

LAPORAN TEKNIS 2016

55/AIR 4/OT 02 02/01/2017

**PROTOTYPE BIOMATERIAL STERIL UNTUK APLIKASI
KLINIS**

Darmawan, Basril, Erizal, Nikham, Ermin Katrin H.



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2017**

55/AIR 4/OT 02 02/01/2017

PROTOTIPE BIOMATERIAL STERIL UNTUK APLIKASI
KLINIS

Darmawan, Basril, Erizal, Nikham, Ermin Katrin H.

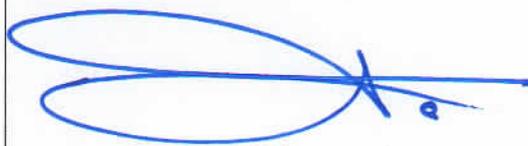
Mengetahui/Menyetujui

Kepala Bidang Proses Radiasi



Dr. Darmawan
NIP. 1910108 198803 1 002

Kepala Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi



Totti Tjiptosumirat
NIP. 19630830 198803 1 002

Pada tahun 2016 Suboutput Prototip Biomaterial Steril untuk Aplikasi Klinis siap disertifikasi mempunyai beberapa kegiatan penelitian. Laporan teknis masing-masing penelitian akan disajikan dibawah.

1. Pengaruh Penggunaan Scaffold Komposit Kolagen-Kitosan-Bio Hidroksi Apatit Untuk Penyembuhan Defek Tulang Kalvaria Tikus Sprague Dawly

ABSTRAK

Tissue Engineering (TE) adalah metode yang dikembangkan untuk memperbaiki kerusakan atau defek jaringan tubuh manusia akibat trauma ataupun penyakit. Salah satu komponen yang harus ada dalam TE adalah berupa *scaffold* yang memiliki arsitektur berpori bersifat bioaktif, biokompatibel dan biodegradable. Dalam penelitian ini telah dibuat komposit Hidroksiapatit (HA)-Kolagen-Kitosan berupa scaffold dengan besaran pori 6-521 μm . Pada komposit ini tidak terjadi reaksi dari ketiga bahan tersebut. Secara in-vitro menggunakan Simulated Body Fluid, pada scaffold ini terjadi pertumbuhan HA yang menandakan bahwa scaffold bersifat bioaktif. Aplikasi scaffold HA-Kolagen-Kitosan pada hewan coba secara in-vivo menunjukkan pertumbuhan tulang yang baik

PENDAHULUAN

Dalam beberapa dekade terakhir ini, bidang teknologi biomaterial untuk kebutuhan medik berkembang dengan cepat. Beberapa bahan yang dikembangkan antara lain logam, biokeramik, dan bahan biopolimer. Biokeramik merupakan bagian penting dari biomaterial karena sifatnya yang biokompatibel yang baik dan osteontgrasi yang tinggi karena kesamaannya dengan komponen tulang (hidroksiapatit). Keuntungan lain dari biokeramik termasuk reaktivitas kimia yang rendah, yang hampir benar-benar inert dan, karena itu, non-toksisitas. Pada teknologi yang terbaru, teknologi keramik memiliki potensi besar dalam merumuskan keramik berpori yang mouldable sehingga sangat baik sehingga menjadikannya sebagai material scaffold untuk pertumbuhan jaringan baru pasca implantasi. Berdasarkan pada respons nya pada jaringan untuk implan, biokeramik dikalisifikasikan tiga kelompok yaitu keramik bioiner, keramik bioaktif, dan keramik biresorbable.

Biokeramik atau biohidroksiapatit merupakan hidroksiapatit yang berasal dari

bahan biologi seperti tulang. Bahan tersebut mengandung hidroksiapatit yang terkarbonasi. Dalam hal hidroksiapatit yang terkarbonasi, terdapat dua tipe. Hidroksiapatit yang struktur anion PO_4^{3-} sebagian dapat tersubstitusi oleh kelompok karbonat disebut dengan hidroksiapatit terkarbonasi tipe-B, sedangkan, kelompok karbonat yang tersubstitusi pada ion hidroksil disebut dengan hidroksiapatit terkarbonasi tipe-A (Rajabi-Zamani *et al* 2008). Menurut Sobczak-Kupiek (2013) hidroksiapatit yang berasal dari bahan biologi seperti tulang termasuk ke dalam hidroksiapatit non-stokiometri. Hidroksiapatit ini memiliki defisiensi kalsium dengan ukuran kristal atau derajat kristalinitas rendah. Disamping itu, biohidroksiapatit memiliki kelaurtan atau resorbabilitas tinggi bila material tersebut dimplankan dalam sistem tubuh manusia. Dengan demikian, biohidroksiapatit ini baik untuk implan yang resorbable.

Kolagen merupakan jenis biomaterial secara luas digunakan untuk aplikasi klinis. Kelemahan dari bahan ini adalah matriks kolagen mempunyai pori yang besar yang memiliki sifat-sifat matriksnya relatif lemah sehingga mempunyai keterbatasan dalam penggunaannya untuk *bonr tissue engineering*. Selanjutnya, hidroksiapatit telah diketahui banyak digunakan sebagai pengganti tulang karena memiliki kompatibilitas dan osteoinduktifitas yang baik pada tulang. Namun, HA brittle dan sulit diproses ke dalam bentuk-bentuk kompleks.

Secara alami, tulang merupakan komposit 3D yang terbuat dari kolagen yang berbentuk fiber dan mengikat hidroksiapatit dengan kuat. Untuk menstimulasi tulang alami, maka penelitian ini mengembangkan jenis komposit kolagen-HA sebagai matriks tulang dan memodifikasinya dengan kitosan. Kitosan merupakan polisakarida karbohidrat positive charged. Kroslinking pada matriks tulang, dapat menurunkan immunogen dari kolagen, meningkatkan kapabilitas perlekatan sel dan meningkatkan histokompatibilitas dari matriks tulang artifisial (Wang, *et.al.*, 2008). Kitosan adalah positively charged sedangkan kebanyakan growth factor adalah negatively charged. Oleh karena itu modifikasi matriks HA-kolagen dengan kitosan dapat menyerap growth factor yang dikeluarkan oleh osteoblast sekitar matriks, yang mana akan mempercepat proses perbaikan dari defek tulang.

