

ISSN: 2087-0337
Juli 2016
Volume 7 nomor 2

Jurnal Ilmiah Farmako Bahari



www.fmipa.uniga.ac.id



Jurnal Ilmiah Farmako Bahari

PIMPINAN UMUM/PENANGGUNG JAWAB
DEKAN FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS GARUT

WAKIL PIMPINAN UMUM/WAKIL PENANGGUNG JAWAB
KETUA PROGRAM STUDI FARMASI FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS GARUT

MITRA BESTARI

Prof. Dr.H.Anas Subarnas, M.Sc., Apt.
Prof.Dr. Entun Santosa, M.Sc.
Prof.Dr.H.Muhammad Ali Ramdhani, MT.
Prof.Dr. Ieke Sartika, MS.

DEWAN EDITOR

Ketua : dr.Hj. Syifa Hamdani, MARS.
Sekretaris : Setiadi Ihsan, M.Si., Apt.
Anggota : Riska Prasetiawati, M.Si., Apt
Dr. Nizar AH,MM.,MT.,M.Si

EDITOR PELAKSANA

Ketua : Dr. Ria Mariani, M.Si., Apt
Sekretaris : Nurhabibah, M.Si., Apt.
Anggota : Daden Wahyudin Darajat, M.Pd
Irman Nuichsan, M.Si.

Penerbit:

Jurusan Farmasi FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS GARUT

Alamat Penerbit

Jurusan Farmasi FMIPA UNIGA
Jl. Jati No. 42B Kecamatan Tarogong Kaler Kab. Garut 44151
Telp/Fax (0262) 540007
email : farmasi@uniga.ac.id
website: www.fmipa.uniga.ac.id

Kata Pengantar

Puji Syukur ke Hadirat Tuhan Yang Maha Kuasa atas rahmat-Nya sehingga Jurnal Farmako Bahari ini dapat terbit.

Seiring dengan meningkatnya kemajuan dan ilmu pengetahuan serta sumber daya manusia maka hasil-hasil penelitian maupun teori baru dalam bidang farmasi perlu dipublikasikan. Berkaitan dengan hal ini, Program Studi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Garut berinisiatif untuk memberikan ruang dan peluang bagi akademisi, peneliti, dan mahasiswa untuk menuangkan tulisannya dalam “ Jurnal Farmako Bahari”.

Jurnal Farmako Bahari diharapkan dapat terbit dua kali setahun dengan topik kajian yang beragam sesuai dengan bidang kefarmasian.

Semoga Jurnal Farmako Bahari ini dapat menambah dan melengkapi diseminasi hasil hasil penelitian di bidang farmasi.

Pimpinan Umum
Jurnal Farmako Bahari

dr. Siva Hamdani, MARS.

Jurnal Ilmiah

Farmako Bahari

Juli 2016, Volume 7 Nomor 2

		Hal
Kata Pengantar		i
Daftar Isi		ii
Nurul Auliasari	FORMULASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA NANOPARTIKEL BERBASIS KITOSAN YANG MENGANDUNG ANTISENSE OLIGODEOKSINUKLEOTIDA BERTARGET GEN EBA-175 DAN DHS	1-13
Framesti Frisma Sriarumtias	PENGUKURAN KADAR BETAKAROTEN DAN FENOL TOTAL BUAH PEPINO KUNING (<i>Solanum muricatum</i> Aiton) PADA TINGKAT KEMATANGAN YANG BERBEDA	14-25
Farid Perdana1*, Deden WS1, Rahmi RD1	PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN JAMBU BOL (<i>Syzygium malaccense</i> (L.) Merr. & Perry), DAUN SALAM (<i>Syzygium polyanthum</i> (Wight.) Walpers), SERTA DAUN JAMBLANG (<i>Syzygium cumini</i> (L.) Skeels) ASAL ARBORETUM GARUT	26-35
Shendi Suryana	AKTIVITAS ANTIBAKTERI MADU MURNI KALIMANTAN BARAT TERHADAP BAKTERI <i>Escherichia coli</i> DAN <i>Staphylococcus aureus</i> DENGAN METODE DIFUSI AGAR	36-43
Novriyanti Lubis	ANALISIS FORMALIN PADA USUS AYAM YANG DIJUAL DI PASAR KOTA GARUT	44-52

**FORMULASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA NANOPARTIKEL BERBASIS
KITOSAN YANG MENGANDUNG ANTISENSE OLIGODEOKSINUKLEOTIDA
BERTARGET GEN *EBA-175* DAN *DHS***

Nurul Auliasari
nurul.auliasari94@gmail.com

Prodi Farmasi FMIPA
Universitas Garut

Abstrak

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. *Plasmodium falciparum* merupakan spesies yang menimbulkan dampak paling serius dari malaria. Masalah utama pada pengobatan malaria saat ini adalah terjadinya resistensi obat dan targetnya yang non-spesifik pada intraselular parasit. Pada penelitian ini dikembangkan terapi malaria menggunakan as-ODN (antisense oligodeoksinukleotida) yang spesifik terhadap gen target *eba-175* dan *dhs*. As-ODN dienkapsulasi dalam nanopartikel yang terdiri atas formula akhir nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer 10% yang dibuat dengan metode gelasi ionik. Diperoleh nanopartikel kitosan dengan ukuran 70,80-89,17 nm dan nanopartikel kitosan-poloksamer dengan ukuran 109,63-178,93 nm masing-masing dengan indeks polidispersitas kurang dari 0,5. Nanopartikel yang mengandung as-ODN diuji aktivitasnya secara in vitro dan ditentukan inhibisi pertumbuhan skizon secara mikroskopik. Inhibisi pertumbuhan skizon yang dihasilkan oleh nanopartikel kitosan bertarget *eba-175* dan *dhs* masing-masing sebesar 47,7% dan 57,2%, sementara untuk nanopartikel kitosan-poloksamer bertarget *eba-175* dan *dhs* masing-masing sebesar 58,8% dan 68,3%. Terdapat perbedaan bermakna antara as-ODN yang dienkapsulasi nanopartikel dibandingkan dengan as-ODN bebas dalam menghambat pertumbuhan skizon *Plasmodium falciparum*. Kemudian untuk melihat kesesuaian hasil uji aktivitas antimalaria secara in vitro, dilakukan isolasi RNA total *Plasmodium falciparum* menggunakan TRIzol™ LS Reagent. Persentase inhibisi pertumbuhan skizon dan penurunan konsentrasi RNA total paling tinggi diberikan oleh nanopartikel kitosan-poloksamer dengan as-ODN bertarget gen *dhs*.

Kata Kunci : Malaria, as-ODN, *Plasmodium falciparum*, *eba-175*, *dhs*

1. Pendahuluan

Malaria merupakan penyakit yang disebabkan oleh parasit dan paling tinggi prevalensinya hingga mencapai sepertiga dari populasi dunia. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi protozoa dari genus *Plasmodium* diantaranya *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium ovale*. Dari keempat spesies *Plasmodium* penyebab malaria, *Plasmodium falciparum*

merupakan spesies yang menimbulkan dampak paling serius dan bertanggung jawab terhadap kematian sebagian besar pada anak-anak (Kats dkk, 2007).

Obat yang digunakan untuk terapi penyakit malaria adalah kuinin dan artemisinin dengan target kerja pada metabolisme Heme. Namun, terapi ini memiliki kendala yaitu mudahnya terjadi resistensi obat (*multiple drug resistance*) dan targetnya yang non-spesifik pada intraselular parasit. Resistensi obat oleh parasit malaria disebabkan oleh penggunaan bentuk sediaan antimalaria yang kurang efektif dan ketersediaan hayati obat yang rendah dalam jumlah parasit yang tinggi. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan alternatif terapi untuk mengatasi penyakit malaria (Santos dkk, 2010).

Terapi berbasis asam ribonukleat menggunakan antisense oligodeoksinukleotida (as-ODN) saat ini sedang banyak dikembangkan dan as-ODN diketahui dapat menginduksi manipulasi ekspresi protein dan dapat menghambat ekspresi gen pada sekuens yang spesifik. As-ODN diketahui mempunyai target kerja yang spesifik pada gen *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan bentuk fosforotioat stabil ODN pada konsentrasi 0,005-0,5 μ M (Barker dkk., 1996).

Dalam penelitian ini, terdapat 2 gen yang dijadikan target yaitu *eba-175* (*Erythrocyte Binding Antigen-175* kDa) dan *dhs* (*deoxyhypusine synthase*). *EBA-175* adalah protein berukuran 175 kDa yang diekspresikan di bagian mikronema dari merozoit (Barker dkk, 1996). Sedangkan *dhs* merupakan gen yang mengkatalisis langkah awal pada biosintesis asam amino hypusine (Hys) pada *Plasmodium falciparum* (Schwentke dkk 2012). Penggunaan as-ODN untuk menghambat gen target pada *Plasmodium falciparum* memiliki kekurangan akibat as-ODN rentan terhadap degradasi enzimatis (Koh dkk., 2015). Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu strategi penghantaran antimalaria berbasis as-ODN yang dapat melindungi terhadap degradasi tersebut dan juga selektif pada target gen dari *Plasmodium falciparum*. Salah satu caranya adalah dengan mengenkapsulasi as-ODN dalam nanokarier.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengembangkan formula dan menguji aktivitas antimalaria nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer yang mengandung as-ODN bertarget gen *eba-175* dan *dhs*. Dimana kebenaran uji aktivitas penghambatan nanopartikel as-ODN terhadap kedua gen tersebut dilakukan dengan penentuan inhibisi pertumbuhan skizon disertai proses isolasi RNA total *Plasmodium falciparum*. Hasil dari penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi secara signifikan untuk mengatasi masalah penyakit malaria.

2. Metode Penelitian

Pada penelitian ini, diteliti aktivitas antimalaria dari nanopartikel mengandung as-ODN. Metode dalam penelitian ini merupakan metode eksperimen laboratorium dengan tahapan kerja utama meliputi preparasi nanopartikel as-ODN disalut kitosan dan kitosan-poloksamer dengan metode gelasi ionik menggunakan TPP sebagai *crosslinker agent*. Kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi terhadap nanopartikel

yang dihasilkan meliputi karakterisasi ukuran partikel dan indeks polidispersitas dengan menggunakan *particle size analyzer*.

Selanjutnya, pengujian antimalaria secara *in vitro* dilakukan pada sel darah merah yang terinfeksi *Plasmodium falciparum*. Uji aktivitas antimalaria *in vitro* nanopartikel mengandung as-ODN dilakukan pada lempeng sumur mikro dan dianalisis secara mikroskopik. Pertama-tama dilakukan pertumbuhan kultur *Plasmodium falciparum* terlebih dahulu. Pembuatan kultur dilakukan menggunakan medium yang mengandung RPMI, HEPES, serta serum darah (medium biak) yang harus diperbaharui setiap 24 jam hingga diperoleh kultur yang siap uji. Uji aktivitas kemudian dilakukan dengan menginkubasi nanopartikel dalam kultur *Plasmodium falciparum* pada lempeng sumur mikro selama 48 jam. Pertumbuhan parasit dihitung dengan cara menghitung jumlah skizon dalam 200 parasit aseksual. Persen inhibisi pertumbuhan skizon dari nanopartikel yang mengandung as-ODN kemudian dibandingkan terhadap kontrol, as-ODN bebas tanpa nanopartikel dan nanopartikel kosong.

Tahap selanjutnya dilakukan proses isolasi RNA total *Plasmodium falciparum* dengan menggunakan metode Trizol™ LS Reagent. Analisis kadar RNA total hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan alat spektrofotometer *microplate* pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

3.1 Formulasi dan Karakterisasi Nanopartikel

Berdasarkan pada target penghantaran obat yang ditujukan pada gen *eba-175* dan *dhs* dari *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi sel darah merah maka pengembangan obat yang dilakukan diharapkan dapat masuk ke dalam sel darah merah dimana diketahui ukuran diameter pori sel darah merah yaitu kurang dari 200 nm (Rothen, 2006). Oleh karena itu target ukuran nanopartikel as-ODN harus dibawah 200 nm untuk mempermudah masuknya nanopartikel ke dalam sel darah merah kemudian menuju target di *Plasmodium falciparum* (Stein dkk, 2002).

Polimer biodegradabel yang digunakan pada penelitian ini adalah kitosan dan poloksamer. Pembuatan nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer sebagai pembawa dilakukan dengan menggunakan teknik gelasi ionik. Pembentukan nanopartikel dengan teknik ini didasarkan pada interaksi antara gugus NH_2 dari kitosan yang terprotonasi dalam larutan asam membentuk NH_3^+ dengan muatan negatif dari senyawa polianion tripolifosfat (TPP) sebagai *crosslinker agent* (Tiyaboonthai, 2003).

Pembentukan nanopartikel mengandung as-ODN didasarkan pada interaksi elektrostatik antara as-ODN yang bermuatan negatif dengan muatan positif dari gugus amin yang terprotonasi kemudian disambung silangkan dengan TPP. Konsentrasi as-ODN yang digunakan yaitu 0,5 μM dengan formula nanopartikel kitosan sebagai pembawa yaitu kitosan 1,4 mg/mL dan TPP 1,47 mg/mL (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil Karakterisasi Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas Nanopartikel Kitosan

Jenis Karakterisasi	Nanopartikel Kitosan Tanpa ODN	Nanopartikel dengan ODN konsentrasi 0,5 μ M	
		<i>eba-175</i>	<i>dhs</i>
Ukuran Partikel (nm)	70,80 \pm 2,39	86,53 \pm 1,87	89,17 \pm 6,07
Indeks Polidispersitas	0,299 \pm 0,018	0,324 \pm 0,020	0,294 \pm 0,027

Pada tabel 1, hasil karakterisasi ukuran partikel menunjukkan bahwa nanopartikel yang terbentuk berada dalam rentang kriteria ukuran nanopartikel 10-1000 nm yang jika diamati secara makroskopik terlihat sebagai suatu sistem dispersi yang menyerupai larutan berwarna *opaque*. Selanjutnya, distribusi ukuran partikel dinyatakan sebagai indeks polidispersitas. Dari hasil penelitian, diperoleh indeks polidispersitas dengan rentang 0,294 hingga 0,324. Hasil ini menunjukkan bahwa nanopartikel yang dibuat memiliki kestabilan fisik yang cukup baik dimana rentang indeks polidispersitas yang dapat diterima adalah 0 sampai 0,5. Nilai indeks polidispersitas yang rendah menunjukkan bahwa sistem dispersi yang terbentuk bersifat lebih stabil dalam jangka panjang (Gao dkk, 2008).

Hasil pengukuran terhadap nanopartikel kitosan yang menjerat as-ODN pada tabel 1 menunjukkan adanya peningkatan ukuran partikel dibandingkan dengan ukuran nanopartikel kosong (tanpa as-ODN). Hal ini dapat diduga bahwa as-ODN telah terenkapsulasi di dalam matriks nanopartikel.

Seperti pada nanopartikel kitosan, pembuatan nanopartikel kitosan-poloksamer juga dilakukan dengan menggunakan teknik gelas ionik. Pada pengembangan formula nanopartikel dilakukan optimasi konsentrasi poloksamer yang digunakan saat preparasi karena adanya pengaruh dari konsentrasi poloksamer terhadap kemampuan nanopartikel untuk bersirkulasi lama di dalam darah (*long circulating*) (Husni, 2015). Mengacu pada pustaka tersebut maka dilakukan optimasi konsentrasi poloksamer untuk melihat pengaruhnya terhadap ukuran partikel yang dihasilkan. Optimasi konsentrasi poloksamer dilakukan pada berbagai konsentrasi diantaranya 30 mg/mL (3%), 50 mg/mL (5%) dan 100 mg/mL (10%) dengan konsentrasi kitosan dan TPP yang sama yaitu 1 mg/mL dan 0,75 mg/mL. Perbandingan antara kitosan-poloksamer dengan TPP adalah 5:2.

Tabel 2 Optimasi Perbedaan Konsentrasi Poloksamer

Kitosan	Konsentrasi (mg/mL)		Ukuran Partikel (nm)	Indeks Polidispersitas
	Poloksamer	TPP		
1	30	0,75	109,63 \pm 4,98	0,327 \pm 0,008
	50		117,83 \pm 1,32	0,321 \pm 0,007
	100		136,07 \pm 3,35	0,290 \pm 0,024

Berdasarkan hasil optimasi pada tabel 2, berbagai konsentrasi poloksamer yang digunakan berpengaruh terhadap ukuran partikel yang dihasilkan. Dimana pada konsentrasi poloksamer yang paling kecil (3%) ukuran partikel yang dihasilkan yaitu $109,63 \pm 4,98$, sementara pada konsentrasi yang lebih besar (5% dan 10%) ukuran partikel yang dihasilkan juga semakin besar yaitu $117,83 \pm 1,32$ dan $136,07 \pm 3,35$.

