

book chapter

by Dewi Mustika

Submission date: 31-Dec-2022 12:00AM (UTC+0700)

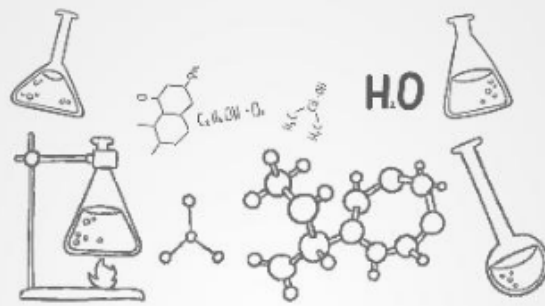
Submission ID: 1987507468

File name: 2-8-22_POTENSI_SENYAWA_AKTIF_BAHAN_ALAM.pdf (36.91M)

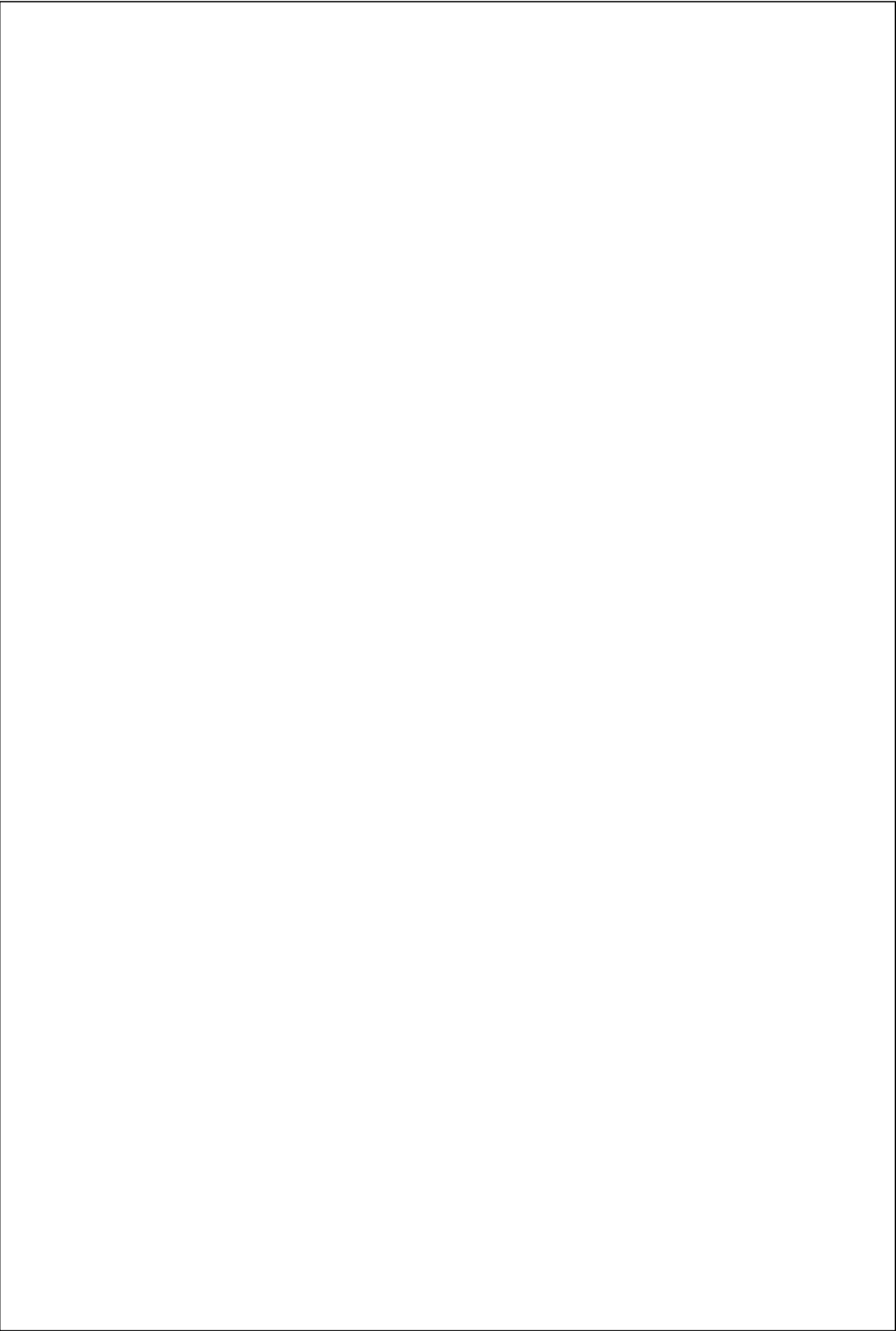
Word count: 776

Character count: 3548

POTENSI SENYAWA AKTIF BAHAN ALAM



Pramesti Dewi | Talitha Widiatningrum | Ibnul Mubarak | Ni Luh Tirtasari | Ghani Walandipa |
 Tristiana Hidayatul Wahidah | Siti Sulaiha | Mailani | Noor Aini Habibah | Dewi Mustikaningtyas |
 Sri Widyarti | Muhaimin Rifa'i | Widodo | Retno Sri Iswari | Wulan Christijanti | Lisdiana |
 Harjono | Fitri Arum Sasi | Muchamad Dafip | Nugrahaningsih WH | Aditya Marianti |
 Nur Dina Amalina | Sri Mursiti | Shafira Septiana Putri | Legendra Gantar Negara | Intan Kharyna
 Sholehah | Dian Sri Asmorowati | Putri Dyah Astari | Ari Yuniastuti | Priyantini Widyeningrum |
 Ning Setiati | Sri Ngabekti | R. Susanti | Senda Kartika | Yudi Priyanto | Desy Amelia |
 Sabila Yasaroh | Maria Magdalena Riyaniarti Estri W



Potensi Senyawa Aktif Bahan Alam

Author:

Pramesti Dewi
Talitha Widiatningrum
Ibnul Mubarak
Ni Luh Tirtasari
Ghani Walandipa
Tristiana Hidayatul Wahidah
Siti Sulaiha
Mailani
Noor Aini Habibah
Dewi Mustikaningtyas
Sri Widyarti
Muhaimin Rifa'i
Widodo
Retno Sri Iswari
Wulan Christijanti
Lisdiana
Harjono
Muchamad Dafip
Nugrahaningsih WH
Nur Dina Amalina

Sri Mursiti
Shafira Septiana Futri
Legendra Gantar Negara
Intan Kharyna Sholehah
Dian Sri Asmorowati
Putri Dyah Astari
Ari Yuniastuti
Fitri Arum Sasi
Priyantini Widiyaningrum
Ning Setiati
Sri Ngabekti
R. Susanti
Aditya Marianti
Senda Kartika
Yudi Priyanto
Desy Amelia
Sabila Yasaroh
Maria Magdalena Riyaniarti
Estri W



Potensi Senyawa Aktif Bahan Alam

Author:

Pramesti Dewi, Talitha Widiatningrum, Ibnul Mubarak, Ni Luh Tirtasari, Ghani Walandipa, Tristiana Hidayatul Wahidah, Siti Sulaiha, Mailani, Noor Aini Habibah, Dewi Mustikaningtyas, Sri Widyarti, Muhaimin Rifa'i, Widodo, Retno Sri Iswari, Wulan Christijanti, Lisdiana, Harjono, Muchamad Dafip, Nugrahaningsih WH, Nur Dina Amalina, Sri Mursiti, Shafira Septiana Putri, Legendra Gantar Negara, Intan Kharyna Sholehah, Dian Sri Asmorowati, Putri Dyah Astari, Ari Yuniastuti, Fitri Arum Sasi, Priyantini Widiyaningrum, Ning Setiati, Sri Ngabekti, R. Susanti, Aditya Marianti, Senda Kartika, Yudi Priyanto, Desy Amelia, Sabila Yasaroh, Maria Magdalena Riyaniarti Estri W

Tata Letak : Ahmad Sofiyuddin
Cover : Aliyul Murtadlo

copyright © 2022

Penerbit



1

Unisma Press

Gedung Umar bin Khattab Kantor Pusat LT. 3,

Universitas Islam Malang

Jl. Mayjen Haryono 193 Malang, 65144

Telp. 0341-551932 ext 232

unismapress@unisma.ac.id

Cetakan Pertama : Mei 2022
Ukuran : 15,5 cm x 23 cm
Jumlah Halaman : xvi + 216 halaman

Anggota IKAPI No.303/JTI/2021

ISBN: 978-623-99161-8-3

Hak cipta dilindungi oleh Undang-undang Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku tanpa izin tertulis dari Penerbit



Kata Pengantar

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati yang sangat kaya. Berbagai spesies hewan dan tumbuh-tumbuhan termasuk mikroorganisme hidup di Indonesia. Organisme-organisme tersebut memiliki potensi besar untuk memproduksi berbagai jenis senyawa organik bahan alam dengan berbagai aktivitas biologi. Walaupun penemuan senyawa bioaktif yang berasal dari sumber bahan alam organik Indonesia sudah banyak dilaporkan, namun dimungkinkan masih banyak yang belum diteliti, baik dari spesies-spesies tumbuhan maupun mikroba.

Penelitian bahan alam pada saat ini telah berkembang dengan pesat. Penelitian ini banyak dilakukan untuk memperoleh senyawa-senyawa organik yang berkhasiat sebagai obat. Manfaat penelitian senyawa organik bahan alam dalam bidang pengobatan meliputi tiga hal, yaitu dapat langsung digunakan untuk obat penyakit tertentu, dijadikan bahan asal untuk sintesis obat, atau dijadikan model senyawa aktif farmakologi dalam sintesis obat tertentu. Penemuan senyawa obat baru dari sumber bahan alam pada umumnya dilanjutkan dengan uji toksisitas dan uji klinis lainnya untuk memastikan bahwa senyawa obat tersebut aman digunakan. Selain itu, diupayakan pula agar produksi senyawa tersebut tidak memerlukan biaya yang tinggi sehingga bila dipasarkan harganya terjangkau oleh masyarakat luas. Untuk itu dilakukan beberapa cara, antara lain menghasilkan senyawa bioaktif

melalui pendekatan bioteknologi (kultur *in vitro* atau rekayasa genetik).

Bahan alam berpotensi besar dalam penemuan obat berbagai penyakit, baik penyakit degeneratif maupun penyakit akibat patogen. Di antara bahan alam yang telah diteliti banyak yang berpotensi sebagai antioksidan, antikanker, antibiotik, antidiabetic, dan lain-lain. Selain itu ada pula yang berpotensi sebagai imunomodulator, anti stress akibat infeksi patogen, dan protektor akibat paparan logam berat. Seiring dengan munculnya berbagai jenis penyakit baru dan banyaknya mikroba patogen yang telah resisten terhadap penggunaan obat-obat antibiotika tertentu, maka penemuan obat-obat baru harus terus diupayakan.

Dalam buku “Potensi Senyawa Aktif Bahan Alam” ini dibahas beberapa hasil penelitian tentang potensi mikroba dan tumbuhan sebagai sumber bahan obat. Kapang lignoselulolitik berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai antibiotik, antikanker dan antifungi patogen; sedangkan *Saccharomyces cerevisiae* berpotensi menghasilkan antioksidan glutathione. Produksi glutathione dapat menggunakan ekstrak kedelai selain asam amino bebas. Beberapa jenis tumbuhan yang berpotensi sebagai tanaman obat yang dituliskan dalam buku ini adalah tomat, ubi kayu, *garlic* (bawang putih), kelor hijau dan kelor merah serta beberapa tumbuhan rempah komponen minuman tradisional *wedang uwuh*. Ekstrak buah tomat yang diperoleh dari berbagai jenis pelarut mengandung tomatidin yang berpotensi sebagai antikanker. Ekstrak daun ubi kayu mempunyai peluang untuk dikembangkan menjadi obat herbal, antikanker, mempercepat penyembuhan luka, analgetik, antibakteri, anti inflamasi, hepatoprotektif, antidiabetic, antidiare dan antihelmintik. Selanjutnya, kandungan senyawa bioaktif tanaman dalam wedang uwuh yang teridentifikasi

berpotensi sebagai imunomodulator pada infeksi SARS-Cov2 penyebab penyakit covid 19. *Fermented black garlic* terbukti mengandung antioksidan yang tinggi. Kandungan antioksidan umbi *garlic* tunggal lebih tinggi dibandingkan umbi majemuk. Daun kelor hijau mempunyai potensi sebagai antioksidan pada tikus hiperglikemia, sedangkan senyawa aktif hasil fermentasi kelor merah dapat berperan sebagai penangkal stress oksidatif akibat serangan *Salmonella tiphii*.

Selain itu dalam buku ini juga dibahas tentang peran kultur *in vitro* dalam produksi antioksidan, potensi khitosan dan gulma kipahit. Kultur *in vitro* dapat digunakan untuk produksi senyawa antioksidan dengan bermacam-macam eksplan, tipe kultur, medium dan zat pengatur tumbuh. Kitosan memiliki potensi sebagai agen proteksi organ sistem pencernaan tikus dari kerusakan akibat paparan Pb-asetat. Ekstrak gulma kipahit berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai bioinsektisida serangga peternakan.

Dengan substansi tersebut, buku ini memberikan sumbangan yang cukup signifikan dalam perkembangan penelitian senyawa bahan alam di Indonesia. Informasi yang diberikan yang berupa hasil penelitian dan hasil review dapat dijadikan dasar untuk melakukan penelitian lebih lanjut sehingga ditemukan obat dan insektisida alamiah yang berguna dalam kehidupan masyarakat.

Buku ditulis oleh para dosen Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang yang kompeten dan berpengalaman di bidangnya. Setiap *chapter* ditulis dalam format artikel hasil penelitian atau hasil review yang informatif dan dilengkapi dengan daftar pustaka. Hal ini akan membantu pembaca untuk menelusuri informasi lanjut yang diperlukan. Dengan teknik penulisan yang mudah dipahami dan nilai penting substansi yang disajikan dalam

perkembangan penelitian senyawa bahan alam, maka buku ini layak dibaca oleh mahasiswa, dosen, dan peneliti bidang Biologi, Kimia, Farmasi dan bidang terkait lainnya. Selain itu juga perlu dibaca oleh para pemerhati obat herbal dan pecinta tumbuh-tumbuhan.

Prof. Dr. Enni Suwarsi Rahayu, M.Si
Guru Besar Jurusan Biologi FMIPA UNNES



Prakata

Tanaman merupakan sumber obat-obatan alami yang sangat beragam. Sejumlah obat juga disintesis dari produk alami melalui reaksi kimia yang berbeda. Senyawa aktif bahan alam antara lain terpenoid, alkaloid, steroid, senyawa fenolik, vitamin, karbosiklik dan aromatik heterosiklik senyawa, protein, dan karbohidrat. Selain tanaman, bakteri dan jamur merupakan mikroorganisme yang juga sangat berguna sebagai sumber senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai obat. Sebagian besar produk alami ditemukan dalam kombinasi dengan banyak bahan aktif lainnya maupun komponen nonaktif.

Penulisan buku *Potensi Senyawa Bahan Alam* mengkaji berbagai produk senyawa bahan alam, mekanisme aksi produk alami yang mungkin, menemukan penggunaan sebagai obat atau molekul timbal dengan identifikasi jalur biokimia menggunakan metode modern termasuk analisis genomik dan proteomik. Keanekaragaman hayati alam tersedia bagi kita. Alam tetap menjadi sumber yang paling berharga untuk penelitian bidang kimia dan biologi molekul dengan stereokimia baru. Oleh karena itu, produk alami baru dan produk alami bioaktif yang sudah mapan akan tetap menjadi kunci bagi kesejahteraan manusia.

Buku ini dapat digunakan oleh ilmuwan ahli, peneliti, dan siswa untuk pengalaman belajar dan penelitian yang luar biasa. Kualitas buku ini di pasar penelitian kompetitif akan merangsang masa kini dan generasi ilmuwan masa depan yang tertarik untuk

meningkatkan kualitas kehidupan manusia melalui pengerjaan produk alam dan turunannya. Buku ini berisi banyak fitur yang mencakup informasi tentang sejumlah beragam produk alami bioaktif yang disajikan oleh penulis dengan banyak referensi terkait. Hal ini akan membantu pembaca untuk melakukan penelitian di daerah di masa depan.

Setiap bab disajikan dengan cara jelas dan ringkas. Ilmuwan yang bekerja pada produk bahan alam akan menemukan ini sebagai buku sumber daya yang berguna yang akan membantu mereka dengan pekerjaan mereka. Buku Potensi Senyawa Aktif Bahan Alam sangat signifikan, dan bermanfaat bagi pembaca yang terlibat dalam kimia, biologi, farmakologi, dan studi obat berbahan alam.

Daftar Isi

KATA PENGANTAR __ v

PRAKATA __ ix

DAFTAR ISI __ xi

DAFTAR TABEL __ xiii

DAFTAR GAMBAR __ xiv

BAGIAN SATU: PRODUKSI SENYAWA BIOAKTIF

BAB I Potensi Kapang Lignoselulotik Dalam Produksi Senyawa Bioaktif __ 2

BAB II Produksi Antioksidan Melalui Kultur *In Vitro* __ 27

BAB III Potensi *Saccharomyces cerevisiae* Sebagai Uniseluler Penghasil Antioksidan Glutathion __ 46

BAGIAN DUA: POTENSI SENYAWA BAHAN ALAM

BAB IV Potensi Senyawa Bioaktif Potensial Pada Tomat: Temuan Tomatidin Pada ekstrak Tomat Berbagai Pelarut __ 62

BAB V Potensi Ekstrak Daun Cassava (*Manihot esculenta*) untuk Kesehatan __ 77

BAB VI Potensi Kitosan Sebagai Agen Proteksi Organ Pencernaan Tikus yang Terpajan Timbal Asetat __92

BAB VII Potensi Wedang uwuh Sebagai Imunomodulator Pada Infeksi SARS-COV 2 Melalui *Studi In Silico* __112

BAB VIII	Potensi Gulma Kipahit Sebagai Bioinsektisida Pengendali Serangga Peternakan	139
BAGIAN TIGA: POTENSI ANTIOKSIDAN BAHAN ALAM		
BAB IX	Aktivitas Antioksidan Fermented Black garlic Majemuk dan Tunggal	162
BAB X	Potensi Daun Kelor (<i>Moringa oliefera</i>) Sebagai Antioksidan Pada Tikus hiperglikemik	176
BAB XI	Potensi Senyawa Aktif Fermentasi Daun kelor Merah (<i>Moringa Oliefera</i>) Sebagai Penangkal Stres Oksidatif Akibat Ifeksi Salmonella Typhi	189
GLOSARIUM		209
TENTANG PENULIS		227

Daftar Tabel

- TABEL 1 Beberapa senyawa bioaktif utama dalam ekstrak methanol dari kultur cair *Aspergillus niger* __ 7
- TABEL 2 Senyawa bioaktif utama dalam ekstrak etil asetat dari kultur cair *Aspergillus niger* SH2-EGY __ 8
- TABEL 3 produksi antioksidan secara in vitro __ 30
- TABEL 4 Metode analisis antioksidan, aktivitas antioksidan dan senyawa bioaktif dari kultur in vitro beberapa tanaman sumber antioksidan __ 35
- TABEL 5 Persentase fitosterol pada buah tomat __ 67
- TABEL 6 Hasil *molecular docking* senyawa bioaktif dalam penghambatan protein target ACE, TMPRSS2, RdRp, 3CLpro dan PLpro __ 126
- TABEL 7 Senyawa-Senyawa Hasil analisis *GC-MS* dari Ekstrak Ethanol Gulma Kipahit __ 147
- TABEL 8 Estimasi LC50 ekstrak Gulma *Kipahit* __ 153
- TABEL 9 Desain eksperimental fermentasi termal bawang __165
- TABEL 10 Pembagian Kelompok Kontrol dan Perlakuan Ekstrak Daun Kelor __ 179
- TABEL 11 Uji Statistik Terhadap Variabel Yang diamati __ 181
- TABEL 12 Rerata (Mean \pm SD) Kadar SOD, Katalase dan MDA __181
- TABEL 13 Perubahan komposisi kimia pada daun kelor merah terfermentasi __ 193

Daftar Gambar

- GAMBAR 1 Struktur kimia dari stigmasterol __ 9
- GAMBAR 2 Trichoderma sp. (A). Morfologi koloni Trichoderma sp. dalam media PDA (Błaszczuk *et al.*, 2014) dan (B). Struktur mikroskopis Trichoderma sp __ 11
- GAMBAR 3 Jalur asam shikimat (*Shikimic Acid Pathway*) sebagai jalur biosintesis senyawa bioaktif pada tanaman dan mikroorganisme __ 15
- GAMBAR 4 Reaksi transformasi phenilalanin menjadi derivat-derivatnya yang termasuk dalam kelompok senyawa bioaktif fenolat __ 16
- GAMBAR 5 Jalur produksi senyawa bioaktif menggunakan kultur in vitro __ 28
- GAMBAR 6 Kadar glutathion (GSH) __ 52
- GAMBAR 7 Hasil analisis GC-MS menunjukkan perbedaan kandungan senyawa bioaktif pada jenis pelarut yang berbeda __ 66
- GAMBAR 8 Perbedaan jumlah total senyawa bioaktif pada tomat yang diekstraksi menggunakan jenis pelarut yang berbeda __ 66
- GAMBAR 9 Perbandingan rumus kimia steroid (A) dan tomatidine (B) yang terdapat pada tomat. Tanda panah menunjukkan letak percabangan rantai samping __ 69
- GAMBAR 10 Daun Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) __ 78
- GAMBAR 11 Jaringan hepar kelompok kontrol negatif __ 98

- GAMBAR 12 Gambaran histopatologi jaringan hepar tikus kelompok kontrol positif yang terpajan Pb asetat 175 mg/kg BB (HE, 400X) __ 99
- GAMBAR 13 Gambaran histopatologi jaringan hepar tikus kelompok perlakuan yang terpajan Pb asetat dan kitosan 64 mg/kg BB (HE, 400X) __ 99
- GAMBAR 14 Gambaran jaringan lambung kelompok kontrol negatif (HE, 400X) __ 100
- GAMBAR 15 Gambaran jaringan lambung tikus kelompok kontrol positif yang terpajan __ 101
- GAMBAR 16 Gambaran jaringan lambung tikus kelompok perlakuan yang terpajan __ 101
- GAMBAR 17 Gambaran histopatologi intestinum tikus __ 102
- GAMBAR 18 Gambaran jaringan intestinum tikus __ 102
- GAMBAR 19 Gambaran histopatologi jaringan intestinum tikus __ 103
- GAMBAR 20 Gulma Kipahit *Tithonia diversifolia* (Dokumentasi pribadi) __ 141
- GAMBAR 21 Grafik kromatogram GC-MS ekstrak gulma Kipahit __ 146
- GAMBAR 22 Indeks preferensi kutu kandang *A. diaperinus* yang terpapar ekstrak dalam berbagai konsentrasi __ 150
- GAMBAR 23 Mortalitas kutu kandang dalam waktu 24, 48 dan 72 jam setelah terpapar ekstrak __ 152
- GAMBAR 24 Aktivitas antioksidan (%) berdasarkan lama fermentasi dan perlakuan suhu pada bawang __ 166
- GAMBAR 25 Rerata kadar SOD dan Katalase kelompok Kontrol dan Perlakuan __ 182
- GAMBAR 26 Rerata kadar MDA kelompok Kontrol dan Perlakuan __ 182
- GAMBAR 27 Kadar glukosa darah mengalami penurunan __ 183

GAMBAR 28 Fermentasi daun kelor merah dengan *Lactobacillus*
plantarum __ 192

GAMBAR 29 Ekspresi hasil analisis HO-1 __ 197

GAMBAR 30 Hasil ekspresi Nrf-2 __ 198

GAMBAR 31 Hasil ekspresi Nrf-2 __ 198

#BAGIAN_SATU
PRODUKSI
SENYAWA BIOAKTIF

Potensi Kapang Lignoselulolitik Dalam Produksi Senyawa Bioaktif

Pramesti Dewi¹, Talitha Widiatningrum¹, Ibnul Mubarok¹,

Ni Luh Tirtasari², Ghani Walandipa³,

Tristiana Hidayatul Wahidah³, Siti Sulaiha³, Mailani⁴

¹ Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang

² Jurusan IPA Terpadu, FMIPA, Universitas Negeri Semarang

³ Mahasiswa Prodi Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Semarang

⁴ PT. Nutrilab Pratama, Jakarta (Alumni Prodi Biologi, FMIPA,
Universitas Negeri Semarang)

1.1. Pendahuluan

Senyawa bioaktif adalah sekelompok senyawa dari golongan karotenoid, fenolat, alkaloid, senyawa mengandung nitrogen, dan senyawa sulfur-organik [1]. Senyawa bioaktif memiliki peran penting dalam kehidupan manusia. Peran senyawa bioaktif antara lain adalah sebagai antioksidan, antikanker [2], antiinflamasi, imunomodulator, antibakteri, dan lain sebagainya.

Senyawa bioaktif secara alami dihasilkan oleh seluruh makhluk hidup, baik makhluk hidup tingkat tinggi seperti manusia, hewan dan tumbuhan, maupun makhluk tingkat rendah seperti bakteri dan jamur. Kapang (*molds*) adalah mikroorganisme dari Kingdom Fungi, yang terdiri atas struktur multiseluler dan disebut

juga sebagai jamur benang. Kingdom Fungi (Jamur) terdiri atas anggota banyak divisio, yaitu jamur mikroskopis, makroskopis, multiseluler, maupun uniseluler. Diantara berbagai jenis kapang, terdapat beberapa genus yang termasuk ke dalam kelompok kapang lignoselulolitik yaitu kapang yang dapat mendegradasi material lignoselulosa, seperti limbah pertanian dan pengolahan makanan. Kapang lignoselulolitik antara lain dari genus *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, dan *Trichoderma* [3]. Kapang lignoselulolitik ini juga potensial sebagai penghasil senyawa bioaktif.

Peran penting dari berbagai senyawa bioaktif mendorong diterapkannya teknik untuk produksi yang lebih efisien agar supaya kebutuhan akan senyawa bioaktif dapat terpenuhi dengan memadai. Produksi senyawa bioaktif secara tradisional adalah melalui ekstraksi tanaman atau bagian-bagian tanaman yang mengandung senyawa-senyawa tersebut. Cara tradisional ini kurang memadai untuk produksi yang efisien, sehingga diperlukan produksi dengan cara lain dan dari sumber yang mudah diperbanyak untuk memenuhi kebutuhan akan senyawa bioaktif.

Proses produksi senyawa fenolat secara fermentasi yang saat ini dilakukan adalah melalui kultur sel yang direkayasa (*engineered plant cells*). Proses rekayasa ini menggunakan dasar jalur sintesa yang sudah ada dalam tanaman, sehingga dicapai peningkatan produksi molekul target, dapat mengurangi produk samping yang tidak berguna, dan dapat dilakukan perbanyakan sel lebih cepat dalam jumlah banyak [2]. Proses produksi ini membutuhkan biaya produksi yang tinggi.

Proses produksi yang lebih memberikan peluang produksi senyawa fenolat adalah dengan menggunakan fungi lignoselulolitik. Kapang lignoselulolitik adalah anggota dari Kingdom Fungi (Jamur) berukuran mikroskopis dan berstruktur multiseluler, serta meng-

hasilkan enzim-enzim pendegradasi senyawa lignoselulosa. Enzim-enzim yang dihasilkan untuk aktivitas degradasi senyawa lignoselulosa adalah ligninase dan hidrolase yang menyerang polimer seperti selulosa, hemiselulosa, pektin, dan pati [3]. Oleh karena itu kapang lignoselulolitik dapat ditumbuhkan pada media berupa material lignoselulosa dari hasil samping pertanian yang murah, berlimpah, dan belum banyak digunakan untuk menghasilkan produk bernilai tinggi. Sepanjang proses degradasi senyawa lignoselulosa, kapang lignoselulolitik juga mampu menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang bermanfaat bagi kesehatan, yaitu sebagai agen antitumor, antimikroba, antioksidan, dan antiviral [4].

Permasalahan yang akan dibahas berkaitan dengan produksi senyawa bioaktif oleh kapang lignoselulolitik adalah: 1). Senyawa bioaktif apa saja yang dapat dihasilkan oleh kapang lignoselulolitik; 2). Bagaimana jalur biosintesis senyawa bioaktif oleh kapang lignoselulolitik; 3). Bagaimana cara mendapatkan isolat-isolat kapang lignoselulolitik yang potensial dalam menghasilkan senyawa bioaktif; dan 4). Metode produksi apakah yang dapat secara efisien menghasilkan senyawa bioaktif?

1.2. Metode

Metode yang digunakan adalah *review naratif* dan hasil penelitian. *Review* ditulis berdasarkan informasi dari berbagai artikel. Artikel-artikel yang dijadikan sumber informasi adalah artikel tentang jenis kapang lignoselulolitik, cara isolasi, senyawa-senyawa bioaktif yang diproduksi oleh kapang lignoselulolitik, jalur biosintesis senyawa bioaktif, dan metode fermentasi yang optimal untuk produksi senyawa bioaktif oleh kapang lignoselulolitik. Artikel yang telah dipublikasi mengenai senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh kapang lignoselulolitik ini masih sangat terbatas jumlahnya. Publikasi masih didominasi oleh produksi senyawa

bioaktif oleh jamur endofit, yaitu jamur yang tumbuh bersimbiosis dengan tanaman penghasil senyawa bioaktif.

Metode penelitian dilakukan untuk mendapatkan data isolat kapang lignoselulolitik. Pada metode penelitian dilakukan proses isolasi sampel tanah dan seresah daun di lingkungan kampus Universitas Negeri Semarang. Sampel diambil dari titik lokasi yang terdapat tumpukan daun gugur di area kampus. Universitas Negeri Semarang merupakan kampus konservasi dengan vegetasi yang sangat banyak jenis maupun jumlahnya, dan setiap saat terdapat guguran daun yang sangat berlimpah. Seringkali terjadi guguran daun ini terlewat untuk dibersihkan dan tidak terangkut oleh petugas kebersihan, sehingga menumpuk di tempat-tempat tertentu.

Tanah yang di atasnya terdapat tumpukan daun yang tidak terangkut oleh petugas kebersihan ada di banyak titik di area kampus yang sangat luas. Setelah melalui periode waktu yang cukup lama, guguran daun ini akan hancur dengan sendirinya oleh aktivitas kapang lignoselulolitik melalui reaksi enzimatik. Kapang lignoselulolitik mampu menghasilkan enzim-enzim pendegradasi senyawa lignoselulosa, misalnya yang terdapat pada guguran daun.

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dan identifikasi kapang lignoselulolitik endemik yang terdapat di lingkungan kampus Universitas Negeri Semarang. Metode isolasi yang menghasilkan isolat kapang lignoselulolitik adalah metode pengenceran seri sampel menggunakan akuades steril. Hasil pengenceran dengan tingkat pengenceran 10^{-5} dan 10^{-6} selanjutnya ditanam pada metode *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan masing-masing diulang dua kali.

1.3. Hasil dan Pembahasan

Senyawa bioaktif dari kapang lignoselulolitik

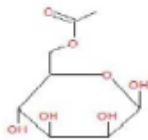
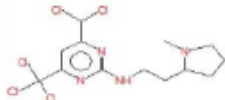
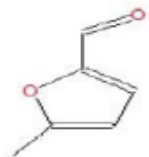
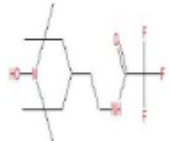
Jenis senyawa bioaktif yang dapat dihasilkan oleh kapang lignoselulolitik antara lain adalah senyawa-senyawa fenolat. Senyawa fenolat merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang selain metabolit primer. Metabolit sekunder dihasilkan bukan sebagai penunjang pertumbuhan kapang, tetapi untuk kebutuhan lain selama kehidupan kapang. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang ini merupakan sumber dari berbagai senyawa yang penting dalam aspek industri kimia, kesehatan, pangan, kecantikan, maupun pertanian [5].

Aspergillus niger adalah salah satu kapang lignoselulolitik yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif. Telah ditemukan 35 jenis senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* SH2-EGY [6]. Analisis senyawa dilakukan menggunakan GC-MS, sedangkan struktur senyawa diketahui melalui hasil analisis ekstrak menggunakan FTIR. Hasil analisis dengan FTIR menunjukkan ke 35 senyawa memiliki struktur antara lain cincin aromatik, alkena, senyawa alifatik mengandung fluor, amina tertier, dan ikatan regang C-N (*C-N stretch*). Selain itu juga telah diidentifikasi sebanyak 26 senyawa yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger*, dengan aktivitas sebagai sitotoksik, antimikotik, ntioksidan, antikanker, antiaflatoksin, antifungi, dan antimikroba [7]. Diantara 26 senyawa tersebut, terdapat 7 senyawa yang dihasilkan dengan kuantitas terbanyak. Penelitian untuk mendeteksi dan mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* tersebut dilakukan melalui metode fermentasi substrat cair (*liquid culture*) menggunakan medium *Potato Dextrose Broth* (PDB).

Hasil analisis senyawa bioaktif dalam ekstrak methanol dari *Aspergillus niger* SH2-EGY menggunakan GC-MS yang berhasil

diidentifikasi oleh [6] disajikan pada Tabel 1. Sedangkan senyawa bioaktif utama dalam ekstrak etil asetat dari *Aspergillus niger* yang telah diidentifikasi oleh [7] disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1: Beberapa senyawa bioaktif utama dalam ekstrak methanol dari kultur cair *Aspergillus niger* [6]

S/N	Phytochemical compound	RT (min)	Formula	Molecular weight	Exact mass	Chemical structure
1	6-Acetyl-5- α -mannose	3.201	$C_8H_{14}O_7$	222	222.073953	
2	4-[Dichloromethyl]-2-[2-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)ethyl]amino-6-trichloro	3.613	$C_{13}H_{17}Cl_3N_4$	403	403.989586	
3	2-Furancarboxaldehyde, 5-methyl	3.722	$C_6H_6O_2$	110	110.0367794	
4	2,2,2-Trifluoro-N-[2-(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)]	3.779	$C_{13}H_{23}F_3N_2O_2$	296	296.171164	

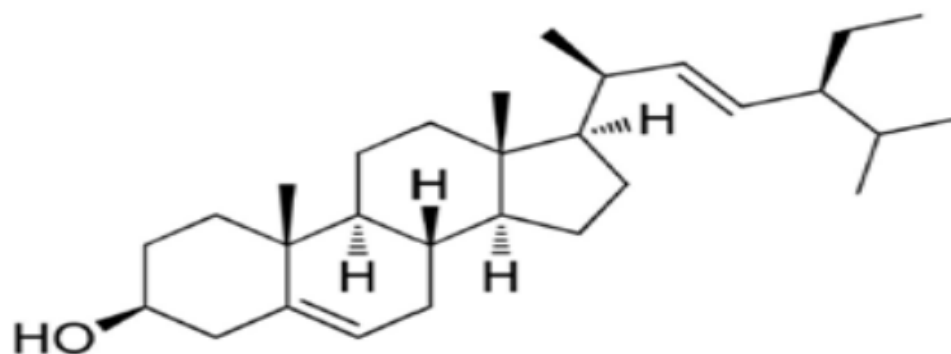
Ekstrak dari kultur *Aspergillus niger* telah diuji kemampuannya sebagai senyawa bioaktif [7]. Senyawa-senyawa tersebut terbukti dapat menginduksi kemampuan tikus percobaan untuk melawan toksin AFB₁ (Aflatoksin B₁) yang dihasilkan oleh *Aspergillus flavus*. Pada tikus yang diperlakukan dengan AFB₁ terjadi gangguan mikrostruktur pada liver dan ginjal sehingga berbeda dengan liver dan ginjal yang normal. Pada pemberian ekstrak fungi baik pada dosis rendah maupun tinggi, terjadi perbaikan mirostruktur sehingga mendekati normal tanpa perlakuan penambahan AFB₁. Efek perbaikan ini dimungkinkan oleh aktivitas senyawa yang dihasilkan oleh *Aspergillus niger* sebagai antioksidan. Senyawa yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa fenolat,

yang kandungan totalnya dalam ekstrak sangat tinggi, yaitu sekitar 940 mg setara dengan asam askorbat /g ekstrak. AFB₁ diketahui dapat merusak sel-sel dalam organ karena meningkatkan kadar ROS (*Reactive Oxygen Species*), sedangkan antioksidan berperan menurunkan ROS sehingga dapat memperbaiki kerusakan sel oleh pengaruh negatif dari AFB₁.

Tabel 2: Senyawa bioaktif utama dalam ekstrak etil asetat dari kultur cair *Aspergillus niger* SH2-EGY [7]

No.	RT	Area %	Identified compounds (M.W.)
1	12.18	2.30	Oridonin ^a (364)
2	14.30	2.04	5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic acid (302)
3	14.44	1.75	24, 25-Dihydroxycholecalciferol (416)
4	31.11	1.58	Butylated hydroxytoluene ^c (220)
5	34.86	2.34	α-D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetyl amino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate ^d (331)
6	35.22	1.78	Thalicpureine (385)
7	35.29	0.94	3-Desoxo-3,16-dihydroxy-12-desoxyphorbol 3,13,16,20-tetraacetate (534)
8	35.36	1.65	Quercetin trimethyl ether (344)
9	37.56	1.17	(2R,3R,5S,2'R,5'R,8' abeta)-2-Methoxy-5-(3-furyl)-2' alpha-methyl-4' aalpha-(acetoxymethyl)-4,5-dihydrodispiro[furan-3(2H),1'-decalin-5',2''-oxirane]-4' alpha,6'beta-diol diacetate (520)
10	38.20	0.91	1,2-Bis[1-(2-hydroxyethyl)-3,6-diazahomoadamantantydene-9] hydrazin ^{b,c, d, e, f, g} (416)
11	39.79	2.34	α-D-Glucopyranosiduronic acid, 3-(5-ethylhexahydro-2,4,6-trioxo-5-pyrimidinyl)-1,1-dimethylpropyl 2,3,4-tris-O-(trimethylsilyl)-, methyl ester ^d (648)
12	39.96	11.51	D-(-)-Fructopyranose, pentakis(trimethylsilyl) ether ^{a, d} (540)
13	40.20	12.75	1,2-Bis[1-(2-hydroxyethyl)-3,6-diazahomoadamantantydene-9] hydrazin ^{c, d} (437)
14	40.97	3.79	alpha-D-Glucopyranoside, methyl 2,3,4,6-tetraakis-O-(trimethylsilyl)- (482)
15	41.62	3.44	Heptasiloxane, Hexadecamethyl- (532)
16	42.16	6.78	Octadecanamide, N- (2- methyl propyl)-N-nitroso (368)
17	42.80	2.27	5Z,8Z,11Z-elcosatrienoic acid (306)
18	43.17	7.60	Trimethylsilyl ether-glucitol (614)
19	44.49	14.78	1,2,3,4,6-Penta-trimethylsilyl Glucopyranose ^{a, d} (540)
20	46.83	1.53	Didodecyl 3,3'-thiodipropionate ^c (514)
21	47.05	0.88	1H-Purin-6-amine, [(2-fluorophenyl)methyl] (243)
22	48.71	1.41	Pentasiloxane, dodecamethyl ^{b, c} (384)
23	55.76	9.20	Bis (2-ethylhexyl) phthalate (390)
24	56.92	0.83	3-Pyridinecarboxylic acid (597)
25	60.04	1.52	5H-Cyclopropa[3,4]benz[1,2-e]azulen-5-one, 9,9a-bis (acetyloxy)-1,1 a,1b,2,4a,7a,7b,8,9,9adecahydro-2,4a,7b-trih ydroxy-3-(hydroxymethyl)-1,1,6,8-tetramethyl (464)
26	60.72	1.96	Flavone 4'-OH,5-OH,7-Di-O-Glucoside ^d (594)

Trichoderma sp. adalah contoh lain dari kapang lignoselulolitik yang mampu menghasilkan berbagai senyawa bioaktif yang berperan sebagai penghambat pertumbuhan fungi patogen pada tanaman. Masing-masing spesies dari genus *Trichoderma* menghasilkan senyawa yang spesifik, tetapi memiliki peran yang sama dalam menghambat fungi patogen. Senyawa-senyawa tersebut, antara lain adalah stigmasterol yang dihasilkan oleh *T. harzianum* dan *T. koningii*. Struktur dari stigmasterol dapat diikuti pada Gambar 1.



Gambar 1: Struktur kimia dari stigmasterol [8]

Stigmasterol adalah senyawa dalam kelompok steroid. Selain steroid, masih banyak senyawa lain yang dihasilkan oleh kapang lignoselulolitik dari genus *Trichoderma*. Stigmasterol menunjukkan aktivitas sebagai anti pertumbuhan untuk fungi patogen *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, dan *Fusarium oxysporum*.

Rhizoctonia solani merupakan fungi patogen tular tanah (*soilborne*) penyebab *damping-off* (*seedling disease*) atau rebah kecambah pada berbagai tanaman, sebagai contoh penyakit rebah kecambah pada tanaman kedelai yang terjadi di negara-negara bagian utara Amerika [9]. *Rhizoctonia solani* memiliki morfologi yang bervariasi, jenis tumbuhan yang dapat menjadi inang sangat beragam, dan sangat agresif dalam menyebabkan penyakit pada

tanaman. Infeksi *Rhizoctonia solani* dimulai dari perkecambahan *sclerotia* yang selanjutnya berkembang menjadi miselia. Perkembangan miselia akan dipicu oleh *eksudat* yang dikeluarkan tanaman inang sebagai respon pertahanan terhadap penempelan miselia fungi patogen pada inang.

Sclerotium rolfsii adalah patogen tanaman yang menyebabkan *blight disease* (penyakit hawar) yang menular dengan cepat dan mencapai area yang luas. Tanaman yang diserang oleh *Sclerotium rolfsii* antara lain adalah kacang tanah (*Phaseolus vulgaris*), seperti yang dilaporkan terjadi di Uganda [10].

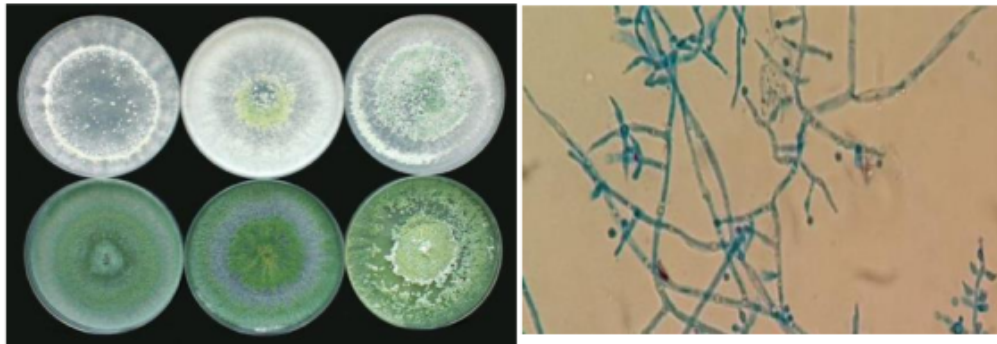
Fusarium oxysporum juga merupakan fungi patogen tular tanah yang menyerang berbagai tanaman. Jenis tanaman yang diserang terkadang spesifik varietas dari fungi ini, misalnya yang menyerang tanaman pisang adalah *Fusarium oxysporum* var. *cubense*, yang menyerang tanaman kacang-kacangan adalah *Fusarium oxysporum* var. *pisi*, sedangkan yang menyerang ubi rambat adalah *Fusarium oxysporum* var. *batatas* [11].

Fungi patogen lainnya yang menyerang berbagai tanaman adalah *Macrophomina phaseolina*. Fungi ini menyebabkan penyakit pembusukan pada bagian batang dan akar, akar menjadi berwarna hitam seperti arang (*charcoal root*), dan pembusukan kecambah dari kedelai, sorghum, dan kacang tanah [12]. Senyawa stigmasterol yang dihasilkan oleh *T. harzianum* dan *T. koningii* memiliki aktivitas antifungi pada keempat fungi patogen tersebut [8].

Mekanisme antifungi dari metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang lignoselulolitik ada empat mekanisme. Mekanisme yang pertama adalah kombinasi aksi dari metabolit sekunder dengan enzim-enzim hidrolitik, sebagai contoh terjadinya interaksi aktivitas Gliotoxin (senyawa metabolit sekunder) dengan endochitinase (enzim hidrolitik) dalam menghambat perkecambahan spora jamur

Botrytis cinerea. *Botrytis cinerea* adalah fungi patogen yang menginfeksi buah dan daun hingga menyebabkan tanaman mati. Mekanisme antifungi yang lain adalah: induksi *apoptosis*, memicu respon sistem pertahanan tanaman, dan kompetisi perolehan nutrisi antara fungi patogen dengan *Trichoderma* [8].

Morfologi dari *Trichoderma* secara makro dan mikroskopis dapat diikuti pada Gambar 2. Dari morfologi secara makroskopis pada media PDA nampak pertumbuhan sirkuler dengan konidia berwarna hijau. Pada struktur secara mikroskopis menunjukkan bahwa miselia *Trichoderma* adalah miselia bersepta. Miselia bercabang untuk membentuk konidiofor dan di setiap ujung konidiofor terbentuk konidia (spora).



Gambar 2: *Trichoderma* sp. (A). Morfologi koloni *Trichoderma* sp. dalam media PDA (Błaszczuk *et al.*, 2014) dan (B). Struktur mikroskopis *Trichoderma* sp. [13]

Biosintesis senyawa bioaktif oleh kapang lignoselulolitik

Senyawa bioaktif yang merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman atau mikroorganisme, disintesis melalui jalur asam shikimat (*Shikimic Acid Pathway* = SAP). SAP merupakan jalur reaksi yang terdiri atas tujuh langkah yang melibatkan penggunaan serangkaian enzim [5, 14-15]. Metabolit sekunder disintesis tidak berkaitan dengan kebutuhan dan kepentingan primer organisme dalam kehidupannya, akan tetapi melalui SAP terjadi *link* antar jalur metabolisme primer dan sekunder. SAP

membutuhkan substrat berupa senyawa hasil metabolisme glukosa (*Glycolysis Pathway*) dan senyawa hasil dari jalur pentosa fosfat (*Pentose Phospate Pathway*).

SAP merupakan reaksi biokimia untuk menyediakan berbagai senyawa *prekursor* dari molekul-molekul aromatik yang memiliki aktivitas biologis dan terjadi pada tanaman dan mikroorganisme. Pada mikroorganisme SAP menghasilkan asam amino aromatis, yaitu L-Phenylalanin (L-Phe), L-Tyrosin (L-Tyr), dan L-Tryptophan (L-Trp). Jalur-jalur metabolisme yang dimulai dari SAP hingga jalur pembentukan asam amino aromatik ini menjadi jalan untuk tersedianya berbagai metabolit sekunder penting, antara lain asam klorogenat, alkaloid, tannin, maupun tokoferol [15].

Tahap-tahap reaksi yang terjadi pada SAP adalah sebagai berikut [5, 14-15]:

- 1). SAP ini dimulai dengan reaksi pertama berupa kondensasi antara fosfo-enol-piruvat (*Phosphoenolpyruvate* = PEP) dari jalur glikolisis dengan eritrosa-4P dari jalur pentosa fosfat untuk menghasilkan senyawa asam 3-deoksi-D-arabino-heptulosonik-fosfat (DAHP). Reaksi kondensasi ini dikatalisis oleh enzim DAHP-sintase. Kofaktor yang dibutuhkan untuk aktivitas enzim DAHPS adalah Co^{2+} , Mg^{2+} atau Mn^{2+} .

- 2). Reaksi yang kedua adalah pengubahan DHAP menjadi senyawa siklis DHQ (dehydroquinic acid = asam dehidro quinon), melalui reaksi siklisasi intramolekuler. Enzim yang berperan sebagai katalisator dari reaksi ini adalah enzim DHQS (EC. 4.2.3.4)) yang merupakan enzim C-O liase, sehingga dapat memutus ikatan C-O pada molekul DAHP dan membentuk ikatan siklis. Enzim DHQS membutuhkan kofaktor berupa ion Co^{2+} dan NAD^+ . NAD^+ merupakan kofaktor yang terikat kuat pada enzim DHQS. Apabila

di dalam medium terdapat substrat DHAP, maka dengan segera NAD^+ akan terdisosiasi dan menempel pada enzim DHQS untuk menjadi katalisator perubahan DHAP menjadi DHQ.

3). Reaksi ketiga adalah perubahan DHQ menjadi 3-dehydroshikimic acid (DHS) dengan mengambil satu molekul air. Reaksi ini merupakan reaksi yang *reversible* (dapat balik) dan dikatalisis oleh enzim 3-dehydroquininate dehidratase (EC 4.2.1.10). Enzim 3-dehydroquininate dehidratase memiliki dua jenis struktur yang berbeda, yaitu tipe I yang tidak tahan panas dan terdapat pada tanaman tingkat tinggi. Tipe II adalah enzim 3-dehydroquininate dehidratase yang tahan panas dan terdapat pada fungi. Pembentukan DHS ini merupakan titik cabang (*branch point*) ke shikimic acid dan ke jalur katabolisme quinat. Apabila DHS mengalami pengambilan satu molekul (dehidratasi), maka akan membentuk *protocathuic acid* atau *gallic acid*, salah satu komponen dari tannin. Tannin adalah salah satu senyawa bioaktif dari kelompok senyawa fenolat (*phenolic compounds*) [16].

4). Reaksi berikutnya (keempat) adalah pengurangan karbonil dari gugus keton dari DHS. Reaksi ini merupakan reaksi reduksi DHS dengan melibatkan NADPH , dan enzim shikimat dehidrogenase (SDH, EC. 1.1.1.25) menghasilkan **asam shikimat**.

Enzim yang berperan dalam mengkatalisis reaksi ketiga dan keempat adalah enzim yang sama, akan tetapi memainkan dua peran yang berbeda. Peran pertama adalah mengkatalisis pengambilan molekul air (dehidratasi) untuk mengubah DHQ menjadi DHS, sehingga disebut enzim **DHQ dehidratase**. Peran kedua adalah mengkatalisis reaksi reduksi DHS menjadi asam shikimat, sehingga disebut **SDH, shikimic dehidrogenase**.

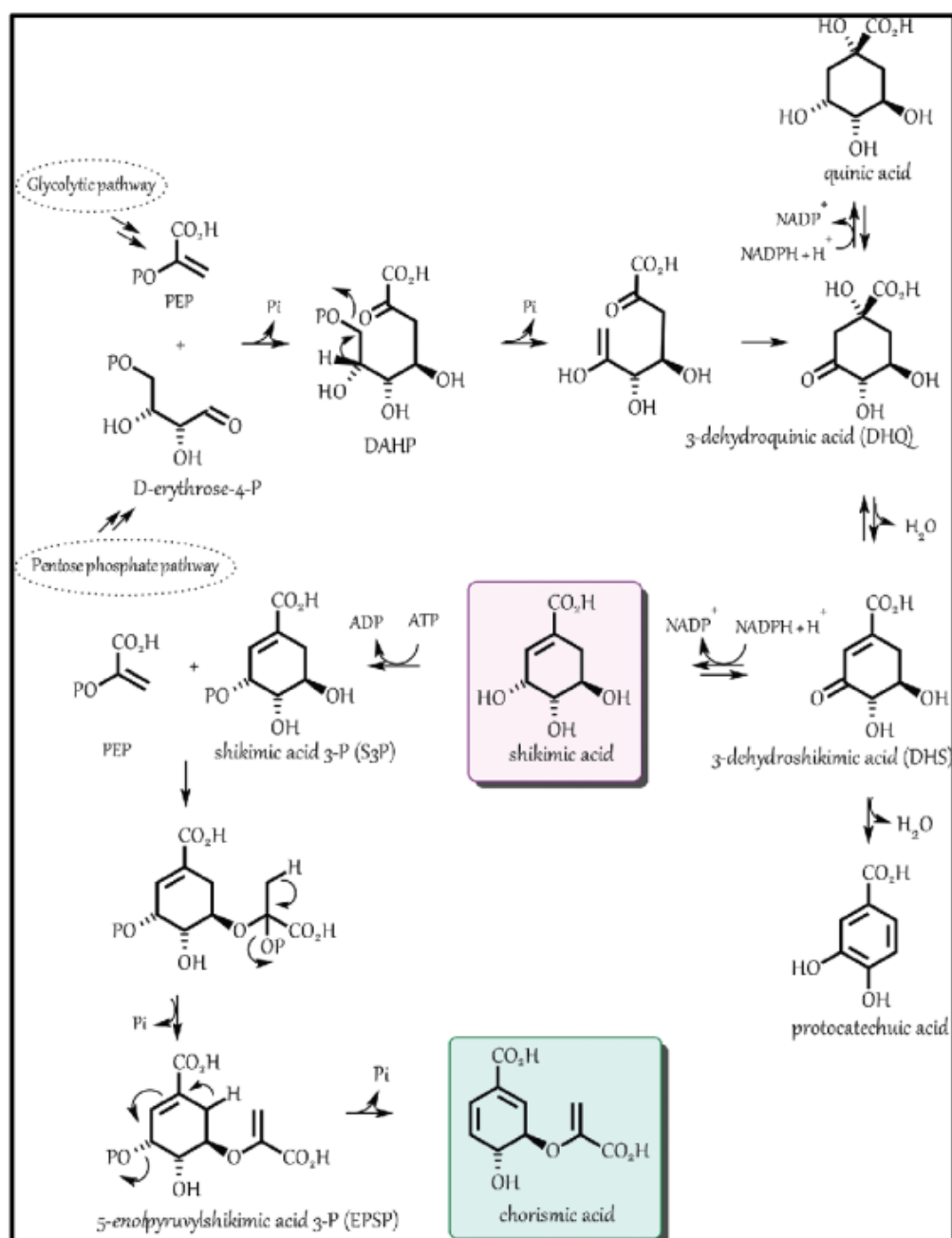
5). Reaksi kelima dalam SAP adalah fosforilasi shikimic acid menggunakan enzim shikimat kinase (SK, EC.2.7.1.71) dan ATP

menghasilkan shikimic acid 3-phosphate (S3P) dan ADP. Enzim SK adalah enzim yang penting pada beberapa bakteri patogen, dan tidak terdapat pada sel manusia.

6). Reaksi kelima adalah kondensasi S3P dengan PEP yang dikatalisis oleh enzim 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase (EPSPS, EC. 2.5.1.19) menghasilkan 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate (EPSP). Pada reaksi ini juga akan dilepaskan satu molekul fosfat organik (Pi).

Enzim EPSPS merupakan enzim dalam SAP yang sudah dipelajari dengan mendalam karena merupakan enzim yang berperan pada reaksi setahap sebelum tahap akhir reaksi. Apabila enzim EPSPS ini terhambat aktivitasnya, maka tidak akan terjadi reaksi tahap akhir yang menghasilkan chorismic acid, bahkan akan terjadi akumulasi shikimic acid dan tidak akan terbentuk asam amino aromatik sebagai dasar terbentuknya senyawa-senyawa fenolat.

7). Reaksi ketujuh atau terakhir adalah pembentukan *chorismic acid* dari EPSP, melalui reaksi pelepasan satu molekul fosfat organik (Pi) pada C-3 dari EPSP. Reaksi ini dikatalisis oleh *chorismate synthase* (CS, EC. 4.2.3.5), yang membutuhkan bentuk tereduksi dari flavin mononukleotida (FMNH₂). Gambaran lengkap dari jalur biosintesis senyawa fenolat pada tanaman dan juga fungi dapat diikuti pada Gambar 3.



