 3,35	33,58 \pm 0,98
6	36,12 \pm 2,85	33,62 \pm 2,63	33,14 \pm 2,34	34,02 \pm 5,40	36,28 \pm 1,80
7	37,04 \pm 2,99	35,98 \pm 3,89	35,24 \pm 2,17	33,20 \pm 5,00	37,88 \pm 2,55
8	37,66 \pm 2,78	35,04 \pm 2,73	35,94 \pm 2,58	33,96 \pm 5,13	39,10 \pm 2,88
9	37,28 \pm 2,32	35,76 \pm 2,75	35,82 \pm 2,47	33,92 \pm 4,89	38,36 \pm 2,32
10	37,88 \pm 2,60	36,74 \pm 2,79	36,54 \pm 2,07	34,56 \pm 4,96	38,56 \pm 2,62
11	38,82 \pm 2,75	37,66 \pm 3,59	37,60 \pm 1,31	35,40 \pm 4,92	39,28 \pm 3,01
12	39,48 \pm 2,73	38,20 \pm 3,31	38,26 \pm 1,45	36,30 \pm 4,52	39,82 \pm 2,63
13	39,76 \pm 2,00	38,80 \pm 2,46	38,94 \pm 1,53	37,18 \pm 4,48	40,56 \pm 2,14

Tabel 3. Hasil rata-rata berat badan mencit betina setelah diberikan teh gaharu

Minggu	Rata-rata berat badan (g) \pm SD				
	Dosis 130 mg/kg bb	Dosis 260 mg/kg bb	Dosis 390 mg/kg bb	Dosis 520 mg/kg bb	Kontrol
1	25,44 \pm 2,17	24,46 \pm 2,91	26,22 \pm 3,30	25,30 \pm 1,19	31,36 \pm 0,79
2	26,74 \pm 1,54	27,30 \pm 1,94	26,58 \pm 3,09	25,98 \pm 1,29	32,26 \pm 2,76
3	26,98 \pm 1,28	27,30 \pm 2,04	26,40 \pm 2,88	27,16 \pm 0,66	33,08 \pm 3,26
4	27,92 \pm 1,39	27,16 \pm 1,05	27,20 \pm 2,85	28,04 \pm 1,16	33,96 \pm 3,45
5	28,32 \pm 0,94	26,78 \pm 1,77	27,08 \pm 2,59	27,24 \pm 2,17	34,54 \pm 3,24
6	29,34 \pm 1,61	27,88 \pm 1,96	29,14 \pm 2,62	27,56 \pm 1,99	34,80 \pm 3,18
7	29,46 \pm 2,04	28,08 \pm 2,76	29,40 \pm 2,37	27,34 \pm 3,22	34,86 \pm 3,26
8	29,60 \pm 2,56	27,92 \pm 2,59	28,22 \pm 4,69	27,36 \pm 3,21	36,20 \pm 3,78
9	29,42 \pm 2,31	28,40 \pm 2,52	29,76 \pm 3,07	33,08 \pm 3,67	36,52 \pm 1,66
10	29,90 \pm 2,16	28,92 \pm 2,67	30,32 \pm 2,92	27,08 \pm 3,78	36,76 \pm 4,06
11	31,48 \pm 2,74	29,90 \pm 2,96	29,44 \pm 4,09	28,60 \pm 4,41	37,38 \pm 4,37
12	32,38 \pm 2,48	29,60 \pm 2,86	30,14 \pm 3,84	29,50 \pm 3,93	37,76 \pm 4,14
13	32,98 \pm 2,12	30,36 \pm 3,03	31,32 \pm 3,75	30,86 \pm 4,11	38,16 \pm 4,09

Tabel 4. Jumlah mencit jantan dan betina yang mati setelah pemberian seduhan teh gaharu selama tiga bulan (90 hari)

Kelompok	Jantan		Betina	
	Jumlah mencit	Jumlah kematian	Jumlah mencit	Jumlah kematian
Dosis 130 mg/kg bb	5	0	5	0
Dosis 260 mg/kg bb	5	0	5	0
Dosis 390 mg/kg bb	5	0	5	0
Dosis 520 mg/kg bb	5	0	5	0
Kontrol	5	0	5	0