Penggunaan poloksamer sebagai salah satu polimer digunakan untuk menghindari opsonisasi oleh MPS (*Mononuclear Phagocytic System*) sehingga nanokarier dapat bersirkulasi dalam waktu yang lama dalam darah (Owens dkk, 2005). Selain itu, poloksamer merupakan triblok yang tersusun oleh gugus hidrofobik polipropilenoxide (PPO) dan gugus hidrofilik polietilenoxide (PEO) yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan kelarutan dan menstabilkan obat (Li dkk, 2008). Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi poloksamer, peningkatan konsentrasi poloksamer dapat meningkatkan ukuran partikel yang terbentuk.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Husni, 2015), poloksamer yang memberi efek *long circulating* di dalam darah adalah pada konsentrasi 5% dan 10% dimana poloksamer dapat memberikan halangan sterik pada nanokarier dan menunjukkan konsentrasi tinggi dalam darah. Hal ini pula yang menyebabkan ukuran dari nanopartikel kitosan-poloksamer lebih besar dari pada nanopartikel kitosan saja, dimana dengan adanya penyisipan poloksamer pada permukaan kitosan yang akan memberikan halangan sterik sehingga menyebabkan ukuran partikelnya meningkat. Adapun hasil karakterisasi nanopartikel kitosan-poloksamer dengan as-ODN bertarget *eba-175* dan *dhs* menunjukkan bahwa ukuran partikel yang diperoleh pada konsentrasi poloksamer 5% dan 10% sesuai dengan target yang dituju yaitu kurang dari 200 nm (Tabel 3).

Tabel 3 Karakterisasi Ukuran Partikel dan Indeks Polidispersitas Nanopartikel Kitosan-Poloksamer dengan as-ODN

Kitosan	Konsentrasi (mg/mL)			Ukuran Partikel (nm)	Indeks Polidispersitas
	Poloksamer	TPP	ODN		
1	30	0,75	<i>eba-175</i> 0,5 μ M	$128,70 \pm 4,78$	$0,320 \pm 0,016$
	50			$139,17 \pm 1,39$	$0,352 \pm 0,023$
	100			$170,43 \pm 0,48$	$0,317 \pm 0,023$
1	30	0,75	<i>dhs</i> 0,5 μ M	$124,80 \pm 2,98$	$0,210 \pm 0,026$
	50			$155,97 \pm 2,67$	$0,324 \pm 0,018$
	100			$178,93 \pm 3,36$	$0,290 \pm 0,024$

Pada tabel 3, ukuran nanopartikel yang mengandung as-ODN lebih besar daripada nanopartikel tanpa as-ODN. Hal tersebut dapat menunjukkan bahwa adanya penjeratan as-ODN dalam nanopartikel sehingga menyebabkan ukuran partikel meningkat. Selain itu, semakin besar konsentrasi poloksamer yang

digunakan maka ukuran partikel yang dihasilkan juga semakin besar. Hal ini dikarenakan semakin banyak poloksamer yang teradsorpsi pada permukaan nanopartikel kitosan sehingga diameter partikel menjadi semakin besar (Ortega dkk., 2006).

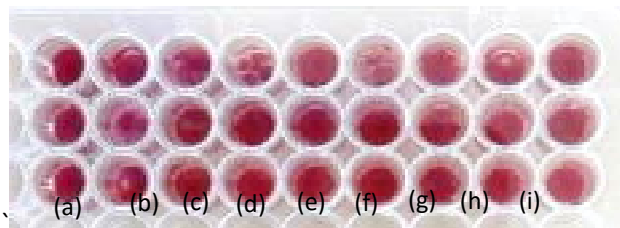
3.2 Uji Pendahuluan

Pengujian sinkronisasi kultur *Plasmodium falciparum* dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan kondisi kultur yang seragam. Dalam hal ini kondisi yang diharapkan sebagai kondisi awal pengujian adalah kultur dengan dominan fase skizon. Proses sinkronisasi ini dilakukan dengan menggunakan sorbitol 5% kemudian diinkubasi selama 54 jam dan dilakukan pengamatan secara periodik dengan interval waktu 6 jam. Berdasarkan hasil pengamatan diperoleh kondisi pada jam ke-36 dimana pada waktu tersebut kultur berada pada dominan fase skizon. Proses pada sinkronisasi dengan menggunakan sorbitol adalah lisis secara selektif yang terjadi melalui *simple osmosis shock* (Lambros-Vanderberg, 1979).

3.3 Uji Aktivitas Antimalaria Sediaan Nanopartikel

As-ODN yang digunakan ditargetkan dapat menginhibisi gen *eba-175* yang merupakan ligan merozoit dari *glycophorin A*. *Glycophorin A* diketahui sebagai reseptor utama *Plasmodium falciparum* pada eritrosit. Penghambatan gen *eba-175* akan berakibat pada penghambatan pertumbuhan parasit yang disebabkan oleh terhambatnya proses invasi merozoit pada sel darah merah dan menyebabkan penurunan jumlah parasit yang menginfeksi sel darah merah (Carvalho dkk, 2002).

Selain target gen *eba-175*, as-ODN lain yang juga digunakan pada penelitian ini adalah as-ODN target *dhs* yang diharapkan mampu menginhibisi *deoxyhypusine synthase* yang bekerja dengan mengkatalisis proses biosintesis asam amino *hypusine*. Penghambatan gen *dhs* menyebabkan hilangnya kemampuan hidup *Plasmodium falciparum* akibat terhentinya proses proliferasi sel (Liao D dkk, 1997).



Gambar 1 Uji aktivitas antimalaria

Keterangan : (a) Kultur normal *Plasmodium falciparum*; (b) ODN bebas (target *eba-175*); (c) ODN bebas (target *dhs*); (d) Nanopartikel kitosan (tanpa ODN); (e) Nanopartikel kitosan-ODN target *eba-175*; (f) Nanopartikel kitosan-ODN target *dhs*; (g) Nanopartikel kitosan-poloksamer 10% (tanpa ODN); (h) Nanopartikel kitosan-poloksamer 10%-ODN target *eba-175*; (i) Nanopartikel kitosan-poloksamer 10%-ODN target *dhs*.

Tabel 4 Rata-rata Persen Parasitemia *Plasmodium falciparum*

Perlakuan	% Parasitemia
Kontrol	15,1 ± 0,531
ODN bebas (<i>eba-175</i>)	11,0 ± 0,910 ^c
ODN bebas (<i>dhs</i>)	10,5 ± 0,838 ^c
NP-Kitosan (Tanpa ODN)	14,1 ± 0,268
NP-Kitosan ODN (<i>eba-175</i>)	7,5 ± 0,249 ^{c,z,r}
NP-Kitosan ODN (<i>dhs</i>)	5,7 ± 0,450 ^{c,z,r}
NP-Kitosan Poloksamer (Tanpa ODN)	14,0 ± 0,538
NP-Kitosan Poloksamer ODN (<i>eba-175</i>)	5,8 ± 0,735 ^{c,z,r}
NP-Kitosan Poloksamer ODN (<i>dhs</i>)	3,8 ± 0,125 ^{c,z,r}

Persen parasitemia pada jam ke-0 = 14,3%

Keterangan :

a = $p < 0,1$; b = $p < 0,05$; c = $p < 0,01$ dibandingkan terhadap kontrol

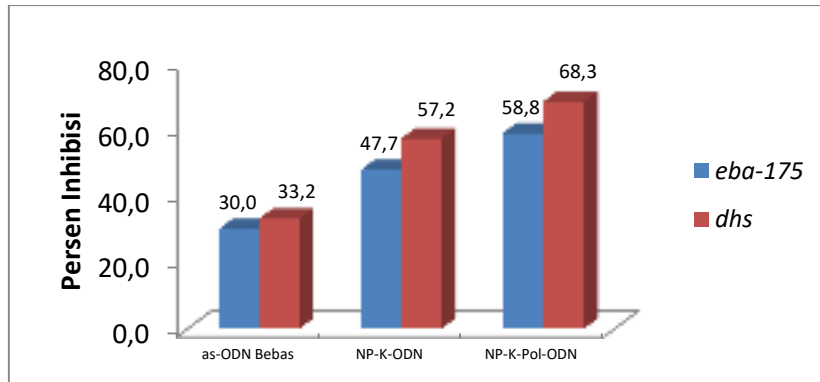
x = $p < 0,1$; y = $p < 0,05$; z = $p < 0,01$ dibandingkan terhadap nanopartikel tanpa as-ODN

p = $p < 0,1$; q = $p < 0,05$; r = $p < 0,01$ dibandingkan terhadap as-ODN bebas

Uji aktivitas antimalaria (Gambar 1) dilakukan secara *in vitro* pada kultur *Plasmodium falciparum*. Pada hari ke-0 kultur *Plasmodium falciparum* yang digunakan mempunyai persen parasitemia sebesar 14,3%. Setelah diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam, kadar parasitemia pada kontrol normal mengalami peningkatan. Sedangkan pada kultur yang diberikan perlakuan dengan penambahan as-ODN bebas, nanopartikel tanpa as-ODN dan nanopartikel dengan as-ODN mengalami penurunan kadar parasitemia.

Sehingga berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa adanya aktivitas penurunan pertumbuhan dari sel darah merah yang terinfeksi pada kultur dengan penambahan as-ODN bebas maupun as-ODN yang dienkapsulasi dalam nanopartikel dibandingkan terhadap kontrol normal. Serta as-ODN yang dienkapsulasi dalam nanopartikel dibandingkan terhadap as-ODN bebasnya dan terhadap nanopartikel kosong.

Selanjutnya pertumbuhan parasit dihitung dengan cara menghitung jumlah skizon terhadap 200 parasit aseksual. Fase hidup yang dihitung dalam penelitian ini adalah skizon yang memiliki tiga inti atau lebih. Dimana dari kondisi kultur siap uji yang terlebih dahulu dilakukan sinkronisasi lalu diinkubasi selama 36 jam kemudian diberikan beberapa perlakuan dan diinkubasi selama 48 jam, parasit akan berkembang dalam satu siklus sampai menjadi skizon kembali (Nagueira dkk, 2010).



Gambar 2 Grafik persentase inhibisi pertumbuhan skizon

Keterangan :
 NP-K-ODN : Nanopartikel Kitosan dengan as-ODN
 NP-K-Pol-ODN : Nanopartikel Kitosan-Poloksamer 10% dengan as-ODN
 as-ODN : Antisense Oligodeoksinukleotida

Persen inhibisi menyatakan besarnya penghambatan suatu obat terhadap banyaknya sel yang terinfeksi pada fase aseksual yang dilihat dari banyaknya fase skizon terhadap minimal 200 sel darah merah yang terinfeksi (fase aseksual). Berdasarkan hasil pengujian terdapat penghambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* yang diberikan oleh nanopartikel kitosan dan nanopartikel kitosan-poloksamer (tanpa as-ODN), namun secara statistik menggunakan uji *t-student* tidak berpasangan memberikan hasil tidak berbeda bermakna terhadap kontrol normal. Sehingga dapat disimpulkan bahwa nanopartikel pembawa tidak mempengaruhi kultur hidup *Plasmodium falciparum*.

Sementara itu, as-ODN bebas bertarget *eba-175* dan *dhs* secara statistik memberikan hasil berbeda bermakna terhadap kontrol normal sehingga dapat disimpulkan bahwa as-ODN bebas bertarget *eba-175* dan *dhs* mempengaruhi kultur *Plasmodium falciparum* meskipun penghambatan pertumbuhan yang dihasilkan lebih kecil dibandingkan dengan as-ODN yang dienkapsulasi dalam nanopartikel. Nanopartikel kitosan mengandung as-ODN 0,5 μ M bertarget *eba-175* dan *dhs* secara statistik memiliki perbedaan bermakna dengan as-ODN bebas bertarget *eba-175* dan *dhs*. Kemudian nanopartikel kitosan-poloksamer yang mengandung as-ODN bertarget *eba-175* dan *dhs* secara statistik juga memiliki perbedaan bermakna dengan as-ODN bebas bertarget *eba-175* dan *dhs*. Sehingga hal ini menunjukkan bahwa as-ODN yang terenkapsulasi dalam nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer memberikan efek terhadap penghambatan pertumbuhan parasite *Plasmodium falciparum* yang dilihat dari penurunan jumlah skizon parasit pada fase aseksual.

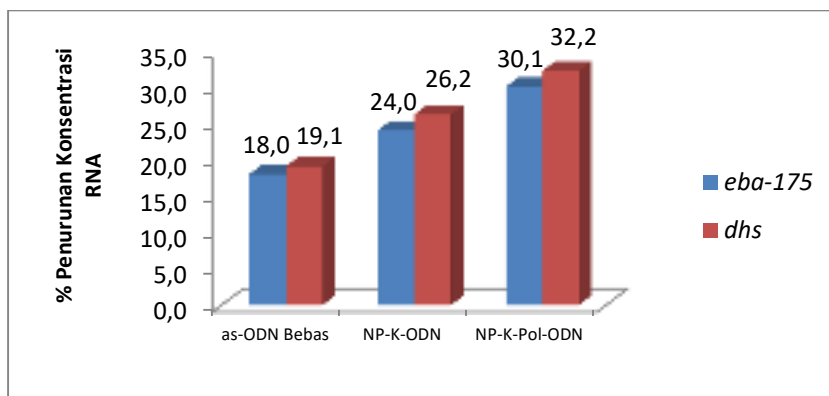
Kemungkinan mekanisme yang terjadi hingga as-ODN yang dienkapsulasi nanopartikel kitosan dapat dilepaskan pada target kerjanya dan memberikan efek penghambatan pertumbuhan parasit *Plasmodium falciparum* adalah melalui mekanisme *proton sponge effect* yang menghasilkan rusaknya membran endosomal sebagai konsekuensi dari proses protonasi kitosan pada suasana asam yang mampu meningkatkan osmolalitas di endosom (Mao dkk., 2010).

Sementara itu, penghambatan pertumbuhan parasit oleh as-ODN yang dienkapsulasi nanopartikel kitosan-poloksamer kemungkinan disebabkan oleh adanya halangan sterik dari poloksamer sehingga dapat menghambat terjadinya degradasi as-ODN, selain itu penambahan poloksamer pada nanopartikel bertujuan untuk menghindari opsonisasi oleh MPS (*Mononuclear Phagocytic System*) sehingga nanopartikel dapat bersirkulasi dalam waktu yang lama dalam darah hingga as-ODN yang terenkapsulasi dapat dilepaskan pada target kerjanya. Unit hidrofilik pada polimer ini dapat melindungi permukaan partikel dan menghindari MPS sedangkan unit hidrofobiknya akan teradsorpsi pada permukaan nanopartikel (Owens dkk., 2005).

Selanjutnya as-ODN bebas yang memberikan penghambatan lebih kecil dibandingkan as-ODN yang dienkapsulasi nanopartikel dimungkinkan karena terjadinya degradasi as-ODN oleh enzim nuklease serta protein-protein serum yang menyebabkan berkurangnya konsentrasi as-ODN bebas (tanpa nanopartikel) yang sampai pada target (Junghans dkk, 2000).

3.4 Isolasi RNA Total *Plasmodium falciparum* (TRizol™ LS Reagent)

Pengujian dilakukan pada *tissue culture testplate* (6 well) terhadap kultur *Plasmodium falciparum* yang telah dilakukan sinkronisasi dan diinkubasi selama 36 jam. Pengujian dilakukan dengan menambahkan 500 µL sediaan nanopartikel yang setara dengan 0,5 µM dan 1.250 µL kultur sel ke dalam *well plate* kemudian diinkubasi selama 48 jam. Sementara pada kontrol normal hanya berisi 1.750 µL kultur sel *Plasmodium falciparum* tanpa penambahan nanopartikel.



Gambar 3 Grafik penurunan konsentrasi RNA total *Plasmodium falciparum* terhadap kontrol normal

Keterangan :

NP-K-ODN : Nanopartikel Kitosan dengan as-ODN

NP-K-Pol-ODN : Nanopartikel Kitosan-Poloksamer 10% dengan as-ODN

as-ODN : Antisense Oligodeoksinukleotida

Konsentrasi RNA total yang diperoleh adalah berdasarkan pengukuran menggunakan alat spektrofotometer *microplate* dimana dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 260 dan 280 nm kemudian hasil yang diperoleh dinormalisasi terhadap konsentrasi total RNA sel darah merah. Adapun berdasarkan pustaka dinyatakan kemurniaan RNA semakin tinggi apabila rasio antara absorbansi pada panjang gelombang 260 nm terhadap 280 nm mendekati 2. Adapun hasil yang diperoleh pada penelitian ini, rasio absorbansi pada 260 nm dan 280 nm berada pada kisaran 1,734-1,923 yang menunjukkan kemurnian RNA yang diperoleh telah sesuai dengan pustaka.

