

Biofarmasi

Journal of Natural Products Biochemistry

**VOLUME 9
NOMOR 2
AGUSTUS 2011
ISSN: 1693-2242**

PENERBIT:

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta

ALAMAT PENERBIT/REDAKSI:

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

TERBIT PERTAMA TAHUN:

2003

ISSN:

1693-2242

PEMIMPIN REDAKSI/PENANGGUNGJAWAB:

S u t a r n o

SEKRETARIS REDAKSI:

Ahmad Dwi Setyawan

PENYUNTING PELAKSANA:

Djoko Santoso
Ratna Setyaningsih
Solichatun
Suratman
Tetri Widiyani

PENYUNTING AHLI:

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

Biofarmasi, Journal of Natural Products Biochemistry

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

Pengaruh ekstrak putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap mortalitas *Ascaris suum* secara in vitro

Effect of putri malu (*Mimosa pudica*) extract on *Ascaris suum* mortality in vitro

MUHAMMAD ARIF NUR SYAHID, CR. SITI UTARI, SUTARMIADJI DJUMARGA

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

Manuskrip diterima: 7 Januari 2010. Revisi disetujui: 26 Agustus 2010.

Abstract. Syahid MAN, Utari CRS, Djumarga S. 2011. Effect of putri malu extract (*Mimosa pudica*) on *Ascaris suum* mortality in vitro. *Biofarmasi* 9: 33-37. This study was to determine the influence of *Mimosa pudica* extract in *Ascaris suum* mortality. This research was a laboratory experiment, with a post-test only with control group design by using 140 adult *A. suum*, divided into seven groups. This research used NaCl 0.9% for a negative control, pirantel pamoat 5 mg/mL solution for a positive control, and five intervention by using 20%, 40%, 60%, 80% and 100% concentration of *M. pudica* extract. The observation was conducted in every two hours until worm death and it was started to be counted after all worm death. Data were analyzed with one-way ANOVA test continued with Least Significance Difference (LSD) by using SPP for Window Release 17 with a significance level $p < 0.05$. The results showed that all *A. suum* death in 96 hours at negative control, 2 hours at positive control, 29.5 hours at 20% *M. pudica* extract, 24.5 hours at 40% *M. pudica* extract, 16 hours at 60% *M. pudica* extract, 12 hours at 80% *M. pudica* extract and 4 hours at 100% *M. pudica* extract. There was a significant difference in the death time of *A. suum* in all research groups. From the result of research, it could be concluded that the extract of putri malu had an effect on accelerating *A. suum* mortality time.

Keywords: *Ascaris suum* mortality, putri malu extract, *Mimosa pudica*

PENDAHULUAN

Askariasis merupakan penyakit infeksi cacing yang paling sering terjadi, dengan perkiraan prevalensi di dunia sekitar 25% atau berkisar antara 0,8-1,22 miliar orang. Populasi dengan risiko tinggi terserang askariasis adalah di Asia, Afrika, Amerika Latin, dan USSR (David 2008; Kazura JW 2008). Penyakit ini disebabkan oleh infeksi cacing *Ascaris lumbricoides*. Askariasis paling banyak menyerang balita dan anak usia sekolah dasar. Di Indonesia, prevalensi askariasis masih tinggi, yaitu antara 60-90%, tergantung pada lokasi dan sanitasi lingkungan, terutama pada anak-anak (Pohan 2006).

Infeksi *A. lumbricoides* dalam jumlah kecil tidak menunjukkan gejala klinis yang berarti. Meskipun belum dilaporkan adanya korban meninggal akibat infeksi *A. lumbricoides*, infeksi *A. lumbricoides* dalam jumlah besar sangat merugikan bagi manusia, diantaranya dapat menyebabkan obstruksi usus, berkurangnya nafsu makan, diare, dan konstipasi. Cacing dewasa juga dapat menyebabkan gangguan penyerapan nutrisi, terutama pada anak-anak yang menyebabkan gangguan pertumbuhan dan perkembangan anak. Pada stadium larva, *A. lumbricoides* dapat menyebabkan gejala ringan di hati, sedangkan pada paru-paru menimbulkan sindrom Loeffler (Laskey 2007). Oleh karena itu, penanganan yang tepat sangatlah dibutuhkan untuk memberantas larva maupun cacing dewasa.

Obat-obat antihelminik (anticacing) digunakan untuk memberantas (mengeradikasi) atau mengurangi parasit-parasit cacing pada saluran atau jaringan intestinal dalam

tubuh. Mebendazole, albendazole, dan pirantel pamoat merupakan obat cacing pilihan pertama terhadap askariasis, sedangkan obat alternatifnya adalah piperazine ataupun levamisole (Ganiswara 2007; Katzung 2004).

Pirantel pamoat dan mebendazol tidak diserap oleh usus sehingga diekskresikan dalam bentuk utuh dan metabolitnya, hal inilah yang menyebabkan pirantel pamoat dan mebendazol sangat efek dan selektif memberantas cacing gelang. Namun, keduanya memiliki efek samping yang kadang-kadang timbul, diantaranya diare dan sakit perut. Selain itu, pemberian dosis tunggal pada tikus hamil menunjukkan efek *embryotoxic* dan teratogenik, sehingga tidak dianjurkan bagi wanita hamil dan anak usia di bawah dua tahun (Ganiswara 2007; Katzung 2004). Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan askariasis yang tidak memiliki efek samping dan kontra indikasi seperti pada pirantel pamoat dan mebendazol, diantaranya menggunakan obat tradisional.

Macam-macam obat tradisional untuk kasus cacingan sudah banyak tersedia di Indonesia, baik yang sudah dijadikan obat kimia sintetik maupun masih merupakan obat tradisional murni. Keanekaragaman tersebut perlu dimanfaatkan sebagai obat-obatan alternatif untuk sistem pemberantasan cacingan di Indonesia, disamping murah dan mudah didapat karena tersedia di mana-mana, juga dapat mengikutsertakan masyarakat serta mengurangi subsidi pemerintah (Herawati 2000).

Obat-obatan tradisional banyak mengandung zat aktif yang memiliki efek antihelminik, di antara senyawa-senyawa aktif tersebut adalah mimosin dan tanin yang

terdapat dalam biji lamtoro (*Leucaena glauca* Benth) dan biji lamtoro gung (*Leucaena leucocephala* Lamarck de Wit) yang sudah lama dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat cacing (Anwar 2005). Mimosin identik dengan *leucanol* dan *leucaenin* yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim asetilkolinesterase, sehingga terjadi penumpukan asetilkolin pada tubuh cacing yang menyebabkan cacing mati dalam kondisi kaku (Eduardo 2005). Adapun tanin secara langsung berefek pada cacing melalui perusakan protein tubuh cacing (Harvey dan John 2005; Duke 2009b). Selain biji lamtoro, tumbuhan putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) juga mengandung senyawa mimosin dan tanin yang kadarnya lebih tinggi dari senyawa tanin dan mimosin pada biji lamtoro (Dalimartha 2008).

Tumbuhan putri malu tumbuh liar di tepi jalan, lapangan terlantar, dan tempat-tempat terbuka yang terpapar sinar matahari, sehingga mudah ditemukan. Namun, masih sedikit orang yang mengetahui bahwa putri malu mengandung senyawa aktif tanin dan mimosin. Hal ini yang membuat penulis tertarik untuk meneliti pengaruh ekstrak putri malu terhadap kematian cacing gelang. Cacing gelang yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Ascaris suum* Goeze yang terdapat dalam usus babi. Penggunaan cacing *A. suum* dikarenakan sulitnya untuk menemukan penderita askariasis, dan juga secara morfologi *A. suum* hampir sama dengan *A. lumbricoides*, bahkan cacing tersebut juga disebut *Ascaris lumbricoides suum*. Selain itu, *A. suum* dapat menginfeksi manusia meskipun tidak menimbulkan manifestasi klinis yang berarti (Laskey 2007; Miyazaki 1991).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak putri malu (*Mimosa pudica* Linn) terhadap mortalitas *Ascaris suum* Goeze secara in vitro.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Juli 2009.

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri dengan diameter 15 cm, batang pengaduk kaca, gelas ukur, pinset anatomis, labu takar, stoples untuk menyimpan cacing, inkubator, larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%), larutan uji dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *the post-test only controlled group design*.

Objek penelitian

Objek penelitian atau hewan uji pada penelitian ini adalah *Ascaris suum* Goeze yang masih bergerak aktif, diperoleh dari usus babi dari tempat penyembelihan

"Radjakaja" Kotamadya Surakarta yang dibagi dalam tujuh kelompok, yaitu kontrol negatif dengan larutan NaCl 0,9%, kontrol positif dengan pirantel pamoat, serta kelompok perlakuan ekstrak putri malu dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

Teknik sampling

Penelitian ini menggunakan teknik sampling *purposive sampling* dengan cara menyamakan ukuran panjang cacing dan jenis cacing, serta tidak membedakan jenis kelamin cacing.

Cara kerja

Pembuatan ekstrak putri malu

Pengambilan bahan. Tumbuhan putri malu yang akan diekstrak langsung didapat dari BBPPTO Tawangmangu.

Pembuatan serbuk putri malu. Tumbuhan putri malu segera dicuci bersih pada air mengalir, tujuannya untuk menghilangkan kotoran yang melekat kemudian dikeringkan dalam lemari pengering pada suhu 40°C sampai kering untuk mencegah terjadinya pembusukan oleh bakteri atau cendawan, serta lebih mudah dihaluskan untuk dibuat serbuk. Tanaman putri malu yang sudah kering dihaluskan menjadi serbuk halus, diayak dengan ayakan nomor 40, lalu serbuk halus ditimbang.

Ekstraksi putri malu. Ekstraksi tanaman putri malu dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat (BBPPTO) Tawangmangu, Karanganyar dengan metode perkolasi. Perkolasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Metode perkolasi digunakan untuk mencari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks, dan lilin (Alam et al. 2007).

Metode perkolasi memiliki prinsip penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara serbuk simplisia dimaserasi selama 3 jam, kemudian simplisia dipindahkan ke dalam bejana silinder yang bagian bawahnya diberi sekat berpori, dimana cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui simplisia tersebut, cairan penyari akan melarutkan zat-zat aktif dalam sel-sel simplisia yang dilalui sampai kondisi jenuh. Gerakan ke bawah disebabkan oleh adanya gravitasi, kohesi, dan berat cairan di atas dikurangi gaya kapiler yang menahan gerakan ke bawah. Perkolat yang diperoleh dikumpulkan lalu dipekatkan (Alam et al. 2007).

Pembuatan ekstrak putri malu dilakukan dengan cara menimbang serbuk sebanyak 2000 gram, kemudian dibungkus dengan kertas saring, dibentuk silinder, dan diikat dengan tali, lalu dimasukkan ke dalam alat perkolasi dan ditambahkan etanol 70% sebanyak 20 liter. Proses perkolasi dihentikan setelah larutan berwarna jernih. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menguapkan pelarut di atas penangas api sampai diperoleh ekstrak pekat berupa larutan kental tanpa mengandung etanol.

Penentuan konsentrasi larutan uji yang digunakan

Penentuan larutan uji yang digunakan dilakukan berdasarkan kadar mimosin dan tanin yang terdapat dalam

M. pudica. Tumbuhan putri malu memiliki kandungan mimosin 8,60-10,35%, sedangkan akarnya mengandung tanin sebesar 100000 ppm (Duke 2009b). Penelitian yang dilakukan oleh Anwar (2005) mengenai perbandingan efek antihelmintik biji lamtoro dan lamtoro gung terhadap *A. suum* dilakukan dengan menggunakan konsentrasi terkecil ekstrak biji lamtoro dan lamtoro gung, yaitu sebesar 25% yang menimbulkan kematian semua *A. suum* setelah 24 jam, dengan kadar mimosin pada biji lamtoro 6,40-8,70% dan kadar tanin sebesar 68000 ppm, sedangkan pada biji lamtoro gung kadar mimosinnya sebesar 2,08-2,32% dan kandungan tanin sebesar 84000 ppm (Duke 2009b). Dari keterangan tersebut diambil konsentrasi minimal untuk penelitian ini yaitu 20%.

Tingkatan konsentrasi ekstrak putri malu pada penelitian ini dapat dijelaskan sebagai berikut: (i) Konsentrasi I: Larutan ekstrak putri malu 20%, terdiri dari 20 mL ekstrak putri malu + 80 mL larutan NaCl 0,9%. (ii) Konsentrasi II: Larutan ekstrak putri malu 40%, terdiri dari 40 mL ekstrak putri malu + 60 mL larutan NaCl 0,9%. (iii) Konsentrasi III: Larutan ekstrak putri malu 60%, terdiri dari 60 mL ekstrak putri malu + 40 mL larutan NaCl 0,9%. (iv) Konsentrasi IV: Larutan ekstrak putri malu 80%, terdiri dari 80 mL ekstrak putri malu + 20 mL larutan NaCl 0,9%. (v) Konsentrasi V: Larutan ekstrak putri malu 100%, dibuat dari 100 mL ekstrak putri malu.

Penentuan sampel penelitian

Penentuan besar sampel dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut:

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

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

Oleh karena penelitian ini menggunakan 7 kelompok perlakuan maka:

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

$$(n-1)(7-1) > 15$$

$$7n > 23$$

$$n > 3,28$$

Masing-masing kelompok perlakuan memiliki besar sampel sebanyak 5 sampel dengan 4 kali pengulangan (replikasi) pada masing-masing kelompok.

Penelitian pendahuluan

Larutan pirantel pamoat 5 mg/mL untuk kontrol positif dibuat dengan cara melarutkan 1 tablet *pyrantel pamoat* 125 mg ke dalam 25 mL larutan garam fisiologis. Sementara itu, cawan petri disiapkan dan diisi dengan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) sebanyak 25 mL sebagai kontrol negatif dan larutan *pyrantel pamoat* sebanyak 25 mL sebagai kontrol positif, kemudian dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37°C di dalam inkubator selama kurang lebih 15 menit.

Ke dalam cawan petri dimasukkan *A. suum* sebanyak 5 ekor, dan diinkubasi pada suhu 37°C. Untuk menentukan cacing tersebut mati atau hidup, cacing-cacing tersebut

disentuh dengan pinset. Jika sudah tidak bergerak maka cacing dinyatakan mati. Pengamatan dilakukan tiap 2 jam sekali hingga semua cacing mati. Hasil yang diperoleh kemudian dicatat. Penelitian direplikasi sebanyak 4 kali.

Penelitian akhir

Cawan petri disiapkan, kemudian masing-masing cawan petri diisi dengan larutan uji ekstrak putri malu dalam 5 konsentrasi, larutan NaCl 0,9%, dan larutan pirantel pamoat 5 mg/mL masing-masing sebanyak 25 mL dan dihangatkan terlebih dahulu pada suhu 37°C di dalam inkubator selama kurang lebih 15 menit. Ke dalam cawan petri dimasukkan *A. suum* sebanyak 5 ekor dan diinkubasi pada suhu 37°C. Untuk menentukan cacing tersebut mati atau hidup, cacing-cacing tersebut disentuh dengan pinset. Jika sudah tidak bergerak maka cacing dinyatakan mati. Pengamatan dilakukan tiap 2 jam sekali hingga semua cacing mati. Hasil yang diperoleh kemudian dicatat. Penelitian direplikasi sebanyak 4 kali.

Analisis data

Data yang berupa waktu kematian cacing dianalisis secara statistik dengan uji *One-way* Anova dan uji *post-hoc* LSD. Uji *One-way* Anova bertujuan untuk membandingkan perbedaan rata-rata (*mean*) pada ketujuh kelompok sekaligus, sehingga dapat diketahui apakah ketujuh kelompok memiliki *mean* waktu kematian cacing yang berbeda secara signifikan atau tidak ($\alpha=0,05$). Uji *post-hoc* LSD adalah uji yang bertujuan untuk membandingkan perbedaan *mean* antar kelompok perlakuan. Data yang diperoleh selanjutnya diolah dengan menggunakan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) 17.0 for *Windows*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pada Gambar 1 dapat dilihat adanya perbedaan rerata waktu kematian cacing yang menunjukkan efek antihelmintik pada masing-masing perlakuan. Pada kelompok ekstrak putri malu tampak bahwa efek antihelmintik terhadap *A. suum* secara *in vitro* meningkat seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak yang terlihat dari semakin cepatnya waktu kematian cacing. Pada kelompok ekstrak putri malu dengan konsentrasi 100% menunjukkan waktu kematian yang lebih lama daripada waktu kematian pada kelompok perlakuan obat standar (pirantel pamoat). Kontrol negatif dengan menggunakan larutan garam fisiologis (NaCl 0,9%) menunjukkan rerata waktu kematian cacing 96 jam, hal ini menunjukkan kemampuan hidup cacing di luar tubuh babi dan digunakan sebagai waktu maksimal pengujian larutan ekstrak.

Dari tabel uji ANOVA dapat diketahui bahwa F-tabel untuk derajat kemaknaan 0,05 didapatkan sebesar 2,572 dan F-hitung yang diperoleh sebesar 969,407, sehingga F-hitung > F-tabel. Selain itu, dari uji ANOVA didapatkan nilai probabilitas 0,000 ($p < 0,05$). Kedua hal tersebut mengandung makna bahwa paling tidak terdapat perbedaan waktu kematian cacing yang signifikan pada kedua

kelompok. Kemudian untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang signifikan dilakukan uji *Post-hoc* LSD.

Pembahasan

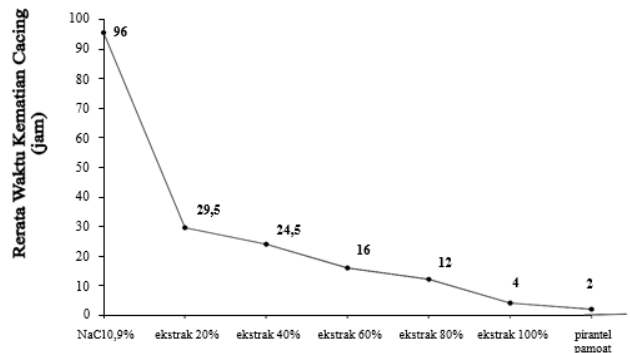
Penelitian pendahuluan yang digunakan sebagai kontrol negatif dilakukan pada larutan NaCl 0,9% untuk mengetahui lama hidup cacing *A. suum* di luar tubuh babi sebagai hospes utamanya. Berdasarkan hasil uji pendahuluan pada Tabel 1 dapat diketahui rata-rata hidup cacing pada larutan NaCl 0,9% adalah 96 jam. Hasil ini digunakan sebagai waktu maksimal pengujian larutan ekstrak.

Berdasarkan hasil penelitian pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa hasil rerata waktu kematian cacing adalah 29,5 jam pada konsentrasi ekstrak 20%, 24,5 jam pada konsentrasi ekstrak 40%, 16 jam pada konsentrasi ekstrak 60%, 12 jam pada konsentrasi ekstrak 80%, dan 4 jam pada konsentrasi ekstrak 100%. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi percepatan waktu kematian cacing pada konsentrasi ekstrak yang semakin meningkat, artinya bahwa ekstrak putri malu memang memiliki efek antihelmintik, diperlihatkan dengan semakin cepatnya waktu kematian cacing pada konsentrasi yang lebih tinggi seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

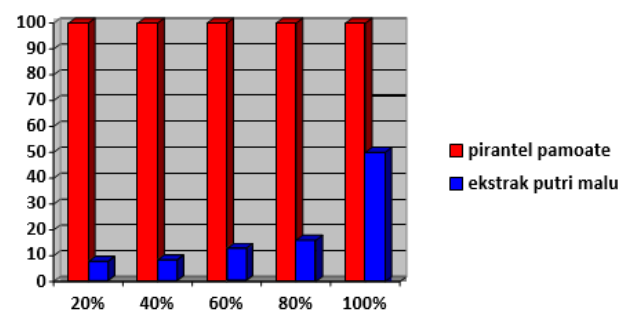
Pada kontrol positif dengan obat standar untuk askariasis, digunakan pirantel pamoat dengan merek dagang ‘Combantrine’ dengan konsentrasi 5 mg/mL, didapatkan waktu kematian cacing pada semua ulangan adalah 2 jam. Hal ini menunjukkan bahwa efek antihelmintik ekstrak putri malu masih lebih lemah jika dibandingkan dengan pirantel pamoat dengan merek dagang ‘Combantrine’. Absorpsi pirantel pamoat melalui usus tidak berlangsung dengan baik, sifat ini memperkuat efeknya yang selektif pada cacing. Oleh karena tidak diserap oleh usus maka tidak diketahui kadarnya dalam darah dan diekskresikan dalam tinja juga urin dalam bentuk utuh dan metabolitnya (Ganiswara 2007; Kaztzung 2004). Dengan demikian, dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 5 mg/mL dengan cara melarutkan satu tablet pirantel pamot dalam 25 mL larutan NaCl 0,9%.

Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata waktu kematian cacing yang signifikan pada ketujuh kelompok perlakuan maka dilakukan uji *One-way* Anova. Berdasarkan analisis uji *One-way* Anova pada Tabel 3 didapatkan F-hitung sebesar 969,407 dengan taraf signifikansi sebesar 0,05 dan nilai F-tabel sebesar 2,572. Dari hasil tersebut dapat diketahui bahwa F-hitung > F-tabel, dengan demikian rata-rata ketujuh kelompok tersebut memang berbeda. Kemudian untuk membandingkan rerata waktu kematian cacing yang terbentuk antar kelompok perlakuan dilakukan uji *Post-hoc* LSD.

Berdasarkan hasil analisis *Post-hoc* LSD diketahui bahwa perbandingan lama kematian cacing antara kelompok ekstrak putri malu dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan kelompok kontrol memiliki nilai probabilitas 0,000 yang berarti $p < 0,05$. Hal ini berarti rata-rata lama kematian cacing pada kelompok tersebut memiliki perbedaan yang signifikan. Begitu juga antara kelompok ekstrak putri malu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan kelompok obat standar juga memiliki nilai probabilitas 0,000 yang berarti $p < 0,05$.



Gambar 1. Grafik rerata waktu kematian cacing dengan pemberian ekstrak putri malu



Gambar 2. Persentase daya antihelmintik ekstrak putri malu dibanding pirantel pamoat

Tabel 1. Hasil penelitian pendahuluan

Ulangan	Lama kematian cacing (jam)	
	NaCl 0,9%	pirantel pamoat 5 mg/mL
I	88	2
II	98	2
III	102	2
IV	96	2
Rerata	96	2

Tabel 2. Hasil penelitian akhir

Ulangan	Kontrol (NaCl 0,9%)	Lama kematian cacing (jam)					Pyrantel Pamoate 5 mg/mL
		20%	40%	60%	80%	100%	
I	90	28	22	16	10	4	2
II	96	32	26	18	14	4	2
III	100	28	24	14	12	4	2
IV	92	30	26	16	12	4	2
Rerata	96	29,5	24,5	16	12	4	2

Tabel 3. Persentase daya antihelmintik ekstrak putri malu

Perlakuan	Persentase daya antihelmintik
Konsentrasi ekstrak 20%	7,413%
Konsentrasi ekstrak 40%	8,163%
Konsentrasi ekstrak 60%	12,50%
Konsentrasi ekstrak 80%	16,00%
Konsentrasi ekstrak 100%	50,00%

Tabel 4. Hasil uji statistik *One-way* Anova

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
<i>Between Groups</i>	181,492	6	30,249	969,407	0,000
<i>Within Groups</i>	0,655	210	0,031		
Total	182,147	27			

Dari hasil penelitian terlihat bahwa ekstrak putri malu memiliki efek antihelmintik. Pada Gambar 1 terlihat pada konsentrasi ekstrak putri malu yang berbeda menunjukkan daya antihelmintik yang berbeda pula, semakin tinggi konsentrasi maka waktu kematian cacing semakin cepat.

Hal ini sesuai dengan teori sebelumnya yang menyebutkan bahwa putri malu memiliki efek antihelmintik. Efek antihelmintik dari putri malu diduga dikarenakan kandungan zat aktif tanin dan mimosin pada putri malu. Senyawa mimosin bersifat neurotoksik terhadap cacing dengan jalan menghambat kerja dari enzim asetilkolinesterase, hal ini mengakibatkan menumpuknya asetilkolin pada tubuh cacing yang tidak segera dinaktifkan karena dihambatnya enzim asetilkolinesterase, sehingga cacing mati dalam kondisi kaku (Eduardo 2005). Adapun senyawa tanin yang memiliki kemampuan mendenaturasi protein menyebabkan protein pada permukaan tubuh cacing terdenaturasi, sehingga permukaan tubuh cacing menjadi tidak permeabel lagi dan terdapat zat di luar tubuh cacing (Brunet dan Hoste 2006; Iqbal et al. 2007; Cenci et al. 2007; Anthanasiadou et al. 2001).

Daya antihelmintik dari zat aktif tanin dan mimosin juga telah dibuktikan oleh Anwar (2005) yang membandingkan efek antihelmintik ekstrak biji lamtoro dan ekstrak biji lamtoro gung yang juga mengandung senyawa aktif tanin dan mimosin. Anwar (2005) menyatakan bahwa ekstrak biji lamtoro memiliki efek antihelmintik yang lebih lemah daripada ekstrak biji lamtoro gung pada konsentrasi yang sama terhadap *A. suum*. Namun, efek antihelmintik dari ekstrak putri malu lebih kuat daripada efek antihelmintik ekstrak biji lamtoro dan biji lamtoro gung pada konsentrasi sama pada penelitian Anwar (2005), hal ini diduga dikarenakan ekstrak herba putri malu memiliki kadar tanin dan mimosin yang lebih besar daripada biji lamtoro dan lamtoro gung.

Efek antihelmintik pirantel pamoat sudah banyak diketahui karena pirantel pamoat merupakan *drug of choice* pada kasus askariasis. Pirantel pamoat menimbulkan depolarisasi pada otot cacing dan meningkatkan frekuensi impuls, sehingga cacing mati dalam kondisi spastik. Pirantel pamoat juga menghambat enzim asetilkolinesterase dan menyebabkan penimbunan asetilkolin, sehingga otot cacing mengalami hiperkontraksi (Katzung 2004; Ganiswara 2007). Dari penelitian ini juga diketahui bahwa pirantel pamoat memiliki efek antihelmintik yang lebih kuat daripada ekstrak putri malu pada semua konsentrasi.

Dari Tabel 3 dan Gambar 2 dapat diketahui bahwa perbandingan daya antihelmintik ekstrak putri malu pada berbagai konsentrasi dengan pirantel pamoat sebagai

kontrol positif. Pada konsentrasi 100%, ekstrak putri malu memiliki daya antihelmintik setengah kali lipat dibandingkan pirantel pamoat. Dengan efektivitas ekstrak putri malu setengah kali lipat dibandingkan efektivitas pirantel pamoat, ekstrak putri malu memiliki peluang tinggi untuk dikembangkan menjadi obat antihelmintik, khususnya pada askariasis, karena efek samping yang terdapat dalam pirantel pamoat, seperti gangguan pencernaan, demam, dan sakit kepala, yang mungkin tidak ditemukan pada penggunaan ekstrak putri malu sebagai obat cacing. Selain itu, penggunaan pirantel pamoat pada wanita hamil dan anak usia di bawah 2 tahun tidak dianjurkan dan masih dalam kontroversi. Dari beberapa kekurangan pirantel pamoat yang tidak terdapat dalam ekstrak putri malu, menjadi alasan kuat dalam penelitian ini untuk dapat dikembangkan lebih jauh.

KESIMPULAN

Ekstrak putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) memiliki pengaruh dalam mempercepat mortalitas *Ascaris suum* Goeze secara in vitro.

DAFTAR PUSTAKA

- Alam, Gemini, Rahim A. 2007. Penuntun praktikum fitokimia. UIN Alaudin, Makassar.
- Anwar YAM. 2005. Perbedaan efek antihelmintik ekstrak biji lamtoro (*Leucaena galuca* Benth) dan lamtoro gung terhadap *Ascaris suum* Goeze secara in vitro. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson F. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: In vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 99(3): 205-219.
- Brunet S, Hoste H. 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J Agric Food Chem* 54(20): 7481-7487.
- Cenci FB, Louvandini H, McManus CM et al. 2007. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Vet Parasitol* 144(1-2): 132-137.
- Dalimartha S. 2008. 1001 resep herbal. Penebar Swadaya, Jakarta.
- David RH. 2008. Ascariasis. *emedicine.medscape.com*. [24 Februari 2009].
- Duke J. 2009b. Phytochemical and ethnobotanical database-Tannin sun. *arsgri.gov*. [9 Maret 2009].
- Eduardo BA. 2005. Planting trees in Salvador: *Leucaena* is a dewormer for goats. *www.farmadio.org*. [3 Februari 2009].
- Ganiswara SG. 2007. Farmakologi dan terapi. 5th edition. Gaya Baru, Jakarta.
- Harvey WF, John UL. 2005. Kamala. *www.ibiblio.org*. [3 Februari 2009].
- Herawati MH. 2000. Berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat kecacingan. *Media Litbang Kesehatan* 10: 235-239.
- Iqbal Z, Sarwar M, Jabbar A et al. 2007. Direct and indirect anthelmintic effects of condensed tannins in sheep. *Vet Parasitol* 144(1-2): 125-131.
- Katzung BG. 2004. Farmakologi dasar dan klinik. Salemba Empat, Jakarta.
- Kazura JW. 2008. Nematode infections. In: Goldman L, Ausiello D (eds). *Cecil Medicine*. 23rd edition. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Laskey A. 2007. *Ascaris lumbricoides*. *dokterfoto.com*. [2 Maret 2009].
- Miyazaki I. 1991. Helminthic zoonoses. International Medical Foundation of Japan, Tokyo.
- Pohan HT. 2006. Penyakit cacing yang ditularkan melalui tanah. Ilmu Penyakit Dalam. Departemen Ilmu Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.

Kajian aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol pada angkak dengan variasi jenis substrat (beras, jagung, dan gapek)

Study of antioxidant activity and anti-cholesterol content on red yeast rice with substrates variation (rice, corn and dried cassava)

HADI WIYOTO, M.A.M. ANDRIANI, NUR HER RIYADI PARNANTO

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 24 Agustus 2010. Revisi disetujui: 14 Desember 2010.

Abstract. Wiyoto H, Andriani MAM, Parnanto NHR. 2011. Study of antioxidant activity and anti-cholesterol content on red yeast rice with substrates variation (rice, corn and dried cassava). *Biofarmasi* 9: 38-44. Red yeast rice is one of fermented rice product by *Monascus purpureus*. Traditionally, the substrate used to produce red yeast rice is rice. Usually, the rice with high amylose content is proper to produce red yeast rice than low amylose. The other substrates that be used to produce red yeast rice are corn and dried cassava. The purposes of this research were to determine the effect of substrates variation (rice, corn and dried cassava) on antioxidant activity and anti-cholesterol content in red yeast rice, and to determine the substrate(s) that produce the highest antioxidant activity and anti-cholesterol content. The design of this research was a Completely Randomized Design with one factor, i.e. the kind of substrates: rice, corn and dried cassava, with three replications. Then, the data were analyzed with ANOVA at a level of significance $\alpha=0.05$, and continued with DMRT at the same level. This results showed that the effect of substrates kind to antioxidant activity and anti-cholesterol content on red yeast rice. The rice substrate had higher antioxidant activity and anti-cholesterol content than corn and dried cassava substrates. The antioxidant activity and the anti-cholesterol content on red yeast rice from rice substrate were 45.6100% and 0.026600%, respectively. The antioxidant activity and the anti-cholesterol content on red yeast rice from corn substrate were 44.0500% and 0.022833%, respectively, while the antioxidant activity and the anti-cholesterol content on red yeast rice from dried cassava substrate were 42.8333% and 0.013200%, respectively.

Keywords: Anti-cholesterol, antioxidant activity, red yeast rice, substrates variation

PENDAHULUAN

Angkak merupakan salah satu produk beras terfermentasi dengan menggunakan kapang *Monascus* sp. (Ardiansyah 2005). Melalui proses fermentasi fasa padat dengan menggunakan kapang *Monascus*, butir-butir beras yang tadinya berwarna putih akan diselimuti oleh pigmen merah yang dihasilkan selama fermentasi. Metabolit yang terbentuk selama proses fermentasi umumnya berupa senyawa-senyawa poliketida, seperti *monascin*, *ankaflavin*, *rubropuctatin*, dan *monascorubrin*, yang merupakan pigmen warna. Selain itu, proses fermentasi juga menghasilkan beberapa senyawa metabolit sekunder bentuk poliketida lain, seperti monakolin K yang identik dengan lovastatin atau mevinolin, serta senyawa monakolin lainnya yang berfungsi sebagai antikolesterol (Tisnadajaja 2006).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting bagi kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan berpotensi mengurangi risiko terhadap penyakit kronis, seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak

berpasangan dalam orbital luarnya, sehingga dapat bereaksi dengan molekul-molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron molekul sel tersebut (Amrun dan Umiyah 2005). Oleh karena secara kimia molekulnya tidak lengkap, radikal bebas cenderung mengambil partikel sel dari molekul lain, yang kemudian menimbulkan senyawa abnormal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh.

Menurut Albert (1989), lovastatin digolongkan ke dalam kelompok obat statin. Lovastatin sebagai agen hiperkolesterolemia mampu menurunkan kadar serum kolesterol, LDL, trigliserol, dan VLDL dalam darah. Amita (2006) menyatakan bahwa dibandingkan penurunan kolesterol lainnya (pengikat asam empedu, asam nikotinat, asam fibrat, penghambat absorpsi terol), kolestatin memiliki efek penurunan LDL-C terbesar. Dengan demikian, kolestatin dijadikan sebagai obat utama untuk mengatasi hiperkolesterolemia.

Menurut Jenie et al. (1994), angkak diproduksi secara tradisional dengan menggunakan substrat beras. Pada umumnya, angkak yang beredar di pasaran terdapat dalam bentuk beras utuh. Winarno dan Titi (1994) menyatakan bahwa berbagai varietas beras dapat digunakan untuk memproduksi angkak, namun beras pera yang memiliki kadar amilosa tinggi lebih sesuai digunakan untuk

memproduksi angkak daripada beras dengan kadar amilosa rendah.

Berbagai varietas beras dapat digunakan sebagai medium pertumbuhan kapang *Monascus purpureus*. Santoso (1985) melaporkan bahwa beras pera dengan kadar amilosa yang tinggi dan amilopektin yang rendah merupakan substrat yang baik untuk pembuatan angkak dan kandungan lovastatinnya. Beras yang lengket (ketan) mempunyai kandungan amilosa yang sangat rendah (<9%), beras yang sangat pulen mempunyai kandungan amilosa yang rendah (9-20%), beras yang pulen memiliki kadar amilosa tinggi (20-25%), sedangkan beras pera memiliki kandungan amilosa yang lebih tinggi, yaitu antara 25-30%. Kandungan protein pada beras umumnya berkisar antara 6-10%.

Substrat beras biasa digunakan dalam produksi pigmen angkak. Substrat lainnya antara lain jagung, singkong, tepung tapioka dan gaplek, ubi, sago, terigu, suweg, dan kentang serta campuran onggok-ampas tahu (Yuan 1980). Adapun Rahayu et al. (1993) menyatakan bahwa bahan berkarbohidrat lain, seperti jagung dan cantel, juga dapat digunakan sebagai media pertumbuhan dalam pembuatan angkak.

Jagung merupakan salah satu jenis bahan makanan yang mengandung sumber hidrat arang yang dapat digunakan untuk menggantikan (mensubstitusi) beras, karena jagung memiliki kalori yang hampir sama dengan kalori yang terkandung pada padi. Kandungan protein dan karbohidratnya pun hampir mendekati kandungan protein dan karbohidrat pada padi. Menurut Suarni dan Widowati (2005), komponen utama jagung adalah pati, yaitu sekitar 70% dari bobot biji. Komponen karbohidrat lain adalah gula sederhana, yaitu glukosa, sukrosa, dan fruktosa, 1-3% dari bobot biji. Pati terdiri atas dua jenis polimer glukosa, yaitu amilosa dan amilopektin. Komposisi amilosa dan amilopektin di dalam biji jagung terkendali secara genetik.

Gaplek merupakan salah satu bentuk pengolahan ubi kayu yang paling sederhana. Gaplek terutama mengandung zat pati seperti halnya beras. Tetapi berbeda dengan beras, jagung, dan padi-padian lain, gaplek hanya memiliki kadar protein yang sangat rendah (Hastuti dan Rahardjo 1983). Dari gaplek ubi kayu dapat dibuat tiwul, gatot, dan berbagai macam makanan lainnya (Tjokroadikoesoemo 1986).

Berdasarkan latar belakang tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai pembuatan angkak dengan menggunakan substrat beras, jagung, dan gaplek. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan substrat berupa beras, jagung, dan gaplek yang merupakan komoditas lokal yang masih jarang digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan angkak. Pemilihan jagung dan gaplek sebagai substrat dalam pembuatan angkak dikarenakan jagung dan gaplek memiliki kandungan karbohidrat yang hampir setara dengan beras, selain itu juga harganya yang relatif lebih murah. Penelitian ini juga bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol (lovastatin) dalam angkak yang dibuat dari beras, jagung, dan gaplek yang diinokulasi dengan *Monascus purpureus*.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh variasi jenis substrat (beras, jagung, dan gaplek) terhadap aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol pada angkak, serta jenis substrat yang mampu menghasilkan aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol paling tinggi pada angkak.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses Pengolahan dan Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta dan Laboratorium Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta. Penelitian ini dilaksanakan dari November 2009 sampai April 2010.

Bahan dan Alat Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan untuk membuat angkak yaitu beras putih (varietas IR64), jagung putih (varietas Srikandi Putih), gaplek (singkong varietas Malang-1), akuades, biakan *M. purpureus* dalam PDA miring. Adapun bahan-bahan yang digunakan untuk analisis aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol adalah metanol, larutan DPPH 0,1 mM, asetonitril, *aquabidest*, dan asam fosfat 0,1%.

Sementara itu, alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, penumbuk, mortar, ayakan, autoklaf, alat pengering, labu takar, pipet ukur, mikropipet, pro-pipet, *hotplate*, bunsen, ose, erlenmeyer, pengaduk, gelas ukur, tabung reaksi, *vortex*, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis, dan HPLC.

Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu jenis substrat, dengan 3 kali ulangan. Adapun substrat yang digunakan terdiri dari beras, jagung, dan gaplek.

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
Substrat beras (B)	B ₁	B ₂	B ₃
Substrat jagung (J)	J ₁	J ₂	J ₃
Substrat gaplek (G)	G ₁	G ₂	G ₃

Cara Kerja

Produksi kapang *Monascus purpureus*

Biakan murni *M. purpureus* diperbanyak dengan memindahkan kultur kapang tersebut ke dalam beberapa tabung reaksi yang berisi media PDA miring dan diinkubasi selama 5-7 hari. Tahapan ini dilakukan dengan cara mengambil 1 ose kultur bakteri secara aseptis kemudian diinokulasikan ke dalam tabung reaksi.

Pembuatan suspensi *Monascus purpureus*

Pembuatan suspensi *M. purpureus* dilakukan dengan cara 2 ml akuades steril dituangkan ke dalam tabung reaksi

berisi media miring dengan biakan murni *M. purpureus*, kemudian digojog menggunakan ose untuk melepaskan spora-spora *M. purpureus*, selanjutnya dituangkan ke dalam erlenmeyer yang berisi substrat padat beras putih, jagung, maupun gaplek.

Pembuatan angkak

Pembuatan angkak dilakukan dengan cara memasukkan 100 gram bahan (beras, jagung, maupun gaplek) rendaman selama 40 jam ke dalam erlenmeyer, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, bahan-bahan tersebut didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 36°C. Bahan hasil perendaman kemudian diinokulasi dengan 2 ml suspensi *M. purpureus*. Setelah itu, campuran tersebut diaduk hingga rata dan diinkubasi pada suhu 27-32°C selama kurang lebih 30 hari, hingga terbentuknya pigmen merah yang menyelubungi beras yang disebut angkak. Angkak tersebut kemudian dikeringkan dengan alat pengering pada suhu 40°C selama 15 jam. Pengeringan ini bertujuan untuk mengeringkan angkak. Angkak yang sudah kering kemudian dibuat serbuk. Serbuk angkak diekstrak dengan menggunakan metanol untuk diuji aktivitas antioksidan dan diekstrak dengan menggunakan asetonitril untuk diuji kadar antikolesterolnya.