Gambar 3: Jalur asam shikimat (*Shikimic Acid Pathway*) sebagai jalur biosintesis senyawa bioaktif pada tanaman dan mikroorganisme [5]

Chorismic acid yang dihasilkan melalui SAP selanjutnya akan mengalami transformasi menjadi asam amino aromatik L-Phe, L-Tyr, dan L-Trp. L-Phe dan L-Tyr akan ditransformasi lebih lanjut menjadi *phenolic compounds*, sedangkan L-Trp menjadi alkaloids

yang telah banyak diteliti akan kemampuannya untuk tumbuh pada material yang mengandung lignoselulosa adalah *Trichoderma oxysporum* dan *T. viridae*. Kapang lignoselulolitik yang diisolasi dari area yang berbeda akan berbeda juga jenisnya, karena masing-masing tempat memiliki lingkungan yang tidak sama baik suhu, kelembaban, kadar oksigen, pH, maupun intensitas cahaya. Telah berhasil diisolasi kapang lignoselulolitik dari material tanaman yang melapuk di area tanah bagian utara Maroko [3]. Jenis yang didapatkan adalah *Mucor circinelloides*, *Mucor racemosus*, *Penicillium brasilianum*, *Penicillium crustosum*, *Paecilomyces sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fischeri*, *Curvularia spicifera*, *Humicola grisea*, *Trichoderma atroviride*, dan *Cosmospora viridescens*.

Metode isolasi yang digunakan adalah metode pengenceran seri sampel tanah menggunakan pengencer *aquadest* steril. Pengenceran dilakukan hingga tingkat 10^{-6} . Selanjutnya dilakukan penanaman hasil pengenceran dari tingkat 10^{-5} dan 10^{-6} pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*). Penanaman dilakukan sebanyak masing-masing dua ulangan pada dua petridish.

Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sebagian besar koloni yang tumbuh adalah jamur uniseluler atau khamir (*yeast*). Hasil pengamatan yang merujuk pada koloni khamir disimpulkan melalui pengamatan morfologi koloni. Koloni yang banyak muncul adalah koloni dengan bentuk irreguler, tepian variate, dan tidak nampak adanya struktur berbenang-benang. Hanya beberapa koloni yang menunjukkan ciri morfologi kapang (*molds*), yaitu koloni berwarna hijau dan putih dari sampel lokasi B (lokasi parkir kendaraan di sebelah barat auditorium Unnes) dari pengenceran 10^{-5} .

Isolat kapang yang diperoleh dari area kampus Unveritas Negeri Semarang (Unnes), di daerah Gunungpati, Kota Semarang telah diidentifikasi secara molekuler. Data identifikasi isolat kapang

adalah dari genus *Trichoderma*, yaitu *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis*. *Trichoderma* sp. diketahui merupakan salah satu genus kapang lignoselulolitik [3]. Isolat ini adalah isolat dominan dari sampel tanah yang diambil dari empat area di lingkungan kampus Unveritas Negeri Semarang.

Metode produksi senyawa bioaktif oleh kapang lignoselulolitik

Metode produksi senyawa fenolat dari kapang lignoselulolitik *Aspergillus niger* yang telah dilakukan adalah menggunakan metode fermentasi kultur cair dalam medium *Potato Dextrose Broth* [6-7]. Media PDB merupakan *defined media* yang harganya mahal. Kebutuhan untuk penyediaan media PDB akan meningkatkan biaya produksi, terutama bila akan dilakukan proses produksi secara massal.

Kondisi pertumbuhan *Aspergillus niger* dalam fermentasi substrat cair adalah pada kisaran suhu 25-28 °C, menggunakan shaker yang bergerak dengan kecepatan 130 – 150 rpm, selama 7 – 16 hari. Proses fermentasi dengan kondisi pertumbuhan seperti ini membutuhkan biaya operasional yang tinggi, terutama untuk penjagaan suhu (di bawah rata-rata suhu kamar) dan penyediaan alat *incubator shaker* yang harus menggunakan daya listrik.

Pada fermentasi kultur cair menggunakan kapang memang dibutuhkan *shaker* agar supaya miselium tersebar merata dalam medium dan tidak menggumpal membentuk pelet agar pertumbuhan kapang bisa maksimal. Pertumbuhan maksimal kapang sangat mempengaruhi produksi senyawa bioaktif dari kelompok fenolat ini. Pengoperasian *shaker* membutuhkan biaya tinggi dan diperlukan pula analisis kecepatan *shaker* yang tepat untuk setiap jenis kapang yang berbeda.

Pemanenan produk fermentasi kultur cair membutuhkan proses pemisahan miselium kapang menggunakan sentrifus

kecepatan tinggi dan suhu rendah (5000 rpm, 4 °C) yang tidak mudah tersedia. Pada pemanenan fermentasi kultur cair ini juga harus dilakukan proses ekstraksi menggunakan pelarut *ethyl acetat* dan *methanol* yang mahal dan tidak aman untuk kesehatan. Oleh karena itu, fermentasi kultur cair pada produksi senyawa bioaktif dari kapang kurang optimal dan efisien dalam memenuhi kebutuhan senyawa bioaktif yang semakin meningkat.

Fermentasi substrat padat (*Solid State Fermentation* = SSF) adalah metode fermentasi alternatif, yang dapat dipilih untuk menggantikan fermentasi substrat cair dalam produksi senyawa fenolat. Fermentasi menggunakan substrat pertumbuhan kapang dalam bentuk padat lebih sesuai dengan sifat alami dari kapang. Kapang merupakan anggota Kingdom Fungi yang memiliki struktur berupa miselium. Miselium adalah jaringan yang tersusun atas hifa. Selama pertumbuhan kapang, hifa akan semakin memanjang dan bercabang. Pemanjangan dan percabangan hifa akan menembus substrat atau media pertumbuhan yang berupa material padat. Proses ini merupakan ciri khas kapang dalam kehidupannya di alam.

Kapang lignoselulolitik (KLS) yang dikultur secara SSF dapat menggunakan material berupa hasil samping (*by product*) proses budidaya tanaman, seperti batang singkong, jerami padi, ampas tebu, maupun hasil samping dari industri pengolahan pangan yang berlimpah dan murah sebagai media pertumbuhan. *Aspergillus niger* terbukti mampu tumbuh pada media batang singkong melalui fermentasi substrat padat [18]. Batang singkong merupakan material yang dominan mengandung lignoselulosa, sehingga dapat dipastikan bahwa *Aspergillus niger* mampu menghasilkan enzim-enzim pendegradasi lignoselulosa.

Teknik SSF menggunakan KLS dapat memainkan dua peran sekaligus. Peran pertama adalah produksi senyawa bioaktif, khususnya senyawa fenolat, menggunakan KLS sebagai agen biokonversi, dan peran kedua adalah dekomposisi material lignoselulosa sehingga dapat mengurangi volume material *by product* dan mengatasi pencemaran lingkungan dari penumpukan hasil samping.

KLS dapat mendegradasi material lignoselulosa (Ls) karena kemampuannya dalam menghasilkan enzim-enzim pemecah Ls yaitu ligninase, selulase, dan hemiselulose [4]. Enzim-enzim ini merupakan sistem enzim hidrolitik dan oksidatif [16], misalnya enzim pendegradasi selulosa terdiri atas enzim-enzim hidrolitik exoglukanase, endoglukanase, dan β -glukosidase. Di dalam sistem enzim proses hidrolisis polimer berlangsung secara sinergis, tidak berdiri sendiri-sendiri. Sedangkan enzim-enzim oksidatif adalah sistem enzim ligninolitik, yang terdiri atas enzim manggan peroksidase, lignin peroksidase, dan lakase. Selama proses fermentasi, akan terjadi degradasi lignin oleh KLS yang akan membebaskan beberapa senyawa fenolat. KLS juga dapat memproduksi sendiri senyawa fenolat sebagai contoh *mycophenolic acid*, *dicerandrol C*, *phenylacetates*, *anthraquinones*, *benzofurans* dan *alkenyl phenols* yang memiliki manfaat kesehatan sebagai antitumor, antimikrobia, antioksidan dan aktivitas antiviral [4].

Kapang yang telah digunakan untuk menghasilkan senyawa bioaktif pada bahan pangan adalah dari spesies *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, dan *Aspergillus oryzae* menggunakan SSF dengan substrat sereal (biji-bijian) dalam review dari beberapa sumber [4]. Efek antioksidan dari sereal meningkat melalui penggunaan kapang, akan tetapi tingkat antioksidannya bervariasi tergantung jenis kapang dan jenis biji-bijian yang digunakan.

Hasil samping industri pengolahan pangan juga sudah digunakan sebagai substrat pertumbuhan KLS untuk menghasilkan senyawa-senyawa fenolat dan terbukti dapat memberikan hasil ekstrak tertinggi. Percobaan yang telah dilakukan adalah menggunakan ampas buah zaitun dari industri pengolahan minyak zaitun [19]. Aktivitas biologis ekstrak hasil fermentasi yang telah diuji adalah sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan tertinggi diperoleh dari ekstrak ampas zaitun dengan pertumbuhan *R. oryzae* MUM 10.260. Aktivitas antioksidan mencapai lebih dari 12 kali dibandingkan ekstrak dari ampas zaitun yang tidak difermentasi.

Diantara makhluk hidup, fungi merupakan sumber senyawa alami yang berperan dalam mendukung kesehatan manusia, seperti antibiotik. Fakta pertama yang fenomenal adalah dihasilkannya antibiotik penicillin oleh KLS *Penicillium chrysogenum*. Disamping juga telah diperoleh bukti dihasilkannya senyawa fumagilin oleh KLS *Aspergillus fumigatus* yang memiliki aktivitas biologis sebagai antitumor [20]. Penelitian terus dilakukan pada potensi kapang dan juga efisiensi produksi senyawa bioaktif agar supaya diperoleh pengetahuan yang lebih lengkap tentang senyawa yang dapat dihasilkan, aktivitas biologisnya, dan stabilitas produksi serta keamanan produknya. Hasil yang diharapkan adalah produk yang aman, efektif, dan tidak toksik [21].

1.4. Implementasi

Kapang lignoselulolitik mampu menghasilkan enzim-enzim dari kelompok lignolitik, selulolitik, dan hemiselulolitik. Kelompok enzim-enzim ini bekerja secara sinergis dalam mendegradasi senyawa lignoselulosa yang terdiri atas lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Oleh karena itu kapang jenis ini berperan dalam proses dekomposisi bahan organik, termasuk guguran daun, hasil

samping budidaya tanaman, maupun *by-product* dari industri pengolahan hasil pertanian.

Dalam proses degradasi senyawa lignoselulosa, kapang tidak hanya melakukan proses dekomposisi bahan organik sisa tetapi juga berperan dalam pelepasan senyawa fenolat maupun sintesis senyawa fenolat dalam tahap metabolisme sekundernya. Kapang dapat mendegradasi lignin dan menghidrolisis selulosa.

Proses degradasi lignin oleh kapang lignoselulolitik dapat melepaskan asam-asam fenolat (*phenolic acids*) yang sebelumnya terikat dalam struktur lignin, seperti asam ferulat (*ferulic*) dan komurat (*coumaric*) karena asam fenolat membentuk ikatan silang (*crosslink*) dengan gula dan lignin dalam mendukung sifat kaku dari tanaman [22]. Asam fenolat merupakan anggota dari kelompok senyawa fenolat (*phenolic compounds*), yaitu kelompok senyawa yang memiliki aktivitas biologis (bioaktif) bagi manusia dan hewan.

1.5. Ringkasan

Senyawa bioaktif adalah sekelompok senyawa yang memiliki aktivitas biologis bagi kesehatan manusia, dan hewan. Senyawa ini merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman maupun mikroorganisme. Salah satu kelompok senyawa bioaktif yang banyak diproduksi dan sudah diketahui memiliki peran penting bagi manusia adalah senyawa fenolat, yang terdiri atas flavonoid, fenolat, dan tannin. Senyawa fenolat disintesis melalui jalur asam shikimat (*Shikimic Acid Pathway* = **SAP**). SAP merupakan jalur biosintesis senyawa fenolat yang terdapat pada tanaman dan mikroorganisme, termasuk fungi.

Senyawa bioaktif yang diproduksi oleh kapang lignoselulolitik antara lain berperan sebagai antibiotik, antikanker, antioksidan, antifungi untuk mencegah pertumbuhan fungi patogen tanaman. Proses produksi yang efisien adalah melalui metode

fermentasi substrat padat (*Solid state Fermentation* = SSF) menggunakan substrat pertumbuhan material lignoselulosa dari *by product* budidaya tanaman dan industri pengolahan pangan. Pemanfaatan kapang lignoselulolitik menggunakan metode SSF ini dapat diterapkan untuk produksi senyawa bioaktif, terutama senyawa-senyawa fenolat dan sekaligus dapat mengurangi kuantitas limbah padat.

Daftar Pustaka

- [1] Liu, RH. 2004. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer*. 0022-3166/04 \$8.00 © 2004 American Society for Nutritional Sciences. Downloaded from <https://academic.oup.com/jn/article-abstract/134/12/3479S/4688708> on 05 February 2018
- [2] Wu, X; Zha, J, and Koffas, MAG. 2020. Microbial production of bioactive chemicals for human health. *Current Opinion in Food Science* 2020, 32:9–16, *Functional foods and nutrition*, edited by Andreas Schieber. Available online at www.sciencedirect.com. ScienceDirect
- [3] M'barek, HN; Taidi, B; Smaoui, T; Ben Aziz, M; Mansouri, A and Hajjaj, H. 2019. Isolation, screening and identification of ligno-cellulolytic fungi from northern central Morocco. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2019 23(4), 207-217. Available online 10 October 2019. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>
- [4] Verduzco-Oliva, R and Gutierrez-Urbe, JA. 2020. Beyond Enzyme Production: Solid State Fermentation (SSF) as an Alternative Approach to Produce Antioxidant Polysaccharides. *Sustainability* 2020, 12, 495. doi:10.3390/su12020495 www.mdpi.com/journal/sustainability
- [5] Santos-Sánchez, NF; Salas-Coronado, R; Hernández-Carlos, B and Villanueva-Cañongo, C. 2019. Shikimic Acid Pathway in

Biosynthesis of Phenolic Compounds. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*. Intechopen © 2019 <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>

- [6] Hameed, IH; Hamza, LF and Kamal, SA. 2015. Analysis of bioactive chemical compounds of *Aspergillus niger* by using gas chromatography-mass spectrometry and fourier-transform infrared spectroscopy. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Vol. 7(8), pp. 132-163, August 2015. DOI: 10.5897/JPP2015.0354 ISSN 2141-2502. Copyright © 2015. <http://www.academicjournals.org/JPP>
- [7] Abdel-Wahhab, MA; El-Nekeety, AA. ; Hathout, AS.; Salman, AS.; Abdel-Aziem, SH. ; Sabry, BA. ; Hassan, NS. ; Abdel-Aziz, MS. ; Aly, SE. ; and Jaswir, I. 2020. Bioactive compounds from *Aspergillus niger* extract enhance the antioxidant activity and prevent the genotoxicity in aflatoxin B1-treated rats. *Toxicon* 181 (2020) 57–68. Available online 28 April 2020 at ScienceDirect. <http://www.elsevier.com/locate/toxicon>. 0041-0101/© 2020 Elsevier Ltd.
- [8] Khan, RAA; Najeeb, S; Hussain, S; Xie, B and Li, Y. 2020. Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi *Microorganisms* 8, 817; Published: 29 May 2020. doi:10.3390/microorganisms8060817. www.mdpi.com/journal/microorganisms
- [9] Ajayi-Oyetunde, OO and Bradley, CA. 2018. *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of rhizoctonia seedling disease of soybean. *Plant Pathology* 67, 3–17. DOI: 10.1111/ppa.1273. Published online 2 August 2017. © 2017 British Society for Plant Pathology
- [10] Paparu, P ; Acur, A; Kato, F; Acam, C; Nakibuule, J; Nkuboye, A; Musoke, S and Mukankusi, C. 2020. Morphological and Pathogenic Characterization of *Sclerotium rolfsii*, the Causal Agent of Southern Blight Disease on Common Bean in Uganda. *Plant Disease* 104:2130-2137. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2144-RE>

- [11] Arie, T. 2019. *Fusarium* diseases of cultivated plants, control, diagnosis, and molecular and genetic studies. *J. Pestic. Sci.* 44(4), 275–281. Accepted September 1, 2019. DOI: 10.1584/jpestics.J19-03
- [12] Marquez, N; Giachero, ML; Declerck, S and Ducasse, DA. 2021. *Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. *Frontiers in Plant Science*. www.frontiersin.org. 1 April 2021. Volume 12 Article 634397
- [13] Yan, ZK and Anh, VTT. 2018. Effect of *Trichoderma* sp. on Anthracnose Disease of Stored Chilli. *Borneo Journal of Resource Science and Technology* 8(2): 90-102. Published: 30 December 2018
- [14] Hermann, KM & Weaver, LM. 1999. The Shikimate Pathway . *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:473–503. © 1999 by Annual Reviews.
- [15] Tohge, T; Watanabe, M; Hoefgen, R and Fernie, AR. 2013. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage (REVIEW ARTICLE). *Frontier in Plant Science* March 2013 Volume 4 Article 62. www.frontiersin.org. published: 27 March 2013 doi: 10.3389/fpls.2013.00062
- [16] Martins, S; Mussatto, SI; Martínez-Avila, G; Montañez-Saenz, J; Aguilar, CN and Teixeira, JA. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29 (2011) 365–373. www.elsevier.com/locate/biotechadv. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.01.008
- [17] Mtui, GYS. 2012. Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates and applications. *Scientific Research and Essays* Vol. 7(15), pp. 1544-1555, 23 April, 2012. Available online at <http://www.academicjournals.org/SRE> Accepted 5 April, 2012. DOI: 10.5897/SRE11.1812. ISSN 1992-2248 ©2012 Academic Journals
- [18] Dewi, P; Indrati, R; Millati, R and Sardjono. 2020. Process design for bioconversion of cassava stalk through solid substrate

- fermentation. *Journal of Physics: Conference Series* 1567 (2020) 032054. 6th International Conference on Mathematics, Science, and Education (ICMSE 2019). IOP Publishing doi:10.1088/1742-6596/1567/3/032054
- [19] Leite, P; Silva, C; Salgado, JM and Belo, I. 2019. Simultaneous production of lignocellulolytic enzymes and extraction of antioxidant compounds by solid-state fermentation of agro-industrial wastes. *Industrial Crops & Products* 137 315–322. Accepted 18 April 2019. www.elsevier.com/locate/indcrop <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.044>. © 2019 Elsevier B.V.
- [20] Sanchez, S and Demain, AL. 2017. Bioactive Products from Fungi (Chapter 3). *Food Bioactives* edited by M. Puri. DOI 10.1007/978-3-319-51639-4_3. © Springer International Publishing AG 2017
- [21] Srivastava, AK. 2019. The role of fungus in bioactive compound production and Nanotechnology. *Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology*. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817004-5.00009-9> Copyright © 2019 Elsevier Inc.
- [22] Cocero, MJ; Cabeza, A; Abad, N; Adamovic, T; Vaquerizo, L;. Martínez, CM and Pazo-Cepeda, MV.2017. Understanding biomass fractionation in subcritical & supercritical Water. *The Journal of Supercritical Fluids*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.08.012>

Produksi Antioksidan Melalui Kultur *In Vitro*

Noor Aini Habibah

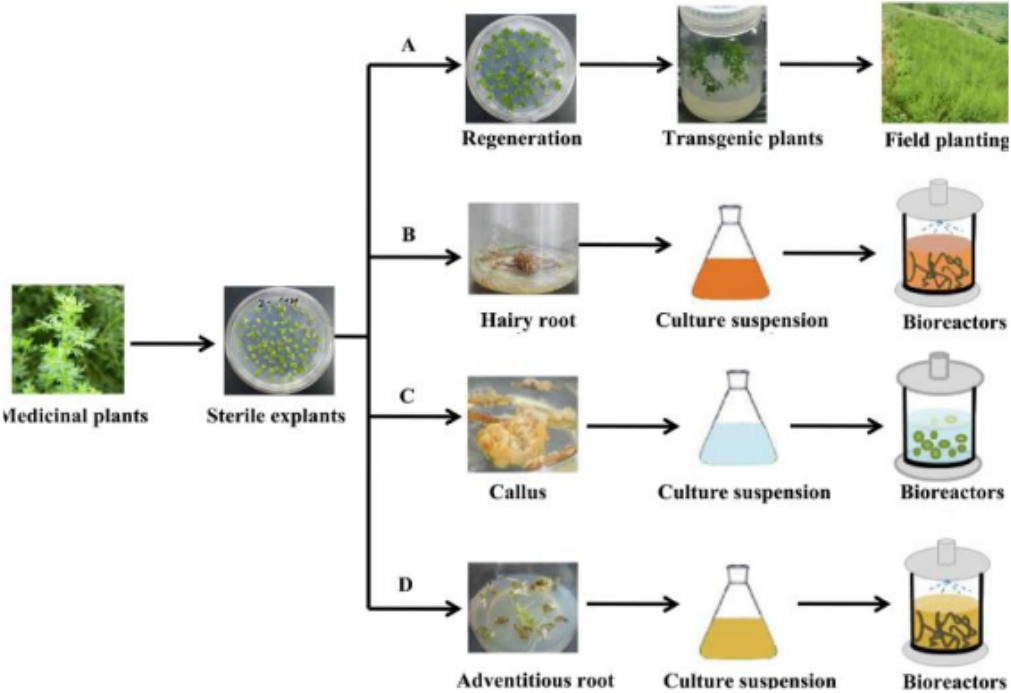
Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang

Email : nooraini@mail.unnes.ac.id

2.1 Pendahuluan

Salah satu aplikasi kultur jaringan adalah untuk produksi senyawa bioaktif dari tanaman. Produksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan telah banyak dilaporkan [1,2,3]. Keuntungan penggunaan kultur jaringan dalam produksi senyawa bioaktif antara lain: setiap sel dapat diperbanyak, tidak bergantung kepada kondisi lingkungan, efisiensi penggunaan lahan, sel dapat diseragamkan, kondisi dapat terkontrol, proses metabolismenya dapat diatur, hasil dan mutu produksi lebih mantap dan stabil dan dapat menghasilkan metabolit jenis lain. Produksi senyawa bioaktif melalui kultur jaringan dapat dilakukan melalui berbagai jalur (Gambar 5). Jalur pertama menggunakan eksplan dari tanaman berpotensi obat untuk menghasilkan bibit dalam jumlah banyak. Bibit tersebut dapat berupa tanaman yang mempunyai sifat sama dengan induk atau dapat juga menghasilkan tanaman yang mempunyai sifat genetik yang berbeda dengan induk jika dilakukan proses transformasi atau induksi variasi somaklonal pada kultur tanaman tersebut. Bibit tersebut ditanam di lahan dan menjadi bahan baku sumber senyawa bioaktif. Jalur kedua menggunakan eksplan dari tanaman berpotensi obat untuk induksi kultur berambut atau hairy root dengan cara induksi menggunakan *Agrobacterium rhizogenes*. Kultur *hairy root*

mempunyai kemampuan tinggi dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Jalur ketiga induksi kalus dari eksplan tanaman berpotensi obat. Kalus diperbanyak dan digunakan sebagai bahan untuk pembuatan kultur suspensi sel. Kultur kalus maupun kultur suspensi sel dapat digunakan untuk proses produksi metabolit sekunder. Jalur keempat adalah induksi akar adventif yang dapat dipelihara dalam medium cair menjadi kultur suspensi dan menjadi sumber senyawa bioaktif [4].



Gambar 5: Jalur produksi senyawa bioaktif menggunakan kultur *in vitro* [4]

Produksi antioksidan dari kultur *in vitro* telah banyak dilaporkan [5,6,7]. Berbagai jenis eksplan, tipe kultur, jenis medium, jenis ZPT, cara analisis antioksidan dan identifikasi senyawa bioaktif telah diteliti. Perlu upaya identifikasi berbagai parameter di atas untuk mendapatkan informasi komprehensif berkaitan dengan produksi antioksidan melalui kultur *in vitro*. Informasi ini bermanfaat untuk pengembangan produksi

antioksidan melalui kultur *in vitro* skala industri maupun pengembangan penelitian berikutnya.

Permasalahan yang perlu dipecahkan dalam pengembangan produksi antioksidan melalui kultur *in vitro* adalah .

1. Tanaman apa saja yang menjadi sumber antioksidan melalui metode kultur *in vitro*?
2. Bagaimana produksi antioksidan tanaman melalui metode kultur *in vitro* berkaitan dengan jenis eksplan, tipe kultur, medium yang digunakan, ZPT yang digunakan?
3. Bagaimana analisis produksi antioksidan tanaman yang dihasilkan melalui metode kultur *in vitro*?

Tujuan penulisan buku ini adalah mengkaji beberapa hal terkait, antara lain:

1. Mengidentifikasi tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi sumber antioksidan melalui metode kultur *in vitro*
2. Menginformasikan produksi antioksidan pada tanaman secara *in vitro* berkaitan dengan jenis eksplan, tipe kultur, medium yang digunakan, ZPT yang digunakan.
3. Menginformasikan analisis produksi antioksidan tanaman yang dihasilkan melalui metode kultur *in vitro*

2.2 Metode

Berdasarkan identifikasi masalah, dilakukan penelitian literature review yaitu kajian hasil penelitian produksi senyawa bioaktif berpotensi antioksidan pada tanaman melalui kultur *in vitro*. Hasil penelitian produksi senyawa bioaktif berpotensi antioksidan pada tanaman melalui kultur *in vitro* dikumpulkan dari beberapa penerbit seperti PubMed, Google Scholar dan Medline. Tulisan ini mengkaji produksi antioksidan melalui kultur *in vitro* secara teoritik dan juga dari hasil penelitian terkait. Kajian yang dilakukan berkaitan dengan informasi:

1. Tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi sumber antioksidan melalui metode kultur *in vitro*
2. Proses produksi antioksidan tanaman secara *in vitro* berkaitan dengan jenis eksplan, tipe kultur, medium yang digunakan, ZPT yang digunakan.
3. Cara analisis produksi antioksidan tanaman yang dihasilkan melalui metode kultur *in vitro*

2.3 Hasil dan Pembahasan

Jenis tanaman, jenis eksplan, tipe kultur, medium serta zat pengatur tumbuh yang digunakan dalam produksi antioksidan secara *in vitro* tersaji pada Tabel 3.

N o	Spesies tanaman	Jenis eksplan	Tipe kultur	Mediu m	ZPT	Peneliti
1	<i>Crataegus monogyna</i>		<i>kalus</i>			<i>Bahorun et al., 2003 [8]</i>
2	<i>Maytenus ilicifolia</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>NAA +BAP</i>	<i>Filho et al., 2004 [9]</i>
3	<i>Prunella vulgaris</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>NAA</i>	<i>Fazal et al., 2010 [10]</i>
4	<i>Mesembryant hemum crystallinum</i>	<i>hipokotil</i>	<i>akar</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D</i>	<i>Konieczny et al., 2014 [5]</i>
5	<i>Brassica oleracea Var italic</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>BAP, NAA, IAA, IBA</i>	<i>Hossain et al., 2016 [11]</i>
6	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>daun</i>	<i>Kultur sel</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D</i>	<i>Largo-Gosens et al., 2016 [12]</i>
7	<i>Tacca leontopetaloides</i>	<i>tunas</i>	<i>tunas</i>	<i>MS</i>	-	<i>Hapsari et al., 2016 [6]</i>
8	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>daun</i>	<i>Kalus Plantlet</i>	<i>MS</i>	<i>BAP+ NAA</i>	<i>Ashrafzadeh & Leung, 2017 [13]</i>

9	<i>Stelechocarpus burahol</i>	<i>mesokarp</i>	<i>Kalus Kultur sel</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D, Picloran</i>	<i>Habibah et al., 2016 [14]</i>
	<i>Stelechocarpus burahol</i>	<i>Immature seed</i>	<i>Kalus Kultur sel</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D, Picloran</i>	<i>Habibah et al., 2018 [1]</i>
10	<i>Lithospermum officinale</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>LS</i>	<i>2,4-D dan kinetin</i>	<i>Khosravi et al., 2019 [15]</i>
11	<i>Argania spinosa</i>	<i>axillary buds</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D+NA A 2,4-D+BA P</i>	<i>Lamaoui et al., 2019 [16]</i>
12	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Daun</i>	<i>Kalus</i>	<i>MS</i>	<i>TDZ, NAA, BAP, BAP+ NAA</i>	<i>Nazir et al., 2019 [17]</i>
13	<i>Kaempferia parviflora</i>	<i>shoots, rhizomes and roots</i>	<i>Kalus</i>	<i>MS</i>	<i>NAA, kinetin, 2,4-D</i>	<i>Kitwetcharoen et al., 2020 [7]</i>
14	<i>Elaocarpus grandiflorus</i>	<i>Tangkai daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D + kinetin</i>	<i>Habibah et al., 2020 [2]</i>
15	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>(hypocotyls, cotyledons, and roots</i>	<i>Kultur sel</i>	<i>MS</i>	<i>NAA + BAP</i>	<i>Bose et al., 2020 [18]</i>
16	<i>Solanum xanthocarpum</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>IAA+ BAP</i>	<i>Usman et al., 2020 [19]</i>
17	<i>Ocimum basilicum</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>GA3, GA3+ NA, BAP, BAP+ NAA</i>	<i>Nazir et al., 2020 [20]</i>

18	<i>Centella asiatica</i>	<i>stolon</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>NAA+ BAP</i>	<i>Buranasudja et al., 2021 [21]</i>
19	<i>Echinacea purpurea</i>	<i>daun</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>2,4-D+ kinetin</i>	<i>Hasan et al., 2021 [22]</i>
20	<i>Dioscorea esculenta</i>	<i>umbi</i>	<i>kalus</i>	<i>MS</i>	<i>Kineti n+2,4-D</i>	<i>Habibah, 2021 [23]</i>

Berdasarkan Tabel 3, menunjukkan bahwa semua bagian tanaman dapat digunakan sebagai eksplan untuk kultur *in vitro* dalam rangka produksi antioksidan. Hal ini sesuai yang disampaikan oleh [24] yang menyatakan bahwa untuk kultur *in vitro* dapat digunakan eksplan dari berbagai bagian dari tumbuhan. Pemilihan eksplan tergantung pada tujuan kultur dan spesies yang digunakan. Penggunaan semua bagian tumbuhan sebagai sumber eksplan dapat dilakukan karena semua bagian tumbuhan memiliki genetik yang sama. Meskipun semua bagian tanaman dapat digunakan sebagai eksplan, tetapi untuk memudahkan proses kultur jaringan tumbuhan, eksplan dipilih yang sesuai dengan tujuan kultur misalnya untuk menghasilkan tunas maka digunakan eksplan tunas aksiler. Induksi kalus dapat dilakukan dari berbagai eksplan karena pada induksi kalus dilakukan dengan proses dideferensiasi sel sehingga sel yang telah terdiferensiasi dari berbagai organ diubah kembali menjadi sel-sel yang meristematik. Tetapi sel yang telah mengalami diferensiasi lanjut lebih sulit untuk diinduksi ke arah proses dediferensiasi. Bagian tanaman yang terdiri dari sel-sel yang masih aktif membelah dan terdiri atas sel-sel yang masih muda merupakan bagian tanaman yang paling baik untuk digunakan sebagai eksplan. Kemudahan dalam sterilisasi eksplan juga merupakan salah satu jalan lain yang perlu dipertimbangkan. Eksplan dari bagian tanaman yang berada di bawah tanah umumnya memiliki tingkat kontaminasi yang lebih tinggi dibanding bagian tanaman di bagian atas tanah.

Hal ini terlihat pada Tabel 3, sebagian besar penelitian menggunakan bagian tanaman yang berada di atas tanah (daun, tangkai daun, tunas aksiler, dan mesocarp). Tetapi struktur dari eksplan juga berpengaruh terhadap kemudahan proses sterilisasi. Penggunaan umbi dan rhizome meskipun berasal dari tanah tetapi karena strukturnya yang tebal maka lebih mudah disterilisasi. Bahan sterilan yang cukup kuat dapat digunakan karena dengan ukuran yang besar maka bagian luar dapat dihilangkan dan masih tersisa bagian steril yang cukup ukurannya untuk dijadikan eksplan.

Tipe kultur yang digunakan untuk produksi antioksidan sebagian besar adalah kultur kalus. Produksi metabolit sekunder umumnya dilakukan menggunakan kultur kalus atau kultur suspensi sel. Penggunaan kalus untuk produksi metabolit sekunder telah banyak dilaporkan. Senyawa bioaktif medicarpin dilaporkan dapat dihasilkan kalus *Dalbergia congestiflora* [25]. Dilaporkan bahwa kalus *Vigna unguiculata* memproduksi senyawa antioksidan [26]. Produksi senyawa antikanker dilaporkan dihasilkan pada kalus padi [27]. Kalus *Byrsonima verbascifolia* dilaporkan dapat memproduksi senyawa bioaktif fenolik [28]. Senyawa flavonoid dapat dihasilkan dari kalus *Stelechocarpus burahol* [14,1], kultur kalus brotowali [29] dan *Elaocarpus grandiflorus* [2].

Keuntungan penggunaan jaringan tidak terdiferensiasi antara lain [30]:

- 1) Gradien kimiawi. Sel-sel di jaringan kompleks secara terus-menerus terkena sinyal dari jaringan kompleks sekitarnya. Gradien kimia endogen pada kultur sel-sel dapat diinduksi secara eksperimental. Pengaruh dari elicitor, prekursor, inhibitor dan fitohormon dapat dipelajari tanpa perlu aplikasi yang lama dan tanpa gangguan dari jaringan di sekitarnya.

2) Pada kasus tertentu, memungkinkan dilakukannya pemisahan kapasitas produksi dan penyimpanan yang menyebabkan peningkatan produksi yang cukup besar. Penambahan auksin dalam konsentrasi tinggi dapat mengurangi jumlah sel penyimpanan tanpa mengurangi jumlah produksi senyawa bioaktif.

3) Ekstraksi lebih mudah karena ketidakhadiran jaringan pelindung diantara sel-sel penghasil senyawa bioaktif.

Selain itu kalus dan kultur sel lebih mudah untuk diinduksi dan lebih mudah dipelihara dalam jumlah besar. Tetapi ada salah satu kelemahan penggunaan kalus dalam produksi metabolit sekunder yaitu umumnya produksinya rendah. Hal ini dapat diatasi dengan metode peningkatan produksi seperti elisitasi, seleksi lini sel, dan penambahan precursor. Tetapi pada beberapa kasus kalus dapat menghasilkan metabolit sekunder lebih tinggi dari tanaman yang tumbuh secara alami. Kultur kalus pada tanaman *A. annua* memproduksi artemisinin lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman yang tumbuh secara alami [31].

Medium yang paling dominan digunakan adalah medium Murashige & Skoog. Media ini dipakai secara luas dikarenakan beberapa kelebihanannya. Medium MS memiliki kandungan kalium, nitrat, dan amonium yang tinggi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan tanaman. Media kultur jaringan yang ideal harus memiliki komponen seperti makronutrien, mikronutrien, suplemen nitrogen, asam amino, sumber karbon, vitamin, suplemen organik, ZPT, dan agen untuk memadatkan seperti agar. Media Murashige and Skoog (MS) merupakan media yang paling sesuai untuk media kultur sel tanaman, mengandung karbohidrat, vitamin, dan garam anorganik.

Zat pengatur tumbuh yang digunakan sangat berkaitan dengan tipe kultur. Induksi kalus memerlukan hormon auksin dan

sitokinin dalam kadar yang seimbang. Kadar seimbang ini merupakan interaksi antara hormone endogen dan zat pengatur tumbuh eksogen yang ditambahkan ke dalam media. Auksin 2,4-D merupakan auksin sintesis yang paling banyak digunakan untuk induksi kalus. Hal ini karena 2,4-D merupakan auksin yang kuat. Selain itu 2,4-D mempunyai laju metabolisme yang lambat dan mempunyai stabilitas yang tinggi sehingga meningkatkan ketersediaan ZPT tersebut untuk sel tumbuhan [32].

Auksin selain mempengaruhi pertumbuhan kalus tetapi juga mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Auksin dapat menginduksi aktivitas gen untuk enzim dalam jalur biosintesis flavonoid. Akumulasi mRNA *CHALCONE SYNTHASE (CHS)* dan *FLAVONOL SYNTHASE (FLS)* terdeteksi pada perlakuan dengan pemberian 1 µm IAA [33]. Penambahan NAA sebesar 5 mg/l pada kultur kalus kedelai meningkatkan produksi isoflavonoid [34]. Peningkatan produksi rutin 87,5% selama 4 minggu pertama setelah kalus *Morus alba* diinduks terjadi pada perlakuan penambahan 5 mg/L IAA [35].

Aktivitas antioksidan pada kultur *in vitro* telah banyak dilaporkan. Informasi berkaitan dengan ktivitas antioksidan, metode analisis dan senyawa bioaktif yang terkandung dalam kultur *in vitro* tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4: Metode analisis antioksidan, aktivitas antioksidan dan senyawa bioaktif dari kultur *in vitro* beberapa tanaman sumber antioksidan

No	Spesies tanaman	Aktivitas antioksidan (%)	Nilai IC50	Metode analisis	senyawa bioaktif	Peneliti
1	<i>Crataegus monogyna</i>		3.66 µmol/g 208.19 µmol Fe2+/g	TEAC FRAP assay	Fenol, proanthosian idin, flavonoid, antosianin, epitekin,	Bahorun et al., 2003 [8]

No	Spesies tanaman	Aktivitas antioksidan (%)	Nilai IC50	Metode analisis	senyawa bioaktif	Peneliti
					prosyanidin, asam klorogenik.	
2	<i>Maytenus ilicifolia</i>			Peningkatan senyawa antioksidan	22 β -hydroxymayt enin Maytenin	Filho et al., 2004 [9]
3	<i>Prunella vulgaris</i>	85.33 (perlakuan elisitasi partikel emas)		DPPH Aktivitas enzim	Fenolik, flavonoid	Fazal et al., 2010 [10]
4	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>			Aktivitas enzim		Konieczny et al., 2014 [5]
5	<i>Tacca leontopetaloides</i>		50,85 (μ g/mL)	DPPH	alkaloid, flavonoid dan steroid	Hapsari et al., 2016 [6]
6	<i>Phaseolus vulgaris</i>			Aktivitas enzim		Largo-Gosens et al., 2016 [12]
7	<i>Brassica oleracea</i> Var <i>italica</i>	46.3		DPPH		Hossain et al., 2016 [11]
8	<i>Solanum tuberosum</i>			Aktivitas enzim		Ashrafzadeh & Leung, 2017 [13]
9	<i>Stelechocarpus burahol</i>			DPPH	Quercetin, rutin, naringenin	Habibah et al., 2016 [14]
10	<i>Stelechocarpus burahol</i>	66,05		DPPH	Naringenin, rutin, quercetin	Habibah et al., 2018 [1]
11	<i>Lithospermum officinale</i>		20.21 TE (μ mol g ⁻¹)	DPPH	rosmarinic acid chlorogenic acid cinnamic acid p-	Khosravi et al., 2019 [15]

No	Spesies tanaman	Aktivitas antioksidan (%)	Nilai IC50	Metode analisis	senyawa bioaktif	Peneliti
					<i>coumaric acid</i>	
12	<i>Argania spinosa</i>			<i>Aktivitas enzim</i>		<i>Lamaoui et al., 2019 [16]</i>
13	<i>Ocimum basilicum</i>		656.04 μ M	FRAP	<i>caffeic acid</i> <i>rosmarinic acid</i> <i>chicoric acid</i> <i>cyanidin</i> <i>peonidin</i>	<i>Nazir et al., 2019 [17]</i>
14	<i>Kaempferia parviflora</i>	76.34	113.00 (μ g/mL)	DPPH FRAP assay	<i>Phenolics and Flavonoids</i>	<i>Kitwetcha roen et al., 2020 [7]</i>
15	<i>Linum usitatissimum</i>		334.7 μ M 558.5 μ M 142.8 μ M 108.5 μ M	DPPH ABTS CUPRAC FRAP		<i>Bose et al., 2020 [18]</i>
16	<i>Solanum xanthocarpum</i>	94.8	514.88 μ M 356.17 μ M	DPPH FRAP ABTS	<i>caffeic acid</i> <i>methyl-caffeate</i> <i>scopoletin</i> <i>esculetin</i>	<i>Usman et al., 2020 [19]</i>
17	<i>Ocimum basilicum</i>	93.2	1322 μ M	DPPH ABTS	<i>chicoric acid</i> <i>rosmarinic acid</i>	<i>Nazir et al., 2020 [20]</i>
18	<i>Centella asiatica</i>		98.6 (μ g/mL)	DPPH		<i>Buranasudja et al., 2021 [21]</i>
19	<i>Echinacea purpurea</i>		33 (μ g/mL)	DPPH	<i>Chicoric acid and chlorogenic acid</i>	<i>Hasan et al., 2021 [22]</i>
20	<i>Dioscorea esculenta</i>	69,897		DPPH		<i>Habibah, 2021 [23]</i>

Berdasarkan Tabel 4 dapat terlihat bahwa analisis paling banyak dilakukan adalah analisis antioksidan menggunakan Teknik DPPH. Metode α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) merupakan metode pengikatan radikal bebas yang merupakan pendekatan pertama untuk mengevaluasi potensi antioksidan dari suatu senyawa, ekstrak atau sumber biologis lainnya. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana, dimana senyawa prospektif atau ekstrak dicampur dengan solusi DPPH dan kemudian absorbansi diukur dan dicatat. Metode ini selain sederhana juga cepat dan murah sehingga banyak digunakan secara luas [36]. Seiring dengan berjalannya waktu metode aktivitas enzim yang terkait dalam aktivitas antioksidan juga mulai dianalisis untuk menggambarkan aktivitas antioksidan suatu bahan. Enzim *Superoxide dismutase (SOD)*, *Peroxidase* dan *Catalase* merupakan enzim yang berkaitan dengan aktivitas antioksidan dan banyak dianalisis untuk mendapatkan gambaran aktivitas antioksidan suatu bahan [13].

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar antioksidan yang dihasilkan pada *kultur in vitro* lebih rendah daripada tanaman yang tumbuh secara alami. Perlu peningkatan produksi antioksidan menggunakan beberapa metode antara lain pemberian stress menggunakan elisitor dan pemberian precursor. Senyawa bioaktif yang paling banyak terdeteksi adalah senyawa golongan flavonoid dan fenolik yang memang berperan dalam aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan yang berbeda pada tiap bagian tumbuhan disebabkan karena setiap bagian tumbuhan mengandung flavonoid yang berbeda gugus hidroksinya baik dalam jumlah dan lokasinya pada kerangka flavonoid. Gugus hidroksi pada struktur molekul flavonoid menentukan aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan akan meningkat dengan adanya flavonoid

dengan gugus hidroksi lebih dari satu terutama pada cincin B dan gugus hidroksi bebas yang memiliki aktivitas penangkap radikal [37, 38, 39].

Flavonoid dan fenolik merupakan kelompok besar yang terdiri atas banyak jenis senyawa. Naringen, quercetin dan rutin merupakan contoh dari flavonoid. Naringenin merupakan salah satu flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan, dan juga memiliki potensi sebagai obat *Alzheimer's disease*, [40,41]. Quercetin yang banyak ditemui di tumbuhan memiliki banyak bioaktivitas antara lain sebagai anti kanker, antioksidan, anti inflamasi, anti virus dan juga memiliki aktivitas hepatoprotektif [42]. Rutin memiliki kemampuan sebagai hepatoprotektif, anti fungi, antioksidan, anti kanker, anti inflamasi, dan menghambat leukimia [43,42].

2.4 Ringkasan

Berdasarkan data yang diperoleh jenis eksplan yang paling dominan adalah daun dan bagian tumbuhan yang berada di atas tanah. Kalus merupakan tipe kultur yang paling banyak digunakan untuk produksi antioksidan. Medium yang paling banyak digunakan adalah medium MS. Jenis zat pengatur tumbuh yang digunakan berkaitan dengan tipe kultur. Induksi kalus banyak dilakukan menggunakan 2,4-D yang merupakan auksin kuat. Metode α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) merupakan metode yang paling banyak digunakan karena metode ini sederhana, murah, dan cepat. Hasil penelitian menunjukkan senyawa bioaktif yang diproduksi adalah kelompok flavonoid dan fenolik. Berdasarkan informasi yang ada maka dapat disimpulkan bahwa kultur *in vitro* dapat digunakan untuk produksi senyawa antioksidan dengan bermacam-macam eksplan, tipe kultur, medium dan ZPT. Analisis aktivitas antioksidan pada kultur *in vitro* dapat dilakukan

Daftar Pustaka

- [1] Habibah, N.A., Moeljopawiro, S., Dewi, K., and Indrianto, A. 2018. Callus Induction And Flavonoid Production On The Immature Seed of *Stelechocarpus burahol*. Journal of Physics: Conf. Series 983 012186. doi :10.1088/1742-6596/983/1/012186
- [2] Habibah, N.A., Nugrahaningsih, W.H., Musafa, F., Rostriana, R., Mukhtar, K., Wijawati, N., & Anggraito, Y.U. 2020. Bioactive Compounds From Callus Culture of *Elaeocarpus grandiflorus*. Journal of Physics: Conference Series 1567 032055 IOP Publishing doi:10.1088/1742-6596/1567/3/032055
- [3] Anggraito, Y.U., Nugrahaningsih, W.H., Musafa, F., Mukhtar, K., Wijayati, N., Rostriana, Y., Safitri, Habibah, N.A. Secondary metabolites in *elaecarpus grandiflorus* cell culture in WPM medium with various concentrations of PGR. ISNPINSA 2019 Journal of Physics: Conference Series 1524 (2020) 012054 IOP
- [4] Lu X, Tang K and Li P (2016) Plant Metabolic Engineering Strategies for the Production of Pharmaceutical Terpenoids. Front. Plant Sci. 7:1647. doi: 10.3389/fpls.2016.01647
- [5] Konieczny, L.R., Banas, A.K., Suro'wka, E., Michalec, Z., Misalski, Z., & Libik-Konieczny, M. 2014. Pattern of antioxidant enzyme activities and hydrogen peroxide content during developmental stages of rhizogenesis from hypocotyl explants of *Mesembryanthemum crystallinum* L. Plant Cell Rep. 33:165–177
- [6] Hapsari, B.W., Martin, A.F., & Ermayanti, T.M. 2016. Pertumbuhan Kultur *In Vitro* Dan Uji Aktivitas Antioksidan Pada Tanaman Taka (*Tacca leontopetaloides* L. Kuntze) Hasil Radiasi Sinar Gamma. Prosiding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah – Penelitian Dasar Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Nuklir 2016 Pusat Sains dan Teknologi Akselerator, BATAN – Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNS Surakarta, 9 Agustus 2016

- [7] Kitwetcharoen, H., Thanonkeo, S., Klanrit, P., & Thanonkeo, P. 2020. A high potential of *Kaempferia parviflora* cell culture for phenolics and flavonoids production. *J. Applied Sci.*, 20: 109-118.
- [8] Bahorun, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., & Aruoma, O. 2003. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. *Nahrung/Food* 47 (3):191 – 198
- [9] Filho, W.B., Furlan, M., Pereira, A.M.S., Francab, S.C. 2004. *In vitro* propagation of *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae) as potential source for antitumoral and antioxidant quinomethide triterpenes production. A rapid quantitative method for their analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *ARKIVOC* 6: 137-146
- [10] Fazal, H.m Abbasi, B.H., Ahmad, N., & Ali, M. 2016. Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L.. *Appl Biochem Biotechnol.* 180:1076–1092
- [11] Hossain, A.B.M. S., Hag, I., Ibrahim, N.A. Aleissa. 2016. Callus cell proliferation from broccoli leaf slice using IBA and BAP *in vitro* culture: Its biochemical and antioxidant properties Data in Brief. 6: 214-220. DOI: 10.1016/j.dib.2015.11.061. PMID: 26862562; PMCID: PMC4707183.
- [12] Largo-Gosens A, de Castro M, Alonso-Simón A, García-Angulo P, Acebes JL, Encina A, & Álvarez JM. 2016. Quinclorac-habituating of bean (*Phaseolus vulgaris*) cultured cells is related to an increase in their antioxidant capacity. *Plant Physiol Biochem.* 107:257-263. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.06.011. PMID: 27318799.
- [13] Ashrafzadeh, S., & Leung, D.W.M. 2017. Novel potato plants with enhanced cadmium resistance and antioxidative defence generated after *in vitro* cell line selection. *PLoS ONE* 12(10): e0185621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185621>

- [14] Habibah, N.A., Moeljopawiro, S., Dewi, K., and Indrianto, A. 2016. Flavonoid Production in Callus Cultures from Mesocarp of *Stelechocarpus burahol*. Biosaintifika 8 (2) 214-22
- [15] Khosravi, E., Mousavi, A., Farhadpour, M. 2019. Pyrrolizidine Alkaloids-Free Extract from the Cell Culture of *Lithospermum officinale* with High Antioxidant Capacity. Appl Biochem Biotechnol. 187:744–752. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2830-3>
- [16] Lamaoui, M., Chakhchar, A., Benlaouane, B., El Kharrassi, Y., Farissi, M., Wahbi, S., & Modafar, C. 2019. Uprising the antioxidant power of *Argania spinosa* L. callus through abiotic elicitation Mouna. Biologies 342:7–17
- [17] Nazir, M., Tungmunnithum, D., Bose, S., Drouet, S. Garros, L., Giglioli-Guivarc, N., Abbasi, B.H., & Hano, C. 2019. Differential Production of Phenylpropanoid Metabolites in Callus Cultures of *Ocimum basilicum* L. with Distinct *In Vitro* Antioxidant Activities and In Vivo Protective Effects against UV stress. J. Agric. Food Chem. 67:1847–1859
- [18] Bose S, Munsch T, Lanoue A, Garros L, Tungmunnithum D, Messaili S, Destandau E, Billet K, St-Pierre B, Clastre M, Abbasi BH, Hano C and Giglioli-Guivarc'h N. 2020. UPLC-HRMS Analysis Revealed the Differential Accumulation of Antioxidant and Anti-Aging Lignans and Neolignans in *In Vitro* Cultures of *Linum usitatissimum* L. Front. Plant Sci. 11:508658. doi: 10.3389/fpls.2020.508658
- [19] Usman H, Ullah MA, Jan H, Siddiquah A, Drouet S, Anjum S, Giglioli-Guivarc'h N, Hano C, Abbasi BH. 2020. Interactive Effects of Wide-Spectrum Monochromatic Lights on Phytochemical Production, Antioxidant and Biological Activities of *Solanum xanthocarpum* Callus Cultures. *Molecules*. 25(9):2201. doi.org/10.3390/molecules25092201
- [20] Nazir, S., Jan, H., Tungmunnithum, D., Drouet, S., Zia, M., Hano, C., Abbasi, B.H. 2020. Callus Culture of Thai Basil Is an Effective Biological System for the Production of

Antioxidants. Molecules. 25:4859. doi:10.3390/molecules25204859

- [21] Buranasudja, V., Rani, D., Malla, A., Kobtrakul, K., & Vimolmangkang, S. 2021. Insights into antioxidant activities and anti-skin-aging potential of callus extract from *Centella asiatica* (L.). Scientific Reports. 11:13459
- [22] Hassan, M.E.S., Taha, K.F., Ibrahim, I.A., Bekhit, M., Talat, S.E., & Almahdy, M. 2021. Comparative Phytochemical Study, Antioxidant Capacity And Antimicrobial Activity Of Different Propagated Callus Of *Echinacea Purpurea* Against Its Leaf Extracts. European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research. Ejpmr. 8(4): 37-44
- [23] Habibah, N.A. 2021. Produksi Senyawa Bioaktif Dari Kultur Kalus Gembili (*Dioscorea esculenta*). Deepubliser. Semarang. Pp. 74
- [24] George, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure - Background in Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Edwin F. George, Michael A. Hall and Geert-Jan De Klerk. Springer 1-28.
- [25] Hernández-García, A., C. Velázquez-Becerra, R. Herrera-Bucio, J.J. García-Magaña, P. López-Albarrán and E. Ambriz. 2021. Establishment of callus and cell suspensions cultures of *Dalbergia congestiflora* (Fabaceae) to (+)-medicarpin production. Asian J. Plant Sci., 20: 109-115
- [26] Vats S. 2012. Antioxidant Activity of Callus Culture of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Researcher. 4(6):22-24].
- [27] Deshpande, A., Dhadi, S.R., Hager, E.J., & Ramakrishna, W. 2011. Anticancer Activity of Rice Callus Suspension Culture. PHYTOTHERAPY RESEARCH Phytother. Res.
- [28] Castro, A.H.F., Braga, K. Sousa, F.M., Coimbra, M.C., & Chagas, C.R. 2016. Callus Induction And Bioactive Phenolic Compounds Production from *Byrsonima verbascifolia* (L.) DC. (Malpighiaceae). Revista Ciência Agronômica 47 (1) 143-151

- [29] Sukmawati, D., Herlina, H., Muslimin, M., & Suwastika, I. N. (2018). Induksi Kalus Dan Metabolit Sekunder Tanaman Brotowali (*Tinospora crispa* L.) Pada Medium MS Dengan Penambahan ZPT 2, 4-D dan Air Kelapa Secara *In Vitro*. *Natural Science: Journal of Science and Technology*, 7(2): 268-273
- [30] Endress, R. 1994. Plant Cells as Producers of Secondary Compounds in Plant Cell Biotechnology © Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 121-255.
- [31] Manalu, M.M., Wirasutisna, K.R., & Elfahmi. 2012. Produksi Senyawa Metabolit Sekunder Melalui Kultur Jaringan dan Transformasi Genetik *Artemisia Annua* L. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 37(1):23-27
- [32] Tripathi, A.P.K., Awasthi, S., Kanojiya, S., Tripathi, V., Mishra, D.K. 2012. Callus culture and *in vitro* biosynthesis of cardiac glycosides from *Calotropis gigantea* (L.) *In Vitro Cell.Dev.Biol.*—Plant DOI 10.1007/s11627-012-9481-9.
- [33] Lewis, D.R., Ramirez, M.V., Miller, N.D., Vallabhaneni, P., Ray, W.K., Helm, R.F., Winkel, B.S.J., and Muday, G.K. 2011. Auxin and Ethylene Induce Flavonol Accumulation through Distinct Transcriptional Networks. *Plant Physiol.* 156(1): 144–164.
- [34] Downey, P.J., Levine, L.H., Musgrave, M.E., Keon-Bennett, M., and Moane, S. 2013. Effect of Hypergravity and Phytohormones on Isoflavonoid Accumulation in Soybean (*Glycine max.* L.) Callus. *Microgravity Sci. Technol.* 25:9–15
- [35] Lee, Y., Lee., D.E., Lee H.S., Kim, S.K., Lee, W.S., Kim, S.H., and Kim M.W. 2011. Influence of Auxins, Cytokinins, and Nitrogen on Production of Rutin from Callus and Adventitious Roots of the White Mulberry Tree (*Morus alba* L.). *Plant Cell Tiss Org.* 105:9–19
- [36] Kedare, S.B.& Singh, R.P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 48(4):412–422 DOI 10.1007/s13197-011-0251-1

- [37] Gulcin, I., Uguz, M.T., Oktay, M., Beydemir, S., and Kufrevioglu, O.I., 2004. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turk I. Agric.For.*, 28: 25-33
- [38] Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., 2001. *Antioxidants in Food, Practical Applications*, 1-123, Wood Publishing Limited, Cambridge, England.
- [39] Sunarni, T., Pramono, S., dan Asmah, R. 2007. Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.). *Indonesian J. Pharm.* 18(3), 111–116.
- [40] Ferreyra, M.F., Rius, S.P., and Casati, P. 2012. Flavonoids: Biosynthesis, Biological Functions, and Biotechnological Applications. *Plant Sci.* 3(222): 1-15
- [41] Ghofrani, S., Joghataei, M., Mohseni, S., Baluchnejadmojarad, T., Bagheri, M., Khamse, S., and Roghani, M. 2015. Naringenin improves learning and memory in an Alzheimer's disease rat model: Insights into the underlying mechanisms. *European J Pharmacol.* (764), 195-201.
- [42] Kumar, S., and Pandey, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, 2013. *The Scientific World Journal* <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>
- [43] Gupta, N., Chauhan, R.S., and Pradhan, J.K. 2014. Rutin: A bioactive flavonoid in *Handbook of Medicinal Plants and their Bioactive Compounds*, Ed: N. Gupta ISBN: 978-81-308-0548-1 51-57

Potensi *Saccharomyces cerevisiae* sebagai Uniseluler Penghasil Antioksidan Glulathion

Dewi Mustikaningtyas¹, Sri Widyarti², Muhaimin Rifa'i², Widodo²

¹ Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang

² Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya

E-mail: dewi_mustikaningtyas@mail.unnes.ac.id

3.1 Pendahuluan

Produksi radikal bebas (ROS) yang berlebihan di dalam tubuh telah berdampak pada berkembangnya beberapa penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, neurodegeneratif, penyakit pernafasan maupun pencernaan. Secara fisiologis konsentrasi ROS diatur oleh keberadaan antioksidan, baik antioksidan endogen maupun eksogen. Defisiensi antioksidan dapat disebabkan oleh kejadian peradangan berkelanjutan seperti penyakit paru-paru kronis, radang usus, gangguan neurodegeneratif, penyakit kardiovaskular, dan penuaan (*Aging*). Kombinasi dari defisiensi antioksidan dan malnutri dapat menyebabkan kerentanan terhadap stress oksidatif yang dapat meningkatkan resiko terjadinya kanker. Implikasi ROS dalam etiologi beberapa penyakit kronis dan penyakit inflamasi menunjukkan bahwa terapi berbasis antioksidan dapat dijadikan sebagai strategi terapeutik yang dapat meningkatkan kapasitas antioksidan individu dalam pengobatan jangka panjang [1].