Persentase penurunan konsentrasi RNA total *Plasmodium falciparum* pada gambar 3 menyatakan besarnya penghambatan dari as-ODN bebas maupun as-ODN yang dienkapsulasi nanopartikel terhadap jumlah RNA total kontrol normal *Plasmodium falciparum*. Berdasarkan hasil pengujian terdapat penurunan konsentrasi RNA total yang diberikan oleh as-ODN bebas, nanopartikel kitosan dan nanopartikel kitosan-poloksamer (tanpa as-ODN), serta nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer (dengan as-ODN). Adapun persentase penurunan yang dihasilkan oleh as-ODN yang dienkapsulasi oleh kedua formula nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer memberikan persentase penurunan konsentrasi RNA total yang lebih besar dibandingkan as-ODN bebas bertarget *eba-175* dan *dhs*.

4. Kesimpulan

Formula nanopartikel kitosan dan kitosan-poloksamer yang mengandung as-ODN bertarget gen *eba-175* dan *dhs* memiliki ukuran partikel kurang dari 200 nm dengan indeks polidispersitas kurang dari 0,5. Kedua jenis nanopartikel tersebut dapat menghambat pertumbuhan skizon dan menurunkan konsentrasi RNA total *Plasmodium falciparum* lebih baik daripada as-ODN bebas. Persentase inhibisi pertumbuhan skizon dan penurunan konsentrasi RNA total paling tinggi diberikan oleh nanopartikel kitosan-poloksamer dengan as-ODN bertarget gen *dhs*.

5. Daftar Pustaka

1. Agnihotri, S,A., Mallikarjuna, N,N., dan Aminabhavi, T, M., (2004): Recent Advances on Chitosan-Based Micro and Nanoparticles in Drug Delivery, *Journal of Controlled Release*, **100**: 5–28.
2. Barker, RH., Metelev, V., Rapaport, E., dan Zamecnik, P., (1996): Inhibition of *Plasmodium falciparum* Malaria using Antisense Oligodeoxynucleotides, *PNAS* **93**: 514-518.

3. Bhumkar, DR dan Pokharkar, VB., (2006): Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note, *AAPS Pharm Sci Tech*, **7**(2).
4. Carvalho, LJM., Daniel-Ribeiro CT., dan Goto, H., (2002): Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects, *Scand J Immunol*, **56**, 327-343.
5. Coltel, N., Combes, V., dan Hunt, N.H., (2010): Cerebral malaria-a neurovascular pathology with many riddles still to be solved, *Curr. Neurovasc*, **1**, 91-110.
6. Cowman, A, F., Triglia, T., Maier, A, G., dan Duraisingh, M, T., (2003): Erythrocyte-Binding Antigen 175 Mediates Invasion in *Plasmodium falciparum* Utilizing Sialic Acid-Dependent and –Independent Pathway, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia, *PNAS*, **100 (8)**: 4796-4801.
7. Cowman, A, F., Berry, D., dan Baum, J., (2012): The Cellular and Molecular Basis for Malaria Parasite Invasion of The Human Red Blood Cell, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia, *JCB: Review*, **198 (6)**: 961-971.
8. Gao, H dan Matyjaszewski K, (2008): Synthesis of low-polydispersity miktoarm star copolymer via a simple “arm-first” method: macromonomers as arm precursors, *Macromolecules* **41**, 4250–4257.
9. Greenwood BM, DA Idock, de Kyle, SHI Kappe, PL Alenso, FH Collins, dan PE Duffy, (2008): Malaria: progress, perils, and prospects for eradication, *J.Clin Invest*, **118**:1266-1276.
10. Gupta RB, dan Kompella, (2006): Nanoparticle technology for drug delivery, London, *Taylor and Francis Group*, 21-99.
11. Hosseinzadeh, H., Atyabi, F., Dinarvand, R., dan Ostad, S, N., (2012): Chitosan-Pluronic Nanoparticles as oral Delivery of Anticancer Gemcitabine: Preparation and In Vitro Study, Nanotechnology Research Center, Iran, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 1851-1863.
12. Husni, P., (2015): Studi Farmakokinetik dan Biodistribusi Nanokarier PLGA-poloksamer Berlabel Fluoresen Quantum Dot pada Mencit. *Tesis Magister Farmasi, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung*.
13. Junghans, M., Kreuter, J., dan Zimmer, A., (2000): Antisense Delivery using Protamine-Oligonucleotide Particles, *Nucleic Acids Res*: **28**, E45.
14. Kats LM., Brian, M., Cooke, Ross L., Coppel dan Casilda G, Black., (2007): Protein Trafficking to Apical Organelles of Malaria Parasites-Building an Invasion Machine, *Journal compilation Traffic*, **9**, 176-186.
15. Koh, CG., Zhang, X., Liu, S., Golan, S., Yu, B., Yang, X., Guan, J., Jin, Y., Talmon, Y., Muthusamy, N., Chan, K., John, C., Byrd, J., Lee, RJ., Marcucci, G., dan Lee, J., (2010): Delivery of antisense oligodeoxyribonucleotide lipopolyplex nanoparticles assembled by microfluidic hydrodynamic focusing, *J Control Release* **141**, 62–69.

16. Krettli AU, VF Andrade-Neto, M. G.L. Brandao dan W.M.S. Ferrari, (2001): The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: A Review, *Mem. I. Oswaldo Cruz*, **(96)**, 1033-1042.
17. Lambros, C., dan Vanderberg, JP., (1978): Synchronization of *Plasmodium falciparum* Erythrocytic Stages in Culture, *J. Parasitol*, **65** (3), 418-420.
18. Li, L., Lim, LH., Wang, Q., dan Jiang, S., (2008): Thermoreversible micellization and gelation of a blend of pluronic polymers, *Polymers*, **49**, 1952-1960.
19. Liao, D., Wolff EC., Park, MH., dan Davies, DR., (1998): Crystal Structure of the NAD Complex of Human Deoxyhypusine synthase: an Enzyme with a Ball and Chain Mechanism for Blocking the Active Site, *PubMed* **6**, 23-32.
20. Magalhaes NS, Mosquera VCF, (2010): Nanotechnology applied to the treatment of malaria, *Adv. Drug Deliv. Rev*, **62**: 560-575.
21. Mao, S., Sun, W., dan Kissel, T., (2009): Chitosan-Based Formulations for Delivery of DNA and siRNA, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **62**, 12-27.
22. Mohanraj, V. J. dan Chen, Y. (2006): Nanoparticles – A Review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **5**, 561-573
23. Mohanty, S., Patel, D, K., Pati, S, S., dan Mishra, S, K., (2006): Adjuvant Therapy in Cerebral Malaria, *Ind. J. Med. Res*, **124**: 245-260.
24. Nagueira, F., dan Rosario, VE., (2010): Methods for assessment of antimalarial activity in the different phases of the *Plasmodium* life cycle, *Rev Pan-Amaz Saude*, **1**(3), 109-124.
25. Njuguna JT, Nassar M, Hoerauf A, dan Kaiser AE, (2006): Cloning, expression and functional activity of deoxyhypusine synthase from *Plasmodium vivax*. *BMC Microbiol*, **6**: 91–96.
26. Ortega, M.J., Reyes, A.B., dan Gonzalez, D.B., (2006): Colloidal Stability of Pluronic F68-Coated PLGA Nanoparticles: A Variety of Stabilisation Mechanism, *Journal of Colloid and Interface Science*, **302**: 522-529.
27. Owens, D.E dan Peppas, N.A, (2005): Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles, *Int J Pharm* **307**, 93–102.
28. Rawat, M., Singh, D., dan Saraf, S., (2006): Nanocarriers: Promising Vehicle for Bioactive Drugs, *Biol. Pharm. Bull*, **29** (9): 1790-1798.
29. Rothen B, (2006): Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques, *Environ Sci Technol* **40**(14): 4353-4359.
30. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., dan Quinn, M. E. (2009): Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Ed. Pharmaceutical Press, London, 159-161, 656-657.
31. Stein, C., dan Krieg, A., (1994): Problems in interpretation of data derived from in vitro an in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides, *Antisense Res Dev*, **4**, 67-69.
32. Santos-Magalhaes, N.S., dan Mosquera, V.C.F., (2010): Nanotechnology Applied to The Treatment of Malaria, *Adv. Drug Deliv. Rev*, **62**, 560-575.
33. Schwentke, A., Krepstakies, M., Mueller, AK., Kamper, CH, Motaal, BA., Bernhard, T., Hauber, J., dan Kaiser, A., (2012): In vitro and in vivo silencing of

plasmodial dhs and elf-5a genes in a putative, non-canonical RNAi-related pathway, *BMC Microbiol*, **12**, 1-13.

34. Tiyafoonchai, W., (2003): Chitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery, *Naresuan University Journal*, **11**, 51.
35. Winstanley, P dan Ward, S., (2006): Malaria Chemotherapy, *Advance Parasitology*, **61**: 47, 76.

PENGUKURAN KADAR BETAKAROTEN DAN FENOL TOTAL BUAH PEPINO KUNING (*Solanum muricatum* Aiton) PADA TINGKAT KEMATANGAN YANG BERBEDA

Framesti Frisma Sriarumtias
Email : framestifs@gmail.com

Prodi Farmasi FMIPA
Universitas Garut

Abstrak

ABSTRAK. Penelitian mengenai pengukuran aktivitas antioksidan serta penetapan kadar betakaroten dan fenol total ekstrak etanol buah pepino kuning (*Solanum muricatum* Aiton) pada tiga tingkat kematang berbeda telah dilakukan. Tingkat kematangan ditentukan berdasarkan perbedaan warna buah pepino (hijau, kekuningan, dan kuning). Buah pepino segar diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Penetapan kadar betakaroten dilakukan dengan mengekstraksi sampel dengan n-heksana dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 450 nm. Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan bantuan Reagen *Follin-Ciocalteau* dan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm. Pengukuran kadar betakaroten dan fenol total menunjukkan bahwa kadar tertinggi betakaroten dan fenol total terdapat pada buah kuning yaitu sebesar $12 \times 10^{-3}\%$ and 0,49% berturut-turut. Pengukuran aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa nilai EC_{50} tertinggi terdapat pada buah pepino kekuningan, yaitu sebesar 1198,89 ppm.

Kata Kunci: *Solanum muricatum* Aiton , Buah pepino kuning, betakaroten, fenol total, aktivitas antioksidan, *Follin-Ciocalteau*, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)

1. Pendahuluan

Seiring dengan berkembangnya isu *back to nature*, pemanfaatan sumber daya alam oleh masyarakat semakin meningkat, baik itu sebagai makanan, obat-obatan, suplemen dan vitamin. Salah satu bahan alam yang diketahui memiliki potensi sebagai antioksidan adalah buah pepino (*Solanum muricatum* Aiton). Pepino adalah tumbuhan asli Amerika Selatan, pada daerah tropis dan subtropis di Andes, yang telah tumbuh sejak zaman prasejarah (Prohens et al, 1966a 264-265, Heiser and Anderson 1999: 379-384).

Di Indonesia, pepino belum dikenal luas oleh masyarakat, penelitian yang menjelaskan tentang manfaat dari pepino sendiri masih jarang dilakukan. Lain halnya dengan di Amerika, pepino dinobatkan sebagai *super fruit*, buah dengan berbagai

manfaat. Pepino banyak diteliti di Turki, Spanyol, India, dan Polandia. Sedangkan penelitian di Indonesia hanya berkisar di daerah Malang, Jawa Timur.

Setiap 100 gram pepino mengandung vitamin C 25,1 mg; protein 0,6 g; betakaroten 26,6 mg dan asam sitrat (IPGRI, 2004:ix). Dalam penelitian Gonzalez (2000: 83), diketahui bahwa pepino digunakan untuk berbagai keperluan konsumsi dengan tingkat kematangan yang berbeda. Jika akan dikonsumsi sebagai sayuran maka digunakan buah pepino yang masih hijau, untuk dikonsumsi sebagai salad digunakan buah yang saat terjadi perubahan antara hijau ke kuning, sedangkan sebagai makanan penutup digunakan buah yang berwarna kuning. Dalam penelitian tersebut, juga menyatakan bahwa terdapat perbedaan kandungan kimia pada tingkat kematangan buah pepino antara *sweet long pepino* (pepino ungu) dan *sweet round pepino* (pepino kuning), baik dalam keadaan mentah, setengah masak, atau masak.

Hal ini yang mendasari dilakukannya penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan buah pepino. Aktivitas antioksidannya diuji pada tingkat kematangan yang berbeda. Dasar pengambilan pengujian pada kematangan berbeda yaitu karena penggunaan yang berbeda pada setiap kematangannya. Selain menguji aktivitas antioksidan, juga dilakukan identifikasi terhadap senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa fitokimia tersebut yaitu betakaroten dan fenol total.

Penelitian ini diharapkan mampu mengenalkan manfaat buah Pepino kuning yang belum diketahui oleh masyarakat luas. Diharapkan dari penelitian ini mampu memaksimalkan manfaat yang terkandung didalamnya. Penelitian ini juga untuk meningkatkan daya jual pepino. Manfaat lain juga agar mendorong lahirnya produk farmasi dari pepino serta meningkatkan taraf perekonomian petani pepino.

2. Metode Penelitian

Tahap penelitian meliputi penyiapan bahan, penetapan parameter standar ekstrak, penapisan fitokimia, ekstraksi, penetapan kadar betakaroten dan fenol total serta pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tumbuhan dan pengolahan bahan. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah pepino kuning (*Solanum muricatum* Aiton) yang diambil dari tingkat kematangan yang berbeda (warna hijau, hijau kekuningan, dan kuning).

Determinasi dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Pengolahan bahan meliputi sortasi, pencucian, pengeringan bahan, sortasi kering dan penggilingan.

Karakterisasi ekstrak meliputi pemeriksaan makroskopik dan mikroskopik, pengujian parameter non spesifik yaitu penetapan kadar abu total. Pengujian parameter spesifik meliputi penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol, dan uji organoleptik.

Penapisan fitokimia meliputi uji senyawa polifenolat, flavonoid, tanin, kuinon, monoterpen dan sesquiterpen, saponin, alkaloid, triterpenoid dan steroid dilakukan terhadap ekstrak buah pepino. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi

menggunakan pelarut etanol 95% selama 3 x 24 jam, dan dilakukan penggantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak cair yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator*.

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan metode Follin-Ciocalteu dengan standar pembanding asam galat. Penetapan kadar betakaroten dilakukan dengan mengekstraksi betakaroten dengan pelarut n heksan kemudian diukur dengan spektrofotometri UV – Cahaya Tampak pada panjang gelombang 450 nm.

3. Hasil penelitian dan pembahasan

3.1 Determinasi

Buah pepino yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perkebunan Kampung Ciburial RT 02 RW 02 Desa Karangmulya, Kecamatan Malangbong, Kabupaten Garut, Jawa Barat. Determinasi yang dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung menyatakan bahwa tanaman yang digunakan benar *Solanum muricatum* Ait. Nama umum Pepino (Indonesia), *melon pear* dan *melon shrub* (Inggris) (Bailey, 1990 ; Cronquist, 1981).

3.2 Pemeriksaan makroskopis

Sampel buah pepino segar dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan tingkat kematangannya yaitu kelompok hijau, kekuningan, dan kuning. Pemeriksaan makroskopis dilakukan terhadap ciri fisik berupa bentuk, warna kulit, warna daging dan ukuran buah. Pemeriksaan makroskopis juga meliputi uji organoleptis buah segar berupa bau, rasa, dan tekstur buah.




Hasil pemeriksaan makroskopik sampel kelompok buah hijau, hijau kekuningan, dan kuning menunjukkan adanya perbedaan warna pada daging serta kulit buah, bentuk fisik dari buah pepino yaitu bulat telur (oval). Lurik pada kulit buah serta warna dagingnya.

Secara organoleptis terdapat perbedaan bau, rasa dan tekstur pada kematangan yang berbeda. Bau khas pada buah hijau dan hijau kuning kurang tercium dibandingkan dengan buah kuning yang bau khasnya sangat terasa.

Selain perbedaan bau, ketiga kelompok sampel menunjukkan rasa yang berbeda pula. Rasa pada buah hijau cenderung hambar dan dingin, pada buah hijau kekuningan rasa manis mulai terasa tetapi masih hambar, sedangkan pada buah kuning rasa manis dan dingin mendominasi.

Tekstur pada ketiga kelompok buah pepino ini juga berbeda, tekstur buah hijau masih renyah, pada buah hijau kekuningan mulai lembut tetapi masih terasa keras, sedangkan pada buah kuning teksturnya sangat lembut.