Uji aktivitas antioksidan

Analisis terhadap aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (Osawa dan Namiki 1981). Sebanyak 0,05 gram sampel diekstrak dalam 10 ml metanol, kemudian divorteks selama 1 jam atau didiamkan selama semalam. Dari larutan tersebut diambil 100 µl kemudian diencerkan menjadi 5 ml, ditambahkan 0,1 mM DPPH sebanyak 1 ml, dan divorteks. Sampel disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit, kemudian ditera absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm.

Uji kadar antikolesterol (lovastatin)

Kadar lovastatin dapat diukur dari serbuk angkak. Sebanyak 1 gram serbuk angkak diekstrak dengan 2 ml asetonitril dan 0,1 ml asam fosfat 0,1%, kemudian dibiarkan selama 30 menit, setelah itu larutan disentrifuse dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya sampel disaring dengan kertas Whatman dan supernatan yang dihasilkan diinjeksikan pada kolom HPLC, dengan demikian, kadar antikolesterol dapat diukur (Kasim et al. 2005). Penentuan kadar antikolesterol dilakukan dengan menggunakan HPLC, pada kolom C18, fase gerak metanol:asetonitril:asam formiat:air (35:40:15:10), panjang gelombang (λ) 254 nm, dan *flow/pressure* 1/88 kg.cm.m⁻¹, terhadap ekstrak hasil pemisahan dengan asetonitril. Kadar antikolesterol diperoleh dengan membandingkan luas area lovastatin sampel dengan luas area lovastatin standar. Sebagai standar digunakan tablet lipovas 200 mg yang mengandung 20 mg lovastatin (Nauli dan Udin 2006).

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian selanjutnya dianalisis dengan metode ANOVA dan apabila terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji beda nyata menggunakan DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada tingkat signifikansi $\alpha=0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antioksidan Angkak

Kapang *M. purpureus* menghasilkan metabolit, antara lain zat warna, zat antihiperkolesterolemia, asam-asam organik, dan enzim. Zat warna *Monascus* terdiri dari *ankaflavine* dan *monascine* (berwarna kuning), *rubropunctatine* dan *monascorubrine* (jingga), serta *rubropunctamine* dan *monascorubramine* (ungu) (Pastrana et al. 1995; Lakrod et al. 2000). Beras yang diinokulasi dengan *Monascus* memiliki kemampuan yang lebih besar dalam mereduksi, *scavenging*, dan kemampuan mengkelat serta memiliki kandungan total fenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan beras yang tidak diinokulasi (Kim et al. 2007).

Menurut Chairate et al. (2009), antioksidan dalam angkak terdiri dari beberapa senyawa seperti flavonoid, polifenol, karotenoid, alkaloid, dan vitamin. Beberapa metabolit sekunder yang diproduksi oleh jamur *Monascus* merupakan komponen yang tersusun atas poliketida. Komponen tersebut adalah pigmen dan komponen fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan. Produksi pigmen yang semakin pekat diiringi dengan kenaikan jumlah antioksidan yang dihasilkan. Adapun Aniya et al. (2000) melaporkan bahwa satu dari metabolit sekunder dari *Monascus* merupakan senyawa antioksidan dalam bentuk *dimerumic acid* yang akan menghambat NADPH dan besi penyebab peroksidasi lemak. Wong dan Bau (1977) menyatakan bahwa *Monascus* mampu menghasilkan antioksidan dan asam dimerumat (*dimerumic acid*).

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan angkak yang dibuat dari berbagai substrat berkisar antara 42,8333-45,6100%. Angkak dari beras memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi apabila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan angkak dari jagung dan gaplek. Hal ini dikarenakan angkak dari beras mempunyai pigmen warna yang lebih pekat apabila dibandingkan dengan angkak dari jagung dan gaplek. Menurut Chairate et al. (2009), produksi pigmen yang semakin pekat diiringi dengan kenaikan jumlah antioksidan yang dihasilkan. Menurut Widjayanti (2000), pembentukan pigmen kuning, merah, dan oranye dengan substrat *cassava* sangat rendah dibandingkan dengan substrat beras. Perbedaan komposisi nutrisi dari masing-masing substrat juga dapat mempengaruhi produksi pigmen. Vitamin B (Lin 1973), asam amino (McHan dan Johnson 1970) dan garam *zinc* (Lin dan Demain 1991) dapat mempengaruhi produksi pigmen. Kandungan protein beras umumnya berkisar antara 6-10%. Beras juga mengandung vitamin B, fosfat, kalium, asam amino, dan garam *zinc*. Kandungan senyawa-senyawa tersebut dapat mempengaruhi produksi pigmen (Lin 1973).

Tabel 1. Aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol angkak dari berbagai jenis substrat

Sampel	Aktivitas Antioksidan (%)	Kadar Anti-kolesterol (%)
Angkak dari gaplek	42,8333 ^a	0,013200 ^a
Angkak dari jagung	44,0500 ^b	0,022833 ^b
Angkak dari beras	45,6100 ^c	0,026600 ^c

Keterangan: Angka dengan notasi yang sama berarti tidak berbeda nyata pada tingkat kepercayaan 95%.

Produksi pigmen berlawanan dengan tingkat kepulenan (*stickiness*) substrat (Widjayanti 2000). Pembentukan angkak yang kurang baik terjadi pada gaplek. Hal ini dikarenakan gaplek lebih pulen dari beras dan jagung. Tingkat kepulenan berkaitan erat dengan kandungan amilosa. Semakin tinggi kandungan amilosa maka semakin rendah tingkat kepulenan (semakin pera) suatu bahan. Singkong memiliki kandungan amilosa antara 17-25% (Ceballos 2007), beras IR64 memiliki kandungan amilosa 24% (Riwan 2008), dan jagung putih mengandung amilosa 31,05% (Suarni 2005). Apabila ditinjau dari kandungan amilosa maka jagung memiliki kandungan amilosa paling tinggi. Akan tetapi, aktivitas antioksidan angkak yang dihasilkan dari jagung ternyata lebih rendah dari beras. Hal ini dikarenakan jagung putih tergolong jagung mutiara (*Zea mays var. indurata*) yang mempunyai bentuk agak bulat dengan bagian luar keras dan licin. Penyebab biji yang keras yaitu karena bagian luar endosperma seluruhnya terdiri dari pati keras yang menguntungkan sebagai daya tahan terhadap serangan hama dan jamur (Noble dan Andrizal 2003). Oleh karena itu, miselia dari *Monascus* sulit untuk menembus lapisan endosperma biji jagung, sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan menjadi kurang optimal.

Kadar Antikolesterol (Lovastatin) Angkak

Lovastatin adalah suatu *pro-drug* yang di dalam tubuh akan segera terhidrolisis menghasilkan suatu senyawa yang dapat menghambat kerja dari HMG-CoA reduktase, yaitu sebuah enzim yang berfungsi untuk mengkatalisis perubahan HMG-CoA menjadi mevalonat yang merupakan sebuah tahapan penting dalam biosintesis kolesterol. Aktivitas penghambatan enzim tersebut mampu meningkatkan densitas reseptor LDL dalam sel hati, sehingga mengakibatkan penurunan LDL kolesterol. Aktivitas lovastatin tersebut memiliki arti penting secara medis sebagai obat antihiperkolesterolemia (Hardmann et al. 1996) dan diindikasikan dapat menurunkan risiko arteriosklerosis (Cottingham 1998).

Lovastatin merupakan produk metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Monascus* setelah fase stasioner pada pertumbuhan *Monascus*. Pembentukan produk metabolit sekunder tersebut dihasilkan oleh mikroorganisme sebagai upaya untuk mempertahankan hidup dalam kondisi terbatasnya nutrien. Ciri-ciri dari metabolit sekunder tersebut adalah metabolit tersebut umumnya tidak diproduksi selama fase pertumbuhan cepat (trofofase), tetapi dibentuk selama tahap produksi subsekuen (idiofase) (Kasim et al. 2006).

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa kadar antikolesterol angkak yang dibuat dari berbagai substrat berkisar antara 0,013200-0,026600%. Angkak dari beras memiliki kadar antikolesterol paling tinggi apabila dibandingkan dengan kadar antikolesterol angkak dari jagung dan gaplek. Menurut Chang et al. (2002), produksi lovastatin atau mevacor pada medium beras lebih tinggi kandungannya dari substrat yang lain.

Hal ini dikarenakan beras mengandung asam amino metionin yang merupakan asam amino esensial bagi biosintesis lovastatin karena merupakan *precursor*

langsung (Stocking dan Williams 2003). Asam amino metionin pada beras lebih tinggi daripada jagung dan gaplek. Asam amino metionin pada beras sebesar 0,16%, sedangkan kandungan metionin pada jagung putih dan singkong berturut-turut sebesar 0,067% dan 0,011%.

Pigmen juga dapat mengindikasikan banyaknya lovastatin yang diproduksi (Kasim et al. 2006). Semakin pekat warna pigmen yang dihasilkan maka semakin banyak lovastatin yang diproduksi. Hal ini terbukti dengan angkak dari beras mempunyai pigmen warna yang lebih pekat apabila dibandingkan dengan angkak dari jagung dan gaplek.

Selain memproduksi pigmen, *Monascus* juga menghasilkan enzim α dan β -amilase, glukamilase, protease, dan lipase (Lin 1973; Steinkraus 1983). Kapang *M. purpureus* menghasilkan enzim amilase yang berfungsi menghidrolisis amilosa menjadi glukosa dan maltosa melalui pemutusan ikatan (1,4)-glukosida. Glukosa mudah digunakan untuk metabolisme mikroba (Kasim et al. 2006). Oleh karena itu, semakin tinggi kandungan amilosanya maka semakin banyak amilosa yang terhidrolisis, sehingga semakin banyak lovastatin yang diproduksi. Singkong memiliki kandungan amilosa antara 17-25% (Ceballos 2007), beras IR64 memiliki kandungan amilosa 24% (Riwan 2008), dan jagung putih mengandung amilosa 31,05% (Suarni 2005). Apabila ditinjau dari kandungan amilosa maka jagung memiliki kandungan amilosa paling tinggi. Akan tetapi, kadar antikolesterol angkak yang dihasilkan dari jagung ternyata lebih rendah dari beras. Hal ini dikarenakan jagung putih tergolong jagung mutiara (*Zea mays var. indurata*) yang mempunyai bentuk agak bulat dengan bagian luar keras dan licin. Penyebab biji yang keras disebabkan oleh bagian luar endosperma seluruhnya terdiri dari pati keras yang menguntungkan sebagai daya tahan terhadap serangan hama dan jamur (Noble dan Andrizal 2003). Oleh karena itu, miselia dari *Monascus* sulit untuk menembus lapisan endosperma biji jagung, sehingga kadar antikolesterol yang dihasilkan menjadi kurang optimal.

KESIMPULAN

Jenis substrat mempunyai pengaruh terhadap aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol dari angkak yang dihasilkan. Angkak dari beras memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi (45,6100%) apabila dibandingkan dengan aktivitas antioksidan angkak dari jagung (44,0500%) dan gaplek (42,8333%). Angkak dari beras memiliki kadar antikolesterol paling tinggi (0,026600%) apabila dibandingkan dengan kadar antikolesterol angkak dari jagung (0,022833%) dan gaplek (0,013200%). Angkak dari beras memiliki aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol paling tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alberts AW. 1989. Lovastatin. Cardiovascular Drug Rev 7: 89-109.
 Amita. 2006. Optimalisasi manfaat statin. www.majalah-farmacia.com. [18 Juli 2009].

- Amrun MH, Umiyah. 2005. Pengujian antiradikal bebas Difenilpicril Hidrazil (DPPH) ekstrak buah kenit (*Chrysophyllum cainito* L.) dari daerah sekitar Jember. *Jurnal Ilmu Dasar* 6 (2): 110-114.
- Aniya Y, Ohtani II, Higa T, Miyagi C, Gibo H, Shimabukuro M, Nakanishi H, Taira J. 2000. Dimeric acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free Radic Biol Med* 28(6):999-1004.
- Ardiansyah. 2005. Minum angkak menyehatkan. www.journal.agric.food.chem.com. [18 Juli 2009].
- Aryantha NP, Widayanti S, Yuanita. 2004. Eksplorasi fungi *Deuteromyces* (*Aspergillus* sp. dan *Penicillium* sp.) penghasil senyawa antikolesterol. Laporan Akhir Penelitian Dasar. Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Ceballos H. 2007. Penemuan: Singkong lebih bernutrisi. www.indobic.or.id. [31 Januari 2010].
- Chairote E, Chairote Griangsak, Lumyong S. 2009. Red yeast rice prepared from Thai glutinous rice and the antioxidant activities. *Chiang Mai J Sci* 36(1): 42-49.
- Chang YN, Huang JC, Lee CC, Shih IL and Tzeng YM. 2002. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme Microb Technol* 30: 889-894.
- Cottingham, J., 1998, Lovastatin/ Mevacor™: Cholesterol Control , The Parkins List Drug Database Index, 1-3.
- Hardmann, J.G. et al. , (eds.). 1996. Goodman and Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics , McGraw-Hill Book Co., New York.
- Hastuti P, Rahardjo P. 1983. Pengolahan hasil tanaman serealia dan palawija. Depdiknas, Jakarta.
- Jenie BSL, Ridawati, Rahayu WP. 1994. Produksi angkak oleh *Monascus purpureus* dalam medium limbah cair tapioka, ampas tapioka dan ampas tahu. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan* 5(3): 60-64.
- Kasim E, Astuti S, Nurhidayat N. 2005. Karakterisasi pigmen dan kadar lovastatin beberapa isolat *Monascus purpureus*. *Biodiversitas* 6(4): 247-250.
- Kasim E, Suharna N, Nurhidayat N. 2006. Kandungan pigmen dan lovastatin pada angkak beras merah kultivar Bah Butong dan BP 1804 IF 9 yang difermentasi dengan *Monascus purpureus* Jmba. *Biodiversitas* 7(1): 7-9.
- Kim SY, Yoon SK, Young SK et al. 2007. The application of monascol rice in rice beverage preparation. www.net-lanna.info. [5 Februari 2010].
- Lakrod K, Chairisook C, Skinner DZ. 2003. Tanasformation of *Monascus purpureus* to hygromycin B resistance with cosmid pMOcosX reduces fertility. *Mol Biol Genet* 6 (2). <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v6n2/a07.pdf>
- Lin TF, Demain AL. 1991. Effect of nutrition of *Monascus* sp. on formation of red pigments. *J Appl Microbiol Biotechnol* 36: 70-75.
- Lin TF. 1973. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp for the production of pigment in a submerged culture. *J Ferment Technol* 51: 135-142.
- McHan E, Johnson GT. 1970. Zinc and amino acids: important components of a medium promoting growth of *Monascus purpureus*. *Mycologia* 62: 1018-1031.
- Nauli T, Udin LZ. 2006. Model fermentasi lovastatin. *Akta Kimindo* 1(2): 99-104.
- Noble P, Andrizal. 2003. Pedoman penanganan pasca panen jagung. Direktorat Pengolahan dan Pemasaran Hasil Tanaman Pangan, Departemen Pertanian, Jakarta.
- Osawa T, Namiki MA. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of *Eucalyptus* leaves. *Agric Biol Chem* 45: 735-739.
- Pastrana, L., P.J. Blanc, A.L. Santerre, M.O. Loret, and G. Goma. 1995. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. *Process Biochem* 30 (4): 333-341.
- Rahayu ES, Indrati R, Utami T et al. 1993. Bahan pangan hasil fermentasi. PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Riwan. 2008. Hubungan antara varietas dengan komposisi beras. <http://teknologi-hasil-pertanian.blogspot.com>. [18 Juli 2009].
- Santoso, G.S.B. 1985. Produksi pewarna alami angkak dengan media fermentasi beras sosoh. *Media Teknologi dan Pangan* 11 (2): 34-38.
- Steinkraus KH. 1983. Handbook of Indigenous Fermented Foods. Marcel Dekker Inc., New York.
- Stocking, E.M., and R.M. Williams. 2003. Chemistry and biology of biosynthetic Diels-Alder reactions. *Angewandte Chem Intl* 42: 3078-3115.
- Suarni, Widowati S. 2005. Struktur, komposisi, dan nutrisi jagung. balitsereal.litbang.deptan.go.id. [14 Juli 2009].
- Suarni. 2005. Karakteristik fisikokimia dan amilograf tepung jagung sebagai bahan pangan. Prosiding Seminar dan Lokakarya Nasional Jagung. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Makassar, 29- 30 September 2005. p. 440-444.
- Timotius KH. 2004. Produksi pigmen angkak oleh *Monascus*. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 15(1): 79-86.
- Tisnadjaja D. 2006. Bebas kolesterol dan demam berdarah dengan angkak. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Tjokroadikoesoemo S. 1986. HFS dan industri ubi kayu lainnya. Gramedia, Jakarta.
- Widjayanti RDE. 2000. Membandingkan beras dan *cassava* sebagai substrat untuk produksi pigmen *Monascus* dengan fermentasi padat. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia* 2(2): 23-26.
- Winarno FG, Titi SR. 1994. Bahan tambahan untuk makanan dan kontaminan. Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.
- Wong HC, Bau YS. 1977. Pigmentation and antibacterial activity of fast-neutron-X-ray- induced strains of *Monascus purpureus*. *Went. Plant Physiol* 60: 578-581.
- Yuan CS. 1980. Fermentative production of ankak pigments (*Monascus pigments*). *Proceeding of the Oriental Fermented Foods*. Bangkok, Thailand.

Pengaruh pemberian ekstrak air kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kadar kolesterol total darah dan berat badan tikus putih

The influence of aqueous extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx on blood cholesterol level and body weight in rats

MEISA MARSALINA, SAMIGUN, ENDANG SRI HARDJANTI

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

Manuskrip diterima: 27 Agustus 2010. Revisi disetujui: 21 Desember 2010.

Abstract. Marsalina M, Samigun, Hardjanti ES. 2011. The influence of aqueous extract of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx on blood cholesterol level and body weight in rats. *Biofarmasi* 9: 43-49. This study aimed to investigate the influence of aqueous extract of roselle calyx on blood cholesterol level and body weight in rats. This experimental research was arranged as a pre and post-test controlled group design. Thirty Sprague-Dawley rats, with 3 months of age and 250 g in average weight, were used as an animal model. Those rats were grouped equally into five groups, i.e. negative control (aquadest), positive control (0.26 mg lovastatin/200 g body weight of rats/2 mL), the first dose of aqueous extract of roselle calyx (65 mg/200 g/2 mL), the second dose of aqueous extract of roselle calyx (130 mg/200 g/2 mL), and the third dose of aqueous extract of roselle calyx (195 mg/200 g/2 mL). The measurement of rat blood cholesterol level was conducted before and after treatment, while the rat body weight was measured once a week. The result of this study was analyzed by using one-way ANOVA statistical test. The one-way ANOVA statistical test showed no significant difference on reducing blood cholesterol level with $p=0.327$ ($p>0.05$) and body weight in rat with $p=0.154$, $p=0.214$, and $p=0.938$ ($p>0.05$). This study concluded that the aqueous extract of roselle calyx has no influence on lowering blood cholesterol level and body weight in rats.

Keywords: Aqueous extract, roselle calyx, blood cholesterol level, rat body weight

PENDAHULUAN

Sejak ribuan tahun yang lalu, obat dan pengobatan tradisional sudah ada di Indonesia, jauh sebelum pelayanan kesehatan formal dengan obat-obatan modern yang dikenal masyarakat (Wijayakusuma 2002). Tumbuh-tumbuhan berperan penting dalam kehidupan masyarakat, baik sebagai sumber pangan maupun obat-obatan.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional masih dilakukan oleh masyarakat di Indonesia, terutama di daerah pedesaan yang masih kaya dengan keanekaragaman jenis tumbuhan (Wayan 2004). Selain murah dan mudah didapat, obat tradisional yang berasal dari tumbuhan pun memiliki efek samping yang jauh lebih rendah tingkat bahayanya dibandingkan obat-obatan kimia (Fauziah 1999). Obat tradisional Indonesia masih banyak yang belum diteliti, khususnya sebagian besar berasal dari bahan tumbuhan (Azwar 1992).