Penelitian ini membuat matriks pengganti tulang yang menggabungkan HA-Kolagen-Kitosan untuk menghasilkan matriks pengganti tulang berupa scaffold dengan struktur berpori. Mikrostruktur dan karakteristik dari scaffold yang merupakan matriks tulang artifisial diamati, dan defek tulang pada hewan uji dievaluasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Hidroksiapatit, diekstraksi dari tulang sapi, kolagen, diekstraksi dari tendon sapi, kitosan, diekstraksi dari cangkang kepiting.

Pembuatan Komposit Scaffold HA/Kolagen/Kitosan

Scaffold dibuat dengan mencampurkan HA/Kolagen/Kitosan (3:3:2). Tahapan pembuatan komposit yaitu pertama kitosan dilarutkan dalam larutan asam asetat 1%. Ke dalam larutan kitosan ditambahkan kolagen, diaduk hingga homogem. Ke dalam capuran kitosan/kolagen ditambahkan HA. Campuran HA/Kolagen/Kitosan dicetak dan dibekukan pada suhu -80 °C. Selanjutnya, pH komposit HA/Kolagen/Kitosan dinetralkan dengan larutan natrium hidroksida (NaOH) 2 N, dan dikeringkan dengan cara liofilisasi. Produk *scaffold* disterilkan dengan cara radiasi gamma dosis 15 kGy, dan selanjutnya digunakan sebagai sampel FTIR, *Scanning Electron Microscop* (SEM), dan penelitian in-vitro dan in-vivo.

Pengujian in-vitro

Pengujian in-vitro dilakukan dengan merendam scaffold komposit HA-Kolagen-Kitosan di dalam larutan Simulated Body Fluid (SBF). Larutan SBF dibuat dari senyawa NaCl, NaHCO₃, KCl, K₂HPO₄·3H₂O, MgCl₂·6H₂O, Na₂SO₄ dan Na₃N masing-masing dengan konsentrasi 136.8, 4.2, 3.0, 1.0, 2.5, 0.5, dan 3.08 m mol/L. Larutan tersebut selanjutnya pHnya diatur menjadi 7.4.

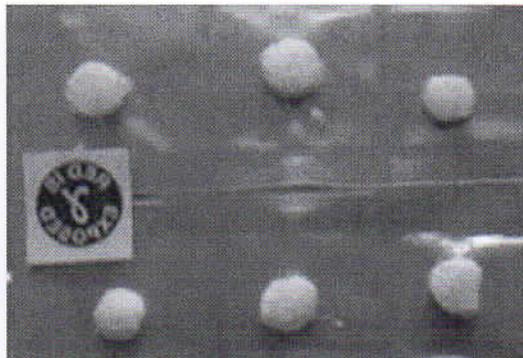
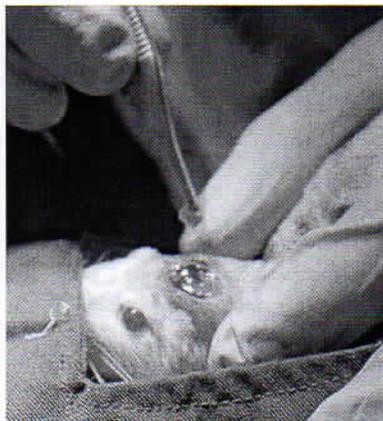
Scaffold direndam di dalam larutan tersebut selama 6 hari, kemudian diangkat dan dibilas dengan aquabides dan dikeringkan pada suhu ruang selama 24 jam dan mikrostrukturnya dilakukan dengan SEM

Pengujian In-Vivo

Penelitian menggunakan tikus *sprague dawly* berumur 2 bulan dengan berat badan antara 150-200 g, jantan dengan jumlah 40 ekor. Tikus dibagi menjadi dua kelompok perlakuan secara acak dengan masing-masing 20 ekor tikus. Sebelum diintervensi, hewan coba dipelihara terlebih dulu selama 2 minggu untuk aklimatisasi. Pada tahap aklimatisasi semua tikus diberikan antelmintik, antiprotozoal dan antibiotik selama 5 hari berturut-turut.

Prosedur bedah dilakukan secara aseptis, anastesi yang digunakan adalah kombinasi ketamine (100 mg/kg berat badan) dan xylazin (3 mg/kg berat badan) yang diberikan secara intraperitoneal. Semua tikus putih dilakukan pembuatan defek tulang calvaria berukuran 5 mm (Gambar 1). Defek tulang pada kelompok 1 dibiarkan sembuh sendiri, sedangkan kelompok 2 ditutup dengan *scaffold*. Lima ekor tikus dari tiap-tiap kelompok dilakukan pengamatan radiologi, untuk pengambilan sampel histopatologi pada hari ke-15, 30, 60 dan 90 setelah perlakuan.

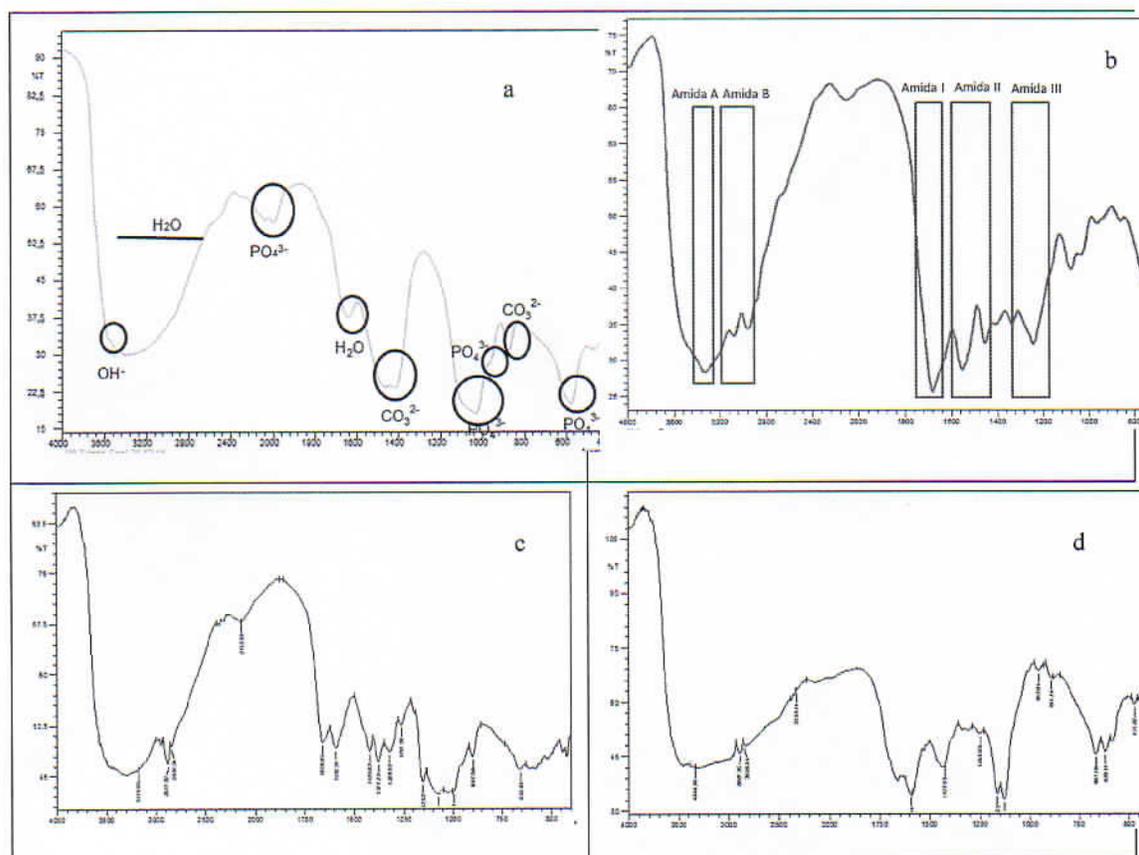
Data kualitatif yang diperoleh dianalisis secara deskriptif, sedangkan data kuantitatif dianalisis dengan analisis varian menggunakan SPSS 18.