Tabel 3.1. Hasil pemeriksaan makroskopis buah pepino dengan tiga tingkat kematangan yang berbeda

Hijau Panjang : 7,85 cm Lebar : 5,22 cm	Hijau kuning Panjang : 9,76 cm Lebar : 6,11 cm	Kuning Panjang : 10,48 cm Lebar : 7,33 cm
		
		

Buah pepino kuning berbentuk bulat telur, berwarna hijau saat muda dan berwarna kuning saat tua. Terdapat lurik ungu yang membujur dipermukaan kulit buah, lurik ungu muncul ketika buah mulai matang dan berwarna kuning. Saat muda (hijau) belum muncul lurik-lurik ungu.

Dari segi ukuran penambahan ukuran dan berat terus bertambah dari buah hijau sampai kuning. Perubahan kematangan juga ditandai dengan munculnya lurik ungu dan perubahan warna kulit menjadi kuning.

3.3 Pemeriksaan mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan terhadap tiga kelompok buah pepino kuning dengan menggunakan beberapa reagen yaitu I_2KI , Kloralhidrat, dan Phloroglucinol HCl. Bagian buah yang diamati yaitu mesokarp.

Pada buah hijau Nampak terlihat butiran pati yang jelas dengan lamella dan hilus dengan reagen I_2KI . Sedangkan dengan menggunakan reagen kloral hidrat terlihat jaringan parenkim di semua bagian. Parenkim merupakan bagian khas dan selalu ada di setiap bagian buah. Pada buah kekuningan dan kuning dengan reagen I_2KI , Kloralhidrat, dan Phloroglucinol HCl hanya terlihat jaringan parenkim di semua bagian.

3.4 Parameter standar non spesifik

Parameter standar non spesifik dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak etanol buah pepino kuning. Parameter standar non spesifik bertujuan untuk mengetahui kemurnian dan kontaminasi pada bahan. Pada penelitian ini penetapan parameter standar non spesifik yang dilakukan yaitu penetapan kadar abu total dan bobot jenis.

3.5 Parameter standar spesifik

Parameter standar spesifik dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak yaitu uji organoleptik, sedangkan yang hanya dilakukan pada simplisia meliputi kadar sari larut air dan larut etanol yang bertujuan untuk menetapkan jumlah senyawa yang terlarut dalam air maupun etanol.

Tabel 3.2. Hasil penetapan parameter standar simplisia dan ekstrak

Parameter	Hasil (%)					
	Hijau		Hijau Kekuningan		Kuning	
	Simplisia	Ekstrak	Simplisia	Ekstrak	Simplisia	Ekstrak
Kadar Abu Total	0,33	-	0,33	-	0,335	-
Bobot Jenis	-	1,3695	-	1,386	-	1,387
Kadar Sari larut air	2,85	-	2,99	-	3,29	-
Kadar sari larut Etanol	3,982	-	3,515	-	3,16	-

3.6 Penapisan fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa alkaloid, senyawa polifenolat, flavanoid, saponin, tanin, kuinon, monoterpenoid dan seskuiterpenoid, dan steroid/triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak (Farnsworth, 1966:244). Penapisan fitokimia dilakukan terhadap buah segar dan ekstrak.

Tabel 3.3. Pengamatan penapisan fitokimia

No	Pengujian	Hijau		Kekuningan		Kuning	
		Simplisia	Ekstrak	Simplisia	Ekstrak	Simplisia	Ekstrak
1	Alkaloid	Dragendorf	√	√	√	√	√
		Mayer	-	-	-	-	-
2	Polifenol	√	√	√	√	√	√
3	Flavanoid	-	-	-	-	-	-
4	Tanin	FeCl ₃	√	√	√	√	√
		Gelatin	-	-	-	-	-
5	Kuinon	-	-	-	-	-	-
6	Saponin	-	-	-	-	-	-
7	Mono dan seskuiterpen	-	-	-	-	-	-
8	Triterpen dan Steroid	Steroid	Steroid	Steroid	Steroid	Steroid	Steroid

3.7 Ekstraksi dan rendemen ekstrak

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi, dimana bahan diekstrak pada suhu kamar dan dilakukan penggantian pelarut secara berkala. Keuntungan utama cara ini merupakan ekstraksi yang mudah karena ekstrak tidak dipanaskan sehingga kemungkinan kecil bahan alam menjadi terurai. Ekstraksi dengan cara dingin memungkinkan banyak senyawa terekstraksi, meskipun beberapa senyawa memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut ekstraksi pada suhu kamar (Heinrich, 2005 : 118).

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi yaitu etanol 70 %, merujuk pada penelitian Husnah, 2005 yaitu Identifikasi dan Uji Aktivitas Golongan Senyawa Antioksidan Ekstrak Kasar Buah Pepino (*Solanum muricatum* Ait.) Berdasarkan Variasi Pelarut dan pelarut yang memberikan hasil baik yaitu etanol 70%.

Selama proses ekstraksi berlangsung cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang banyak mengandung zat aktif dan zat aktif tersebut akan larut dalam cairan penyari sehingga penyari yang masuk ke dalam sel akan mengandung zat aktif. Sementara itu, penyari yang berada di luar sel belum mengandung zat aktif sehingga menimbulkan perbedaan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel yang akan menimbulkan gaya difusi. Larutan yang terpekat akan keluar untuk mencapai keseimbangan konsentrasi antara zat aktif di dalam dan di luar sel. Proses keseimbangan ini akan berhenti, setelah terjadi keseimbangan konsentrasi atau telah mencapai kondisi jenuh. Dalam kondisi ini zat aktif di dalam dan di luar sel akan memiliki konsentrasi yang sama (Voigt 1994).

Ekstraksi dilakukan pada bahan alam bertujuan untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung dalam bahan alam tersebut. Prinsip ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat yang terlarut ke dalam pelarut sehingga terjadi perpindahan pada lapisan antar muka dan berdifusi masuk ke pelarut (Harbone 1996).

Setelah didapat ekstrak pekat, hasil rendemen menunjukkan sampel hijau dengan 2 Kg buah segar menjadi 81,659 g dengan rendemen 4,08 %. Sampel buah kekuningan dengan 3 kg buah segar menjadi 147,809 g dengan rendemen 4,93%. Sedangkan sampel buah kuning dengan 3 kg buah segar menghasilkan ekstrak pekat sebesar 150,486 g dengan rendemen ekstrak 5,016%.

Tabel 3.3. Rendemen ekstrak

Sampel	Berat Simplisia (g)	Berat ekstrak pekat (g)	Rendemen ekstrak (% b/b)
Hijau	2000	81,659	4,08
Hijau kekuningan	3000	147,809	4,93
Kuning	3000	150,486	5,016

3.8 Penetapan kadar fenol total

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan reagen *Follin-Ciocalteu* (Lee *et al.*, 2003). Prinsip kerja dari Reagen *Follin-Ciocalteu* berdasarkan reaksi oksidasi – reduksi. Reagen *Follin-Ciocalteu* terdiri dari asam fosfomolibdat dan asam fosfotungstat yang akan tereduksi oleh polifenol menjadi molybdenum-tungsten. Pengoksidasi berupa larutan kuning, senyawa fenolik dalam sampel dioksidasi oleh molibdotungstate yang merupakan komponen dari Reagen *Follin-Ciocalteu* sehingga berubah menjadi warna biru. Reaksi *Follin Ciocalteu* dengan fenol berlangsung lambat pada suasana asam, sehingga perlu penambahan natrium bikarbonat agar terbentuk suasana basa sehingga reaksi menjadi lebih cepat.

Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksil fenolik. Semua senyawa fenolik termasuk fenol sederhana dapat bereaksi dengan reagen Folin Ciocalteu, walaupun bukan penangkap radikal (antiradikal) efektif (Huang *et al.* 2005). Adanya inti aromatis pada senyawa fenolik dapat mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat menjadi molibdenum yang berwarna biru (Sudjadi dan Rohman 2004).

Perhitungan kadar polifenol dalam sampel

$$\% \text{ Polifenol} = \frac{C}{\text{mg sampel}} \times 100$$

Pembanding yang digunakan yaitu asam galat (3, 4, 5-*trihydroxybenzoic acid*). Asam galat termasuk dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Lee *et al.* 2003). Pengukuran kadar fenol total dilakukan terhadap tiga sampel buah pepino kuning. Hasil yang diperoleh sampel hijau sebesar 0,35%, sampel kekuningan sebesar 0,36%, dan sampel kuning sebesar 0,49%.

Buah pepino kuning sendiri sangat mudah teroksidasi. Setelah dilakukan pengupasan kulit dan berinteraksi dengan udara, dalam beberapa menit terjadi perubahan warna daging buah menjadi cokelat. Hal ini bisa dikarenakan fenol yang terkandung dalam buah pepino kuning telah teroksidasi.

Sedikitnya kadar fenol total pada buah pepino bisa disebabkan oleh berbagai hal selama proses pengolahan. Sifat fenol yang mudah teroksidasi bisa menjadi penyebab berkurangnya fenol. Saat berinteraksi dengan udara fenol akan teroksidasi dengan mudah, hasil oksidasi ditandai dengan perubahan warna menjadi cokelat. Dengan oksidasi ini akan mengurangi kadar fenol pada buah pepino kuning.

Proses pengolahan yang dilakukan banyak terpapar udara, saat pengupasan, pemotongan dan saat akan diolah menjadi bubur buah bahan sering terpapar udara. Saat sudah menjadi bubur buah, sampel berubah warna

menjadi cokelat. Hal ini mengindikasikan bahwa banyak senyawa fenol yang teroksidasi.

Fenol bersifat asam, karena sifat gugus –OH yang mudah melepaskan diri. Karakteristik lainnya adalah kemampuan membentuk senyawa kelat dengan logam, mudah teroksidasi dan membentuk polimer yang menimbulkan warna gelap. Timbulnya warna gelap pada bagian tumbuhan yang terpotong atau mati disebabkan oleh reaksi ini, hal ini sekaligus menghambat pertumbuhan tanaman (Pratt dan Hudson, 1990).

Dalam tumbuhan yang mengandung fenol, terdapat enzim polifenol oksidase (PPO). PPO adalah enzim oksidatif golongan protein yang mengandung logam tembaga yang secara merata tersebar luas di dalam tanaman. Lepasnya logam tersebut menyebabkan denaturasi enzim secara *reversible* bila kondisi kembali normal. Enzim ini berperan dalam perubahan warna menjadi cokelat dan penurunan kadar dari beberapa senyawa.

Perubahan warna menjadi cokelat akibat enzim ini terjadi karena adanya jaringan tanaman yang terluka, misalnya pemotongan, penyikatan, dan perlakuan lain yang dapat mengakibatkan kerusakan integritas jaringan tanaman. Adanya kerusakan jaringan seringkali mengakibatkan enzim kontak dengan substrat. Enzim yang bertanggung jawab dalam reaksi pencoklatan enzimatis adalah oksidase yang disebut PPO. Substrat untuk PPO dalam tanaman biasanya asam amino tirosin dan komponen polifenolik seperti katekin, asam kafeat, pirokatekol/katekol dan asam klorogenat. Tirosin yang merupakan monofenol, pertama kali dihidroksilasi menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin dan kemudian dioksidasi menjadi quinon yang akan membentuk warna coklat (Cheng & Crisosto, 1995).

Pencoklatan (*browning*) merupakan proses pembentukan pigmen berwarna kuning yang akan segera berubah menjadi coklat gelap (Rahmawati, 2008). Pembentukan warna coklat ini dipicu oleh reaksi oksidasi yang dikatalisis oleh enzim fenol oksidase atau polifenol oksidase. Kedua enzim ini dapat mengkatalis oksidasi senyawa fenol menjadi quinon dan kemudian dipolimerasi menjadi pigmen melaniadin yang berwarna coklat (Mardiah, 1996).

Walaupun hasil yang diperoleh sangat kecil, tapi bisa disimpulkan bahwa kadar fenol pada kelompok buah kuning lebih besar dibandingkan kelompok lain yaitu sebesar 0,49%.

3.9 Penetapan kadar betakaroten

Penetapan kadar betakaroten yang dilakukan dalam penelitian ini mengikuti prosedur De Ritter dan Purcell dalam penelitian Ndawula, 2004 dengan modifikasi. Penggunaan n-heksana yang bersifat non polar dimaksudkan untuk memaksimalkan proses ekstraksi betakaroten. Betakaroten merupakan senyawa non polar yang akan mudah tertarik apabila dilarutkan dalam pelarut non polar. Hal ini berdasarkan pada prinsip *like dissolve like*, dimana senyawa akan terlarut pada pelarut yang memiliki kesamaan sifat.

Perhitungan Kadar Betakaroten dalam sampel

$$\text{Kadar betakaroten (\%)} = \frac{c (\mu\text{g/mL}) \times V (\text{mL})}{g (\mu\text{g})} \times 100\%$$

Berdasarkan pengukuran diperoleh penetapan kadar betakaroten pada buah pepino kuning sampel hijau adalah $6,384 \times 10^{-3}$ %, sampel kekuningan $8,145 \times 10^{-3}$ %, dan sampel kuning 12×10^{-3} %.

Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa kandungan betakaroten dalam buah pepino sangat kecil. Dari ketiga kelompok sampel yang memiliki kandungan betakaroten terbesar yaitu sampel kuning yaitu sebesar 12×10^{-3} %.

Kadar betakaroten yang rendah bisa diakibatkan karena kerusakan selama proses pengolahan, dimana betakaroten dapat terdegradasi pada suhu tinggi dan oksidasi (Eskin, 1979). Proses pertanian juga dapat mempengaruhi komposisi karotenoid. Misalnya, perlakuan pada lahan pertanian dengan menggunakan bahan kimia, penelitian menunjukkan bahwa kadar karotenoid pada sampel lebih besar dengan perlakuan alami tanpa bahan kimia (Mercadante dan Rodriguez-Amaya 1991).

Perubahan atau hilangnya karotenoid selama pengolahan dan penyimpanan terjadi melalui kerusakan fisik (misalnya, mengupas), isomerisasi geometrik, dan enzimatis atau oksidasi non-enzimatis (Rodriguez-Amaya 1999b, 2002).

Menurut Rodriguez-Amaya, 1997 banyak hal yang bisa menyebabkan berkurangnya kadar betakaroten. Dari segi pengolahan sampai penyimpanan. Biosintesis karotenoid dapat terus, meningkatkan kandungan karotenoid, buah-buahan, sayuran buah, dan akar tanaman bahkan setelah panen, asalkan tanaman tetap utuh, menjaga enzim untuk carotenogenesis. Dalam daun dan sayuran, degradasi pasca panen karotenoid mungkin akan besar, terutama pada suhu penyimpanan yang tinggi dan di bawah kondisi yang mempercepat layu.

Karotenoid secara alami dilindungi dalam jaringan tanaman; memotong, merobek-robek, memotong, dan peningkatan paparan oksigen dan mempertemukan karotenoid dan enzim yang mengkatalisis oksidasi karotenoid.

Penyebab utama kerusakan karotenoid selama pengolahan dan penyimpanan enzimatis atau nonenzimatis yaitu oksidasi. Isomerisasi trans-karotenoid ke cis-isomer, terutama selama perlakuan panas, mengubah aktivitas biologis dan perubahan warna.

Apapun metode pengolahan, karotenoid berkurang dengan waktu pengolahan yang lebih lama, suhu pengolahan yang lebih tinggi, dan memotong atau penghalusan. Secara signifikan kadar karotenoid bisa ditingkatkan dengan mengurangi waktu pemrosesan, menurunkan suhu, dan memperpendek jeda waktu antara mengupas, memotong, atau menghaluskan bahan dan pengolahan. Proses pengolahan seperti jus mengakibatkan kehilangan

karotenoid dalam jumlah besar dibandingkan dengan pemanasan (Rodriguez-Amaya, 2004)

Selain dipengaruhi oleh kerusakan yang mungkin terjadi selama proses pengolahan juga dilihat dari warna yang terbentuk dari buah pepino. Dari pengamatan makroskopis dilihat bahwa warna kuning yang paling mencolok yaitu pada sampel kuning, sedangkan pada sampel kekuningan dan hijau warna kuning masih belum mencolok. Sebagaimana diketahui bahwa karotenoid sebagai suatu zat warna kuning sampai merah (Karrer dan Jucker, 1950 dalam Muchtadi, 1992). Sehingga dari pengamatan makroskopis dari segi warna daging buah, dapat diprediksi perbedaan kandungan kandungan betakaroten secara kualitatif.

Penggunaan pelarut dalam proses ekstraksi juga berpengaruh dalam penarikan betakaroten pada sampel. Betakaroten memiliki sifat non polar sehingga baik apabila diekstraksi menggunakan pelarut non polar. Sedangkan pada penelitian kali ini pelarut yang digunakan yaitu etanol 70% sehingga ada kemungkinan betakaroten tidak terekstraksi secara sempurna.