Penyakit jantung koroner dan stroke merupakan penyakit kardiovaskular yang sering kita jumpai saat ini. Di banyak negara maju maupun negara berkembang, penyakit kardiovaskuler merupakan penyebab kematian utama. Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 1972, penyakit kardiovaskular masih berada pada peringkat ke-11 penyebab utama kematian di Indonesia. Pada tahun 1986, penyakit tersebut naik ke urutan ketiga, kemudian pada tahun 1992, 1995, dan 2001

menjadi urutan pertama (Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah 2008).

Kadar kolesterol yang tinggi di dalam darah, atau disebut dengan hiperkolesterolemia, merupakan satu dari beberapa faktor risiko utama penyakit jantung koroner (Anwar 2004). Hiperkolesterolemia menyebabkan terjadinya aterosklerosis, yaitu kondisi dimana terjadi penimbunan plak pada lapisan intima dinding arteri. Perkembangan lebih lanjut dari aterosklerosis menyebabkan terjadinya penyakit kardiovaskular (Guyton dan Hall 1997).

Obesitas adalah suatu gangguan keseimbangan energi, dapat terjadi apabila pengeluaran energi tidak lagi seimbang dengan asupan energi. Obesitas mempunyai pengaruh yang besar pada morbiditas dan harapan hidup manusia (Amin 2009). Peningkatan kejadian obesitas memberikan kesan bahwa kelebihan berat badan epidemik tersebut akan semakin memburuk di masa depan (York et al. 2007). Prevalensi obesitas di dunia meningkat dengan cepat pada orang dewasa, begitu juga pada anak-anak dan remaja, dimana asupan makanan tinggi lemak sebagai faktor risiko utama dari perkembangan obesitas. Konsumsi makanan tinggi lemak dapat memicu terjadinya obesitas, karena makanan tinggi lemak akan memfasilitasi terbentuknya keseimbangan energi positif yang nantinya akan meningkatkan penimbunan lemak pada organ dalam tubuh, yang akan memicu terjadinya obesitas, terutama

obesitas abdominal. Saat ini, penggunaan obat dengan efek kuat menjadi cara populer untuk mengatasi berat badan yang berlebih. Akan tetapi, banyaknya efek samping menjadi masalah yang akhirnya membatasi kegunaan dari obat itu sendiri (Amin 2009). Tidak adanya terapi yang efektif untuk kelebihan berat badan, selain operasi *bariatric*, telah mendorong pencarian untuk menemukan obat baru yang lebih efektif untuk menurunkan berat badan dan/atau mencegah kenaikan berat badan (York et al. 2007).

Saat ini, rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) menjadi begitu populer. Kepopuleran bunga rosela tersebut disebabkan hampir seluruh bagian tanaman dapat digunakan untuk kebutuhan pengobatan, terutama untuk pengobatan alternatif. Selain itu, rosela memiliki kandungan senyawa kimia yang memberikan banyak manfaat (Mardiah et al. 2009).

Kelopak bunga rosela saat ini sedang populer dan diminati oleh masyarakat, karena bermanfaat bagi penderita aterosklerosis (Maryani dan Kristiana 2005). *Anthocyanin*, *flavonoid*, dan *polyphenol* merupakan zat kardioprotektif pencegah penyakit kardiovaskuler yang terdapat dalam kelopak bunga rosela (Oppel 2007). Kandungan antioksidan, seperti *α-tocopherol* dan *probuco*, dalam kelopak bunga rosela telah diteliti dapat mengurangi oksidasi *low-density lipoprotein* (LDL). Infus daun dan kelopak bunga rosela dianggap bermanfaat sebagai diuretik, menurunkan kadar kolesterol, menurunkan tekanan darah, menurunkan viskositas darah, menstimulasi peristaltik usus, dan sebagai antibakterial (Morton 1981). Kelopak bunga rosela juga bermanfaat untuk menurunkan nafsu makan, mengatasi demam, radang selaput lendir pada sistem pernapasan dan pencernaan, mengencerkan dahak, sebagai diuretik, dan gangguan sirkulasi. Pada penelitian di Thailand disimpulkan bahwa terdapat hubungan antara kadar LDL dengan angka kejadian aterosklerosis (Hirunpanich 2005). Selain sebagai antioksidan, kelopak bunga rosela dapat mencegah aterosklerosis dengan efek hipokolesterolemik yang dimilikinya. Penelitian selama empat minggu dengan perlakuan pakan hiperkolesterolemik beserta ekstrak etanol kelopak bunga rosela terhadap tikus Sprague-Dawley, membuktikan bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga rosela dapat menurunkan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida (Carjavall-zarrabal et al. 2005). Pada penelitian lain disimpulkan bahwa dosis ekstrak kelopak bunga rosela yang mampu menurunkan kadar kolesterol total darah pada manusia secara optimal adalah 3000 mg/hari (Oppel 2007).

Kelopak bunga rosela di beberapa negara banyak dikonsumsi sebagai minuman kesehatan. Salah satu bentuk minuman kesehatan tersebut berupa teh kelopak bunga rosela yang pembuatannya dengan cara diseduh (Maryani dan Kristiana 2005). Penelitian tentang manfaat teh kelopak bunga rosela memberikan simpulan bahwa pemberian seduhan kelopak bunga rosela dengan dosis 36 mg/hari dan 54 mg/hari tidak dapat mencegah peningkatan kadar kolesterol total darah tikus putih yang dibuat hiperkolesterolemik (Harindraputra 2009).

Lovastatin adalah obat golongan statin yang digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol pada kondisi

hiperkolesterolemi. Statin saat ini merupakan hipolipidemik yang paling efektif dan aman (Suyatna 2007).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin membuktikan manfaat kelopak bunga rosela terhadap penurunan kadar kolesterol total darah tikus putih dengan menggunakan metode lain, yaitu memakai ekstrak air kelopak bunga rosela, dan dengan menggunakan obat penurun kolesterol yang umum dipakai di masyarakat yaitu lovastatin sebagai kontrol positif. Selain itu, peneliti juga ingin mengetahui manfaat kelopak bunga rosela dalam menurunkan peningkatan berat badan tikus putih yang diberi makanan tinggi kolesterol.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak air kelopak bunga rosela (*H. sabdariffa*) dalam menurunkan kadar kolesterol total darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) serta untuk mengetahui pengaruh ekstrak air kelopak bunga rosela (*H. sabdariffa*) dalam menurunkan kenaikan berat badan tikus putih (*R. norvegicus*).

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Pemberian perlakuan ekstrak air kelopak bunga rosela dan pengukuran kadar kolesterol total darah dan berat badan tikus putih dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

Subjek penelitian

Tikus diperoleh dari LPPT UGM yaitu berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Sprague-Dawley, dalam kondisi sehat dan mempunyai aktivitas normal, berumur sekitar 3 bulan dengan berat badan ± 250 gram sebanyak 30 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus putih yang dipilih secara acak.

Jenis penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan *pre and post-test controlled group design*.

Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*. Penentuan besar sampel dilakukan dengan menggunakan rumus Federer (Maryanto dan Fatimah 2004) sebagai berikut:

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

Keterangan:

n = besar sampel tiap kelompok

t = banyaknya kelompok yaitu:

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

$$(n-1) \times 4 > 15$$

$$n-1 > 3,75$$

$$n > 4,75$$

Dengan demikian, setiap kelompok terdapat minimal 5 ekor tikus putih. Pada penelitian ini digunakan 6 ekor tikus putih untuk tiap kelompok dengan jumlah kelompok sebanyak 5 kelompok, sehingga jumlah seluruh subjek penelitian sebanyak 30 ekor tikus putih.

Cara Kerja

Tikus sebanyak 30 ekor dibagi dalam lima kelompok secara random, sehingga dalam satu kelompok terdiri atas 6 tikus. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol negatif, kelompok 2 sebagai kelompok kontrol positif, sedangkan kelompok 3, 4, dan 5 sebagai kelompok perlakuan.

Selama 7 hari, tikus diadaptasikan dengan lingkungan tempat penelitian dan diberi makan standar untuk tikus, yaitu *pellet* dan akuades. Untuk tikus seberat 200 gram setiap harinya membutuhkan minum sebanyak 20-45 mL air (Smith dan Mangkoewidjojo 1988).

Berat badan awal tikus ditimbang. Perbedaan rerata berat badan dianalisis dengan menggunakan uji *one-way ANOVA*. Apabila didapatkan perbedaan yang signifikan maka dicari berat badan tikus yang jauh di atas atau di bawah rerata dengan toleransi 20% (200-300 gram), untuk dapat diganti dengan berat badan tikus yang lain, sehingga tercapai kondisi homogen. Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap minggu untuk mendapatkan data berat badan tikus secara teratur, yang selanjutnya dianalisis untuk mengetahui pengaruh ekstrak air kelopak bunga rosela dalam menurunkan kenaikan berat badan tikus.

Setelah 7 hari, semua tikus diambil darahnya untuk pemeriksaan kadar kolesterol total darah *pre-test*. Setiap subjek penelitian dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam sebelum darahnya diambil. Darah tikus putih diambil melalui sinus orbitalis dengan pipet mikro hematokrit, lalu darahnya ditampung dalam tabung sentrifuge. Darah dalam tabung sentrifuge dipusingkan selama 15-20 menit dengan kecepatan 3000 rpm, sehingga didapatkan serum darah untuk diperiksa kadar kolesterol total serum darahnya. Kadar kolesterol total yang didapatkan adalah kadar kolesterol total sebelum perlakuan (*pretest*). Kadar kolesterol total diukur dengan metode spektrofotometrik.

Rerata kadar kolesterol total *pre-test* dianalisis dengan menggunakan uji *One-way ANOVA*. Apabila didapatkan perbedaan yang signifikan maka dicari data kolesterol total yang jauh di atas atau di bawah rerata untuk dapat diganti dengan data dari tikus yang lain untuk mencapai kondisi yang homogen sebelum perlakuan. Apabila tidak didapat perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan tahap berikutnya.

Perlakuan ekstrak air kelopak bunga rosela pada masing-masing kelompok yaitu sebagai berikut:

- Kelompok 1: Kelompok kontrol negatif, selama 4 minggu diberi induksi pakan hiperkolesterolemik, masing-masing tikus diberi 2,5 mL secara per oral melalui sonde. Pemberian pakan dilakukan dua kali sehari, pada pagi hari pukul 07.00 WIB dan sore hari pukul 15.00 WIB.
- Kelompok 2: Kelompok kontrol positif, selama 4 minggu diberi induksi pakan hiperkolesterolemik, masing-masing tikus diberi 2,5 mL secara per oral melalui sonde. Tikus diberikan lovastatin dosis 0,26

mg/200 g BB/2 mL secara per oral setelah pemberian pakan pada sore hari.

- Kelompok 3: Kelompok uji dosis 1, selama 4 minggu diberi induksi pakan hiperkolesterolemik, masing-masing tikus diberi 2,5 mL, dan ditambah dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 65 mg/200 g BB/2 mL yang diberikan secara per oral dua kali sehari.
- Kelompok 4: Kelompok uji dosis 2, selama 4 minggu diberi induksi pakan hiperkolesterolemik, masing-masing tikus diberi 2,5 mL, dan ditambah dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 130 mg/200 g BB/2 mL yang diberikan secara per oral dua kali sehari.
- Kelompok 5: Kelompok uji dosis 3, selama 4 minggu diberi induksi pakan hiperkolesterolemik, masing-masing tikus diberi 2,5 mL, dan ditambah dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 195 mg/200 g BB/2 mL yang diberikan secara per oral dua kali sehari.

Setelah hari ke-35, semua tikus diambil darahnya untuk pemeriksaan kadar kolesterol total darah *post-test*. Sebelum diambil darahnya, semua subjek penelitian dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam. Darah tikus putih diambil melalui sinus orbitalis dengan pipet mikro hematokrit, lalu darah ditampung dalam tabung sentrifuge. Darah dalam tabung sentrifuge dipusingkan selama 15-20 menit dengan kecepatan 3000 rpm, sehingga didapatkan serum darah untuk diperiksa kadar kolesterol total serum darahnya. Kadar kolesterol total yang didapatkan adalah kadar kolesterol total sesudah perlakuan (*post-test*). Kadar kolesterol total diukur dengan metode spektrofotometrik.

Penentuan dosis ekstrak air kelopak bunga rosela

Ekstrak air kelopak bunga rosela

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan secara per oral pada tikus adalah 5 mL/100 g (Ngatidjan 1991). Disarankan takaran dosis tidak sampai melebihi setengah kali volume maksimalnya (Imono dan Nurlaila 1989).

Takaran konversi dosis untuk manusia dengan berat badan (BB) 70 kg pada tikus dengan BB 200 g adalah 0,018. Orang Indonesia memiliki berat rata-rata 50 kg (Imono dan Nurlaila 1989).

Dosis kelopak rosela yang digunakan adalah dosis yang biasa dipakai di masyarakat, yaitu 3-4 kuntum bunga rosela, jika dikonversi menjadi ± 10 gram. Dengan demikian, dosis ekstrak air kelopak bunga rosela untuk tikus, yaitu:

$$= (10 \times 1000 \text{ mg} \times 0,018 \times 50/70)/200 \text{ g BB}$$

$$= 128,6 \text{ mg}/200 \text{ g BB, ekuivalen dengan } 130 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$$

Dalam percobaan ini digunakan dosis ekstrak kelopak bunga rosela secara bertingkat yaitu:

- Kelompok uji I: dosis rendah (dosis 1)
= $0,5 \times 130 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$
= $65 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$
- Kelompok uji II: dosis sedang (dosis 2)
= $1 \times 130 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$
= $130 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$
- Kelompok uji III: dosis tinggi (dosis 3)
= $1,5 \times 130 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$

= 195 mg/200 g BB

Berat serbuk kelopak bunga rosela 400 g yang diekstrak dengan 5 L akuades menghasilkan ekstrak sebanyak 115,240 g, sehingga 1 g serbuk kelopak bunga rosela setara dengan 288,10 mg ekstrak air kelopak bunga rosela.

- Dosis 1: 65 mg serbuk/200 g BB/2 mL setara dengan 18,73 mg ekstrak air kelopak bunga rosela.
- Dosis 2: 130 mg serbuk/200 g BB/2 mL setara dengan 37,46 mg ekstrak air kelopak bunga rosela.
- Dosis 3: 195 mg serbuk/200 g BB/2 mL setara dengan 56,19 mg ekstrak air kelopak bunga rosela.

Pemberian ekstrak bunga rosela dilakukan secara per oral sebanyak 2 mL. Tikus yang digunakan mempunyai berat badan rata-rata 250 g, oleh karena itu pemberian dosis secara per oral disesuaikan dengan berat badan tikus, misalnya tikus dengan berat badan 250 g maka dosis per oralnya adalah $(250/200) \times 2 \text{ mL} = 2,5 \text{ mL}$.

Dosis lovastatin

Dosis awal lovastatin yang disarankan adalah 20 mg (Mahley dan Bersot 2007). Rata-rata berat orang dewasa adalah 70 kg. Takaran konversi dosis untuk manusia dengan berat badan (BB) 70 kg pada tikus dengan BB 200 g adalah 0,018 (Imono dan Nurlaila 1989), sehingga didapatkan dosis untuk tikus 200 g yaitu: $0,018 \times (50/70) \times 20 \text{ mg} = 0,26 \text{ mg/200 g BB}$.

Lovastatin sebanyak 13 mg dilarutkan dengan akuades steril sampai volume 100 mL, kemudian diberikan secara per oral sebanyak 2 mL tiap kali pemberian. Tikus yang digunakan mempunyai berat badan rata-rata 250 g, oleh karena itu pemberian dosis secara per oral disesuaikan dengan berat badan tikus, misalnya tikus dengan berat badan 250 g maka dosis per oralnya adalah $(250/200) \times 2 \text{ mL} = 2,5 \text{ mL}$.

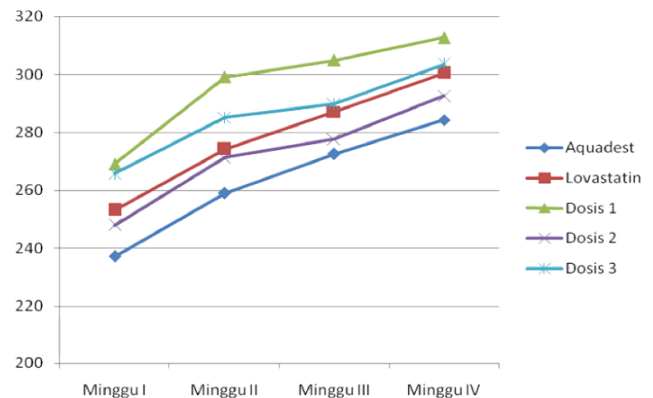
Analisis data

Data yang didapat dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-way ANOVA* untuk membandingkan perbedaan rerata lebih dari dua kelompok dengan derajat signifikansi $\alpha=0,05$. Uji *One-way ANOVA* kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian

Penelitian ini menggunakan tikus putih strain Sprague-Dawley jantan umur 3 bulan dengan berat badan ± 250 gram. Tikus-tikus tersebut dibagi dalam 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus putih. Kelompok I sebagai kelompok kontrol negatif (akuades), kelompok II sebagai kelompok kontrol positif (lovastatin), kelompok III diberi perlakuan dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 1 (65 mg/200 g BB/2 mL), kelompok IV diberi perlakuan dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 2 (130 mg/200 g BB/2 mL), dan kelompok V diberi perlakuan dengan ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 3 (195 mg/200 g BB/2 mL).



Gambar 1. Rerata berat badan tikus putih dari lima kelompok perlakuan

Kelima kelompok tikus putih diukur kadar kolesterol total darahnya sebelum (*pre-test*) dan sesudah diberi perlakuan selama 4 minggu (*post-test*), kemudian dicari perubahan kadar kolesterol total darah dengan cara mencari selisih antara kadar kolesterol sebelum (*pre-test*) dan sesudah perlakuan (*post-test*) (Tabel 1). Berat badan (BB) tikus putih diukur setiap minggu, mulai minggu pertama penelitian sampai minggu terakhir, sehingga didapatkan 4 kali pengukuran berat badan tikus putih (Tabel 2, Gambar 1). Kemudian dicari selisih dari setiap pengukuran berat badan tikus putih.

Data hasil pengukuran berat badan tikus putih setiap minggu dihitung selisihnya untuk melihat perubahan kenaikan berat badan tikus putih dari tiap kelompok perlakuan. Selisih 1 didapatkan dari pengurangan berat badan (BB) tikus pada minggu II dengan BB tikus minggu I, selisih 2 didapatkan dari pengurangan BB tikus minggu III dengan BB tikus minggu II, dan selisih 3 didapatkan dari pengurangan BB tikus IV dengan BB tikus III. Hasil rerata perubahan kenaikan berat badan tikus putih dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil uji normalitas data perubahan kadar kolesterol total darah tikus putih menunjukkan nilai probabilitas $p < 0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa populasi data terdistribusi tidak normal, dengan demikian perlu dilakukan proses transformasi data untuk menormalkan distribusi data yang tidak normal. Hasil tes normalitas pada data hasil transformasi (Trans-perubahan 1) yaitu kelompok akuades $p=0,191$, kelompok lovastatin $p=0,456$, kelompok dosis uji 1 $p=0,733$, kelompok dosis uji 2 $p=0,286$, dan kelompok dosis uji 3 $p=0,755$, dimana semua kelompok tersebut menunjukkan nilai $p > 0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa populasi data terdistribusi normal. Untuk uji-uji selanjutnya digunakan data perubahan kadar kolesterol yang telah ditransformasi (Trans-perubahan 1).