Gambar.1. Pembuatan Defek Tulang Calvaria CONTOH SAMPEL BIOMATERIAL

HASIL DAN PEMBAHASAN

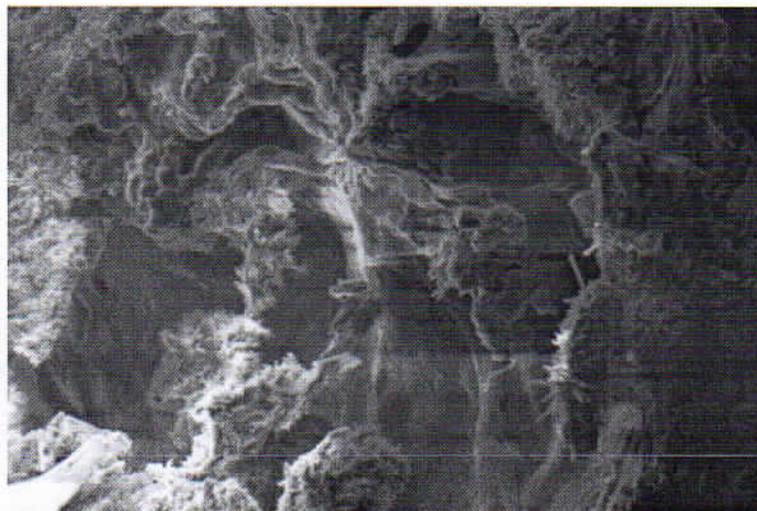
Gambar 2 adalah FTIR HA (a), kolagen (b), kitosan (c), dan komposit (HA-kolagen-kitosan). Pada Gambar 1d semua karakteristik spektrum dari masing-masing bahan baku (HA, kolagen, dan kitosan) terdapat dalam komposit ini. Pita yang lebar pada bilangan gelombang antara 3470 dan 2885 cm^{-1} merupakan overlapping gugus OH^- dari HA dengan NH -pergerakan dari kolagen dan kitosan. Selanjutnya terdapat pula pita serapan CH alifatik pada bilangan gelombang 2885 dan 2990 cm^{-1} dari kitosan dan kolagen. Puncak asimetri perengangan karboksi (COO^-) yang melebar pada puncak spectrum 1423 cm^{-1} yang menandakan adanya penggabungan antara kitosan dan kolagen. Selanjutnya, HA ditunjukkan dengan adanya fosfat yang terdapat pada bilangan gelombang $1131, 1062, 988, 876, 576,$ dan 528 cm^{-1} . Berdasarkan pada puncak-puncak yang terjadi pada komposit HA-kolagen-kitosan dimana tidak terdapat pergeseran puncak tersebut satu sama lainnya, maka ketiga komponen dari komposit HA-kolagen-kitosan dapat dianggap sebagai campuran yang homogen saja. Dengan kata lain tidak terjadi reaksi kimia pada pembentukan komposit tersebut.



Gambar 2. Spektrum FTIR HA (a), Kolagen (b), Kitosan (c), dan Kompositnya (d)

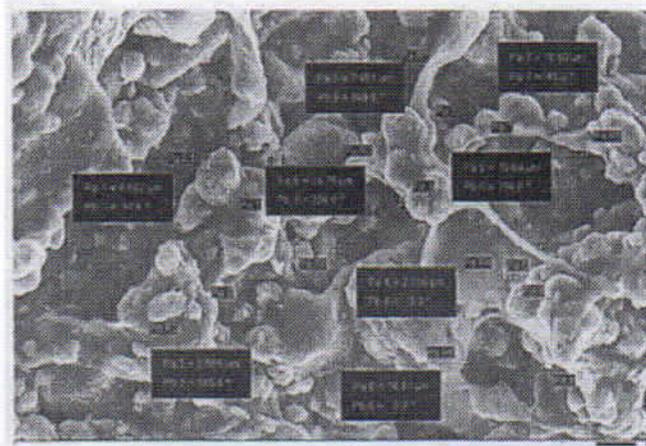
Kehomogenan dari komposit tersebut terlihat gambaran SEM pada Gambar 3. Di samping homogen, ketiga bahan tersebut dapat menjadi satu kesatuan yang membentuk *scaffold* yang berpori dengan pori yang terhubung satu dengan yang lainnya (*Interconeted pore*) untuk memfasilitasi nutrisi dan difusi oksigen dan pembuangan hasil metabolisme. Besaran pori dari *scaffold* komposit antara 6 – 521 μm dengan permukaan *scaffold* yang tanpak rata. Pori tersebut sangat penting dalam dalam adhesi dan pertumbuhan sel.