Potensi antioksidan dalam pemanfaatannya sebagai strategi terapeutik dalam pengobatan jangka panjang ini, memberikan peluang untuk mengeksplorasi sumber antioksidan eksogen yang dapat dikembangkan. Salah satu jenis antioksidan yang banyak diteliti dan dikembangkan teknik produksinya adalah glutathion. Antioksidan glutathion telah banyak dimanfaatkan di bidang farmasi, kosmetik dan makanan. Salah satu pemanfaatannya adalah dalam mengatur fungsi sel kekebalan untuk mengendalikan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* [2–5]. Status pertumbuhan pada anak-anak penderita *cystic fibrosis* dapat ditingkatkan dengan pemberian L-glutathion tereduksi secara oral, selain itu juga mengatasi peradangan usus yang diderita oleh mereka [6].

Glutathion merupakan suatu protein sederhana yang tersusun dari tiga asam amino yaitu asam glutamat, sistein, dan glisin. Semua sel eukariotik pada umumnya dapat menghasilkan glutathion yang disebut dengan glutathion intraseluler dengan konsentrasi sekitar 5 mM setiap sel, tetapi dengan tingginya kadar ROS di dalam sel, kadang diperlukan juga tambahan glutathion untuk mengatasi stres oksidatif yang terjadi di dalam sel [7].

Manfaat glutathion yang banyak tersebut memberikan peluang untuk pengembangan teknik produksi glutathion. Biaya produksi yang masih relatif tinggi sering menjadi salah satu kendala yang ditemui. Oleh karena itu mengembangkan suatu metode dengan memanfaatkan mikroorganisme untuk menghasilkan glutathion menjadi sebuah potensi yang dapat dikembangkan. Salah satunya dengan memanfaatkan mikroorganisme *Saccharomyces cerevisiae* sebagai sel host untuk memproduksi glutathion.

Metode produksi glutathion ada beberapa strategi di antaranya adalah menggunakan metode kimiawi, metode enzimatis, dan metode fermentasi. Pemanfaatan *S. cerevisiae* merupakan salah

satu contoh metode produksi glutathion dengan fermentasi. Kelebihan metode fermentasi ini adalah selain biaya yang dibutuhkan lebih murah daripada metode yang lain, hasil akhir yang diperoleh pada metode ini sudah dalam bentuk L-isomer, dimana secara fisiologis glutathion dalam bentuk L-isomer merupakan bentuk aktif yang siap digunakan [8]. Metode fermentasi menggunakan *S. cerevisiae* juga tidak lagi membutuhkan penambahan ATP maupun coenzim, karena secara alami mikroorganisme tersebut mampu menghasilkan ATP dan coenzim yang dibutuhkan dalam sintesis glutathion. Metode fermentasi adalah metode yang dikembangkan dengan memanfaatkan mikroorganisme dan penambahan gula sebagai substratnya dalam proses fermentasi untuk biosintesis glutathion. Mikroorganisme yang berperan dalam metode fermentasi adalah kelompok yeast seperti *Saccharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Torulopsis*. Dari kelompok yeast tersebut yang sering digunakan adalah *S. cerevisiae* dan *Candida utilis* [9 - 10].

Hal lain yang perlu dipertimbangkan dalam produksi glutathion adalah kehalalannya, selama ini kebutuhan glutathion masih dipenuhi produk import dimana bahan protein yang digunakan belum diketahui kehalalannya. Sumber protein meskipun berasal dari mikroorganisme, tetap harus terjaga kehalalannya. Hal ini telah diatur di dalam MUI FATWA no 1/2012 tentang produk dari mikroorganisme. Bahwa produk dari mikroorganisme harus terhindar dari bahan yang berbahaya, tidak menyebabkan suatu penyakit dan tidak menggunakan bahan atau media yang mengandung najis. Jika seandainya menggunakan bahan yang tidak halal, maka dapat dilakukan purifikasi untuk memisahkan dari media atau bahan yg mengandung najis tersebut. Dengan menjaga

bahan material yang digunakan dapat mengatasi permasalahan kekuatan akan hal ini.

Pemanfaatan *S. cerevisiae* sebagai mikroorganisme penghasil glutathion, masih berpotensi untuk dilakukan penelitian lebih lanjut. *S. cerevisiae* secara alami memiliki kemampuan untuk menghasilkan glutathion intraseluler yang berfungsi sebagai perlindungan sel terhadap stres oksidatif yang terjadi di lingkungannya. Dengan melakukan penambahan bahan penyusun glutathion yaitu sistein, asam glutamat dan glisin, diharapkan glutathion yang dihasilkan dapat ditingkatkan. Langkah yang lain juga dapat dilakukan dengan penambahan oksidan untuk memicu terjadinya stress oksidatif pada *S. cerevisiae* sehingga produksi antioksidan termasuk glutathion dapat meningkat. Pada dekade terakhir penelitian tentang peningkatan produksi glutathion juga dilakukan dengan pendekatan rekayasa genetik. Dalam buku ini perkembangan penelitian terkait produksi antioksidan khususnya glutathion akan dibahas baik dari sisi metode fermentasi, induksi dengan oksidan maupun melalui pendekatan teknik rekayasa genetik.

3.2 Metode

Produksi antioksidan glutathion dengan memanfaatkan *S. cerevisiae* memiliki potensi untuk terus dikembangkan. Oleh karena itu studi tentang hal ini dapat dilakukan dengan berbagai tahapan dan langkah kerja, yaitu melalui studi literatur dan eksperimen di laboratorium. Penjelasan tentang produksi antioksidan glutathion oleh *S. cerevisiae* dalam buku ini menggunakan pendekatan literatur review berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Serta berdasarkan hasil eksperimen di laboratorium dengan melakukan modifikasi media tumbuh *S. cerevisiae* untuk meningkatkan produksi glutathion.

Penelitian terdahulu yang digunakan sebagai rujukan diperoleh dari artikel ilmiah yang telah dipublikasikan di jurnal ilmiah di beberapa publisher seperti Elsevier dan Springer Journal, selain itu juga dari laman bibliografi seperti MEDLINE database dan google scholar. Artikel-artikel yang dipilih adalah artikel hasil penelitian tentang modifikasi media kultur *S. cerevisiae* dan rekayasa genetik *S. cerevisiae* yang bertujuan untuk meningkatkan produksi glutathion.

Salah satu modifikasi media tumbuh *S. cerevisiae* yang dilakukan untuk meningkatkan produksi glutathion adalah dengan suplementasi ekstrak kedelai sebagai sumber asam amino bahan dasar pembentukan glutathion. Selain itu digunakan media YPD modifikasi yang terbuat dari *yeast extract* 1% (w/v) (Bacto™), ekstrak kaldu daging 2% (w/v) dan ekstrak papaya 2% (w/v). Penggunaan ekstrak daging dalam hal ini menggantikan fungsi pepton dan ekstrak papaya sebagai pengganti dekstrosa. Penambahan ekstrak kedelai dilakukan pada saat kultur *S. cerevisiae* memasuki fase stasioner yaitu pada jam ke 24. Kultur *S. cerevisiae* dilakukan selama 44 jam pada suhu 30°C dengan kecepatan 180 rpm. Dengan memastikan semua bahan yang digunakan terutama media kultur *S. cerevisiae* meyakinkan kita terkait kehalalan produk yang dihasilkan. Pengukuran kadar glutathion yang dihasilkan oleh *S. cerevisiae* dilakukan menggunakan metode Ellman, yaitu dengan mencampur 0,1 mM DTNB 95 µL dengan 5 µL sampel, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama dua menit dan diukur absorbansinya dengan metode spektrofotometri menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.

3.3 Hasil dan Pembahasan

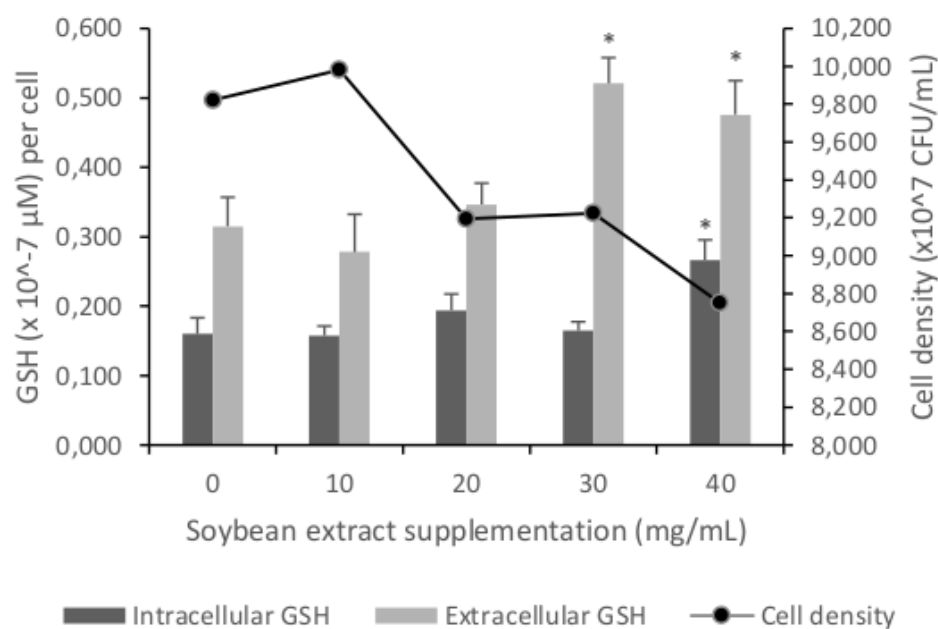
Ekstrak kedelai diperoleh dari proses ekstraksi air dan untuk meningkatkan kadar asam amino pembentuk glutathion dengan

cara penambahan asam asetat pH 5. Fungsi dari penambahan asam asetat ini adalah memecah protein menjadi asam amino. Dengan penambahan asam asetat pH 5 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit telah terbukti dapat meningkatkan kadar asam amino yang terkandung dalam ekstrak kedelai [11]. Diketahui dari penelitian sebelumnya bahwa perlakuan pH dan suhu saat proses ekstraksi dapat meningkatkan konsentrasi asam amino pada ekstrak kedelai [12-13]. Ekstrak kedelai ini dapat digunakan sebagai bahan suplemen pada media kultur *S. cerevisiae* sebagai sumber asam amino, karena konsentrasi glutathion dapat ditingkatkan dengan adanya penambahan asam amino bebas [14–16].

Penelitian lain oleh Hara [17] menggunakan strategi yang berbeda yaitu dengan melakukan rekayasa genetik pada *S. cerevisiae* sehingga mampu mengekspresikan protease pada permukaan selnya. *S. cerevisiae* transforman ini mampu memanfaatkan protein kedelai untuk mensuplai kebutuhan asam amino dalam proses sintesis glutathion. Seperti telah lama diketahui bahwa kedelai merupakan salah satu sumber nutrisi berprotein tinggi, kandungan protein pada kedelai dapat mencapai 40% dari berat keringnya [18]. Asam amino sistein, asam glutamat, dan glisin yang terkandung dalam kedelai dapat mensuplai kebutuhan bahan dasar pembentukan glutathion di dalam sel *S. cerevisiae*.

Penelitian dengan perlakuan penambahan ekstrak kedelai di jam ke 24 kultur *S. cerevisiae* terbukti telah meningkatkan produksi glutathion (Gambar 6). Produksi glutathion dari *S. cerevisiae* diukur secara intraseluler dan ekstraseluler. Perlakuan penambahan ekstrak kedelai pada konsentrasi 10, 20, dan 30 mg/mL ke dalam media kultur *S. cerevisiae* menghasilkan glutathion intraseluler dengan konsentrasi yang tidak berbeda nyata dengan control (tanpa penambahan ekstrak kedelai). Sedangkan peningkatan kadar

glutathion intraseluler menunjukkan perbedaan yang nyata pada penambahan konsentrasi ekstrak kedelai 40 mg/mL ($p \leq 0,05$). Sedangkan hasil produksi glutathion ekstraseluler menunjukkan hasil yang sejalan dengan produksi glutathion intraseluler dimana memberikan hasil yang berbeda nyata pada penambahan ekstrak kedelai konsentrasi 40 mg/mL. Meskipun kadar glutathion ekstraseluler lebih tinggi jika dibandingkan dengan glutathion intraseluler.



Gambar 6: Kadar glutathion (GSH) intraseluler dan ekstraseluler menggunakan media ekstrak pepaya dan daging sapi ditambah ekstrak kedelai. Pemberian ekstrak kedelai 40 mg/mL dapat meningkatkan produksi GSH. Konsentrasi GSH tertinggi berturut-turut adalah $0,28 \times 10^{-7}$ M dan $0,52 \times 10^{-7}$ M per sel *S. cerevisiae*, intraseluler dan ekstraseluler. Histogram menyajikan mean \pm SD dari konsentrasi GSH per sel, dan analisis varians dilakukan pada nilai $P \leq 0,05$.

Penambahan ekstrak kedelai 40 mg/mL pada media kultur *S. cerevisiae* dapat meningkatkan konsentrasi glutathion intraseluler

59,93% lebih tinggi dari pada kontrol, sedangkan konsentrasi glutathion ekstraseluler meningkat 60,46% dari kontrol pada penambahan ekstrak kedelai 30 mg/mL. Glutathion intraseluler adalah glutathion yang disintesis di dalam sel *S. cerevisiae* sedangkan glutathion ekstraseluler adalah glutathion yang disintesis di dalam sel dan dibawa keluar sel melalui suatu protein transporter [19,20]. Hasil dari penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Kresnowati [21] dimana penambahan sistein pada sintesis glutathion merupakan salah satu strategi yang dapat digunakan untuk meningkatkan konsentrasi glutathion. Hal ini penting karena kelompok sulfhydryl (SH) dipengaruhi oleh adanya penambahan sistein sebagai donor elektron yang kuat [10]. Keberadaan sistein di dalam sel menunjukkan seberapa banyak glutathion dapat diproduksi. Konsentrasi glutathion sitosol pada kelompok yeast dapat mencapai 13 mM [22].

Glutathion dalam sintesisnya dikatalisis oleh dua enzim sitosolic ATP-dependent yaitu enzim gamma glutamylcysteine synthetase (GSH1) dan glutathion synthetase (GSH2). γ -carboxyl grup pada L-glutamat berkonjugasi dengan L-cystein melalui mekanisme fosforilasi γ -carboxylate L-glutamat oleh ATP menghasilkan γ -glutamyl phosphate intermediate, kemudian L-cystein sebagai nucleophile menempel pada γ -glutamyl phosphate intermediate membentuk γ -glutamylcysteine. Dipeptida tersebut kemudian berikatan dengan glisin membentuk glutathion [23].

Penelitian tentang upaya peningkatan produksi glutathion pada *S. cerevisiae* sudah lama dilakukan, tahun 2004 Wen bersama dengan tim risetnya memberikan penambahan asam amino sistein, asam glutamat, glisin, serin, arginin, dan metionin untuk meningkatkan produksi glutathion pada *S. cerevisiae* [24]. Penelitian berlanjut satu tahun kemudian yang mendapatkan kesimpulan

bahwa asam glutamat, sistein, dan glisin merupakan asam amino penting dalam sintesis glutathion [14]. Penelitian lain yang mendukung hasil tersebut menyatakan bahwa penambahan asam amino penyusun glutathion merupakan faktor penting yang dapat dilakukan untuk meningkatkan produksi glutathion [25]. Pemanfaatan sumber protein lainnya juga telah dilakukan dengan menggunakan ekstrak ikan pada media kultur *S. cerevisiae* telah terbukti dapat meningkatkan produksi glutathion [26]. Strain *S. cerevisiae* yang digunakan juga dapat menentukan banyaknya glutathion yang dihasilkan, karena perbedaan strain *S. cerevisiae* menghasilkan konsentrasi glutathion yang bervariasi, salah satu yang terbanyak adalah *S. cerevisiae* FF-8 yang dikulturkan pada media yang mengandung glukosa 3% (w/v), yeast ekstrak 3%, KH_2PO_4 0,06% dan L-Sistein 0,06% dapat menghasilkan glutathion sebanyak 90 mg/L [27-28].

Strategi lain dalam upaya optimalisasi produksi glutathion juga dapat dilakukan dengan pendekatan rekayasa genetik. Pemberian Ethyl Methanesulfonat (EMS) 2% ke dalam media kultur *S. cerevisiae* dapat menyebabkan mikroorganisme ini mengalami mutasi [28]. *S. cerevisiae* mutan ini mampu memproduksi glutathion lebih banyak dibandingkan *wildtype*nya. Produksi glutathion juga dapat ditingkatkan melalui pemanfaatan sumber gula selain glukosa, dengan cara membuat rekayasa genetik pada *S. cerevisiae*. Melakukan overekspresi gen *XR*, *XDH*, dan *XK*, dimana ketiga gen tersebut mengkode secara berurutan protein enzim xylose reductase, xylitol dehydrogenase, D-xylulokinase yang berperan dalam metabolisme D-xylose (merupakan gula turunan dari lignoselulosa). Dengan overekspresi ketiga enzim tersebut, *S. cerevisiae* dapat memanfaatkan D-xylose sebagai sumber karbon saat proses fermentasi mikroorganisme tersebut dalam memproduksi

glutathion [29]. *S. cerevisiae* juga dapat direkayasa sehingga memiliki kemampuan untuk melakukan kombinasi tiga *pathway* untuk melakukan sintesis glutathion. Tiga *pathway* tersebut adalah G *pathway* yaitu sintesis glutathion yang dikatalisis oleh enzim GSH1 dan GSH2; F *pathway* yaitu memanfaatkan enzim glutamate-systeine ligase (GshF) yang memiliki peran yang sama dengan GSH1 dan GSH2 sehingga dapat mengkatalisis sintesis glutathion; dan P *pathway* yaitu kerja enzim Pro1 mengubah glutamat menjadi γ -glutamyl phosphate yang kemudian bereaksi dengan sistein sehingga terbentuk γ -glutamyl cysteine dan berikatan dengan glisin menghasilkan glutathion [16].

Peningkatan produksi glutathion berdampak pada akumulasi konsentrasi glutathion di dalam sel, secara fisiologi direspon oleh sel untuk mengaktifkan mekanisme *feedback inhibition*. Glutathion dalam jumlah yang tinggi di dalam sel dapat menghambat aktivitas enzim GSH1 dengan cara *competitive inhibition* antara glutathion dengan asam glutamat pada perlekatan sisi aktif asam glutamat enzim GSH1 (*Nonallostic feedback inhibition*), serta mengganggu koordinasi Mg^{2+} pada situs aktif ATP [30,31]. Hal ini dapat diatasi dengan melakukan rekayasa genetik untuk overekspresi gen *GXA1* (glutathione export ABC protein) pada *S. cerevisiae* sehingga glutathion yang dihasilkan dapat diekskresikan keluar sel (glutathion ekstraseluler) [20]. Berdasarkan dari hasil beberapa penelitian yang telah diuraikan dapat ditarik kesimpulan bahwa penelitian tentang upaya peningkatan produksi glutathion oleh *S. cerevisiae* masih memberikan peluang untuk terus dikembangkan, baik secara mikrobiologis dengan melakukan modifikasi media kulturnya maupun dengan pendekatan rekayasa genetik pada *S. cerevisiae*.

3.4 Ringkasan

S. cerevisiae memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai uniseluler penghasil antioksidan glutathion. Dengan berbagai strategi seperti modifikasi media kulturnya untuk mensuplai kebutuhan sumber nitrogen dan sumber karbon dalam proses fermentasi untuk sintesis glutathion. Juga dapat dilakukan rekayasa genetik pada gen-gen yang mengkode protein enzim yang memiliki peran dalam proses sintesis glutathion. Selain memanfaatkan asam amino bebas sebagai bahan penyusun glutathion, dapat juga digunakan ekstrak kedelai sebagai substitusi asam amino bebas. Gen-gen yang terlibat dalam mekanisme sintesis glutathion diantaranya adalah *GSH1*, *GSH2*, dan *GXA1*.

Daftar Pustaka

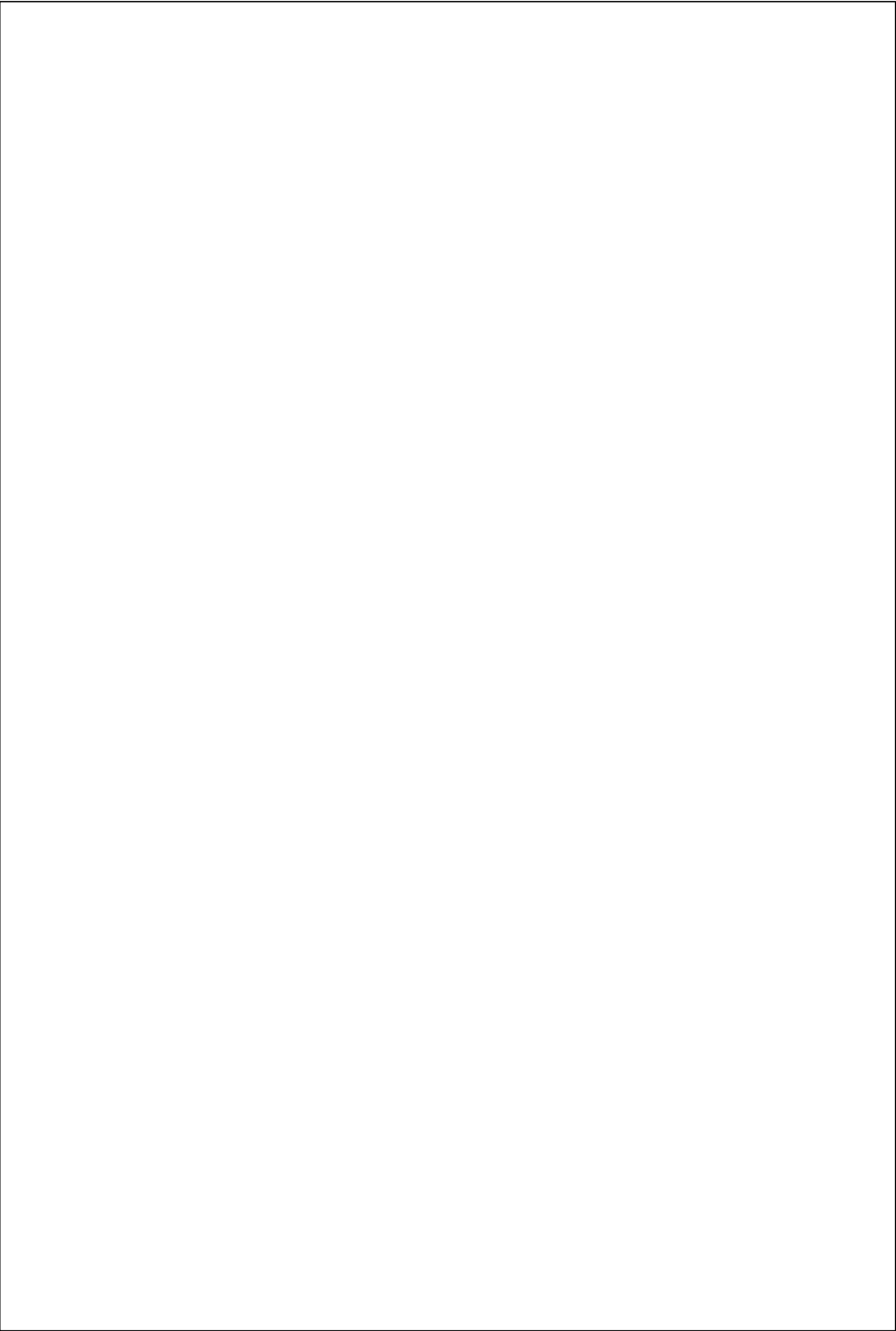
- [1] Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang C, Kandaswamy E, Zhou T, et al. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. *Front Physiol.* 2018;9(May):1–14.
- [2] Guerra C, Devin M, Andrea S, Steven K, Meshare F, Dennis G, et al. Glutathione and Adaptive Immune Response Against Mycobacterium tuberculosis Infection in Healthy and HIV Infected Individual. *PlosOne* (12). 2011;6(6).
- [3] Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R, et al. Glutathione and infection. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830(5):3329–49.
- [4] Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND, Venketaraman V. Characterization of a Glutathione Metabolic Mutant of Mycobacterium tuberculosis and Its Resistance to Glutathione and Nitrosoglutathione. 2006;188(4):1364–72.
- [5] Yuniastuti A, Yusuf I, Massi MN, Budu. Status Antioksidan Glutathion pada Pasien Tuberkulosis Paru di Balai Kesehatan Paru (BKPM) Makassar. *Biosaintifika.* 2013;5(2):74–81.
- [6] Visca A, Bishop CT, Hilton S, Hudson VM. Oral Reduced L-Glutathione Improves Growth in Pediatric Cystic Fibrosis

- Patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015;60(6):802–10.
- [7] Pizzorno J. Glutathione! *Integr Med (Encinitas, Calif).* 2014;13(1):8–12.
- [8] Bachhawat AK, Ganguli D, Jaspreet K, Kasturia N, Thakur A, Kaur H, et al. Glutathione production in yeast. In: *Yeast biotechnology: diversity and applications.* 2009. p. 259–80.
- [9] Li Y, Wei G, Chen J. Glutathione: A review on biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004;66(3):233–42.
- [10] Nigam PS, Owusu-Apenten R. *Frontier Discoveries and Innovations in Interdisciplinary Microbiology.* Shukla P, editor. New Delhi: Springer; 2016.
- [11] Mustikaningtyas D, Widyarti S, Rifa'i M, Widodo N. Cysteine content obtained from the variation of temperature and acidity on soybean extraction. *J Phys Conf Ser.* 2019;1321(32038):1–6.
- [12] Triyono A. Mempelajari Pengaruh Penambahan Beberapa Asam pada Proses Isolasi Protein terhadap Tepung Protein Isolat Kacang Hijau (*Phaseolus radiatus* L.). In: *Seminar Rekayasa Kimia dan Proses.* 2010.
- [13] Rosenthal A, Pyle DL, Niranjana K. Simultaneous Aqueous Extraction of Oil and Protein from Soybean: Mechanism for Process Design. *Trans IChemE.* 1998;76(December):224–30.
- [14] Wen S, Zhang T, Tan T. Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. *Process Biochem.* 2005;40(11):3474–9.
- [15] Wang M, Sun J, Xue F, Shang F, Wang Z, Tan T. The Effect of Intracellular Amino Acids on GSH Production by High-cell-density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;168:198–205.
- [16] Tang L, Wang W, Zhou W, Cheng K, Yang Y, Liu M, et al. Three-pathway combination for glutathione biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell Fact.* 2015;14(139):1–12.
- [17] Hara KY, Kim S, Yoshida H, Kiriya K, Kondo T, Okai N,

- et al. Development of a glutathione production process from proteinaceous biomass resources using protease-displaying *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93:1495–502.
- [18] Preece KE, Hooshyar N, Zuidam NJ. Whole soybean protein extraction processes: A review. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2017;43(March):163–72.
- [19] Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ. Glutathione Transport Is a Unique Function of the ATP-binding Cassette Protein ABCG2. 2010;285(22):16582–7.
- [20] Kiriya K, Hara KY, Kondo A. Extracellular glutathione fermentation using engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel glutathione exporter. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;96:1021–7.
- [21] Kresnowati M, Ikhsan NA, Nursa RS, Santoso NN, Susanto Y. Evaluation of Glutathione Production Method using *Saccharomyces cerevisiae*. *Mater Sci Eng*. 2019;543(12004).
- [22] Deponte M. The Incomplete Glutathione Puzzle: Just Guessing at Numbers and Figures? *Antioxid Redox Signal*. 2017;27(15):1130–61.
- [23] Biterova EI, Barycki JJ. Mechanistic Details of Glutathione Biosynthesis Revealed by Crystal Structures of *Saccharomyces cerevisiae* Glutamate Cysteine Ligase. *J Biol Chem*. 2009;284(47):32700–8.
- [24] Wen S, Zhang T, Tan T. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol*. 2004;35(6–7):501–7.
- [25] Anschau A, Santos LO dos, Alegre RM. A Cost Effective Fermentative Production of Glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* with Cane Molasses and Glycerol. *Braz Arch Biol Technol*. 2013;56(October):849–57.
- [26] Dluha N, Widyarti S, Widodo W. Alternative Media Based on Papaya and Fish Extract for Glutathione Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Pak J Sci Ind Res*.

2019;62B(3):178–82.

- [27] Cha JY, Park JC, Jeon BS, Lee YC, Cho YS. Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. *J Microbiol.* 2004;42(1):51–5.
- [28] Hamad GM, Taha TH, Alshehri AM, Hafez EE. Enhancement of the Glutathione Production by Mutated Yeast Strains and its Potential as Food Supplement and Preservative. *Res J Microbiol.* 2018;13(1):28–36.
- [29] Kobayashi J, Sasaki D, Bamba T, Hasunuma T, Kondo A. Sustainable production of glutathione from lignocellulose-derived sugars using engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;103(3):1–7.
- [30] Richman PG, Meister A. Regulation of γ -Glutamyl-Cysteine Synthetase by Nonallosteric Feedback Inhibition by Glutathione. *J OP Biol Chem.* 1975;250(4):1422–7.
- [31] Biterova EI, Barycki JJ. Structural Basis for Feedback and Pharmacological Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Glutamate Cysteine Ligase. *J Biol Chem.* 2010;285(19):14459–66.



#BAGIAN_DUA

POTENSI SENYAWA BAHAN ALAM

Senyawa Bioaktif Potensial Pada Tomat: Temuan Tomatidine Pada Ekstrak Tomat Berbagai Pelarut

Retno Sri Iswari¹✉, Wulan Christijanti¹, Lisdiana¹, Harjono²,
Fitri Arum Sasi³, Muchamad Dafip¹

¹. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Negeri Semarang

². Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Negeri Semarang

³. Laboratorium Biokimia, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika
dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang

✉ e-mail: retno.sri@unnes.mail.com

4.1 Pendahuluan

Tomat (*Lycopersicum esculentum* Linn) merupakan salah satu sayuran yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder melimpah. Senyawa utama seperti golongan karotenoid, termasuk β -karoten dan likopen saat ini dikenal sebagai senyawa metabolit sekunder utama pada tomat yang efektif menangkal radikal bebas [6], menurunkan kadar kolestrol total [16], trigliserida dan meningkatkan kadar kolestrol-HDL [13]. Selain karotenoid, dalam 1g ekstrak tomat yang dikukus juga mengandung kurang lebih 22,98 mg/ 100 g vitamin C dan 0,41 mg/ 100 g α -tokoferol [11]. Lebih lanjut, tidak menutup kemungkinan adanya senyawa potensial lain dalam tomat yang memiliki potensi terapeutik.

Tomat masih menyimpan banyak potensi senyawa metabolit sekunder salah satunya adalah tomatidine. Tomatidine

merupakan alkaloid-steroid yang dapat diekstraksi dari kulit dan daun tomat. Tomat hijau mentah mengandung hingga 500 mg tomatine per kg sedangkan tomat merah matang memiliki kurang dari 5mg / kg. Kandungan bioaktif tomat berfungsi sebagai antioksidan dan herba melawan pathogen seperti malaria [10]. Tomatidine adalah metabolit aglycon dari tomatine dan terbukti menggunakan berbagai aktivitas biologis yang bermanfaat seperti anti-kanker, anti-inflamasi dan peningkatan kesehatan otot. Tomatidine ditemukan berpotensi mengurangi replikasi bakteri patogenik *Streptococcus aureus* [7], serta memiliki aktivitas antivirus terhadap beberapa jenis virus termasuk Sunnhemp rossettevirus, human herpes simplex virus, human respirasi syncytial, dan virus influenza [9].

Tomatidine berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat obat danantisipasi *outbreak* pandemic hingga mutasi sel kanker [4,21]. Meskipun demikian, perlu adanya upaya identifikasi untuk mengetahui kandungan senyawa tomatidine pada tomat, terutama proses ekstraksi yang paling baik. Proses ekstraksi sangat dipengaruhi oleh jenis pelarut untuk memperoleh senyawa target, yang dapat dibedakan menjadi pelarut polar dan non-polar [1]. Kedua jenis pelarut tersebut memiliki kemampuan berbeda dalam mengekstraksi senyawa metabolit sekunder [19]. Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan penemuan senyawa bioaktif potensial tomatidine pada tomat pada berbagai pelarut. Hal tersebut sebagai upaya untuk memperoleh pelarut isolasi yang tepat dalam mengekstraksi senyawa potensial berdasarkan karakteristik kimia.

4.2 Metode

Penelitian ini menggunakan *qualitative model: observational exploratory* dengan teknik analisis diskriptif kualitatif. Penelitian

dilakukan di Laboratorium Gizi, Fakultas Ilmu Gizi, Universitas Katolik Soegijopranoto (UNIKA) untuk pembuatan ekstrak. Kuantifikasi senyawa bioaktif tomat dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT), Universitas Gadjah Mada (UGM).

4.2.1 Ekstraksi Tomat

Sebanyak 80 kg tomat merah segar varietas Lentana diperoleh dari sentra sayuran Bandungan, Kabupaten Semarang. Tomat yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir dan dibuang bagian kaliknya dipotong menjadi kecil dan dikukus pada suhu 120 °C selama 30 menit. Tomat yang telah dikukus kemudian dihaluskan dibagi menjadi empat bagian yang ditempatkan pada wadah plastic berkapasitas 5 L. Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, yaitu dengan menambahkan etanol 70%, aquades, petroleum eter, dan chloroform secara terpisah pada masing-masing wadah plastik hingga volume mencapai dua kali lipat tomat kukus. Campuran tomat dan pelarut kemudian didiamkan selama 24 jam, kemudian larutan tomat dievaporasi hingga diperoleh pasta untuk analisis *gas chromatography mass spectrophotometry* (GC-MS).

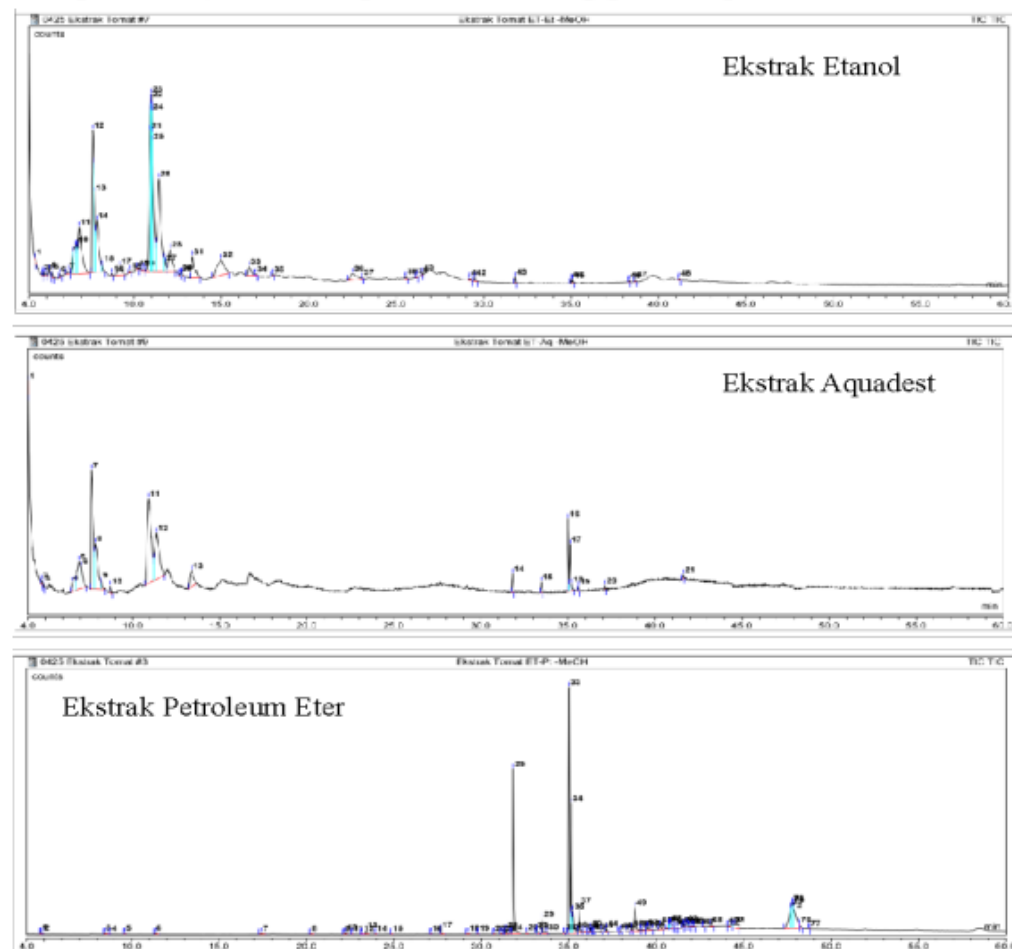
4.2.2 Pengujian GC-MS

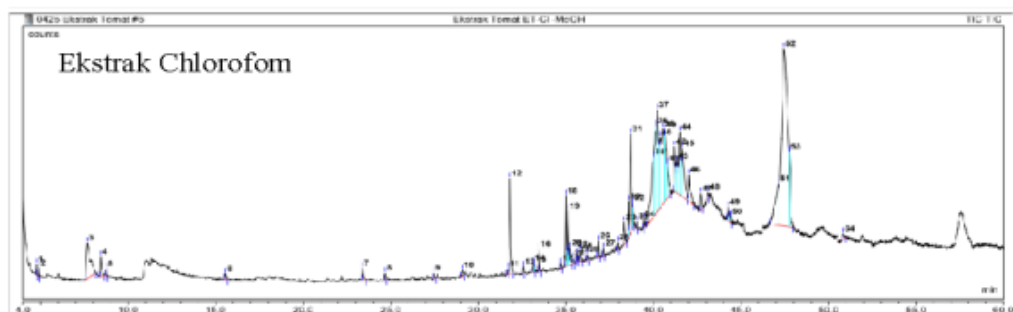
Sebanyak 0.3 mL dari masing-masing sampel dilarutkan kembali menggunakan MeOH 1 mL dalam ependorf dan di vortek sampai homogen dan dilanjutkan dengan sentrifugasi selama 3 menit kecepatan 9000 rp. Supernatan kemudian dipindahkan dalam vial GC untuk diinjeksikan pada mesin GC-MS. Adapun mesin yang digunakan merupakan Thermo Scientific Trace™ 1310 Gas Chromatography (Thermo Fisher Scientific: Waltham, USA). Adapun spesifikasi instrument yaitu Column: HP-5MS UI, *carrier gas* yang digunakan adalah Helium UHP (He) dengan suhu injektor yaitu 260 °C. Laju pemisahan molekul yaitu 50 ml/min dengan

rasion 50:50 dan *front inlet flow*: 1,00 ml/min. Suhu MS-*transfer line* sebesar 250 °C dan *ion source* sebesar 200 °C, *purge flow* sebesar 3 ml/ min, *gas saver flow* yaitu sebesar 5 ml/ min dan *gas saver time* selama 5 min

4.3 Hasil dan Pembahasan

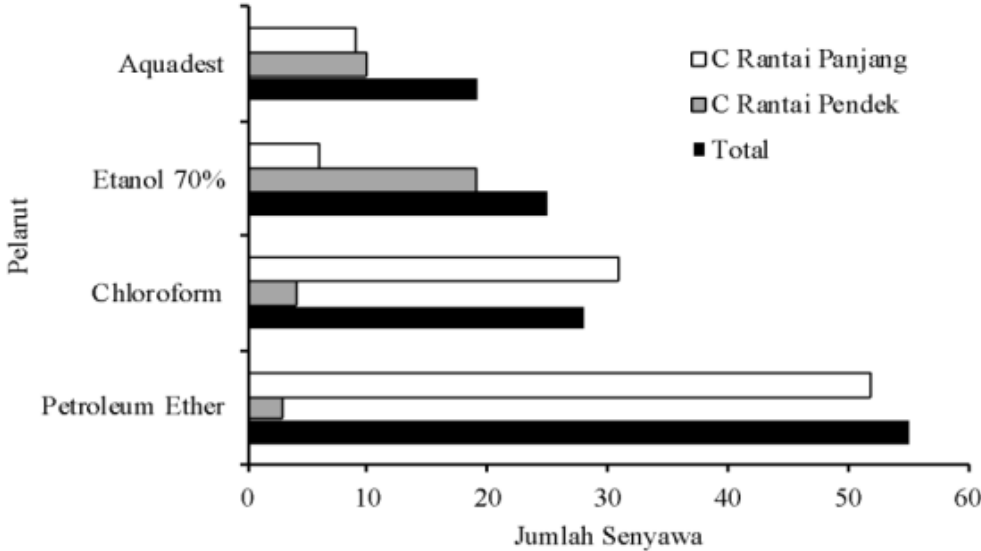
Analisis GC-MS menggabungkan teknik analisis kromatografi gas dengan kemampuan analisis deteksi spektrometri massa menggunakan prinsip kerja pemisahan senyawa metabolit sekunder pada tomat berdasarkan perbedaan kepolaran. Hasil analisis senyawa bioaktif pada tomat dengan pelarut berbeda-beda menunjukkan adanya perbedaan profil molekul yang terdeteksi pada waktu pembacaan berbeda. Jumlah grafik teramati lebih banyak ditemukan pada senyawa non-polar dibanding pelarut polar (Gambar 7.).





Gambar 7: Hasil analisis GC-MS menunjukkan perbedaan kandungan senyawa bioaktif pada jenis pelarut yang berbeda

Profil separasi molekul berbeda juga ditunjukkan pada masing-masing pelarut. Pelarut polar yaitu aquadest memiliki waktu separasi lebih singkat dibanding pelarut lain, diikuti ekstrak dengan pelarut alcohol, sedangkan waktu separasi terlama ditunjukkan oleh pelarut chloroform. Meskipun demikian jumlah senyawa yang terdeteksi GC-MS paling banyak diperoleh dari pelarut petroleum eter, mencapai 77 senyawa (Gambar 8.)



Gambar 8: Perbedaan jumlah total senyawa bioaktif pada tomat yang diekstraksi menggunakan jenis pelarut yang berbeda

Berdasarkan hasil penelitian, senyawa bioaktif dapat ter-ekstraksi lebih banyak menggunakan pelarut non-polar dibanding pelarut polar. Selain itu, penggunaan etanol 70% sebagai pelarut

juga menunjukkan profil senyawa bioaktif paling sedikit dibanding pelarut polar yang lain. Hal tersebut kemungkinan disebabkan oleh adanya campuran aquades pada alkohol yang mempengaruhi tingkat kelarutan senyawa. Meskipun dapat mengekstraksi senyawa bioaktif lebih banyak, namun petroleum eter tidak terlalu efektif untuk mengekstraksi senyawa C rantai pendek. Secara spesifik, senyawa fitosterol lebih banyak ditemukan pada tomat yang diekstraksi dengan petroleum eter, ditampilkan pada Table 1.

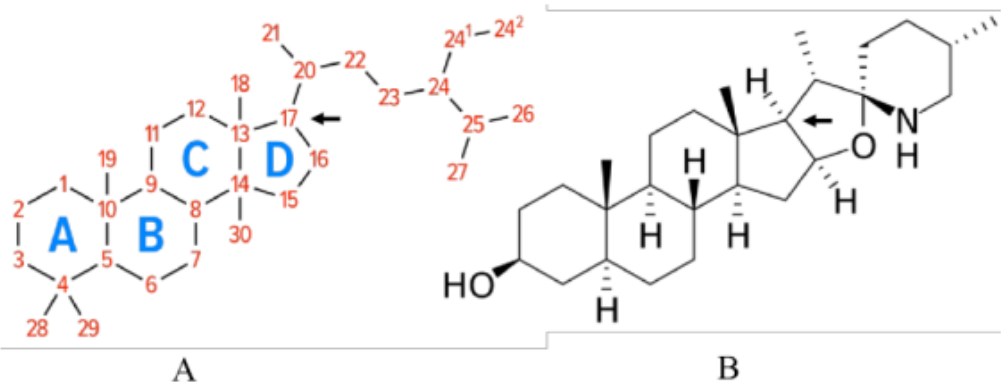
Tabel 5: Persentase fitosterol pada buah tomat.

Nama IUPAC	Rumus Molekul	Konsentrasi senyawa (%)			
		P	C	E	A
6-Methoxy-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman	C29H50O2	9.02	29.28	-	-
Methyl 9-cis,11-trans-octadecadienoate	C19H34O2	21.25	-	-	-
Butanedioic acid, hydroxy-, (S)-	C4H6O5	-	-	25.25	26.37
2,5-Hexanedione, 3,4-dihydroxy-3,4-dimethyl-	C8H14O4	-	-	6.56	19.56
N-Hydroxymethylacetamide	C3H7NO2	-	-	9.80	15.82
Pentadecanoic acid, methyl ester	C16H32O2	15.80	-	-	-
4,4,6a,6b,8a,11,12,14b-Octamethyl-docosahydricene-3,13-diol	C30H52O2	-	15.10	-	-
Acetic acid, 3,4-dihydroxy-3-methyl-butyl ester	C7H14O4	-	-	13.53	-
6-Octadecenoic acid, methyl ester	C19H36O2	13.42	-	-	-
Butanoic acid, ethyl ester	C6H12O2	-	3.89	13.59	-
(+)-?-Tocopherol, O-methyl-	C29H50O2	10.41	2.83	-	-
Oxirane-2-carboxylic acid, ethyl ester	C5H8O3	-	-	-	10.17
9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-triene-3,24,25-triol, (3f,5Z,7E)-	C27H44O3	-	8.76	-	-
Dihydroxyacetone	C3H6O3	-	-	7.67	-
Isoxazolidine-3,5-dicarboxylic acid, dimethyl ester	C7H11NO5	-	-	-	6.90
d-Glycero-d-ido-heptose	C7H14O7	-	-	6.02	-
Heptadecanoic acid, 15-methyl-, methyl ester	C19H38O2	5.66	2.31	-	-

Nama IUPAC	Rumus Molekul	Konsentrasi senyawa (%)			
		P	C	E	A
l-(+)-Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	C38H68O8	3.73	-	-	-
1-Heptatriacotanol	C37H76O	0.37	4.31	-	-
trans-13-Octadecenoic acid, methyl ester	C19H36O2	3.31	-	-	-
Docosanoic acid, 1,2,3-propanetriyl ester	C69H134O6	2.25	0.81	-	-
13,16-Octadecadiynoic acid, methyl ester	C19H30O2	0.08	1.59		2.77
17-(1,5-Dimethylhexyl)-2,3-dihydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahydrocyclopenta[a]phenanthren-6-one	C27H44O3	-	4.20	-	-
1b,4a-Epoxy-2H-cyclopenta[3,4]cyclopropa[8,9]cycloundec[1,2-b]oxiren-5(1aH)-one, 2,7,9,10-tetrakis(acetyloxy)decahydro-3,6,8,8,10a-pentamethyl-	C28H38O11	-	4.92	-	-
6a,14a-Methanoplicene, perhydro-1,2,4a,6b,9,9,12a-heptamethyl-10-hydroxy-	C30H50O	-	3.84	-	-
9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester, (E,E)-	C19H34O2	-	-	-	3.81
d-Glycero-d-galacto-heptose	C7H14O7	-	-	-	3.91
L-Glucose	C6H12O6	-	-	3.50	
Hexadecanoic acid, 2-(octadecyloxy)ethyl ester	C36H72O3		3.42	-	-
(1R,2S,4S,5'S,6S,7S,8R,9S,12S,13S,16S,18S)-5',7,9,13-tetramethylspiro[5-oxapentacyclo[10.8.0.02,9.04,8.013,18]icosane-6,2'-piperidine]-16-ol *	C27H45NO2	1.05	2.44	0.09	-
N-Isopentyl-N-nitroso-pentylamine	C10H22N2O	-	-	-	3.30
Deoxyspergualin	C17H37N7O3	-	-	-	2.71
l-Gala-l-ido-octose	C8H16O8	0.06	-	1.86	0.18
Spiro[8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3f,5a,14f,20f,22f,25R)-	C27H40O4	-	1.76	-	-

Nama IUPAC	Rumus Molekul	Konsentrasi senyawa (%)			
		P	C	E	A
Senyawa lain (termasuk fitosteroid dengan komposisi < 1% dan senyawa non fitosteroid)		22.62	39.83	12.13	4.29

Keterangan: tanda bintang (*) menunjukkan keberadaan tomatidine. P = petroleum eter; C = chloroform; E = ethanol 70%; A = Aquadestt.



Gambar 9: Perbandingan rumus kimia steroid (A) dan tomatidine (B) yang terdapat pada tomat. Tanda panah menunjukkan letak percabangan rantai samping.

Hasil pengujian GC-MS menunjukkan bahwa tomatidine ditemukan pada ketiga pelarut namun tidak ditemukan pada pelarut air. Hal tersebut sesuai dengan sifat fisikokimia tomatidine yaitu golongan phytosteroid yang terlarutkan dalam pelarut non-polar. Hal yang menarik adalah beberapa senyawa, termasuk tomatidine cenderung lebih banyak ditemukan pada pelarut chloroform dibanding petroleum eter dan ethanol 70%.

Prosedur ekstraksi merupakan tahapan yang krusial dalam memperoleh senyawa yang target. Pemahaman tentang karakter fisikokimia senyawa target menjadi sangat penting sebagai landasan berpikir dalam menentukan jenis pelarut yang harus digunakan [19]. Dalam penelitian ini, ekstraksi tomatidine yang merupakan

senyawa non-polar golongan fitosteroid lebih, cocok dilakukan menggunakan pelarut non-polar seperti kloroform, petroleum eter atau pelarut semi polar seperti ethanol dengan kemurnian 70% atau lebih. Hal tersebut karena, struktur atau jenis atom penyusun senyawa bioaktif sangat menentukan karakter fisikokimia, seperti pH, polaritas [15], dan stabilitas termal yang mempengaruhi interaksi antar atom dengan pelarut [18].

Pelarut non-polar dalam penelitian ini adalah chloroform dan petroleum eter memiliki konstanta dielektrik yang rendah dan melarutkan senyawa non-polar dengan tekanan internal yang sama melalui interaksi dipol terinduksi [23]. Berbeda dengan kelarutan senyawa polar menggunakan pelarut aquades yang lebih disebabkan oleh adanya proses ionisasi, pada pelarut non-polar kelarutan lebih disebabkan oleh gaya lemah dipol sesaat pada interaksi Van-Der-Waals [2]. Sedangkan pada pelarut semi-polar seperti etanol 70%, gaya dipol sesaat dapat mempengaruhi derajat polaritas yang menyebabkan senyawa non-polar dapat terlarut. Pelarut semi-polar bertindak sebagai perantara yang menyebabkan bercampurnya cairan polar dan non-polar [22].

Mayoritas senyawa yang teridentifikasi melalui GC-MS merupakan golongan fitosterol dan turunan alkaloid. Fitosterol merupakan anggota dari keluarga triterpene yang memiliki struktur tetrasiklik dan rantai samping pada posisi C-17 (Gambar 9A). Secara umum senyawa fitosterol memiliki struktur utama tetrasiklik, dengan substitusi diposisi C-4 dan C-24 pada rantai samping [14]. Sifat ketidakjenuhan senyawa dipengaruhi oleh keberadaan rantai samping dan cincin, serta konjugasi gugus hidroksil alkohol C-3 yang bermuatan dan berpotensi berikatan dengan asam fenolik, asam lemak, atau karbohidrat [12]. Selain itu, fitosterol bebas sering mengandung ikatan rangkap pada cincin-B antara C-5 dan C-6,

atau C-7 dan C-8, juga disebut sebagai 5- dan 7-sterol (tergantung letak posisi ikatan rangkap yang biasanya menjadi pengenalan/karakter khas spesies tumbuhan tertentu [14]. Sebagai contoh, fitosterol pada mayoritas tumbuhan memiliki struktur 5-sterol, namun spesies tertentu dari family Amaranthaceae dan Cucurbitaceae didominasi dengan struktur 7-sterol [17].

Pengelompokan fitosterol dapat dilakukan menggunakan keberadaan metil pada atom C-4, yang menjadi desmetil- (tanpa gugus metil), 4-monometil- (satu molekul metil berikatan dengan C-4), atau 4,4-dimetil sterol (dua metil). Selain itu, keberadaan gugus alkil pada atom C-24 juga digunakan sebagai dasar pengelompokan keragaman struktural fitosterol pada tumbuhan tingkat tinggi dimana gugus metil, metilen, etil atau etilena dapat terpasang pada C-24 [8]. Selanjutnya, beberapa kondisi yang cukup jarang ditemukan pada fitosterol adalah adanya ikatan rangkap pada rantai samping C-22 dan C-23 atau C-23 dengan C-24 yang meningkatkan polaritas sterol. Terbatasnya gugus molekul yang bersifat polar (hanya pada C-3 dan kemungkinan pada ujung bebas) menyebabkan senyawa fitosterol tidak dapat larut dalam senyawa non-polar [24].