Tabel 5. Hasil rata-rata berat organ mencit jantan dan betina

Kelompok	Rata-rata berat organ (g) ± SD					
	Jantan			Betina		
	Hati	Ginjal kanan	Ginjal kiri	Hati	Ginjal kanan	Ginjal kiri
Dosis 130 mg/kg bb	1,80 ± 0,14	0,25 ± 0,20	0,25 ± 0,11	1,43 ± 0,32	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,04
Dosis 260 mg/kg bb	1,76 ± 0,19	0,26 ± 0,05	0,26 ± 0,05	1,27 ± 0,09	0,19 ± 0,03	0,19 ± 0,03
Dosis 390 mg/kg bb	1,77 ± 0,17	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,02	1,10 ± 0,07	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Dosis 520 mg/kg bb	1,78 ± 0,12	0,28 ± 0,05	0,29 ± 0,03	1,10 ± 0,02	0,15 ± 0,00	0,17 ± 0,01
Kontrol	1,83 ± 0,26	0,26 ± 0,20	0,25 ± 0,02	1,22 ± 0,17	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,00

Tabel 6. Hasil pengamatan warna organ hati mencit jantan dan betina

Kelompok	Pengamatan					
	Jantan			Betina		
	Warna	Permukaan	Konsistensi	Warna	Permukaan	Konsistensi
Dosis 130 mg/kg bb	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal
Dosis 260 mg/kg bb	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal
Dosis 390 mg/kg bb	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal
Dosis 520 mg/kg bb	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal
Kontrol	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal	Merah kecoklatan	Licin	Kenyal

Tabel 7. Pengukuran rata-rata kadar SGPT dan SGOT setelah diberikan seduhan teh gaharu selama 90 hari

Kelompok	Rata-rata kadar SGPT (IU/L)		Rata-rata kadar SGOT (IU/L)	
	Jantan	Betina	Jantan	Betina
Dosis 130 mg/kg bb	78	171	290	184
Dosis 260 mg/kg bb	63	163	223	714
Dosis 390 mg/kg bb	59	150	205	1284
Dosis 520 mg/kg bb	74	92	262	532
Kontrol	144	164	219	1256

Berdasarkan Tabel 5 disajikan bahwa hasil uji statistik pengamatan berat organ hati mencit jantan diketahui tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari setiap kelompok perlakuan setelah pemberian seduhan teh gaharu. Hasil uji statistik pengamatan berat organ ginjal kanan diketahui tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari setiap kelompok perlakuan setelah pemberian seduhan teh gaharu dan begitu juga dengan berat organ ginjal kiri menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan. Berdasarkan Tabel 5 uji statistik pengamatan berat organ mencit betina yaitu organ hati, ginjal kanan dan ginjal kiri diketahui tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari setiap kelompok perlakuan setelah pemberian seduhan teh gaharu.

Makropatologi

Hasil pengamatan makropatologi meliputi pengamatan warna dan permukaan organ dapat disajikan pada Tabel 6. Berdasarkan Tabel 6 menunjukkan bahwa organ hati setelah diberi seduhan teh gaharu pada kelompok kontrol, dosis 130 mg/kgBB, 260 mg/kgBB, 390 mg/kgBB dan 520 mg/kgBB masih dalam keadaan normal yang berwarna merah kecoklatan, permukaan licin dan konsistensi kenyal. Hasil dari pengamatan permukaan dan konsistensi organ

hati dan ginjal mencit jantan dan betina tidak terjadi perubahan.

Warna dan penampilan sering dapat menunjukkan sifat toksisitas seperti perlemakan hati, atau sirosis. Biasanya berat organ merupakan petunjuk yang sangat peka dari efek pada hati. Meski suatu efek tidak selalu menunjukkan toksisitas, dalam kasus tertentu peningkatan berat hati merupakan kriteria paling peka untuk toksisitas (Lu 1995).

Kriteria normal pada organ bila tidak ditemukan perubahan warna, perubahan struktur permukaan dan perubahan konsistensi. Tidak terlihat adanya perubahan warna hati dan ginjal pada kelompok kontrol dan dosis 130 mg/kgBB, 260 mg/kgBB, 390 mg/kgBB, dan 520 mg/kgBB.