Dalam aplikasi *tissue engineering*, *scaffold* merupakan media yang sangat penting sebagai lingkungan mikro yang cocok untuk pengabungan sel dan faktor pertumbuhan dalam meregenrasi jaringan yang rusak. Scaffold tersebut berfungsi untuk meniru dari lingkungan mikro yang sebenarnya pada in-vivo di mana sel-sel berinteraksi dan berperilaku sesuai dengan isyarat mekanik diperoleh dari lingkungan 3D sekitarnya. Oleh karena itu, sifat material dari scaffold sangat penting dalam menentukan respon seluler (Loh and Choong, 2013)



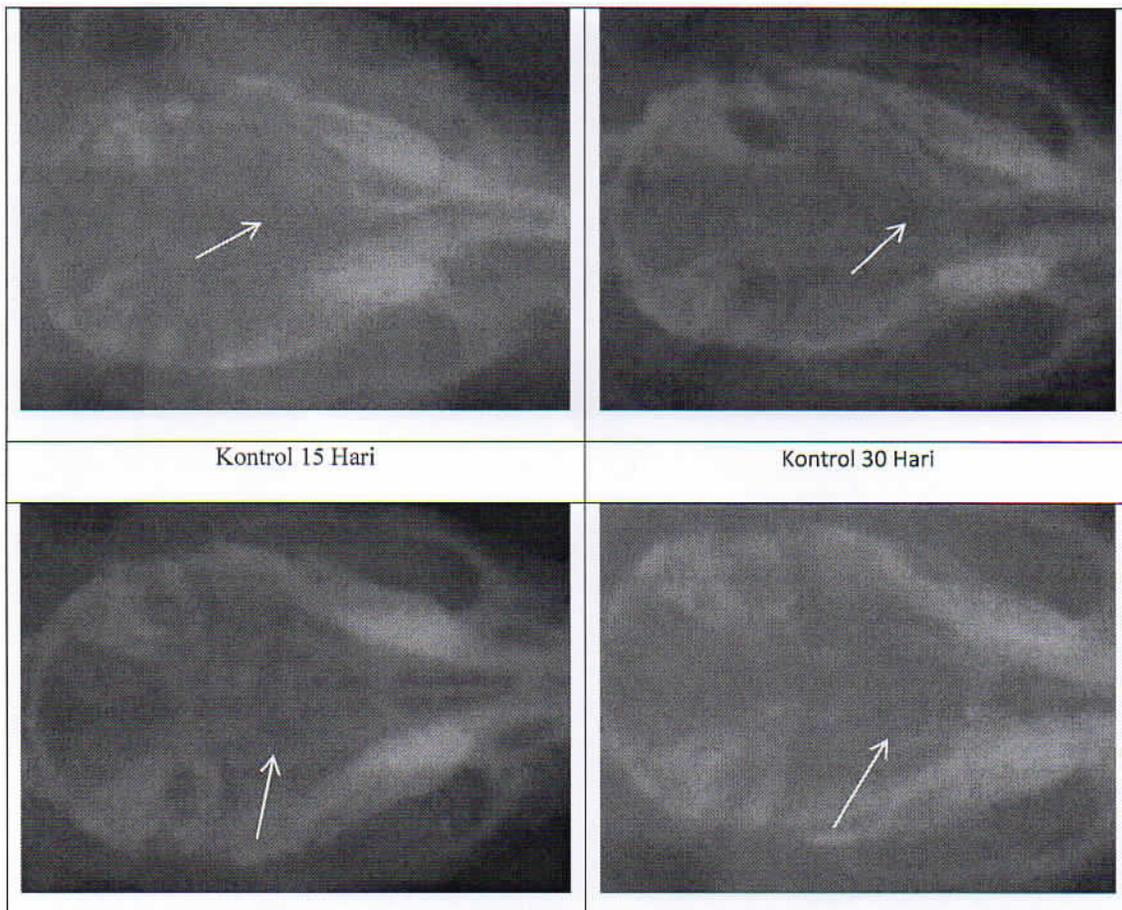
Gambar 3. Mikrostruktur komposit scaffold HA-kolagen-kitosan

Secara in-vitro menggunakan simulated body fluid (SBF), setelah perendaman komposit selama 6 hari menunjukkan scaffold terlihat seperti ada pertumbuhan penupukan globular (Verisqa, 2016) (Gambar 4). Gambar 2 ini sangat berbeda bila dibandingkan dengan scaffold yang tidak direndam dalam SBF (Gambar 3).



Gambar 4. SEM Komposit HA-Kolagen-Kitosan yang direndam dalam SBF

Scaffold yang direndam dalam SBF menjadi bentuk globular yang berpori. Hal ini disebabkan hidroksiapatit yang terdapat dalam *scaffold* bersifat bioaktif sehingga dapat menarik ion-ion kalsium dan fosfor dari substrat SBF, membentuk hidroksiapatit baru. Selama proses perendaman, ion Ca^{2+} yang dikandung SBF ditarik oleh ion OH^- dan PO_4^{3-} sehingga pada permukaan dari *scaffold* ditumbuhi oleh kalsium hidroksiapatit baru yang disebut dengan *bone-like apatite* (Chien, et.al., 2014).



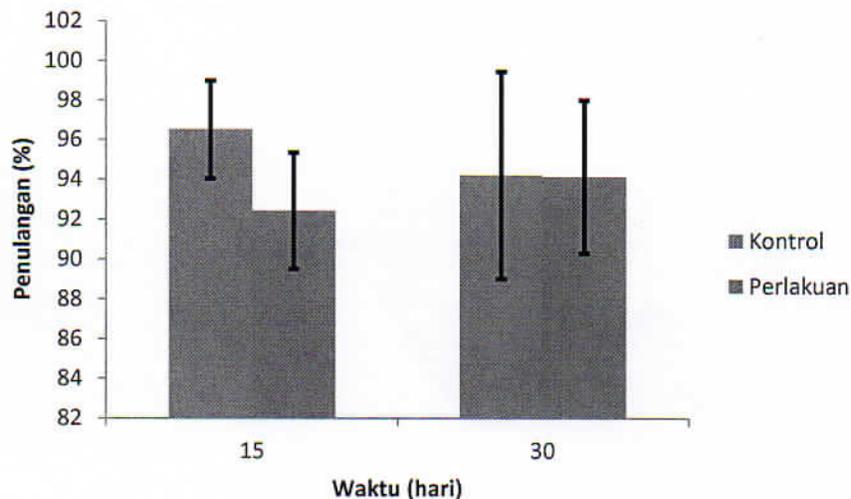
Komposit 15 Hari	Komposit 30 hari
------------------	------------------

Gambar 5. Gambaran X-ray pasca implantasi

Gambar 5 adalah hasil X-ray tulang kranial hewan uji dengan dan tanpa komposit. Pada hewan kontrol maupun hewan yang diimplan dengan komposit HA-kolagen-kitosan menunjukkan sudah terjadi pertumbuhan tulang baru sejak 15 hari pasca implantasi. Pertumbuhan tulang jelas terlihat dimulaid dari pinggiran defek tulang dan lalu berkembang ke bagian tengah dari defek.