Salah satu fitosterol yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat adalah tomatidine. Tomatidine memiliki manfaat kesehatan, terutama dalam mencegah terjadinya atrofi otot melalui interaksi dengan *activating transcription factor 4* (ATF4) (mediator penting dalam mekanisme kelemahan dan atrofi otot terkait usia), dan sarkopenia terkait penuaan [5]. Suplementasi makanan dengan 0,04% tomatidine selama 10 minggu juga terbukti mampu menurunkan kadar kolesterol plasma dan resiko aterosklerosis [20]. Selain itu, tomatidine berperan dalam mempengaruhi ekspresi gen *ATF2* pada respon inflamasi virus (Mayra

Diosa-Toro). Tomatidine terbukti secara aktif meningkatkan regulasi TIMP-1 dan RECK dan menurunkan regulasi MMP-2 pada sel adenocarcinoma A549 [3].

Berdasarkan keterangan di atas, perbandingan struktur kimia tomatidine dengan fitosterol secara umum menunjukkan adanya perbedaan, seperti ujung C-4 bebas dan C-3 mengandung gugus hidroksi pada tomatidin. Selain itu, percabangan pada C-23 berikatan dengan N-24 dan menyisakan ujung yang kemungkinan mengakibatkan perubahan polaritas kelarutan. Oleh sebab itu, tomatidine dapat ditemukan pada pelarut ethanol 70% yang mengandung molekul air. Meskipun demikian, polaritas tersebut tidak cukup kuat untuk melarutkan tomatidine di dalam air yang merupakan pelarut senyawa polar.

Tomatidine termasuk fitosteroid yang secara alami dapat ditemukan di daun atau tomat hijau dan mengalami degradasi pada tomat yang telah matang [3]. Oleh sebab itu, faktor pemilihan usia tomat kemungkinan juga menjadi penyebab sedikitnya konsentrasi tomatidine. Perlu adanya kajian lebih lanjut untuk menemukan konsentrasi terbaik tomatidine pada berbagai jenis dan usia tomat.

4.4 Ringkasan

Penelitian ini menghasilkan beberapa temuan, yaitu bahwa senyawa kandidat Tomatidine kemungkinan terdapat pada tiga ekstrak tomat yaitu, ether, chloroform dan petroleum eter. Hal tersebut diperkuat dengan adanya senyawa (1R,2S,4S,5'S,6S,7S,8R,9S,12S,13S,16S,18S)-5',7,9,13-tetramethylspiro[5-oxapentacyclo [10.8.0.0.2,9.0.4,8.0.13,18] icosane-6,2'-piperidine]-16-ol dengan rumus molekul $C_{27}H_{45}NO_2$ dan konsentrasi yang mencapai 2.44% pada pelarut chloroform. Meskipun demikian, tomatidine bukanlah senyawa bioaktif utama yang memiliki kandungan konsentrasi paling tinggi pada tomat merah. Lebih lanjut, senyawa bioaktif

tomat lebih banyak ditemukan pada pelarut lipid daripada air. Kemungkinan sifat senyawa bioaktif yang terkandung pada buah tomat cenderung didominasi oleh karakteristik sifat senyawa non-polar. Hal tersebut mendukung fakta yang menunjukkan bahwa perlunya lipid sebagai agen peningkat absorpsi nutrisi tomat di dalam usus. Penelitian lebih lanjut perlu dikembangkan untuk mengetahui konsentrasi terbaik senyawa tomatidine berdasarkan usia buah tomat.

Daftar Pustaka

- [1] Awotedu, O. L., Okeke, U. E., Ogunbamowo, P. O., Ariwoola, O. S., & Omolola, T. O. (2020). Extraction of Phytochemical Compounds of *Leea guineensis* (G. Don) Leaves Using Non-polar and Polar Solvents. *European Journal of Medicinal Plants*, 31(March 2019), 24–31. <https://doi.org/10.9734/ejmp/2020/v31i230213>
- [2] Bux, K., & Moin, S. T. (2020). Solvation of cholesterol in different solvents: A molecular dynamics simulation study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(3), 1154–1167. <https://doi.org/10.1039/c9cp05303d>
- [3] Dey, A., & Mukherjee, A. (2018). Plant-Derived Alkaloids: A Promising Window for Neuroprotective Drug Discovery. In *Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products: Natural Product Drug Discovery*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809593-5.00006-9>
- [4] Dey, P., Kundu, A., Chakraborty, H. J., Kar, B., Choi, W. S., Lee, B. M., Bhakta, T., Atanasov, A. G., & Kim, H. S. (2019). Therapeutic value of steroidal alkaloids in cancer: Current trends and future perspectives. *International Journal of Cancer*, 145(7), 1731–1744. <https://doi.org/10.1002/ijc.31965>
- [5] Ebert, S. M., Al-Zougbi, A., Bodine, S. C., & Adams, C. M. (2019). Skeletal muscle atrophy: Discovery of mechanisms and potential therapies. *Physiology*, 34(4), 232–239.

<https://doi.org/10.1152/physiol.00003.2019>

- [6] Edge, R., & Truscott, T. G. (2018). Singlet oxygen and free radical reactions of retinoids and carotenoids—A review. *Antioxidants*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/antiox7010005>
- [7] Elias, M. D. B., Oliveira, F. L., Guma, F. C. R., Martucci, R. B., Borojevic, R., & Teodoro, A. J. (2019). Lycopene inhibits hepatic stellate cell activation and modulates cellular lipid storage and signaling. *Food and Function*, 10(4), 1974–1984. <https://doi.org/10.1039/c8fo02369g>
- [8] Feng, S., Wang, L., Shao, P., Sun, P., & Yang, C. S. (2021). A review on chemical and physical modifications of phytosterols and their influence on bioavailability and safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–20. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1888692>
- [9] Friedman, M. (2013). Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, α -tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(40), 9534–9550. <https://doi.org/10.1021/jf402654e>
- [10] Iswari, R. S., Dharmana, E., Muiz, F., & Riwanto, I. (2016). Combination of chloroquine and lycopene for combating malaria: A case study in mice (*Mus musculus*) infected with *Plasmodium berghei*. *Pakistan Journal of Nutrition*, 15(8), 789–794. <https://doi.org/10.3923/pjn.2016.789.794>
- [11] Iswari, R. S., & Susanti, R. (2016). Antioxidant Activity from Various Tomato Processing. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 8(1), 127. <https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v8i1.4722>
- [12] Miras-Moreno, B., Sabater-Jara, A. B., Pedreno, M. A., & Almagro, L. (2016). Bioactivity of Phytosterols and Their Production in Plant *in Vitro* Cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(38), 7049–7058. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02345>
- [13] Mohajeri, D., & Sefidan, A. M. (2013). Inhibitory Effects of

Solanum lycopersicum L . on High Fat Diet-. *Advances in BioResearch*, 4(4), 33–39.

- [14] Moreau, R. A., Nyström, L., Whitaker, B. D., Winkler-Moser, J. K., Baer, D. J., Gebauer, S. K., & Hicks, K. B. (2018). Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70(2017), 35–61. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.001>
- [15] Nawaz, H., Shad, M. A., Rehman, N., Andaleeb, H., & Ullah, N. (2020). Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 56, e17129. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000417129>
- [16] Nouri, M. H. K., & Abad, A. N. A. (2013). Comparative study of tomato and tomato paste supplementation on the level of serum lipids and lipoproteins levels in rats fed with high cholesterol. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(4), 287–291. <https://doi.org/10.5812/ircmj.1007>
- [17] Piironen, V., & Lampi, A. M. (2014). Rye as a Source of Phytosterols, Tocopherols, and Tocotrienols. In *Rye and Health* (1st ed.). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-891127-81-6.50009-2>
- [18] Poole, C. F. (2019). Influence of Solvent Effects on Retention of Small Molecules in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 82(1), 49–64. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3531-3>
- [19] Roopashree, K. M., & Naik, D. (2019). Advanced method of secondary metabolite extraction and quality analysis. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 8(3), 1829–1842. <https://www.researchgate.net/publication/333531494>
- [20] Singh, S. P., & Sashidhara, K. V. (2017). Lipid lowering agents of natural origin: An account of some promising chemotypes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 140, 331–348. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.020>
- [21] Sukthanarak, C., & Peerapittayamongkol, C. (2021). The

- effects of Tomatidine in stimulating mitophagy in human fibroblast. *7th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, 1–15.
- [22] Tang, W., & Row, K. H. (2020). Design and evaluation of polarity controlled and recyclable deep eutectic solvent based biphasic system for the polarity driven extraction and separation of compounds. *Journal of Cleaner Production*, 268, 122306. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122306>
- [23] Trivedi, C. M., & Rana, V. A. (2017). Dielectric properties of amino substituted pyridines in dilute solutions of some non-polar solvents at different temperatures. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, 55(9), 655–663.
- [24] Uddin, M. S., Ferdosh, S., Haque Akanda, M. J., Ghafoor, K., Rukshana, A. H., Ali, M. E., Kamaruzzaman, B. Y., Fauzi, M. B., Hadijah, S., Shaarani, S., & Islam Sarker, M. Z. (2018). Techniques for the extraction of phytosterols and their benefits in human health: a review. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(14), 2206–2223. <https://doi.org/10.1080/01496395.2018.1454472>

Potensi Ekstrak Daun Cassava (*Manihot Esculenta*) Untuk Kesehatan

Nugrahaningsih WH

Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Negeri Semarang

e-mail: nugrahaningsihwh@mail.unnes.ac.id

5.1 Pendahuluan

Cassava merupakan tanaman yang berasal dari Amerika Selatan, menyebar ke seluruh dunia termasuk Indonesia. Tanaman ini sangat mudah tumbuh dan berkembang pada daerah tropis. Cassava merupakan salah satu tumbuhan budidaya di Indonesia. Tanaman ini memiliki banyak manfaat, terutama umbi dan daunnya. Umbi Cassava merupakan sumber karbohidrat dan menjadi makanan pokok di beberapa daerah. Cassava memiliki beberapa nama daerah antara lain merupakan famili *Euphorbiaceae* dengan taksonomi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatopyhta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: Manihot
Spesies	: <i>Manihot Uttilissima</i> Pohl. Sin (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).



Gambar 10: Daun Cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Daun Cassava (*Manihot esculenta*) merupakan salah sumber antioksidan yang memiliki banyak manfaat untuk kesehatan. Beberapa kultivar Cassava memiliki kandungan antioksidan yang berbeda-beda [1]. Perbedaan kandungan antioksidan pada berbagai kultivar ini sangat wajar mengingat adanya perbedaan pada tiap kultivarnya. Jumlah klorofil ataupun perbedaan warna daun bisa jadi menghasilkan kandungan antioksidan yang berbeda.

Persen penghambatan radikal bebas DPPH terkuat dihasilkan oleh ekstrak metanol simplisia daun singkong dengan nilai IC_{50} sebesar 92.10 mg/L yang tergolong antioksidan kuat [2]. Ekstrak methanol daun rebus dan ekstrak air menghasilkan nilai IC_{50} yang lebih tinggi, yang berarti lebih lemah dibanding ekstrak methanol simplisia.

Analisis komponen fitokimia ekstrak daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz) menunjukkan ekstrak air dan ekstrak methanol daun singkong mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, fenolik, dan saponin [2-3]. Senyawa- senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun Cassava memegang peran peting pada pengaruhnya terhadap perubahan metabolisme maupun patofisiologi sel, jaringan, organ dan system organ.

Daun Cassava tidak hanya dimanfaatkan sebagai sayuran, tetapi juga dimanfaatkan untuk pengobatan. Kandungan mineral, elektrolit, flavonoid dan metabolit sekunder lainnya membuat daun Cassava memiliki beberapa manfaat dalam bidang pengobatan atau kesehatan. Kandungan zat aktif pada daun Cassava cukup banyak dan zat aktif tersebut memiliki titik kerja pada struktur sel dan jaringan sehingga dapat mempengaruhi fungsi, atau memperbaiki fungsi yang kurang optimal. Cukup banyak penelitian yang menganalisis fungsi ekstrak daun Cassava pada variable-variabel yang berkaitan dengan fungsi tubuh dan kesehatan sehingga perlu dilakukan identifikasi dan klasifikasi.

5.2 Metode

Review dilakukan terhadap 19 artikel penelitian yang dipublikasikan dari tahun 2006 sampai tahun 2021. Pencarian artikel penelitian menggunakan kata kunci: *Manihot esculenta*, *Manihot utilissima*, Cassava dan singkong. Artikel yang direview hanya artikel dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris. Review artikel dilakukan secara sistematis dengan melihat pada variable terikat dan tujuan penelitian dari artikel untuk mendapatkan potensi ekstrak daun Cassava dalam bidang preventif dan kuratif penyakit. Hasil review disajikan secara deskriptif dalam klasifikasi pengaruh pemberian ekstrak daun Cassava terhadap kondisi patologis tertentu.

5.3 Hasil dan Pembahasan

Antikanker

Kanker merupakan kelainan yang menimbulkan mortalitas dan morbiditas cukup tinggi. Kanker terjadi karena adanya perubahan perilaku sel yang menjadi tidak terkendali. Proliferasi sel pada jaringan kanker meningkat berlipat dari sel normal, sementara

kemampuan untuk apoptosis menjadi hilang atau sangat rendah, sehingga jaringan kanker akan bertambah besar dengan cepat. Kanker ganas bersifat invasif dan destruktif sehingga dapat menyebabkan metastase dan berakhir dengan kematian.

Ekstrak daun Cassava memiliki potensi sebagai anti kanker. Uji sitotoksik yang dilakukan pada sel Raji menunjukkan adanya kemampuan ekstrak chloroform dan ethanol dari daun Cassava dalam menghambat proliferasi sel kanker [4]. Ekstrak daun Cassava juga berhasil menghambat proliferasi sel kanker ovarium (Caov-3) dan kanker leher rahim (sel HeLa) [5]. Uji sitotoksik dengan teknik MTT assay menunjukkan nilai IC_{50} ekstrak aquadest daun Cassava sebesar 38 $\mu\text{g/mL}$ pada sel Caov-3 dan 57 $\mu\text{g/mL}$ [5]. Nilai IC_{50} yang rendah juga ditunjukkan terhadap sel Raji, yaitu 71,865 $\mu\text{g/mL}$ [4]

Ekstrak daun Cassava juga meningkatkan ekspresi protein p53 [4]. Protein p53 dikenal sebagai *the guardian of genome* berperan dalam menjaga sel dari mutasi dan kerusakan DNA yang dapat menyebabkan berkembangnya sel normal menjadi sel kanker. Meningkatnya ekspresi protein p53 setelah pemberian ekstrak daun Cassava dapat memberikan keuntungan dimana p53 akan mencegah sel-sel dengan kerusakan DNA berproliferasi sehingga mengarahkan pada sel yang Kembali ke normal.

Linamarin merupakan salah satu zat aktif yang ada dalam daun Cassava. Linamarin berperan sebagai antineoplastik dengan melepaskan HCN selama proses hidrolisis. HCN yang dilepaskan pada daerah sekitar sel kanker dapat menyebabkan kematian sel secara bertahap karena adanya gen linamarase pada sel kanker. Linamarin memiliki potensi sitotoksik yang lebih baik dibandingkan dengan tamoxifen dan etoposida karena kemampuan berdifusi dari metabolit toksiknya yang lebih tinggi, dan juga karena

dosisnya yang relative kecil sehingga mudah didetoksifikasi oleh sel sehat di sekitarnya [5].

Terhambatnya proliferasi sel Raji juga disebabkan kandungan β -karoten 5,6 dalam daun Cassava. β -karoten memiliki mekanisme antikanker dengan metabolisme modulasi karsinogen dan aktivitas antioksidannya, sehingga memodulasi sistem kekebalan, meningkatkan diferensiasi sel, merangsang komunikasi sel pada *gap junction* dan mempengaruhi *retinoid-dependent signals* [4].

Penyembuhan Luka

Ekstrak daun Cassava memiliki potensi sebagai agen dalam percepatan penyembuhan luka. Penelitian secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan hasil adanya perbaikan jaringan yang lebih cepat. Pada penelitian *in vivo*, luka sayat pada kulit kelinci yang diberikan ekstrak daun Cassava 20% mengalami penyembuhan hampir sama cepat dengan kontrol positif [6].

Penggunaan gel ekstrak daun Cassava untuk penyembuhan luka sayat juga menunjukkan hasil yang cukup bagus. Pada konsentrasi 80% hasilnya hampir menyamai kontrol positif [7]. Kuersetin sebagai salah satu flavonoid yang cukup tinggi dalam ekstrak daun Cassava diperkirakan berperan dalam penghambatan pembentukan mediator kimia *prostaglandin*, *leukotrin* dan *histamin*.

Ekstrak daun Cassava tidak hanya mempercepat penyembuhan luka sayat, namun juga memiliki efek yang baik pada proses penyembuhan luka bakar [8]. Proses penyembuhan luka bakar ini juga dipengaruhi oleh dosis ekstrak. Pemberian ekstrak etanol daun Cassava mencegah terjadinya infeksi pada luka bakar sehingga proses penyembuhan luka tidak terganggu.

Penyembuhan luka yang dipercepat oleh adanya zat aktif pada ekstrak daun Cassava tidak hanya ditemukan pada penelitian *in vivo* pada hewan coba, namun juga terbukti pada penelitian *in*

vitro. Penelitian dengan memberikan ekstrak daun Cassava pada sel *Human Cell Fibroblast* (HSF) 1184 menunjukkan adanya peningkatan viabilitas setelah proses penggoresan pada lapisan sel [9]. Kombinasi ekstrak daun Cassava dan gelombang ultrasonic memberikan efek penyembuhan luka yang paling baik. Ekstrak daun Cassava 5% juga dapat meningkatkan viabilitas sel Fibroblast pada kultur DMEM sehingga segera terjadi perbaikan kembali lapisan sel fibroblast selapis yang dikerok [10]. Fibroblast mempunyai peran penting pada penyembuhan luka.

Ekstrak daun Cassava mengandung saponin dan flavonoid yang diperkirakan memiliki peran penting pada proses penyembuhan luka melalui fungsinya sebagai anti inflamasi. Kandungan tannin dan terpenoid juga berperan dalam penyembuhan luka melalui perannya sebagai antioksidan. Vitamin C (asam askorbat) selain berperan pada proses proliferasi, juga dapat meningkatkan sintesis kolagen pada sel fibroblast.

Analgesik

Daun Cassava mengandung substansi yang dapat berfungsi sebagai antioksidan termasuk vitamin C dan α -carotenes. Kemampuan antioksidan dalam menetralkan efek radikal bebas memungkinkan ekstrak daun Cassava dapat memberikan efek sebagai analgetic atau penghilang rasa sakit. Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun Cassava dapat mengurangi frekuensi menggeliat sebagai respon terhadap rasa sakit akibat induksi asam asetat [11-12]. Asam asetat adalah zat yang digunakan untuk melakukan induksi rasa sakit pada hewan coba, termasuk tikus,

Penghambatan rasa sakit akibat diinduksi asam asetat pada tikus oleh ekstrak daun Cassava mungkin terjadi karena penghambatan aktivitas siklooksigenase (COX) dan penurunan sintesis

mediator kimia pada proses inflamasi seperti prostaglandin, dan tromboksan. Ekstrak daun Cassava mengandung karotenoid, flavonoid, tanin dan terpenoid. Keempat metabolit tersebut diperkirakan memiliki peran dalam fungsinya sebagai analgesik.

Flavonoid merupakan zat aktif yang banyak terdapat pada tumbuhan termasuk daun Cassava. Telah banyak penelitian yang mengatakan bahwa flavonoid dapat menghasilkan berbagai aktivitas biologis seperti anti-alergi dan anti-inflamasi. Flavonoid menekan aktivitas siklooksigenase dan lipooksigenase, menyebabkan peroksidasi lipid, mempengaruhi permeabilitas kapiler dan agregasi trombosit.

Selain flavonoid, peran analgesik juga dilakukan oleh tannin. Tanin merupakan inhibitor oksidase yang kuat sehingga berfungsi sebagai anti inflamasi yang berarti juga dapat mengurangi rasa sakit akibat peradangan. Aktivitas biologis Tanin dimediasi melalui penghambatan peroksidasi lipid dan aktivitas plasma. Beberapa penelitian menunjukkan menunjukkan bahwa tanin mampu menginduksi fungsi analgesik dan mengurangi edema kaki yang disebabkan pemberian formalin dan karagenan [13-14].

Karotenoid dan terpenoid merupakan zat aktif dalam daun Cassava yang juga memiliki peran dalam menimbulkan efek analgesic. Karotenoid memiliki fungsi sebagai antioksidan sehingga melindungi sel dan jaringan dari kerusakan akibat adanya ROS pada proses inflamasi. Karotenoid dapat mengikat oksigen bebas pada radikal peroksida. Terpenoid juga memiliki peran signifikan dalam menghambat perkembangan kronis pembengkakan sendi akibat proses inflamasi. Terpenoid dapat mempengaruhi mekanisme yang berbeda yang relevan peradangan yang timbul sebagai respons terhadap faktor etiologi. Adanya efek anti inflamasi dari ekstrak daun singkong mungkin karena adanya kandungan terpenoid ini.

Antibakteri

Ekstrak daun Cassava mengandung zat aktif yang mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi zat antibakteri. Ekstrak etanol dengan konsentrasi yang cukup rendah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. epidermidis* dan *P. acnes* [15]. *S. epidermidis* dan *P. acnes* merupakan flora normal kulit yang dapat menjadi patogen ketika lingkungan hidupnya berubah, dan menimbulkan akne/jerawat.

Ekstrak kloroform dan ekstrak etanol dari daun Cassava juga mampu menghambat pertumbuhan koloni beberapa bakteri. Dengan uji penghambatan koloni bakteri didapatkan hasil bahwa ekstrak kloroform memiliki aktivitas antibakteri terhadap *L. monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* dan *Salmonella typhi*. Hasil serupa ditunjukkan oleh ekstrak etanol dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, *C. diphtheria* dan *V. cholerae* [16]. Uji penghambatan cakram ekstrak daun Cassava mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi terbaik 1000 µg/ml [17]. Pengaruh ekstrak daun Cassava terhadap *Shigella sp.* tidak sekuat daya hambat Chloramphenicol yang saat ini masih merupakan obat standar untuk *Shigella sp.* meskipun daya hambatnya semakin meningkat seiring penambahan dosis ekstrak [18].

Saponin dapat meningkatkan permeabilitas membrane sel bakteri sehingga terjadi sitolisis sel bakteri. Kerusakan membrane sel bakteri juga dapat disebabkan karena kandungan flavonoid pada ekstrak Cassava. Secara umum efek antibakteri yang diakibatkan oleh zat aktif dari ekstrak Cassava terjadi karena terganggunya integritas membran bakteri sehingga terjadi lisis. Sebagai organisme sel tunggal, maka lisis membrane sel berarti kematian organisme.

Hepatoprotektif

Hati merupakan organ penting yang berfungsi untuk menetralkan racun atau zat toksik yang masuk melalui saluran cerna. Dengan fungsi tersebut hati sangat rentan terhadap kerusakan. Sebagai sel pada sistem pertahanan tubuh, sel hepatosit dapat mengalami regenerasi dengan lebih baik. Kemampuan regenerasi sel-sel hepatosit dapat didukung oleh banyak faktor maupun zat. Daun Cassava yang memiliki kandungan antioksidan yang cukup tinggi merupakan salah satu tumbuhan yang dapat mempercepat regenerasi sel-sel hepatosit yang mengalami kerusakan.

Penelitian dengan memberikan ekstrak daun Cassava dapat menurunkan kadar AST dan ALT yang tinggi setelah induksi kerusakan hati dengan CCl₄ pada tikus [19]. Penurunan kadar AST dan ALT terjadi pada pemberian dosis ekstrak yang cukup tinggi yaitu 400 mg/KgBB. Flavonoid diperkirakan memegang peran penting dalam perbaikan sel hati karena dapat mencegah atau menetralkan terjadinya radikal bebas. Adanya antioksidan dapat mencegah reaksi oksidasi yang dari radikal bebas yang bisa berakibat kerusakan membrane sel.

Ekstrak daun Cassava juga dapat memperbaiki kerusakan sel hati akibat efek samping obat Gentamisin. Gentamisin merupakan salah satu antibiotik standar yang digunakan untuk melawan bakteri Gram negatif. Sayangnya, Gentamisin memiliki efek samping dapat menyebabkan kerusakan sel hati dengan prevalensi sekitar 5-10%. Pemberian ekstrak daun Cassava dapat mencegah terjadinya penurunan serum albumin akibat kerusakan sel hati akibat induksi Gentamisin [20].

Antidiabetik

Diabetes Mellitus merupakan penyakit metabolik yang ditandai dengan tingginya kadar gula darah. Kondisi ini terjadi

karena sel-sel tidak bisa memanfaatkan glukosa dari makanan menjadi energi. Diabetes Mellitus dapat dibedakan menjadi IDDM (*Insulin Dependent Diabetes Mellitus*) dan NIDDM (*Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus*). Baik IDDM maupun NIDDM memerlukan manajemen terapi diet, olahraga dan OAD. Bahan makanan dengan indeks glikemik dan antioksidan yang tinggi yang rendah menjadi alternatif untuk membantu mengontrol kadar gula darah.

Ekstrak daun Cassava sebagai salah satu tanaman dengan kadar antioksidan yang tinggi dapat membantu menurunkan kadar gula darah pada tikus yang diinduksi aloksan [21]. Secara *in vitro*, penurunan kadar gula darah pada pemberian ekstrak daun Cassava dapat melalui jalur penghambatan enzim α -glukosidase dan α -amilase [22]. Enzim α -glukosidase dan α -amilase merupakan enzim pencernaan yang merubah karbohidrat menjadi gula sederhana yang mudah diabsorpsi oleh usus halus. OAD yang memiliki target kerja pada enzim α -glukosidase dan α -amilase adalah acarbose. Pada penelitian secara *in vitro*, efek penghambatan enzim α -glukosidase dan α -amilase oleh ekstrak daun Cassava mendekati efek Acarbose (Okoro).

Antidiare

Diare dapat disebabkan oleh banyak faktor, antara lain infeksi, zat toksik maupun adanya zat atau obat yang bersifat parasimpatomimetik. Secara patofisiologis, diare terjadi karena meningkatnya motilitas usus halus sehingga isi saluran cerna lebih cepat dikeluarkan melalui anus. Motilitas usus yang meningkat juga menyebabkan timbulnya rasa mules atau nyeri pada saluran cerna. Diare juga ditandai dengan adanya akumulasi cairan dalam saluran cerna.

Sebuah penelitian menggunakan ekstrak daun Cassava untuk menghambat motilitas usus halus tikus dilakukan dengan *Charcoal meal test*. Penelitian tersebut menunjukkan adanya aktivitas antidiare dari ekstrak daun Cassava yang mampu menurunkan motilitas usus halus hingga 58,49%, sangat mirip dengan control positif yang digunakan yaitu Atropin sulfat [23]. Atropin sulfat mampu menghambat motilitas usus halus sebesar 59,86%. Aktivitas antidiare tersebut dimungkinkan karena adanya kandungan tannin, polifenol, alkaloid, saponin dan rendah gula, yang dapat mengurangi akumulasi cairan pada saluran cerna.

Antihelmintik

Cacing merupakan salah satu parasite yang dapat hidup pada tubuh manusia dan mengganggu beberapa fungsi fisiologis tubuh. Cacing pada saluran cerna selain dapat menyebabkan gangguan absorbs nutrisi, juga dapat menyebabkan terjadinya anemia dalam jangka Panjang. Beberapa Nematoda yang biasa menjadi parasite pada saluran cerna manusia telah mengalami proses adaptasi sehingga menjadi resisten terhadap obat antihelmintik yang diberikan.

Ekstrak daun Cassava merupakan alternatif yang dieksplorasi dalam aktivitasnya sebagai antihelmintik. Pengujian dengan memberikan ekstrak daun Cassava pada *Haemophilus contortus* menunjukkan adanya penurunan pergerakan cacing dan akhirnya terjadi kematian [24]. Efek antihelmintik ini diperkirakan karena adanya kandungan tannin pada ekstrak daun Cassava. Tannin membentuk kompleks protein yang tidak tercerna pada gastrointestinal cacing dengan mengikat asam amino dan menghambat kerja enzim pencernaan *H. contortus* sehingga terjadi kematian.

5.4 Ringkasan

Daun Cassava merupakan salah satu bahan dari tumbuhan yang memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai kandidat obat herbal berstandar maupun fitofarmaka. Kandungan flavonoid, tannin, vitamin dan mineral menjadikan ekstrak daun Cassava dapat bekerja dalam beberapa jalur yang berkaitan dengan patofisiologi tubuh. Dari artikel penelitian yang sudah dipublikasi daun Cassava dapat memiliki potensi sebagai antikanker, mempercepat penyembuhan luka, analgetik, antibakteri, anti inflamasi, hepatoprotektif, antidiabetic, antidiare dan anthelmintik. Sebagian besar riset pengaruh ekstrak daun Cassava pada kesehatan masih terbatas pada pengaruhnya terhadap sel, jaringan dan fungsi fisiologis, dan belum banyak penjelasan secara biomolekulernya. Masih terbuka luas riset untuk mengeksplorasi daun Cassava, baik pengaruhnya maupun mekanisme atau target kerjanya pada sel, jaringan, organ dan sistem organ sehingga pengembangan daun Cassava sebagai obat herbal atau fitofarmaka memiliki dasar yang lebih kuat.

Daftar Pustaka

- [1] Solikhah R, Purwantoyo E dan Rudyatmi E. (2019). Aktivitas Antioksidan Dan Kadar Klorofil Kultivar Singkong Di Daerah Wonosobo. *Life Science* 8 (10)
- [2] Hasim, Falah S, Dewi LK (2016) Effect of Boiled Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) on Total Phenolic, Flavonoid and its Antioxidant Activity. *Current Biochemistry* Volume 3 (3): 116 - 127, 2016
- [3] Ogbuji CA dan David-Chukwu NP (2016) Phytochemical, Antinutrient and Mineral Compositions of Leaf Extracts of Some Cassava Varieties. *Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR-JESTFT)* 10 (1): 05-08
- [4] Sutiningsih D, Wuryanto MA, Susanto HS, Hariyadi S dan Mustofa (2020). Anticancer Activity of Linamarin from Cassava

- Leaves (*Manihot esculenta* Cranz) on Raji Cells. *Int. J. Cancer Res.*, 16 (1): 18-27,
- [5] Yusuf, U.F., Fakhru'l-Razi, A., Rosli, R., Iyuke, S.E., Billa, N., Abdullah, N. and Umar-Tsafe, N. (2006) An *in vitro* inhibition of human malignant cell growth of crude water extract of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and commercial linamarin. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 28(Suppl. 1): 145-155
- [6] Sukmawati SS, Hastuti S, Rejeki S. (2021) Activity Test of The Ethanol Extract of Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) Against The Healing of Crosses In Rabbit. *IJMS – Indonesian Journal On Medical Science* 8 (2)
- [7] Megawati S, Nur'aini, Kurniasih D (2020) Uji Efektivitas Gel Ekstrak Etanol 96% Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) Pada Penyembuhan Luka Sayat Kelinci Jantan Galur New Zealand White. *Jurnal Farmagazine VII*(1)
- [8] Anggraini D, Suhada A, dan Rahmawati S (2017) Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot Esculenta*) Dalam Mengobati Luka Bakar Kulit Punggung Tikus (*Rattus Novergicus*) Jantan. *Jurnal Farmasetis* 6 (2):39 – 46
- [9] Anwar U dan Siti Pauliena Mohd Bohari SPM(2019) Effect of *Manihot Esculenta* Aqueous Extract and Therapeutic Ultrasound in Accelerating The Wound Healing Process *In Vitro*. *Jurnal Teknologi (Sciences & Engineering)* 81(4): 13–20
- [10] Riliani M, Kusuma I Halim A, M Aliya, Fitrianto A, dan Narendra IBE (2021) The Role of Fibroblast Proliferation in Wound Healing by Different Plants: An Experimental Study. *Proceedings of the 1st Jenderal Soedirman International Medical Conference in conjunction with the 5th Annual Scientific Meeting (Temilnas) Consortium of Biomedical Science Indonesia (JIMC 2020)*: 5-9. DOI: 10.5220/0010486300050009.
- [11] Miladiyah I, Dayi F, and Desrini S (2011) Analgesic activity of ethanolic extract of *Manihot esculenta* Crantz leaves in mice. *Univ Med* 30:3-10
- [12] Bokanisereme, Umar F. Yusuf, Patrick N. Okechukwu (2013) Anti-Inflammatory, Analgesic And Anti - Pyretic Activity of

Cassava Leaves Extract. *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 6 Issue 4, 2013, 89-92

- [13] Lee H, Lee JY, Suh MH. (2010) Hydrolysable tannins depress cardiac papillary muscle contraction and propranolol-induced negative inotropism. *Fitoterapia* 81:820-825
- [14] Owoyele BV, Negedu MN, Olaniran SO. (2010) Analgesic and anti-inflammatory effects of aqueous extract of Zea mays husk in male wistar rats. *Journal of medicinal food* 13:343-347.
- [15] Mustarichie R, Sulistiyaningsih S, and Runadi D (2020) Antibacterial Activity Test of Extracts and Fractions of Cassava Leaves (*Manihot esculenta* Crantz) against Clinical Isolates of *Staphylococcus epidermidis* and *Propionibacterium acnes* Causing Acne. *International Journal of Microbiology*
- [16] Zakaria ZA, Khairi HM, Somchit MN, Sulaiman MR, Mat Jais AM, Reezal I, Mat Zaid NN, Abdul Wahab S.N.Z., Fadzil N.S., Abdullah M and Fatimah CA,(2006). The *in vitro* Antibacterial Activity and Brine Shrimp Toxicity of *Manihot esculenta* var. Sri Pontian (Euphorbiaceae) Extracts. *International Journal of Pharmacology*, 2: 216-220
- [17] Rikomah, SE (2016) Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Singkong (*Manihot utilisima*) Pada Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa*. *Prosiding Seminar Nasional Ilmu Kesehatan 2016*:79-88.
<http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/snik/article/view/1216>
- [18] Pratiwi AP. (2016) Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz. *Jurnal Kesehatan VII* (1):161-164
- [19] Tao HT, Qiu B, Du FL, Xu TC, Liu LN, Lü F, Li KM, Liu W (2015) The Protective Effects of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Leaf Flavonoid extracts on Liver Damage of Carbon Tetrachloride Injured Mice. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* (2015) 12(1):52-56
- [20] Rosita Dewi R, Rena Normasari (2021) Cassava Leaves Extract (*Manihot esculenta*) Prevents the Decrease of Albumin Serum

Level in Mice with Gentamicin- Induced Hepatotoxicity.
Medico-legal Update 21 (1)

- [21] Warditiani NK, Larasanty LPF dan Damanik I () Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70% Daun Singkong (*Manihot utilissima* Pohl) terhadap Kadar Gula Darah Mencit Jantan Galur Balb/C yang Diinduksi Aloksan.
- [22] Oghenevwodokohwo Okoro I. (2020) Two Extracts From *Manihot Esculenta* Leaves Efficiently Inhibit α -Glucosidase and α -Amylase: A New Approach for the Management of Diabetes. *Iranian Journal of Toxicology* 14(3):131-138. <http://dx.doi.org/10.32598/ijt.14.3.583.3>
- [23] Bahekar SE dan Kale, RS (2015) Antidiarrheal activity of ethanolic extract of *Manihot esculenta* Crantz leaves in Wistar rats. *Journal of Ayurveda & Integrative Medicine* 6(1)
- [24] Ariyanti E (2012) Antihelmintic Effect of Cassava (*Manihot esculenta*) Leaf Extract in the *Haemonchus contortus in Vitro*, *JSV* 30 (2)

Potensi Kitosan Sebagai Agen Protektif Organ Pencernaan Tikus Yang Terpajan Timbal Asetat

Aditya Marianti¹, Nur Dina Amalina², Sri Mursiti²,
Shafira Septiana Futri², Legendra Gantar Negara², Intan Kharyna
Sholehah¹, Dian Sri Asmorowati², Putri Dyah Astari¹

¹Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Semarang

²Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Semarang

e-mail:aditya.marianti.am@mail.unnes.ac.id

6.1 Pendahuluan

Beberapa logam berat beracun dari lingkungan (ekotoksik) antara lain timbal (Pb), merkuri (Hg), kadmium (Cd), dan Arsen (As), memiliki efek beracun bagi berbagai organisme bahkan pada konsentrasi yang sangat rendah. Tingkatan toksisitasnya berkaitan dengan kekuatan oksidatifnya dan kemampuannya untuk bereaksi dengan senyawa lain. Timbal (Plumbum/Pb) memiliki sifat tidak dapat terurai secara hayati, hal ini adalah alasan utama Pb dapat bertahan lama di lingkungan [1]. Paparan timbal pada manusia terjadi melalui berbagai cara antara lain kegiatan industri seperti peleburan timbal dan pembakaran batu bara, penggunaan cat berbahan dasar timbal, pelapis pipa yang mengandung timbal atau solder berbasis timbal dalam sistem pasokan air, daur ulang aki (accu) mobil, dan lain-lain

Timbal (Pb) dapat masuk ke tubuh melalui jalur saluran pernapasan (inhalasi), saluran gastrointestinal (ingesti) dan melalui kulit (sub kutan). Sekitar 30%-40% dari Pb yang masuk secara inhalasi akan diserap ke dalam aliran darah. Penyerapan melalui saluran gastrointestinal bervariasi tergantung pada status gizi dan usia. Pada kasus kekurangan zat besi, akan meningkatkan absorpsi timbal di intestinum. Pada anak-anak timbal akan lebih banyak diabsorpsi di intestinum dibandingkan pada orang dewasa [2].

Pada jalur masuk secara ingesti, Pb akan masuk dari mulut menuju lambung menuju intestinum untuk diabsorpsi masuk ke pembuluh darah, kemudian melalui vena porta hepatica akan dibawa menuju hepar untuk didetoksifikasi. Akibat jalur masuk toksikan Pb yang seperti ini menyebabkan organ-organ gastrointestinal tersebut rentan mengalami kerusakan. Kerusakan jaringan lambung, intestinum, dan hepar akibat paparan Pb kronis telah dilaporkan. [3-5]. Manifestasi keracunan timbal pada saluran gastrointestinal antara lain adalah sakit perut kronis atau berulang, mual, muntah, sembelit, kembung, anoreksia dan penurunan berat badan.

Gangguan fisiologis, biokimia darah, dan bahkan perilaku adalah manifestasi dari tingginya kadar Pb dalam tubuh. Kadar Pb darah yang diijinkan *Centers for Disease Kontrol and Prevention* (CDCs) adalah $< 10 \mu\text{g/dL}$, hal ini karena Pb adalah racun sistemik kuat, yang menyebabkan kerusakan pada berbagai sistem organ. Kerusakan terjadi akibat proses oksidatif pada jaringan [6]. Ion Pb^{2+} dalam tubuh dapat berubah menjadi radikal bebas dan menghasilkan spesies oksigen reaktif (ROS). Peningkatan ROS dapat menyebabkan stres oksidatif di dalam sel dengan bereaksi dengan makromolekul dan menyebabkan kerusakan. Kerusakan tersebut berupa peningkatan peroksidasi lipid, kerusakan DNA, dan

oksidasi protein [7-8]. Ion Pb^{2+} dalam tubuh berpotensi menjadi radikal bebas yang akan meningkatkan kadar ROS. ROS yang terbentuk seperti radikal superoksida, radikal hidroksil (OH), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) berpotensi menjadi racun bagi sel dan dapat merusak komponen-komponen biomolekul sel.

Tingginya kadar ROS tubuh menyebabkan enzim-enzim antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), tidak mampu lagi mengatasinya. Turunnya kadar antioksidan endogen ini menyebabkan menurunnya pertahanan sel-sel tubuh terhadap radikal bebas dan meningkatnya lipid peroksidase [9]. Ion Pb^{2+} bersifat lipofilik sehingga mudah berikatan dengan komponen lipid penyusun membran sel maupun menembus membran sel membentuk radikal lipid. Pembentukan radikal lipid melibatkan pengikatan antara radikal bebas Pb^{2+} dan lipid peroksida. Radikal lipid akan mengikat oksigen sehingga terbentuk rantai radikal bebas. Rantai radikal bebas akan berikatan dengan rantai radikal bebas lainnya, sehingga memicu meningkatnya stress oksidatif pada sel, yang menyebabkan kerusakan membran sel.

Kerusakan membran sel adalah awal dari terjadinya nekrosis. Akumulasi ion Pb^{2+} di dalam sel akan meningkatkan produksi radikal bebas dan menurunkan kadar antioksidan endogen. Akibat peningkatan serangan radikal bebas terhadap pertahanan antioksidan endogen akan menghasilkan ketidakseimbangan reaksi oksidasi-reduksi pada organisme. Kondisi ini akan menyebabkan munculnya stress oksidatif ditandai dengan peningkatan ROS. Berbagai reaksi redoks yang dikatalisis oleh enzim, berlangsung melalui proses fosforilasi oksidatif. Fosforilasi oksidatif yang tidak efisien dapat menghasilkan ROS, yang menyebabkan disfungsi mitokondria. Paparan ROS pada konsentrasi tinggi dan jangka

waktu yang lama menyebabkan kerusakan pada berbagai molekul-molekul makro di tingkat seluler antara lain molekul DNA, lipid, dan protein, yang menyebabkan terjadinya nekrosis dan berujung pada kematian sel [10].

Sebagai organ yang terpapar langsung oleh ion Pb^{2+} maka organ-organ pencernaan lambung, intestinum dan hepar berisiko mengalami kerusakan jaringan. Untuk itu perlu upaya untuk meminimalisir dampak paparan ion Pb pada organ-organ tersebut. Salah satunya adalah menggunakan bahan yang memiliki kemampuan bertindak sebagai agen protektif bagi tubuh terhadap aktivitas radikal bebas ion Pb^{2+} . Bahan alami yang berpotensi untuk dikembangkan untuk memproteksi tubuh dari serangan radikal bebas Pb^{2+} antara lain adalah kitosan. Kitosan adalah hasil deasetilasi kitin yang berasal dari limbah cangkang crustacea. Proses deasetilase dengan melepas gugus asetil dari amina menyebabkan gugus amina memiliki tangan bebas yang siap berikatan dengan ion yang tidak stabil. Ikatannya dengan radikal bebas ion Pb^{2+} menyebabkan Pb^{2+} teredam aktivitas radikal bebasnya karena menjadi stabil setelah diikat oleh amina. Mekanisme ini juga dikenal dengan mekanisme khelasi.

Beberapa mekanisme aktivitas antioksidan kitosan telah diteliti antara lain aktivitas pemulungan radikal bebas, kemampuan *chelating*, dan pengurangan aktivitas radikal bebas. Penelitian lain juga melaporkan aktivitas pemulungan radikal oksigen *in vitro* oleh kitosan dan turunannya. Banyak bukti telah menunjukkan bahwa kitosan dapat mencegah oksidasi lipid dalam sistem biologis dengan menghilangkan radikal bebas, menghambat pembentukan ROS dan mencegah peroksidasi lipid. Kemampuan kitosan tersebut berkaitan dengan keberadaan gugus hidroksil (-OH) dan gugus amina (-NH₂) [11]. Gugus substituen juga merupakan faktor penting pada

aktivitas antioksidan kitosan, selain gugus hidroksil dan amina kitosan. Namun, karena ikatan hidrogen intramolekul yang kuat dari kitosan, aktivitas gugus hidroksil dan amina menjadi lemah.

Pemberian kombinasi kitosan dan vitamin C pada tikus yang terpajan Pb asetat per oral terbukti telah meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan endogen SOD, CAT, dan GPx [9]. Kombinasi kitosan dan vitamin C ini juga berhasil mempertahankan kadar haemoglobin (Hb) normal tikus yang dipapar Pb asetat [12].

Potensi kitosan sebagai antioksidan juga dilaporkan oleh [11] Ketika kitosan ditambahkan ke dalam homogenate otot tuna yang dioksidasi oleh FeCl_3 sebagai model simulasi oksidasi lipid, maka radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi antara hidrogenperoksida lipid dan metmyoglobin (metMb) dalam homogenat dapat ditangkap oleh kitosan, sementara ferilmyoglobin yang terbentuk dari reaksi ini menerima elektron dari gugus NH_2 kitosan, sehingga kembali ke bentuk metMb. Hal ini menyebabkan peroksidasi lipid dalam homogenat dapat ditekan. Penelitian ini menunjukkan mekanisme utama aktivitas antioksidan kitosan terhadap peroksidasi lipid dalam homogenat otot tuna didasarkan pada aktivitas penangkapan radikal bebas dan kemampuan daya pereduksinya.

Uraian pada latar belakang tersebut menunjukkan perlunya dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengkaji potensi kitosan antioksidan dalam memproteksi organ sistem pencernaan yaitu lambung, intestinum dan hepar dari efek radikal bebas ion Pb^{2+} . Penelitian ini menggunakan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus* L) strain wistar yang dipajan Pb asetat per oral.

6.2 Metode Penelitian

Seluruh tahapan penelitian dilaksanakan selama 3 bulan. Penelitian dilaksanakan di 2 laboratorium yaitu Laboratorium Biologi UNNES sebagai tempat pemberian perlakuan pada hewan uji dan laboratorium Patologi Anatomi FKH UGM sebagai tempat pembuatan dan analisis preparate. Penelitian eksperimental ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus* L) strain Wistar sejumlah 24 ekor. Hewan uji yang digunakan telah memenuhi syarat-syarat inklusi yaitu jantan, sehat, berat badan minimal 180 gram, umur minimal 2 bulan. Pemberian makan dan minum dilakukan secara *ad libitum*. Untuk etika penelitian menggunakan *Ethical Clearance* yang dikeluarkan oleh Komisi Bioetika Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung No 342/VII/2021/Komisi Bioetik.

Bahan penelitian ini adalah kitosan dengan spesifikasi berasal dari cangkang rajungan dengan derajat deasetilasi 90-95%. Prosedur penelitian ini diawali dengan tahap penyiapan larutan Pb asetat sebagai sumber polutan. Pb asetat akan disondekan ke hewan uji selama 40 hari. Disiapkan juga larutan stok kitosan yaitu kitosan dilarutkan dalam asam cuka (CH_3COOH) 2%, kadar masing-masing larutan sesuai dengan dosis yang ditetapkan.

Tahap pelaksanaan penelitian dimulai dengan memisahkan 24 tikus menjadi 3 kelompok secara acak, masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor. Kelompok kontrol negatif (KN) tidak diberi perlakuan tertentu, Kelompok kontrol positif (KP) diberi Pb asetat 175 mg/kgBB, dan kelompok Perlakuan diberi Pb asetat dosis 175 mg/kg BB tikus) dan kitosan dosis 64 mg/kg BB (P), mengacu pada penelitian Marianti dan Mahatmanti (2018) [9]. Hewan uji diberi perlakuan selama 40 hari, pada hari ke 41 hewan uji tersebut dikorbankan, setelah terlebih dahulu dianestesi dengan kloroform

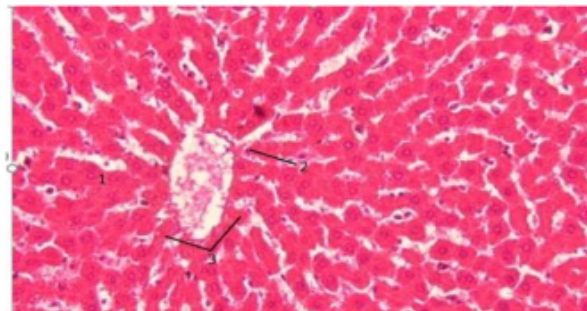
dan didekapitasi. Setelah dibedah, organ hepar, intestinum dan lambung hewan uji tersebut diambil dan diawetkan dengan formalin 4%. Organ yang telah diawetkan kemudian dibuat slide preparat mikroanatomi dengan metode Parafin dan pewarnaan Hematoksilin Eosin (HE) di laboratorium Patologi Anatomi FKH UGM. Preparat mikroanatomi tersebut kemudian dianalisis untuk melihat tingkat kerusakan masing-masing jaringan organ. Teknik pengambilan data dilakukan dengan mengamati setiap slide preparat dengan mikroskop pada perbesaran minimal 400 kali. Setiap slide diamati pada lima lapang pandang yang berbeda. Data deskriptif yang dikumpulkan adalah Nekrosis (N), degenerasi sel dan peradangan pada jaringan hepar, intestinum dan lambung.

6.3 Hasil dan Pembahasan

6.3.1 Hasil Penelitian

Histopatologi Hepar Tikus

Hasil analisis patologi anatomi preparat hepar tikus yang diteliti ditunjukkan pada gambar 11-13.

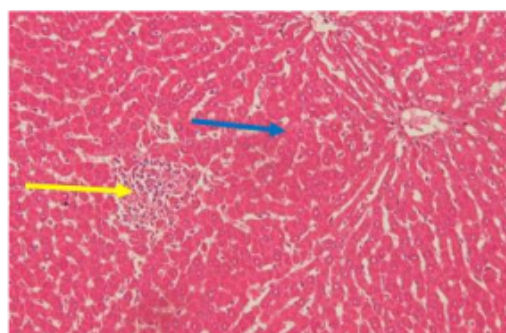


Keterangan gambar:

Jaringan hepar normal
tidak ada kelainan

1. Vena sentralis,
2. Hepatosit,
3. Sinusoid

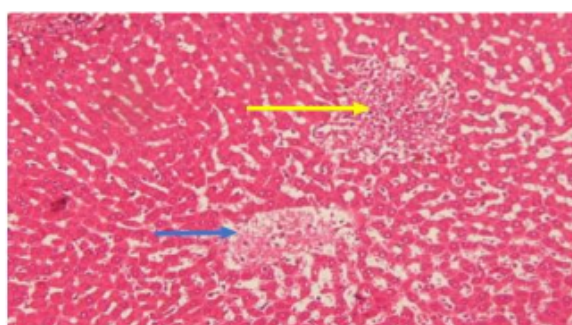
Gambar 11: Jaringan hepar kelompok kontrol negatif. (HE, 400X)



Keterangan gambar

1. Jaringan hepar menunjukkan gejala perihepatitis kronis (panah kuning)
2. Peradangan lobular (panah biru)

Gambar 12: Gambaran histopatologi jaringan hepar tikus kelompok kontrol positif yang terpajan Pb asetat 175 mg/kg BB (HE, 400X)



Keterangan gambar

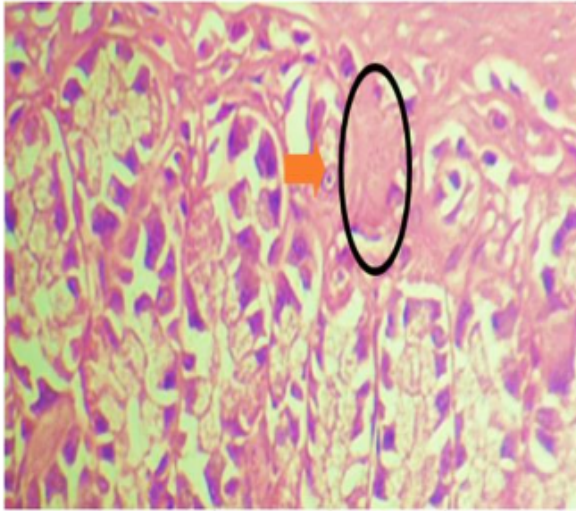
1. Jaringan hepar mengalami nekrosis multifokal (panah kuning)
2. Tanda panah menunjukkan adanya debris (panah biru)

Gambar 13: Gambaran histopatologi jaringan hepar tikus kelompok perlakuan yang terpajan Pb asetat dan kitosan 64 mg/kg BB (HE, 400X)

Jaringan hepar tikus putih kelompok kontrol tampak normal dan tidak ada perubahan (Gambar 11). Sedangkan pada tikus putih yang dipapar timbal asetat (kelompok kontrol positif) menunjukkan kelainan mulai dari terjadinya hepatitis, nekrosis multifokal dan degenerasi melemak secara merata hampir di setiap sampel penelitian (Gambar 12). Pada kelompok perlakuan yang dipapar Pb asetat dan diberikan kitosan juga terjadi kerusakan berupa nekrosis multifokal pada beberapa tempat dan ditemukan debris atau sisa-sisa jaringan rusak, namun kerusakan jaringan yang terjadi tidak sebanyak pada kelompok kontrol positif.

Histopatologi Lambung Tikus

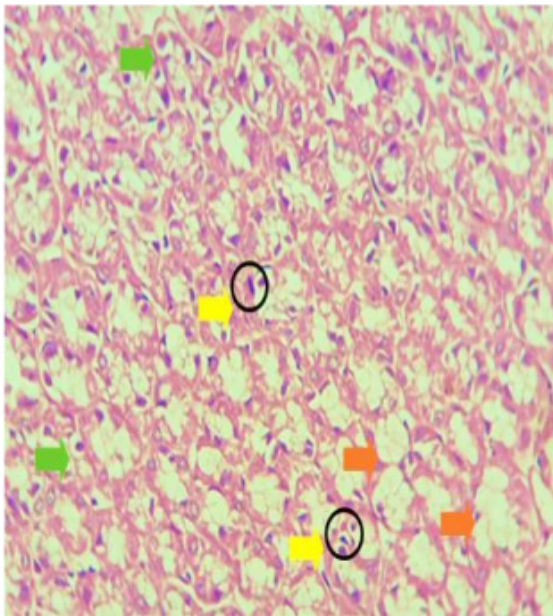
Gambaran histopatologi lambung tikus yang diteliti disajikan pada gambar 14, 15, dan 16



Keterangan :

1. sel mukosa terlihat normal., sel berbentuk poligonal, membran sel berbatas tegas, dan sitoplasma berwarna merah homogen,
2. sel yang mengalami nekrosis hanya sedikit (panah merah)

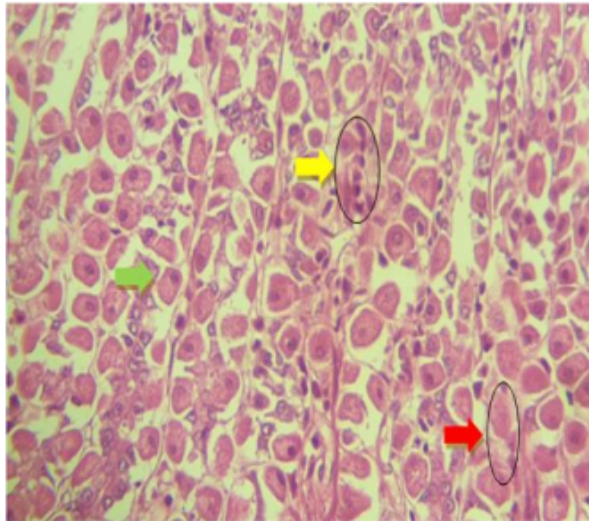
Gambar 14: Gambaran jaringan lambung kelompok kontrol negatif (HE, 400X).



Keterangan:

1. Nekrosis: inti sel sudah hilang, sel terlihat kosong (panah merah)
2. Gastritis, ditunjukkan adanya peradangan sel: dilatasi pembuluh darah dan inti sel terlihat terkumpul (panah kuning)
3. Sel degenerasi: inti sel dipinggir dan sitoplasma terlihat mengembang (panah hijau)

Gambar 15: Gambaran jaringan lambung tikus kelompok kontrol positif yang terpajan timbal asetat 175 mg/Kg BB (HE, 400X.)