Hasil uji normalitas data selisih berat badan (BB) tikus putih, yaitu selisih 1 dan selisih 2, menunjukkan nilai probabilitas $p > 0,05$ yang dapat disimpulkan bahwa populasi data terdistribusi normal, sedangkan data selisih 3 menunjukkan $p < 0,05$ yang berarti data tidak terdistribusi normal. Oleh karena itu, dilakukan proses transformasi data untuk menormalkan distribusi data yang tidak normal. Hasil tes normalitas pada data hasil transformasi berturut-

turut untuk masing-masing kelompok: $p=0,108$, $p=0,321$, $p=0,136$, $p=0,708$, dan $p=0,932$, hasil ini menunjukkan nilai probabilitas $p>0,05$, sehingga dapat disimpulkan bahwa populasi data terdistribusi normal. Untuk uji-uji selanjutnya digunakan data selisih 3 yang telah ditransformasi (Trans-selisih 3) (Tabel 4).

Uji homogenitas

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui varian populasi homogen atau tidak. Nilai signifikansi lebih dari 0,05 berarti bahwa varian dari dua atau lebih kelompok data adalah homogen (Priyanto 2009).

Hasil uji homogenitas data trans-perubahan 1 menunjukkan nilai $p<0,05$, sehingga perlu dilakukan transformasi data dengan cara *cosines*. Hasil yang diperoleh menunjukkan data dengan nama Trans-perubahan 2 memiliki nilai $p=0,86$ ($p>0,05$) untuk uji homogenitas. Hasil tersebut dapat diasumsikan bahwa varian data bersifat homogen.

Hasil uji homogenitas data selisih berat badan (BB) tikus putih yaitu selisih 1, selisih 2, dan trans-selisih 3 menunjukkan nilai $p>0,05$. Hasil tersebut dapat diasumsikan bahwa varian data bersifat homogeny (Tabel 5).

Uji one-way ANOVA

Uji *One-way* ANOVA digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan rerata lebih dari dua kelompok sampel yang tidak berhubungan (Priyanto 2009). Hasil analisis statistik data perubahan kadar kolesterol total darah tikus putih dengan uji *One-way* ANOVA menunjukkan nilai $p>0,05$ yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan kadar kolesterol total darah tikus putih yang signifikan. Oleh karena tidak signifikan maka analisis statistik tidak dilanjutkan dengan uji *post-hoc*.

Analisis statistik data selisih berat badan (BB) tikus, yaitu selisih 1, selisih 2, dan trans-selisih 3, dengan uji *One-way* ANOVA menunjukkan nilai $p>0,05$ yang berarti bahwa tidak terdapat perbedaan selisih berat badan tikus putih yang signifikan. Oleh karena tidak signifikan maka analisis statistik tidak dilanjutkan dengan uji *post-hoc* (Tabel 6).

Tabel 1. Hasil pengukuran rerata perubahan kadar kolesterol total darah tikus putih

Kelompok perlakuan	Perubahan kadar kolesterol <i>Post-test</i> dan <i>Pre-test</i> (mg/dl)
Aquadest (K1)	6,02±8,4
Lovastatin (K2)	8,00±8,6
Dosis 1 (K3)	3,43±7,0
Dosis 2 (K4)	4,38±13,4
Dosis 3 (K5)	14,02±12,1

Keterangan Tabel 1-3: K1 = Kelompok kontrol negatif (akuades), K2 = kelompok kontrol positif (lovastatin) (0,26 mg/200 g BB/2 mL per oral), K3 = kelompok ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 1 (65 mg/200 g BB/2 mL per oral), K4 = kelompok ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 2 (130 mg/200 g BB/2 mL per oral), K5 = kelompok ekstrak air kelopak bunga rosela dosis 3 (195 mg/200 g BB/2 mL per oral).

Tabel 2. Hasil pengukuran rerata berat badan tikus putih

Kelompok Perlakuan	Rerata berat badan tikus putih (gram)			
	Minggu I	Minggu II	Minggu III	Minggu IV
Akuades (K1)	237,15	259,00	272,53	284,36
Lovastatin (K2)	253,25	274,18	287,10	300,42
Dosis 1 (K3)	269,05	299,13	304,90	312,72
Dosis 2 (K4)	247,98	271,38	277,66	292,65
Dosis 3 (K5)	265,83	285,18	289,85	303,50

Tabel 3. Hasil rerata perubahan kenaikan berat badan tikus putih

Kelompok perlakuan	Rata-rata selisih berat badan tikus (g)		
	Selisih 1	Selisih 2	Selisih 3
Akuades (K1)	21,85±7,7	13,53±7,1	11,83±11,2
Lovastatin (K2)	20,93±8,3	12,92±8,2	13,32±8,8
Dosis 1 (K3)	30,06±3,7	5,77±7,7	7,82±31,5
Dosis 2 (K4)	23,40±7,4	6,28±9,3	14,99±8,1
Dosis 3 (K5)	19,35±9,3	4,67±8,9	13,65±11,0

Tabel 4. Hasil uji normalitas

Kelompok perlakuan	Rata-rata selisih berat badan tikus (g)		
	Selisih 1	Selisih 2	Selisih 3
Akuades (K1)	0,713	0,998	0,995
Lovastatin (K2)	0,047	0,889	0,430
Dosis 1 (K3)	0,102	0,489	0,631
Dosis 2 (K4)	0,091	0,251	0,183
Dosis 3 (K5)	0,951	0,404	0,379

Tabel 5. Hasil uji homogenitas

Uji homogenitas	p
Trans-perubahan 1	0,013
Selisih 1	0,316
Selisih 2	0,940
Trans-selisih 3	0,431

Tabel 6. Hasil uji *One-way* Anova

Variabel Tergantung	p	Signifikansi
Trans-perubahan 2	0,327	Tidak signifikan
Selisih 1	0,154	Tidak signifikan
Selisih 2	0,214	Tidak signifikan
Trans-selisih 3	0,938	Tidak signifikan

Pembahasan

Hasil analisis data perubahan kadar kolesterol total darah tikus putih menunjukkan tidak terdapat perbedaan rerata kadar kolesterol darah tikus putih yang signifikan. Hasil analisis data selisih berat badan tikus, yaitu selisih 1, selisih 2, dan trans-selisih 3, juga menunjukkan hasil yang tidak signifikan. Kenyataan ini dapat terjadi karena beberapa faktor sebagai berikut.

Cara pengekstrasian yang kurang tepat

Kelopak bunga rosela berpotensi menurunkan kadar kolesterol total darah, karena memiliki beberapa komponen zat, yaitu vitamin C, niasin, pektin, flavonoid, dan polifenol, serta mengandung asam *hibiscin* yang diduga berperan sebagai antiobesitas. Dalam penelitian ini digunakan ekstrak air dari kelopak bunga rosela agar lebih mirip dengan cara penyajian kelopak bunga rosela yang umum di masyarakat, yaitu diseduh menjadi teh.

Tidak adanya efek yang diharapkan dari pemberian ekstrak air kelopak bunga rosela pada tikus yang diberi pakan tinggi kolesterol, yaitu terjadinya penurunan kadar kolesterol total darah dan penurunan kenaikan berat badan, diduga disebabkan karena cara pengekstrasian yang kurang tepat yang dapat menyebabkan zat-zat yang berpotensi sebagai antikolesterol dan antiobesitas tidak tersari dengan sempurna, akibatnya ekstrak air kelopak bunga rosela tidak mampu menurunkan kadar kolesterol total darah dan berat badan tikus putih secara signifikan.

Metabolisme dalam tubuh tikus yang berbeda

Menurut Ganong (2002), naik turunnya berat badan berhubungan dengan keseimbangan energi. Apabila jumlah kalori yang diperoleh dari makanan lebih kecil dari energi yang dikeluarkan, atau diistilahkan sebagai keseimbangan negatif, maka simpanan endogen akan digunakan, sehingga orang yang banyak makan, belum tentu lebih gemuk dari orang yang makan sedikit. Menurut Guyton dan Hall (1997), hal ini berkaitan dengan kelenjar gondok, apabila produksi hormon tiroid sangat meningkat maka hampir selalu menurunkan berat badan, namun efek tersebut tidak selalu terjadi, oleh karena hormon tiroid juga meningkatkan nafsu makan. Haryanti (1997) juga mengatakan bahwa penyerapan makanan dan kemungkinan adanya perbedaan yang sangat besar pada masing-masing individu mengenai respons tubuh terhadap makanan yang berlebih, berpengaruh pada ada tidaknya peningkatan berat badan.

Faktor stres

Tikus satu dengan tikus yang lain memiliki tingkat ketahanan terhadap stres yang berbeda. Penelitian ini dilakukan dalam waktu yang cukup lama, yaitu 4 minggu, sehingga pelbagai stres yang dialami tikus juga meningkat. Kondisi stres akan memacu produksi hormon epinefrin, norepinefrin, kortikotropin, dan glukokortikoid yang akan mengaktifkan hormon lipase trigliserida yang berperan dalam memecah trigliserida dan meningkatkan asam lemak bebas. Hormon yang dikeluarkan tubuh ketika stres dapat menjadi penyebab utama obesitas. Pada tikus yang sedang stres diketahui bahwa lemaknya meningkat dua kali lipat dibandingkan dengan tikus yang tidak stres. Artinya, hormon stres menyebabkan aktifnya gen dalam sel-sel lemak untuk memperbanyak diri dan berkembang.

Rerata kadar kolesterol total darah tikus dari kelompok 2 (lovastatin) adalah rerata terendah diantara seluruh kelompok. Hal ini terjadi karena lovastatin mempunyai efek menurunkan kadar kolesterol total darah. Lovastatin menurunkan kadar kolesterol total darah tikus yang diberi pakan tinggi kolesterol. Hal ini terjadi karena lovastatin menghambat enzim HMG CoA reduktase. Penghambatan

terhadap HMG CoA reduktase akan menghambat biosintesis kolesterol yang akhirnya akan menghambat kenaikan kadar kolesterol total darah (Katzung 1997).

KESIMPULAN

Ekstrak air kelopak bunga rosela tidak berpengaruh secara signifikan dalam menurunkan kadar kolesterol total darah dan kenaikan berat badan tikus putih.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin KA, Nagy MA. 2009. Effect of carnitine and herbal mixture extract on obesity induced by high fat diet in rats. *Diabetol Metab Syndr*: 1(1): 17.
- Anwar TB. 2004. Faktor risiko penyakit jantung koroner. *library.usu.ac.id*. [22 Oktober 2009].
- Azwar A. 1992. Antropologi kesehatan Indonesia Jilid I: Pengobatan tradisional. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Carjavall-zarrabal O, Waliszewski SM, Barradas-dermitz DM et al. 2005. The consumption of *Hibiscus sabdariffa* dried calyx ethanolic extract reduced lipid profile in rats. *Plant Foods for Hum Nutr* 60: 153-159.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. 2008. Laporan Hasil Pemeriksaan Faktor Risiko Penyakit Tidak Menular Tertentu Pegawai Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah. www.dinkesjatengprov.go.id. [22 November 2009].
- Fauziah M. 1999. Tanaman obat keluarga. Penerbit Swadaya, Jakarta.
- Ganong WF. 2002. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi ke-20. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Guyton AC, Hall JE. 1997. Buku ajar fisiologi kedokteran. Edisi ke-9. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Harindraputra R. 2009. Pengaruh Pemberian Seduhan Rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap Kadar Kolesterol Total Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). [Skripsi]. Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Haryanti. 1997. Pengaruh Infus Rimpang Temulawak terhadap Nafsu Makan dan Perubahan Berat Badan Tikus Putih. Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Hirunpanich V, Utaipat A, Noppawan PM et al. 2005. Antioxidant effect of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn (roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Bio Pharm Bull* 28(3): 481-484.
- Imono AD, Nurlaila. 1989. Obat tradisional dan fitoterapi uji toksikologi. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Katzung BG. 1997. Farmakologi dasar dan klinik. Edisi ke-6. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Mahley WR, Bersot TP. 2007. Terapi obat untuk hiperkolesterolemia dan dislipidemia. In: Goodman, Gilman (eds). *Dasar Farmakologi Terapi Volume 1*, Edisi ke-10. Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Mardiah, Sawarni H, Ashadi RW et al. 2009. Budi daya dan pengolahan rosela si merah segudang manfaat. Cetakan ke-1. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Maryani H, Kristiana L. 2005. Khasiat dan manfaat rosela. PT. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Maryanto, Fatimah. 2004. Pengaruh pemberian jambu biji (*Psidium guajava* L.) pada lipidemia serum tikus (Sprague-Dawley) hiperkolesterolemia. *Media Medika Indonesia* 39: 105-111.
- Morton JF. 1981. Atlas of medicinal plants of Middle America. CC Thomas Publishers, USA.
- Ngatidjan. 1991. Petunjuk laboratorium metode laboratorium dalam toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Oppel M. 2007. *Hibiscus* tea may have cholesterol-lowering effects. *Herbclip*. www.herbalgram.org. [11 Oktober 2009].
- Priyanto D. 2009. Mandiri belajar SPSS (*Statistic Product and Service Solution*) untuk analisis data dan uji statistik bagi mahasiswa dan umum, Cetakan ke-3. Mediakom, Yogyakarta.
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. Pemeliharaan, pembiakan, dan penggunaan hewan percobaan di daerah tropis. UI Press, Jakarta.

- Suyatna FD. 2007. Hipolipidemik. In: Sulistia G (ed). Farmakologi dan Terapi. Edisi ke-5. Bagian Farmakologi, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Wayan S. 2004. Pemanfaatan obat penurun panas oleh masyarakat Angkah, Tabanan Bali. Prosiding Seminar Nasional XXV Tumbuhan Obat Indonesia. Pokjanas, Tawangmangu.
- Wijayakusuma H. 2002. Tumbuhan berkhasiat obat: Rempah, rimpang dan umbi. Milenia Populer, Jakarta.
- York DA, Thomas S, Greenway FL. 2007. Effect of an herbal extract Number Ten (NT) on body weight in rats. Chin Med 2: 10.

Pengaruh berbagai jenis beras terhadap aktivitas antimikrobia pada angkak oleh *Monascus purpureus*

The effect of various rice varieties to antimicrobial activity of red mould rice by *Monascus purpureus*

FITRI SULISTYORINI, M.A.M. ANDRIANI, ROHULA UTAMI

Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 4 November 2010. Revisi disetujui: 25 Februari 2011.

Abstract. Sulistyorini F, Andriani M, Utami R. 2008. The effect of various rice varieties to antimicrobial activity of red mould rice by *Monascus purpureus*. *Biofarmasi* 9: 50-54. This research had been done at Food and Nutrient Laboratory and Manipulated of Process Laboratory, Agriculture Product Technology Department, Agriculture Faculty, Sebelas Maret University in Surakarta, started from May until September 2008. The aim of this research was to determine the antimicrobial activity of red mould rice from white rice, red rice and black rice. This research used a factorial experiment that arranged in a Completely Randomized Design (CRD) factorial with two experimental factors. The first factor was three levels of rice variety, i.e. white rice (B1), red rice (B2) and black rice (B3). The second factor was fourth levels of extract concentrations, i.e. 2.5% (K1), 5.0% (K2), 7.5% (K3) and 10% (K4). The observation variables included colonies total of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, with a plate count method. The result of this research showed that the interaction of rice variety of red mould rice and the extract concentration effected to *Pseudomonas aeruginosa* and not effected to *Escherichia coli*. The extract of red mould rice from black rice with 10% concentration extract, had the highest antimicrobial activity to *Pseudomonas aeruginosa*. The conclusion of this research was red mould rice had an antimicrobial activity. Red mould rice from black rice had an antimicrobial activity higher than red mould rice from red rice and red mould rice from white rice.

Keywords: Antimicrobia, *Escherichia coli*, *Monascus purpureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, red mould rice

PENDAHULUAN

Angkak merupakan salah satu produk fermentasi beras dengan menggunakan kapang *Monascus* sp. Pembuatan angkak untuk pertama kali dilakukan di Cina oleh Dinasti Ming yang berkuasa pada abad ke-14 hingga ke-17. Pada zaman tersebut, angkak digunakan sebagai pewarna alami makanan serta obat untuk melancarkan pencernaan dan sirkulasi darah (Ardiansyah 2005).

Angkak secara tradisional diproduksi dengan menggunakan substrat beras. Pada umumnya, angkak yang beredar di pasaran terdapat dalam bentuk beras utuh (Jennie et al. 1997). Berbagai varietas beras dapat digunakan untuk memproduksi angkak, namun beras pera yang memiliki kadar amilosa tinggi lebih cocok digunakan untuk memproduksi angkak daripada beras dengan amilosa rendah. Beras dengan kadar amilosa rendah, bersifat lengket atau lekat. Jika beras jenis ini digunakan dalam proses pembuatan angkak, kelekatan antar butiran beras akan menghalangi pertumbuhan kapang *Monascus* sp., sehingga pertumbuhan kapang tidak merata dan butiran beras tidak tertutup sempurna oleh miselia kapang (Winarno dan Titi 1994).

Kadar amilosa beras biasa (beras putih) pada umumnya sekitar 20%. Beras putih mendominasi pasar beras di Indonesia. Selain beras putih, terdapat jenis beras yang lain. Berdasarkan warnanya, beras dapat dibedakan menjadi beras putih, beras merah, dan beras hitam.

Menurut Surdi (2005), jika dibandingkan dengan beras putih, beras merah dan beras hitam terasa lebih kasar atau keras jika dimakan. Hal ini menunjukkan bahwa kedua beras tersebut bersifat pera, sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai substrat dalam memproduksi angkak.

Berbagai penelitian tentang angkak telah dilakukan, salah satunya mengenai manfaat angkak. Justiawan (1997) membuktikan bahwa angkak dapat menggantikan fungsi nitrit dalam pembuatan sosis, karena angkak mampu memperbaiki warna merah dari sosis serta dapat menghambat pertumbuhan bakteri perusak (*Bacillus stearothermophilus*), sehingga dapat memperpanjang umur simpan sosis. Dari hasil penelitian tersebut dapat diketahui bahwa angkak memiliki sifat antimikrobia, hal ini dibuktikan dengan adanya kemampuan angkak dalam menghambat pertumbuhan bakteri perusak pada sosis. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengkajian lebih lanjut mengenai aktivitas antimikrobia pada angkak. Dengan adanya pengujian aktivitas antimikrobia pada angkak dari berbagai jenis beras, diharapkan dapat diketahui efektivitas angkak sebagai antimikrobia pada bahan makanan.

Dalam penelitian ini, pengujian aktivitas antimikrobia pada angkak dilakukan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Kedua bakteri tersebut merupakan bakteri pembusuk dan bakteri patogen yang sering mengontaminasi daging, dimana angkak sering digunakan sebagai bahan tambahan pada produk-produk olahan daging.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimikrobia pada angkak yang terbuat dari berbagai jenis beras, yaitu beras putih, beras merah, dan beras hitam.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Rekayasa Proses dan Laboratorium Pangan dan Gizi, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta. Penelitian dilaksanakan mulai bulan Mei 2008 dengan percobaan pendahuluan dilaksanakan pada bulan April 2008.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu angkak yang diperoleh dari hasil percobaan pendahuluan dari hasil inokulasi nasi karon yang telah diinokulasi dengan *Monascus purpureus* koleksi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta. Beras yang digunakan berasal dari tiga jenis beras yaitu beras putih, beras merah, dan beras hitam, sedangkan untuk uji antimikrobia digunakan bakteri uji antara lain *Pseudomonas aeruginosa* yang mewakili jenis bakteri pembusuk, dan *Escherichia coli* yang mewakili jenis bakteri patogen. Semua bakteri yang digunakan berasal dari koleksi Universitas Setia Budi (USB) Surakarta. Media yang digunakan untuk mengembangbiakkan *M. purpureus* adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA), sedangkan media untuk mengembangbiakkan bakteri adalah *Nutrient Broth* (NB) dan *Nutrient Agar* (NA).

Alat-alat yang digunakan antara lain *encash*, *laminar air flow*, tabung reaksi, labu takar, pipet, autoklaf, oven, bunsen, erlenmeyer, gelas ukur, *aluminium foil*, cawan petri, kawat ose, *colony counter*, neraca analitik, kapas penyumbat, dan pengaduk.

Cara kerja

Produksi kapang

Biakan murni *M. purpureus* diperbanyak dengan memindahkan kultur ke beberapa tabung berisi media PDA miring dan diinkubasi selama 3-5 hari.