Berdasarkan pada analisis Image J, (Gambar 5), pertumbuhan kepadatan tulang dari defek tulang pada hewan kontrol pada hari 15 hari dan 30 hari serta perlakuan 15 hari dan 30 hari berturut-turut adalah $96,51 \pm 2,47$, $92,42 \pm 2,92$, $94,22 \pm 5,22$, dan $94,13 \pm 3,86$.

Kepadatan tulang 30 hari pasca implantasi pada hewan kontrol terlihat lebih rendah dibandingkan dengan hari ke 15, namun secara statistik tidak berbeda nyata ($\alpha = 0,05$). Walaupun demikian, penurunan ini mungkin disebabkan terjadinya resorpsi dalam proses remodelling pembentukan osteoklas. Resorpsi terjadi karena adanya asam yang mengasamkan kompartmen yang berdekatan dengan tulang sehingga melarutkan mineral tulang. Resorpsi tulang berakhir ketika osteoklas mati oleh apoptosis (Raggat dan Partridge, 2010)



Gambar 5. Kepadatan tulang pada defek pasca implantasi hari ke 15 dan 30.

Kepadatan defek tulang kalvarial hewan uji yang diimplan dengan *scaffold* HA-Kolagen-Kitosan adalah 94 % yang tidak berbeda nyata dengan kontrol. Yang menarik adalah, kepadatan tulang 15 dan 30 hari pasca implantasi tidak mengalami penurunan seperti yang terjadi pada kontrol.

KESIMPULAN DAN SARAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. *Scaffold* komposit HA-Kolagen-Kitosan merupakan biomaterial yang berpori yang terkoneksi satu dan lainnya.
2. *Scaffold* bersifat bioaktif yang dapat menumbuhkan hidroksiapatit baru atau bone-like apatit.
3. *Scaffold* dapat menyembuhkan defek tulang kalvaria dari hewan uji.

DAFTAR PUSTAKA

- Rajabi-Zamani, A.H., Behnamghader, A., Kazemzadeh, A. Synthesis of nanocrystalline carbonated hydroxyapatite powder via nonalkoxide sol-gel method. *Materials Science and Engineering* . 2008; C. 28, 1326–1329
- Sobczak-kupiec A, Wzorek Z , Kijkowska R, and Kowalski Z. Effect of calcination conditions of pork bone sludge on behaviour of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Bull. Mater. Sci.* 2013; 36(4):755–764.
- Wang Y1, Zhang L, Hu M, Liu H, Wen W, Xiao H, Niu Y. Synthesis and characterization of collagen-chitosan-hydroxyapatite artificial bone matrix. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Jul;86(1):244-52
- Chien CS, Liao ZY, Hong TF, Kuo TY, Chang CH, Yeh ML. Surface microstructure and bioactivity of hydroxyapatite and fluoroapatite coatings deposited on Ti-6Al-4-V substrates using Nd-YAG laser. *J. Med Biol Eng.* 2014;34(2):109-115.
- Verisqa F. Evaluasi morfologi permukaan dan komposisi scaffold kitosan-hidroksiapatit-kolagen setelah perendaman dalam simulated body fluid. 2016; Tesis, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia.
- Raggatt, LJ and Partridge, NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010; 285(33): 25103–25108.
- Loh QL, and Choong C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering*; 2010; Part B 18(6): 485-501

2. Ekstraksi dan uji in vivo bionano hidroksi apatit sisik ikan kakap putih sebagai bahan baku bone graft.

ABSTRAK

Aplikasi *bone graft* merupakan terapi pada perbaikan fungsi tulang dan pencegahan kelanjutan resorpsi tulang. Namun, *bone graft* yang ada saat ini memiliki beberapa kekurangan yang dapat merugikan resipien, seperti tindakan invasif, risiko kontaminasi maupun penularan penyakit dari donor, ragam budaya dan agama yang menentang beberapa sumber donor, serta tingginya harga. Oleh karena itu, penelitian tentang *alloplast* sebagai bahan alternatif banyak dikembangkan belakangan ini. *Alloplast* merupakan *bone graft* sintetik yang memiliki kandungan hidroksiapatit. Hidroksiapatit (HA) dapat ditemukan diulang dan sisik ikan. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari perkembangan pertumbuhan defek tulang mandibula yang telah diberikan bubuk hidroksiapatit steril iradiasi gamma dari sisik ikan kakap putih (*Lates calcarifer*) sebagai bahan alternatif *bone graft alloplast*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan menggunakan 24 ekor hewan coba tikus *Sprague-Dawley* jantan usia 16 minggu yang diberikan defek tulang pada mandibula kanan dengan diameter 3 mm. Hasil pembedahan diobservasi dengan foto rontgen dan uji histopatologi. Hasil penelitian menunjukkan peningkatan berat badan pada kelompok kontrol dan perlakuan. Dari hasil foto rontgen, pertumbuhan tulang yang tertinggi diperoleh pada kelompok perlakuan 6 minggu dengan pertumbuhan 100% kemudian disusul dengan kelompok perlakuan 4 minggu sebesar 88,89% dan terakhir pada kelompok perlakuan 2 minggu sebesar 66,67%. Hasil uji histopatologi menunjukkan ada osteosit dan osteoblas yang ditemukan pada kelompok perlakuan 6 minggu. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa bubuk HA yang didapat dari sisik ikan kakap putih dapat dijadikan bahan alternatif *bone graft* dalam dunia kedokteran gigi.