Kadar SGPT dan SGOT

Kelainan hati dapat diketahui dengan pemeriksaan kadar enzim, salah satunya adalah dengan mengukur kadar enzim transaminase yaitu Serum Glutamat Piruvat Transaminase (SGPT). Hasil analisa kimia darah mencit untuk pengujian kandungan SGPT dilakukan pada akhir perlakuan yaitu hari ke-91, dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan Tabel 7 dapat disajikan bahwa kadar SGPT mencit jantan berbeda pada setiap kelompok perlakuan

yang diberikan seduhan teh gaharu, dimana kadar SGPT pada kelompok dosis 130 mg/bb (78 IU/L), 260 mg/kg bb (63 IU/L), 390 mg/kg bb (59 IU/L) dan 520 mg/kg bb (74 IU/L) berbeda jauh dengan kadar SGPT kelompok kontrol mencit jantan yaitu 144 IU/L. Pada dosis 260 mg/kg bb (63 IU/L), dosis 390 mg/kg bb (59 IU/L) dan dosis 520 mg/kg bb (74 IU/L) masih berada dalam batas normal. Sedangkan pada dosis 130 mg/kg bb (78 IU/L) dan kelompok kontrol (144 IU/L) berada diatas batas normal. Kadar ALT normal mencit adalah 17-77 IU/L (Research Animal Resources 2009).

Pada mencit betina, kadar SGPT pada kelompok dosis 520 mg/kg bb (92 IU/L) berada pada batas normal sedangkan pada kelompok dosis 130 mg/bb (171 IU/L), 260 mg/kg bb (163 IU/L), 390 mg/kg bb (150 IU/L) dan kelompok kontrol kadar SGPT nya diatas batas normal. Pada tabel diatas dapat disajikan bahwa kadar SGPT mencit jantan dan kadar SGPT mencit betina dengan pemberian seduhan teh gaharu berbeda pada setiap kelompok perlakuan.

Berdasarkan pengukuran kadar SGOT mencit jantan pada Tabel 7 tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol (219 IU/L) dengan dosis 130 mg/kg bb (290 IU/L), dosis 260 mg/kg bb (223 IU/L), dosis 390 mg/kg bb (205 IU/L) dan dosis 520 mg/kg bb (262 IU/L), dimana hasil pengukuran kadar SGOT pada setiap kelompok masih dalam batas normal.

Berbeda dengan kadar SGOT pada mencit betina, dimana hanya kelompok dosis 130 mg/kg bb (184 IU/L) yang berada pada batas normal sedangkan dosis 260 mg/kg bb (714 IU/L), dosis 390 mg/kg bb (1284 IU/L), dosis 520 mg/kg bb (532 IU/L) dan kelompok kontrol (1256 IU/L) berada diatas batas normal. Kadar SGOT normal mencit adalah 54-298 IU/L (Research Animal Resources 2009). SGOT (*Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase*) atau *Aspartateaminotransferase* (AST) merupakan sebuah enzim yang biasanya terletak di dalam sel-sel hati. SGOT dilepaskan ke dalam darah ketika hati atau jantung rusak. Tingkat SGOT dalam darah signifikan dengan tingginya kerusakan hati atau dengan kerusakan jantung (misalnya serangan jantung). Beberapa obat juga dapat meningkatkan kadar SGOT. Enzim ini dalam jumlah yang kecil dijumpai pada otot jantung, ginjal dan otot rangka (Krysanti 2014).

GPT dan GOT merupakan indikator yang kuat dan peka terhadap kelainan sel –sel hati. Enzim glutamate piruvat transaminase (GPT)/ALT merupakan enzim sitosol yang sebagian besar terdapat di dalam hati, jantung dan otot. Enzim ini sebagai indikator yang lebih spesifik untuk kerusakan sel-sel hati dibandingkan GOT, karena GOT merupakan enzim mitokondria ada dalam jumlah besar di jantung, hati otot rangka dan ginjal, jika kadar dalam jantung hati, ALT tinggi ada indikasi terjadi kerusakan sel di dalam hati (Murtini et al. 2010; Widjaja 2010).

Histopatologi hati dan ginjal

Organ hati dan ginjal pada mencit yang mati segera diambil pada akhir pemberian sediaan uji, semua mencit yang masih hidup diotopsi. Organ hati dan ginjal diambil kemudian dibuat menjadi preparat histopatologi selanjutnya dilihat kerusakan jaringan di bawah mikroskop.