Pembuatan suspensi Monascus purpureus

Suspensi kapang *M. purpureus* dibuat dengan cara menambahkan 2 ml akuades steril ke dalam tiap-tiap tabung reaksi berisi biakan murni *M. purpureus* secara aseptik. Spora kapang *M. purpureus* selanjutnya dikikis dengan kawat ose steril secara aseptis.

Pembuatan angkak

Angkak dibuat dengan cara memasukkan 100 gram beras yang telah direndam selama 40 jam ke dalam Erlenmeyer, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah didinginkan hingga suhu sekitar 36°C, beras tersebut diinokulasi dengan 2 ml suspensi kapang *M. purpureus* untuk tiap erlenmeyer. Setelah itu, campuran tersebut diaduk hingga rata dan

diinkubasi pada suhu 27-32°C selama 30 hari. Angkak kemudian dikeringkan dengan menggunakan alat pengering pada suhu 45°C selama 15 jam. Angkak yang telah kering kemudian disimpan dalam botol kaca.

Pembuatan ekstrak angkak

Ekstrak angkak dibuat dengan cara melarutkan angkak ke dalam akuades steril, dengan berbagai konsentrasi (b/v) yaitu 2,5%; 5%; 7,5%; dan 10%. Tahap pembuatan larutan stok konsentrasi 10% dilakukan dengan menimbang 4 gram angkak, kemudian dilarutkan dalam 40 ml akuades steril. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak angkak berikutnya dilakukan sebagai berikut.

Konsentrasi 10%: 2,0 ml larutan stok

Konsentrasi 7,5%: 1,5 ml larutan stok+akuades steril 2 ml

Konsentrasi 5,0%: 1,0 ml larutan stok+akuades steril 2 ml

Konsentrasi 2,5%: 0,5 ml larutan stok+akuades steril 2 ml

Pembuatan suspensi bakteri

Metode yang digunakan untuk pengujian aktivitas antimikrobia adalah metode *plate count*. Pada awalnya, kedua bakteri uji, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*, masing-masing ditumbuhkan pada media *Nutrient Broth* (NB), dengan cara mengikis koloni *P. aeruginosa* maupun *E. coli* dari biakan agar miring dengan menggunakan kawat ose secara aseptis. Biakan tersebut selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Kemudian dilakukan pemilihan biakan bakteri dengan jumlah koloni 250-300 cfu dengan cara pengenceran. Biakan bakteri pada media NB diencerkan dengan menggunakan akuades steril hingga pengenceran 1:1.000.000, dan dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri mulai dari pengenceran 1:10.000 hingga penenceran 1:1.000.000, dengan menumbuhkan 1 ml suspensi bakteri tersebut ke dalam media NA pada cawan petri. Pengenceran suspensi bakteri yang memiliki jumlah koloni 250-300 cfu selanjutnya digunakan untuk pengujian antimikrobia angkak.

Uji aktivitas antimikrobia

Masing-masing ekstrak angkak dengan berbagai konsentrasi, ditambah dengan 2 ml suspensi bakteri terpilih dan digojok hingga homogen. Campuran antara ekstrak angkak dan suspensi bakteri tersebut kemudian diambil 1 ml untuk ditumbuhkan dalam cawan petri dengan media *Nutrient Agar* (NA), dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Setelah diinkubasi, dilakukan penghitungan jumlah bakteri dengan bantuan *colony counter*. Sebagai kontrol, digunakan bakteri dengan pengenceran yang sama, kemudian ditumbuhkan pada media NA tanpa penambahan ekstrak angkak.

Analisis data

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap Faktorial dengan dua faktor yaitu jenis beras sebagai faktor pertama dan konsentrasi ekstrak angkak sebagai faktor kedua, masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Analisis data yang digunakan adalah analisis ragam dengan tingkat signifikansi $\alpha=0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh jenis beras dan konsentrasi ekstrak angkak terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Pada proses fermentasi dalam pembuatan angkak, selain menghasilkan sel, *M. purpureus* juga menghasilkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *M. purpureus* dikelompokkan menjadi dua, yaitu metabolit sekunder berupa pigmen dan non-pigmen. Metabolit sekunder non-pigmen diantaranya berupa *citricin* (*nephrotoxic agent*), *lovastatin* (*anticolesterol agent*), dan *monascidin* (*antimicrobial agent*). *Monascidin* merupakan metabolit sekunder non-pigmen yang dapat berfungsi sebagai senyawa antimikrobia. Pembentukan metabolit non-pigmen seperti *monascidin* dan pembentukan pigmen oleh *M. purpureus* berlangsung secara bersama-sama. Apabila salah satu dari kedua metabolit tersebut tidak ada, atau proses pembentukannya terganggu, maka *M. purpureus* akan cenderung membentuk metabolit yang lain. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Milanda et al. (2007) yang menyatakan bahwa *M. purpureus* albino (tidak berpigmen) yang merupakan hasil mutasi dari *M. purpureus* yang diisolasi dari Sungai Cikapundung Bandung, mampu menghasilkan metabolit sekunder *monascidin* lebih tinggi daripada strain *M. purpureus* yang berpigmen.

Perbedaan jenis beras dari angkak yang digunakan, memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* (Tabel 1, Gambar 1). Dari hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa angkak yang terbuat dari beras hitam memiliki aktivitas antimikrobia yang lebih besar daripada angkak yang terbuat dari beras merah dan angkak yang terbuat dari beras putih. Beras hitam mengandung pigmen alami yaitu *antosianin* dengan intensitas tinggi. Adanya pigmen tersebut diduga dapat menghambat pertumbuhan *M. purpureus*. Antosianin banyak dijumpai pada buah, sayur, bunga, dan serealia. Antosianin memiliki beberapa fungsi, diantaranya merangsang pertumbuhan biji, memberikan perlindungan terhadap efek iradiasi sinar UV, memproduksi antivirus, serta memiliki aktivitas antimikrobia. Sifat antimikrobia yang dimiliki oleh *antosianin* inilah yang diduga dapat menghambat pertumbuhan *M. purpureus*. Keberadaan pigmen tersebut menyebabkan pembentukan metabolit sekunder berupa pigmen merah dari *M. purpureus* menjadi terhambat, sehingga pada saat proses fermentasi dalam pembuatan angkak, nutrisi yang terkandung dalam beras hitam lebih difokuskan untuk pembentukan metabolit sekunder non-pigmen seperti *monascidin*. Senyawa *monascidin* yang dihasilkan pada saat proses fermentasi angkak beras hitam, akan berinteraksi dengan *antosianin* yang terdapat pada beras hitam. Adanya interaksi positif dari kedua senyawa yang bersifat antimikrobia tersebut dapat menyebabkan aktivitas antimikrobia pada angkak dari beras hitam meningkat.

Angkak yang terbuat dari beras merah dan beras putih juga memiliki aktivitas antimikrobia terhadap *P. aeruginosa* meskipun aktivitas penghambatannya tidak setajam penghambatan pada angkak yang terbuat dari beras hitam. Pada saat proses fermentasi dalam pembuatan angkak, nutrisi yang terdapat pada beras putih digunakan

oleh *M. purpureus* untuk pertumbuhan dan pembentukan pigmen. Pembentukan pigmen merah dari *M. purpureus* pada beras putih dapat berjalan dengan baik karena beras putih tidak mengandung pigmen alami, sehingga pembentukan metabolit sekunder lebih condong ke arah pembentukan pigmen. Hal ini dapat menyebabkan pembentukan metabolit sekunder non-pigmen, seperti *monascidin*, menjadi berkurang intensitasnya. Pada angkak yang terbuat dari beras merah, meskipun pada awalnya beras tersebut telah memiliki pigmen alami yaitu *antosianin*, pigmen tersebut memiliki intensitas yang kecil, sehingga sifat antimikrobia yang dimiliki oleh beras merah juga rendah. Pada saat fermentasi dalam proses pembuatan angkak, sifat antimikrobia dari antosianin pada beras merah tidak memberikan pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan *M. purpureus*. Hal ini menyebabkan pembentukan metabolit sekunder, baik pigmen maupun non-pigmen dari *M. purpureus* dapat berjalan secara bersama-sama meskipun keduanya berjalan lambat.

Aktivitas penghambatan pembentukan pigmen merah oleh *M. purpureus* pada angkak yang terbuat dari beras hitam dan beras merah, terlihat pada saat proses fermentasi dan pada produk akhir dari angkak yang dihasilkan. Pada saat proses fermentasi, angkak yang terbuat dari beras putih, butiran-butiran berasnya dapat tertutup oleh miselia kapang *M. purpureus* dengan sempurna, sehingga warnanya terlihat merah pekat, sedangkan angkak dari beras merah dan beras hitam, butiran-butiran berasnya tidak dapat tertutup sempurna oleh miselia kapang. Hal ini bukan disebabkan karena miselia kapang terhalang oleh kelekatan beras, tetapi karena keduanya bersifat pera, namun karena beras merah dan beras hitam telah mengandung pigmen alami yang dapat menghambat pembentukan pigmen oleh *M. purpureus*. Pigmen *M. purpureus* terakumulasi pada miselia, sedangkan senyawa *monascidin* akan bercampur dengan kultur media. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak miselia yang terdapat pada beras, kandungan pigmennya juga akan semakin tinggi. Produk akhir dari angkak yang telah dikeringkan juga tidak berbeda dengan angkak yang masih difermentasi. Angkak putih memiliki intensitas warna merah yang lebih tinggi daripada angkak dari jenis beras yang lain.

Selain jenis beras, faktor kedua yang digunakan sebagai parameter dalam pengujian aktivitas antimikrobia pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak angkak. Variasi konsentrasi ekstrak angkak yang digunakan pada penelitian ini yaitu 2,5%; 5%; 7,5%; dan 10%. Dari variasi konsentrasi tersebut diharapkan semakin tinggi konsentrasi maka aktivitas antimikrobianya juga semakin tinggi.

Dari hasil analisis ragam menggunakan rancangan acak lengkap faktorial, dapat diketahui bahwa variasi konsentrasi ekstrak angkak berpengaruh terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak angkak yang ditambahkan, kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* juga semakin tinggi. Hal ini ditunjukkan dengan semakin berkurangnya jumlah koloni bakteri seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak angkak yang digunakan. Selain itu, interaksi dari kedua faktor yang digunakan yaitu jenis beras dan variasi konsentrasi juga berpengaruh

terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, sehingga dapat disimpulkan bahwa angkak yang terbuat dari beras hitam dengan konsentrasi 10% merupakan angkak yang memiliki aktivitas antimikrobia terbaik dari sampel-sampel yang digunakan.

Pengaruh jenis beras dan konsentrasi ekstrak angkak terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*

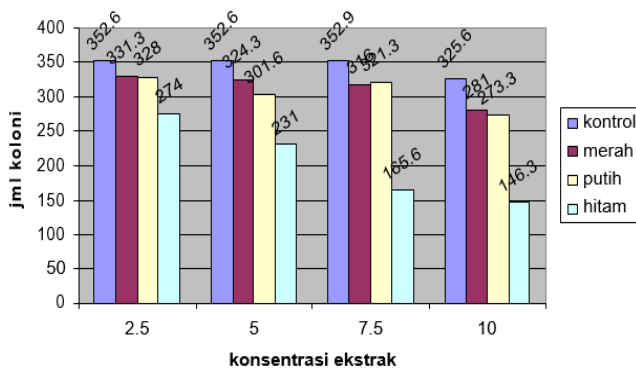
Penambahan ekstrak angkak pada media pertumbuhan *E. coli* dapat menghambat pertumbuhan bakteri tersebut. Namun, perbedaan jenis beras dari angkak yang digunakan dan variasi konsentrasi ekstrak angkak tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *E. coli* (Tabel 2, Gambar 2).

Berdasarkan hasil analisis ragam, interaksi dari faktor perbedaan jenis beras dari angkak dan variasi konsentrasi ekstrak angkak juga tidak memberikan pengaruh yang berbeda. Hal ini diduga karena peptidoglikan pada dinding sel *E. coli* kurang dapat merespons perbedaan jenis angkak dan variasi konsentrasi yang digunakan meskipun peptidoglikan tersebut cukup sensitif terhadap senyawa

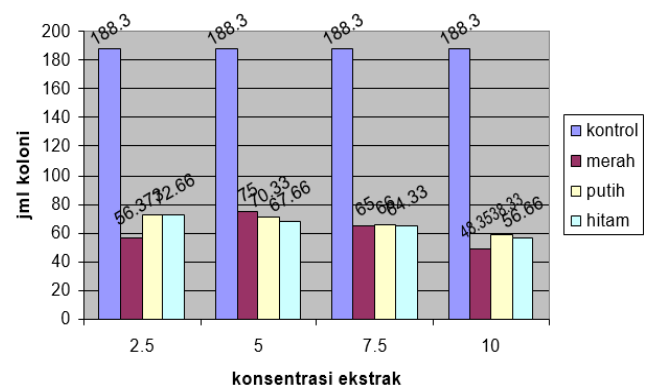
antimikrobia dari angkak. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa senyawa antimikrobia dari angkak efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan *E. coli* meskipun dengan dosis yang rendah, karena dengan penggunaan ekstrak angkak dari jenis beras yang memiliki kandungan senyawa antimikrobia rendah dan konsentrasi rendah pun telah mampu menurunkan jumlah koloni bakteri *E. coli*.

Mekanisme penghambatan senyawa antimikrobia dari ekstrak angkak terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*

Berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan dua bakteri uji, yaitu *P. aeruginosa* dan *E. coli*, dapat diketahui bahwa ekstrak angkak memiliki sifat antimikrobia terhadap kedua bakteri tersebut (Tabel 3). Penambahan ekstrak angkak pada media pertumbuhan bakteri memberikan pengaruh terhadap laju pertumbuhan bakteri. Jumlah bakteri yang tumbuh dapat dihambat.



Gambar 1. Pengaruh jenis beras serta konsentrasi ekstrak angkak terhadap jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 2. Pengaruh jenis beras serta konsentrasi ekstrak angkak terhadap jumlah koloni *Escherichia coli*

Tabel 1. Pengaruh ekstrak angkak dari berbagai jenis beras terhadap jumlah bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Jenis beras	Konsentrasi ekstrak angkak (%)	Konsentrasi			Rerata
		U1	U2	U3	
Putih	2,5	341	316	327	328,00
	5,0	336	268	301	301,60
	7,5	296	364	304	321,30
	10,0	340	236	244	273,30
Merah	2,5	366	321	307	331,30
	5,0	298	311	364	324,30
	7,5	302	278	368	316,00
	10,0	300	264	280	281,00
Hitam	2,5	324	304	292	274,00
	5,0	236	248	209	231,00
	7,5	134	196	167	165,60
	10,0	114	149	176	146,30
Kontrol		330	351	377	352,60

Tabel 2. Pengaruh ekstrak angkak dari berbagai jenis beras terhadap jumlah bakteri *Escherichia coli*

Jenis beras	Konsentrasi ekstrak angkak (%)	Konsentrasi			Rerata
		U1	U2	U3	
Putih	2,5	76	62	81	73,00
	5,0	91	73	47	70,33
	7,5	63	77	58	66,00
	10,0	58	59	58	58,33
Merah	2,5	37	77	56	56,20
	5,0	55	81	89	75,00
	7,5	69	72	54	65,00
	10,0	40	57	48	48,33
Hitam	2,5	88	58	72	72,66
	5,0	53	55	95	67,66
	7,5	75	56	62	64,33
	10,0	39	58	73	56,66
Kontrol		172	212	181	188,33

Senyawa pada angkak yang berfungsi sebagai agen antimikrobia adalah *monascidin*. *Monascidin* merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *M. purpureus* selama proses fermentasi dalam pembuatan angkak. Menurut Justiwawan (1997), *monascidin* diduga menghambat sintesis peptidoglikan dari dinding sel bakteri. Peptidoglikan adalah molekul yang sangat besar, molekul yang meliputi seluruh sel, terbuat dari N-asetil glukosamin dan asam N-asetil muramat. Peptidoglikan pada dinding sel bakteri tersebut berfungsi menyediakan komponen struktural yang kaku dan kuat yang dapat menahan tekanan osmosis yang tinggi yang disebabkan oleh kadar ion organik dalam sel. Tanpa adanya peptidoglikan pada dinding sel bakteri, dalam kondisi lingkungan yang normal, bakteri akan menyerap air dan menyebabkan sel bakteri pecah, hal ini menyebabkan ketidakstabilan pada sel bakteri, sehingga bakteri akan mati (Pelczar 1986).

Prinsip kerja dari angkak sebagai senyawa antimikrobia sama dengan prinsip kerja antibiotik pada umumnya. Senyawa antimikrobia tersebut menyerang dinding sel dengan cara menghambat sintesis peptidoglikan, hal ini dapat mematikan bakteri tanpa membahayakan inangnya. Peptidoglikan pada dinding sel bakteri gram positif berbeda dengan peptidoglikan pada bakteri gram negatif. Bakteri gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri gram negatif, sehingga bakteri gram negatif lebih peka terhadap senyawa antimikrobia.

Pseudomonas aeruginosa tergolong dalam bakteri gram negatif dan merupakan bakteri pembusuk yang sering ditemukan pada makanan, sedangkan *E. coli* juga tergolong dalam bakteri gram negatif dan merupakan bakteri patogen yang sering mengontaminasi makanan. Kedua bakteri tersebut sama-sama memiliki lapisan peptidoglikan yang tipis dan kurang peka terhadap senyawa antimikrobia. Meskipun demikian, penambahan ekstrak angkak dapat menghambat pertumbuhan kedua bakteri ini.

Tabel 3. Persentase penurunan jumlah bakteri dengan penambahan ekstrak angkak pada media pertumbuhan bakteri

Angkak	Konsentrasi ekstrak	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)	<i>Escherichia coli</i> (%)
Angkak beras putih	2,5%	6,976	61,238
	5,0%	14,463	62,655
	7,5%	8,876	64,955
	10%	22,490	69,027
Angkak beras merah	2,5%	6,041	70,158
	5,0%	8,026	60,176
	7,5%	10,380	65,486
	10%	20,306	74,337
Angkak beras hitam	2,5%	22,291	61,418
	5,0%	34,486	64,073
	7,5%	53,034	65,841
	10%	58,508	69,914

Apabila dibandingkan, persentase penurunan jumlah bakteri pada *E. coli* lebih tinggi daripada *P. aeruginosa*. Persentase penurunan jumlah bakteri pada *P. aeruginosa* berkisar antara 6-59%, sedangkan pada *E. coli* berkisar antara 60-75%. Perbedaan kepekaan terhadap senyawa antimikrobia tersebut dapat disebabkan karena perbedaan karakter dari kedua bakteri tersebut. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan jenis bakteri yang memiliki tingkat kepekaan yang rendah terhadap senyawa antibiotik, hal ini diduga karena permeabilitas dinding sel yang rendah, sehingga senyawa antibiotik tidak dapat leluasa menembus dinding sel untuk menghambat sintesis peptidoglikan bakteri tersebut. Hal inilah yang menyebabkan *Pseudomonas* lebih tidak peka terhadap senyawa antimikrobia ekstrak angkak daripada *E. coli*.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut. Angkak yang terbuat dari berbagai jenis beras memiliki aktivitas antimikrobia terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*, hal ini dibuktikan dengan adanya penurunan jumlah bakteri pada sampel yang media pertumbuhannya ditambahkan dengan ekstrak angkak. Interaksi antara jenis beras yang digunakan untuk membuat angkak dan variasi konsentrasi ekstrak angkak berpengaruh terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa*, namun tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan *E. coli*. Angkak yang terbuat dari beras hitam memiliki aktivitas antimikrobia paling tinggi daripada angkak yang terbuat dari beras merah dan beras putih.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah. 2005. Minum angkak menyehatkan. www.journal.agric.food.chem.com.
- Jenie BSL, Mitrajanty KD, Fardiaz S. 1997. Produksi konsentrat dan bubuk pigmen angkak dari *Monascus purpureus* serta stabilitasnya selama penyimpanan. Buletin Teknologi dan Industri Pangan 7(2): 39-46.
- Justiwawan RM. 1997. Pemanfaatan pigmen angkak untuk substitusi nitrit dalam pembuatan sosis daging sapi dan pengaruhnya terhadap *Bacillus stearothermophilus*. [Skripsi]. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Milanda T, Wibowo MS, Gusdinar T et al. 2007. Mutation and characterization of an albino mutant of *Monascus* sp. isolated from the Cikapundung River, Bandung. Microbiology Indonesia 1 (1): 19-22.
- Pelczar MJ. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi. UI Press, Jakarta.
- Surdi D. 2005. Potensi beras merah untuk peningkatan mutu pangan. Jurnal Litbang Pertanian 24 (3): 93-100.
- Winarno FG, Titi SR. 1994. Bahan tambahan untuk makanan dan kontaminan. Pustaka Sinar Harapan, Jakarta.

Pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (*Punica granatum*) terhadap jumlah dan jenis leukosit pada tikus putih yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel

The effect of red pomegranate (*Punica ganatum*) peel extract on leukocyte number and type in rats exposed with mobile phone electromagnetic radiation

MULKI RAKHMAWATI, ISNA QADRIYATI, LILIK WIJAYANTI

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

Manuskrip diterima: 4 Agustus 2011. Revisi disetujui: 29 Agustus 2011.

Abstract. *Rakhmawati M, Qadriyati I, Wijayanti L. 2011. The effect of red pomegranate (Punica granatum) peel extract on leukocyte number and type in rats exposed with mobile phone electromagnetic radiation. Biofarmasi 9: 55-61.* This research aimed to examine the effect of red pomegranate (*Punica granatum*) peel extract on leukocyte number and type in rats exposed with mobile phone electromagnetic radiation. This study was a laboratory experimental post-test only control group design. The subjects used were 32 male rats, divided into 4 groups: (i) control group, (ii) mobile phone electromagnetic radiation-exposed group for 4 hour/day for 14 days, (iii) mobile phone electromagnetic radiation-exposed group for 4 hour/ day for 14 days with red pomegranate peel extract 50 mg/kg weight body in pre and during exposed, and (iv) mobile phone electromagnetic radiation-exposed group for 4 hour/day for 14 days with red pomegranate peel extract 50 mg/kg body weight pre, during and post-exposed. After 41 days, blood was collected in a clean tube with EDTA from orbital sinus of rats. Blood was used for leukocyte number and type in Pathology Clinic Laboratory, Faculty of Medicine, Sebelas Maret University. The data obtained were statistically analyzed with independent t-test by using SPSS Program for Microsoft Windows release 16.0 with a significance level at $p < 0.05$. The results showed that red pomegranate peel extract decrease the leukocyte number than only exposed to mobile phone electromagnetic radiation group. The treatment of red pomegranate peel extract decreased for eosinophil, lymphocyte and monocyte, while for neutrophil, the treatment of red pomegranate peel extract showed increase than only exposed with mobile phone electromagnetic radiation group. Statistical analysis with independent t-test showed that the result was significant between group 1 and 3, and between group 2 and 3 of leukocyte number, but no significant for other groups. Meanwhile, the result of independent t-test showed no significant between all groups of the type of leukocyte. The experiment result showed that red pomegranate peel extract can significantly decrease the leukocyte number in rats exposed with mobile phone electromagnetic radiation ($p < 0.05$), but no significant for different count ($p > 0.05$).

Keywords: Leukocyte number, leukocyte type, mobile phone electromagnetic radiation, *Punica ganatum*, red pomegranate peel

PENDAHULUAN

Penggunaan ponsel pada beberapa tahun terakhir meningkat sangat pesat. Suatu studi yang telah dilakukan oleh lembaga penelitian *Research on Asia Group* (ROA) mengungkapkan perkembangan pasar telepon seluler di Indonesia yang terus tumbuh pesat. Disebutkan juga pengguna telepon seluler di Indonesia tercatat sebanyak 68 juta pada akhir tahun 2006 dan akan tumbuh menjadi 94,7 juta pada tahun 2007. Pada tahun 2010, angka pengguna telepon seluler di Indonesia pun diprediksikan mencapai angka 133 juta orang. Dengan kata lain, sekitar separuh dari seluruh populasi negeri ini yang diperkirakan mencapai 250 juta jiwa, merupakan pengguna telepon seluler. Dengan demikian, Indonesia pun akan menempati peringkat ketiga pasar telepon seluler terbesar di Asia setelah Cina dan India (Mahardika 2009).

Di Afrika, Eropa, Timur Tengah, dan Asia, *provider* ponsel memakai frekuensi 900 MHz dan 1800 MHz. Hanya sedikit operator yang memakai frekuensi DCS-1800

dan GSM-1800. GSM 900 MHz dipakai secara lebih luas di berbagai daerah (Rappaport 2002).

Peningkatan jumlah pengguna ponsel membuat banyak orang terpapar oleh radiasi gelombang elektromagnetik *radiofrequency* (RF). Fenomena tersebut menimbulkan pertanyaan terkait efek biologis dan konsekuensi kesehatan, terutama pada pemaparan dalam jangka waktu yang panjang. Saat ini, hubungan antara risiko kanker dan pemaparan radiasi gelombang elektromagnetik *radiofrequency* (RF) terus berlanjut menjadi perdebatan (Maschevich et al. 2003) Efek gelombang elektromagnetik tergantung jenis, frekuensi, energi, dan durasi paparan (Balmori 2005). Energi yang ditimbulkan oleh radiasi elektromagnetik ponsel secara kuantitas relatif kecil, namun apabila jarak antara ponsel dengan kepala diperhitungkan maka dampak radiasi elektromagnetik yang dipancarkan oleh ponsel tidak boleh diabaikan. Hal ini disebabkan intensitas radiasi elektromagnetik yang diterima oleh materi akan berbanding terbalik dengan kuadrat jarak, artinya semakin dekat dengan sumber radiasi (ponsel) akan semakin besar radiasi yang diterima

(Wardhana 2000). Hasil penelitian menunjukkan adanya hubungan antara paparan gelombang elektromagnetik yang berasal dari peralatan listrik, seperti televisi, monitor, komputer, *microwave oven*, dan telepon seluler dengan timbulnya kanker dan leukemia (Athena dan Sujur 2000).

Liboh et al. (1984) dalam Mansyur (1998) pada penelitiannya melihat adanya peningkatan sintesis DNA pada kultur fibroblas manusia yang terpapar gelombang elektromagnetik. Hasil penelitian Cadossi et al. (1992) dalam Mansyur (1998) menunjukkan adanya peningkatan proliferasi limfosit, hal ini diduga selain sejalan dengan peningkatan sintesis DNA, dan apabila tidak terkendali akan mengarah pada keganasan.

Untuk memperlambat proses perusakan, diperlukan antioksidan tambahan dari luar tubuh. Namun, penggunaan antioksidan sintetik dewasa ini mulai mendapat perhatian serius karena terdapat antioksidan sintetik yang bersifat merugikan. Oleh karena itu, pengembangan antioksidan yang berasal dari alam, yang relatif lebih mudah didapat dan aman, tengah digalakkan saat ini (Rahman 2007).

Salah satu sumber antioksidan alami yang banyak diteliti adalah buah delima merah (*Punica granatum*). Buah delima merah diketahui mengandung senyawa polifenol yang berkhasiat sebagai antioksidan (Yasoubi et al. 2007). Bagian pohon delima merah, seperti buah, kulit, dan akar, mempunyai rasa yang sepat. Rasa sepat tersebut merupakan tanda bahwa di dalam bagian tanaman tersebut mengandung tanin yang merupakan senyawa polifenol (Wiryowidagdo 2007).

Hasil penelitian yang pernah dilakukan oleh Lansky dan Newman (2007) tentang kandungan senyawa kimia pada buah delima merah diantaranya meliputi *quercetin*, *kaempferol*, *luteolin*, dan derivat-derivatnya, salah satu atau semuanya. Kandungan polifenol delima merah terdiri dari dua komponen, yaitu antosianin (*delphinidin*, *cyanidin*, dan *pelargonidin*) yang memberikan kulit buah dan daging buah berwarna merah, serta tanin yang larut air seperti *punicalagin*, *pedunculagin*, *punicalin*, *gallagic*, dan *asam ellagic ester* dari glukosa, yang menyumbangkan 92% sifat antioksidan. Kandungan tanin yang berfungsi sebagai antioksidan banyak terdapat pada kulit buah yaitu sekitar 26% (Ferlina 2009).

Ekstrak buah delima merah terbukti secara *in vitro* memiliki efek antioksidan yang kuat dan dapat bersifat kemopreventif dan kemoterapis pada sel kanker prostat yang diuji dengan sifat antiproliferatif dan pro-apoptosis (Malik et al. 2005).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah terhadap jumlah dan jenis leukosit pada tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar dengan gelombang elektromagnetik 900 MHz.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

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

Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan meliputi timbangan dan wadah untuk menimbang berat badan tikus, kandang tikus berbentuk kotak (60x30x30 cm³) yang dilengkapi dengan tempat pakan dan minum, ponsel 900 MHz 3 buah, tabung mikropipiler berukuran 1,5 ml, tabung reaksi untuk menampung sampel darah, rak tabung reaksi, pipet, mikroskop, bilik hitung *Improved Neuber*, sonde lambung, *object glass*, dan *cover glass*.

Sementara itu, bahan-bahan yang digunakan yaitu makanan dan minuman hewan percobaan (*pellet* dan air PAM), ekstrak buah delima merah, EDTA, larutan Turk, larutan Giemsa, metil alkohol, akuades.

Jenis penelitian

Penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental laboratorik (Arief 2004).

Subjek penelitian

Subjek penelitian adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dengan umur kurang lebih 2 bulan, jenis kelamin jantan, dan berat ± 200 gram yang dikembangkan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Yogyakarta.

Teknik sampling

Pengelompokan sampel dilakukan dengan teknik sampel *simple random sampling*. Setiap subjek penelitian diberi nomor urut terlebih dahulu kemudian ditulis pada secarik kertas dan dimasukkan ke dalam kotak untuk dikocok. Kemudian diambil satu per satu kertas itu sejumlah ukuran sampel yang dikehendaki tanpa dimasukkan kembali kertas yang telah terambil. Setiap subjek yang nomor urutnya terambil menjadi anggota kelompok sampel (Arief 2004). Sampel dibagi menjadi empat kelompok secara random. Besar sampel tiap kelompok dihitung dengan rumus Federer seperti yang ditulis oleh Sastrosupadi (Wiryawan dan Wahyuniari 2009).

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

$$(n-1)(4-1) > 15$$

$$3n > 18$$

$$n > 6$$

Keterangan:

n = jumlah sampel tiap kelompok

t = jumlah kelompok

Berdasarkan perhitungan tersebut maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 6 ekor tikus putih untuk setiap kelompok. Oleh karena itu, dalam penelitian ini digunakan 8 tikus dalam tiap kelompok, sehingga besar sampel yang digunakan adalah 32 ekor tikus.

Penelitian ini menggunakan rancangan *The Post-test Only Control Group Design* (Arief 2004).

Cara kerja

Rancangan percobaan

Perlakuan ekstrak kulit buah delima merah pada masing-masing kelompok hewan uji sebagai berikut: (i) K = Kelompok kontrol, tanpa diberi ekstrak kulit buah delima merah maupun paparan gelombang elektromagnetik ponsel. (ii) P1 = Kelompok perlakuan I, dipapar dengan gelombang elektromagnetik ponsel selama 4 jam setiap hari pada pukul 7.00 sampai 11.00 selama 14 hari. (iii) P2 = Kelompok perlakuan II, diberi ekstrak kulit buah delima merah secara per oral 50 mg/kg BB tikus/hari selama 10 hari sebelum dan selama pemaparan gelombang elektromagnetik. Gelombang elektromagnetik dipaparkan pada hari ke-11 sampai hari ke-24 selama 4 jam setiap hari pada pukul 7.00 sampai 11.00. (iv) P3 = Kelompok perlakuan III, diberi ekstrak kulit buah delima merah secara per oral 50 mg/kg BB tikus/hari selama 10 hari sebelum pemaparan, selama pemaparan, dan 10 hari sesudah pemaparan gelombang elektromagnetik. Paparan gelombang elektromagnetik ponsel diberikan mulai hari ke-11 sampai hari ke-24 selama 4 jam setiap hari pada pukul 7.00 sampai 11.00.

Persiapan percobaan

Sampel adalah tikus putih galur Wistar dengan umur kurang lebih 2 bulan jenis kelamin jantan dan berat ± 200 gram. Kemudian tikus diadaptasikan di Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret Surakarta selama 7 hari dan dilakukan pengelompokan dengan teknik *simple random sampling*. Setiap subjek penelitian diberi nomor urut terlebih dahulu kemudian ditulis pada secarik kertas dan dimasukkan ke dalam kotak untuk dikocok. Kemudian diambil satu per satu kertas tersebut sejumlah ukuran sampel yang dikehendaki tanpa dimasukkan kembali kertas yang telah terambil. Setiap subjek yang nomor urutnya terambil menjadi anggota kelompok sampel (Arief 2004). Sampel dikelompokkan menjadi 4 kelompok. Tiap kelompok berjumlah 8 ekor. Pada hari pertama dilakukan penimbangan dan penandaan pada tikus.

Ekstraksi kulit buah delima merah dilakukan di LPPT UGM Yogyakarta dengan menggunakan metode ekstraksi etanol dengan cara maserasi. Kulit buah delima merah halus dimasukkan ke dalam sebuah bejana kemudian ditambahkan etanol 90%, ditutup rapat, dan dibiarkan selama 3 hari, terlindung dari cahaya matahari sambil diaduk sesekali setiap hari. Ekstrak etanol cair sampel tersebut dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat etanol (Darmawan 2004). Bentuk akhir ekstrak kulit buah delima merah adalah pasta atau semisolid. Dosis yang diberikan sebesar 50 mg/kg BB tikus/hari (Toklu et al. 2009). Apabila setiap tikus mempunyai berat 200 gram maka dosis ekstrak kulit buah delima merah yang diberikan sebesar:

$$\text{Dosis 1 ekor tikus} = \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ grBB}} \times 200 \text{ gram BB} = 10 \text{ mg}$$

Volume cairan maksimal yang dapat diberikan secara per oral pada tikus adalah 5 ml/100 g BB tikus (Ngatijan 1991), disarankan takaran pemberian tidak melebihi setengah kali volume maksimalnya. Oleh karena itu dilakukan pengenceran ekstrak dengan rincian 1 gram ekstrak dilarutkan dalam 100 ml.

$$\begin{aligned} \text{Pengenceran ekstrak} &= \frac{1 \text{ gr ekstrak}}{100 \text{ ml larutan}} = \frac{1000 \text{ mg ekstrak}}{100 \text{ ml larutan}} \\ &= 10 \text{ mg ekstrak dalam 1 ml larutan} \end{aligned}$$

Apabila dosis untuk tiap tikus adalah 10 mg maka volume ekstrak yang diberikan adalah 1 ml tiap tikus. Berdasarkan perhitungan dosis, jumlah sampel, dan lama pemberian maka ekstrak kulit buah delima merah yang dibutuhkan selama penelitian adalah:

$$\begin{aligned} &= (10 \text{ mg} \times 8 \text{ tikus} \times 35 \text{ hari}) + (10 \text{ mg} \times 8 \text{ tikus} \times 25 \text{ hari}) \\ &= 4800 \text{ mg} \end{aligned}$$

Bahan dasar yang digunakan untuk mendapatkan 4800 mg ekstrak kulit buah delima adalah buah delima sebanyak 3 kg. Penyimpanan ekstrak selama pemakaian adalah di dalam *freezer*, dengan suhu di bawah 0°C, agar bakteri tidak berkembang dan unsur-unsur aktif ekstrak kulit delima merah tidak berubah atau memburuk kualitasnya.

Ponsel GSM dengan frekuensi 900 MHz diletakkan di dalam kandang tikus. Setiap kelompok satu ponsel. Ponsel ditelepon selama 4 jam/hari pada pukul 07.00 sampai 11.00 selama 14 hari pada kelompok P1, P2, dan P3.

Hewan uji ditempatkan dalam kandang yang terbuat dari kayu dengan luas 3600 cm² (60x30x30 cm³). Setiap kandang dapat menampung setiap kelompok (8 ekor hewan uji).

Pelaksanaan percobaan

Pada minggu I, keempat kelompok perlakuan diberi *pellet* BR2 dan air PAM agar semua tikus dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Pada minggu II mulai diberikan perlakuan yang berbeda pada masing-masing kelompok. Sebelumnya, masing-masing tikus ditimbang untuk menentukan dosis perlakuan.

Pada minggu II, kelompok P1 dipapar dengan gelombang elektromagnetik yang berasal dari ponsel selama 4 jam setiap hari selama 14 hari. Kelompok P2 dan P3 diberi ekstrak buah delima merah terlebih dahulu selama 10 hari, kemudian pada hari kesebelas dipapar dengan gelombang elektromagnetik ponsel dan ekstrak buah delima merah tetap diteruskan. Setelah pemaparan, pemberian ekstrak kulit buah delima merah pada kelompok P2 dihentikan, sedangkan pada kelompok P3 pemberian ekstrak buah delima merah masih diteruskan sampai 10 hari setelah pemaparan.

Metode pengumpulan data

Pengumpulan data dilakukan dengan perhitungan jumlah leukosit dengan papan bilik *Improved Bauer* dan pembacaan hemogram leukosit darah dengan metode apusan dari sampel darah.

Perhitungan jumlah leukosit

Darah yang sudah dicampur dengan EDTA diisap dengan pipet darah sampai tanda 0,5. Selanjutnya, ujung pipet dimasukkan ke dalam larutan Turk sambil darah ditahan tetap pada garis 0,5. Pipet dipegang dengan arah 45° dan larutan Turk dimasukkan hingga tanda 11. Pipet diangkat dari cairan, ujung pipet ditutup dengan ujung jari, lalu karet pengisap dilepas. Pipet dikocok selama 15-30 detik. Setelah itu, pipet ditaruh secara horizontal. Setelah pengisian pipet leukosit, kamar hitung disiapkan. Kamar hitung yang bersih beserta kaca penutupnya diletakkan mendatar di atas meja.

Pipet yang telah dipersiapkan dikocok selama 3 menit secara terus-menerus. Semua cairan yang terdapat di dalam batang kapiler pipet (3-4 tetes) dibuang dan ujung pipet segera disentuhkan dengan sudut 30° pada permukaan kamar hitung dengan menyinggung pinggir kaca penutup. Kamar hitung dibiarkan terisi cairan secara perlahan-lahan dengan daya kapilaritasnya sendiri.

Kamar hitung dibiarkan selama 2 atau 3 menit supaya leukosit dapat mengendap. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan lensa objektif dengan pembesaran 10 kali. Diamati leukosit yang terdapat dalam keempat bidang, dari sudut ke sudut, dari kanan ke kiri, dan dari atas ke bawah. Pengenceran yang dilakukan dalam pipet adalah 20 kali.

Perhitungan jenis leukosit

Darah diambil dengan pipet, lalu ditaruh pada pinggir kanan *object glass* dengan diameter kurang lebih 2 cm. Dengan menggunakan tangan kanan, *object glass* lain diletakkan di sebelah kiri tetesan darah tersebut dan digerakkan ke kanan, sehingga tetesan darah akan menyebar pada sisi kaca penggeser tersebut. Dengan segera kaca tersebut digeserkan ke kiri sambil dipegang miring dengan sudut antara 30-45° (tanpa ditekan). Selanjutnya, sediaan tersebut dibiarkan mengering di udara. Setelah kering, sediaan tersebut diletakkan di atas rak pulas dengan lapisan darah di bagian atas. Di atas sediaan ditetaskan metilalkohol hingga bagian yang terlapis darah tertutup semuanya kemudian sediaan dibiarkan selama 5 menit. Kelebihan metilalkohol dituang dari kaca. Sediaan ditutup dengan Giemsa yang telah diencerkan dengan larutan penyangga dan biarkan selama 20 menit kemudian dibilas dengan air suling. Sediaan diletakkan secara vertikal dan dibiarkan mengering di udara.