Kata kunci : *bone graft*, hidroksiapatit, sisik ikan kakap putih

ABSTRACT

Bone graft application is a therapy which could be used to repair bone and to avoid the extent of bone resorption. However, current bone graft materials have some disadvantages for the recipient, such as invasive action, risk of contamination and even disease transmission from donor, cultures and religion issues that against several resources of the donor, and also high price of the materials. Therefore, research on *alloplast* as an

alternative material has been developed recently. Alloplast is a synthetic bone graft that contains hydroxyapatite. Hydroxyapatite can be found in fish bone and scales. This study aims to study the growth of mandibular bone defect that has been given with hydroxyapatite powder from white barramundi (*Lates calcarifer*) fish scales as an alternative of bone graft material. This research is an experimental laboratory study with uses of 24 animals of 16-weeks old Sprague-Dawley males rats as subjects that given 3 mm bone defects on right mandible. The surgery results were reviewed by roentgen photos and histopathology tests. Results of this study showed an increase of body weight of control and treatment groups. The roentgen photos results, showed highest bone growth found in the 6-weeks treatment group had 100% growth, followed by the 4-weeks treatment group which showed 88.89% growth, and followed by the 2-weeks treatment group with experienced 66.67% growth. Histopathology tests showed the presence of osteocytes and osteoblasts in the 6-weeks treatment group. Based on these results, it can be concluded that hydroxyapatite powder from white barramundi fish scales can be used as bone graft substitute alternative materials.

Keywords : bone graft, hydroxyapatite, white barramundi fish scales

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal merupakan penyakit yang melibatkan jaringan pendukung gigi. Jaringan pendukung gigi atau jaringan periodonsium terdiri dari jaringan lunak dan jaringan keras. Jaringan lunak pendukung gigi yaitu gingival dan ligamentum periodontal, sedangkan jaringan keras pendukung gigi terdiri dari sementum dan tulang alveolar. Berdasarkan jaringan yang terlibat, penyakit periodontal dapat dibagi menjadi dua, yaitu gingivitis dan periodontitis. Gingivitis merupakan inflamasi yang mengenai gingiva, sedangkan periodontitis merupakan inflamasi yang melibatkan seluruh jaringan pendukung gigi. Periodontitis ditandai dengan adanya inflamasi pada jaringan periodonsium yang disertai dengan hilangnya perlekatan jaringan ikat pada sementum. Hilangnya perlekatan mengakibatkan sulkus gingiva makin dalam sehingga terbentuk poket periodontal yang dikarenakan adanya pergeseran epitel pada sepanjang permukaan akar. Hal tersebut merupakan reaksi inflamasi yang akhirnya menyebabkan resorpsi tulang dan resesi gingiva.

Periodontitis merupakan penyakit destruktif yang selalu melibatkan inflamasi jaringan, elongasi *junctional epithellium*, hilangnya perlekatan jaringan ikat, dan destruksi serat kolagen dan tulang. Pada pemeriksaan klinis intra oral akan terlihat peradangan pada gingiva dan terbentuknya poket periodontal. Pada pemeriksaan radiografi akan terlihat adanya resorpsi tulang alveolar akibat inflamasi gingiva yang menyebar. Resorpsi tulang

alveolar akan menyebabkan gigi goyang dan avulsi. Resorpsi internal ini juga didukung oleh faktor menua tubuh manusia sehingga jumlah sel osteoblas akan menurun dan sel osteoklas meningkat. Untuk mencegah kelanjutan resorpsi tulang alveolar, dilakukan *bone grafting* dari berbagai material yang biokompatibel.

Dalam dunia kedokteran dan kedokteran gigi, bahan *bone graft* dibagi menjadi 4 kategori, yaitu *autograft*, *allograft*, *xenograft*, dan *alloplast*. Keempat bahan tersebut memiliki keunggulannya masing-masing. *Autograft* merupakan bahan *bone graft*, donor dan resipien berasal dari satu individu, yang berarti terdapat dua lokasi luka paska bedah. *Allograft* yaitu bahan *bone graft*, donor dan resipiennya berasal dari spesies yang sama tetapi beda individu, sehingga memungkinkan terjadinya penolakan bahan *graft* pada resipien terhadap donor. *Xenograft*, merupakan bahan *bone graft* yang berasal dari hewan. Bahan *bone graft* terakhir yaitu, *alloplast*, merupakan bahan *bone graft* yang terbuat dari material sintetik mengandung hidroksiapatit (HA) dan beberapa mineral lain.

Di Indonesia, penyakit periodontal merupakan penyakit gigi dan mulut dengan jumlah terbanyak kedua setelah karies [1]. Prevalensi penyakit periodontal di Indonesia pada semua kelompok umur yaitu 96,58% [2]. Tingginya jumlah penderita menunjukkan bahwa tinggi pula kebutuhan bahan *bone graft* di Indonesia. Namun, bahan-bahan *bone graft* yang ada saat ini memiliki banyak kekurangan yang dapat merugikan resipien. Kekurangannya yaitu, adanya tindakan invasif, tingginya risiko kontaminasi yang didapat dari donor, ragam budaya dan agama yang menentang beberapa sumber donor bahan *bone graft*, serta tingginya harga di pasaran. Adanya kekurangan dari bahan-bahan *bone graft* yang ada saat ini membuat banyaknya penelitian tentang bahan alternatif *bone graft* yang terbuat dari limbah. Bahan alternatif ini diharapkan memiliki semua keuntungan bahan *bone graft* sehingga dapat mencegah kelanjutan resorpsi internal tulang alveolar.

Limbah yang dapat digunakan sebagai bahan alternatif *bone graft* harus memiliki kandungan hidroksiapatit (HA) sehingga dapat mendukung proses pertumbuhan tulang. Indonesia merupakan negara penghasil ikan terbesar dengan produksi 10 juta ton tiap tahunnya [3,4]. Salah satu jenis ikan yang banyak ditemukan di sepanjang perairan Indonesia, yaitu ikan kakap putih (*Lates calcarifer*). Pada saat mengkonsumsi ikan, beberapa bagian ikan akan dibersihkan dan dibuang menjadi limbah, termasuk sisik ikan. Tiap tahunnya limbah ikan mencapai 30% dari produksi ikan. Limbah dari pengolahan perikanan diketahui mencapai 75% dari berat total ikan [5]. Sisik ikan yang biasanya

dibuang ini ternyata memiliki struktur kimiawi yang pada saat ini banyak diminati pada bidang kesehatan. Limbah sisik ikan kakap putih merupakan bahan alternatif yang tepat karena komposisinya terdiri dari hidroksiapatit (HA) dan kolagen. Kandungan hidroksiapatit (HA) yang terdapat di dalam sisik ikan dapat dipisahkan dari kolagen sehingga menghasilkan hidroksiapatit murni (HA 100%). Hidroksiapatit murni dapat digunakan sebagai bahan alternatif *bone graft* yang memiliki sifat osteokonduksi sehingga dapat dipakai dalam dunia kedokteran gigi.