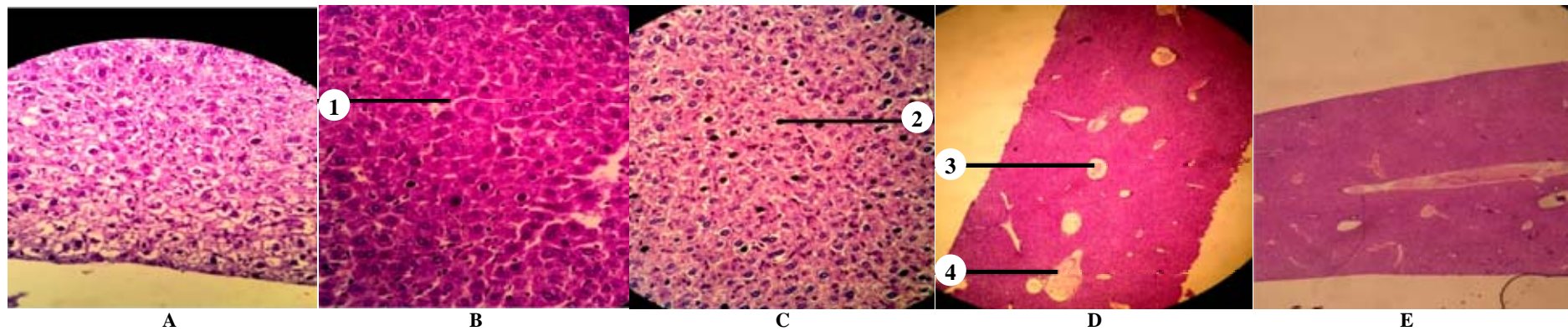
Berdasarkan Gambar 1 dapat dijelaskan bahwa kelompok kontrol dan kelompok perlakuan pada histopatologi organ hati mencit jantan. Begitu juga pada mencit betina yang diberi seduhan teh gaharu mengalami kongesti, dilatasi dan pendarahan pada vena sentralis dan vena porta yang disebabkan rusaknya sel endotel yang peka terhadap zat toksik, hal ini mengakibatkan sel hati mengalami degenerasi hingga nekrosis.

Kongesti adalah terjadinya bendungan darah pada glomerulus, hal ini disebabkan adanya kerusakan pada badan malpighi sehingga sel-sel darah merah dapat menembus glomerulus. Hepatosit pada kelompok perlakuan dosis 130, 260, 390 dan 520 mg/kgBB mengalami apoptosis, sedangkan pada kelompok kontrol hepatositnya normal. Sinusoid pada pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan mencit jantan adalah normal. Sinusoid hati adalah saluran yang berliku-liku dan melebar diameternya. Aliran darah sinusoid berasal dari cabang terminal vena porta dan arteri hepatic, membawa darah kaya nutrisi dari saluran pencernaan dan juga kaya oksigen dari jantung.