Keterangan:

1. Nekrosis: inti sel sudah hilang, sel terlihat kosong (panah merah)
2. Gastritis ditunjukkan adanya sel radang: dilatasi pembuluh darah dan inti sel terlihat terkumpul (panah kuning)
3. Degenerasi: inti sel dipinggir dan sitoplasma terlihat mengembang (panah hijau)

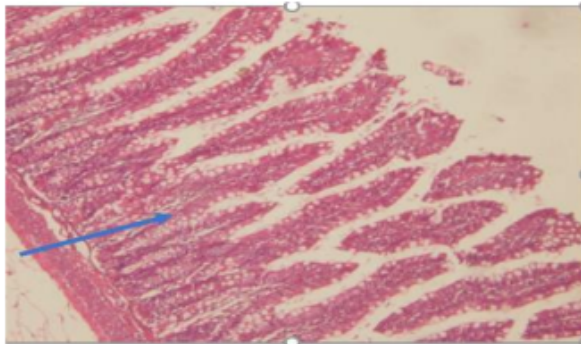
Gambar 16: Gambaran jaringan lambung tikus kelompok perlakuan yang terpajan Pb asetat 175 mg/kg BB dan kitosan dosis 64 mg/kg BB. (HE, 400X).

Kerusakan jaringan dijumpai pada jaringan lambung hewan uji yang terpajan Pb asetat (Gambar 15). Jaringan lambung menunjukkan kerusakan berupa nekrosis, gastritis dan degenerasi sel. Gastritis adalah kondisi peradangan pada jaringan lambung, ditandai terjadinya infiltrasi limfosit dan neutrofil di tunika mukosa dan submukosa serta oedema submucosa. Gambaran jaringan lambung tikus kelompok kontrol negatif relative normal, nekrosis yang terjadi masih dalam batas wajar. Pada kelompok perlakuan tampak masih terjadi nekrosis, gastritis dan degenerasi sel namun

secara keseluruhan lapang pandang yang diamati menunjukkan penurunan tingkat kerusakan.

Histopatologi Intestinum Tikus

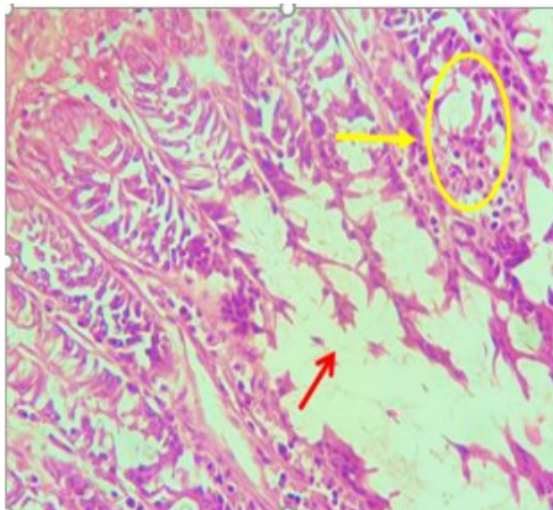
Gambaran histopatologi intestinum tikus yang terpajan Pb asetat dan diberi perlakuan dengan kitosan dapat diamati pada gambar 17, 18, dan 19.



Keterangan:

Relatif tidak ada perubahan patologi yang berarti. Jaringan penyusun intestinum terlihat normal (panah biru)

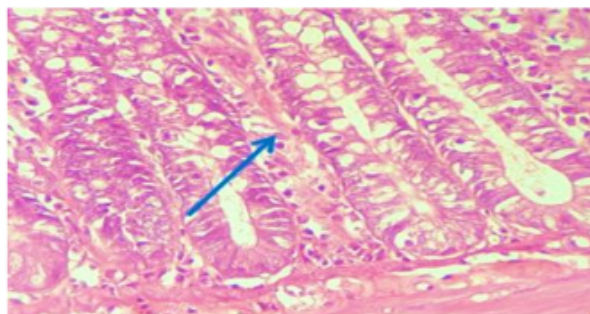
Gambar 17: Gambaran histopatologi intestinum tikus kelompok kontrol negatif (HE, 400X)



Keterangan

1. Radang intestinum ditandai adanya nekrosis tunika mukosa serta infiltrasi sel radang di mukosa (panah kuning)
2. Kerusakan berupa erosi vili-vili intestinum (panah merah)

Gambar 18: Gambaran jaringan intestinum tikus kelompok kontrol positif yang terpajan Pb asetat (175 mg/kg BB) (HE, 400X)



Keterangan:
 Relatif tidak ada perubahan patologi yang berarti. Gambaran histopatologi jaringan penyusun intestinum terlihat normal (panah biru)

Gambar 19: Gambaran histopatologi jaringan intestinum tikus kelompok perlakuan yang terpajan Pb asetat dan kitosan 64 mg/kg BB (HE, 400X)

Kerusakan akibat paparan timbal kronis pada jaringan intestinum juga dijumpai pada penelitian ini. Pada kelompok kontrol positif yang hanya diberi pajanan Pb asetat, jaringan intestinum tikus uji menunjukkan kerusakan berupa erosi pada vili-vili intestinum, nekrosis pada tunika mukosa dan infiltrasi sel-sel radang (Gambar 18). Sementara pada jaringan intestinum kelompok perlakuan yang selain dipajan dengan Pb asetat juga mendapatkan kitosan, terlihat tidak ada kelainan (gambar 19). Jaringan tampak normal tidak ada tanda-tanda erosi vili maupun sel-sel radang. Demikian pula dengan kelompok kontrol negatif.

6.3.2 Pembahasan

Data gambaran histopatologi jaringan organ-organ pencernaan pada penelitian ini menunjukkan bahwa pajanan Pb asetat ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$) per oral secara kronis telah menyebabkan kerusakan pada jaringan hepar, lambung dan intestinum. Kondisi ini berbeda dengan kelompok kontrol yang tidak dipapar Pb asetat. Pada kelompok kontrol, tidak banyak terjadi kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan organ pencernaan pada hewan uji disebabkan karena paparan langsung Pb asetat yang diberikan per oral. Pb asetat

akan melalui lambung yang kondisinya asam. Dalam kondisi asam, Pb asetat akan terdisosiasi menjadi ion Pb^{2+} dan $(C_2H_3O_2)^-$.

Paparan timbal secara kronis telah menimbulkan dampak munculnya kerusakan jaringan hepar. Data ini didukung oleh hasil penelitian [4] yang menyimpulkan bahwa paparan kronis timbal memberikan efek toksik kuat pada hepatosit, yang dimanifestasikan sebagai penipisan glikogen, infiltrasi seluler dan arsitektur hati dalam bentuk inisiasi fibrosis periportal yang dapat berkembang menjadi sirosis. Pada jaringan hepar juga muncul peradangan. Munculnya sel-sel radang di jaringan hepar tikus akibat paparan kronis timbal menunjukkan bahwa ion Pb^{2+} dapat berinteraksi dengan protein dan enzim di jaringan interstisial hepar. Kondisi ini akan menyebabkan gangguan mekanisme pertahanan antioksidan dan menyebabkan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang pada gilirannya dapat memunculkan respon inflamasi. Terjadinya nekrosis hepatosit dapat diawali dari terjadinya gangguan pada proses apoptosis, yang dapat diikuti oleh kerusakan organel terutama mitokondria, retikulum endoplasma dan pecahnya lisosom [13]. Indikasi kerusakan hepatosit akibat paparan timbal dapat terjadi karena sel-sel hepatosit tidak mampu lagi menangani akumulasi akibat gangguan metabolisme dan struktural yang disebabkan oleh timbal.

Ion Pb^{2+} yang terbentuk relatif sulit dieliminasi karena kemampuannya untuk berikatan dengan senyawa lipid pada membran sel dan bahkan menembus masuk ke wilayah intraseluler. Hal ini karena sifatnya yang cenderung lipofilik. Di dalam sel, ion Pb^{2+} akan terakumulasi dan berubah menjadi radikal bebas. Radikal bebas ion Pb^{2+} akan berinteraksi dengan komponen intraseluler. Akibatnya kerja enzim protease akan terhambat. Terhambatnya kerja enzim protease dapat mengakibatkan terjadinya cidera pada sel

[3]. Enzim protease cathepsin misalnya menunjukkan peran penting remodeling matriks ekstraseluler. Enzim protease lainnya misalnya dari kelas calpain, apabila dihambat kerjanya akan menyebabkan penghambatan pemecahan adhesi fokal dan memblok komponen seperti α -actinin pada adhesi fokal, serta menghambat perpindahan adhesi fokal menuju ke intrasel. Pemecahan komponen-komponen kompleks fokal diduga akan menyebabkan perubahan komposisi adhesi yang akan mengakibatkan terjadinya perbedaan pada protein yang direkrut. Selain itu pemecahan kompleks fokal juga akan mengubah sitoskeletal sehingga membuat struktur sel menjadi tidak stabil [14]. Struktur sel yang tidak stabil akan berdampak kepada kerusakan jaringan.

Jaringan lambung tikus yang terpapar Pb asetat secara kronis juga menunjukkan kerusakan. Pada hewan yang terpapar Pb secara kronis, lambung akan merespon histamin lebih maksimal dibandingkan kelompok kontrol yang tidak terpapar Pb. Paparan Pb pada tingkat rendah dan tinggi secara signifikan meningkatkan peroksidasi lipid di lambung menjadi $183,2\% \pm 12,7\%$ dan $226,1\% \pm 6,8\%$ dari nilai kontrol masing-masing ($P < 0,0$). Di sisi lain, paparan timbal secara signifikan menurunkan aktivitas katalase dan superoksida dismutase (SOD) dan jumlah nitrit dalam sampel mukosa lambung [15]. Kondisi gastritis ini juga dipicu akumulasi Pb^{2+} yang menyebabkan peningkatan factor-faktor ofensif antara lain HCl (asam klorida), NO (*Nitric oxide*), enzim pepsin, termasuk juga *Helicobacter pylori*. Hal ini akan menyebabkan penurunan faktor-faktor defensive pelindung dinding lambung seperti musin, prostaglandin, dan asam bikarbonat. Akibatnya lapisan mukosa dinding lambung yang sensitif akan mudah teriritasi [3].

Kerusakan pada jaringan intestinum juga dijumpai pada penelitian ini. Erosi pada vili-vili intestinum, nekrosis pada tunika

mukosa dan infiltrasi sel-sel radang tampak pada kelompok kontrol positif. Erosi vili-vili intestinum ini diduga disebabkan oleh peradangan pada jaringan, yang akan menyebabkan disfungsi endotel dan cedera jaringan. Infiltrasi sel-sel radang pada jaringan, sebenarnya reaksi normal sel dalam upaya membersihkan patogen dan partikel asing. Namun infiltrasi sel-sel radang tersebut juga dapat menyebabkan cedera jaringan. Infiltrasi sel-sel radang dipicu oleh peningkatan ROS. Peradangan pada sel akibat tingginya ROS terjadi karena lebih banyak leukosit yang akan diikat ke oleh sel sebagai hasil dari aktivasi faktor NF κ B. Aktivasi dari factor-faktor ini akan mendorong produksi dari cytokines IL-1, IL-8, dan TNF alfa yang memicu terjadinya reaksi peradangan pada sel [16].

Data gambaran histopatologi pada kelompok perlakuan, menunjukkan kemampuan kitosan memproteksi organ pencernaan. Kitosan dipilih karena bukti-bukti penelitian menunjukkan bahwa kitosan dan vitamin C memiliki aktivitas yang sama sebagai antioksidan. Kombinasi kitosan dan vitamin C mampu menurunkan konsentrasi asam lemak bebas dan malondialdehid (MDA) serum serta meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), dan glutathione peroksidase (GPx) [9,18]. Beberapa hasil penelitian melaporkan bahwa kitosan yang dibuat dengan basa N-deasetilasi kitin kepiting menunjukkan kemampuan memulung radikal DPPH dan radikal OH, serta kemampuan chelating pada ion besi. Semua nilai IC50 berada di bawah 1,5 mg/mL [18].

Penggunaan kitosan dalam penelitian ini bertujuan untuk memproteksi jaringan pada sistem pencernaan tikus yang mengalami stress oksidatif akibat paparan timbal asetat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan telah mampu memproteksi jaringan lambung, hepar dan intestinum. Kerusakan akibat ion Pb^{2+} telah

dapat dikurangi, terbukti kondisi jaringan pada ketiga organ tersebut yang diberi perlakuan dengan kitosan lebih baik dibandingkan dengan kelompok yang hanya menerima Pb asetat. Kerusakan jaringan yang terjadi akibat pajanan ion Pb^{2+} telah dapat dikurangi.

Berdasarkan fakta penelitian ini dapat diduga bahwa kitosan memproteksi jaringan lambung, intestinum dan hepar tikus yang dipapar dengan Pb asetat melalui mekanisme antioksidasi. Mekanisme antioksidasi yang dilakukan kitosan adalah dengan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan menurunkan peroksidasi lipid. Selain itu kitosan juga beraktivitas memungut radikal bebas dan mengkelat ion Pb^{2+} . Serangkaian aktivitas ini akan berpengaruh menurunkan ROS. Penurunan ROS disebabkan karena terjadinya keseimbangan antara prooksidan dan antioksidan atau terjadinya keseimbangan sistem redoks. Kondisi sistem redoks yang setimbang akan menghambat stress oksidatif. Penurunan terjadinya stress oksidatif akan menghambat potensi kerusakan oksidatif pada komponen sel dan cedera jaringan.

Mencermati seluruh pelaksanaan proses penelitian ini, masih memiliki keterbatasan yaitu waktu pelaksanaan penelitian yang belum mencapai tahap sub kronis (60 hari) sehingga dimungkinkan proteksi dan perbaikan yang jaringan sebagai efek pemberian kitosan belum optimal, khususnya terhadap jaringan lambung dan hepar, meskipun telah ditemukan perbaikan. Untuk itu perlu dilakukan penelitian dalam jangka waktu yang lebih lama antara 60-90 hari agar efek kitosan dalam memproteksi jaringan dapat lebih optimal.

Hasil analisis terhadap fakta-fakta penelitian, dapat disimpulkan bahwa kitosan berpotensi sebagai agen proteksi jaringan lambung, hepar dan intestinum tikus yang terpajan Pb asetat per oral. Mekanisme proteksi kitosan terjadi melalui serangkaian

aktivitas yaitu meningkatkan aktivitas enzim antioksidan endogen, pemulungan radikal bebas dan pengkhelatan ion logam berat.

Rekomendasi atas hasil penelitian ini adalah perlu diteliti lebih lanjut peranan kitosan sebagai agen proteksi terhadap pencemaran logam berat selain Pb. Selain itu perlu dilakukan upaya untuk mengoptimalkan potensi kitosan agar dapat dikembangkan sebagai suplemen yang dapat mereduksi efek negatif dari paparan logam berat pada manusia.

6.4 Ringkasan

Timbal (Pb) adalah logam berat ekotoksik. Paparan Pb kronis merusak banyak organ termasuk organ pada sistem pencernaan antara lain lambung, intestinum dan hepar. Pb dalam bentuk senyawa organik maupun anorganik dapat berubah menjadi radikal bebas di dalam tubuh. Peningkatan jumlah radikal bebas tidak dapat diatasi oleh sistem antioksidan endogen, sehingga menyebabkan peningkatan ROS. Peningkatan ROS akan menyebabkan kerusakan jaringan pada organ. Untuk mereduksi efek radikal bebas dapat digunakan antioksidan eksogen. Kitosan memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi kitosan dalam memproteksi organ sistem pencernaan yaitu lambung, intestinum dan hepar dari efek radikal bebas ion Pb^{2+} . Penelitian eksperimental ini menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan sejumlah 24 ekor. Tikus-tikus tersebut dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif yang tidak mendapat perlakuan, kelompok kontrol positif yang diberi Pb asetat 175 mg/kg BB dan kelompok perlakuan yang diberi Pb asetat dan kitosan 64 mg/kg BB. Pemberian perlakuan dilakukan per oral selama 40 hari. Pada hari ke 41 tikus dikorbankan untuk diambil organ lambung, intestinum dan heparnya. Organ tersebut dibuat preparat mikroanatominya.

Kondisi preparat diamati dan dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tikus kelompok kontrol negatif tidak terjadi kerusakan yang berarti, jaringan relatif normal. Pada kelompok kontrol positif telah terjadi kerusakan yang merata pada jaringan lambung, intestinum maupun hepar. Beberapa kerusakan jaringan yang teridentifikasi antara lain nekrosis dan degenerasi sel pada semua jaringan, gastritis pada jaringan lambung dan hepatitis pada jaringan hepar. Pada kelompok perlakuan yang diberi kitosan, meskipun masih dijumpai beberapa kerusakan, namun secara umum telah terjadi pengurangan jaringan yang mengalami kerusakan. Simpulan dari penelitian ini adalah kitosan memiliki potensi sebagai agen proteksi organ sistem pencernaan tikus, dari kerusakan akibat paparan Pb asetat.

Daftar Pustaka

- [1] Flora G, Gupta D, Tiwari A. (2012). Toxicity of lead : A review with recent updates. *Interdisciplinary Toxicology*. 5(2):47–58. doi: 10.2478/v10102-012-0009-2
- [2] Begovic V, Nozic D, Kupresanin S, Tarabar D. (2008). Extreme gastric dilation caused by chronic lead poisoning : A case report. *World Journal Gastroenterology* 14(16):2599–601. DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.14.2599>
- [3] Aziz R Al, Marianti A. (2014). Efek Paparan Kronik Timbal (Pb) Per Oral Pada Struktur Histopatologik Lambung Tikus Putih. *Unnes Journal of Life Science*.3(2): 87-92
- [4] Hegazy AMS, Fouad UA.(2014). Evaluation of Lead Hepatotoxicity; Histological , Histochemical and Ultrastructural Study. *Forensic Medicine and Anatomy Research*, 2 :70–9. DOI: 10.4236/fmar.2014.23013
- [5] Shabani M, Hadeiy SK, Parhizgar P, Zamani N, Mehrad H, Hassanian-moghaddam H, Phillips, S. (2020) Lead poisoning ; a neglected potential diagnosis in abdominal pain. *BMC Gastroenterology*. 20 (134);1–8. <https://doi.org/>

10.1186/s12876-020-01284-1

- [6] El-Far AH, Korshom MA, Mandour AA, El-Bessoumy AA, El-Sayed YS. (2017). Hepatoprotective efficacy of *Nigella sativa* seeds dietary supplementation against lead acetate-induced oxidative damage in rabbit – Purification and characterization of glutathione peroxidase. *Biomedicine & Pharmacotherapy*.89 :711–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.044>
- [7] Unsal, V., Dalkiran, T. , Çicek, M., Kölükçü E. (2020). The Role of Natural Antioxidants Against Reactive Oxygen Species Produced by Cadmium Toxicity : A Review. *Advance Pharmaceutical Bulletin*. 10(2):184–202. doi:10.34172/apb.2020.023
- [8] Ali SA, Al-derawi KH, Al-mansour NAA. (2018) . Toxic effects of lead-induced Damage in liver of rats male and the role of ethanolic ginseng extract as protective agents (histological and physiological). *Merit Research Journal of Medicine and Medical Sciences*. Vol. 6(9) pp. 307-315,
- [9] Marianti A, Mahatmanti FW. (2018). Acta Scientiarum Synergetic effect of chitosan and vitamin C on the oxidative enzyme status in rat exposed to lead acetate. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 40(1):41869: 1-8, doi:10.4025/actascibiols.v40i1.41869
- [10] Singh A, Kukreti R, Saso L. (2019). Oxidative Stress : A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 24, 1583; 1-20 doi:10.3390/molecules24081583:1–20.
- [11] Trung TS, Nguyen H, Bao D. (2015). Physicochemical Properties and Antioxidant Activity of Chitin and Chitosan Prepared from Pacific White Shrimp Waste. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*.Vol 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/7062592015;2015>.
- [12] Ningsih EW, Marianti A, Isnaeni W. (2018) Bioaplikasi Kitosan dan Vitamin C terhadap Kadar Hemoglobin *Rattus norvegicus*. *Life Science Journal of Biology* 7(2):65–72.
- [13] Jarrar BM, Taib NT. (2012). Histological and histochemical

- alterations in the liver induced by lead chronic toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 19: 203–210. doi:10.1016/j.sjbs.2011.12.005
- [14] Hardiany NS. (2013). Molekuler B. Cathepsin dan Calpain : Enzim Pemecah Protein dalam Sel. *eJournal Kedokteran Indonesia*. Vol 1 (1); 75-83. <https://doi.org/10.23886/ejki.1.1602.75-83>
- [15] Olaleye SB, Adaramoye OA, Erigbali PP, Adeniyi OS, Olaleye SB, Erigbali PP.(2007) Lead exposure increases oxidative stress in the gastric mucosa of HCl / ethanol-exposed rats. *World Journal Gastroenterology*. 13(38): 5121-5126
- [16] Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. (2014). Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*. Vol 20 (7):1126-67. DOI: 10.1089/ars.2012.5149
- [17] Alves RS, Sarandy M. (2019). Does antibiotic use accelerate or retard cutaneous repair? A systematic review in animal models. *PLOS ONE* | 1–22 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223511> October 10, 20192019;.
- [18] Ngo D, Kim S.(2014) Antioxidant Effects of Chitin , Chitosan , and Their Derivatives. *Advances in Food and Nutrition Research*. Volume 73:15–31. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0>

Potensi Wedang Uwuh Sebagai Imunomodulator Pada Infeksi SARS-Cov2 Melalui Studi *In Silico*

Ari Yuniastuti, Retno Sri Iswari, Noor Aini Habibah,
Talitha Widiatningrum, Fitri Arum Sasi

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang
E-mail: ariyuniastuti@mail.unnes.ac.id

7.1 Pendahuluan

Corona Virus Disease-19 (COVID-19) merupakan penyakit pandemi yang disebabkan oleh virus corona baru, *Severe Acute Respiratory Syndrome- Coronavirus 2* (SARS-Cov2). Penyakit COVID-19 ini telah menjadi masalah kesehatan yang sangat serius. Kasus COVID-19 telah menyebar di seluruh dunia, dan WHO menyatakan COVID-19 dikategorikan sebagai pandemi. Pandemi Covid-19 menjadi mimpi buruk bagi dunia, termasuk Indonesia. Lebih dari 113 juta orang di seluruh dunia telah terinfeksi Covid-19 [1]. Virus corona adalah virus yang memiliki spike (tonjolan) glikoprotein yang tersusun seperti sebuah mahkota. Virus corona menginfeksi inangnya dengan tiga tahapan. Tahap pertama adalah virus menginfeksi inangnya dengan mengikat spike yang mengandung glikoprotein secara transmembran untuk menjadi tuan rumah melalui enzim ACE2 di dalam inang sehingga terbentuk kompleks antara S-glikoprotein dengan ACE2 dengan bantuan protease transmembran serin 2 (TMPRSS2) yang diproduksi oleh sel inang [1-2]. Tahap selanjutnya adalah tahap replikasi menggunakan RNA-dependent RNA polimerase (RdRp). Coronavirus

adalah RNA virus yang menggunakan sel inang untuk bereplikasi. Virus corona menggunakan RdRp untuk membuat salinan RNA baru. Tahap terakhir adalah tahap pematangan replikasi virus di sel inang menggunakan protease seperti 3CLpro (3C-like protease) dan PLpro (protease like papain) [4]. Beberapa obat diketahui mampu menghambat proses ketiganya, termasuk arbidol sebagai inhibitor ACE2; camostat mesylate sebagai inhibitor TMPRSS2; remdesivir dan ribavirin sebagai penghambat RdRp; Lopinavir dan ritonavir sebagai inhibitor protease. Klorokuin, Lopinavir, Ritonavir, dan Remdesivir merupakan antimikroba yang dinyatakan memiliki potensi aktivitas melawan SARS-CoV [5-7]. Strategi terapi untuk COVID-19, pertama: terapi untuk meningkatkan daya tahan tubuh sel inang atau manusia, kedua: pembatasan perkembangan virus itu sendiri. Sehingga diperlukan kajian untuk mengembangkan penemuan obat antivirus dan imunostimulan yang dapat mengobati COVID-19 secara efektif.

Pemahaman mengenai respons imun tubuh dalam menghadapi infeksi maupun penyakit lain semakin berkembang, demikian pula penelitian mengenai komponen yang dapat memengaruhi respons imun tersebut [8]. Bahan yang dapat memodulasi sistem imun tubuh dikenal sebagai imunomodulator. Imunomodulator terdiri dari imunostimulator, imunorestorator, dan immunosupresor. Secara klinis imunomodulator digunakan pada pasien dengan gangguan imunitas, antara lain pada kasus keganasan, HIV/AIDS, malnutrisi, alergi, dan lain-lain [9-10]. Imunomodulator yang dikenal pula sebagai biological respons modifier, obatobatan yang dipakai pada imunoterapi untuk mengembalikan ketidakseimbangan sistem imun. Imunoterapi merupakan suatu pendekatan pengobatan dengan cara merestorasi, meningkatkan, atau mensupresi respons imun. Imunorestorasi dan

imunostimulasi disebut imunopotensiasi (up regulation), imunosupresi disebut down regulation.

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah. Beberapa senyawa bioaktif dari sumber daya hayati memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat. Perlu dilakukan penelitian dan evaluasi senyawa bioaktif dirancang untuk mengatasi COVID-19. Senyawa bioaktif sebagai kandidat untuk menghambat dan mengurangi infeksi dari coronavirus menyebabkan senyawa itu meningkat sistem kekebalan tubuh dan bertindak sebagai antioksidan antara lain apigenin, brazilin, brazilein, kurkumin, gingerol, hesperidin, hesperetin, kaemferol, luteolin, myricetin, naringenin dan quercetin [11-13].

Wedang uwuh merupakan salah satu produk minuman tradisional yang kaya antioksidan dan kemungkinan dapat digunakan sebagai imunostimulan. Secara umum wedang uwuh terdiri dari beberapa bahan rempah yaitu: jahe (*Zingiber officinate*), kayu Secang (*Caesalpina sappan*), cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*), daun pala (*Myristica fragrans*), sereh (*Cymbopogon citratus*), kapulaga (*Amomum cardamomum*), gula batu [14]. Minuman wedang uwuh baik bagi kesehatan tubuh di antaranya untuk menyembuhkan batuk ringan, menambah stamina tubuh, dan meningkatkan kekebalan tubuh [14]. Senyawa 6-gingerol dalam jahe membuktikan efisiensi anti-virus terhadap SARS-Cov2 dengan menunjukkan afinitas pengikatan tertinggi dan interaksi dengan beberapa target COVID-19 termasuk protease virus, protein pengikat RNA, protein Spike. Penelitian ini sebagai prediksi bahwa 6-gingerol dari tanaman jahe dapat sebagai obat baru untuk COVID-19 [15].

Belum banyak dilaporkan potensi wedang uwuh sebagai imunomodulator pada infeksi SARS-Cov2. Oleh karena itu dalam

tulisan ini akan dikaji potensi wedang uwuh yang terdiri dari herbal yang mengandung beberapa senyawa bioaktif dan berpotensi sebagai imunomodulator pada infeksi virus SARS-Cov2 menggunakan metode *in silico*. Pengembangan obat melalui pendekatan bioinformatika saat ini dapat dilakukan dengan basis komputasi yang disebut *in silico*. Metode ini digunakan untuk mengetahui ikatan antara senyawa bioaktif dengan protein target menggunakan *molecular docking* dan untuk mengidentifikasi hubungan antara senyawa fitokimia pada tanaman dan efek terapeutik dari tanaman obat [16]. Berdasarkan latar belakang, maka permasalahan yang akan dikaji dalam tulisan ini adalah bagaimana potensi wedang uwuh sebagai imunomodulator pada infeksi SRAS-Cov-2 kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang yang dikaji secara *in silico* ? Tujuan dari penulisan ini adalah mengkaji potensi wedang uwuh sebagai imunomodulator pada infeksi SARS-Cov2 dan mengevaluasi kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang.

7.2 Metode

Berdasarkan latar belakang masalah, maka metode pemecahan masalah yang akan dilakukan adalah kajian pustaka yang terkait dengan potensi senyawa bioaktif dalam wedang uwuh dengan mengevaluasi kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang. Serta kajian melalui penelitian **meta analisis** yaitu kajian terhadap beberapa hasil penelitian yang terkait dengan kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan

dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang. Beberapa jurnal hasil penelitian *in silico* tentang senyawa bioaktif tanaman yang terdapat dalam wedang uwuh, seperti jahe (*Zingiber officinale*), kayu Secang (*Caesalpinia sappan*), cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*), daun pala (*Myristica fragrans*), sereh (*Cymbopogon citratus*), kapulaga (*Amomum cardamomum*) dikumpulkan dari penerbit publikasi seperti PubMed, Medline dan Google Scholar. Prosedur meta analisis ini dirancang sesuai yang disarankan oleh Egger *et al* [17] dengan parameter yang digambarkan dengan jelas, faktor-faktor eksklusi dan inklusi, abstrak dari semua kutipan. Tulisan ini mengkaji secara teoritik dan hasil penelitian terkait kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang. Selain kajian secara meta analisis juga telah dilakukan penelitian *in silico* khususnya senyawa bioaktif pada kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) dan jahe (*Zingiber Officinale*). Penelitian *in silico* untuk mengetahui kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam jahe (*Zingiber officinale*) dan kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang [15].

Langkah awal adalah mengoleksi senyawa bioaktif dari tanaman jahe (*Zingiber officinale*) dan kayu Secang (*Caesalpinia sappan*). dari database Knapsack di laman http://www.knapsackfamily.com/KNAPSAcK_Family/ dan ChEBI di laman <https://www.ebi.ac.uk/chebi/>. Untuk memudahkan penelusuran sumber data dan pengarsipan maka dilakukan unifikasi. Senyawa jahe (*Zingiber officinale*) dan kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) yang telah dikoleksi, kemudian diunifikasi dengan mengoleksi SMILE masing-masing senyawa menggunakan PubChem di laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Lalu SMILE masing-masing

senyawa digunakan untuk prediksi bioaktivitasnya. Uji PASS dilakukan secara online di <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>. Hasil uji PASS menunjukkan nilai Pa atau *Potentian Activity* dan Pi atau *Potential Inhibitory*, scoring ini berdasarkan kemiripan struktur senyawa dengan senyawa obat dengan aktivitas sama. Ligan atau senyawa uji hasil skrining yang digunakan pada penelitian ini dan senyawa obat sebagai ligan pembanding diunduh struktur 3D ligan dari Pubchem pada situs <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan format.sdf. Koleksi protein target SARS-Cov2 dilakukan dengan literasi dari jurnal-jurnal terkait. Protein target yang digunakan antara lain: ACE2 (PDB ID: 1O86), TMPRSS2 (PDB ID: 5CE1), RdRp (PDB ID: 6NUR), 3CLpro (PDB ID: 2GTB) dan PLpro (PDB ID: 4OW0). Protein target yang telah dikoleksi kemudian diunduh struktur 3D dari *Protein Data Bank* dengan situs <http://www.rscb.org/>. format .pdb.

Makromolekul protein yang telah diunduh dari RCSB biasanya masih mengandung ligan atau pelarut lain yang menempel pada struktur asli, untuk itu molekul air dan ligan alaminya harus dihilangkan agar tidak menghalangi penambatan ligan lain pada sisi pengikatan protein. Selain itu juga ditambahkan atom hidrogen untuk membuat reseptor menjadi polar dan dapat berpengaruh pada interaksi penambatan serta penomoran kembali residu asam amino dengan menggunakan *software* Discovery studio.

Pembuatan kompleks stabil antara makromolekul dengan ligan yang menghasilkan scoring kekuatan penambatan atau *binding affinity*. Metode ini banyak digunakan untuk mendesain obat karena memiliki kemampuan untuk membuat prediksi konformasi yang rasional dengan penambatan ligan pada sisi pengikatan makromolekul. Interaksi antara ligan dan makromolekul dianalisis menggunakan molecular docking dengan software Autodock Vina

terintegrasi di PyRx 0.8 [18]. Selain senyawa bioaktif dan protein target, *molecular docking* juga dilakukan pada protein target dan senyawa obat yang bioaktivitasnya sama digunakan sebagai kontrol untuk menentukan ketepatan penambatan dari senyawa bioaktif. Hasil *molecular docking* divisualisasi dalam 3D dan 2D dengan software Biovia Discovery Studio sehingga tampak residu-residu asam amino dan ikatan kimia yang terbentuk yang menunjukkan *binding site* suatu protein target.

7.3 Hasil dan Pembahasan

Tanaman Empon-empon Penyusun Wedang uwuh

Jahe (*Zingiber officinale Roscoe*) merupakan herbal yang mengandung berbagai komponen senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, fenol, terpenoid, dan minyak atsiri antara lain zingerone, paradol, gingerols dan shogaols. Senyawa-senyawa tersebut dapat menghambat bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* [19-20]. Ekstrak jahe diketahui dapat menstimulasi sitokin pronflamasi (IFN- γ and TNF- α) dan ekspresi iNOS serta makrofag [21-22]. Senyawa bioaktif utama dalam jahe yaitu 6-gingerol memiliki potensi di bidang farmakologi dan mikrobiologi, seperti antiparasit, antitumor, anti-inflamasi and antioksidan [23-24] dan imunomodulator [25].

Kayu secang (*Caesalpinia sappan Linn*) dapat dimanfaatkan sebagai minuman herbal untuk antiradang, pemurnian darah, antidiabetik antikanker, antitumor, antimikroba, antivirus, imunostimulan, antijamur. Penemuan baru melaporkan bahwa ekstrak kayu secang berpotensi sebagai agen imunosupresif [26].

Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dikenal sebagai obat tradisional untuk gangguan gigi, gangguan pernapasan, sakit kepala, dan sakit tenggorokan. Cengeh mengandung senyawa glikosida, saponin, flavonoid, steroid, tannin, alkaloid, terpenes [27]. Selain

memiliki aktivitas antimikroba, anti-jamur, anti-virus, anti-inflamasi, analgesik, imunomodulator, antioksidan dan anestesi [27-30]. Imunomodulator tidak menyebabkan terjadinya respon imun seluler maupun humoral, melainkan menyebabkan modulasi dari sistem imun berupa stimulasi atau supresi. Imunomodulator mempunyai aspek terapi khusus yang berkaitan dengan mekanisme sistem imun sehingga dapat digunakan untuk terapi terhadap penyakitpenyakit yang berkaitan dengan sistem imun seperti penyakit infeksi, keganasan dan gangguan fungsi sistem imun [31].

Kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*) telah banyak digunakan sebagai obat tradisional yang bermanfaat untuk kesehatan. Kandungan utama senyawa aktif kayu manis yaitu cinnamaldehyd, trans-cinnamaldehyd, asam cinnamik, minyak esensial, dan eugenol. Senyawa aktif eugenol (75–85%), linalool (1.6–8.5%), (E)-cinnamaldehyde (0.6–1.5%), (E)-cinnamyl acetate (0.7–2.6%), β -caryophyllene (0.5–6.7%), eugenyl acetate (0.1–2.9%), and benzyl benzoate (0.1–8.3%) memiliki aktivitas antivirus influenza type A (H1N1) [32].

Pala (*Myristica fragrans*) merupakan tanaman herbal yang banyak digunakan untuk pengobatan tradisional. Komponen biji pala terdiri dari minyak atsiri, minyak lemak, protein, selulosa, pentosan, pati, resin, dan mineral-mineral. Biji pala, digunakan untuk rempah-rempah dan tujuan pengobatan seperti karminatif, hipolipidemik, antitrombotik, agregasi antiplatelet, antijamur, afrodisiak, ansiogenik, antiulcerogenic, nematosidal, antitumor, anti-inflamasi [33-34] dan menurunkan produksi NO [35]

Sereh (*Cymbopogon citrates*) merupakan tanaman yang populer sebagai obat tradisional, mengandung senyawa metabolit sekunder asam fenolat, flavanoid dan alkaloid. Sereh telah banyak dimanfaatkan dalam industri farmasi, pangan dan kosmetik [36-

37]. Di beberapa negara sereh digunakan sebagai obat penenang, antiseptik, antipiretik, anti-inflamasi dan analgesik serta obat nyamuk antibakteri, anti-jamur [38-39]. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol sereh sebagai antivirus herpes simplex virus serotipe 1 (HSV-1) [40], ekstrak methanol berpengaruh terhadap virus dengue serotipe 1 [41], dan virus hepatitis A [42].

Kapulaga (*Amomum cardamomum*) merupakan salah satu spesies penghasil black cardamom yang berasal dari pulau Jawa sehingga disebut juga dengan nama Java cardamom. Masyarakat Indonesia *Amomum cardamomum* memiliki nama berbeda yaitu A. compactum, dan dimanfaatkan untuk berbagai tujuan seperti: bumbu masak, minuman kesehatan, obat tradisional, dan aroma terapi [42]. Kapulaga mengandung cineole sekitar 60-80% dan komponen lain seperti α -pinene, β pinene, camphene, limonene, p -cymene, α -terpineol dan α -humulene [43-44]. Kandungan esensial oil pada buah cardamom bervariasi antara 2 – 5% dengan komposisi utama 1,8% cineol (hingga 70%) and α -pinene (16%) [44]. Senyawa aktif kapulaga berperan sebagai antibakteri [45-46], antioksidan [47]. Majdalawieh dan Ronald (2010) melaporkan bahwa lada dan kapulaga berpotensi sebagai imunomodulator melalui proliferasi sel-sel limpa dan sitokin Th1/Th2, sehingga berperan sebagai pro-inflamasi dan anti-inflamasi [48].

Pendekatan Bioinformatika

Bioinformatika merupakan salah satu pendekatan paling penting dan langsung untuk merancang obat baru [49]. Teknik bioinformatika saat ini sangat berguna karena hemat biaya dan mudah digunakan. Karena tingginya biaya uji klinis dan laboratorium, memakan waktu dan kemungkinan kesalahan teknik, bioinformatika digunakan untuk merancang potensi obat baru [50].

Docking komputasional dapat digunakan untuk memprediksi konformasi dan afinitas energi pengikatan ligan molekul kecil ke target protein. Docking banyak digunakan untuk studi interaksi biomolekuler dan diterapkan pada desain obat berbasis struktur [51]. Fungsi skoring dok dapat digunakan untuk menentukan mode pengikatan dan situs ligan, memprediksi afinitas pengikatan, dan mengidentifikasi obat potensial. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menemukan obat antivirus 2019-nCoV [52-53].

Hasil beberapa penelitian menunjukkan bahwa protease inhibitor yang merupakan bagian utama dari turunan metabolit sekunder, efektif untuk mengendalikan infeksi virus. Berdasarkan hasil asil kajian pustaka yang terkait dengan potensi senyawa bioaktif dalam tanaman untuk pembuatan wedang uwuh seperti jahe (*Zingiber officinale*), kayu Secang (*Caesalpinia sappan*), cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*), daun pala (*Myristica fragrans*), sereh (*Cymbopogon citratus*), kapulaga (*Amomun cardamomum*) melalui evaluasi kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang. Senyawa bioaktif tanaman dalam wedang uwuh diketahui memiliki khasiat tinggi kandungan antioksidannya dan meningkatkan sistem kekebalan tubuh. Senyawa aktif ini mungkin memiliki berpotensi menghambat infeksi virus corona, antara lain *6-gingerol*, *6-shogaol*, and *8-shogaol* yang terkandung dalam jahe (*Zingiber officinale*); *brazilin* dan *brazilein* dalam kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*), *myricetin* dalam cengkih (*Syzygium aromaticum*); *tenufofin*, *pavetanninC1* dan *Cinnamtannin-B1* dalam kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*); *myricetin* dalam daun pala (*Myristica fragrans*), *rhoifolin* dalam sereh (*Cymbopogon citratus*), dan *1,8 cineole* dalam kapulaga (*Amomun cardamomum*)

Koleksi senyawa fitokimia suatu tanaman dapat menggunakan basis data daring yang menyediakan data terkait tanaman obat, fitokimia, dan etnobotani dari berbagai negara di dunia. Beberapa basis data online yang dapat digunakan sebagai sumber informasi tentang senyawa fitokimia yang terkandung di dalam tanaman dan atau bagian tertentu dari tanaman yang bersangkutan, diantaranya Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases dan The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Kelemahan basis data ini sangat sering mengalami gangguan tidak dapat diakses, namun data yang tersimpan relatif sangat lengkap khususnya untuk tanaman herbal yang berasal dari Cina. Selain data yang relatif lengkap, TCMSP juga menyediakan anotasi yang cukup lengkap untuk tiap-tiap entrinya termasuk diantaranya adalah clickable url link yang menghubungkan setiap entri dengan PubChem. Selain dua basis data tersebut juga terdapat basis data online untuk mengoleksi senyawa fitokimia suatu tanaman yaitu KNApSACk, Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI), DrugBank, FooDB, dan Phytochemical Interactions DataBase (PCIDB).

Molecular Docking senyawa bioaktif dengan prtoein target

Berdasarkan hasil uji PASS dilakukan skrining untuk memilih senyawa bioaktif jahe (*Zingiber officinale*), kayu Secang (*Caesalpinia sappan*), cengkeh (*Syzygium aromaticum*), kayu manis (*Cinnamomum zeylanicum*), daun pala (*Myristica fragrans*), sereh (*Cymbopogon citratus*), kapulaga (*Amomum cardamomum*) yang memiliki pa lebih dari 0,7 dan $0,5 < Pa < 0,7$. Nilai $pa > 0,7$ menunjukkan senyawa memiliki potensi yang tinggi untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus memiliki tingkat kemiripan yang tinggi dengan senyawa

obat dengan bioaktivitas yang sama. Nilai $0,5 < Pa < 0,7$ menunjukkan bahwa senyawa memiliki potensi yang tinggi untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus berpotensi dalam pengembangan senyawa obat yang baru dengan bioaktivitas sama. Sedangkan nilai $Pa < 0,5$ menunjukkan bahwa senyawa memiliki potensi yang rendah untuk menjadi senyawa bioaktif di uji eksperimen *in vitro* dan atau *in vivo* dan sekaligus memiliki potensi yang rendah untuk dikembangkan menjadi senyawa obat.

Tahap setelah mengoleksi senyawa yang memiliki potensi bioaktivitas tinggi sebagai penghambat adalah mengoleksi protein target masing-masing senyawa. Protein target telah ditentukan berdasarkan data dari pdb. Saat ini telah diketahui setidaknya ada 21 protein target yang potensial sebagai target kerja obat COVID-19. Dua target diantaranya terdapat pada manusia. Sedangkan saat ini terdapat sekurangnya 78 molekul yang sedang diuji secara klinis sebagai antivirus COVID-19 [54]. Wu dkk melakukan prediksi struktur dan pemodelan homologi terhadap semua protein yang dikode oleh SARS-Cov2. Protein target kerja obat antivirus COVID-19 antara lain ACE2; TMPRSS2; RdRp; 3Clpro; dan Plpro [54]. Protein target yang sudah dikoleksi selanjutnya dicari UNIPRO untuk analisis lebih lanjut menggunakan STRING. Analisis STRING digunakan untuk membuat jejaring interaksi protein dan senyawa bioaktif sehingga diperoleh hubungan antar protein target dari senyawa-senyawa tersebut dan dapat menganalisis pathway biologi yang dipengaruhi oleh protein-protein tersebut [55].

Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) setidaknya memiliki 3 fungsi fisiologis, yaitu negative regulator pada sistem renin-angiotensin, fasilitator transport asam amino dan reseptor

tempat terikatnya SARS-CoV maupun SARS-Cov2 [56]. ACE2 tersebar luas dalam paru-paru, sistem kardiovaskuler, usus, ginjal, sistem saraf pusat dan jaringan adipose [56]. ACE2 merupakan target masuknya SARS-Cov2 ke dalam sel [57]. Situs pengikatan antara ACE2 dan SARS-Cov2 telah teridentifikasi sehingga memungkinkan untuk mendesain molekul blokernya. Bloker ACE2 dapat berupa antibodi maupun molekul kecil [58]. Dalam kasus infeksi virus ini, ACE2 dapat berperan sebagai target kerja sekaligus sebagai obat itu sendiri.

Protein Transmembrane Protease Serin 2 (TMPRSS2) berperan mengaktivasi protein S, sehingga virus dapat memasuki sel inang [3]. TMPRSS2 sebagai target yang potensial obat antivirus COVID-19 [3]. TMPRSS2 merupakan protein pada manusia yang belum diketahui dengan jelas fungsinya [59]. Camostat mesilat yang merupakan sebuah inhibitor serin protease yang juga menunjukkan aktivitasnya terhadap TMPRSS2 [3]. Molekul ini sedang diuji klinis sebagai antivirus SARS-Cov2 [59]. Proses replikasi SARS-Cov2 sangat tergantung pada enzim RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). RdRp disebut juga NSP12 (non structural protein 12) [60]. RdRp mengkatalisis sintesis RNA yang kemudian berperan dalam proses transkripsi dan replikasi virus. NSP7 dan NSP8 diduga berperan sebagai kofaktor dalam proses tersebut [61]. Sehingga, RdRp merupakan target utama inhibitor analog nukleosida, seperti remdesivir [60,62-63]. Remdesivir telah teruji cukup efektif untuk terapi COVID-19 [62-63]. Beberapa obat yang telah ada seperti antijamur itrakonazol dan antibakteri novobiosin juga menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap RdRp [54].

Main protease (Mpro) disebut juga 3C-like protease (3CLpro) [64], dikenal juga sebagai NSP5 [54]. Enzim ini merupakan salah satu enzim yang penting dalam menentukan

kelangsungan hidup CoV, dengan memediasi replikasi dan transkripsi protein-protein pada virus. Pentingnya peran Mpro ini menjadikannya salah satu target penting dalam mendesain antivirus COVID-19. Mpro memiliki lebih dari 11 situs pembelahan. Inhibisi aktivitas enzim ini akan menyebabkan terhambatnya replikasi virus. Manusia tidak memiliki enzim protease yang sama dengan Mpro virus ini, maka inhibitor Mpro tidak akan menghasilkan efek toksik pada manusia [64]. Berbagai studi *in silico* telah dilakukan untuk menemukan calon molekul yang efektif menginhibisi main protease SARS-Cov2 ini. Inhibisi main protease akan menyebabkan terganggunya replikasi dan transkripsi protein non struktural virus, sehingga mengakibatkan kematian virus. Umesh dkk telah melakukan studi penambatan molekul terhadap target Mpro. Studi ini dilakukan dengan menskrining senyawa-senyawa yang terdapat dalam rempah-rempah di India melalui penambatan molekul. Struktur kristal Mpro diunduh dari PDB dengan ID 6Y84. Hasilnya menunjukkan bahwa Carnosol dan arjunglucoside-1 memiliki aktivitas penghambatan Mpro yang cukup kuat [65].

Papain-like proteinase (PLpro) berperan dalam pembelahan terminal N polyprotein (pp) untuk melepas NSP1, NSP2 dan NSP3 yang penting dalam proses replikasi virus [66]. PLpro juga secara signifikan mengantagonis imunitas bawaan inang [67-69,54].

Dalam bidang biomedis, desain dengan bantuan komputer atau *in silico* yang menggunakan teknik komputasi dalam proses penemuan obat digunakan untuk merampingkan dan mempercepat identifikasi hit dan proses optimasi hit-to-lead [70]. Salah satu metode *in silico* merupakan molecular docking atau docking. Docking adalah metode yang memprediksi orientasi dari satu molekul dengan molekul lain (bisa berupa protein atau molekul ligan) ketika terikat satu sama lain untuk membentuk kompleks

yang stabil. Docking digunakan untuk memprediksi binding affinity suatu molekul ligan dengan molekul protein target [71]. Syahputra dkk (2014) menyatakan bahwa semakin negatif afinitas pengikatan maka semakin kuat dan stabil ikatan antara ligan dan reseptor [72]. Didukung oleh Saputri dkk (2016) bahwa semakin kecil nilai afinitas pengikatan maka semakin tinggi pula afinitas ikatan antara reseptor dengan ligan, dan sebaliknya, semakin besar nilainya, semakin rendah afinitas pengikatan maka afinitas ikatan antara reseptor dan ligan [73]. Ikatan hidrogen memiliki peran penting dalam menentukan nilai binding affinity karena ikatan ini memiliki energi yang lebih kuat daripada ikatan hidrofobik. Ikatan hidrogen memiliki energi yang lebih tinggi daripada interaksi hidrofobik dengan nilai 1-7 kcal/mol dengan 1 kcal/mol. Namun, ikatan hidrofobik juga penting dalam menjaga stabilitas ikatan [74].

Perlu diperhatikan sebelum dilakukan docking harus melewati tahap preparasi macromolecule (protein target) yang diperoleh dari Protein Data Bank. Hal ini disebabkan masih ada ligan yang menempel pada macromolecule yang harus dihilangkan dan perlu penambahan hidrogen. Atom hidrogen yang berada di macromolecule ini bergerak dan berputar dengan cepat dan mereka berpartisipasi dalam ikatan hidrogen (ikatan-H) sebagai donor dan akseptor dengan ligan, sehingga diperoleh skoring penambatan. Hasil molecular docking antara ligan yang berupa senyawa bioaktif dan makromolekul protein target pada penghambatan infeksi virus SARS-Cov2 dirangkum dalam tabel 6 yang berisi nama ligan dan energi ikatan antara ligan dan protein.

Tabel 6: Hasil *molecular docking* senyawa bioaktif dalam penghambatan protein target ACE, TMPRSS2, RdRp, 3CLpro dan PLpro

Tanaman herbal	Ligand	Binding affinity (Kcal/mol)				
		ACE	TMPRSS2	RdRp	3CLpro (Mpro)	Plpro
Jahe (<i>Zingiber officinale</i>),	Gingerol	-7,45	-5,57	-5,09	-6,32	-7,0
Kayu Secang (<i>Caesalpinia sappan</i>)	Brazilin	-8,32	-7,25	-4,31	-7,05	-7,18
	Brazilein	-7,73	-7,86	-3,81	-7,73	-7,87
Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Shogaol	-4,2	-	-	-	-
	Eugenol	-4,85	-	-	-	-
Kayu Manis (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	Tenufolin	-	-	-	-8,7	-8,8
	Pavetan	-	-	-	-11,1	-
	ninC1	-	-	-	-10,2	-
	Cinnamtannin-B1	-	-	-	-	-
Daun Pala (<i>Myristica fragrans</i>)	Myricetin	-7,08	-6,25	-3,38	-6,65	-6,57
Sereh (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Rhoifolin	-6,9	-	-	-8,2	-
Kapulaga (<i>Amomum compactum</i>)	1,8-cineole	-5,2	-	-	-6,04	-

Hasil molecular docking menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari kayu manis (*Cinnamomum zeylanocum*) memiliki skor negatif *binding affinity* terendah terhadap ACE2, yaitu brazilin (-8,32 kcal/mol) dalam kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*). Nilai binding affinity merupakan skoring hasil docking berupa nilai energi bebas, semakin negatif nilai binding affinity maka semakin besar penambatan antara macromolecule (protein target) dengan ligand (senyawa bioaktif atau obat), berarti terbentuk afinitas terbaik.

Senyawa yang memiliki ikatan paling stabil terhadap protein TMPRSS2, adalah brazilein pada kayu secang, sedangkan gingerol (-5,09) dari jahe menunjukkan ikatan terbaik dengan RdRp. Senyawa kimia dalam bahan alam yang memiliki potensi untuk mengikat paling kuat dengan 3CLpro adalah pavenin c1 (-11,1 kcal/mol), diikuti oleh cinantanninB1 (-10,2 kcal/mol), dan tenufolin (-8,7 kcal/mol), dan urutan berikutnya adalah rhoifolin (-6,9) dari sereh. Energi ikat yang diperoleh antara senyawa aktif dan lima protein target juga dibandingkan dengan energi ikat obat terhadap ACE2; TMPRSS2; RdRp; 3CLpro dan PLpro inhibitor. Jika nilai energi ikat senyawa kimia dengan lima protein target lebih negatif daripada inhibitor kelima protein, maka kemampuan atau afinitas senyawa aktif untuk mengikat protein target dikatakan lebih besar. Hal ini menunjukkan adanya interaksi yang lebih kuat dan lebih stabil yang terjadi antara senyawa bioaktif dengan protein target.

Gingerol dalam jahe, brazilin dan brazilein dalam kayu secang memiliki ikatan terhadap semua protein target ACE, TMPRSS2, RdRp, 3CLpro dan PLpro. Serta memiliki energi ikat yang lebih rendah dibandingkan dengan ligan obat sebagai kontrol yaitu arbidol, klorokuin, camostat mesylate, remdesivir, ribavirin dan lopinavir terhadap ACE2. Ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dalam jahe dan kayu secang dapat bertindak sebagai penghambat masuknya SARS-Cov2 dengan menghambat ACE2 dan TMPRSS2.

Kayu secang juga memiliki aktivitas menghambat RdRp yang berperan dalam RNA replikasi di sel inang. Protease diperlambat turun juga, agar virus corona matang proses dihentikan. Senyawa lain yang juga memiliki kemampuan menghambat dalam lima protein target virus corona yang menginfeksi inangnya adalah daun

pala yang mengandung mirisetin, memiliki kemampuan tertinggi pada TMPRSS2 sehingga proses pembentukan kompleks S-glikoprotein dengan ACE2 akan terhambat

Untuk memeriksa lebih lanjut mekanisme penghambatan terhadap protein enzim pada COVID-19 dari beberapa senyawa bioaktif hasil kajian ini, uji farmakologi jaringan secara *in silico* dapat digunakan untuk menganalisis target senyawa fitokimia, jalur transduksi sinyal sel yang mungkin terlibat dalam regulasi, dan mekanisme farmakologis potensial.

7.4 Ringkasan

Secara tradisional, obat-obatan dari sumber tanaman obat telah banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit. Pada infeksi COVID-19, diperlukan obat yang efektif. Tumbuhan mengandung sumber yang kaya akan senyawa fitokimia yang dapat menjadi pendekatan yang efektif untuk memerangi COVID-19. Kandungan senyawa bioaktif tanaman dalam wedang uwuh yang teridentifikasi (gingerol, brazilin, brazilien, shogoal, eugenol, tennufofin, pavenantanninC1, cinnantanninB1, myricetin, rhoifolin, 1,8-cineoli) berpotensi sebagai imunomodulator pada infeksi SRAS-Cov2 kemampuan penghambatan senyawa bioaktif dalam wedang uwuh terhadap protein target yang berperan dalam proses masuknya virus ke dalam sel inang yang dikaji secara *in silico*. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk merancang obat spesifik melawan COVID-19. Di masa depan, senyawa fitokimia yang teridentifikasi melalui studi eksperimental digunakan untuk mengkonfirmasi status senyawa bioaktif sebagai senyawa baru yang sebagai kandidat obat terhadap COVID-19..