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka rumusan masalah penelitian ini adalah bagaimanakah potensi sisik ikan kakap putih sebagai bahan alternative *bone graft*. Laporan penelitian ini dibuat dengan tujuan untuk mengetahui potensi sisik ikan kakap putih sebagai bahan alternatif *bone graft* pada pertumbuhan defek tulang mandibula pada tikus *Sprague-dawley*. Manfaat dari laporan penelitian ini yaitu dapat menjadi inovasi baru dalam pemanfaatan limbah sisik ikan sebagai bahan alternatif *bone graft* yang dapat diterapkan di kedokteran gigi dalam upaya mencegah kelanjutan resorpsi tulang mandibula.

BAHAN DAN METODE

Bahan.

Nano hidroksiapatit produk PAIR-BATAN hasil isolasi sisik ikan kakap putih. Bahan kimia lainnya kualitas p.a. Hidroksi apatite komersial buatan Aldrich.

Karakterisasi FTIR nano HA

Hidroksi apatit hasil isolasi sisik ikan kakap putih dikarakterisasi menggunakan spektrofometer FTIR , Prestige-21, Shimadzu ditujukan untuk menguji kualitas mutunya yang dibandingkan dengan hidroksi standard buatan Aldrich. Bubuk HA dicampur dengan KBr, lalu dimasukkan pada tempat sampel stainless steel, selanjutnya diukur spektrumnya pada daerah bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} .

Karakterisasi XRD nano HA

Karakterisasi TEM nano HA

Pengujian morfologi HA dilakukan menggunakan TEM (*Transmission Electron*

Microscope). Sampel dilapisi dengan lapisan tipis emas dengan ketebalan 100Å menggunakan Denton Vacuum. Gambar morfologi dari sampel diperoleh menggunakan SEM 515/RDAX PV 9900.

Uji In Vivo

Percobaan pada hewan coba digunakan tikus sehat Sprague-Dawley dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan IPB, Bogor, berdasarkan prosedur standard kode etik pengujian hewan. Jumlah total tikus sehat *Sprague-Dawley* jantan, dengan kisaran berat 150 -220 gr secara acak didistribusikan dalam 2 kelompok. Kelompok 1 terdiri 12 ekor tikus, Nano HA steril dengan jumlah berat ± 7 mg yang telah dicampur darah dimasukkan pada masing-masing bagian defek tulang tikus. Defek tulang ditutupi oleh mukosa dan penjahitan dengan benang *atraumatic polypropylene* 6-0 dan penutupan kulit serta penjahitan dengan benang *atraumatic polypropylene* 4-0. (gambar 5c). Sedangkan pada masing-masing tikus pada kelompok II (control) tidak dimasukkan nano HA pada defek, sehingga defek langsung ditutup oleh mukosa dan dijahit. Setelah penjahitan selesai, dilakukan foto rontgen pada setiap tikus untuk melihat letak dan bentuk awal defek dengan atau tanpa bahan *bone graft* HA.

Cara pemasukkan nano HA pada defek tulang tikus disajikan pada Gambar 1. Pembedahan dilakukan pada kondisi aseptik dan anastesi *intrapertoneal* dengan ketamine (40 mg/kg) dan xylazin (5 mg/kg). Pembuatan defek tulang dilakukan menggunakan bor *carbide* bulat. Defek tulang terletak di depan angulus mandibula dengan diameter ± 3 mm untuk semua tikus. Selama prosedur pengeboran, diberikan irigasi dengan larutan saline steril untuk menghindari *thermal burn* pada jaringan.

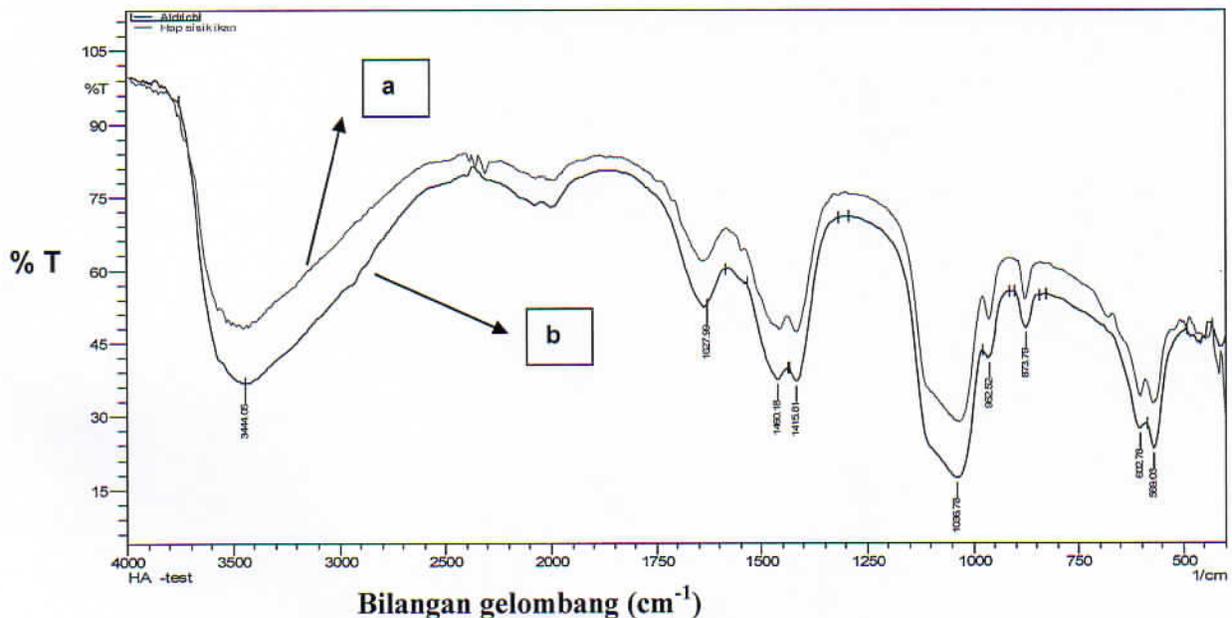
Foto rongent dilakukan segera pada setiap tikus untuk mengamati letak dan bentuk awal defek dengan atau tanpa bahan *bone graft* HA. Selanjutnya dilakukan foto rongent pada pengamatan 2 minggu, 4 minggu dan 6 minggu untuk mempelajari status implant dan reaksi tulang terhadap implant. Selain itu, dilakukan analisis histopatologi untuk mempelajari...