4. Kesimpulan dan saran

Dalam penelitian ini dapat diperoleh hasil berupa kadar fenol total, kadar betakaroten, dan aktivitas antioksidan buah pepino kuning pada tingkat kematangan yang berbeda. Selain itu mengetahui secara kualitatif senyawa yang terkandung dalam buah pepino kuning melalui skrining fitokimia.

Hasil skrining fitokimia buah pepino kuning ketiga sampel tidak ada perbedaan. Senyawa yang dikandung secara kualitatif sama, yaitu alkaloid, polifenol, tanin dan steroid.

Walaupun hasilnya sangat kecil, ta[i bisa ditarik kesimpulan bahwa kadar fenol total dan betakaroten terbesar yaitu pada tingkat kematangan yang masak (kuning) masing-masing sebanyak 0,49% dan $12 \times 10^{-3} \%$.

5. Daftar Pustaka

1. Bailey, L.H. 1960. *The standard cyclopedia of Horticulture*. Volume III-P-Z. The Macmillan Company, New York
2. Cheng, G.W. and C.H. Crisosto. 1995. *Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue*. Journal of the American Society for Horticultural Science 120(5)
3. Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York
4. Eskin, N. A. M. 1979. *Plant pigments, flavors, and textures: The chemistry and biochemistry of selected compounds*. Academic Press (New York)
5. Farnsworth, N.R. (1966). *Biological and Phytochemical Screening Of Plants*. Journal Of Pharmaceutical Sciences, Vol. 55. No. 3

6. Gonzalez, Mercedes et al. 2000. " *Colour And Composition Of Improved Pepino Cultivar At Three Ripening Stages*". Universidad Politecnica de Valencia, Spain
7. Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokomia Penuntun cara Modern menganalisis tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung
8. Harborne, J.B. 2006. *Metode Fitokomia Penuntun cara Modern menganalisis tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung
9. Heinrich, Michael et al. 2005. *Farmakognosi dan Fitoterapi*. Jakarta : Penerbit buku kedokteran EGC
10. Heiser C., Anderson G., 1999. *New" Solanums [In:] Perspectives on new crops and new uses*. J. Janick (Ed.) ASHS Press, Aleksandria, VA
11. Huang, D. Ou, B. dan Prior, R.L. 2005., *The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays*. Journal of Agricultural and Food Chemistry
12. Husnah, Muhibbatul et al. 2009. " *Identifikasi Dan Uji Aktivitas Golongan Senyawa Antioksidan Ektrak Kasar Buah Pepino (Solanum Muricatum Ait.) Berdasarkan Variasi Pelarut*". Jurusan Kimia Fakultas Sains dan teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang
13. IPGRI. 2004. *Descriptor of pepino, Solanum muricatum*. International Plant Genetic Resource Institute, ISBN 92-9043-616-6
14. Karrer, Paul and Ernst Jucker. 1950. *Carotenoids*. New York, Elsevier
15. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY, 2003. *Cocoa Has More Phenolic Phytochemical and A Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine*, J. Agric. Food Chem, 51 (25)
16. Mercadante AZ, Rodriguez-Amaya DB. 1991. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. J Agric Food Chem
17. Muchtadi D. 1989. *Evaluasi Nilai Gizi Pangan*. Bogor: Institut Pertanian Bogor. 2001. Sayuran sebagai sumber serat pangan untuk mencegah timbulnya penyakit degeneratif. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 12(1)
18. Ndawula, J et al. 2004. *Alterations in fruit and vegetable β -carotene and vitamin C content caused by open-sun drying, visqueen-covered and polyethylene-covered solar-dryers*. Makerere Medical School, Uganda
19. Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidants From Plant Material*. Di dalam : M.T. Huang, C.T. Ho, dan C.Y. Lee, editor. *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health H*. American Society, Washington DC.
20. Prohents, Jaime et al. 2010. " *Introduction and Adaptation of the Andean Solanum muricatum as a New Crop for the Mediterranean Region*. Instituto de Conservacion y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universidad Politecnica de Valencia, Valencia, Spain
21. Rodriguez-Amaya DB. 1997. Carotenoids and food preparation: The retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed, and stored foods. Opportunities for Micronutrient Intervention (OMNI), Arlington,.
22. Rodriguez-Amaya DB. 2002. Effects of processing and storage on food carotenoids. Sight Life Newsletter (Special issue)

23. Rodriguez-Amaya, Delia B. and Mieko Kimura, 2004. *Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus: Washington, DC and Cali: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT)
24. Sudjadi dan Rohman A. 2004. *Analisis Obat dan Makanan*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
25. Voigt R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Penerjemah Dr. Soendani Noerono. Edisi Kelima. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

**PENAPISAN FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL
DAUN JAMBU BOL (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry), DAUN SALAM
(*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers), SERTA DAUN JAMBLANG (*Syzygium
cumini* (L.) Skeels) ASAL ARBORETUM GARUT**

**Farid Perdana^{1*}, Deden WS¹, Rahmi RD¹
faridperdana@yahoo.co.id**

**Prodi Farmasi FMIPA
Universitas Garut**

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol daun jambu bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr. & Perry), salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers), Skeels), serta jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). Hasil pemeriksaan karakteristik simplisia menunjukkan kualitas keamanan simplisia sesuai dengan persyaratan standar yang telah ditetapkan oleh BPOM dan MMI. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa simplisia daun jambu bol, salam, serta jamblang mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Simplisia daun jambu bol, salam, serta jamblang diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol dihasilkan ekstrak metanol. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun jambu bol, salam, serta jamblang dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) diperoleh nilai IC₅₀ jambu bol sebesar 22,597 ppm, salam sebesar 32,549 ppm, dan jamblang sebesar 162,197 ppm.

Kata Kunci: *Syzygium*, daun jambu bol, salam dan jamblang, ekstrak metanol, penapisan fitokimia, aktivitas antioksidan, DPPH, IC₅₀.

1. Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia terutama spesies tanaman tingkat tinggi. Tanaman tingkat tinggi salah satunya yaitu tanaman *Syzygium* yang merupakan marga yang memiliki jenis terbanyak dari suku *myrtaceae*. Tanaman *Syzygium* merupakan salah satu tanaman yang banyak dibudidayakan di Arboretum Garut ⁽¹⁾.

Arboretum adalah semacam kebun botani yang mengkoleksi pepohonan. Dalam kebun botani, tumbuhan koleksi dipelihara dan diberi keterangan nama dan beberapa informasi lainnya. Secara umum Arboretum memiliki kegunaan sebagai tempat mengkoleksi berbagai jenis pohon. Selain itu, dari setiap tanaman yang ada di Arboretum perlu pula dilakukan suatu upaya penelitian guna melengkapi data-data serta informasi yang terkait dengan tanaman-tanaman yang dikoleksi tersebut.

Salah satu upaya untuk memperoleh informasi adalah perlunya penelitian terhadap kandungan senyawa kimia dalam tanaman yang biasanya merupakan zat aktif yang bertanggung jawab dalam aktivitas pengobatan. Selain itu, perlu juga penelitian mengenai pengujian aktivitas farmakologi, sehingga keberadaan tanaman-tanaman yang ada di Arboretum memiliki informasi yang lebih lengkap salah satunya dalam bidang pengobatan.

Metode pengujian untuk mengetahui keberadaan kandungan senyawa kimia tanaman dikenal dengan istilah penapisan fitokimia. Penapisan Fitokimia adalah pemeriksaan kandungan kimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu tumbuhan, baik secara kualitatif ataupun kuantitatif⁽²⁾.

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam atau menangkal radikal bebas. Mekanisme kerja senyawa antioksidan salah satunya yaitu dengan cara mendonorkan atom hidrogen atau proton kepada senyawa radikal bebas⁽⁴⁾. Dengan demikian, salah satu upaya untuk membuktikan adanya aktivitas pengobatan dari beberapa tanaman yang ada di arboretum adalah diawali dengan pengujian aktivitas antioksidan.

2. Metode Penelitian

Uji aktivitas antioksidan simplisia dilakukan dengan metode ekstraksi untuk pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Sebelum metode ekstraksi, dilakukan serangkaian tahapan yang meliputi penyiapan bahan terdiri dari determinasi tanaman dan pengumpulan bahan diambil di Arboretum Cimanuk di kawasan taman wisata Kamojang tepatnya di kampung Legok Pulus Desa Sukakarya Kecamatan Samarang Garut.

Kemudian dilakukan proses pembuatan serbuk simplisia yang terdiri dari sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering, dan penggilingan. Pemeriksaan karakteristik meliputi penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, pemeriksaan kadar abu larut air, pemeriksaan kadar abu tidak larut asam, penetapan susut pengeringan, pemeriksaan kadar sari larut air, dan pemeriksaan kadar sari larut etanol. Penapisan fitokimia dilakukan sebagai langkah awal untuk mengetahui golongan komponen kimia yang terkandung dalam bahan dan dilakukan terhadap golongan alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, tanin, kuinon, dan steroid atau triterpenoid⁽⁴⁾.

Metode ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi. Kemudian dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode perendam radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dengan spektrofotometri UV-Visible. Aktivitas penangkapan radikal bebas ditentukan dari nilai IC₅₀ yang diperoleh^(4,22).

3. Hasil Penelitian Dan Pembahasan

Pada penelitian ini tanaman yang digunakan adalah daun jambu bol, daun salam dan daun jamblang. Untuk memastikan identitas dari tanaman yang digunakan dilakukan determinasi di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Dari hasil determinasi dinyatakan

bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah jambu bol (*Syzygium Malaccense* (L.) Merr. & Perry), salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers), dan jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels).

Proses pengolahan bahan menjadi serbuk simplisia meliputi sortasi basah dan pencucian yang bertujuan untuk menghilangkan pengotor yang terdapat dalam simplisia dengan menggunakan air mengalir, selanjutnya dilakukan perajangan yang bertujuan untuk memperkecil ukuran simplisia agar mempermudah proses pengeringan dan penggilingan. Kemudian dilakukan pengeringan pada lemari pengering agar simplisian tidak mudah rusak. Setelah itu, dilakukan sortasi kering untuk memastikan tidak ada lagi pengotor atau jamur pada simplisia, serta tahap terakhir penggilingan simplisia menjadi serbuk dan serbuk simplisia disimpan di tempat tertutup baik ⁽²³⁾

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Karakteristik Fitokimia Simplisia Jambu Bol (*Syzygium Malaccense* (L.) Merr. & Perry), Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers), dan Jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Uji Simplisia	Hasil (%)		
	Daun Jambu Bol	Daun Salam	Daun Jamblang
Kadar Air	9%	5%	9%
Kadar Abu Total	5,7%	6,4%	2,7%
Kadar Abu Larut Air	2%	0,7%	1%
Kadar Abu Tidak Larut Asam	1,7%	1,4%	1%
Kadar Sari Larut Air	18%	20%	19%
Kadar Sari Larut Etanol	27%	25%	13%
Susut Pengeringan	7%	8,9%	12%

Metabolit Sekunder	Simplisia		
	Daun Jambu bol	Daun Salam	Daun Jamblang
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Tanin	+	+	+

Saponin	+	+	+
Kuinon	+	+	+
Steroid/Triterpenoid	+	+	+

Tabel 2. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak Metanol Jambu Bol (*Syzygium Malaccense* (L.) Merr. & Perry), Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers), dan Jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Metabolit Sekunder	Ekstrak Metanol		
	Daun Jambu bol	Daun Salam	Daun Jamblang
Alkaloid	+	+	+
Flavonoid	+	+	+
Tanin	+	+	+
Saponin	+	+	-
Kuinon	+	+	+
Steroid/Triterpenoid	+	-	+

Keterangan (+) : Terdeteksi

(-) : Tidak Terdeteksi

Simplisia	Berat (gram)		Rendemen (%)
	Simplisia	Ekstrak Kental	
Jambu Bol	300	40,31	13,43
Salam	300	18,31	6,23
Jamblang	300	12,96	4,32

Simplisia yang diekstraksi yaitu serbuk simplisia daun jambu bol, daun salam dan daun jamblang. Sebanyak 300 gram serbuk simplisia diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam dengan suhu kamar dan setiap 6 jam sekali dilakukan pengadukan. Kemudian proses maserasi dilakukan penggantian pelarut setiap penyaringan setiap 24 jam. Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, dilakukan terlebih dahulu pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH (2,2-difenil-1-fikrilhidrazil). Dari

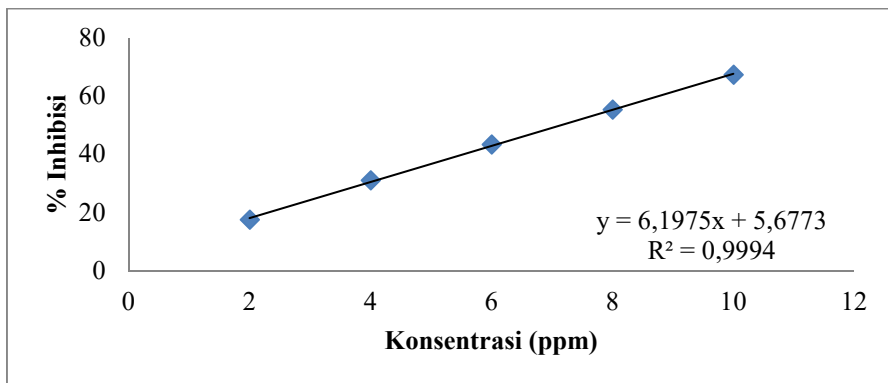
hasil pengujian yang didapatkan panjang gelombang DPPH yang diperoleh adalah 517 nm. pengujian antioksidan pada ekstrak daun jambu bol, daun salam dan daun jambalng dilakukan dengan menggunakan vitamin C sebagai pembanding.

Aktivitas antioksidan dari beberapa sampel yang diuji ditunjukkan dengan nilai Nilai IC_{50} (*inhibition concentration 50*) merupakan konsentrasi antioksidan (ppm) yang mampu memberikan persen penangkapan radikal bebas sebanyak 50%.

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh. Jika nilai IC_{50} suatu ekstrak berada dibawah 50 ppm maka aktivitas antioksidannya kategori sangat kuat, nilai IC_{50} berada diantara 50-100 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori kuat, nilai IC_{50} berada di antara 100-150 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori sedang, nilai IC_{50} berada di antara 150-200 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori lemah, sedangkan nilai IC_{50} berada diatas 200 ppm maka aktivitas antioksidannya dikategorikan sangat lemah ⁽²⁰⁾. Hasil uji aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 5 sampai 8.

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Absorban	Kontrol	Rata-rata % Inhibisi	Rata-rata IC_{50}	SD
2	0,648	0,785	17,495	7,178	0,488
4	0,542		30,955		
6	0,445		43,270		
8	0,351		55,287		
10	0,257		67,304		

Tabel 5. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin C

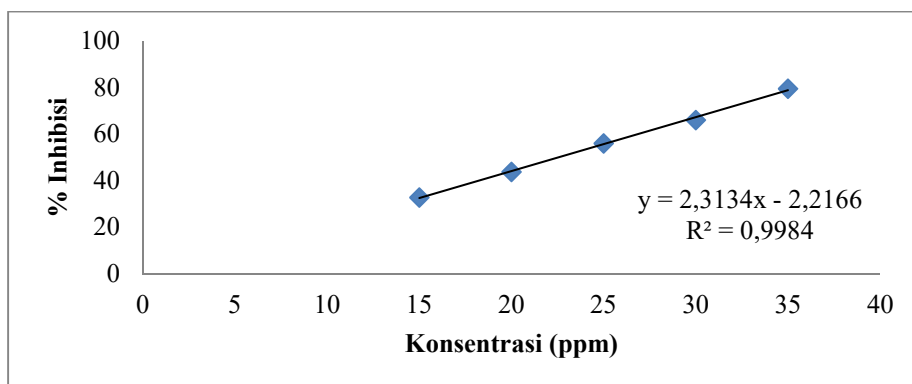


Gambar

1 Kurva Hubungan Konsentrasi Vitamin C dengan % Inhibisi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Absorban	Kontrol	Rata-rata % Inhibisi	Rata-rata IC ₅₀	SD
15	0,528	0,785	32,781	22,598	0,421
20	0,441		43,779		
25	0,345		56,008		
30	0,267		66,030		
35	0,161		79,490		

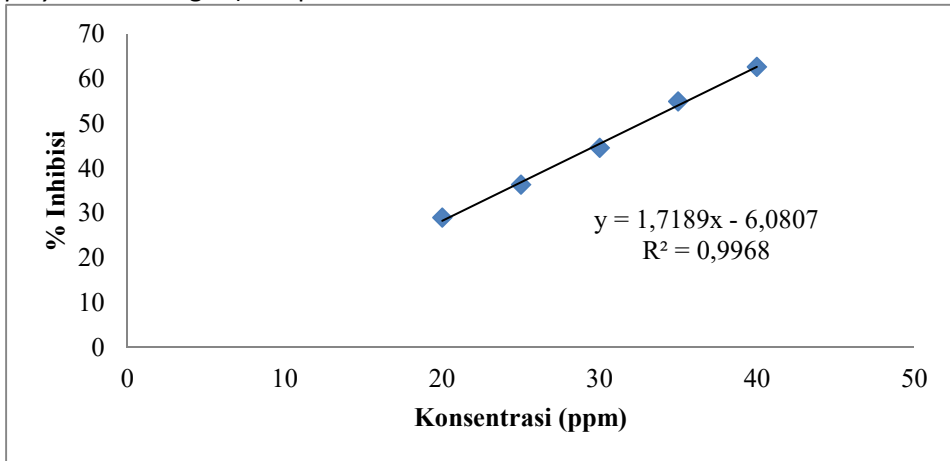
Tabel 6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry).