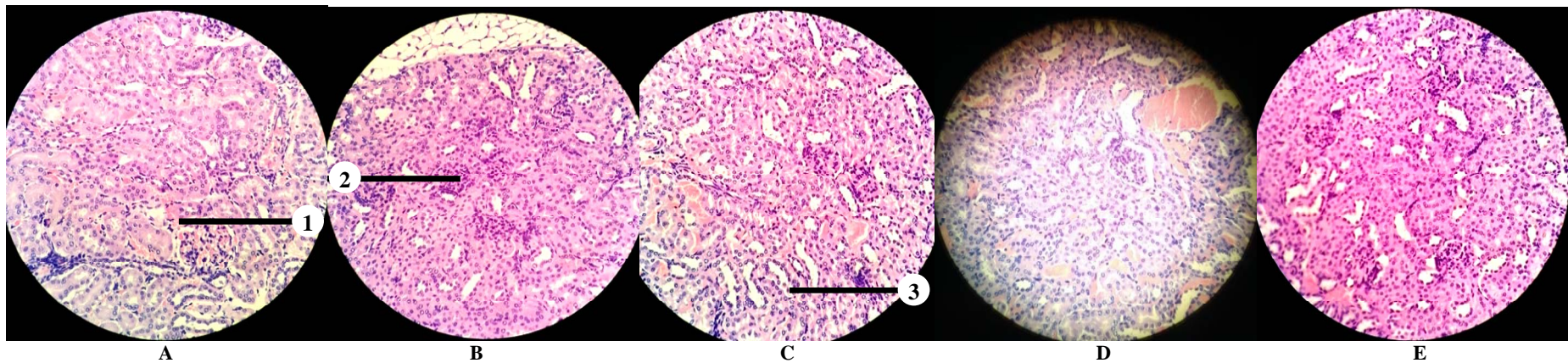
Pengamatan pada histopatologi ginjal mencit beina dengan pemberian seduhan teh gaharu pada kelompok perlakuan 130, 260, 390 dan 520 mg/kgBB dan kelompok kontrol terlihat bahwa pembuluh darah mengalami kongesti yaitu terjadi peningkatan pembuluh darah pada daerah tertentu namun glomerulus dan tubulus terlihat normal (Gambar 2), begitu juga pada mencit jantan. Salah satu bentuk kerusakan pada ginjal terlihat adanya penyempitan pada ruang bowman yang disebkan terjadinya peradangan glomerulus ataupun proliferasi dari epitel kapsul bowman.

Pada histopatologi organ ginjal mencit betina terlihat adanya kengesti pembuluh darah pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Glomerulus dan tubulus tidak mengalami kerusakan (normal). Glomerulus adalah bagian ginjal yang merupakan anyaman pembuluh darah kapiler khusus yang dindingnya bertaut menjadi satu dengan dinding kapsula bowman. Glomerulus ginjal berfungsi untuk menyaring darah, hasil saringan glomerulus adalah urin primer yang mengandung air, garam, asam amino, glukosa, urea dan zat-zat lain. Perubahan yang terjadi pada glomerulus dan kapsula akan mengakibatkan terganggunya fungsi produksi filtrat dan kontrol komposisi filtrat sendiri, sementara perubahan pada tubula mengakibatkan terganggunya proses reabsorpsi daripada filtrat.

Tubulus proksimal merupakan bagian yang paling banyak dan mudah mengalami kerusakan pada kasus nefrotoksik. Hal ini dapat terjadi karena adanya akumulasi bahan-bahan toksik dan karakter tubulus proksimal yang memiliki epitel yang lemah serta mudah bocor. Sama halnya dengan glomerulus, tubulus pada penelitian ini tidak ada yang mengalami masalah, tubulus masih terlihat normal dan berfungsi dengan baik. Kerusakan tubulus proksimal merupakan suatu hasil korelasi yang sangat penting antara transpor segmental tubulus dengan akumulasi, toksisitas, serta reaksi obat pada sel-sel target tubulus proksimal (Prasta 2010).



Gambar 1. Gambaran histopatologi hati mencit jantan setelah perlakuan. 1. Sinusoid, 2. Hepatosit, 3. Vena porta, 4. Vena centralis. A. Dosis 130 mg/kg bb, B. Dosis 260 mg/kg bb, C. Dosis 390 mg/kg bb, D. Dosis 520 mg/kg bb, E. Kontrol



Gambar 1. Gambaran histopatologi ginjal mencit betina setelah perlakuan. 1. Glomerulus, 2. Pembuluh darah, 3. Tubulus. A. Dosis 130 mg/kg bb, B. Dosis 260 mg/kg bb, C. Dosis 390 mg/kg bb, D. Dosis 520 mg/kg bb, E. Kontrol

KESIMPULAN

Pemberian seduhan teh gaharu pada kelompok perlakuan dosis 390 dan 520 mg/kgBB berpengaruh terhadap gejala toksik yaitu lemas, perubahan bulu dan gelisah pada mencit jantan dan betina. Pemberian seduhan teh gaharu pada kelompok perlakuan dosis 130, 260, 390, 520 mg/kgBB dan kelompok kontrol tidak berpengaruh secara signifikan terhadap berat badan mencit jantan, namun pada mencit betina terdapat pengaruh kenaikan berat badan pada minggu ke 1-10. Berbeda dengan berat organ dimana pada semua kelompok perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap berat organ mencit jantan dan betina. Pemberian seduhan teh gaharu pada kelompok perlakuan dosis 130, 260, 390, 520 mg/kgBB dan kelompok kontrol tidak mempengaruhi perubahan warna, permukaan dan konsistensi organ hati dan ginjal mencit jantan dan betina.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana dengan dibiayai oleh Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi tahun 2016 pada Skim Hibah Bersaing.