Analisis data

Untuk mengetahui hubungan antara dua variabel pada kelompok yang tidak berpasangan dengan data yang berupa data numerik maka dilakukan uji-t tidak berpasangan. Sebelumnya dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk untuk mengetahui distribusi data. Data yang diperoleh harus terdistribusi normal ($p > 0,05$) sebagai syarat uji-t tidak berpasangan. Namun, jika ternyata hasil uji Shapiro-Wilk menunjukkan distribusi data yang tidak normal maka uji hipotesis yang dipakai adalah salah satu jenis tes nonparametrik yang sesuai, yaitu uji Mann-Whitney.

Varians data diuji dengan menggunakan uji Levene. Varians data boleh sama ($p > 0,05$) ataupun berbeda ($p < 0,05$). Untuk menentukan nilai signifikansi (p) pada uji-

t tidak berpasangan, terlebih dahulu dilihat nilai signifikansinya pada uji Levene. Apabila varians data sama ($p > 0,05$) maka untuk melihat uji-t tidak berpasangan digunakan hasil pada baris pertama (*equal variances assumed*), sedangkan apabila varians data berbeda ($p < 0,05$) maka untuk melihat uji-t tidak berpasangan digunakan hasil pada baris kedua (*equal variances not assumed*). Nilai $p < 0,05$ berarti terdapat pengaruh ekstrak kulit buah delima merah terhadap jumlah leukosit dan tipe leukosit tikus putih, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan tidak ada pengaruh ekstrak kulit buah delima merah terhadap jumlah leukosit dan tipe leukosit tikus putih (Sopiudin 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah leukosit

Rerata jumlah leukosit dari setiap kelompok perlakuan ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil uji-t tidak berpasangan jumlah leukosit pada kelompok K dan P1 menunjukkan bahwa paparan gelombang elektromagnetik meningkatkan jumlah leukosit namun tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa gelombang elektromagnetik ponsel mampu menyebabkan terjadinya stres fisik dan berefek pada jumlah leukosit meskipun tidak signifikan secara statistik. Hal ini diduga terjadi akibat paparan radiasi gelombang elektromagnetik ponsel yang diterima subjek pada kelompok P1 masih dalam fase *alarm reaction*, dimana sel masih mampu bertahan menghadapi *stressor*. Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat Kolomytseva et al. (2002), Putra (2005), Elyana (2005), Supardi dan Rosid (2003), dan Guyton dan Hall (1997), yang mengungkapkan bahwa gelombang elektromagnetik ponsel dapat menginduksi terjadinya stres fisik dan perubahan pada leukosit.

Stres yang terjadi pada individu berdampak pada berbagai sel tubuh, termasuk sel saraf. Stres menstimulasi pembentukan sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , dan IFN γ oleh sel imun tubuh. Stres juga secara langsung menyebabkan neuron aktif mensintesis berbagai *neurotransmitter*. Pembentukan *neurotransmitter* oleh neuron tersebut juga distimulasi oleh adanya sitokin pro-inflamasi. Semua sinyal terkait stres, termasuk *neurotransmitter* dan sitokin, akan mengalami integrasi di *hypothalamus*, khususnya nukleus paraventriculer, dimana *neurotransmitter* dan sitokin bekerja untuk merangsang atau menghambat sekresi *Corticotropin Releasing Factor* (CRF). CRF merupakan substansi utama yang berperan dalam merambatkan sinyal *stressor* ke sistem imun. CRF merangsang pituitari untuk sekresi ACTH. Selanjutnya, ACTH ditangkap oleh sel-sel di korteks adrenal yang kemudian mengeluarkan glukokortikoid, sedangkan medula adrenal mengeluarkan *epinephrine* (EPI) dan *norepinephrine* (NE) (Putra 2005).

Di bagian perifer, sistem imun dapat dipengaruhi secara langsung oleh sistem saraf otonom. Katekolamin yang dihasilkan oleh saraf simpatis dapat menginduksi pengosongan *noradrenaline* (NA) di Sistem Saraf Otonom (SSO) dan merusak sistem imun. Sistem saraf parasimpatis juga memiliki peran yang penting pada neuromodulasi.

Suatu penelitian menunjukkan bahwa asetilkolin (kolinergik) secara signifikan meningkatkan proliferasi sel T. Kerja saraf NA berlawanan dengan sistem kolinergik, hal ini berfungsi untuk menjaga keseimbangan yang harmonis (Baratawidjaja 2006).

Kemampuan individu untuk tetap mempertahankan kondisi tubuhnya ketika terpapar stres tergantung pada kemampuannya dalam mengelola *stressor*. Mekanisme dalam mengelola *stressor* disebut sebagai *coping mechanism*. *Coping mechanism* merupakan usaha dari individu untuk mengurangi atau bertahan terhadap perubahan-perubahan, baik internal maupun eksternal, yang disebabkan oleh *stressor* (Moeljono 2005).

Teori Selye menyebutkan bahwa adaptasi individu terhadap *stressor* bervariasi. Menurut teori Selye, terdapat fase-fase reaksi psikologis yang disebut *general adaptation syndrome*. *General adaptation syndrome* terdiri dari tiga fase. Fase pertama adalah *fase alarm reaction* yang analog dengan mekanisme *fight or flight*. Pada fase ini, tubuh berusaha untuk bertahan dari *stressor* melalui sistem endokrin. Fase kedua adalah *fase stage of resistance*. Pada fase ini, tubuh berusaha untuk bertahan dan beradaptasi dengan *stressor*. Fase terakhir adalah *stage of exhaustion*. Fase ini dimulai ketika sistem imun melemah dan menghabiskan energi tubuh hingga pertahanan tubuh sangat terbatas (Sarafino 1994).

Hasil uji-t tidak berpasangan jumlah leukosit pada kelompok K dan P2 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima merah selama paparan dengan dosis 50 mg/kg BB tikus/hari dapat meningkatkan jumlah leukosit dibandingkan dengan kelompok kontrol (K) tetapi tidak signifikan. Adapun pada kelompok K dan P3 menunjukkan pemberian ekstrak kulit buah delima merah selama dan setelah paparan dengan dosis 50 mg/kg BB tikus/hari dapat menurunkan jumlah leukosit dibandingkan dengan kelompok kontrol tetapi tidak signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit delima merah memberikan efek antiproliferatif pada P2 dan P3 yang terpapar gelombang elektromagnetik, tetapi efeknya tidak signifikan secara statistik.

Hasil uji-t tidak berpasangan jumlah leukosit pada kelompok P1 dan P2 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima merah selama paparan dengan dosis 50 mg/kg BB tikus/hari dapat menurunkan jumlah leukosit dibandingkan dengan kelompok terpapar gelombang elektromagnetik tanpa pemberian ekstrak delima merah tetapi tidak signifikan. Hasil uji-t tidak berpasangan jumlah leukosit pada kelompok P1 dan P3 menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kulit buah delima merah selama dan sesudah paparan dengan dosis 50 mg/kg BB tikus/hari dapat menurunkan jumlah leukosit dibandingkan dengan

kelompok yang hanya diberi ekstrak delima selama paparan dan hasilnya juga signifikan.

Dari uraian tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak delima merah dengan dosis 50 mg/kg BB tikus/hari sebelum, selama, dan sesudah paparan dapat menurunkan proliferasi leukosit akibat paparan gelombang elektromagnetik ponsel. Hal ini sesuai dengan pendapat Manian et al. (2000) dan Negi et al. (2003) bahwa aktivitas penghambatan radikal bebas sangat bergantung pada konsentrasi dan jumlah antioksidan yang digunakan. Pada umumnya, semua dosis ekstrak menunjukkan korelasi positif antara konsentrasi dan jumlah ekstrak sampai angka optimal dengan aktivitas antioksidannya.

Kulit buah delima merah yang selama ini tidak pernah dimanfaatkan ternyata menunjukkan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi. Penelitian yang dilakukan oleh Ricci et al. (2006) menunjukkan bahwa aktivitas ekstrak daging delima lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak kulit delima.

Kurang optimalnya penelitian ini diduga dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan. Antioksidan yang terlarut dalam kompleks etanol hanya sedikit membantu dalam efek penghambatan proliferasi sel, karena zat-zat aktif dalam ekstrak kulit buah delima merah larut dalam etanol yang bersifat polar. Ekstrak dengan pelarut nonpolar, seperti air dan metanol, cenderung mempunyai kemampuan yang lebih baik dalam menghambat proliferasi sel dibanding ekstrak dengan pelarut lain. Hal ini disebabkan karena komponen atau senyawa yang berpotensi dalam penghambatan proliferasi sel diduga larut dalam pelarut polar dan sulit larut pada pelarut nonpolar (Yuana 1998).

Kecenderungan kemampuan penghambatan proliferasi sel yang ditunjukkan oleh ekstraksi dengan pelarut nonpolar diduga disebabkan oleh kandungan senyawa yang bersifat antiproliferatif maupun toksik terhadap sel-sel tubuh. Senyawa tersebut dapat berupa senyawa fenolik yang selain bersifat antiproliferatif, yaitu mampu menghambat sintesis DNA, juga dapat bersifat toksik yaitu dengan bereaksi dengan membran sel, sehingga membran sitoplasma rusak yang mengakibatkan keluarnya komponen sitoplasma sel (Yuana 1998).

Pengaruh penghambatan proliferasi sel pada suatu senyawa tertentu biasanya dengan menekan pertumbuhan dan menimbulkan toksisitas, yaitu dengan menghambat pembelahan sel normal yang proliferasinya cepat (Gan dan Nafrialdi 2007). Sel-sel yang sedang berada pada tahap proliferasi lebih peka terhadap senyawa kimia toksik daripada sel yang tidak berproliferasi.

Tabel 1. Rerata jumlah leukosit dari setiap kelompok perlakuan

Kelompok perlakuan	Rerata ± SD ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
K	10,40±4,39
P1	11,01±2,38
P2	10,91±1,21
P3	8,56±1,70

Keterangan: K, P1, P2, P3 = dijelaskan dalam metode

Tabel 2. Rerata hitung jenis leukosit pada setiap kelompok.

Kelompok	Rerata ± SD basofil	Rerata ± SD eosinofil	Rerata ± SD neutrofil	Rerata ± SD limfosit	Rerata ± SD monosit	Sel muda
K	0	1,75±1,98	25,50±13,68	71,00±12,84	1,75±1,03	0
P1	0	3,00±2,39	24,25±13,31	71,00±12,94	1,75±0,71	0
P2	0	1,14±0,90	32,71±10,19	64,57±10,03	1,57±0,53	0
P3	0	1,71±1,25	32,00±6,08	64,71±5,99	1,57±0,79	0

Pengaruh yang ditimbulkan kurang lebih sama dengan senyawa antiproliferatif yang dimiliki oleh bahan pangan lain, seperti anggur merah, *blueberry*, *cranberry*, teh hijau, dan teh hitam (Seeram et al. 2008). Selain itu, diduga mekanisme efek penghambatan terhadap proliferasi sel yang diberi perlakuan ekstrak kulit delima merah tersebut mirip dengan efek penghambatan dari pengobatan melalui kemoterapi. Pemberian ekstrak tersebut mempunyai sifat toksik yaitu adanya kontak langsung sel dengan zat aktif ekstrak. Zat aktif ekstrak tersebut akan masuk ke dalam sistem aliran darah dan bertemu dengan sel yang sedang mengalami proliferasi, sehingga dapat memberikan sifat toksik. Toksisitas tersebut dapat berupa pemecahan dinding sel, sitoplasma sel, inaktivasi DNA sel, serta inaktivasi senyawa-senyawa yang berperan dalam meningkatkan pertahanan tubuh, seperti sitokin dan limfokin (Seeram et al. 2008).

Jenis leukosit

Rata-rata jumlah eosinofil pada kelompok P1 meningkat dari jumlah kelompok kontrolnya, limfosit dan monosit tetap, sedangkan neutrofil menurun (Tabel 2). Namun, hasil uji-t tidak berpasangan untuk kelompok K dan P1 pada neutrofil, dan uji Mann-Whitney untuk kelompok K dan P1 pada limfosit, eosinofil, dan monosit menunjukkan hasil yang sama, yaitu tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Selain itu, neutrofil, eosinofil, limfosit, dan monosit yang ditemukan adalah sel-sel dewasa, serta tidak ditemukan sel-sel muda dalam lapang pandang sampel.

Rata-rata jumlah eosinofil, limfosit, dan monosit pada kelompok P2 dan P3 menunjukkan hasil yang lebih rendah daripada rata-rata eosinofil, limfosit, dan monosit pada kelompok K dan P1. Hal ini diduga disebabkan karena sifat antiproliferatif dari ekstrak delima, sedangkan hasil pada neutrofil adalah sebaliknya, yaitu kelompok K dan P1 lebih rendah daripada kelompok P2 dan P3. Namun, hasil uji-t tidak berpasangan untuk seluruh kelompok neutrofil, dan uji Mann-Whitney untuk seluruh kelompok limfosit, eosinofil, dan monosit menunjukkan hasil yang sama, yaitu tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Penurunan jumlah cukup terlihat pada limfosit antara kelompok yang terpapar tetapi tidak diberi ekstrak dengan kelompok yang diberi ekstrak. Hal ini diduga terjadi karena limfosit adalah sel imun yang bekerja aktif ketika stres fisik terjadi. CRF dapat ditangkap langsung oleh reseptor CRF-R1 limfosit, sehingga perilaku limfosit berubah (Elyana 2005).

KESIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (*P. granatum*) terhadap jumlah leukosit tikus putih (*R. norvegicus*) yang dipapar dengan gelombang elektromagnetik ponsel dengan tingkat signifikansi ($p < 0,05$). Namun, untuk jenis leukosit, tidak terdapat perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Arief MTQ. 2004. Pengantar metodologi penelitian untuk ilmu kesehatan. The Community of Self Help Group Forum (CSGF), Klaten.
- Athena ATT, Sujur SOS. 2000. Kuat medan listrik dan medan magnet pada peralatan rumah tangga dan kantor. Buletin Penelitian Kesehatan 27(1): 170-179.
- Balmori A. 2005. Possible effects of electromagnetic fields from phone masts on a population of white stork (*Ciconia ciconia*). Electromagn Biol Med 24:109-119.
- Baratawidjaja KG. 2006. Immunologi dasar. Balai Penerbit FK UI, Jakarta.
- Darmawan A, Sundowo A, Fajriah S et al. 2004. Uji aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak metanol beberapa jenis benalu. Pusat Penelitian Kimia-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, Tangerang.
- Elyana SA. 2005. Psikoneuroimunologi kedokteran (modulasi imunitas sebagian respons terhadap renjatan listrik, suatu pendekatan psikoimunologi). Graha masyarakat Ilmiah, FK UNAIR, Surabaya.
- Ferlina S. 2009. Khasiat delima. www.khasiatku.com. [9 April 2010].
- Gan S, Nafrialdi. 2007. Farmakologi dan Terapi. Universitas Indonesia, Jakarta.
- Guyton, Hall. 2007. Buku ajar fisiologi kedokteran. 11th edition. EGC, Jakarta.
- Kolomytseva MP, Gapeev AB, Sadovnikov VB et al. 2002. Suppression of nonspecific resistance of the body under the effect of extremely high frequency electromagnetic radiation of low intensity. Biofizika. 47(1): 71-77.
- Lansky EP, Newman. 2007. *Punica granatum* (Pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. J Ethnopharmacol 109(2): 177-206.
- Mahardika IP. 2009. Efek radiasi gelombang elektromagnetik ponsel terhadap kesehatan manusia. mahardikaholic.files.wordpress.com. [4 Maret 2010].
- Malik A, Afaq F, Safaraz S et al. 2005. Pomegranate fruit juice for chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. PNAS 102: 14813-14818.
- Manian R, Nagarajan A, Perumal S et al. 2000. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. Food Chem 107: 1000-1007.
- Mansyur M. 1998. Dampak medan elektromagnetik terhadap kesehatan. Majalah Kedokteran Indonesia 48(7): 264-269.
- Maschevich M, Dan F, Amit K et al. 2003. Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular

- phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 24(2): 82-90.
- Moeljono N. 2005. Psikoneuroimunologi (psikologi sebagai dasar psikoneuroimunologi). Graha Masyarakat Ilmiah FK UNAIR, Surabaya.
- Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS. 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extract. *Food Chem* 80: 393-397.
- Ngatijan. 1991. Petunjuk laboratorium metode laboratorium dalam toksikologi. Pusat Antar Universitas Bioteknologi UGM, Yogyakarta.
- Putra ST. 2005. Psikoneuroimunologi kedokteran. Gramik FK UNAIR, Surabaya.
- Rahman A. 2007. Analisis kandungan antioksidan dari kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan uji aktivitasnya pada asam oleat. www.digilib.ui.ac.id. [4 Maret 2010].
- Rappaport TS. 2002. *Wireless communications: Principles and practices*. 2nd edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Ricci D, Giamperi L, Bucchini A. 2006. Antioxidant activity of *Punica granatum* fruits. *Fitoterapia* 77: 310-312.
- Sarafino EP. 1994. *Health psychology*. John Wiley and Sons Inc., USA.
- Seeram NP, Aviram M, Zhang Y et al. 2008. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem* 56: 1415-1422.
- Sopiyudin. 2008. *Statistik untuk kedokteran dan kesehatan*. PT. ARKANS Entertainment and Education in Harmony, Jakarta.
- Supardi A, Al Rosid H. 2003. Pengaruh perubahan konfigurasi saluran transmisi terhadap intensitas magnet. *Jurnal Teknik Elektro dan Komputer* 3(2): 41-44.
- Toklu HZ, Seherli O, Ozyurt H et al. 2009. *Punica granatum* peel extract protects against ionizing radiation-induced enteritis and leukocyte apoptosis in rats. *J Radiat Res* 50: 345-353.
- Wardhana WA. 2000. Dampak radiasi gelombang elektromagnetik ponsel. elektroindonesia.com. [4 Maret 2010].
- Wiryawan IGNS, Wahyuniari IAI. 2009. Ekstrak biji klabet menurunkan jumlah sel spermatozoa pada kelinci. *Jurnal Veteriner* 10(2): 71-76.
- Wiryowidagdo S. 2007. Delima (*Punica granatum* L.) obat tradisional Indonesia yang merupakan sumber antioksidan. www.isfinational.or.id. [25 Maret 2010].
- Yasoubi P, Barzegarl M, Sahari MA et al. 2007. Total phenolic content and antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extracts. *J Agric Sci Technol* 9: 35-42.
- Yuana. 1998. Pengaruh Ekstrak Jahe Terhadap Proliferasi Sel Limfosit dan Beberapa Alur Sel Kanker secara In Vitro. [Skripsi]. Institut Pertanian Bogor, Bogor.

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 sampul depan meskipun tidak dimuat dalam naskah sendiri. **Tidak ada lampiran**, semua data atau analisis data dimasukkan dalam Hasil dan Pembahasan.

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

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

Jurnal:

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

Buku:

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

Bab dalam buku:

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

Abstrak:

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

Prosiding:

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

Skripsi, Tesis, Disertasi:

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

Informasi dari Internet:

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

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

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

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

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

Pengaruh ekstrak putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap mortalitas *Ascaris suum* secara in vitro 33-37

- MUHAMMAD ARIF NUR SYAHID, CR. SITI UTARI, SUTARMIADJI DJUMARGA

Kajian aktivitas antioksidan dan kadar antikolesterol pada angkak dengan variasi jenis substrat (beras, jagung, dan gaplek) 38-42

- HADI WIYOTO, M.A.M. ANDRIANI, NUR HER RIYADI PARNANTO

Pengaruh pemberian ekstrak air kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap kadar kolesterol total darah dan berat badan tikus putih 43-49

- MEISA MARSALINA, SAMIGUN, ENDANG SRI HARDJANTI

Pengaruh berbagai jenis beras terhadap aktivitas antimikrobia pada angkak oleh *Monascus purpureus* 50-54

- FITRI SULISTYORINI, M.A.M. ANDRIANI, ROHULA UTAMI

Pengaruh pemberian ekstrak kulit buah delima merah (*Punica granatum*) terhadap jumlah dan jenis leukosit pada tikus putih yang dipapar gelombang elektromagnetik ponsel 55-61

- MULKI RAKHMAWATI, ISNA QADRIYATI, LILIK WIJAYANTI