Gambar 2. Kurva Hubungan Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense* (L.) Merr & Perry) dengan % Inhibisi

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Absorban	Kontrol	Rata-rata % Inhibisi	Rata-rata IC ₅₀	SD
20	0,558	0,785	28,960	32,549	0,934
25	0,500		36,348		
30	0,435		44,544		
35	0,354		54,947		
40	0,293		62,633		

Tabel 7. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* Wight.) Walpers.

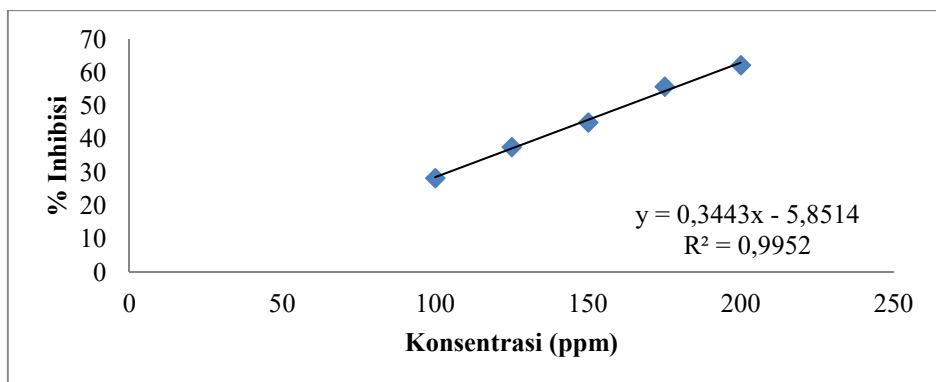


Gambar 3 Kurva Hubungan Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight.) Walpers dengan % Inhibisi

Tabel 5.8

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels)

Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Absorban	Kontrol	Rata-rata % Inhibisi	Rata-rata IC ₅₀	SD
100	0,563	0,785	28,280	162,197	0,741
125	0,490		37,622		
150	0,432		45,011		
175	0,347		55,839		
200	0,297		62,208		



Gambar 4. Kurva Hubungan Konsentrasi Ekstrak Metanol Daun Jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels dengan % Inhibisi

Berdasarkan hasil pengujian antioksidan terhadap vitamin C dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm diperoleh nilai IC_{50} sebesar 7,178 ppm. Sedangkan pengujian antioksidan ekstrak daun jambu bol dengan konsentrasi 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, dan 35 ppm diperoleh nilai IC_{50} sebesar 22,598 ppm. Ekstrak daun salam dengan konsentrasi 20 ppm, 25 ppm, 30 ppm, 35 ppm, dan 40 ppm diperoleh nilai IC_{50} sebesar 32,549 ppm. Dan ekstrak daun jamblang dengan konsentrasi 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, 175 ppm, dan 200 ppm diperoleh IC_{50} 162,197. Sehingga ekstrak daun jambu bol, ekstrak daun salam, dan ekstrak daun jambalng memiliki kekuatan antioksidan yang rendah dibandingkan vitamin C. Namun aktivitas ekstrak daun jambu bol dan ekstrak daun salam masih tergolong sangat kuat karena nilai IC_{50} yang diperoleh <50 ppm. Sedangkan ekstrak daun jamblang tergolong lemah karena nilai IC_{50} yang diperoleh 150 – 200 ppm.

4. Kesimpulan

Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa simplisia daun jambu bol, salam, dan jamblang mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun jambu bol dan daun salam menunjukkan aktivitas antioksidan yang tergolong sangat kuat dengan nilai IC_{50} jambu bol sebesar 22,597 ppm dan nilai IC_{50} daun salam sebesar 32,549 ppm. Sedangkan ekstrak daun jamblang menunjukkan aktivitas antioksidan yang tergolong lemah dengan nilai IC_{50} sebesar 162,197 ppm.

5. DAFTAR PUSTAKA

1. Muhammad D. Satria., 2013, "**Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N Heksan Buah Lakum (*Cayratia Trifolia*) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazyl)**", Tugas Akhir Sarjana Farmasi, Program Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, Pontianak, Hlm. 1 – 2.
2. Cut Fatimah Zahra, Julianti, Dkk., 2008, "**Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk (*Sauropus androgunus* (L) Merr.)**", Departemen Kimia FMIPA, USU, ISSN 1907-5537, 3(1), Hlm. 7 – 10.
3. Asri Werddhasari, 2014, "**Peran Antioksidan bagi Kesehatan**", Pusat Biomedis dan Dasar Kesehatan Balitbangkes, Kemenkes RI.
4. Aggit S, 2012, "**Aktivitas Antioksidan Teh Hitam (*Camellia sinensis* (L.) *Kuantze*)**", Tugas Akhir I, Farmasi FMIPA UNIGA, Garut, Hlm. 1 - 7.
5. Arifin, H., Rasyid R., dan H Lucida, 2009, "**Pengembangan Tumbuhan Jambu Bol (*Syzygium malaccense* (L.)**" Hasil Penelitian Tahun I Hibah Unggulan Strategis Nasional Tahun Anggaran 2009, Universitas Andalas, Padang, Hlm. 1-3.

6. Haryanto A., 2012, **"Kolerasi Antar Karakter Komponen Hasil pada Tanaman Jambu Bol di Kecamatan Wedarjaksa, Pati, Jawa Tengah"** Skripsi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
7. Dalimarta S., 2000, **"Atlas Tumbuhan Obat"**, Edisi II, Trubus Agriwidya, Jakarta.
8. Arum S., 2014, **"Karakteristik Ekstrak Etanol Daun Salam dari Tiga Tempat Tumbuhan Indonesia"**, Skripsi, Uin Syarif Hidayatullah, Jakarta.
9. Putrawan B, Nurdin R., dan Agung Wahid M. Diah, 2014, **"Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum*) dengan Menggunakan 1,1-Defenil-2-Pikrilhidrazil"**, Universitas Tadulako, Palu, ISSN 2302-6030, 3 (3), Hlm. 143-149.
10. Dalimartha, S., 2003 **"Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 3"**, Trubus Agriwidya, Jakarta.
11. Ayyanar, M dan Pandurangan, SB., 2012, **"*Syzygium cumini* (L.) Skeels A Review of Its Fitochemical Constituents and Traditional Uses"**, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 240-243.
12. Ruan, ZP, Zhang, LL and Lin, YM., 2008, **"Evaluation of the Antioxidant Activity of *Syzygium cumini* Leaves"**, *Molecules*, 13, pp. 2545-2556.
13. Harborne, J., 1987, **"Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan"**, Terjemahan K. Padmawinata & I. Soediro, ITB, Bandung.
14. Robinson, T., 1995, **"Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi"**, Terjemahan Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Jakarta, Hlm. 71, 91, 152-157.
15. Sirait, M., 2007, **"Penuntun Fitokimia dalam Farmasi"**, Penerbit ITB, Bandung, Hlm. 129-131, 142, 155, 191-196.
16. Mukhriani, 2014, **"Ekstraksi Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif"**, *Jurnal Kesehatan*, (7) 2, Hlm. 361-367.
17. Sudaryanti, E., 1999, **"Aspek Penanganan Radikal Bebas Melalui Antioksidan"**, Fakultas Kesehatan Masyarakat, Universitas Sumatera Utara, Medan, Hlm. 6-9.
18. Panangan, A.T., 2011, **"Pengaruh Penambahan Tepung Wortel (*Daucus carrota* L.) terhadap Bilangan Peroksida dan Asam Lemak Bebas pada Minyak Goreng Curah"**, *Jurnal Penelitian Sains*, Hlm. 18-21.
19. Sayuti, K., MS., 2015, **Antioksidan Alami dan Sintetik**, Andalas University Press, Padang, Hlm. 7-10, 15-20, 32, 67, 57.
20. Rohmatussolihat., 2009, **"Antioksidan Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia"**, *BioTrens*, 4(1), Hlm. 5-9.
21. Molyneux, P, 2004, **"The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity"**, *Sci Technol*. 26 (2), Hlm. 211-219.
22. Ika J. Putri, Fauziyah dan Elfita., 2013, **"Aktivitas Antioksidan Daun dan Biji Nipah (*Nypa fruitcans*) Asal Pesisir Bayuasin Sumatera Setelah Dengan Metode DPPH"**, *Maspari Journal*, 5 (1), Hlm. 16 - 21.

23. Dirjen POM, Departemen Kesehatan RI, 1995, "**Farmakope Standar**", Edisi IV, Departemen Kesehatan RI, Jakarta, Hlm. 6.
24. BPOM, 1985, "**Cara Pembuatan Simplisia**", Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Hlm. 7-15.
25. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989, "**Materi Medika Indonesia**", Jilid V, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Hlm. 53-55.
26. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000, "**Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat**", Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Hlm. 13-27.
27. Nina Salamah, Erlinda Widyasari., 2015, "**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan (L) Steud.*) dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil**", *Pharmaciana*, 5 (1), Hlm. 25-34.
28. Debby A. Priangan, 2017, "**Aktivitas Antioksidan Seduhan Teh Daun Tahongai (*Kleinhovia hospita L.*) dengan Metode DPPH (1,1-Dipenil-2-Pikrilhidrazil)**", Skripsi, Farmasi FMIPA Universitas Garut, Garut.
29. Diniatik. Suparman., Dewi Anggraeni, Dkk., 2016, "**Uji Antioksidan Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Manggis (*Garcinia mangostana L.*)**". *Pharmaciana*, 6 (1), Hlm. 21-30.

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI MADU MURNI KALIMANTAN BARAT TERHADAP BAKTERI
Escherichia coli DAN *Staphylococcus aureus* DENGAN METODE DIFUSI AGAR**

Shendi Suryana

shendi@uniga.ac.id

**Prodi Farmasi FMIPA
Universitas Garut**

abstrak

Telah dilakukan uji aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat jenis *Apis dorsata* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar. Hasil pengujian menunjukkan bahwa madu murni Kalimantan Barat menunjukkan aktivitas antibakteri hanya pada *Staphylococcus aureus*. Madu murni Kalimantan Barat menunjukkan aktivitas pada konsentrasi 40%, 30%, 20% dan 10% (b/v) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan diameter hambat masing-masing sebesar 27.3 mm, 20.5 mm, 17.4 mm dan 9.7 mm. Nilai konsentrasi hambat minimum madu murni Kalimantan Barat adalah 6% (b/v). Nilai kesetaraan aktivitas madu murni Kalimantan Barat terhadap tetrasiklin adalah 0.03134873 terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: antibakteri, madu murni, *Staphylococcus aureus*, konsentrasi hambat minimum

1. Pendahuluan

Indonesia memiliki keanekaragaman tumbuhan berbunga yang tinggi dan selalu ada sepanjang tahun. Indonesia dikenal dunia internasional sebagai negara yang kaya akan jenis lebah madu. Salah satunya jenis *Apis dorsata* hidup secara alami di hutan Sumatra, Kalimantan, Jawa, Sulawesi dan kepulauan Nusa Tenggara. Madu adalah cairan manis alami berasal dari nektar tumbuhan yang diproduksi lebah madu (1). Seperti kita ketahui madu memiliki banyak sekali manfaat dan kegunaan bagi manusia, baik untuk obat luar maupun dalam. Salah satu khasiat madu adalah memiliki sifat antibakteri (2). Efek antibakteri pertamakali dikenalkan tahun 1892 oleh van ketel. Awalnya efek antibakteri ini diduga karna kandungan gula madu yang tinggi, yang disebut efek osmotik. Namun, penelitian lebih lanjut menunjukkan adanya zat inhibine yang pada akhirnya diidentifikasi sebagai hidrogen peroksida yang berfungsi sebagai antibakteri (3)

Dr. WG Sackett, ahli bakteriologi dari Colorado Agricultural Academy menemukan secara *in vitro*, madu dapat mematikan kuman tifus dalam 48 jam, kuman penyebab penyakit radang paru-paru mati pada hari keempat bersamaan dengan kuman penyebab peritonitis, radang selaput paru, dan kuman penghasil nanah. Adapun bakteri penyebab diare disentri mati hanya dalam 10 jam (4). Sebelum antibiotik ditemukan di tahun 1930-an, madu masih digunakan dalam perawatan berbagai penyakit. Dengan beralihnya manusia ke pengobatan modern, madu kian tersisih perannya. Belakangan ini ketika banyak bakteri menjadi resisten terhadap obat-obatan, banyak orang “kembali ke alam” dengan memanfaatkan madu dalam pengobatan (5).

Dari beberapa informasi ilmiah diatas mengenai aktivitas antibakteri madu, maka dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas daya hambat antibakteri dan KHM pada madu murni Kalimantan Barat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, serta menentukan kesetaraan aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat terhadap pembanding (tetrasiklin).

2. Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium, dengan tahapan penelitian sebagai berikut : (1) Pengumpulan dan penyiapan sampel madu murni Kalimantan Barat, serta bahan kimia dan bahan pendukung keberhasilan penelitian, (2) Uji kualitas madu murni Kalimantan Barat, meliputi keasaman, viskositas, kadar air, pH, berat jenis., (3) uji aktivitas madu murni Kalimantan Barat terhadap bakteri uji *E. coli* dan *S. Aureus*, (4) penentuan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dari madu murni Kalimantan Barat terhadap bakteri *E. coli* dan *S. Aureus*, (5) uji banding aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat dengan antibiotik tetrasiklin, (6) Pengolahan data,

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar untuk mengetahui aktivitas antibakteri madu murni dari hutan kalbar terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah pada aktivitas antibakteri madu murni dari hutan Kalbar terhadap bakteri *E. coli* dan bakteri *S. aureus*.

3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pada penelitian ini digunakan madu murni kalimantan Barat, karena madu diketahui memiliki banyak sekali manfaat dan kegunaan bagi manusia baik untuk obat luar maupun dalam, salah satu khasiat madu adalah memiliki sifat antibakteri, maka

untuk membuktikan khasiat madu murni Kalimantan Barat sebagai antibakteri, dilakukan uji aktivitas madu murni Kalimantan Barat terhadap bakteri E. coli dan S. aureus dengan metode difusi agar cakram kertas.

Pada hasil pengujian analisis kualitas madu murni Kalimantan Barat kriteria yang diperoleh masih memenuhi standar, hanya pada uji viskositas hasil pengujian sampel cukup kental yaitu 19,6 (pois) (min) jika dibandingkan dengan standar SNI yaitu pada angka 10,7 (pois) (min). Jadi dapat dikatakan madu murni Kalimantan Barat yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai kualitas yang baik.

Hasil Analisis Kualitas Madu Murni Kalimantan Barat

Kriteria	Madu murni kalbar	Standar SNI 2004
Keasaman (ml NaOH 1 N/kg)	43,3	50
PH	4,1	3,2-4,5
Kadar air (%) (maks)	16,36	22
Viskositas (poise) (min)	19,6	10,7
Berat jenis (g/ml)	1,346	1,354-1,416

Dari data hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa, aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat hanya terjadi pada bakteri S. aureus. Sedangkan pada pengujian aktivitas terhadap E. coli tidak menunjukkan hasil aktivitas antibakteri. Hal ini mungkin dikarenakan kandungan senyawa zat aktif yang terdapat didalam madu murni Kalimantan Barat hanya berpengaruh pada bakteri gram positif (S. aureus). Dengan mekanisme kerja zat antibakteri yang terkandung didalam madu murni Kalimantan Barat dapat mengganggu sintesis dinding sel bakteri sehingga dinding sel yang terbentuk menjadi kurang sempurna atau rusak.