DAFTAR PUSTAKA

- BPOM RI. 2014. Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo. Pusat Riset Obat dan Makanan BPOM RI, Jakarta.
- Gupta D, Bhardwaj S. 2012. Study of acute, subacute and chronic toxicity test. Intl J Adv Res Pharmaceut Bio Sci 1 (2):104.
- Iwuanyanwu KCV, Amadi U, Charles IA, Ayalogu EO. 2012. Evaluation of Acute and Subchronic Oral Toxicity Suti of Baker Cleancer Bitters A Polyherbal Drug on Experimental Rat. EXCLI J 11 (1): 632-640.
- Krysanti A, Widjanarko SB. 2014. Toksisitas subakut tepung glukomanan (*A. muelleri* Blume) terhadap SGOT dan natrium tikus Wistar secara in vivo. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2 (1): 1-7.
- Lu FC. 1995. Toksikologi Dasar: Asas, Organ, Sasaran, dan Penilaian Risiko. Edisi II. Penerj.: Nugroho E, Bustami ZS, Darmansjah I. UI Press, Jakarta.
- Mega IM, Swastini DA. 2010. Screening fitokimia dan aktivitas antiradikal bebas ekstrak metanol daun gaharu (*Gyrinops versteegi*). J Kimia 4 (2): 187-192.
- Murtini JT, Priyanto N, Siregar TH. 2010. Toksisitas Subkronik Alginat pada Histopatologi Hati, Ginjal dan Lambung Mencit. Prosiding Universitas Brawijaya, Malang.
- Prasta BP. 2010. Pengaruh Pemberian Dekstrometorfan Dosis Bertingkat Per Oral Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Rasyid M, Usmar, Subehan. 2012. Uji toksisitas akut ekstrak etanol lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* Val.) pada mencit. Jurnal Majalah Farmasi dan Farmakologi 16 (1): 13-20.
- Research Animal Resource. 2009. Reference Values for Laboratory Animals: Normal Haematological Values. RAR Websites, University of Minnesota. <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>. diakses Oktober 2016.
- Surjanto, Batubara R, Ginting H. 2014. Kajian Kelayakan daun Gaharu Sebagai Teh Alternatif yang Kaya Antioksidan. [Laporan Penelitian Hibah Fundamental]. USU, Medan.
- Widjaja S. 2010. Gangguan Faal (Fungsi) Hati yang Sering Dipertanyakan oleh Penderita. RS Medistra, Jakarta
- Winarsih A, Puspita F, Khouri A. 2011. Pengaruh Stressing Terhadap Percepatan Pembentukan Gubal Gaharu Pada Tanaman Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk). Departemen Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Riau. Pekanbaru.
- Wirasuta MAG, Niruri R. 2006. Toksikologi Umum. Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana, Bali.