Daftar Pustaka

- [1] Yuniastuti A. (2021). *Potensi Wedang Uwuh di tengah Pandemi Covid-19*. Ruang Prosefor. FMIPA Unnes. Juni 2021. <https://mipa.unnes.ac.id/v3/2021/06/potensi-wedang-uwuh-di-tengah-pandemi-covid-19/>
- [2] Shahid S.M.A, Kausar M.A, Khalid M.A, Tewari S, Alghassab T.A, Acar T, Ahmed M.Q and Alenazi F.S.H. (2018). Analysis of binding properties of angiotensin-converting enzyme 2 through in silico molecular docking. *J.Exp. Zool. India*. 21(1): 559-563.
- [3] Hoffman et al (2020) Hoffman M, Weber H.K, Schroeder S, Muller M.A, Drosten C and Pohlmann S. SARS-Cov2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 181: 1-10.
- [4] Kong R, Yang G, Xue R, Liu M, Wang F, Hu J, Guo X and Chang S. (2020). COVID-19 docking server: An interactive server for docking small molecules, peptides and antibodies against potential targets of COVID-19. Q-bio. *BM.arXiv*: 2003.00163.
- [5] Wang, D., Bo H., Chang H., Fangfang Z., Xing L., Jing X., *et al.* (2020). Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *Jama*. 323(11): 1061–1069.
- [6] Wu C, Liu Y, Yang Y, Zhang P, Zhong W, Wang Y, Wang Q, Xu Y, Li M, Li X, Zheng M, Chen L and Li H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-Cov2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharm. Sin. B*. 20: 1-44.
- [7] Laksmiani N.P.L, Reynaldi K.R, Widiastari M.I, Nugraha I.P.W, Suyadnya I.M.K and Maharani R.A.I.K. (2018). Cytotoxic Activity of Andrographolide in Colon Cancer Through Inhibition Cox-2 by In Silico Study. *J. Phys. Conf. Ser.* 1040:1-6.
- [8] Saito, L. B., Laura D. S., Danyel E., Ximena F. C., Sai M., Robert G. W., *et al.* (2018). IFN and Cytokine Responses in

- Ducks to Genetically Similar H5N1 Influenza A Viruses of Varying Pathogenicity. *The Journal of General Virology*. 99(4):464.
- [9] Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. (2016). Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoVInfected Mice. *Cell Host Microbe*. 19(2):181-93
- [10] Chen, Y., Rubin P., Williams J.,Jacky., Eric H., Therese S., danPaul O. (2001). Circulating IL-6 as A Predictor of Radiation Pneumonitis. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 49(3):641-48.
- [11] Pestariati, Edy H and Dwi K. (2019). Bioactive wood potential (Caesalpinia sappan L.) in the proliferation of wistar in infection Salmonella Typhimurium. *Indian J Med Forensic Med Toxicol*. 13(4): 1579-1581.
- [12] Puig E.R and Castell M. (2008). Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *Br. J. Nutr*. 101: 931-940
- [13] Kathal R and Rawat P. (2016). Immunity booster herbs and their conservation-a review. *International Conferences on Public Health: Issues, challenges, opportunities, prevention, awareness. Public Health*. 135-140.
- [14] Suryaningsum, S danAnies S. H. (2018).Peningkatan Kualitas Produksi Usaha Wedang Uwuh Untuk Meningkatkan Ekonomi Masyarakat Dusun Kerten Imogiri Bantul .*Jurnal Ekonomi Manajemen Sumber Daya*. 20(2)
- [15] Yuniastuti A., Retno SI., Noor AH, Talitha W, Fitri AS., Maulida SS., Friska K., Cindy S., Rizka K. (2021). Studi Eksplorasi: Potensi Rempah “Wedang Uwuh” Sebagai Imunomodulator Dalam Pencegahan Infeksi Virus Sarscov-2. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian dan Pengabdian. Universitas Negeri Semarang.
- [16] Lagunin AA, Goel RK, Gawande DY, Pahwa P, Glorizova TA, Dmitriev AV, Ivanov SM, Rudik AV, Konova VI, Pogodin PV, Druzhilovsky DS. Chemo-and bioinformatics resources for

- in silico drug discovery from medicinal plants beyond their traditional use: a critical review. *Nat Prod Rep*, 2014; 31:1585–611
- [17] Egger M., M Schneider, G Davey Smith. (1998). Spurious precision? Meta-analysis of observational studies. *BMJ* 316(7125):140-4.
- [18] Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461.
- [19] Sari, K. I. P., Periadnadi, Nasir N. (2013). Uji Antimikroba Ekstrak Segar Jahe-Jahean (Zingiberaceae) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas*. 2(1):20-24.
- [20] Alibasyah, Z. M., Ridha A., dan Ana F. (2016). Potensi Antibakteri Ekstrak Jahe (Zingiber Officinale Roscoe) Terhadap *Porphyromonas Gingivalis* Secara In Vitro. *J Syiah Kuala Dent Soc*. 1(2): 147-152.
- [21] Rath, M., Muller I., Kropf P., Closs E. I., Munder M. (2014). Metabolism Via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 5: 532.
- [22] Bogdan, C. (2015). Nitric Oxide Synthase in Innate and Adaptive Immunity: An Update. *Trends Immunol*. 36(3): 161-178.
- [23] Rahmani, A. H., Al shabrmi F. M., dan Aly S. M. (2014). Active ingredients of ginger as potential candidates in the prevention and treatment of diseases via modulation of biological activities. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*. 6(2): 125-136.
- [24] Wang, S, Zhang C, Yang G, Yang Y. (2014). Biological properties of 6-gingerol: a brief review. *Nat. Prod. Commun*. 9(7): 1027-1030
- [25] Amri, M, dan Chafia Touil-Boukoffa. (2016). In Vitro Antihydatic and Immunomodulatory Effects of Ginger and [6]-

- gingerol. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9(8): 749-756
- [26] Batiha, G.E.S.; Beshbishy, A.A.; Tayebwa, D.S.; Shaheen, M.H.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. (2018). Inhibitory effects of *Uncaria tomentosa* bark, *Myrtus communis* roots, *Origanum vulgare* leaves and *Cuminum cyminum* seeds extracts against the growth of *Babesia* and *Theileria* in vitro. *Jap. J. Vet. Parasitol*, 17, 1–13.
- [27] Dzotam, J. K.; Simo, I. K.; Bitchagno, G.; Celik, I.; Sandjo, L. P., et al.(2018). In Vitro Antibacterial and Antibiotic Modifying Activity of Crude Extract, Fractions and 3',4',7-trihydroxyflavone from *Myristica Fragrans* Houtt against MDR Gram-negative Enteric Bacteria. *BMC Complement. Altern. Med.*, 18(1), 15
- [28] Beshbishy, A.M.; Batiha, G.E.S.; Adeyemi, O.S.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. (2019). Inhibitory effects of methanolic *Olea europaea* and acetonc *Acacia laeta* on the growth of *Babesia* and *Theileria*. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 12, 425–434
- [29] Astuti, R.I.; Listyowati, S.; Wahyuni, W.T. (2019). Life span extension of model yeast *Saccharomyces cerevisiae* upon ethanol derived-clover bud extract treatment. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 299, 012059
- [30] Setzer, W.N. (2016). Essential oils as complementary and alternative medicines for the treatment of influenza. *Am. J. Essent. Oil Nat. Prod.* 4, 16–22
- [31] Peter M. Gayed (2011). Toward a Modern Synthesis of Immunity: Charles A. Janeway Jr. and the Immunologist's Dirty Little Secret. *Yale J Biol Med.* 84(2): 131–138.
- [32] Odubanjo, V. O.; Olasehinde, T. A.; Oyeleye, S. I.; Oboh, G.; Boligon, A. A. (2018). Seed Extracts from *Myristica Fragrans* (nutmeg) and *Moringa Oleifera* (drumstick Tree) Inhibits Enzymes Relevant to Erectile Dysfunction and Metal-induced Oxidative Damage in Rats' Penile Tissues. *J. Food Biochem.* 42, e12452

- [33] Brito, R., Norma L. S., Leuridan C. T., Carlos F. L., Jailson de B. C., dan Giselia A. P. (2016). The Balance Between the Serum Levels of IL-6 and IL-10 Cytokines Discriminates Mild and Severe Acute Pneumonia. *BMC pulmonary medicine*. 16(1):170.
- [34] Cao, G. Y.; Xu, W.; Yang, X. W.; Gonzalez, F. J.; Li, F. (2015). New Neolignans from the Seeds of *Myristica Fragrans* that Inhibit Nitric Oxide Production. *Food Chem.* 173, 231–237.
- [35] Soares MO, Alves RC, Pires PC, Oliveira MB, Vinha AF. (2013). Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. *Food Chem Toxicol.* 60:413-8.
- [36] Ekpenyong CE, Akpan EE. (2017). Use of *Cymbopogon citratus* essential oil in food preservation: Recent advances and future perspectives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 57(12):2541-2559.
- [37] Avoseh O, Oyedele O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedele A (2015). *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. *Molecules.* 20(5):743853.
- [38] Oliveira MMM, Brugnera, DF, Cardoso MG, Guimarães LGL, Piccoli RH. (2011). Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Rev Bras Plantas Med.* 13(1):8-16.
- [39] Ocheng F, Bwanga F, Joloba M, Borg-Karlson AK, Gustafsson A, Obua C. (2014). Antibacterial activities of extracts from Ugandan medicinal plants used for oral care. *J Ethnopharmacol.* 155(1):852-5.
- [40] Adibah, AB, Nazlina I, Ahmad IB. (2010). Anti-HSV-1 activity of *Cymbopogon nardus* (L.) rendle fractions. *Malays Appl Biol J*, 39(2):19-23.
- [41] AbuShady EAE, Aly KAS, Azza MS, ElMokadem GMT, Abo-Ghalia HH. (2017). The antiviral and antioxidant activity of some medicinal plants. *W J Pharm Sci*, 6(11):263-281.

- [42] Setyawan, AD., Wiryanto, Suranto, Bermawie, N and Sudarmono. (2014). Comparisons of isozyme diversity in local Java cardamom (*Amomum compactum*) and true cardamom (*Elettaria cardamomum*). *Nusantara Bioscience*, 6(1) 94-101.
- [43] Feng X, Jiang ZT, Wang Y, Li R. (2011). Composition comparison of essential oils extracted by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation from *Amomum kravanh* and *Amomum compactum*. *Journal Essential Oil-bearing*. 14(3): 354-359
- [44] Lim, T.K. (2013). *Amomum compactum*. In *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*. Dordrecht: Springer Sciences & Busines Media: 797 – 800
- [45] Sari, SPW., Rahmapuspita, F., Iriyani, N., Pratiwi, SUT and Hertiani, T. (2014). Penelusuran Potensi Kapulaga, Temu Putri dan Senggugu sebagai Penghambat Pembentukan Biofil . *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17-24.
- [46] Shaghayegh Pishkhan Dibazar, Shirin Fateh, and Saeed Daneshmandi. (2015). Immunomodulatory effects of clove (*Syzygium aromaticum*) constituents on macrophages: In vitro evaluations of aqueous and ethanolic components. *J Immunotoxicol* 12(2): 124–131
- [47] Widowati, W., Ratnawati, H., Husin, W and Maesaroh, M. (2015). Antioxidant properties of spice extracts *Biomedical Engineering*, 1(1): 24-29
- [48] Majdalawieh A.F and Ronald I. Carr. (2010). In Vitro Investigation of the Potential Immunomodulatory and Anti-Cancer Activities of Black Pepper (*Piper nigrum*) and Cardamom (*Elettaria cardamomum*) *JOURNAL OF Medicinal Food J Med Food* 13 (2), 371–381
- [49] Lin X, Li X, Lin X. (2020). A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules*.
- [50] Shaghaghi neda (2020): Molecular Docking Study of Novel COVID-19 Protease with Low Risk Terpenoides Compounds

- of Plants. *ChemRxiv. Preprint*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.11935722.v1>
- [51] Vijayaraj, R., Altaff, K., Rosita, A. S., Ramadevi, S., & Revathy, J. (2020). Bioactive compounds from marine resources against novel corona virus (2019-nCoV): in silico study for corona viral drug. *Natural Product Research*, 1–5.
- [52] Jin, Z., Du, X., Xu, Y. et al. Structure of Mpro from COVID-19 virus and discovery of its inhibitors. (2020). Nature Kannan S, Shaik Syed Ali P, Sheeza A, Hemalatha K. 2020. COVID-19 (NovelCoronavirus 2019)– recent trends. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 24:2006-2011.
- [53] Sampangi-Ramaiah MH, Vishwakarma R, Shaanker RU. (2020). Molecular docking analysis of selected natural products from plants for inhibition of SARS-Cov2 main protease. *Curr Sci*. 118(7):1087.
- [54] Shaghghi N. (2020). Molecular Docking study of novel COVID-19 Protease with low risk Terpenoides Compounds of Plants. *ChemRxiv*.
- [55] Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., et al. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-Cov2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta. Pharma. Sin. B* 10, 766–788.
- [56] Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., Von Mering, C., & Jensen, L. J. (2013). STRING v9.1. Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41, 808–815.
- [57] Gheblawi, M., Wang, K., Viveiros, A., Nguyen, Q., Zhong, J. C., Turner, A. J., et al. (2020). Angiotensin converting enzyme 2: SARS-Cov2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system. *Circ. Res*. 126, 1456–1474.
- [58] Zou X., Chen K., Zou J., Han P., Hao J., Han Z. (2020). Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front. Med*.

- [59] Zhang, H. and Baker, A. (2017). Recombinant human ACE2: Acing out angiotensin II in ARDS therapy. *Critical Care*. doi: 10.1186/s13054-017-1882-z.
- [60] Kupferschmidt, K. (2020). These target the coronavirus they target us target the coronavirus†they target us. *Science*. doi: 10.1126/science.abc0405.
- [61] Gao, J., Tian, Z. and Yang, X., (2020). Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies. *Bioscience trends*.14(1):7273.
- [62] Subissi L, Imbert I, Ferron F, Collet A, Coutard B, Decroly E, et al. (2014). SARS-CoV ORF1b-encoded nonstructural proteins 12e16: replicative enzymes as antiviral targets. *Antiviral Res*101:122e30..
- [63] Wang, M. Y. et al. (2018). A comprehensive in silico method to study the QSTR of the aconitine alkaloids for designing novel drugs. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules23092385.
- [64] Holshue, M. L. M.P.H., Chas DeBolt, M.P.H., Scott Lindquist, M.D., Kathy H. Lofy, M.D., John Wiesman et al. (2020). First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa2001191
- [65] Zhang, L., Lin, D., Sun, X., Curth, U., et al. (2020). Crystal structure of SARS-Cov2 main protease provides a basis for design of improved a-ketoamide inhibitors. *Science*. doi: 10.1126/science.abb3405.
- [66] Umesh et al. (2020). Identification of new antinCoV drug chemical compounds from Indian spices exploiting SARS-Cov2 main protease as target. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. Taylor & Francis, 0(0), pp.1–9.
- [67] Harcourt BH, Jukneliene D, Kanjanahaluethai A, Bechill J, Severson KM, Smith CM, Rota PA, Baker SC. (2004). Identification of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase products and characterization of papain-like protease activity. *J Virol*. 2004;78:13600–13612.

- [68] Chen, X. et al. (2014). SARS coronavirus papain- like protease inhibits the type I interferon signaling pathway through interaction with the STING-TRAF3-TBK1 complex. *Protein and Cell*. doi: 10.1007/s13238-014-0026-3.
- [69] Yuan, L. et al. (2015). P53 degradation by a coronavirus papain-like protease suppresses type I interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry*. doi:10.1074/jbc.M114.619890.
- [70] Li, S. W. et al. (2016). SARS coronavirus papainlike protease inhibits the TLR7 signaling pathway through removing Lys63-linked polyubiquitination of TRAF3 and TRAF6. *International Journal of Molecular Sciences*. doi: 10.3390/ijms17050678.
- [71] Ekins, S., Mestres, J., & Testa, B. (2007). In silico pharmacology for drug discovery: Methods for virtual ligand screening and profiling. *British Journal of Pharmacology*, 152(1), 9–20.
- [72] Borman, S. (1990). New QSAR techniques eyed for environmental assessments. *Chemical and Engineering News*, 68(8), 20–23.
- [73] Syahputra, G., Ambarsari, L., & Sumaryada, T. (2014). Simulasi Docking Kurkumin Enol , Bismetoksikurkumin Dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*, 10(1), 55–67.
- [74] Saputri, K. E., Fakhmi, N., Kusumaningtyas, E., Priyatama, D., & Santoso, B. (2016). Docking Molekular Potensi Anti Diabetes Melitus Tipe 2 Turunan Zerumbon Sebagai Inhibitor Aldosa Reduktase Dengan Autodock-Vina. *Chimica et Natura Acta*, 4(1), 16. <https://doi.org/10.24198/cna.v4.n1.10443>
- [75] Hernandez, M. A., & Rathinavelu, Ap. (2006). Basic Pharmacology Understanding Drug Actions and Reactions (1st ed.). CRC Press.

Potensi Gulma Kipahit Sebagai Bioinsektisida Pengendali Serangga Peternakan

Priyantini Widiyaningrum¹⁾, Ning Setiati, Sri Ngabekti

Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural
Sciences

Universitas Negeri Semarang, Indonesia

¹⁾ Corresponding Email: wiwiedeka@mail.unnes.ac.id

8.1 Pendahuluan

Penggunaan insektisida sintetis di sektor pertanian, tidak hanya ditujukan pada perlindungan tanaman tetapi juga dalam pengendalian serangga peternakan, serangga pemukiman dan gudang penyimpanan bahan pangan. Salah satu serangga peternakan yang menimbulkan dampak cukup signifikan secara ekonomi adalah kutu kandang *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae).

Kutu kandang adalah serangga hama yang hidup dan berkembangbiak di lingkungan peternakan ayam hampir di seluruh dunia. Suhu dan kelembaban yang tinggi di area pemeliharaan ayam serta gudang pakan, merupakan faktor yang menguntungkan bagi serangga dewasa untuk bereproduksi sepanjang tahun [13]. Kutu kandang hidup di sisa-sisa pakan bercampur kotoran, tumpukan sekam, di sela-sela dinding dan langit-langit bangunan kandang untuk meletakkan telur [11]. Serangga ini berperan sebagai vektor penyakit karena virus, bakteri dan jamur pada unggas, seperti *Fowlpox*, *Newcastle Disease*, *Aspergillus spp.*, *Escherichia spp.*,

Salmonella spp. dan *Campylobacter spp.* [32,10,28]. Keberadaannya memicu penurunan konsumsi pakan dan produktivitas, bahkan menjadi penyebab kematian pada ayam.

Permasalahannya, hingga saat ini pengendalian kutu kandang oleh peternak umumnya masih menggunakan insektisida sintetis golongan piretroid dan organofosfat seperti cypermethrin, chlorpyrifos, dan citronellal. Di satu sisi, insektisida sintetis memiliki keunggulan karena kemanjurannya dalam pengendalian siklus hidup hama, namun di sisi lain bahan ini merupakan bahan beracun yang tidak bisa diabaikan begitu saja. Penggunaan insektisida sintetis yang tidak terkendali dalam beberapa dekade terakhir terbukti telah menyebabkan sejumlah masalah lingkungan jangka panjang [4]. Selain mencemari lingkungan kandang dan mengganggu keseimbangan ekosistem di dalamnya [16], residu yang terakumulasi terus-menerus telah memicu timbulnya penyakit pada tingkat yang mengkhawatirkan [18]. Penggunaan insektisida di lingkungan peternakan juga mengancam kesehatan ternak dan pekerja. Oleh karena itu eksplorasi dan mengembangkan bioinsektisida yang aman di lingkungan peternakan unggas masih sangat diperlukan. Sumber bioinsektisida asal tanaman sangat melimpah di alam, mudah terurai, menunjukkan berbagai mode aksi pengendalian, lebih murah dan memiliki toksisitas rendah terhadap manusia dan organisme non-target [15]. Selain itu alternatif pemakaian bioinsektisida ke dalam program pengelolaan hama terpadu telah terbukti mengurangi penggunaan pestisida sintetis yang tidak perlu [19]. Salah satu sumber bioinsektisida potensial yang belum banyak diungkap adalah tanaman gulma.

Gulma Kipahit (*Tithonia diversifolia*) merupakan salah satu tanaman anggota familia Asteraceae yang tergolong tanaman invasive, banyak ditemukan tumbuh liar di sela-sela tanaman

budidaya (Gambar 20). Tanaman liar ini mudah tumbuh di berbagai jenis tanah karena kemampuannya beradaptasi, kecepatan tumbuh, dan dapat berkembangbiak secara vegetatif dan generatif, sehingga mudah dikembangbiakkan. Masyarakat di beberapa negara mengenal Kipahit sebagai obat tradisional, karena memiliki efek farmakologis dan kandungan nutrisi [2,19,26]. Masyarakat di beberapa negara juga memanfaatkan gulma Kipahit sebagai pupuk hijau [23].

Kipahit dikenal di berbagai negara dengan sebutan berbeda. Di Indonesia dikenal dengan sebutan Kipahit, Kembang bulan, atau daun insulin. Di negara lain disebut Mexican Sunflower, Tree Marigold (Inggris); Guasmara, Jalacate (Spanyol); Verschiedenblaettrige Fackelblume (Jerman); Daoruang-Yipun, Denchamat-Nam, Thantawan-Nu (Thailand) [25]. Kipahit mengandung senyawa aktif yang secara alamiah berfungsi sebagai pelindung diri dari serangan pengganggu, serta senyawa2 bersifat alelopati yang dapat menghambat kehidupan organisme di sekitarnya.



Gambar 20: Gulma Kipahit *Tithonia diversifolia* (Dokumentasi pribadi)

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa daun Kipahit mengandung senyawa toksik, sehingga potensial dikembangkan sebagai pengendali serangga hama [1,22]. Analisis Fitokimia bagian daun terdeteksi mengandung senyawa golongan fenolik, flavonoid, saponin, alkaloid, steroid, dan tanin [19]. Namun demikian, efek insektisida yang dihasilkan akan bervariasi tergantung kondisi lingkungan dimana gulma tersebut tumbuh serta perbedaan genetik [7,27]. Dalam rangka mengungkap potensinya sebagai sumber bioinsektisida, dilakukan analisis fitokimia ekstrak daun Kipahit menggunakan metode GC-MS, serta menguji aktivitasnya terhadap pengendalian kutu kandang *A. diaperinus*.

8.2 Metode

Penelitian dirancang eksperimental laboratorik dalam tiga tahap yaitu analisis ekstrak Kipahit menggunakan screening GC-MS, uji aktivitas repelen, dan uji toksisitas terhadap kutu kandang *A. diaperinus*.

a. Preparasi Ekstrak

Daun Kipahit diambil dari kebun obat herbal Temu Kencana, di Kecamatan Grabag, Kabupaten Magelang. Sampel daun dikeringkan lalu dibuat serbuk, dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dalam perbandingan 1: 4 (w/v). Proses maserasi selama 3x24 jam, sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas Whatman no. 1. Filtrat ditampung dalam labu penguap, kemudian diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 45°C. Ekstrak yang sudah dievaporasi dipanaskan dalam waterbath dengan suhu 50°C hingga semua pelarut hilang (< 5%). Ekstrak pekat yang diperoleh diasumsikan sebagai ekstrak konsentrasi 100%. Ekstrak ini kemudian dibuat menjadi berbagai variasi konsentrasi, yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%.

b. Analisis GC-MS

Untuk menduga keberadaan senyawa aktif dalam ekstrak dilakukan analisis GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometer*). Kuantifikasi pendugaan senyawa diperoleh dari pembacaan area pada grafik GC-MS. Pendugaan senyawa hasil uji GC-MS dilakukan dengan menggunakan software Wiley/NIST Library.

c. Koleksi dan Pembiakan Kutu Kandang *Alphitobius diaperinus*

Alphitobius diaperinus dewasa diperoleh dari peternakan ayam potong di wilayah Cepoko, Gunungpati Semarang, kemudian dibiakkan dalam *container box insect* dengan media pakan ayam potong dicampur sekam. Untuk mendapatkan keturunan pertama (F1), setiap satu minggu, seluruh imago dipindahkan ke dalam *container box insect* yang lain dengan media pakan yang sama. *Container box* yang ditinggalkan imago diinkubasi hingga telur menetas dan diperoleh larva. Kemunculan larva ini diasumsikan sebagai F1 dengan umur yang relatif seragam. Pembiakan dilakukan di ruang dengan kisaran suhu $27^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dengan kelembaban 75-80%.

d. Uji preferensi

Aktivitas repelen ekstrak diukur berdasarkan respon penolakan *A. diaperinus* terhadap ekstrak dalam uji preferensi. Uji preferensi menggunakan tabung *dual choice olfactometer*–Y. Masing-masing lengan Olfaktometer mempunyai diameter 2,5 cm, panjang 20 cm ditambah tabung penutup panjang 10 cm yang bisa dibuka dan ditutup. Lengan A adalah lorong tempat memasukkan serangga uji, ujung lengan B digunakan untuk meletakkan ekstrak perlakuan, sedangkan ujung lengan C digunakan untuk kontrol. Setiap pengujian menggunakan sebanyak 25 ekor *A. diaperinus* dewasa jantan betina dengan kriteria ukuran dan umur relatif sama. Ekstrak yang akan diuji diteteskan sebanyak 200 μL ke dalam sepotong

kapas berukuran 2x2 cm lalu diletakkan di ujung lengan B. Adapun ujung lengan C letakkan kapas yang sama dan diteteskan akuadest sebanyak 200 μ L sebagai kontrol. Setelah serangga uji masuk kedalam lengan olfaktometer (A) dan berjalan menuju persimpangan Y, lengan A ditutup secara perlahan menggunakan potongan busa yang didorong secara perlahan, masuk hingga mencapai persimpangan lengan B dan C. Tujuannya adalah agar serangga uji tidak berbalik arah ke pintu masuk. Pengamatan dilakukan terhadap perilaku serangga. Durasi waktu yang diperlukan serangga uji untuk berdiam di salah satu lengan adalah 30 menit, sesuai dengan rata-rata hasil pencatatan waktu pada uji pendahuluan. Setelah menit ke-30, jumlah serangga uji yang berada di lorong lengan B dan C dihitung dan ditabulasi, untuk selanjutnya digunakan untuk menghitung Indeks preferensi mengacu cara yang dilakukan Gitahi *et al.* (2021). Indeks preferensi digunakan untuk mengetahui sejauh mana respon penolakan kutu kandang terhadap ekstrak. Jika nilai indeks preferensi negatif (< 1), menunjukkan adanya respon penolakan, sebaliknya jika indeks preferensi positif (> 1), maka serangga uji tidak memberikan respon penolakan. Semakin kecil nilai indeks preferensi, penolakan serangga uji terhadap bahan uji makin besar/kuat, serta mengindikasikan bahwa ekstrak yang diuji memiliki aktivitas repelen. Perhitungan indeks preferensi menggunakan formula sebagai berikut.

$$IP = \frac{NP - NK}{NP + NK}$$

Dimana, IP = Indeks Preferensi

NP = jumlah serangga yang berada di lorong perlakuan

NK = jumlah serangga yang masuk ke dalam lorong kontrol

e. Efek toksik

Ekstrak etanol daun Kipahit yang diujikan dibuat dalam 5 level konsentrasi diujikan dan diamati setelah 24, 48 dan 72 jam perlakuan. Efek toksik ekstrak dilihat berdasarkan nilai LC_{50} , yaitu kemampuannya membunuh serangga uji >50% dalam waktu kurang dari 24 jam.

Pengujian LC_{50} dibuat dalam 5 level konsentrasi ekstrak yaitu 100%, 75%, 50%, 25%, 0%. Masing-masing level konsentrasi diulang lima kali, dan setiap ulangan menggunakan 25 ekor kutu kandang dewasa yang ditempatkan dalam cup plastik bertutup (dimater 4cm; tinggi 7cm) dilengkapi lubang ventilasi. Pemaparan ekstrak dilakukan dengan cara meneteskan sebanyak 200 μ L ekstrak ke dalam kertas saring berukuran 2x2 cm di dasar cup plastik, lalu serangga dimasukkan kedalamnya untuk memperoleh paparan dengan kontak langsung. Setelah kontak langsung, kedalam cup ditambahkan pakan sebanyak 5 gram. Mortalitas serangga uji diamati pada selang waktu 24, 48, dan 72 jam setelah dipapar ekstrak. Jika pada kelompok kontrol ditemukan mortalitas lebih dari 5%, maka semua data akan dikoreksi terlebih dahulu menggunakan formula Abbott (1925). Jumlah kematian kutu pada setiap waktu pengamatan ditabulasi dan disajikan dalam bentuk grafik.

$$P = \frac{Po - Pc}{100 - Pc} \times 100\%$$

P = jumlah serangga yang mati setelah dikoreksi

Po = jumlah serangga yang mati karena perlakuan ekstrak

Pc = jumlah serangga yang mati pada kontrol

f. Analisis data

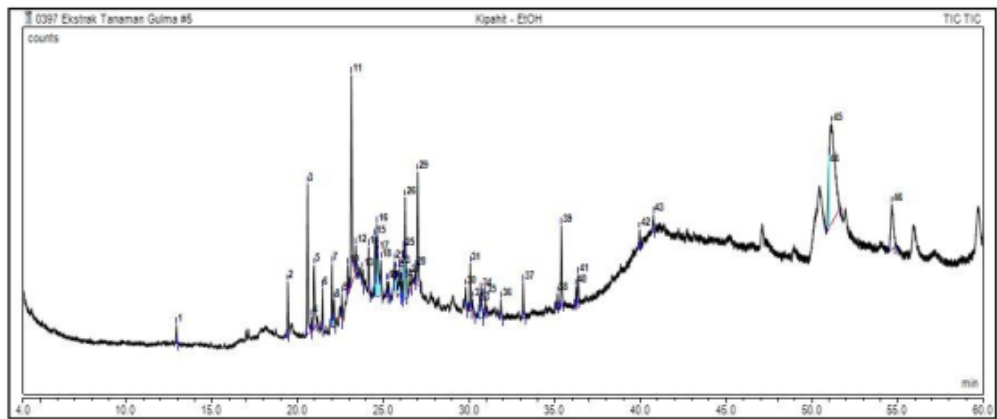
Hasil analisis GC-MS berupa grafik kromatogram dan tabel komponen senyawa aktif yang terdeteksi. Data kemudian dianalisis deskriptif. Indeks preferensi disajikan dalam dalam grafik batang

dan dianalisis secara deskriptif. Hasil uji toksisitas dianalisis probit menggunakan SPSS 23.0. sehingga diperoleh estimasi konsentrasi ekstrak yang dapat mematikan serangga uji hingga 50% (LC₅₀).

8.3 Hasil dan Pembahasan

a. Hasil Analisis GC-MS

Analisis GC-MS terhadap ekstrak gulma Kipahit berhasil mengidentifikasi senyawa-senyawa aktif yang disajikan dalam bentuk grafik kromatogram dan spektrum massa [3]. Grafik kromatogram ekstrak Kipahit terlihat seperti pada Gambar 21, sedangkan hasil identifikasi spektrum massa disajikan pada Tabel 7.



Gambar 21: Grafik kromatogram GC-MS ekstrak gulma Kipahit

Pada grafik kromatogram (Gambar 21) terdapat 46 *peak* yang menunjukkan kuantitas senyawa-senyawa aktif yang berhasil diidentifikasi. Dari grafik tersebut senyawa bioaktif polar yang memiliki % *area* tertinggi adalah β -copaene yang terdeteksi pada *peak* 11. Senyawa ini termasuk golongan terpenoid, dengan % *area* sebesar 18,66%. Pada *peak* 45 terdeteksi Androst-5,7-dien-3-ol-17-one- yang merupakan golongan fitosterol, dengan % *area* sebesar 21,64%. Selain β -copaene, terdapat 11 sesquiterpenoid lain juga teridentifikasi (Tabel 7). Sesquiterpenoid merupakan senyawa senyawa yang bersifat aromatik, mengeluarkan bau khas pada setiap tanaman dan dapat digunakan sebagai penolak serangga [25].

Menurut Miranda et al (2015) [17], bagian daun dan bunga Kipahit mengandung minyak atsiri yang tinggi, dan berpotensi dimanfaatkan sebagai produk obat, makanan, kosmetik dan insektisida. Hasil-hasil penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa senyawa aktif golongan terpenoid bersifat toksik terhadap hama serangga. Lebih dari 150 senyawa metabolit sekunder ada dalam tanaman Kipahit, sebagian besar didominasi flavonoid dan seskuiterpen, sedangkan minyak atsirinya didominasi oleh hidrokarbon monoterpen [8,20].

Tabel 7: Senyawa-Senyawa Hasil analisis *GC-MS* dari Ekstrak Ethanol Gulma Kipahit^{*)}.

Peak	Retention.time (min)	Komponen	Ret.Area (%)
1	12.92	<i>10-Heptadecen-8-ynoic acid, methyl ester, (E)-</i>	0,59
2	19.42	<i>β-copaene</i>	1,65
3	20.57	<i>Caryophyllene</i>	5,65
4	20.81	<i>β-copaene</i>	0,39
5	20.95	<i>Methyl 9,11-octadecadiynoate</i>	3,76
6	21.44	<i>7-epi-cis-sesquisabinene hydrate</i>	1,16
7	22.00	<i>α-ylangene</i>	1,95
8	22.12	<i>β-ylangene</i>	0,97
9	22.57	<i>β-copaene</i>	0,65
10	22.93	<i>β-ylangene</i>	0,64
11	23.13	<i>β-copaene</i>	18,66
12	23.38	<i>2-Myristynoyl pantetheine</i>	0,83
13	23.80	<i>Tetraacetyl-d-xylonic nitrile</i>	0,64
14	24.15	<i>Ethyl iso-allocholate</i>	1,54
15	24.52	<i>Ledene oxide-(II)</i>	2,01
16	24.61	<i>9,12,15-Octadecatrienoic acid, 2,3-dihydroxypropyl ester, (Z,Z,Z)-</i>	2,65
17	24.67	<i>Methyl 7,10,13,16,19-docosapentaenoate</i>	2,30

Peak	Retention.time (min)	Komponen	Ret.Area (%)
18	24.85	<i>Cyclopropa[d]naphthalen-3-one, octahydro-2,4a,8,8-tetramethyl-, oxime</i>	1,60
19	25.21	<i>Pyrazole[4,5-b]imidazole, 1-formyl-3-ethyl-6-β-d-ribofuranosyl-</i>	0,60
20	25.30	<i>Methyl 5,7-hexadecadiynoate</i>	0,53
21	25.64	<i>6,9-Octadecadiynoic acid, methyl ester</i>	0,96
22	25.75	<i>7-epi-cis-sesquisabinene hydrate</i>	1,17
23	25.96	<i>a-acorenol</i>	1,59
24	26.07	<i>Pregan-20-one, 2-hydroxy-5,6-epoxy-15-methyl-</i>	0,58
25	26.19	<i>2-((4aS,8R,8aR)-4a,8-Dimethyl-3,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydronaphthalen-2-yl)propan-2-ol</i>	1,53
26	26.26	<i>β-Guaiene</i>	4,72
27	26.51	<i>12,15-Octadecadiynoic acid, methyl ester</i>	0,80
28	26.88	<i>9,10-Secocholesta-5,7,10(19)-triene-3,24,25-triol, (3β,5Z,7E)-</i>	0,48
29	26.99	<i>trans-Z-a-Bisabolene epoxide</i>	5,17
30	29.79	<i>6,9,12,15-Docosatetraenoic acid, methyl ester</i>	0,94
31	30.07	<i>Z,Z-3,15-Octadecadien-1-ol acetate</i>	1,48
32	30.21	<i>12,15-Octadecadiynoic acid, methyl ester</i>	0,59
33	30.59	<i>Acetamide, N-methyl-N-[4-[2-acetoxymethyl-1-pyrrolidyl]-2-butynyl]-</i>	0.52
34	30.69	<i>N,N'-Bis(Carbobenzyloxy)-lysine methyl(ester)</i>	1,83
35	30.94	<i>13-Heptadecyn-1-ol</i>	0,55
36	31.84	<i>Acetamide, N-methyl-N-[4-(3-hydroxypyrrolidinyl)-2-butynyl]-</i>	0,77
37	33.15	<i>[1,1'-Bicyclopropyl]-2-octanoic acid, 2'-hexyl-, methyl ester</i>	1,26

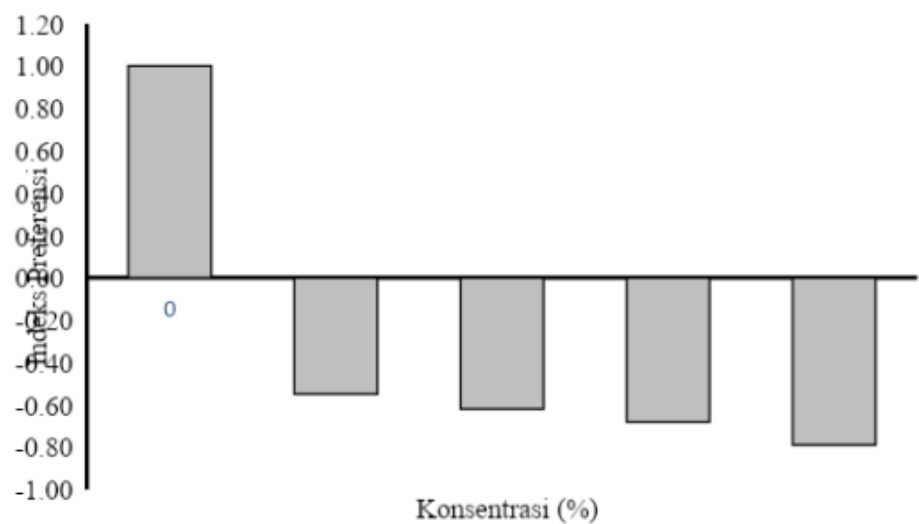
Peak	Retention.time (min)	Komponen	Ret.Area (%)
38	35.14	<i>Pregn-4-ene-3,20-dione, 17,21-dihydroxy-, bis(O-methyloxime)</i>	0,47
39	35.39	<i>12-Methyl-E,E-2,13-octadecadien-1-ol</i>	2,93
40	36.24	<i>Cyclopropanebutanoic acid, 2-[[2-[[2-[[2-pentylcyclopropyl)methyl]cyclopropyl]methyl]cyclopropyl]methyl]-methyl ester</i>	0,55
41	36.35	<i>2-[4-methyl-6-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)hexa-1,3,5-trienyl]cyclohex-1-en-1-carboxaldehyde</i>	1,00
42	39.95	<i>Spirost-8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3β,5α,14β,20β,22β,25R)-</i>	0,63
43	40.75	<i>Spirost-8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3β,5α,14β,20β,22β,25R)-</i>	0,68
44	50.98	<i>Spirost-8-en-11-one, 3-hydroxy-, (3β,5α,14β,20β,22β,25R)-</i>	3,26
45	51.13	<i>Androst-5,7-dien-3-ol-17-one-</i>	21,64
46	54.64	<i>α-D-Glucopyranoside, methyl 2-(acetylamino)-2-deoxy-3-O-(trimethylsilyl)-, cyclic methylboronate</i>	5,11

*) Analisis GC-MS dilakukan di LPPT UGM (2021).

b. Efek Repelen

Aktivitas repelen ekstrak Kipahit diamati berdasarkan nilai indeks preferensi yang diperoleh dari uji preferensi. Hasil perhitungan indeks preferensi dianalisis deskriptif untuk mengetahui konsentrasi mana yang memberikan aktivitas repelen tertinggi (Gambar 22). Pada perlakuan konsentrasi ekstrak terendah (25%), Indeks preferensi sudah menunjukkan angka <1, dan pada konsentrasi yang lebih tinggi, indeks preferensi semakin kecil. Hal ini mengindikasikan bahwa kutu kandang yang diuji menunjukkan aktivitas menolak pada semua level konsentrasi, sehingga bisa dikatakan paparan ekstrak dengan konsentrasi 25% sudah mampu

memberikan efek mengusir serangga uji. Semakin pekat konsentrasi yang diberikan, aktivitas repelen menjadi semakin kuat. Hasil ini diperkuat dari analisis GC-MS yang menunjukkan adanya senyawa bioaktif dalam ekstrak yang berhubungan dengan efek repelensi, terutama senyawa golongan terpenoid yang memiliki sifat aromatik.

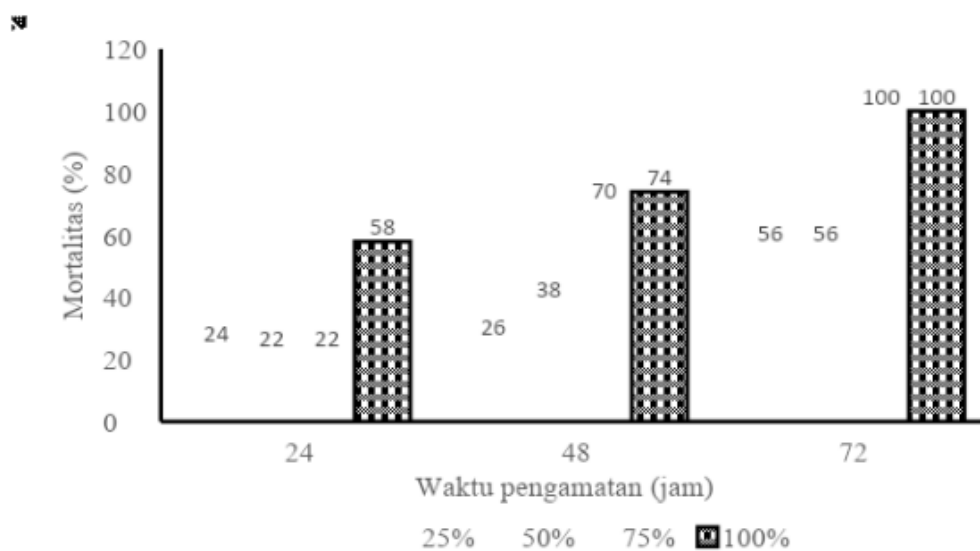


Gambar 22: Indeks preferensi kutu kandang *A. diaperinus* yang terpapar ekstrak dalam berbagai konsentrasi.

Aktivitas repelen Kipahit juga dibuktikan pada penelitian-penelitian terdahulu terhadap semut pemotong daun *Atta cephalotes* [22], kutu jagung *Sitophilus zeamais* (Gitahi, 2021), Ngengat beras *Corcyra cephalonica*, dan serangga gudang *Callosobruchus maculatus* [12], kutu beras *Sitophilus oryzae* dan *Tribolium castaneum* (Devi *et al.*, 2020). Penelitian Widiyaningrum *et al* (2019) [30], mengenai efek repelen beberapa ekstrak limbah beberapa tanaman anggota Zingberaceae menemukan bahwa ekstrak yg mengandung komponen terpenoid memberikan efek penolakan yang lebih kuat dibanding ekstrak yang tidak terdeteksi mengandung terpenoid. Ekstrak memberikan efek penolak pada bonggol padi yang lebih dominan dari yang lain senyawa.

c. Hasil Uji Efek Toksik

Pada pengujian ini tidak ditemukan kematian serangga uji di kelompok kontrol, sehingga data mortalitas tidak perlu dikonversi menggunakan formula Abbott. Efek toksik ekstrak gulma Kipahit terhadap kutu kandang *A. diaperinus* diindikasikan berdasarkan jumlah kematian yang terjadi dalam durasi waktu 24, 48 dan 72 jam setelah terpapar ekstrak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak daun Kipahit menyebabkan kematian serangga uji dengan persentase berbeda-beda (Gambar 21). Hasil pengamatan selama 3 x 24 jam menunjukkan jumlah kematian kutu kandang *A. diaperinus* bertambah sejalan dengan waktu pengamatan dan level konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, terlihat mortalitas semakin banyak. Pada pengamatan 24 jam setelah terpapar ekstrak, kematian lebih dari 50% hanya terjadi pada perlakuan konsentrasi ekstrak 100%. Pada pengamatan 48 jam, mortalitas > 50% terjadi pada perlakuan konsentrasi ekstrak 75% dan 100%. Pada perlakuan konsentrasi ekstrak yang lebih rendah (25% dan 50%), kematian serangga uji > 50% baru tercapai pada pengamatan 72 jam. Ditemukannya senyawa golongan terpenoid (monoterpenoid dan seskuiterpenoid) yang cukup tinggi dalam ekstrak etanol gulma Kipahit diduga menjadi penyebab kematian pada kutu kandang, meskipun efek toksiknya tidak terjadi dalam waktu singkat. Terpenoid merupakan senyawa bioaktif asal tanaman yang mampu merusak sistem syaraf pada serangga. Banyak penelitian menunjukkan terpenoid bersifat neurotoksik pada serangga, menyebabkan kelumpuhan dan diikuti oleh kematian [14,21, Jankowska et al., 2018).



Gambar 23: Mortalitas kutu kandang dalam waktu 24, 48 dan 72 jam setelah terpapar ekstrak.

Kemampuan senyawa terpenoid menghambat AchE pada sistem saraf serangga membuat komponen ini menjadi kandidat yang menarik untuk bioinsektisida (Jankowska et al., 2017). Akibat gangguan pada sistem syaraf juga menyebabkan efek antifeedant, dengan indikasi serangga uji tidak mengenali pakan, mempengaruhi perilaku makan dan pada akhirnya menurunkan konsumsi pakan [31].

Hasil analisis probit (Tabel 8), menunjukkan estimasi LC_{50} pada 24 jam pertama pengamatan adalah berada pada konsentrasi 61,8%. Artinya, perlakuan konsentrasi ekstrak 25% dan 50% ternyata belum mampu membunuh 50% serangga uji dalam 24 jam. Hal ini mengindikasikan bahwa efek toksik ekstrak terhadap kutu kandang tidak terlalu kuat. Kuat tidaknya efek toksik yang ditimbulkan sangat dipengaruhi fase dan jenis serangga. Pada pengamatan 48 jam, LC_{50} tercapai pada perlakuan konsentrasi 50 dan 75%. Menurut Gitahi *et al.* (2021), pestisida alami yang diekstraksi dari tanaman umumnya memiliki toksisitas lebih rendah dari insektisida sintesis, sehingga dalam dosis tertentu tidak selalu dapat membunuh serangga secara langsung tetapi pasti menimbulkan

kan efek penghambatan yang lain, seperti efek repellent (penolak), efek antifeedant (menghambat selera/kemampuan makan), chemosterilant (menyebabkan mandul), dan growth retardants (menghambat parameter pertumbuhan).

Tabel 8: Estimasi LC50 ekstrak Gulma *Kipahit*

	Waktu Pengamatan (Jam)	Estimasi Konsentrasi Ekstrak
LC ₅₀ (%)	24	61.8
	48	42.8
	72	38.1

Toksisitas dari insektisida alami berbeda pengaruhnya terhadap setiap jenis dan tahapan perkembangan serangga, sehingga tidak selalu berakibat langsung pada kematian. Berbeda dengan insektisida sintetis, pada umumnya efek bioinsektisida muncul bertahap [5].

8.4 ingkasan

Kutu kandang *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) merupakan salah satu serangga peternakan yang menimbulkan dampak cukup signifikan secara ekonomi bagi peternak. Selain berperan sebagai vektor penyebaran penyakit pada unggas, keberadaannya memicu penurunan konsumsi pakan dan produktivitas, bahkan menjadi penyebab kematian pada ayam.

Dalam pengendalian populasi kutu kandang, peternak umumnya masih menggunakan insektisida sintetis golongan piretroid dan organofosfat, misalnya cypermethrin, chlorpyrifos, dan citronellal. Permasalahannya, penggunaan insektisida sintetis yang bersentuhan langsung dengan bahan pangan tidak menjamin keamanan pangan dan membahayakan ternak dan pekerja. Insektisida sintetis merupakan bahan beracun yang tidak bisa diabaikan begitu saja. Penggunaan insektisida sintetis yang tidak

terkendali dalam beberapa dekade terakhir terbukti telah menyebabkan sejumlah masalah lingkungan jangka panjang [4]. Oleh karena itu mencari sumber insektisida alami yang ramah lingkungan dan aman masih sangat diperlukan.

Gulma merupakan tanaman liar yang mudah ditemukan. Sumber bioinsektisida asal tanaman sangat melimpah di alam, mudah terurai, menunjukkan berbagai mode aksi pengendalian, lebih murah dan memiliki toksisitas rendah terhadap manusia dan organisme non-target. Selain itu aplikasi bioinsektisida ke dalam program pengelolaan hama terpadu telah terbukti mengurangi penggunaan pestisida sintetis yang tidak perlu [9]. Gulma Kipahit (*Tithonia diversifolia*) merupakan salah satu tanaman anggota familia Asteraceae yang tergolong tanaman invasive, banyak ditemukan tumbuh liar di sela-sela tanaman budidaya. Beberapa hasil penelitian terdahulu menyebutkan bahwa daun Kipahit mengandung senyawa toksik, sehingga potensial dikembangkan sebagai pengendali serangga hama [1,22]. Namun demikian, efek insektisida yang dihasilkan akan bervariasi tergantung kondisi lingkungan dimana gulma tersebut tumbuh serta perbedaan genetik. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji kemungkinan ekstrak gulma Kipahit sebagai bioinsektisida serangga peternakan. Penelitian dirancang eksperimental laboratorik dalam tiga tahap. Pertama, menganalisis senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak melalui screening GC-MS, Kedua, menguji efek repelen ekstrak terhadap kutu kandang *A. diaperinus* menggunakan tabung *dual choice Y-Olfactometer*. Ketiga, menguji efek toksik ekstrak terhadap kutu *A. diaperinus* melalui pengujian mortalitas 3 x 24 jam.

Hasil analisis menunjukkan bahwa kandungan senyawa aktif ekstrak etanol gulma Kipahit terbanyak ditemukan adalah golongan fitosterol yaitu *Androst-5,7-dien-3-ol-17-one* dengan

persen area sebesar 21,64%, serta seskuiterpenoid β -copaene 18,66%. Selain itu ditemukan sedikitnya 11 macam senyawa seskuiterpenoid lain dengan persen area berkisar antara 0,63–5,65%. Hasil pengujian efek repelen ekstrak terhadap kutu kandang *A. diaperinus* menunjukkan adanya respon penolakan pada semua perlakuan konsentrasi. Semakin pekat konsentrasi ekstrak, penolakan oleh kutu kandang semakin tinggi. Berdasarkan hasil uji mortalitas, diketahui bahwa dalam waktu 24 jam, nilai LC₅₀ hanya terlihat pada perlakuan konsentrasi ekstrak 100%. Pada pengamatan 72 jam, LC₅₀ tercapai pada semua perlakuan. Dengan demikian, berdasarkan hasil analisis tiga parameter tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak gulma Kipahit berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai bioinsektisida serangga peternakan.

Daftar Pustaka

- [1] Agboola OO., Oyedele S., Olowoyo JO., Ajao A. & Aregbesola O. 2016. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil extracted from *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) flower. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 1(4), 169-176
- [2] Ajao AA., & Moteetee AN. 2017. *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray.(Asteraceae: Heliantheae), an invasive plant of significant ethnopharmacological importance: A review. *South African Journal of Botany*, 113, 396-403.
- [3] Al-Rubaye AF., Hameed IH. & Kadhim MJ. 2017. A review: uses of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) technique for analysis of bioactive natural compounds of some plants. *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 9(1), 81-85.
- [4] Arora NK, Tewari S, Singh S, Lal N, Maheshwari DK 2012. PGPR for protection of plant health under saline conditions. In: Maheshwari DK (ed) *Bacteria in agrobiolgy: stress management*. Springer, Berlin, pp 239–258

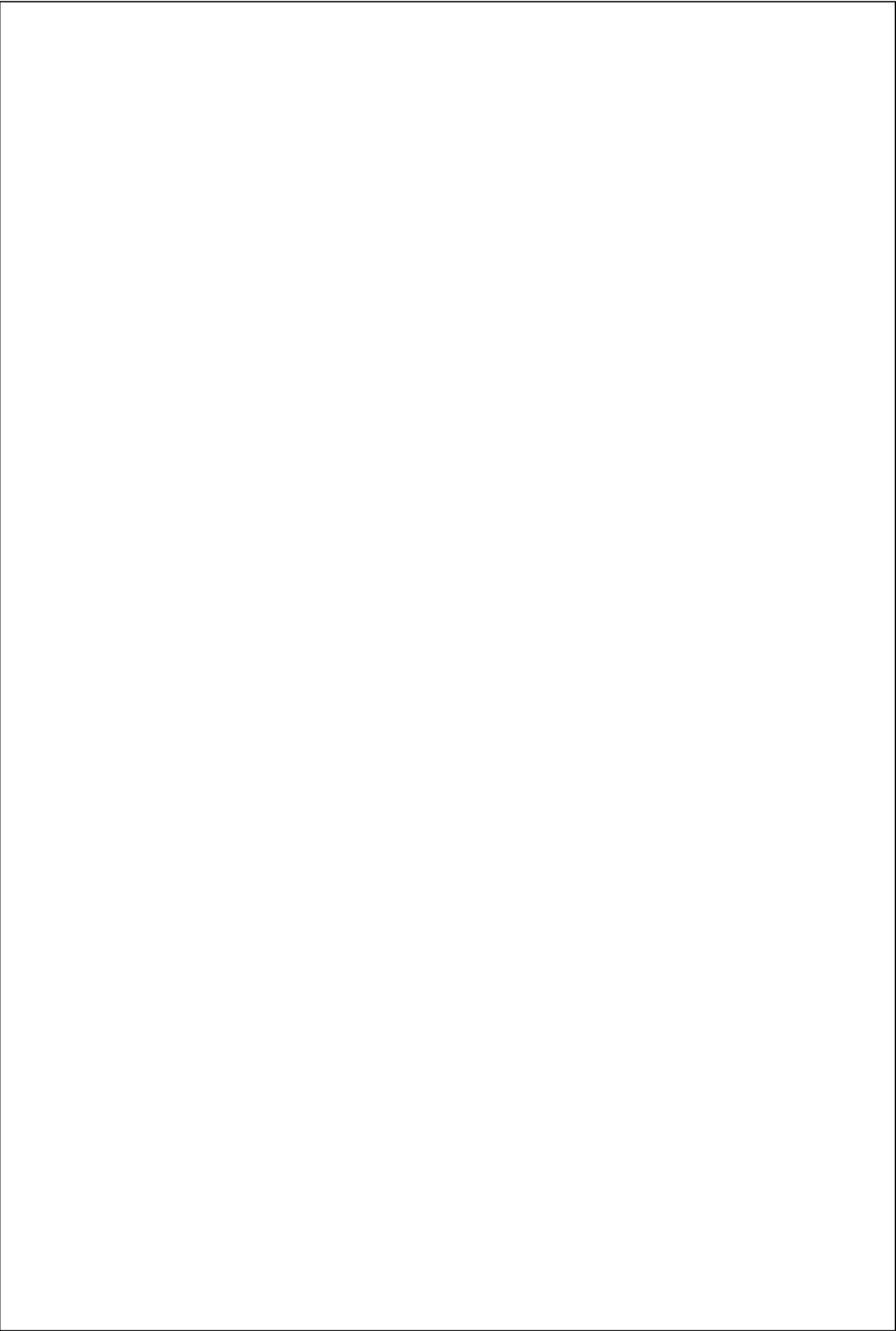
- [5] Ayun C., Kurniawati DM. & Zulmanarif MT. 2019. *Ageratum conyzoides*: Alternative pesticides for *Glycine max* (L.) pest (*Spodoptera Litura* F.) in Indonesia. In ASEAN/Asian Academic Society International Conference Proceeding Series (pp. 190-196).
- [6] Azwana A., Mardiana S., & Zannah RR. 2019. Efikasi Insektisida Nabati Ekstrak Bunga Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) Terhadap Hama Ulat Grayak (*Spodoptera litura* F.) pada Tanaman Sawi di Laboratorium. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan Industri Kesehatan)*, 5(2), 131-141.
- [7] Mkindi A., Mpumi N., Tembo Y., Stevenson PC., Ndakidemi^a PA., Mtei K., Machunda R., SR. 2017. Invasive weeds with pesticidal properties as potential new crops. *Industrial Crops and Products*, 110, 13-122.
- [8] Chukwuka, KS. & Ojo, OM. 2014. Extraction and characterization of essential oils from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. gray. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 1(4), 1-5.
- [9] Damalas CA. 2016. Safe food production with minimum and judicious use of pesticides. In *Food Safety* (pp. 43-55). Springer, Cham.
- [10] Del Valle EE, Frizzo LS, Malmierca M, Zbrun MV, Lax P. & Doucet ME. 2016. Biological control of *Alphitobius diaperinus* with *Steinernema rarum* CUL and *Heterorhabditis bacteriophora* SMC and feasibility of application in rice hull. *Journal of Pesticide Science* 89: 161–170.
- [11] Gazoni FL, Flores F, Bampi RA, Silveira F, Bouffleur R, Lovato M. 2012. Evaluation of the resistance of mealworm (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) at different temperatures. *Arquivos de Instituto Biologico* 79: 69–74.
- [12] Green PW., Belmain SR., Ndakidemi PA., Farrell IW. & Stevenson PC. 2017. Insecticidal activity of *Tithonia diversifolia* and *Vernonia amygdalina*. *Industrial Crops and Products*, 110, 15-21.