Uji Aktivitas Antibakteri Madu Murni Kalimantan Barat

Konsentrasi (%)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
40 %	-	27,3 mm
30 %	-	20,5 mm
20 %	-	17,4 mm
10 %	-	9,7 mm

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada penelitian ini untuk menentukan aktivitas antibakteri dengan konsentrasi terendah dari madu murni Kalimantan Barat terhadap bakteri *S. aureus*. Hasil uji yang didapat bahwa pada konsentrasi 3 %, 4 %, dan 5% positif ditumbuhi bakteri disekitar jalur zigzag sedangkan pada konsentrasi 6 %, tidak terjadi perubahan yang ditandai dengan warna bening tetap didalam cawan petri. Jadi dapat dikatakan bahwa nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) madu murni Kalimantan Barat berada pada konsentrasi 6 %.

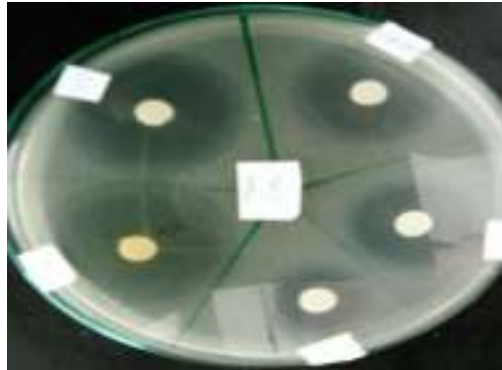
Uji Konsentrasi Hambat Minimum

Mikro uji	Konsentrasi dalam μ L			
	3	4	5	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-

Keterangan : - = tidak ada pertumbuhan bakteri

+ = ada pertumbuhan bakteri

Penentuan kesetaraan aktivitas madu murni kalimantan barat dengan antibiotik pembanding (tetrasiklin)

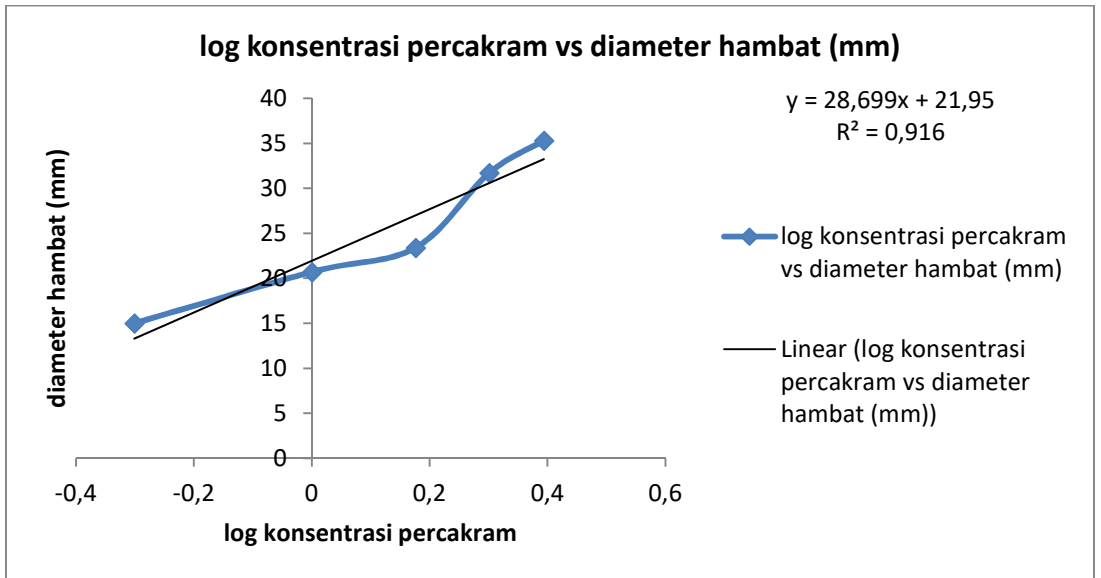


Keterangan gambar : uji aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%. Terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Persamaan Kesetaraan Aktivitas Madu Dengan Antibiotik Pembanding Tetrasiklin

Konsentrasi Antibiotik (%)	Konsentrasi Per cakram (μg)	Log Konsentrasi Per Cakram	Diameter Hambat (mm)
50	2.5	0,3937	35,3
40	2	0,301	31,7
30	1,5	0,176	23,4
20	1	0	20,7
10	0.5	-0,301	15

Kurva Potensi Tetrasiklin



Grafik 5.1 Kurva potensi tetrasiklin terhadap *Staphylococcus aureus* dengan persamaan garis $y = 28,69x + 21,9$.

Uji kesetaraan, penentuan kesetaraan aktivitas antibakteri madu murni Kalimantan Barat untuk nilai kesetaraan terhadap tetrasiklin diperoleh hasil yaitu 1 mg madu murni Kalimantan Barat setara dengan 0,03134879 mg tetrasiklin terhadap bakteri *S. aureus*.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa madu murni Kalimantan Barat hanya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dari madu murni Kalimantan Barat adalah pada konsentrasi 6% terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Nilai kesetaraan terhadap tetrasiklin menunjukkan bahwa 1 mg madu maurni Kalbar setara dengan 0,03134873 mg tetrasiklin terhadap *S. Aureus*

5. Daftar Pustaka

1. Benech, A. 2004. *Honey: Functional Sweetness Wellness Food. Wellness Food Europe*.
2. Brooks, G.F., J.S. Butel dan S.A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Buku 1. Penerjemah dan editor: Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Edisi Pertama. Jakarta: Salemba Medika. hal. 301 – 8, 317 – 26.
3. Caron, D.W. 2004. *Honey. J MAAREC Publication. 3 .8. Available at: Hadinegoro, S. R. 1999. Masalah Multi Drug Resistance pada Demam Tifoid Anak. Cermin Dunia kedokteran. 124. Hal. 5-8.*
4. Hadioetomo, S.R, 1993. Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek. Editor: Sidhi P.I, Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama. Hal.1.
5. Yuliani, L.E, 2007. Madu Hutan Organik dan *Higienis KalBar*. Availabel at: HTTP/file///D:/Riak Bumi- [Diakses tanggal 1 juni 2012].
6. Molan, P. C. 1992. *The Antibacterial Activity of Honey: The Nature of The Antibacterial Activity. Bee World. 73 (1). P. 5-28.*
7. Mulu, A., B. Tessema and F. Derbie. 2004. *In vitro Assesment of the antimicrobial potential of honey on common human patogens. Ethiop J Health Dev.18(2):107-11.*
8. *National Honey Board. 2001. Honey: a reference guide to a nature's sweetener. Availabel at: <http://www.honeylocator/ref.guide> [Diakses 29 november 2012].*
9. Radji, M. 2011. Buku Ajar Mikrobiologi: Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran, Jakarta: Buku Kedokteran EGC. Hal 31, 33.
10. Sukartiko, 1986. Prosessing Madu Lebah. Prosiding Lokakarya Pembudidayaan Lebah Madu untuk Peningkatan Kesejahteraan Masyarakat. Perum Perhutani, Jakarta. Halaman 129-133.
11. Suranto, A. 2004. Khasiat dan Manfaat Madu Herbal. Editor: T. Yulia. Cetakan Pertama. Jakarta: AgroMedia Pustaka. Hal. 1 – 4, 14, 19
12. Suranto, A. 2007. Terapi madu. Editor: Inriadi. H,K. Shinta Cetakan Pertama. Jakarta: Penebar Swadaya. Hal. 26, 33, 43-45.
13. Susilo, 2004. Komposisi Madu. Available at: <http://habbat.com/madu> [Diakses Tanggal 13 Oktober 2008].
14. Tjay, T. H., dan K. Rahardja. 2002. Obat-Obat Penting: Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya, edisi ke-5. Elex Media Komputindo. Jakarta. Hal. 59.
15. Titasmara, 2011. Merambah Aneka Bakteri. Editor: Muttaqien, Z.M cetakan pertama. bandung: Salsabila Publishing. Hal. 41-42, 47-48.
16. *White JW, Riethof ML, Kushnir I. 1960. Composition of Honey. VI. The effect of storage on carbohydrates, acidity and diastase content. J Food Sci, 26(1): 63-71.*

17. Wilix, D. J., P. C. Molan, and C. J. Harfoot. 1992. *A Comparison of The Sensitivity of Wound Infecting Species of Bacteria to The Antibacterial Activity of Manuka and Other Honey.* *J. Applied Bacteriology.* 73. P. 388- 394.

ANALISIS FORMALIN PADA USUS AYAM YANG DIJUAL DI PASAR KOTA GARUT

Novriyanti Lubis
novri_sung@yahoo.co.id

Prodi Farmasi F. MIPA
Universitas Garut

Abstrak

Telah dilakukan analisis formalin pada usus ayam yang dijual di pasar Ciawitali Garut, sampel diuji secara kualitatif dengan metode asam kromatopat. Sampel yang positif mengandung formalin akan diuji secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV. Hasil uji kualitatif 21 sampel usus ayam yang diambil secara acak dari Pasar Ciawitali Kota Garut menunjukkan 4 sampel teridentifikasi mengandung formalin. Kadar formalin tertinggi yang diperoleh dari pedagang usus ayam di Pasar Ciawitali Kota Garut yaitu 1980,6 ppm/100 gram sampel dan kadar formalin terendah yaitu 986,0 ppm/100 gram sampel.

Kata Kunci : Formalin, Usus ayam, Asam kromatopat, Spektrofotometri UV

1. Pendahuluan

Bahan Tambahan Makanan yang sering disalahgunakan dalam makanan adalah Formalin, Boraks, Rhodamin B dan *Methanil yellow*. Bahan berbahaya yang paling banyak digunakan dalam makanan adalah Formalin dan Boraks. Formalin yang digunakan sebagai pengawet mayat, banyak juga digunakan dalam berbagai produk makanan sebagai bahan pengawet. Sedangkan Boraks yang digunakan sebagai pengawet kayu, antiseptik kayu saat ini sering juga digunakan dalam makanan sebagai bahan pengental, menambah kerenyahan makanan, serta memperbaiki tekstur makanan⁽⁵⁾.

Formalin banyak digunakan karena memiliki kemampuan yang sangat baik dalam mengawetkan makanan, harganya murah dan mudah didapatkan. Oleh karena itu, akibat dari tingginya tekanan ekonomi, formalin sering ditambahkan dalam makanan-makanan yang tidak tahan lama untuk mengurangi kerugian jika barang dagangan yang tidak laku dijual.

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu untuk memastikan keamanan produk pangan khususnya usus ayam yang ada di Pasar Ciawitali Kota Garut apakah terbebas dari formalin atau tidak, sehingga dapat memberikan informasi secara jelas kepada masyarakat tentang aman atau tidaknya usus ayam yang dijual oleh para pedagang usus ayam di Pasar Ciawitali Kota Garut.

2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian yaitu eksperimen atau percobaan (*experiment research*) dengan pendekatan laboratorium yang akan dilakukan dengan serangkaian percobaan.⁽¹¹⁾

Populasi adalah keseluruhan objek penelitian atau objek yang diperlukan dalam suatu penelitian⁽¹¹⁾. Berdasarkan pada pengertian tersebut maka populasi pada penelitian ini adalah seluruh pedagang ayam potong di Pasar Ciawitali Kota Garut. Sampel adalah bagian dari populasi yang mewakili dari keseluruhan populasi⁽¹¹⁾. Berdasarkan pada pengertian tersebut maka sampel dalam penelitian ini yaitu usus ayam yang dijual oleh pedagang ayam potong di Pasar Ciawitali Kota Garut.

Pengambilan sampel dalam penelitian ini yaitu menggunakan teknik *Quota Sampling*. Pengambilan sampel secara *Quota Sampling* yaitu peneliti mengumpulkan subjek yang memenuhi persyaratan.

Tahap awal penelitian meliputi proses pengumpulan sampel. Dalam penelitian ini ada sebanyak 21 sampel usus ayam yang di ambil dari pedagang di Pasar Ciawitali Kota Garut. Sampel diuji secara kualitatif dengan metode asam kromatropat. Sampel yang positif mengandung formalin akan diuji secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri UV.

3. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu spektrofotometri UV-Vis, alat destilasi, *blender*, tabung reaksi, penangas air, bunsen, batang pengaduk, beaker gelas, gelas ukur, erlenmayer, labu tentukur, pipet volume, pipet ukur, mikropipet, timbangan analitik. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel usus ayam yang diambil dari pedagang dipasar Ciawitali Kota Garut, dan bahan kimia asam posfat (H_3PO_4), H_2SO_4 pekat, asam kromatropat, formalin 37%, dan aquadest.

Pengambilan sampel dilakukan terhadap pedagang ayam potong yang menjual usus ayam di Pasar Ciawitali Kota Garut. Pengambilan sampel dilakukan secara *Quota Sampling*.

Tujuan dilakukannya pembuatan kontrol positif dan negatif adalah untuk mengetahui bagaimana identitas atau penampakan warna yang diberikan apabila sampel yang telah dianalisis mengandung formalin atau tidak. Pembuatan kontrol positif dilakukan dengan cara menambahkan larutan formalin sebanyak 5 mL pada usus ayam simulasi. Didestilasi, hasil destilasi kemudian diambil 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi pereaksi asam kromatropat, kemudian memanaskan tabung reaksi pada penangas air dan amati perubahan yang terjadi. Sedangkan pembuatan kontrol negatif dilakukan dengan cara yang sama, hanya saja usus simulasi tidak ditambahkan formalin. Didestilasi, hasil destilasi kemudian diambil 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi pereaksi asam kromatropat, kemudian memanaskan tabung reaksi pada penangas air dan amati perubahan yang terjadi.

Preparasi sampel dimulai dengan memotong usus ayam menjadi kecil - kecil, dilanjutkan melakukan penghalusan terhadap sampel usus ayam kemudian usus ayam yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram. Kemudian dilakukan analisis kualitatif dan dilanjutkan dengan kuantitatif.

Pembuatan larutan baku standar formalin dengan konsentrasi 1000 ppm yaitu dengan cara 0,270 mL formalin dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Pembuatan Larutan baku seri formalin yaitu dilakukan dengan cara mengencerkan larutan baku standar 1000 ppm menjadi konsentrasi 500 ppm, 100 ppm, 90 ppm, 80 ppm, 70 ppm, 60 ppm, 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm, 20 ppm, 10 ppm, 9 ppm, 8 ppm, 6 ppm, 5 ppm, 4 ppm, 3 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0,9 ppm, 0,8 ppm, 0,7 ppm, 0,6 ppm, 0,5 ppm, 0,4 ppm, 0,3 ppm, 0,2 ppm dan 0,1 ppm.

Pengukuran batas deteksi bertujuan untuk mengetahui batas deteksi antara metode dan senyawa yang akan dianalisis. Dari larutan yang telah diencerkan dalam berbagai konsentrasi tersebut masing-masing diberi larutan asam kromatropat sebagai pereaksi spesifik yang akan memberikan warna ungu hingga kemudian tidak menimbulkan warna ungu yang menandakan batas deteksi minimum dari metode asam kromatropat. Dari hasil percobaan yang dilakukan, larutan tidak menunjukkan perubahan menjadi warna ungu yaitu pada konsentrasi 0,1 ppm

Sampel yang sudah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram kemudian dimasukkan kedalam labu destilasi. Kemudian 100 gram sampel ditambahkan 100 mL air dan diasamkan dengan asam posfat pekat 1 mL. Didestilasi dan hasil destilasi ditampung. Masukkan 5 mL pereaksi asam kromatropat ke dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 1 mL hasil destilasi sambil diaduk. Kemudian larutan diletakkan dalam penangas air yang mendidih selama 15 menit dan amati perubahan yang terjadi. Adanya formalin ditunjukkan dengan adanya warna ungu terang sampai ungu tua ⁽¹²⁾. Dari hasil uji kualitatif terhadap 21 sampel usus ayam, 4 dari 21 sampel pedagang yang menjual usus ayam teridentifikasi mengandung formalin. Sampel yang mengandung formalin ditemukan pada pedagang 5, pedagang 9, pedagang 16 dan pedagang 20.

Pembuatan larutan baku standar formalin yaitu dengan cara 0,270 mL formalin dilarutkan dalam 100 mL aquadest. Penentuan panjang gelombang bertujuan untuk mendapatkan panjang gelombang dengan nilai absorbansi maksimum dari standar formalin pada spektrofotometri UV-Vis. Absorbansi pada panjang gelombang maksimum memberikan kepekaan analisis maksimum pada sampel usus ayam yang diteliti. Larutan baku formalin 25 ppm dipipet 0,25 mL menggunakan pipet volume lalu ditambahkan aquadest dalam gelas ukur sebanyak 10 mL. Diukur serapan maksimum pada panjang gelombang 560-580 nm. Dari hasil percobaan diperoleh panjang gelombang maximum 568 nm dengan nilai absorbansi 0,397 dari konsentrasi 25 ppm

Tujuan pembuatan kurva baku adalah agar dapat menghitung kadar formalin pada sampel usus ayam. Kurva baku/kalibrasi diperoleh dengan cara membaca absorbansi pada panjang gelombang maksimum pada spektrofotometri UV-Vis. Larutan baku standar formalin 1000 ppm dibuat seri larutan dengan konsentrasi yang bervariasi yaitu 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm. Kemudian larutan tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh.