PEDOMAN UNTUK PENULIS

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

Tulisan diketik pada satu sisi kertas putih, ukuran A4 (210x297 mm²), dalam satu kolom, menggunakan spasi ganda, jenis huruf *Times New Roman*, ukuran 12 point, dengan jarak tepi 2 cm di semua sisi. Program pengolah kata atau jenis huruf tambahan dapat digunakan, namun harus *PC compatible* dan berbasis *Microsoft Word*. **Nama ilmiah** (genus, spesies, author), dan kultivar atau strain disebutkan secara lengkap pada penyebutan pertama kali. Nama genus dapat disingkat setelahnya penyebutan yang pertama, kecuali menimbulkan kerancuan. Nama author dapat dihilangkan setelah penyebutan pertama. Misalnya pertama kali ditulis *Rhizopus oryzae* L. UICC 524, selanjutnya ditulis *R. oryzae* UICC 524. Nama daerah dapat dicantumkan apabila tidak menimbulkan makna ganda. Penyebutan nama ilmiah secara lengkap dapat diulang pada bagian Bahan dan Metode. **Tata nama kimia dan biokimia** mengikuti aturan IUPAC-IUB. Simbol-simbol kimia standar dan penyingkatan untuk nama kimia dapat dilakukan apabila jelas dan umum digunakan, misalnya pertama kali ditulis lengkap butirat hidrositoluen (BHT) selanjutnya ditulis BHT. **Ukuran metrik** menggunakan satuan SI, penggunaan satuan lain harus diikuti nilai ekuivalen dengan satuan SI pada penyebutan pertama. Penyingkatan satuan, seperti g, mg, ml, dan sebagainya tidak diikuti titik. Indeks minus (m⁻², l⁻¹, h⁻¹) disarankan untuk digunakan, kecuali dalam hal-hal seperti "per-tanaman" atau "per-plot". **Persamaan matematika** tidak selalu dapat dituliskan dalam satu kolom dengan teks, untuk itu dapat ditulis secara terpisah. **Angka** satu hingga sepuluh dinyatakan dengan kata-kata, kecuali apabila berhubungan dengan pengukuran, sedangkan nilai di atasnya dituliskan dalam angka, kecuali di awal kalimat. Pecahan sebaiknya dinyatakan dalam desimal. Dalam teks digunakan "%" bukannya "persen". Pengungkapan ide dengan kalimat yang rumit dan bertele-tele perlu dihindari, sebaiknya digunakan kalimat yang efektif dan efisien. Naskah hasil penelitian diharapkan tidak lebih dari 25 halaman (termasuk gambar dan tabel), naskah telaah pustaka menyesuaikan, masing-masing halaman berisi 700-800 kata, atau sebanding dengan naskah dalam nomor penerbitan ini.

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

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

sebaiknya menyertakan file digital. Penulis dianjurkan menyertakan foto atau gambar untuk 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 kebaharuan pustaka. Pada naskah yang ditulis oleh dua penulis, nama keduanya disebutkan, sedangkan pada naskah yang ditulis oleh tiga penulis atau lebih, hanya nama penulis pertama yang ditulis diikuti et al. atau dkk., misalnya: Sprent dan Sprent (1990) atau (Suranto et al. 1998; Baker and Manwell 1991; Smith 1982a, b). Pada sitasi bertingkat digunakan kata *cit* atau dalam, misalnya (Gyorgy 1991 *cit* Coward 1999) atau Gyorgy (1991, dalam Coward 1999).

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

Jurnal:

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

Buku:

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

Bab dalam buku:

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

Abstrak:

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

Prosiding:

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

Skripsi, Tesis, Disertasi:

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

Informasi dari Internet:

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

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

Beberapa catatan tambahan. Naskah diketik tanpa tanda hubung (-), kecuali kata ulang. Penggunaan huruf "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.

Kapasitas antioksidan minuman temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i>) menggunakan gula kristal putih, gula kristal merah, gula merah, dan gula aren <ul style="list-style-type: none">• SETIYA NING RUM S, KAWIJI, SETYANINGRUM ARIVIANI	39-46
Uji berbagai konsentrasi ekstrak mahkota dewa dan meniran serta penambahan pupuk organik cair pada pertumbuhan tunas pegagan (<i>Centella asiatica</i>) secara in vitro <ul style="list-style-type: none">• VENI SISKAYANTI, RETNA BANDRIYATI ARNIPUTRI, PRASWANTO	47-55
Efek ekstrak batang belimbing wuluh (<i>Averrhoa bilimbi</i>) terhadap kadar gula darah tikus putih yang diinduksi aloksan <ul style="list-style-type: none">• CAHYANING GUSTI AGRIANI, KISRINI, RUBEN DHARMAWAN	56-62
Pembuatan salep minyak atsiri daun jeruk limau (<i>Citrus amblycarpa</i>) dan uji stabilitas terhadap tipe basis yang digunakan <ul style="list-style-type: none">• NINDYA NARESWARI, ANANG KUNCORO	63-68
Keamanan teh gaharu (<i>Aquilaria malaccensis</i>) dari pohon induksi melalui uji toksisitas subkronik oral 90 hari <ul style="list-style-type: none">• RIDWANTI BATUBARA, SURJANTO, TAHAN MANGARANAP SIHOMBING, HERAWATY GINTING	69-76