- [13] Hinkle, NC. & Corrigan, RM. 2020. External parasites and poultry pests. *Diseases of poultry*, 1135-1156.
- [14] Isman, MB. (2020). Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. *Phytochemistry reviews*, 19(2), 235-241.
- [15] Lengai, GM., & Muthomi, JW. 2018. Biopesticides and their role in sustainable agricultural production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 6(06), 7-41
- [16] Mishra, J., Tewari, S., Singh, S., & Arora, NK. 2015. Biopesticides: where we stand?. In *Plant microbes symbiosis: Applied facets* (pp. 37-75). Springer, New Delhi.
- [17] Miranda CASF., Carvalho MLM., Gomes MS., Santiago JA., Santiago WD. & Teixeira ML. 2015. Evaluation of the chemical composition and allelopathic potential of essential oils from three species of *Astereaceae* against seed germination and seedling vigor of lettuce *J. Adv. Pharm. Chem*, 11(6), 1-14
- [18] Ndolo D., Njuguna E., Adetunji CO., Harbor C., Rowe A., Den Breeyen A., Sangeetha J., Singh G., Szewczyk B., Anjorin TS., Thangadurai D. & Hospet R. 2019. Research and development of biopesticides: challenges and prospects. *Outlooks on Pest Management*, 30(6), 267-276.
- [19] Omolola TO. 2020. Phytochemical, Proximate and Elemental Composition of *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray leaves. *International Annals of Science*, 8(1), 54-61.
- [20] Oriyomi OV. 2018. Phytochemical biopesticides. *Phytochemistry*. edn.: Apple Academic Press, 303-324.
- [21] Plata-Rueda A., Campos JM., da Silva Rolim G., Martínez LC., Dos Santos MH., Fernandes, FL., Serrão JE., Zanuncio JC. 2018. Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 156, 263-270.
- [22] Pulido KDP., Rodríguez J., Isaza-Martínez JH., Gutiérrez-Cabrera M., Colmenares-Dulcey AJ. & Montoya-Lerma J.

2020. Insecticidal and Cholinesterase Activity of Dichloromethane Extracts of *Tithonia diversifolia* on *Atta cephalotes* Worker Ants (Formicidae: Myrmicinae). *Insects*, 11(3), 1-12.
- [23] Quintana KCO., Montoya-Lerma J. & Giraldo-Echeverri C. 2013. Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (Asteraceae) on *Atta Cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers. *Industrial Crops and Products* 44, 391–395.
- [24] Rodríguez J., Montoya-Lerma J. & Calle Z. 2015. Effect of *Tithonia diversifolia* mulch on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae) nests. *Journal of Insect Science*, 15(1).
- [25] Ramadhani MA., Hati AK., Lukitasari NF. & Jusman, AH. 2020. Skrining fitokimia dan penetapan kadar flavonoid total serta fenolik total ekstrak daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*, 3(1), 8-18
- [26] de Souza Silva GA., da Silva AR., de Oliveira EG. & Almeida-Bezerra JW. Ethnopharmacological Potential of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray. *Research, Society and Development*, 9(10), 1-24.
- [27] Stevenson, P.C., Isman, M.B. and Belmain, S.R. 2017. Pesticidal Plants in Africa: A Global Vision of New Biological Control Products from Local Uses. *Industrial Crops and Products*, 110, 2-9.
- [28] Tampubolon K., Sihombing FN., Purba Z., Samosir STS. & Karim, S. 2018. Potensi metabolit sekunder gulma sebagai pestisida nabati di Indonesia. *Kultivasi*, 17(3), 683-693.
- [29] Ventrella E., Marciniak P., Adamski Z., Rosinski G., Chowański S., Falabella P., Bufo S. A. 2015. Cardioactive properties of Solanaceae plant extracts and pure glycoalkaloids on *Zophobas atratus* Fab. *Insect Science*, 22(2), 251–262.
- [30] Widiyaningrum, P., Candrawati, D., Indriyanti, D. R., & Priyono, B. 2019. Repellent Activity of Waste Extract from Two Local Medicinal Plant Against Rice Weevil (*Sitophilus*

oryzae). Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education, 11(1), 62-67.

- [31] Widiyaningrum, P., & Candrawati, D. 2021. Insecticidal effect from waste extract of two local spices plant on the rice weevil. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1918, No. 5, p. 052002. IOP Publishing.
- [32] Wolf J., Potrich M., Lozano ER., Gouvea A. & Pegorini CS. 2015. Combined physical and chemical methods to control lesser mealworm beetles under laboratory conditions. *Poultry Science*, 94(6), 1145-1149.



#BAGIAN_TIGA

**POTENSI ANTIOKSIDAN
BAHAN ALAM**

Aktivitas Antioksidan *Fermented Black Garlic* Majemuk dan Tunggal

R. Susanti

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang
Gedung D6 Lantai 1, Kampus Sekaran. Jl. Taman Siswa Sekaran,
Gunungpati, Semarang 50229.

*E-mail: rsusantiunnes@gmail.com

9.1 Pendahuluan

Bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan tanaman pangan di Indonesia dengan jumlah produksi yang cukup tinggi. Data Badan Pusat Statistik (2021) [1] menunjukkan bahwa jumlah produksi bawang putih tahun 2017 sebesar 19.510 ton, kemudian meningkat menjadi 39.302 ton di tahun 2018 dan 88.816 ton di tahun 2019, namun sedikit menurun menjadi 81.805 pada tahun 2020. Ada lima varietas bawang putih yang dibudidayakan dan terdaftar di Kementerian Pertanian, yaitu Lumbu Hijau, Lumbu Kuning, Lumbu Putih, Tawangmangu baru dan Sangga Sembalun. Berdasarkan jumlah umbinya, ada bawang majemuk dan bawang tunggal.

Bawang putih banyak digunakan sebagai rempah untuk bumbu dapur, dan dilaporkan memiliki banyak manfaat bagi kesehatan [2]. Secara keseluruhan, bawang putih adalah sumber alami yang sangat baik dari senyawa yang mengandung sulfur bioaktif dan berpotensi diaplikasikan dalam pengembangan makanan fungsional atau *nutraceuticals*, serta pencegahan dan

pengelolaan penyakit tertentu. Bawang putih memiliki aktivitas antioksidan, antikolesterol, antidiabetes, antikanker dan antiinflamasi. Bawang putih yang dikenal memiliki beberapa manfaat kesehatan tersebut, dikarenakan mengandung senyawa organosulfur dan enzim bioaktif [3]. Senyawa sulfur dan prekursor-nya berperan utama sebagai antioksidan. Senyawa seperti allicin, dialil disulfida, dan dialil trisulfida merupakan senyawa utama antioksidan pada bawang putih [4]. Allicin yang memberikan karakteristik rasa dan flavor pada bawang, dihasilkan dari proses hidrolis dan oksidasi alliin [5]. Allicin dan thiosulfinat yang lain selanjutnya diuraikan menjadi beberapa komponen seperti dialil sulfida, dialil disulfida, dan dialil trisulfida. Sementara γ -glutamilsistein dirubah menjadi S-alil sistein melalui jalur katabolisme. S-alil sistein bermanfaat bagi kesehatan sebagai antidiabetes, antioksidan [6] dan aktivitas antiinflamasi [5].

Allium sativum segar berisi 63% air, 28% karbohidrat (fruktan), 2,3% senyawa organosulfur, 2% protein (alliinase), 1,2% asam amino bebas (arginin), dan 1,5% serat [7-8]. *Allium sativum* segar, tanpa pengolahan, mengandung γ -glutamylcysteine yang dapat terhidrolisis dan teroksidasi membentuk alliin [9]. Aliin merupakan senyawa precursor alkil-alkana sitotoksik dan tiosulfinat seperti allicin [10-11]. Allicin dan tiosulfinat lainnya terurai menjadi dialil sulfide (DAS), dialil disulfide (DADS, dan diallyltrisulfida (DATS), ditiins, dan ajoene [12]. Saat yang sama, γ -glutamylcysteine diubah menjadi S-allyl cysteine (SAC) yang berkontribusi pada aktivitas antidiabetes, antioksidan, dan anti-inflamasi [7, 13-14].

Aktivitas-aktivitas senyawa pada bawang putih dapat ditingkatkan melalui proses fermentasi menggunakan temperatur dan kelembaban tertentu sehingga dihasilkan bawang hitam atau *black garlic* [3]. Fermentasi, mampu meningkatkan senyawa bioaktif

dalam bawang hingga empat kali lipat [15]. Konsumsi *black garlic* secara signifikan menghambat pertumbuhan berbagai jenis kanker [16-17], dan meningkatkan antioksidan dan antiinflamasi [6,18]. Penelitian Kimura *et al.* [6] menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan *black garlic* lebih kuat dibandingkan bawang putih biasa (segar). Selain sebagai antioksidan, ekstrak bawang hitam juga dilaporkan peneliti sebelumnya memiliki aktivitas sebagai antialergi, antidiabetes, antiinflamasi, dan antikarsinogenik [19-23].

Tujuan penelitian ini adalah menganalisis pengaruh variasi lama waktu dan suhu fermentasi *black garlic* dari bawang majemuk dan bawang tunggal terhadap aktivitas antioksidan.

9.2 Metode Penelitian

Desain penelitian ini adalah *Qualitative method: Observasional explanatory design* untuk mengukur aktivitas antioksidan *fermented black garlic* dengan analisis DPPH.

Bawang putih yang difermentasikan ada 2 jenis yaitu bawang kating biasa (majemuk) dan bawang tunggal (lanang), sebagai kajian ilmiah perbedaan potensinya ditinjau dari komponen antioksidannya. Sebanyak 10 kg bawang segar tanpa kupas dicuci bersih dan difermentasi secara fisik/termal menggunakan oven kelembaban 90%, dengan 3 variasi suhu (75°C, 80°C dan 85°C), dan 5 variasi waktu (0, 4, 8, 12 dan 16 hari) hingga menjadi *black garlic* (Tabel 9).

Produk *fermented black garlic* dicincang dan dihaluskan dengan blender. Kemudian, ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi memakai pelarut air selama 4 jam. Semua ekstraksi dilakukan dalam rangkap tiga. Setelah ekstraksi dihentikan, sampel disaring melalui kain saring linen. Filtrat dari tiga ekstraksi digabungkan dan semua filtrat dipekatkan dalam rotari-evaporator dan dikering-bekukan. Sampel kering-beku disimpan dalam botol

kaca gelap tertutup pada -20 °C sampai dilakukan analisis aktivitas antioksidannya.

Tabel 9: Desain eksperimental fermentasi termal bawang

Suhu fermentasi (oC)	Lama waktu (hari)				
	0	4	8	12	16
75	BB	BB	BB	BB	BB
	BL	BL	BL	BL	BL
80	BB	BB	BB	BB	BB
	BL	BL	BL	BL	BL
85	BB	BB	BB	BB	BB
	BL	BL	BL	BL	BL

BB: bawang biasa; BL: bawang lanang

Analisis aktivitas antioksidan

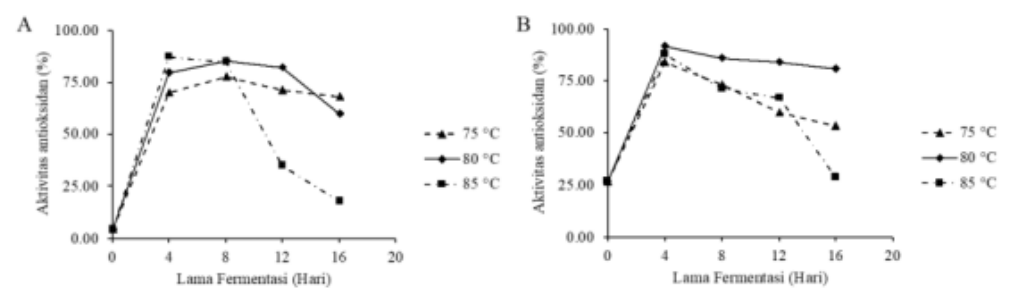
Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan *black garlic*. Setiap sampel ekstrak *black garlic* sejumlah 0,2 mL diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tube. Selanjutnya, ditambah 3,8 mL larutan DPPH 50 µM dan dikocok sampai homogen. Setelah homogen, diinkubasi selama 30 menit di tempat gelap. Absorbansi/serapan setiap sampel diukur dengan spektrofotometri UV–Vis pada jarak gelombang maksimum DPPH (517 nm). Besarnya inhibisi absorbansi radikal DPPH merupakan nilai dari aktivitas antioksidan sampel, yang dihitung dengan persentase hambatan absorbansi DPPH dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\textit{Absorban blanko}-\textit{Absorban sampel}}{\textit{absorban blanko}} \times 100\%$$

9.3 Hasil dan Pembahasan

Aktivitas antioksidan bawang lanang (tunggal) tanpa fermentasi sebesar 26,56%, jauh lebih tinggi dibanding bawang kating (majemuk) sebesar 4,23% (Gambar 24). Temuan ini

semakin menambah data bahwa bawang putih tunggal memiliki berbagai senyawa bioaktif yang lebih tinggi dibanding bawang putih biasa (majemuk). Dibanding varietas bawang putih biasa, bawang putih tunggal memiliki aktivitas antiinflamasi dan antimikroba yang lebih tinggi [24]. Zeng *et al.* [25] juga menyebutkan bahwa bawang tunggal memiliki kandungan senyawa fungsional lebih tinggi serta aroma lebih tajam dibanding bawang putih biasa. Varietas bawang putih tunggal sebenarnya merupakan varietas yang terjelma akibat ketidaksengajaan oleh lingkungan penanaman yang tidak cocok, sehingga terjadi pertumbuhan yang tidak sempurna (tidak berumbi lapis) [26]. Berdasarkan European Union Institutions [27], bawang putih siung tunggal (*solo garlic*) atau bawang putih lanang adalah bawang yang memiliki diameter sekitar 25-50 mM.



Gambar 24: Aktivitas antioksidan (%) berdasarkan lama fermentasi dan perlakuan suhu pada bawang putih majemuk (biasa) (A) dan bawang tunggal (lanang) (B).

Pada penelitian ini, proses fermentasi dalam sintesis bawang hitam dilakukan dengan variasi suhu dan lama waktu, namun tanpa penambahan zat aditif. Hal ini sesuai dengan penelitian Kang [3] bahwa fermentasi *black garlic* dilakukan tanpa penambahan zat aditif. Fermentasi bawang pada kelembaban dan suhu tinggi menyebabkan flavor, tekstur, dan warna yang berbeda [6]. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan bawang hitam mengalami peningkatan dibandingkan bawang putih segar, baik pada bawang majemuk dan tunggal. Hal ini sesuai dengan penelitian

sebelumnya bahwa ekstrak bawang hitam mengalami peningkatan aktivitas antioksidan dibandingkan bawang putih segar [20]. Penelitian Lee *et al.* [28] juga menunjukkan adanya penurunan angka radikal bebas yang lebih banyak pada bawang hitam dibandingkan bawang putih segar.

Aktivitas antioksidan *black garlic* bawang majemuk, meningkat tajam pada fermentasi 4 hari, 70,042%, 79,612% dan 87,101% berturut-turut pada suhu 75°C, 80°C dan 85°C. Namun pada fermentasi 8 hari suhu 75°C, 80°C, aktivitas antioksidan sedikit meningkat, kemudian menurun pada 12 hari dan 16 hari (Gambar 24A). Aktivitas antioksidan *black garlic* bawang lanang (tunggal), meningkat tajam pada fermentasi 4 hari suhu 75°C, 80°C dan 85°C, kemudian menurun pada 8,12 dan 16 hari (Gambar 24B).

Aktivitas antioksidan dari bawang antara lain diperankan oleh kandungan fenol, alkaloid dan flavonoid. Selama proses fermentasi, senyawa allicin dalam bawang putih diubah menjadi komponen antioksidan SAC (S-allyl cysteine), alkaloid dan flavonoid [19]. Pada fermentasi (*aging*) juga terjadi proses pemutusan ikatan glikosida dan ester menjadi bentuk yang lebih bebas, serta terjadi peningkatan kompleks polifenol selama reaksi browning [29]. Proses pemanasan dengan variasi waktu, suhu, dan psikokimia bahan berpengaruh besar terhadap nilai flavonoid [30]. Penelitian Choi *et al.* [31] menunjukkan bahwa hasil total fenol dan flavonoid bawang hitam mencapai optimum saat 21 hari *aging*, dan cenderung menurun setelah 21 hari *aging* (28 dan 35 hari *aging*).

Penelitian Jesika [32] menunjukkan nilai polifenol bawang hitam tunggal pada hari ke-21 *aging* (101,43 mg GAE/g) lebih tinggi dari pada bawang hitam biasa (58,33 ± 1,90 mg GAE/g). Aktivitas antioksidan pada bawang hitam dipengaruhi oleh nilai

total polifenol, total flavonoid, dan asam askorbat yang dihasilkan selama proses *aging* [3]. Namun dalam penelitian ini, asam askorbat (vitamin C) tidak terdeteksi lagi pada bawang hitam setelah *aging* 4 hari (data belum dipublikasikan).

Lama waktu *aging* sangat mempengaruhi aktivitas antioksidan, karena perubahan komponen kimia yang menentukan aktivitas antioksidan, terjadi saat proses *aging*. Pemanasan (*aging*) menyebabkan senyawa tidak stabil dalam bawang putih segar berubah menjadi senyawa larut yang stabil dengan aktivitas antioksidan yang tinggi [33]. Senyawa tidak stabil pada bawang, alliin, berubah menjadi bentuk stabil SAC, dan beraktivitas sebagai antioksidan [6]. Pemanasan juga menyebabkan terbebasnya komponen polifenol dan flavonoid yang terikat dengan komponen lain [34]. Pemanasan buah dan sayur, secara umum menyebabkan perubahan struktur selulosa sehingga meningkatkan jumlah dan jenis senyawa bioaktif [29].

Dalam penelitian ini, warna bawang semakin gelap dengan meningkatnya suhu dan lama fermentasi, baik pada bawang majemuk atau bawang tunggal. Fermentasi menyebabkan bawang berwarna coklat kegelapan cenderung hitam, bertekstur lembut dan elastis, serta memiliki rasa sedikit asam-manis [5]. Pemanasan menyebabkan reaksi pencoklatan enzimatis dan reaksi Maillard, sehingga terjadi perubahan warna bawang dan perubahan senyawa-senyawa yang tidak stabil menjadi lebih stabil [3]. Proses termal juga menyebabkan perubahan komponen kimia dalam bawang menjadi amadori atau komponen Heyns, sehingga berwarna coklat kegelapan.

Setelah mengalami fermentasi, bawang hitam tidak memiliki *off-flavor* seperti bawang segar. Reaksi non enzimatis yang terjadi saat fermentasi termal, mengubah senyawa gliko dan asam

amino dari bawang menjadi senyawa melanoidin dan senyawa-senyawa larut air seperti s-alil sistein (SAC) dan s-alil melkaptosistein (SAMC) serta menghilangkan seluruh senyawa volatil pada bawang. Peningkatan senyawa SAC dan SAMC inilah yang kemungkinan memiliki peran kunci sebagai antilipidemik dan aktivitas antioksidan [19].

Warna paling gelap didapati terjadi pada bawang yang melalui proses aging selama 16 hari. Reaksi Maillard yang terjadi, merupakan reaksi non enzimatik browning saat suhu 70°C, menghasilkan produk yang menyebabkan peningkatan warna merah, penurunan kecerahan serta penurunan warna kuning [31]. Reaksi Maillard terjadi dalam tiga tahapan perubahan warna. Tahap pertama, menghasilkan produk tidak berwarna dari endapan gula amin dan penataan ulang amadori. Tahap intermediate, menghasilkan produk yang tidak berwarna atau berwarna kuning karena penurunan kandungan asam amino, dehidrasi dan fragmentasi gula. Tahap akhir, dihasilkan produk yang sangat berwarna akibat pengendapan adolf, aldehyd-amin, dan pembentukan senyawa nitro heterosiklik.

Penelitian *in vivo* dan *in vitro* juga membuktikan bahwa ekstrak *black garlic* memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian Marie dan Wijayanti [35] menunjukkan bahwa pemberian ekstrak air *black garlic* pada *cell vero* berpotensi sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan *black garlic* berfungsi sebagai hepatoprotektor dengan menghambat pengaruh oksidan tert-Butil Hidroperoksida (t-BHP) terhadap inflamasi, nekrosis sel, lipid peroksidasi, dan stres oksidatif pada sel hati tikus [36]. Kandungan antioksidan dari bawang putih juga berkapasitas sebagai penghalang terpaan sinar ultraviolet dari cahaya matahari [37]. Penambahan bubuk *black garlic* 1% dapat

meningkatkan kualitas nugget daging bebek selama penyimpanan tanpa menurunkan kualitas sensoris nugget [38].

9.4 Ringkasan

Bawang putih memiliki aktivitas antioksidan, antikolesterol, antidiabetes, antikanker dan antiinflamasi. Aktivitas bawang putih dapat ditingkatkan melalui proses fermentasi menggunakan temperatur dan kelembaban tertentu sehingga dihasilkan bawang hitam atau *black garlic*. Penelitian ini berfokus apa analisis pengaruh variasi lama waktu dan suhu fermentasi black garlic dari bawang majemuk dan bawang tunggal terhadap aktivitas antioksidan. Sebanyak 10 kg bawang segar tanpa kupas dicuci bersih dan difermentasi secara fisik/termal menggunakan oven kelembaban 90%, dengan 3 variasi suhu (75°C, 80°C dan 85°C), dan 5 variasi waktu (0, 4, 8, 12 dan 16 hari) hingga menjadi *black garlic*. Aktivitas antioksidan diukur dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi lama waktu dan suhu fermentasi bawang majemuk dan bawang tunggal menghasilkan *black garlic* dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Aktivitas antioksidan bawang lanang (tunggal) tanpa fermentasi sebesar 26,56%, jauh lebih tinggi dibanding bawang kating (majemuk) sebesar 4,23%. Aktivitas antioksidan black garlic bawang majemuk, meningkat tajam pada fermentasi 4 hari, baik pada suhu 75°C, 80°C dan 85°C. Pada fermentasi 8 hari suhu 75°C, 80°C, aktivitas antioksidan sedikit meningkat, kemudian menurun pada 12 hari dan 16 hari. Aktivitas antioksidan black garlic bawang lanang (tunggal), meningkat tajam pada fermentasi 4 hari suhu 75°C, 80°C dan 85°C, kemudian menurun pada 8,12 dan 16 hari.

\

Daftar Pustaka

- [1] Badan Pusat Statistik. (BPS). (2021). Tabel produksi tanaman sayuran bawang putih tahun 2013-2017. Retrieved October 14, 2021, from <https://www.bps.go.id/site/resultTab>
- [2] Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1), 1-14.
- [3] Kang, O.-J. (2016). Physicochemical characteristics of black garlic after different thermal processing steps. *Preventive Nutrition and Food Science*, 21(4), 348-354.
- [4] Kumari, M., & Ranjan, N. (2014). *In vitro* antioxidant activity of extract of bulb of *Allium sativum* linn. using DPPH and Frap assays with evaluation of total phenolic content. *International Journal of Bioassays*, 3(2), 1752-1755.
- [5] Qiu, Z., Li, N., Lu, X., Zheng, Z., Zhang, M., & Qiao, X. (2017). Characterization of microbial community structure and metabolic potential using Illumina MiSeq platform during the black garlic processing. *Food Research International*, 106, 428-438.
- [6] Kimura, S., Tung, Y., Pan, M., & Su, N. (2016). Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 62-70.
- [7] Xiong, F., Dai, C. H., Hou, F. R., Zhu, P. P., He, R. H., & Ma, H.L. (2018). Study on the ageing method and antioxidant activity of black garlic residues. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(1), 88-97.
- [8] Tran, G-B., Pham, T-V., & Trinh, N-N. (2020). *Black garlic and its therapeutic benefits*. Chapter in: Medicinal Plants - Use in Prevention and Treatment of Diseases, IntechOpen, 1-13.
- [9] Wilson, B., & Whelan, K. (2017). Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 64-68.
- [10] Zhang, X., Shi, Y., Wang, L., Li, X., Zhang, S., Wang, X., Jin, M., Hsiao, C.D., Lin, H., Han, L., & Liu, K. (2019).

- Metabolomics for biomarker discovery in fermented black garlic and potential bioprotective responses against cardiovascular diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(44), 12191-12198.
- [11] Schoonenboom, J., & Johnson, R. B. (2017). Wie man ein mixed methods-forschungs-design konstruiert. *Kolner Zeitschrift für Soziologie und Sozialpsychologie*, 69, 107-131.
- [12] Mussatto, S.I., Aguilar, C.N., Rodrigues, L.R., & Teixeira, J.A. (2009b). Fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59, 76-81.
- [13] Dennis, K. L., Wang, Y., Blatner, N. R., Wang, S., Saadalla, A., Trudeau, E., Roers, A., Weaver, C. T., Lee, J. J. & Gilbert, J. A. (2013). Adenomatous polyps are driven by microbe-instigated focal inflammation and are controlled by IL-10-producing T cells. *Cancer Research*, 73(19), 5905-5913.
- [14] Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R. & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, 12(9), 635-645.
- [15] Lu, X., Li, N., Qiao, X., Qiu, Z., & Liu, P. (2018). Effects of thermal treatment on polysaccharide degradation during black garlic processing. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 95(61), 223-229.
- [16] Zhang, Y., Liu, X., Ruan, J., Zhuang, X., Zhang, X., & Li, Z. (2020). Phytochemicals of garlic: Promising candidates for cancer therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 123, 109730.
- [17] Permatasari, E., Farida & Widiyanto, S. (2020). Cytotoxic of ethanol extract & n-hexane fraction of solo black garlic (*Allium sativum* L.) to breast cancer cell line T47D. *6th International Conf. Biol. Sci. ICBS 2019 "Biodiversity as a Cornerstone for Embracing Future Humanity"*. 2260, September p. 040001.
- [18] Lu, X., Li, N., Qiao, X., Qiu, Z., & Liu, P. (2017).

- Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 340-349.
- [19] Ha, A. W., Ying, T., & Kim, W. K. (2015). The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*, 9(1), 30-6.
- [20] Jeong, Y., Ryu, J., Shin, J.-H., Kang, M., Kang, J., Han, J., & Kang, D. (2016). Comparison of antioxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules*, 21(4), 430.
- [21] Kim, M.J., Yoo, Y.C., Kim, H.J., Shin, S.K., Sohn, E.J., Min, A.Y., Sung, N.Y., & Kim, M.R. (2014). Aged black garlic exerts anti-inflammatory effects by decreasing pro and proinflammatory cytokine production with less cytotoxicity in LPS-stimulated raw 264.7 macrophages and LPS-induced septicemia mice. *Journal of Medicinal Food*, 17(10), 1057-1063
- [22] Park, C., Park, S., Chung, Y. H., Kim, G.-Y., Choi, Y. W., Kim, B. W., & Choi, Y. H. (2014). Induction of apoptosis by a hexane extract of aged black garlic in the human leukemic U937 cells. *Nutrition Research and Practice*, 8(2), 132-137.
- [23] Yoo, J.-M., Sok, D.-E., & Kim, M. R. (2014). Anti-allergic action of aged black garlic extract in RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. *Journal of Medicinal Food*, 17(1), 92-102
- [24] Utami, Y. W., Murniati, A., & Sumarno, S. (2016). Efek perawatan luka terkontaminasi dengan ekstrak bawang putih lanang dalam mempercepat penurunan eritema. *YARSI Medical Journal*, 17(1), 021-030.
- [25] Zeng, Y.-W., Yang, J.-Z., Pu, X.-Y., Du, J., Yang, T., Yang, S.-M., & Zhu, W.-H. (2013). Strategies of functional food for cancer prevention in human beings. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 14(3), 1585-1592
- [26] Pratimi, A. Potensi Bakteriostatik Bawang Putih Umbi Tunggul Terhadap Bakteri Gram Positif. Prosiding Simposium Nasional Peluang dan Tantangan Obat Tradisional dalam Pelayanan Kesehatan Formal, 40-42. Retrieved from

- [http://ikafi-yogya.org/foto_berita/File/Pratimi. 40-42..pdf](http://ikafi-yogya.org/foto_berita/File/Pratimi.40-42..pdf) (15 Oktober 2021)
- [27] European Union Institutions. (2013). Official Journal of the European Union: Information and Notices. Retrieved from <https://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2010:201:FULL:EN:PD F>
- [28] Lee, H. S., Lim, W. C., Lee, S. J., Lee, S. H., Yu, H. J., Lee, J. H., & Cho, H. Y. (2016). Hepatoprotective effects of lactic acid-fermented garlic extract against acetaminophen-induced acute liver injury in rats. *Food Science and Biotechnology*, 25(3): 867-873
- [29] Kim, J. S., Kang, O. J., & Gweon, O. C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 80-86
- [30] Ioannou, I., Hafsa, I., Hamdi, S., Charbonnel, C., & Ghoul, M. (2012). Review of the effects of food processing and formulation on flavonol and anthocyanin behaviour. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 208-217
- [31] Choi, I. S., Cha, H. S., & Lee, Y. S. (2014). Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*, 19(10), 16811-16823
- [32] Jesica C. (2018). Efek fermentasi menggunakan bakteri asam laktat pada proses aging bawang putih tunggal (*Allium sativum* L.) terhadap profil aktivitas antioksidan bawang putih tunggal hitam. *Skripsi*. Universitas Surya, Tangerang
- [33] Mardawati, E., Fitriani, E.N., Sundari, D.A., Eko Fuji Ariyanto, E.F. (2021). Evaluation of physicochemical, antioxidant properties, and antioxidant activity of black garlic produced on different heating duration. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 12(03), 885-892
- [34] Choi, Y., Lee, S. M., Chun, J., Lee, H. B., & Lee, J. (2006). Influence of heat treatment on the antioxidant activities and polyphenolic compounds of Shiitake (*Lentinus edodes*) mushroom. *Food Chemistry*, 99(2), 381-387

- [35] Marie, A.M.A. & Wijayanti, N. (2020). The antioxidant properties of black garlic aqueous extract in vero cell line. *Proceedings of the International Conference of Science and Engineering*, 3, 85-89
- [36] Astari, I.P.D.S., & Hanriko, R. (2020). Black garlic (*Allium sativum*) sebagai terapi adjuvan potensial pada kerusakan hepar yang diinduksi minyak jelantah. *Majority*, 9(1), 1-6
- [37] Dampati, P.S., & Veronica, E. (2020). Potensi ekstrak bawang hitam sebagai tabir surya terhadap paparan sinar ultraviolet. *KELUWIH: Jurnal Kesehatan dan Kedokteran*, 2(1), 23-31.
- [38] Lishianawati, T. U., Yusiati, L.M., & Jamhari. (2021). Antioxidant effects of black garlic powder on spent duck meat nugget quality during storage. *Food Science and Technology*, Ahead of Print

Potensi Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Antioksidan Pada Tikus Hiperglikemia

Wulan Christijanti^{1*}, Aditya Marianti¹, R. Susanti¹,
Senda Kartika², Yudi Priyanto¹, Desy Amelia¹, Sabila Yasaroh¹

¹ Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Semarang

² Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan
Alam Universitas Negeri Semarang

*e-mail: wulan.christijanti@mail.unnes.ac.id

10.1 Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) mengacu pada gangguan/kelainan metabolisme yang ditandai dengan glikemia berlebihan, glikosuria, serta hiperlipemia yang disebabkan oleh insufisiensi lengkap atau relatif dari sekresi insulin dan/atau kerja insulin [1]. Diabetes melitus dikelompokkan menjadi tergantung insulin (tipe-I) dan tidak tergantung insulin (tipe-II). Tipe-I mengacu pada hasil gangguan autoimun ketika sel β pankreas sebagai penghasil insulin mengalami kerusakan dan mengakibatkan pengurangan produksi insulin yang menyebabkan hiperglikemia. Tipe II terjadi resistensi adalah bentuk penyakit yang lebih sering terjadi di mana 90% pasien menderita bentuk ini yang mengarah ke hiperglikemia [2].

Hiperglikemia bekerja melalui mekanisme yang berbeda seperti aktivasi protein kinase C, jalur poliol dan heksosamin, produksi produk akhir glikasi berkaitan dengan disfungsi mitokondria dan stres retikulum endoplasma, mendorong

akumulasi spesies oksigen reaktif (ROS) [3,4]. Spesies oksigen reaktif dapat secara langsung merusak lipid, protein atau DNA dan memodulasi jalur pensinyalan intraseluler yang menyebabkan perubahan ekspresi protein [5]. Hiperglikemia dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan menginduksi stres oksidatif karena ketidakseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan. Hal tersebut dapat dinilai dengan pengukuran produk reaksi kerusakan oksidatif, seperti peroksidasi lipid (malondialdehid), oksidasi DNA (8-hydroxydeoxyguanine/8-OHdG) dan oksidasi protein [6].

Antioksidan tersedia secara endogen sebagai mekanisme pertahanan sel atau dapat diperoleh secara eksogen dari diet. Contohnya termasuk antioksidan enzimatik seperti superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione tereduksi (GSH), dan antioksidan nonenzimatik seperti asam urat, karotenoid, flavonoid, dan vitamin A, C, dan E. SOD mendismutasi anion superoksida untuk membentuk hidrogen peroksida yang ditindaklanjuti oleh CAT dan GPx untuk menghasilkan air. Vitamin C dan E terlibat dalam penghambat proses peroksidasi lipid serta flavonoid untuk memulung radikal bebas [7].

Tanaman semakin banyak diperhatikan sebagai pengganti yang cocok untuk obat-obatan kimia karena aksesibilitas yang mudah, efek samping yang lebih sedikit, toksisitas rendah, efektivitas biaya dan efek yang dilaporkan bermanfaat. Beberapa tanaman tropis/subtropis banyak digunakan untuk mencegah dan mengobati pasien DM dan penyakit terkaitnya komplikasi dengan efek samping yang relatif terbatas dibandingkan dengan obat-obatan kimia [8]. Beberapa penyelidikan epidemiologis telah menunjukkan bahwa diet kaya makanan dengan kandungan fitokimia dan kapasitas antioksidan tinggi terkait dengan penurunan risiko

diabetes. Polifenol tanaman dan produk yang kaya polifenol memodulasi metabolisme karbohidrat dan lipid, melemahkan hiperglikemia, dislipidemia dan resistensi insulin [9].

Salah satu tanaman yang dimanfaatkan adalah *Moringa oleifera* dengan berbagai macam manfaat nutrisi dan obat yang ditunjukkan dalam daun, biji, bunga, akar, dan kulit kayu [10]. Fitokimia alami pada *M. oleifera* berkontribusi pada banyak kegiatan farmakologi, seperti antioksidan, hepatoprotektif, hipolipidemia, hipoglikemia, antidiabetik, aktivitas anti-inflamasi [11,12]. Dilaporkan bahwa *M. oleifera* mengandung banyak fitokonstituen seperti flavonoid, alkaloid, saponin, sakarida, glukosinolat, tanin, asam fenolik, glikosida nitril [13] karotenoid, tokoferol, asam fenolik, folat, asam lemak tak jenuh ganda dan berbagai mineral [14]

Penelitian diabetes banyak pada hewan tergantung pada sifat riset, baik untuk jenis hewan dan teknik untuk keperluan tersebut, seperti induksi diet/nutrisi, secara kimia (aloksan, streptozotocin) dan pembedahan hewan. Faktor yang mempengaruhi penelitian diabetes antara lain jenis diabetes, durasi penelitian, biaya induksi, keterampilan/pengalaman peneliti [1]. Diabetes tipe-1 yang diinduksi secara kimiawi adalah model hewan diabetes yang paling umum digunakan. Agen kimia yang menyebabkan diabetes dapat diklasifikasikan menjadi 3 kategori: secara spesifik merusak sel ; menyebabkan penghambatan sementara produksi / sekresi insulin dan mengurangi aktivitas metabolisme insulin di jaringan target. Secara umum, aloksan merupakan agen kimia yang dapat membuat lesi yang mirip dengan diabetes melitus tergantung insulin [15].

Berdasar latar belakang tersebut maka dilakukan penelitian dengan tujuan menganalisis potensi antioksidan ekstrak daun kelor pada tikus diabetes. Data yang menjadi biomarker antioksidan

meliputi kadar *Superoxide Dismutase* (SOD), katalase dan Malondialdehid (MDA).

10.2 Metode

Penelitian merupakan eksperimen dengan *the randomized posttest only control group design*. Pemeliharaan dan perlakuan hewan dilakukan di kandang percobaan laboratorium Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Semarang, parameter kadar antioksidan diukur di laboratorium Pangan dan Gizi, Pusat Studi Pangan dan Gizi Pusat Antar Universitas (PAU) UGM Yogyakarta. Sampel penelitian berupa tikus Wistar jantan berumur 2 bulan dengan berat 150-200 gram sebanyak 20 ekor yang terbagi menjadi 4 kelompok. Tikus dipelihara dalam ruangan tertutup dengan ventilasi dan pencahayaan yang memadai, suhu ruangan berkisar 27–32°C dengan siklus 12 jam terang: 12 jam gelap dengan pakan dan minum *ad libitum*. Penelitian menggunakan hewan coba mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Ilmu Keolahragaan Universitas Negeri Semarang No. 276/KEPK/EC/2021.

Tabel 10: Pembagian Kelompok Kontrol dan Perlakuan Ekstrak Daun Kelor

No	Kelompok	Aloksan 125 mg	Ekstrak Kelor 200 mg	Ekstrak Kelor 400 mg	Ekstrak Kelor 600 mg
1	K	+	-	-	-
2	T1	+	+	-	-
3	T2	+	-	+	-
4	T3	+	-	-	+

Sebelum diberi perlakuan, tikus diaklimasi selama 7 hari. Hari-1 setelah aklimasi dilakukan pengukuran kadar glukosa dengan glukometer. Tikus dengan glukosa < 100 mg/dl selanjutnya diinduksi dengan aloksan 125 mg/kg berat badan secara

interaperitoneal. Kriteria tikus diabetes dengan kadar glukosa > 200 mg/dl dengan dalam waktu tiga hari setelah induksi.

Proses ekstraksi daun kelor dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak dibuat dengan maserasi daun kelor segar pada suhu 30-35 °C kemudian dihancurkan menggunakan blender untuk didapatkan serbuk. Serbuk daun kelor sebanyak 100 g ditambah pelarut etanol 96% sampai sebanyak 1 L. Campuran ditempatkan dalam wadah kaca dan ditutup kemudian dibiarkan selama 48 jam dalam suhu ruang. Campuran itu disaring sehingga didapat maserat. Ampas dimaserasi dengan etanol 96% menggunakan prosedur yang sama. Hasil ekstrak cair diuapkan dengan rotary evaporator. Ekstrak kelor diberikan pada kelompok perlakuan dengan dosis 0 mg (K), 200 mg (T1), 400 mg (T2) dan 600 mg/kg berat badan (T3) secara peroral selama 21 hari. Selama perlakuan dilakukan pengukuran kadar glukosa untuk memantau penurunannya.

Darah diambil dari plexus retroorbitalis dan disentrifugasi supaya serum dapat dianalisis untuk parameter kadar antioksidan. *Superoxide Dismutase* salah satu enzim antioksidan yang paling penting diukur dengan SOD Activity Assay Kit (BioVision Catalog #K335-100), katalase merupakan enzim antioksidan yang berfungsi untuk mengkatalisis penguraian hidrogen peroksida (H₂O₂) menjadi air dan oksigen menggunakan Catalase Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision Catalog #K773-100). Malondialdehid (MDA) sebagai salah satu indikator peroksidasi lipid diukur dengan *Lipid Peroxidation* (MDA) Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision Catalog # K739-100).

Data berupa kadar SOD, katalase dan MDA diuji statistik dengan Anova satu arah. Hasil yang diperoleh berbeda bermakna

yang dilanjutkan dengan uji post hoc LSD (*Least Significant Different*) dengan $p \leq 0,05$.

10.3 Hasil dan Pembahasan

10.3.1 Hasil Penelitian

Variabel yang diamati disajikan pada tabel dibawah ini. Hasil Anova satu arah kadar SOD, katalase dan MDA pada Tabel 11

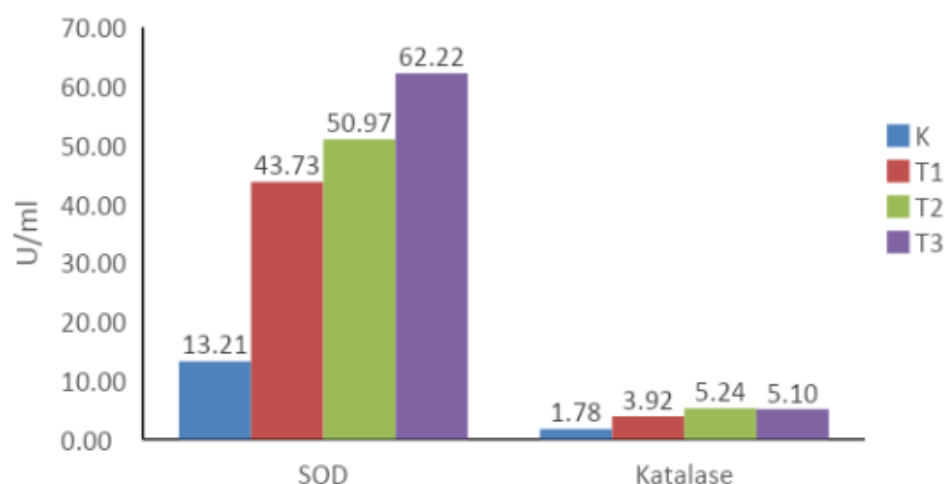
Tabel 11: Uji Statistik Terhadap Variabel Yang diamati

No	Variabel	Normalitas	Homogenesitas	Anova
1	SOD	0.507	0.099	0.000
2	Katalase	0.450	0.480	0.000
3	MDA	0.787	0.157	0.000

Uji pendahuluan menunjukkan bahwa data seragam dan terdistribusi normal serta terdapat pengaruh ekstrak daun kelor terhadap variabel yang diamati, seperti kadar SKD, katalase dan MDA. Uji lanjut dengan LSD seperti pada Tabel 11, menunjukkan bahwa kelompok K berbeda secara nyata dengan kelompok perlakuan dengan ekstrak daun kelor pada semua variabel. Sementara itu untuk kadar SOD terdapat beda nyata antara T1 dan T2 dengan T3, katalase pada T1 berbeda nyata dengan T2 dan T3. Kadar MDA antar kelompok perlakuan terdapat beda nyata.

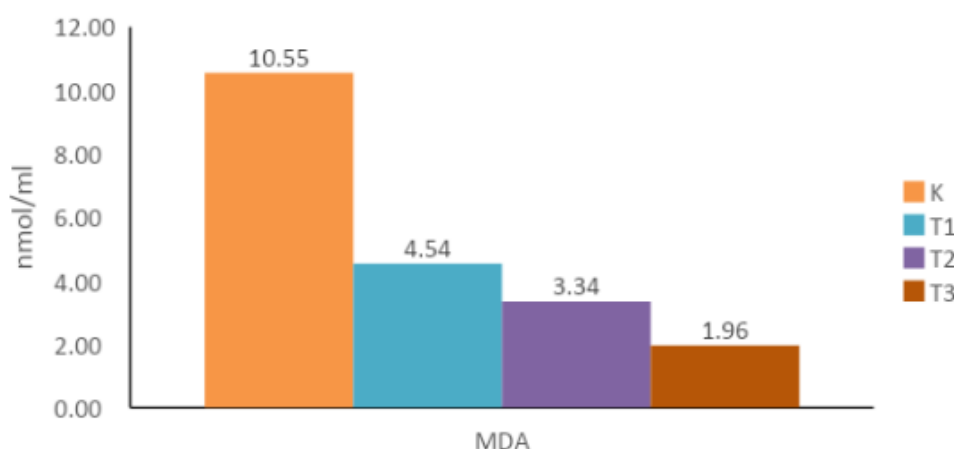
Tabel 12: Rerata (Mean ± SD) Kadar SOD, Katalase dan MDA

No	Kelompok	SOD (U/ml)	Katalase (U / ml)	MDA (nmol/ml)
1	K	13.21 ± 3.48bcd	1.77 ± 0.07bcd	10.55 ± 0.45a
2	T1	43.73 ± 7.89d	3.92 ± 0.20acd	4.54 ± 0.43b
3	T2	50.97 ± 8.90d	5.24 ± 0.80ab	3.34 ± 0.21c
4	T3	62.22 ± 3.84abc	5.10 ± 0.08ab	1.96 ± 0.14d



Gambar 25: Rerata kadar SOD dan Katalase kelompok Kontrol dan Perlakuan.

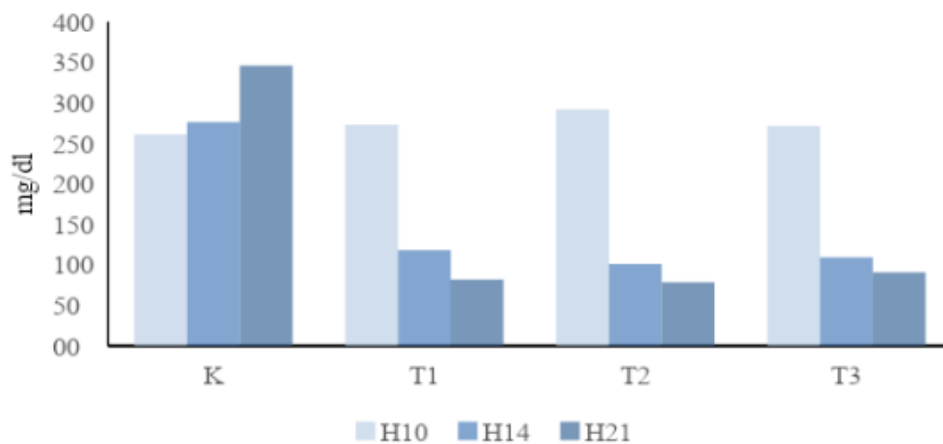
Grafik rerata menunjukkan bahwa terdapat kecenderungan kadar SOD dan katalase dari kelompok kontrol mengalami peningkatan dengan bertambahnya dosis ekstrak kelor. Sementara itu kadar MDA kelompok Kontrol paling tinggi dan mengalami penurunan dengan bertambahnya dosis ekstrak kelor (Gambar 26).



Gambar 26: Rerata kadar MDA kelompok Kontrol dan Perlakuan.

Pemantauan kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-3 setelah induksi aloksan (H3), 14 hari (H14) dan 21 hari (H21) setelah perlakuan. Gambar 27. menunjukkan bahwa kadar glukosa darah mengalami penurunan sejalan dengan lama waktu pemberian

ekstrak daun kelor pada kelompok T1, T2 maupun T3, sementara untuk kelompok kontrol tetap lebih dari 200 mg/dl.



Gambar 27

10.3.2. Pembahasan

Hiperglikemia mampu meningkatkan radikal bebas yang kemudian berkembang menjadi stres oksidatif yang berperan perkembangan komplikasi diabetes kronis. Peningkatan radikal oksidan lipid hidroperoksida seperti produksi MDA terkait dengan pengurangan terus-menerus dalam aktivitas enzim antioksidan SOD dan CAT. Penurunan aktivitas SOD selama perkembangan progresif diabetes bisa disebabkan oleh glikosilasi enzim yang terjadi pada keadaan diabetes. Menurunnya aktivitas SOD bisa juga karena akumulasi H_2O_2 di jaringan yang terkena [16]. Stres oksidatif berperan penting dalam mekanisme regulasi seluler, proliferasi, migrasi dan pensinyalan matriks ekstraseluler yang dapat mampu mengubah struktur dan permeabilitas membran sel dan organela sel, mempengaruhi pertukaran ion, proses oksidatif dan sintesis [17]. Pembentukan spesies oksigen reaktif juga dapat menyerang lisosom dan DNA sehingga sel lebih rentan terhadap kerusakan yang dapat menyebabkan kematian sel [18].

Banyak peneliti menyatakan bahwa fenol dan flavanoid merupakan komponen penting dalam tanaman untuk aktivitas antioksidan. Zat bioaktif fenolik dalam daun kelor penting dengan efek sebagai antioksidan [19]. Semakin lama pemberian ekstrak daun kelor pada kelompok perlakuan meningkatkan kadar SOD dan katalase yang mungkin karena penurunan produksi oksigen reaktif spesies. Antioksidan yang terdapat pada *Moringa oliefera* seperti vitamin C dan flavonoid, memiliki aktivitas kuat sebagai *scavenger* oksidan untuk dapat menghambat pembentukan radikal bebas dan meningkatkan aktivitas SOD, GSH dan katalase sehingga menurunkan stres oksidatif pada sel [20].

Kadar glukosa darah kelompok yang mendapatkan ekstrak daun kelor secara bertahap menurun selaras dengan waktu. Komponen bioaktif daun kelor melakukan aktivitas penurunan tersebut dengan cara: pertama, beberapa mono-glukosida dari quercetin dan kaempferol dalam ekstrak kelor memiliki kemampuan mengikat yang kuat terhadap α -amilase dan α -glukosidase. Potensi glukosida adalah menghambat aktivitas enzimatik α -glukosidase untuk melepaskan α -glukosa di usus halus [21]. Kedua, flavonoid, quercetin dan kaempferol, dan asam fenolik, asam klorogenat dapat bertindak sebagai inhibitor kompetitif *sodium-glucose linked transporter 1* (SGLT1) di mukosa usus halus sehingga mengurangi penyerapan glukosa dari usus [22]. Ketiga, daun kelor mengandung serat makanan dalam kisaran 20- 28% yang dapat mengurangi penyerapan glukosa dari usus. Selain itu daun kelor juga meningkatkan ekspresi reseptor insulin dan reseptor insulin substrat di hati dan transporter glukosa 4 di hati dan otot untuk sensitivitas insulin dan pengambilan glukosa ke dalam sel [8].

Dalam penelitian ini, terdapat peningkatan yang signifikan kadar MDA sebagai biomarker stres oksidatif dalam serum tikus

kelompok kontrol. Malondialdehid merupakan komponen yang mampu menimbulkan kerusakan pada sel tubuh. Pada tikus yang mendapat ekstrak daun kelor menunjukkan ada penurunan kadar MDA dengan cara meningkatkan status antioksidan, aktivitas enzim antioksidan. Aktivitas ini dapat dikaitkan dengan senyawa fenolik yang tinggi sebagai antioksidan kuat yang memiliki kemampuan menangkap radikal aktif yang cukup besar dan mengenapi oksigen tunggal, serta mengaktifkan enzim antioksidan dan kolesterol yang tinggi pada kondisi hiperglikemia memberi peluang yang besar sebagai target untuk aksi radikal bebas [23]. Peroksidasi lipid adalah proses yang paling banyak diselidiki dalam mekanisme pertahanan antioksidan. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak daun kelor mampu menurunkan kadar kolesterol dan lipid [8].

Berdasarkan data hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kelor mempunyai potensi untuk menurunkan stres oksidatif dengan meningkatkan kadar antioksidan enzim seperti SOD dan katalase dan mengurangi kadar MDA.

10.4 Ringkasan

Diabetes melitus (DM) mengacu pada gangguan/kelainan metabolisme yang ditandai dengan glikemia berlebihan. Hiperglikemia dapat meningkatkan produksi radikal bebas dan menginduksi stres oksidatif karena ketidakseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan antioksidan. Hal tersebut dapat dinilai dengan pengukuran produk reaksi kerusakan oksidatif, seperti peroksidasi lipid (malondialdehid), oksidasi DNA ((8-hydroxydeoxyguanine/8-OHdG) dan oksidasi protein. Tanaman semakin banyak diperhatikan sebagai pengganti yang cocok untuk obat-obatan kimia karena aksesibilitas yang mudah, efek samping yang lebih sedikit, toksisitas rendah. Tujuan penelitian ini adalah menganalisis potensi ekstrak daun kelor sebagai antioksidan untuk

mengurangi peroksidasi lipid pada tikus hiperglikemia. Penelitian eksperimental dengan tikus Wistar jantan dewasa yang diinduksi aloksan 125 mg/kg berat badan interaperitoneal. Dua puluh ekor tikus hiperglikemia dengan kadar glukosa >120 mg/dl dibagi menjadi empat kelompok. Pemberian ekstrak daun kelor selama 21 hari dengan dosis 0 mg (K), 200 mg (T1), 400 mg (T2) dan 600 mg/kg (T3). Data yang dikumpulkan meliputi kadar SOD dan katalase (U/ml) dan MDA (nmol/ml) untuk selanjutnya dianalisis dengan Anava dan uji *Least Significance Different* (LSD) taraf uji $P < 0.05$. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok K berbeda secara nyata ($p < 0.05$) dengan kelompok perlakuan ekstrak daun kelor pada semua variabel. Kadar SOD terdapat beda nyata antara T1 dan T2 dengan T3, katalase pada T1 berbeda nyata dengan T2 dan T3. Kadar MDA antar kelompok perlakuan terdapat beda nyata. Simpulan yang diambil adalah bahwa ekstrak dauk kelor mampu meningkatkan kadar SOD dan katalase serta menurunkan MDA.