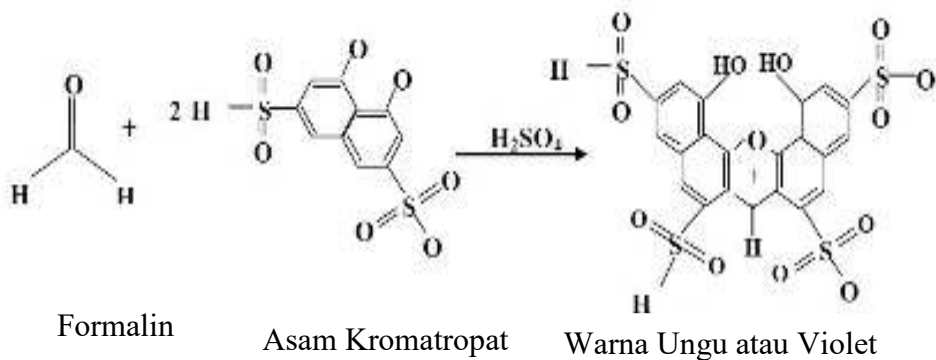
Persamaan dari kurva baku/kalibrasi yang diperoleh menunjukkan $Y = 0,052x + 0,061$ dengan koefisien korelasi (r^2) sebesar 0,999. Nilai 0,052 merupakan nilai kemiringan/*slope* (b) dan 0,061 merupakan titik potong sumbu Y /*intercept* (a).

Penentuan kadar formalin dilakukan pada sampel yang telah positif mengandung formalin setelah melalui uji kualitatif. Dilakukan pengukuran dengan panjang gelombang yang telah diperoleh. Kemudian nilai absorbansi sampel yang positif formalin dilakukan perhitungan berdasarkan persamaan regresi linear sehingga diperoleh kadar formalin pada sampel.

Persamaan kurva baku/kalibrasi yang diperoleh dari hasil regresi linear menunjukkan $Y = 0,052x + 0,061$ dengan koefisien korelasi (r^2) sebesar 0,999. Nilai 0,052 merupakan nilai kemiringan/*slope* (b) dan 0,061 merupakan titik potong sumbu Y /*intercept* (a). Persamaan inilah yang akan digunakan untuk mengetahui kadar formalin dalam sampel berdasarkan absorbansi sampel yang diperoleh.

Formalin merupakan bahan tambahan kimia yang efisien, tetapi dilarang ditambahkan pada bahan pangan (makanan), tetapi ada kemungkinan formalin digunakan dalam pengawet makanan untuk memperpanjang masa simpannya. Larutan formalin adalah desinfektan yang efektif melawan bakteri vegetatif, jamur atau virus. Formalin bereaksi dengan protein dan hal tersebut mengurangi aktivitas bakteri. Formalin dapat merusak bakteri karena bakteri adalah protein. Walaupun demikian, menurut Peraturan Menteri Kesehatan No.033 tahun 2012 tentang perubahan atas Peraturan Menteri Kesehatan No. 1168/Menkes/Per/X/1999 Tentang Bahan Tambah Pangan, bahan pengawet ini tidak disarankan untuk digunakan mengawetkan makanan.

Analisis formalin pada usus ayam yang dijual di pasar ciawitali kota garut menggunakan uji kualitatif yaitu dengan menggunakan asam kromotropat dan sampel yang positif mengandung formalin akan dilanjutkan dengan uji kuantitatif yaitu dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Pereaksi asam kromotropat dengan rumus kimia $C_{10}H_6Na_2O_8S_2 \cdot 2H_2O$ adalah nama lain dari 1,8-Dihydroxynaphthalene-3,6-disulfonic acid disodium salt, memiliki berat molekul 400,29 gr/mol. Formalin dengan adanya asam kromotropat dalam asam sulfat disertai pemanasan beberapa menit akan terjadi pewarnaan menjadi ungu atau violet. Reaksi ini terjadi berdasarkan kondensasi formalin dengan sistem aromatik dari asam kromotropat, membentuk senyawa berwarna (3,4,5,6-dibenzoxanthylum). Warna ungu atau violet yang terbentuk selanjutnya diukur dengan alat spektrofotometri UV-Vis. Reaksi formalin dengan asam kromotropat dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 1 Reaksi Formalin dengan Asam Kromotropat

Sebelum dilakukannya uji kualitatif dan kuantitatif pada sampel usus ayam, terlebih dahulu dilakukan validasi metode yang meliputi uji linearitas, uji presisi uji akurasi dan uji batas deteksi. Pada uji dengan asam kromotropat dilakukan uji batas deteksi secara kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terendah formalin yang masih dapat dideteksi jika ditambahkan dengan asam kromotropat. Dari hasil uji limit deteksi secara kuantitatif diperoleh nilai $S^{y/x}$ 0,00239 dan nilai Y_{BD} 0,0681 ppm. Sedangkan untuk nilai X yang diperoleh dari rumus regresi linear dengan memplotkan Y_{BD} ke dalam rumus diperoleh nilai X sebesar 0,1365 ppm.

Tahap selanjutnya dilakukan uji presisi dengan menghitung nilai RSD untuk melihat ketelitian alat, dari data hasil perhitungan nilai RSD dapat dilihat pada lampiran 10. Hasil dari perhitungan nilai RSD penelitian ini diperoleh sebesar 0,283 %. Menurut Abdul Rohman, semakin kecil nilai RSD dari serangkaian pengukuran, metode yang digunakan semakin presisi, sehingga spektrofotometri UV-Vis yang digunakan dalam penelitian mempunyai harga ketelitian alat sangat baik sehingga alat tersebut layak digunakan dalam penelitian.

Tahapan selanjutnya dilakukan uji akurasi dengan menghitung perolehan kembali menggunakan rumus yang telah ditetapkan. Uji akurasi dilakukan berdasarkan dari perbandingan data minimal 2 sampel yang mendapat perlakuan replikasi sebanyak 3 kali replikasi. Pada uji akurasi diperoleh rata-rata harga perolehan kembali (recovery) pada sampel 1 sebesar 98,2% dan pada sampel 2 sebesar 98,8%. Abdul Rohman menyebutkan suatu metode analisis mempunyai akurasi yang baik apabila nilai persen perolehan kembali diantara 96-102%. Hasil percobaan perolehan kembali (recovery) tersebut menunjukkan adanya kedekatan antara hasil analisis dengan nilai sebenarnya, sehingga spektrofotometri UV-Vis yang digunakan dalam penelitian layak digunakan karena memberikan hasil yang valid.

Setelah validasi metode analisis selesai, tahap selanjutnya adalah melakukan analisis kualitatif terhadap sampel usus yang telah diperoleh dari pasaran. Namun sebelumnya terlebih dahulu dilakukan percobaan simulasi usus ayam yang kemudian dilanjutkan dengan pembuatan kontrol positif dan negatif untuk mengetahui penampakan usus ayam apabila positif mengandung formalin. Pada percobaan analisis kualitatif terhadap sampel usus ayam, sampel dihaluskan dengan menggunakan *blender*, kemudian masing-masing sampel ditimbang sebanyak 100 g. Selanjutnya sampel dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 50 mL aquadest dan asam fosfat sebanyak 1 mL, kemudian dilakukan penyulingan. Tujuan dilakukan penyulingan dengan alat destilasi yaitu untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan titik didihnya. Dari percobaan, diperoleh titik didih formalin pada suhu 96°C. Hasil penyulingan yang diperoleh kemudian di tampung, dari hasil destilasi diperoleh destilat sebanyak 20 mL. Selanjutnya dilakukan uji kualitatif dengan menggunakan pereaksi asam kromatropat dalam H₂SO₄ dan dilanjutkan dengan pemanasan. Ketika formalin ditambahkan pereaksi asam kromatropat dalam H₂SO₄ serta dilakukan pemanasan, hasil positif akan menunjukkan warna ungu atau violet. Hasil positif ini dibandingkan berdasarkan hasil percobaan pada kontrol positif formalin dari percobaan simulasi usus yang telah dilakukan. Hasil analisis Kualitatif menunjukkan 4 dari 21 sampel usus ayam yang diambil dari Pasar Ciawitali Kota Garut positif teridentifikasi mengandung formalin. Sampel yang positif mengandung formalin ditemukan pada sampel pedagang 5, pedagang 9, pedagang 16 dan pedagang 20. Sampel yang mengandung formalin terlebih dahulu ditetapkan volumenya menjadi 20 mL. Penetapan ini dilakukan untuk mempermudah dalam perhitungan konversi kadar formalin karena konsentrasi yang memberikan nilai serapan ideal adalah 100 µL yang dilarutkan dengan aquadest sampai 10 mL. Sampel yang teridentifikasi positif mengandung formalin dilanjutkan ke tahap uji analisis kuantitatif dengan instrument spektrofotometri UV-Vis.

Analisis kuantitatif menggunakan spektrofotometri UV-Vis bertujuan untuk mengetahui konsentrasi formalin pada 4 sampel usus ayam yang telah teridentifikasi positif mengandung formalin melalui uji kualitatif dengan asam kromatropat. Pengukuran kadar formalin dengan metode spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan menggunakan standar formalin yang telah diketahui kadarnya dan dibandingkan dengan absorban sampel yang belum diketahui kadarnya.

Langkah pertama analisis kuantitatif pada percobaan ini adalah penentuan panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang dimana serapan zat terhadap sinar akan diperoleh nilai absorbansi yang maksimum. Panjang gelombang yang digunakan untuk analisis kuantitatif adalah panjang gelombang yang mempunyai nilai absorbansi maksimal. Untuk memilih panjang gelombang maksimal, dilakukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbansi dengan panjang gelombang dari suatu larutan baku pada konsentrasi tertentu ⁽⁶⁾. Ada beberapa alasan mengapa harus menggunakan panjang gelombang maksimum adalah sebagai berikut : (1) Pada panjang gelombang maksimum,

kepekaannya juga maksimum karena pada panjang gelombang maksimum tersebut, perubahan absorbansi untuk setiap satuan adalah yang terbesar; (2) Disekitar panjang gelombang maksimum, bentuk kurva absorbansi datar dan pada kondisi tersebut hukum Lambert-Beer akan terpenuhi; (3) Jika dilakukan pengukuran ulang maka kesalahan yang disebabkan oleh pemasangan ulang panjang gelombang akan kecil sekali ketika digunakan panjang gelombang maksimum⁽⁶⁾. Pada percobaan didapatkan panjang gelombang maksimum dari formalin adalah 568 nm dengan nilai absorbansi 0,397 nm.

Tahap selanjutnya adalah pembuatan kurva baku/kalibrasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Kurva baku/kalibrasi diperlukan untuk menghitung kadar formalin pada sampel. Konsentrasi yang digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi ini adalah 4; 6; 8; 10; 12; dan 14 ppm. Larutan seri diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh yaitu 568 nm. Dibuat kurva baku/kalibrasi standar formalin yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sebagai sumbu (x) dan harga absorbansi sebagai sumbu (y). Persamaan kurva baku yang diperoleh menunjukkan $Y = 0,052x + 0,061$ dengan koefisien korelasi (r^2) sebesar 0,999. Nilai 0,052 merupakan nilai kemiringan/*slope* (b) dan 0,061 merupakan titik potong sumbu Y/*intercept* (a). Persamaan inilah yang akan digunakan untuk mengetahui kadar formalin dalam sampel berdasarkan absorbansi yang diperoleh. Sampel yang positif mengandung formalin dilakukan pengukuran dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis. Adapun rata-rata absorbansi yang diperoleh terhadap sampel setelah dilakukan tiga kali pengukuran dari keempat sampel pedagang usus ayam yang mengandung formalin yaitu pada pedagang 5 absorbansi sampelnya 0,410 ; pedagang 9 absorbansi sampelnya 0,337 ; pedagang 16 absorbansi sampelnya 0,576 ; dan pedagang 20 absorbansi sampelnya 0,316. Dari hasil absorbansi yang diperoleh dari keempat sampel kemudian dihitung kadar dengan memasukkan nilai absorbansi pada persamaan $Y = 0,052x + 0,061$. Adapun hasil hubungan absorbansi sampel yang dihubungkan dengan persamaan garis linear diperoleh dari keempat sampel tersebut yaitu pada pedagang 5 sebesar 1342,2 ; pedagang 9 sebesar 1061,4 ; pedagang 16 sebesar 1980,6 ; dan pedagang 20 sebesar 980,6. Penjelasan tersebut dapat dilihat pada lampiran 9. Kadar formalin tertinggi yang diperoleh dari pedagang usus ayam di Pasar Ciawitali Kota Garut yaitu 1980,6 ppm/20 mL dan kadar formalin terendah yaitu 986,0 ppm/100 gram sampel.

Kembali pada Peraturan Menteri Kesehatan No.033 tahun 2012 tentang perubahan atas Peraturan Menteri Kesehatan No. 1168/Menkes/Per/X/1999 Tentang Bahan Tambah Pangan, tercantum bahwa formalin tidak disarankan untuk digunakan sebagai bahan tambahan dalam makanan seberapa kecil pun konsentrasinya mengingat bahaya yang ditimbulkan sangat membahayakan bagi tubuh baik itu jangka pendek atau jangka panjang, hingga dapat menimbulkan kematian

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan hasil uji kualitatif 21 sampel usus ayam yang diambil secara acak dari Pasar Ciawitali Kota Garut menunjukkan 4 sampel teridentifikasi mengandung formalin. Kadar formalin tertinggi yang diperoleh dari pedagang usus ayam di Pasar Ciawitali Kota Garut yaitu 1980,6 ppm/100 gram sampel dan kadar formalin terendah yaitu 986,0 ppm/100 gram sampel.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap bahan pangan atau makanan lain selain usus ayam dan bahan tambahan berbahaya lain selain formalin yang ada di Pasar Ciawitali Kota Garut formalin. Serta perlu dilakukannya penyuluhan kepada pedagang atau masyarakat tentang bahaya penggunaan bahan tambahan berbahaya yang dilarang seperti formalin dan perlunya dilakukan himbauan kepada masyarakat agar berhati-hati dalam memilih bahan pangan yang sangat mudah membusuk.

5. Daftar Pustaka

1. Anonim. 2004. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 28 Tahun 2004 Tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan. Depkes RI : Jakarta.
2. Anonim. 2012. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia Nomor 033 Tahun 2012 Tentang Bahan Tambahan Pangan. Depkes RI : Jakarta.
3. Anonim. 2004. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor :Hk.00/05.1.2569 Tentang Kriteria Dan Tata Laksana Penilaian Produk Pangan. BPOM : Jakarta.
4. BPOM RI. 2008. FORMALIN (Larutan *Formaldehid*). Direktorat Pengawasan Produk Berbahaya : Jakarta.
5. Cahyadi, Wisnu. 2012. Analisis dan Aspek Kesehatan Bahan Tambahan Pangan. Bumi Aksara : Jakarta.
6. Gholib Gandjar, Ibnu & Rohman, Abdul. 2012. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar : Yogyakarta.
7. Hutabarat, Pujita. 2010. Analisa Kandungan Formalin Pada Mi Basah Serta Ciri-Ciri Fisik Mi Basah Yang Positif Mengandung Formalin Dan Yang Negatif Mengandung Formalin Di Pasar Tradisional Medan Tahun 2010. USU : Medan.
8. Sastrohamidjojo, Hardjono. 2013. Dasar - Dasar Spektroskopi. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta.
9. Rohman, Abdul. 2014. Validasi dan Penjamin Mutu Metode Analisis Kimia. Gadjah Mada University Press : Yogyakarta.
10. Swastiniar Kuswan, Annisrahma. 2011. Optimasi Pereaksi Schryver Dan Penerapannya Pada Analisis Formaldehid Dalam Sampel Usus Dan Hati Ayam Secara Spektrofotometri. UI : Depok
11. Saryono & Anggraeni, 2013. Metodologi Penelitian Kualitatif dan Kuantitatif Dalam Bidang Kesehatan. Nuha Medika : Yogyakarta.

13. SNI 01-2894-1992 ICS. Cara Uji Bahan Pengawet Makanan dan Bahan Tambahan Yang Dilarang Untuk Makanan. Dewan Standar Nasional.
14. Takdir Ambo, Faisal. 2013. Identifikasi Formalin Dan Boraks Secara Kualitatif Pada Makanan Jajanan Somay di Kecamatan Puwatu Kota Kendari. Politeknik Kesehatan Kendari : Kendari.
15. USD, 2007. Modul Kuliah Spectroskopi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma, Universitas Sanata Dharma : Yogyakarta