Daftar Pustaka

- [1] Jato JA, Bawa I, Onyezili FN. 2018. Diabetes Induction with Streptozotocin and Insulin Action on Blood Glucose Levels in Albino Rats. *International Journal of Modern Science and Technology*. 3(10): 208-212.
- [2] Fazlani TA, Mujeeb-ur-Rehman M, Baloch JA, Soomro SA, Soomro J, Kasi AK. 2020. Effect of *Aloe vera* and metformin on diabetic albino rats. *Pure Appl. Biol.*, 9(3): 2122-2127
- [3] Oguntibeju OO. 2019. Review Article Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 11(3):45-63
- [4] Tiwari BK, Pandey KB, Abidi AB, and Syed Ibrahim Rizvi. 2013. Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus. *Journal of Biomarkers*. 1-10

- [5] Fiorentino TV, Prioretta A, Zuo P, Folli F. 2013. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm.* 19(32):5695-703
- [6] Bikkad MD, Somwanshi SD, Ghuge SH, Nagane NS.2014. Oxidative Stress in Type II Diabetes Mellitus. *Biomedical Research.* 25 (1): 84-87
- [7] Oyenih AB, Ayeleso AO, Mukwevho E, and Bubuya Masola. 2015 Antioxidant Strategies in the Management of Diabetic Neuropathy. *BioMed Research International.* Article ID 515042: 1-15
- [8] Watanabe S, Okoshi H, Yamabe S, Shimada M. 2021. Moringa oleifera Lam. in Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Molecules.* 26: 3513
- [9] Fombang EN & Saa RW. 2016. Antihyperglycemic Activity of Moringa oleifera Lam Leaf Functional Tea in Rat Models and Human Subjects. *Food and Nutrition Sciences.* 7 (11): 1021-1032
- [10] Paikra BK, Dhongade HKJ, Gidwani B. 2017. Phytochemistry and Pharmacology of Moringa oleifera Lam. *Journal of Pharmacopuncture.* 20(3):194-200.
- [11] Jaiswal D, Rai, PK, Kumar A, Mehta S, Watal GE. 2009. Effect of Moringa oleifera Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. *J. Ethnopharmacol.* 123: 392–396.
- [12] Verma AR, Vijayakumar M, Mathela CS, Rao CV. 2009. *In vitro* and in vivo antioxidant properties of different fractions of Moringa oleifera leaves. *Food Chem. Toxicol.* 47: 2196–2201
- [13] Yong-Bing X, Gui-Lin C, Ming-Quan G. 2019. Antioxidant and Anti Inflammatory Activities of the Crude Extracts of Moringa oleifera from Kenya and Their Correlations with Flavonoids. *Antioxidants.* 8(296): 1-12
- [14] Bhattacharya A, Tiwari P, Sahu PK, Kumar S. 2018. A Review of the Phytochemical and Pharmacological Characteristics of Moringa oleifera. *J Pharm Bioallied Sci.* 10(4): 181–191.
- [15] Soni & Mishra AN. 2019. Evaluation of alloxan on induction of diabetes in albino rats. *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology.* 8 (12): 2748-50

- [16] Gupta R, Mathur M, Bajaj VK, Katariya P, Yadav S, Kamal And Gupta R. 2012. Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. *Journal of Diabetes* 4: 164–171
- [17] Al Zhrani MM, Althwab SA, Aljutaily T, Alfhecaid HA, Ashoush IS and Barakat H. 2021. Protective effect of moringa-based beverages against hyperlipidemia and hyperglycemia in type 2 diabetes-induced rats. *Food Research* 5 (2) : 279 - 289
- [18] Niedowicz DM, Daleke DL. 200. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Cell Biochem Biophys*;43:289-330.
- [19] Sharma V, Paliwal R, Pracheta and Sadhana Sharma. 2011. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. Pods. *Journal of Pharmacy Research*. 4(2),554-557.
- [20] Hardani MF, Hardani R, Rahmawati S, Hamzah B. 2020. Endogenous Antioxidant Activity Combination Of Moringa Leaf And Clove Flower Extracts Toward Diabetic Rats (*Rattus Norvegicus*). *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*. 07(10): 1806-1813
- [21] Chen GL, Xu YB, Wu JL, Li N, Guo MQ. 2020. Hypoglycemic and Hypolipidemic effects of *Moringa oleifera* leaves and their functional chemical constituents. *Food Chem.*, 333, 127478.
- [22] Nova E, Redondo-Useros N, Martínez-García RM, Gómez-Martínez S, Díaz-Prieto LE, and Marcos A. 2020. Potential of *Moringa oleifera* to Improve Glucose Control for the Prevention of Diabetes and Related Metabolic Alterations: A Systematic Review of Animal and Human Studies. *Nutrients*. 12 (2050): 1-28
- [23] Owoade AO, Adetutu A and Aborisade AB. 2017. Protective effects of *Moringa Oleifera* leaves against oxidative stress in diabetic rats. *World J Pharm Sci*. 5(11): 64-71

Potensi Senyawa Aktif Fermentasi Daun Kelor Merah (*Moringa Oleifera*) Sebagai Penangkal Stres Oksidatif Akibat Infeksi *Salmonella Typhi*

Maria Magdalena Riyaniarti Estri W

Jurusan S1 Farmasi Fakultas Farmasi IIK Bhakti Wiyata Kediri

Jl.KH Wachid Hasyim 65 Kediri

*E-mail: mm.riyaniarti@iik.ac.id

11.1 Pendahuluan

Demam tifoid adalah penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* yang dapat menyebabkan infeksi akut pada usus halus. Sel yang berperan dalam mempertahankan sistem imunitas tubuh dalam mengeliminasi bakteri *Salmonella thypi* adalah sel T CD4⁺ dan sel T CD8⁺ [1,2]. Abbas dan Lichman (2011) [3], berpendapat bahwa sel T CD4⁺ atau yang disebut dengan sel T *helper* berperan dalam proses upaya peningkatan fagositosis terhadap mikroba yang berada di vesikula dengan cara mengaktifkan fagositosis makrofag, sedangkan sel T CD8⁺ atau yang disebut dengan sel *Cytotoxic T Lymphocyte* (CTL) berperan dalam membunuh sel yang mengandung mikroba dalam sitoplasma sehingga reservoir infeksi bakteri akan hilang.

Sistem imunitas tubuh merupakan sistem yang berperan sangat penting untuk menjaga tubuh dari serangan agen infeksius yang menyerang tubuh. Setiap manusia dapat mengalami penurunan system kekebalan tubuh yang disebabkan oleh bakteri patogen, virus, parasite, radiasi dan polusi dilingkungan sekitar yang dapat menyerang system imun *innate* ataupun *adaptive*. *Salmonella typhi*

adalah bakteri intraseluler yang sering menyebabkan infeksi akut gastroenteritis yang ditandai dengan diare sampai peradangan [4]. Melalui respon imun *innate* dan *adaptive* merupakan respon yang digunakan untuk mengeliminasi *Salmonella typhi* [5]. Sistem imun non spesifik merupakan pertahanan tubuh yang pertama kali menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena itu memberikan tanggapan secara langsung [6]. Dalam membunuh bakteri intraseluler salah satu cara yang dilakukan, dengan meningkatkan aktivasi makrofag, menstimulasi sel T dan sitokin-sitokin yang dilepas oleh makrofag yang berkaitan dengan proses fagositosis dan membunuh mikroba, dengan cara memacu fungsi makrofag untuk menghancurkan dan mengeliminasi bakteri tersebut dengan menggunakan bahan imunostimulan. Fungsi imunostimulan akan mengakibatkan terpicunya fungsi makrofag untuk melakukan *killing* melalui *respiratory burst*. Makrofag yang sudah teraktivasi akan melepaskan berbagai macam metabolit seperti *reactive oxygen species* (ROS). Makrofag yang sudah teraktivasi dikarakteristikan dengan adanya peningkatan ROS. Substansi ini merupakan mediator kunci inflamasi, mikrobisidal, dan tumorisidal. ROS berperan penting dalam proses *killing* serta merupakan salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi bakteri. Akan tetapi, akibat semburan ROS ini dapat menghambat kerja antioksidan yang bertanggung jawab untuk menghambat produksi ROS yang berlebih, sehingga menyebabkan stres oksidatif di hati [7]. Jika ROS berlebih akan bereaksi dengan makromolekul biologi, protein, dan DNA dan dapat menimbulkan kerusakan pada hepatosit [8]. Adanya stres oksidatif terjadi akibat ketidakseimbangan antara peningkatan produksi radikal bebas dan penurunan jumlah antioksidan [9] ROS yang muncul akibat salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi

bakteri pada sel fagosit. ROS penyebab utama terjadinya oksidatif stres, termasuk diantaranya anion superoksida, radikal hidroksil, dan hydrogen peroksida [10]. ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stress oksidatif di hati, dengan cara menekan pembentukan jalur transkripsi antioksidan [11]. Nrf-2 adalah faktor transkripsi yang bertanggung jawab atas transkripsi pada sejumlah antioksidan dan gen cytoprotective [12]. HO-1 efektif berperan dalam pencegahan berbagai cedera oksidatif. Sedangkan superoxide dismutase 2 (SOD-2) dikenal sebagai mangan-dependent superoksida dismutase (Mn-SOD), yang terlibat dalam mengatasi terjadinya stres oksidatif [13]. SODs bertindak paling awal pada pertahanan enzim antioksidan terhadap ROS dan terutama radikal anion superoksida [14].

Fermentasi sebagai perubahan oleh enzim dari beberapa bakteri, khamir, dan jamur di dalam media pertumbuhan. Hasil fermentasi akibat perubahan kinia meliputi pengasaman susu, dekomposisi pati, dan gula menjadi alkohol dan karbondioksida [15]. Mikroba dalam melakukan fermentasi memerlukan energi yang biasanya diperoleh dari glukosa. Dalam suasana aerob, mikroba akan mengubah glukosa menjadi air, CO₂, dan energi yang diperlukan untuk kegiatan pertumbuhan. Beberapa mikroba hanya dapat melangsungkan metabolisme dalam suasana anaerob dan hasilnya adalah substrat setengah terurai [16]. Fermentasi ekstrak daun kelor menghasilkan aroma harum yang dapat meningkatkan kualitas dan palatabilitas [17]. Sejauh ini penelitian fermentasi daun kelor dengan *Lactobacillus plantarum* sebatas mengkaji tentang aktivitas antibakteri [18] dan fermentasi daun kelor mampu meningkatkan antioksidan [19], zat besi, kalsium, serta penurunan asam fitat [20].

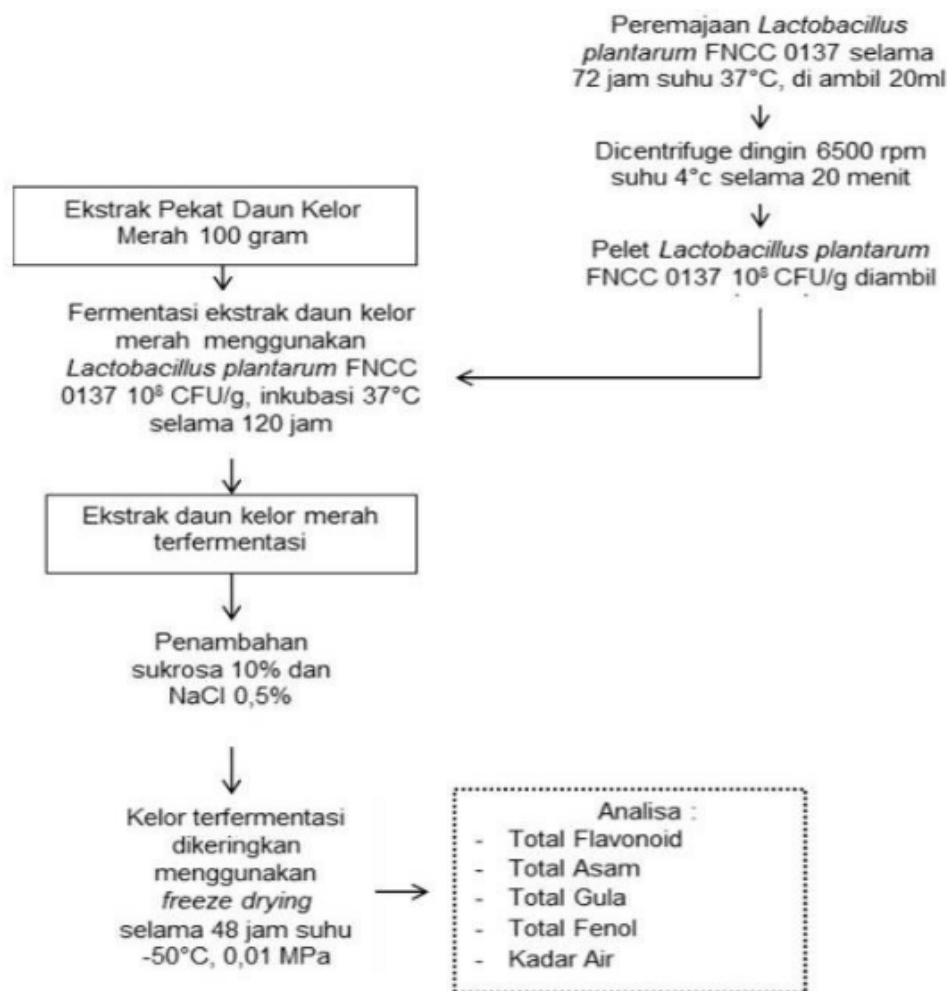
Rumusan Masalah

Apakah ekstrak fermentasi daun kelor merah (*Moringa oleifera*) mempunyai efek sebagai immunomodulatori pada mencit BALB/c setelah diinfeksi oleh *S.typhi* melalui peningkatan Enzim Nrf-2, HO-1, SOD-2.

Tujuan

Menganalisis efek pemberian daun kelor (*Moringa oleifera*) yang terfermentasi oleh *Lactobacillus plantarum* FNCC terhadap respon sistem imun melalui peningkatan Enzim Nrf-2, HO-1, SOD-2 serta menganalisis kandungan daun kelor hasil fermentasi

11.2 Fermentasi daun kelor merah dengan *Lactobacillus plantarum* (Gambar 28)



11.3 Hasil Dan Pembahasan

11.3.1 Potensi Senyawa Bahan Alam Fermentasi Daun Kelor Merah

Eksplorasi senyawa bahan alam dari tumbuhan sangat diperlukan untuk menambah pengetahuan ataupun penelitian terkait untuk pembuatan obat herbal. Hampir semua, kandungan senyawa bahan alam merupakan senyawa organik, dan sumber utama yang digunakan pada senyawa karbon atau senyawa organik ini adalah glukosa yang dibentuk melalui proses fotosintesis pada tumbuhan autotropik atau diperoleh dari organisme heterotrof.

Fermetasi dengan menggunakan *Lactobacillus plantarum* dan bakteri asam laktat lainnya dapat untuk menambah konsentrasi dari komponen fenolik pada bahan pangan yang difermentasi menggunakan enzim β -glucosidase [21]. Kandungan Polifenol kompleks dihidrolisis menjadi lebih sederhana namun aktivitas biologi dari bahan tersebut lebih tinggi selama proses fermentasi, adanya enzim β -glucosidase memecah gugus yang berikatan berupa glikosida yang akan dihidrolisis menjadi fenol dalam bentuk aglikon sehingga lebih mudah diserap [22,23]. Ng *et al.*, (2011) [24] terbukti melaporkan bahwa bagian tumbuhan mengalami kenaikan total fenol setelah fermentasi.

Perubahan Komposisi kimia pada daun kelor merah yang difermentasi menggunakan *Lactobacillus plantarum*

Tabel 13: Perubahan komposisi kimia pada daun kelor merah terfermentasi

Komposisi Kimia		Perlakuan		
		Ekstrak	Fermentasi	Ekstrak Kelor Terfermentasi Kering beku
Kadar Air (%)	BB	10.78 \pm 0.45a	20.54 \pm 0.69b	8.83 \pm 0.93c
	BK	12,09 \pm 0,56a	25,85 \pm 1,09b	9,69 \pm 1,11c

Total Gula (%)	BB	7,07 ± 0,27a	4,74 ± 0,12b	5,11 ± 0,09c
	BK	7.89 ± 0.46a	5.97 ± 1.06b	5.66 ± 0.61b
Total Asam (%)	BB	0,02 ± 0,00a	0,10 ± 0,03b	0,06 ± 0,02b
	BK	0.02 ± 0.01a	0.13 ± 0.00b	0.07 ± 0.00c
Total Fenol (mg GAE/g)	BB	124,57 ± 7,64a	145,83 ± 10,93b	144,16 ± 21,30b
	BK	139.02 ± 0.69a	183.66 ± 2.00b	152.24 ± 1.98c
Total Flavonoid (mgQE/g)	BB	39,56 ± 1,40a	77,41 ± 2,73b	74,96 ± 1,93c
	BK	44.15 ± 1.05a	97.49 ± 0.50b	82.28 ± 1.97c

Keterangan: Notasi yang berbeda menunjukkan beda nyata (*P Value* < 0,05) pada baris yang sama. Ket : BB=Berat Basah, BK=Berat Kering [25].

Setelah difermentasi, kandungan total asam daun kelor merah mengalami peningkatan dan terjadi penurunan terhadap kadar air, total fenol, total gula dan total flavonoid. Adanya peningkatan total flavonoid selama fermentasi diduga akibat adanya aktivitas bakteri asam laktat selama proses fermentasi, bakteri asam laktat akan menghasilkan enzim yang dapat membebaskan senyawa fenolik yang terdapat dalam daun kelor sehingga akan menambah gugus fenol pada senyawa flavonoid [26]. Sedangkan *Lactobacillus plantarum* dapat menghasilkan peningkatan total fenol dengan memproduksi enzim β -glukosidase yang berperan penting dalam proses biotransformasi seperti memodifikasi metabolit primer dan sekunder sehingga akan menyebabkan bertambahnya komponen bioaktif seperti polifenol [27]. Yang tak kalah penting yaitu peran perlakuan *freeze dry* diketahui menjadi salah satu metode untuk memperpanjang umur simpan bahan makanan dengan mekanisme mencegah pertumbuhan mikroorganisme dan memperlambat oksidasi lemak [28]. Dan salah satu cara yang banyak digunakan dalam meningkatkan ketersediaan antioksidan dan mineral pada tumbuhan adalah dengan cara fermentasi [19].

Komponen bioaktif, seperti flavonoid banyak dimanfaatkan sebagai agen anti-inflamasi yang mampu menghambat ekspresi dan menekan eksresi sitokin pro-inflamasi, serta meningkatkan sitokin anti-inflamasi [29]. Sedangkan flavonoid untuk golongan fisetin, kaempferol, myrisetin, kuersetin, dan rutin mempunyai efek terhadap produksi sitokin pro-inflamasi dengan cara menghilangkan fungsi anti-inflamasi dengan menghambat produksi sitokin antiinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, IL-2, IFN- γ , dan TNF- α [30].

11.3.2 Perubahan Kandungan Senyawa Aktif Daun Kelor Merah

Hasil skrinning didapatkan perbedaan hasil antara yang hanya di ekstrak dan ekstrak yang terfermentasi, salah satu bahan aktif yang tidak ditemukan di ekstrak tetapi ditemukan di ekstrak yang terfermentasi adalah golongan flavonoid dalam bentuk glikosida (daidzain). Daidzin termasuk dalam golongan senyawa isoflavon, pada proses fermentasi isoflavon bentuk bebas (aglikon) lebih banyak, sehingga ada di dalam hasil ekstrak yang terfermentasi [31]. Bentuk glikosida isoflavon berubah menjadi senyawa aglikon dalam bentuk bebas yang dihasilkan oleh pelepasan glukosa dari glikosida oleh enzim β glukosidase yang terdapat di *Lactobacillus plantarum*. Proses degradasi dikatalis oleh enzim glukosidase untuk mengubah glikosida menjadi aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein [32]. Senyawa bioaktif isoflavon yang mengandung gugus fenolik yang mampu sebagai antioksidan dan dapat menghalangi terjadinya kerusakan akibat radikal bebas melalui dua cara, yaitu: memberikan ion hidrogen [33], dan bertindak sebagai scavenger radikal bebas secara langsung [33,34]. Demikian juga dengan senyawa hasil fermentasi yaitu, asam piruvat, asam fumarat akan didapatkan pada ekstrak yang terfermentasi karena merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan melalui proses glikolisis.

11.3.3 Potensi Senyawa Bahan Alam sebagai Anti Salmonellasis

Peran sistem imun tubuh memiliki peran yang sangat penting untuk menjaga tubuh terhadap serangan agen infeksius yang menyerang tubuh. Setiap manusia dapat mengalami penurunan system kekebalan tubuh yang disebabkan oleh bakteri patogen, virus, parasite, radiasi dan polusi dilingkungan sekitar yang dapat menyerang system imun *innate* ataupun *adaptive*. Melalui respon imun *innate* dan *adaptive* merupakan respon yang digunakan untuk mengeliminasi *Salmonella typhi* [5]. Pertahanan sistem imun non spesifik adalah pertahanan tubuh yang pertama kali dalam menghadapi serangan berbagai macam mikroorganisme, oleh karena itu dapat memberikan tanggapan secara langsung [35].

Salah satu cara untuk membunuh bakteri intraseluler, dengan cara meningkatkan aktivasi makrofag, menstimulasi sel T dan sitokin-sitokin yang sudah dilepas oleh makrofag yang berkaitan dengan proses fagositosis dan proses membunuh mikroba. Makrofag berperan penting di dalam sistem pertahanan tubuh karena kemampuan fagositosis untuk membunuh dan menghasilkan berbagai mediator inflamasi. Sel-sel efektor yang terlibat di dalam proses inflamasi akan melepaskan berbagai jenis substansi. Keberadaan dari sel-sel efektor maupun substansi yang dilepaskannya dapat dihambat ataupun dicegah oleh bahan-bahan imunomodulator, yaitu immunosupresor dan juga immunostimulator yang dapat diperoleh dari dalam maupun dari luar tubuh. Immunosupresor dari luar tubuh di antaranya dapat diperoleh dari tumbuhan herbal [36]. Infeksi yang terjadi di dalam tubuh akan berdampak munculnya berbagai respons imun yang diawali oleh meningkatnya sel fagosit yang menuju ke arah sumber infeksi. Neutrofil maupun makrofag akan bergerak ke arah sumber infeksi, selanjutnya sel yang dianggap

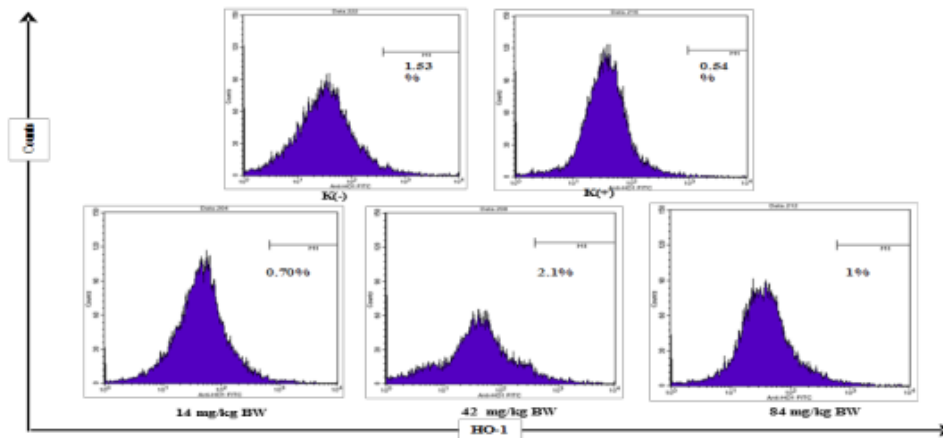
asing tersebut akan difagosit. Sedangkan proses fagositosis di dalam makrofag yang dilakukan oleh berbagai enzim, yang paling dominan adalah enzim lisosim. Hasil fagositosis tersebut berbentuk fragmen protein yang selanjutnya disajikan ke sel T untuk proses pembentukan antibodi. Berbagai sekresi makrofag saat proses eliminasi antigen berguna untuk aktivasi sel fagosit, sel B, dan sel T [37]. Setelah proses eliminasi antigen selesai, sel B akan menghasilkan antibodi.

Tanaman *Moringa oleifera Lam* memiliki sifat imunostimulator karena memiliki kandungan fitokimia maupun zat gizi yang kompleks yaitu mempunyai kandungan asam fenolik dan flavonoid [38-40]. *Lactobacillus plantarum* menghasilkan asam laktat sebagai produk akhir perombakan karbohidrat, bakteriosin dan hidrogen peroksida sebagai zat antimikroba, yang berakibat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella* dan *Escherichia coli* akan dihambat [41].

11.3.4 Peningkatan HO-1, SOD-2 dan Nrf-2

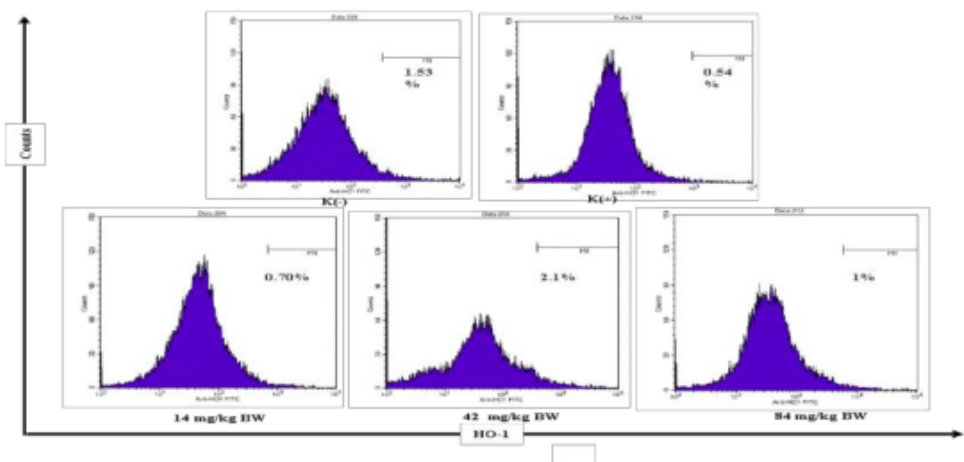
Senyawa anti-oksidatif yang berasal dari ekstrak fermentasi menghasilkan antioksidant yang kuat dengan aktivasi signaling jalur Nrf-2/HO-1, dan SOD-2.

a. Ekspresi hasil analisis HO-1 (Gambar 29)



Dari masing-masing kelompok perlakuan rerata jumlah persentase HO-1 menunjukkan hasil bahwa dosis 14 mg/kg BW , 42mg mg/kg BW, dan 84 mg/kg BW dapat memberikan hasil yang meningkat dibandingkan dengan kelompok control sakit yang tanpa penambahan ekstrak fermentasi daun kelor merah.

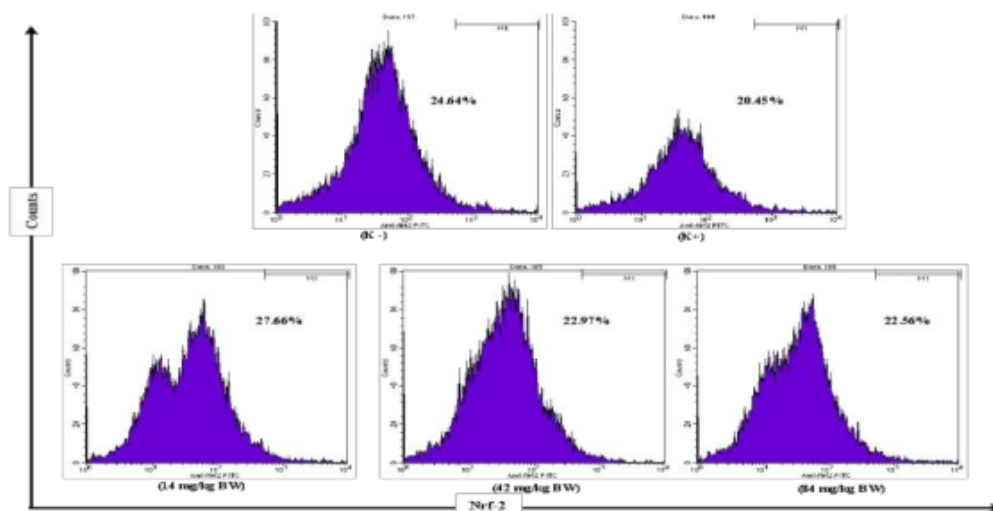
b. Hasil ekspresi SOD-2



Gambar 30

Dari masing-masing kelompok perlakuan rerata jumlah persentase SOD-2 menunjukkan hasil bahwa dosis 14 mg/kg BW , 42mg mg/kg BW, dan 84 mg/kg BW dapat memberikan hasil yang meningkat dibandingkan dengan kelompok control sakit yang tanpa penambahan ekstrak fermentasi daun kelor merah

c. Hasil ekspresi Nrf-2



Gambar 31

Dari masing-masing kelompok perlakuan rerata jumlah persentase HO-1 menunjukkan hasil bahwa dosis 14 mg/kg BW , 42mg mg/kg BW, dan 84 mg/kg BW dapat memberikan hasil yang meningkat dibandingkan dengan kelompok control sakit yang tanpa penambahan ekstrak fermentasi daun kelor merah

Hasil ekstrak fermentasi daun kelor merah oleh *lactobacillus plantarum* salah satu diantaranya dapat memberikan efek meningkatkan total protein dan bioavailabilitas zat besi [42]. Di mana zat besi berperan sebagai sebagai kofaktor enzim-enzim pada proses respirasi mitokondrial. Penurunan hasil rerata total gula pada ekstrak fermentasi daun kelor merah dikarenakan gula sukrosa, glukosa dan fruktosa yang terdapat pada daun kelor [43] digunakan oleh bakteri asam laktat dalam proses pertumbuhannya. Pada proses fermentasi terjadi metabolisme bakteri yang menggunakan glukosa sebagai nutrisi pertumbuhannya, kemudian glukosa tersebut diubah menjadi asam laktat sehingga total gula menjadi turun [44]. Keadaan glikolisis ini digunakan monosit dan makrofag sebagai energy untuk meningkatkan konsumsi oksigennya selama fagositosis [3]. Molekul oksigen akan di konversi oleh Makrofag dan neutrofil ke dalam *Reactive Oxygen Species* (ROS), yang dibantu oleh

enzim IFN- γ dan TLRs untuk membunuh mikroba. Salah satu hasil respon imun seluler berupa produksi Nitrit Oksida (NO) oleh makrofag [45]. Makrofag yang diaktivasi oleh LPS (lipopolisakarida) bakteri, sel tubuh yang rusak, maupun oleh IFN- γ (interferon gamma). Jika makrofag teraktivasi maka transkripsi gen yang menginduksi iNOS akan meningkat, sehingga akan dihasilkan NO dalam jumlah yang lebih banyak. NO dalam hal ini akan berperan sebagai immunoregulator yang akan digunakan untuk membunuh *Salmonella* [3].

Senyawa flavonoid yang meningkat berperan sebagai imunostimulan yang dapat memberikan rangsangan intraseluler pada sel makrofag dan sel T agar bekerja lebih baik dan dapat menghancurkan agen infeksi yang masuk [47]. Makrofag yang diaktifkan IFN- γ menyebabkan peningkatan aktivitas fagositosis. Sehingga akan menyebabkan makrofag dapat membunuh bakteri lebih cepat. Peran senyawa flavonoid memiliki mekanisme kerja dengan cara mengaktivasi sel NK untuk memproduksi IFN- γ . IFN- γ merupakan sitokin penting MAC (*Macrophage Activating Cytokine*) yang akan mengaktifkan makrofag dan memacu peningkatan aktivitas fagositosis [46]. Serta dapat sebagai imunostimulan yang dapat memberikan rangsangan intraseluler seperti sel T dan makrofag supaya bekerja lebih baik dalam menghancurkan infeksi yang masuk [47].

Selain itu hasil ekstrak fermentasi daun kelor merah oleh *Lactobacillus plantarum* salah satu diantaranya dapat memberikan efek meningkatkan total protein dan bioavailabilitas zat besi [42]. Di mana zat besi penting sebagai kofaktor enzim-enzim pada respirasi mitokondrial. *Lactobacillus plantarum* yang terdapat didalam ekstrak daun *Moringa oleifera* meningkatkan sintesa IL-10 dan

sekresi makrofag yang berasal dari kolon yang mengalami inflamasi [48].

Makrofag dapat diaktivasi oleh LPS (lipopolisakarida) bakteri, sel tubuh yang rusak, maupun oleh IFN- γ (*interferon gamma*). Jika makrofag teraktivasi maka transkripsi gen yang menginduksi iNOS akan berrambah, sehingga akan menghasilkan NO dalam jumlah yang lebih banyak. NO berperan sebagai immunoregulator yang digunakan untuk membunuh *Salmonella* [3]. Makrofag berperan penting di dalam sistem pertahanan tubuh dalam hal fagositosis bakteri dan menghasilkan berbagai mediator inflamasi. Sel efektor yang terlibat di dalam proses inflamasi akan melepaskan berbagai jenis substansi. Fungsi sel-sel efektor maupun substansi yang dilepaskannya dapat dihambat ataupun didorong oleh bahan-bahan imunomodulator, yaitu imunosupresor dan juga imunostimulator yang dapat diperoleh dari dalam maupun dari luar tubuh. Imunosupresor dari luar tubuh dapat diperoleh dari tumbuhan herbal [36].

11.4 Ringkasan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa anti-oksidatif yang berasal dari ekstrak fermentasi menghasilkan antioksidan yang kuat dan berkontribusi untuk aktivasi signaling jalur Nrf-2/HO-1, dan SOD-2. SOD-2 bekerja dengan cara menangkap dan menghambat produksi ROS dengan menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas atau menangkap senyawa radikal (*radical scavenging*) sebagai perlindungan awal terhadap kerusakan oksidatif [49]. Sebagai pengatur stres anti-oksidatif, Nrf-2 mengatur ekspresi gen antioksidan dan fase II enzim-enzim detoksifikasi seperti heme oxygenase-1 (HO-1), NAD (P) H quinon oksidoreduktase 1 (NQO-1), dan glutamat sistein ligase katalitik subunit (GCLC) yang menangkal stres oksidatif dengan

meningkatkan penghambatan ROS [50,51]. Peradangan kronis yang tidak terkontrol dapat menyebabkan munculnya penyakit, dan karena itu agen anti-inflamasi baik dari sumber alami atau sintetis diperlukan sebagai agen terapi untuk mencegah penyakit tersebut. Adanya peningkatan total flavonoid selama fermentasi diduga akibat adanya aktivitas bakteri asam laktat selama proses fermentasi berlangsung. Bakteri asam laktat akan memproduksi enzim yang bisa membebaskan senyawa fenolik yang terdapat dalam daun kelor sehingga dapat menambah gugus fenol pada senyawa flavonoid [52]. Flavonoid merupakan imunostimulan yang dapat memberikan rangsangan intraseluler terhadap sel makrofag dan sel T agar dapat membunuh dan mengeliminasi infeksi yang masuk [47].

Daftar Pustaka

- [1] Lapaquea N, James L H, Des C J, Ste P M R, David W H, John T, Adrian P K. (2009). *Salmonella* regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens. *PNAS* 106 : 14052-14057.
- [2] Warrington, R. Wade Watson, Harold L Kim and Francesca Romana Antonetti. (2011). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*. 7(Suppl 1).
- [3] Abbas K A, Lichman A H. dan Pillai, Shiv. (2016). Basic Immunology 3e Updated Edition. Philadelphia: *Elsevier*. 103-107, 113-121
- [4] Santos RL, Zhang S, Tsois RM, Bäumlér AJ, and Adams LG. (2002). Morphologic and molecular characterization of *Salmonella typhimurium* infection in neonatal calves. *Vet. Pathol.* 39, 200-215
- [5] Niedergang, F., J. C. Sirard, C. T. Blanc, and J. P. Kraehenbuhl. (2000). Entry and survival of *Salmonella typhimurium* in dendritic cells and presentation of recombinant antigens do not

- require macrophagespecific virulence factors. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S. A* 97, 14650-1465
- [6] Mayer G. (2011). *Innate (Non Spesific) Immunity. .Microbiology and Immunology on-line*. University of South Carolina
- [7] H. Zhu, Z. Jia, H. Misra, and Y. R. Li. (2012). "Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence," *Journal of Digestive Diseases*. 13, 133–142.
- [8] D. Wu and A. Cederbaum. (2009). "Oxidative stress and alcoholic liver disease," *Seminars in Liver Diseases*. 29, 141–154
- [9] Ruiz S, Pergola PE, Zager RA, Vaziri ND. (2013). Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney Int*. 83(6), 1029-1041
- [10] Jaeschke, H., McGill, M.R., Ramachandran. (2012). Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 44, 88–106.
- [11] T. M. Leung and N. Nieto. (2013). "CYP2E1 and oxidant stress in alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease," *Journal of Hepatology*. 58, 395–398.
- [12] Itoh, K., Mimura, J., Yamamoto, M. (2010) Discovery of the negative regulator of Nrf2, Keap1: a historical overview. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1665–1678
- [13] Truong, V.L., Ko, S.Y., Jun, M., Jeong, W.S. (2016). Quercitrin from *Toona sinensis* (Juss.) M. Roem. attenuates acetaminophen-induced acute liver toxicity in HepG2 cells and mice through induction of antioxidant machinery and inhibition of inflammation. *Nutrients*. 8, 1–16.
- [14] Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Bio Med* 33, 337–349
- [15] Hidayat, Nur., Masdiana CP., dan Sri H. (2006). *Mikrobiologi Industri*. Penerbit Andi. Yogyakarta

- [16] Muchtadi, Tien R., dan Fitriyono A. (2010). Teknologi Proses Pengolahan Pangan. Alfabeta. Bandung
- [17] Wang, J., Cao, F., Zhu, Z., Zhang, X., Sheng, Q., Qin, W. (2018). Improvement of Quality and Digestibility of *Moringa Oleifera* Leaves Feed via Solid-State Fermentation by *Aspergillus Niger*. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*.
- [18] Muñoz, R. Rivas, B. de las F. Felipe, López de. Reverón, I. (2017). Biotransformation of Phenolics by *Lactobacillus plantarum* in Fermented Foods. *Journal of Fermented Food in Health and Disease Prevention*. 4, 63-79
- [19] Hossain, Arzina. Khatun, Afifa. Munshi, M. Kamruzzaman. Hussain, Md Shakhawat. Islam, Mahfuza dan Huque, Roksana. Study on Antibacterial and Antioxidant Activities of Raw and Fermented *Moringa oleifera lam.* Leaves. *Journal of Microbiol Biotech* 4, 23-29.
- [20] Mohite, B. V., Chaudhari, G. A., Ingale, H. S. and Mahajan, V. N. (2013). Effect of fermentation and processing on *in vitro* mineral estimation of selected fermented foods. *Journal International Food Research*. 20(3), 1373-1377
- [21] Duenas. Montserrat, Dolores Fernandez, Teresa Hernandez, Isabel Estrella And Rosario Munoz. (2005). Bioactive Phenolic Compounds Of Cowpeas (*Vigna sinensis* L). Modifications By Fermentation With Natural Microflora And With *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *J Sci Food Agric* 85, 297-304
- [22] Martins, S., Mussatto, S. I., Avila, M. G., Saenz, M. J., Aguilar, C. N. and Teixeira, J. A. (2011). Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances* 29(3), 365-373.
- [23] Wang, J., Cao, F., Zhu, Z., Zhang, X., Sheng, Q., Qin, W. (2018). Improvement of Quality and Digestibility of *Moringa Oleifera* Leaves Feed via Solid-State Fermentation by

Aspergillus Niger. International Journal of Chemical Reactor Engineering.

- [24] Ng, C. C., Wang, C. Y., Wang, Y. P., Tzeng, W. S. and Shyu, Y. T. (2011). Lactic acid bacterial fermentation on the production of functional antioxidant herbal *Anoectochilus formosanus* Hayata. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111(3), 289–293.
- [25] Rd Laili, Erryana Martati, Muhaimmin Rifa'i. (2019). Immunomodulator effect of Moringa oleifera Leaves Fermented by Lactobacillus plantarum FNCC 0137 on Salmonella typhi infected Balb/C Mice. *Research Journal of Pharmacy and Technology* 12(8), 3595
- [26] Hernandez, T., Estrella, I., Perez-Gordo, M., Alegria, E. G., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F. (2007). Contribution of malolactic fermentation by Oenococcusoeni and Lactobacillus plantarum to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 5260–5266.
- [27] Djonu, A., Andayani, S., Nursyam, H. (2018). Identification Of Moringa Oleifera Leaves Content Fermented By Rhizopus Oligosporus. *International Journal Of Scientific & Technology Research*. Vol. 7, Issue 4
- [28] Marques, L.G.; Prado, M.M.; Freire, J.T. (2009). Rehydration characteristics of freeze-dried tropical fruits. *J. Food Sci. Technol.* 42, 1232–1237.
- [29] Comalada, M. Xaus, J. dan Gálvez, J. (2013). Flavonoids and Immunomodulation. E-book of Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases. Cahpter 43. Halaman 556, 560 dan 563
- [30] Park, H.H.; Lee, S.; Son, H.Y.; Park, S.B.; Kim, M.S.; Choi, E.J.; Singh, T.S.; Ha, J.H.; Lee, M.G.; Kim, J.E.; Hyun, M.C.; Kwon, T.K.; Kim, Y.H.; Kim, S.H. (2008). Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch. Pharm. Res.* 31(10), 1303-1311.

- [31] Coward, L., M. Smith, M. Kirk, and S. Barnes. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(Suppl): 1486S-1491S.
- [32] Schmild, M.K. and T.P. Labuza. (2001). *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.
- [33] Arora, A., M.G. Nair, and G.M. Strasburg. (1998). Structure – activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. & Med.* 24(9): 1355-1363.
- [34] Nijveldt, R.J. *et al.* (2001). Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:418-425.
- [35] Mayer G. (2011). *Innate (Non Spesific) Immunity*. Microbiology and Immunology on-line. University of South Carolina
- [36] Kusmardi, Kumala S, Triana EE. (2007). Efek immunomodulator ekstrak daun ketepeng cina (*Cassia allata* L.) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. *J Makara Kesehatan.* 11(2), 50–3
- [37] Noss, E.H., R.K. Pai, T.J. Sellati, J.D. Radolf, J. Belisle, D.T. Golenbock, W.H. Boom, and C.V. Harding. (2001). Toll-like receptor 2-dependent Inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *M. tuberculosis*. *J. Immunol.* 167(2), 910-918.
- [38] Mbikay, M. (2012). Therapeutic potential of *Moringa oleifera* leaves in chronic hyperglycemia and dyslipidemia: a review. *Front. Pharmacol.* 3, 24
- [39] Vongsak, B., Sithisarn, P., Mangmool, S., Thongpraditchote, S., Wongkrajang, Y., Gritsanapan, W. (2013). Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. *Ind. Crops Prod.* 44, 566–571

- [40] Al Khateeb, W., Bahar, E., Lahham, J., Schroeder, D., Hussein, E. (2013). Regeneration and assessment of genetic fidelity of the endangered tree *Moringa peregrine* (Forssk.) Fiori using inter simple sequence repeat (ISSR). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 19, 157–164.
- [41] Puspawati R, Putranti A, Gina A. (2011). Aktivitas Metabolit Bakteri *Lactobacillus plantarum* dan Perannya dalam Menjaga Kesehatan Saluran Pencernaan. *Konferensi Nasional Sains dan Aplikasinya*
- [42] Nirina, Harimalala Andriambelo. Miora, Rasoarinanahary. Vincent, Porphyre. (2007). Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of Fermented *Moringa oleifera* Leaf Powder. *European Journal of Nutrition & Food Safety* 7(1), 77-83
- [43] Leone, A., Fiorillo G., Criscuoli F., Ravasenghi S., Santagostini L., Fico G., Spadafranca A., Battezzati A., Schiraldi A., Pozzi F., DiLello S., Filippini S., Bertoli S. (2015). Nutritional Characterization and Phenolic Profiling of *Moringa oleifera* Leaves Grown in Chad, Sahrawi Refugee Camps, and Haiti *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18923-18937
- [44] Kamsina, Anova, I. T., Firdausni. (2015). The Influence of Juice and Sugar Ratio on The Quality of Functional Drink of Pumpkin. *Jurnal Litbang Industri* Vol. 5 No. 2, 113-122
- [45] Tripathi AK, Kohli S. (2013). Phytochemical Screening And Evaluation Of Antidiabetic Activity Of *Colocasia Esculenta* (L) Leaves On Stz Induced Diabetic Rats. *Adv. Pharmacol. Toxicol.* 14 (2):1-12 ISSN - 0973– 2381
- [46] Sulistiani, P., R., Hesti, R., M. (2015). Pengaruh Ekstrak Lompong Mentah (*Colocasia esculenta* L. Schoot) Terhadap Aktivitas Fagositosis dan Kadar NO (Nitrit Oksida) Mencit Balb/C Sebelum dan Sesudah Terinfeksi *Listeria monocytogens*. *Journal of Nutrition College.* 4(2), 409-415.
- [47] Choudhury, S.S., Bashyam, L., Manthapuram, N., Bitla, P., Kollipara, P., Tetali, S.D., (2014). *Ocimum sanctum* leaf

- extracts attenuate human monocytic (THP-1) cell activation. *J. Ethnopharmacol.* 154, 148–155.
- [48] He F, Morita H, Ouwehand AC. (2002). *Stimulation of the secretion of proinflammatory cytokine by Bifidobacterium strain. Microbiol Immunol.* 46; 781 -785.
- [49] Nishino Y, Takemura S, Minamiyama Y, Kazuhiro H, Tetsuya O, Inoue M, Okada S and Kinoshita H. (2003). Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells attenuates vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Free Radic Res* 37, 373-379.
- [50] Khan, I., Zaneb, H., Masood, S., Yousaf, M., Rehman, H. (2017). Effect of *Moringa oleifera* Leaf Powder Supplementation on Growth Performance and Intestinal Morphology in Broiler Chickens. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 101:114-121.
- [51] Ma, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. (2013). *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 401–426
- [52] Hernandez, T., Estrella, I., Perez-Gordo, M., Alegria, E. G., Tenorio, C., Ruiz-Larrea, F., et al. (2007). Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 5260–5266.

Glosarium

Aloksan	: Bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada binatang percobaan yang dapat diberikan secara intravena, intraperitoneal
Amadori	: Senyawa yang dihasilkan dari reaksi Maillard
Antioksidan endogen	: Antioksidan yang berasal atau disintesis di dalam tubuh misalnya enzim superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase
Antioksidan enzimatik	: Antioksidan yang diproduksi dalam tubuh sebagai penangkal radikal bebas seperti : superoksida dismutase, katalase dan glutathion peroksidase
<i>Chelating</i> (Pengkelat)	: suatu komponen/senyawa yang dapat membentuk kompleks dengan cara berikatan dengan ion logam atau alkali.
Degenerasi sel	: Kelainan sel yang terjadi akibat cedera ringan. Kerusakan ini sifatnya reversibel artinya bisa diperbaiki apabila penyebabnya segera dihilangkan.
Derajat deasetilasi	: Derajat kehilangan gugus asetil pada gugus asetamida kitin.
Ekotoksik	: Bahan-bahan beracun yang berada di lingkungan
Ekstrak	: zat yang dihasilkan dari ekstraksi bahan mentah secara kimiawi dengan pelarut misalnya: air, alkohol, etanol, kloroform
Fermentasi Substrat Padat (<i>Solid Substrate Fermentation=SSF</i>)	: Metode fermentasi dengan substrat bahan padat. SSF merupakan proses fermentasi dengan kandungan air bebas yang sangat rendah. Contoh
Fitokimia	: Senyawa yang ditemukan pada tumbuhan yang tidak dibutuhkan untuk fungsi normal tubuh,

	tetapi memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan atau memiliki peran aktif bagi pencegahan penyakit.
Flavor	: keseluruhan kesan atau sensasi yang dapat diterima oleh indra manusia terutama diperoleh dari rasa dan bau pada saat suatu produk pangan dikonsumsi
Gastritis	: kondisi peradangan pada jaringan lambung, ditandai terjadinya infiltrasi limfosit dan neutrofil di tunika mukosa dan submukosa serta oedema submucosa
Hepatitis	: Kondisi pada jaringan hepatosit yang ditandai dengan munculnya sel-sel radang, multifokal midzonal nekrosis dan fibrosis
Hepatoprotektor (pelindung hati)	: produk yang melindungi hati dan/atau memulihkan hati yang telah dirusak oleh racun, obat atau penyakit.
Hiperglikemia	: Suatu kondisi ketika kadar glukosa darah meningkat melebihi batas normalnya.
IC50	: menunjukkan konsentrasi suatu zat yang dapat menghambat 50% proses oksidasi radikal bebas. Semakin kecil nilai IC50 maka semakin besar aktivitas antioksidannya.
Kapang Lignoselulolitik	: Fungi mikroskopis multiseluler yang dapat menghasilkan enzim-enzim pendegradasi lignoselulosa.
Katalase	: Salah satu antioksidan enzim yang mengkatalisis hidrogen peroksida (H ₂ O ₂) diurai menjadi air (H ₂ O) dan oksigen(O ₂) Senyawa yang dihasilkan dari peroksidasi lipid asam lemak tak jenuh ganda yang merupakan penanda stres oksidatif
Kitosan	: Kitosan adalah senyawa poli-(2-amino-2-deoksi-β-(1-4)-D-glukopiranos) dengan rumus molekul (C ₆ H ₁₁ NO ₄) _n merupakan biopolimer yang berasal dari proses deasetilasi senyawa kitin. Sumber kitin yang digunakan pada umumnya adalah cangkang/ kulit

	crustacea. Kitosan bersifat nontoksik dan biodegradable. Kitosan tidak dapat larut dalam larutan netral atau basa tetapi larut dalam asam-asam organik.
Malondialdehid	: Molekul yang memiliki elektron bebas atau tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan tersebut bersifat tidak stabil
Nekrosis	: merupakan kondisi cedera pada sel yang mengakibatkan kematian dini sel-sel dan jaringan hidup. Nekrosis disebabkan oleh faktor-faktor eksternal seperti infeksi, racun, atau trauma yang menyebabkan mekanisme autofagi komponen-komponen sel menjadi terganggu.
Nutraceuticals	: zat apa pun yang merupakan makanan atau bagian dari makanan yang memberikan manfaat medis atau kesehatan, termasuk pencegahan dan perawatan penyakit
Radikal bebas	: molekul yang kehilangan satu buah elektron dari pasangan elektron bebasnya, atau merupakan hasil pemisahan homolitik suatu ikatan kovalen. sehingga sangat reaktif.
Radikal bebas	: Kondisi di mana jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkannya
Reactive Oxygen Species (ROS)	: senyawa organik yang memiliki gugus fungsional dengan atom oksigen yang bermuatan elektron lebih. ROS terbentuk secara alami, terutama pada kompleks I rantai pernapasan mitokondria, dalam aktivitas selular yang normal maupun <u>patologi</u> .
Reaksi Maillard	: reaksi pencoklatan non enzimatis yang terjadi karena adanya reaksi antara gula pereduksi dengan gugus amin bebas dari asam amino atau protein
Reaksi Redoks	: reaksi redoks terdiri dari reaksi reduksi dan reaksi oksidasi. Berdasarkan pelepasan dan pengikatan oksigen, reaksi reduksi adalah reaksi

	pelepasan oksigen, sedangkan reaksi oksidasi adalah reaksi pengikatan oksigen.
Rempah	: bagian tumbuhan yang beraroma atau beraroma kuat yang digunakan dalam jumlah kecil di makanan sebagai pengawet atau perisa dalam masakan.
Senyawa bioaktif	: Senyawa yang memiliki fungsi biologis, seperti antioksidan, antitumor, antimikroba dan sebagainya
Senyawa fenolat (<i>Phenolic compounds</i>)	: Salah satu kelompok senyawa bioaktif yang merupakan hasil metabolisme sekunder pada tanaman dan mikroorganisme termasuk kapang. Senyawa fenolat terdiri atas flavonoid, asam-asam fenolat, dan tannin.
<i>Shikimic Acid Pathway</i> (SAP)	: Jalur biosintesis senyawa fenolat yang terdapat pada tanaman dan mikroorganisme, tidak terdapat pada hewan dan manusia. SAP terdiri atas tujuh langkah reaksi, dengan hasil akhir asam chorismat (<i>chorismic acid</i>)
Stres oksidatif	: Salah satu antioksidan enzim utama dan merupakan pertahanan tubuh pertama yang menangkal radikal bebas
Timbal (Plumbum/Pb)	: logam berat bernomor atom 82, dengan massa lunak, berwarna abu-abu keperakan. Berat atom relatif sebesar 207,19 berat jenis 11,34, titik leleh pada temperatur 327,5°C dan titik didih pada temperatur 1740°C. Logam Pb memiliki 2 valensi yaitu +2 dan +4. Pb valensi 2 merupakan bentuk dominan dari ionik Pb sedangkan Pb valensi 4 cenderung membentuk ikatan kovalen. Pb organik mudah terdisosiasi dalam kondisi asam
Toksisitas	: Tingkat meracuni suatu zat jika dipaparkan pada organisme. Dampak toksisitas dapat mempengaruhi seluruh organisme, seperti hewan, bakteri, atau tumbuhan, dan efek terhadap substruktur organisme, seperti sel atau organ tubuh.

Penulis



Pramesti Dewi lahir di Salatiga 8 September 1965, menjadi staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak 1989, telah menempuh studi S3 Ilmu Pangan di Universitas Gadjah Mada, mata kuliah yang diampu Mikrobiologi dan Bioteknologi.

Noor Aini Habibah lahir di Cilacap 7 November 1971, menjadi staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak tahun 1998, mata kuliah yang diampu diantaranya Kultur Jaringan Tumbuhan, Genetika, dan Biologi Molekuler, menyelesaikan studi S3 di Universitas Gadjah Mada.



Dewi Mustikaningtyas lahir di Semarang 11 Maret 1980, menyelesaikan studi S3 Program Doktorat Biologi Universitas Brawijaya, mengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak tahun 2005 pada mata kuliah Biologi Molekuler, Mikrobiologi, dan Genetika.

Retno Sri Iswari lahir di Purwodadi 7 Februari 1952, sebagai staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak 1979, mengajar mata kuliah Biokimia dan Dasar Bioteknologi. Menyelesaikan studi S3 di Universitas Diponegoro Semarang.



Nugrahaningsih WH lahir di Klaten 9 Juli 1969, menyelesaikan studi S3 Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang, sejak 1998 sebagai staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES, mengajar mata kuliah Anatomi Fisiologi Manusia, Struktur Jaringan Hewan, Kultur Jaringan Hewan, dan Biopatologi.

Aditya Marianti lahir di Semarang 17 Desember 1967, menyelesaikan studi S3 Ilmu Lingkungan Universitas Diponegoro, merupakan salah satu staf pengajar di Jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak 1993 dan mengampu mata kuliah Fisiologi Hewan dan Biologi Radiasi.





Ari Yuniastuti lahir di Semarang 2 Juni 1968, merupakan lulusan S3 Biomedik Universitas Hasanudin, sejak 1998 mengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES pada mata kuliah Gizi dan Kesehatan, Biokimia, dan Biokimia Nutrisi.

Priyantini Widyaningrum, lahir di Bantul 19 April 1960, merupakan lulusan S3 Ilmu Ternak IPB Bogor, pernah mengajar di Universitas Sumatera Utara dan Universitas Semarang, menjadi staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES sejak 2007 pada mata kuliah Embriologi Hewan dan Ekofisiologi Hewan.



R. Susanti lahir di Sragen 23 Maret 1969, menyelesaikan studi S3 Kedokteran Hewan IPB Bogor, sejak 1997 mengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES pada mata kuliah Biokimia, Kimia Organik, Enzimologi, Imunologi dan Metabolisme Sel.

Wulan Christijanti lahir di Sukoharjo 11 September 1968, pendidikan terakhir S3 Ilmu Kedokteran dan Kesehatan Universitas Diponegoro, sejak 1996 menjadi staf pengajar di jurusan Biologi FMIPA UNNES mengampu mata kuliah Fisiologi Hewan dan Biologi Sel.



Maria Magdalena Riyaniarti Estri W lahir di Surabaya 12 Juni 1974, menyelesaikan studi S3 Program Doktorat Biologi Universitas Brawijaya, sejak tahun 2000 mengajar di Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata Kediri pada mata kuliah Patofisiologi, Biologi Medik, Hematologi, dan Anatomi Fisiologi.

book chapter

ORIGINALITY REPORT

9%

SIMILARITY INDEX

9%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

3%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

repository.unp.ac.id

Internet Source

8%

2

www.scribd.com

Internet Source

1%

Exclude quotes Off

Exclude bibliography On

Exclude matches Off