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi HA hasil isolasi sisik ikan kakap putih

1. FTIR

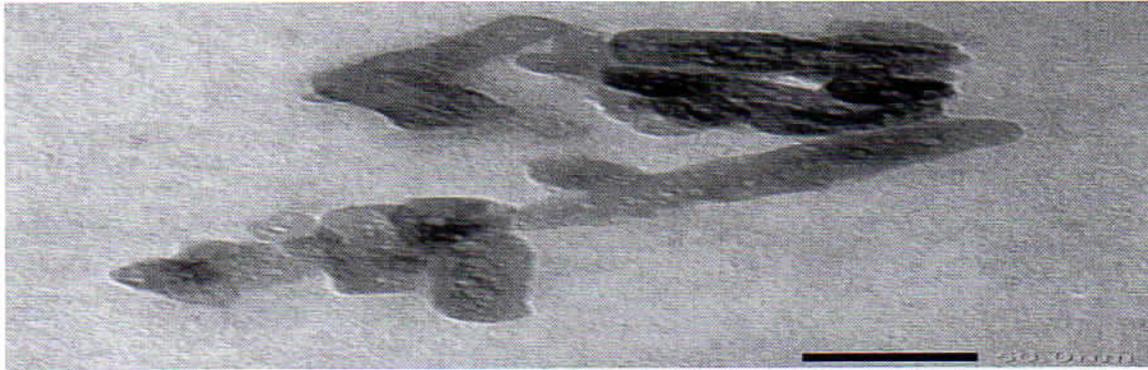
Spectrum FTIR serbuk Hap hasil isolasi sisik ikan (a) dan Hap komersial (b) disajikan pada Gambar 1. Karakteristik daerah bilangan yang ditunjukkan pada 3444 cm^{-1} merupakan mode tekuk gugus ikatan hidrogen Ion OH dan ikatan ion OH yang mode bebas. Puncak pada daerah bilangan gelombang 1038 cm^{-1} muncul dari gugus V_3PO_4 , puncak pada 603 cm^{-1} dan 569 cm^{-1} muncul dari gugus V_4PO_4 . Selanjutnya beberapa kandungan gugus CO_3^{2-} muncul pada bilangan gelombang 1600 cm^{-1} , yang mengindikasikan adanya karbonat apatit. Bentuk spektrum dan letak gugus fungsi baik Hap hasil isolasi sisik ikan sama halnya bentuk spektrum dan letak gugus fungsi Hap komersial. Dapatlah disimpulkan bahwa Hap hasil isolasi sisik ikan kakap putih berupa Hap karbonat.



Gambar 1. Spektra FTIR Hap hasil isolasi sisik ikan kakap putih (a) dan Hap komersial (b)

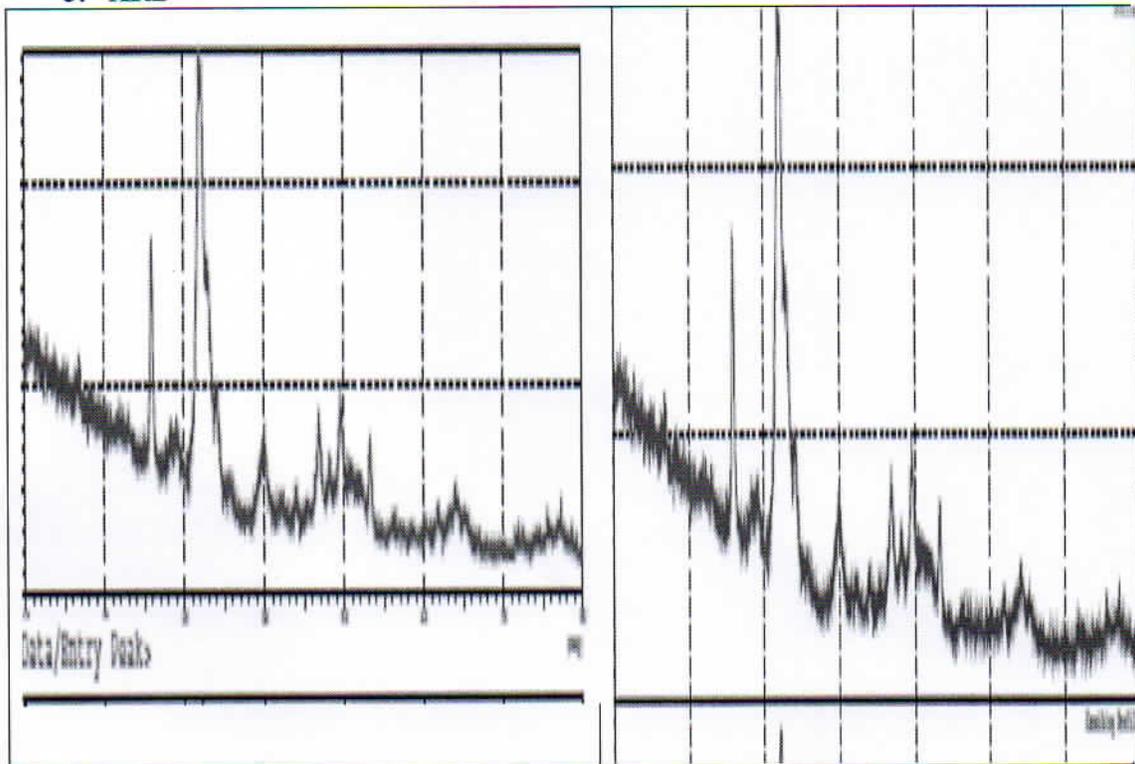
2. TEM

Sruktur dan morfologi n-HA yang diperoleh dari hasil isolasi sisik ikan kakap putih dikonfirmasi menggunakan *Transmission Electron Microscope* (TEM) disajikan pada Gambar 2. Analisis menggunakan TEM mengkonfirmasi bentuk morfologi n-HA dengan ukuran partikel n-HA. Ukuran partikel nano HA yang sama diperoleh oleh Ferraz [14].



Gambar 2. TEM nano hidroksi apatit hasil isolasi sisik ikan kakap putih dengan *mild proses*.

3. XRD



Gambar 3. Spektra XRD nano hidroksiapatite

Uji in vivo

Penelitian dilakukan sejak September 2013. Penyeleksian hewan coba dilakukan sebelum pemeliharaan adaptasi selama kurang lebih 1 minggu. Setelah proses pembedahan, tikus dipelihara dalam kandang dengan jumlah 2 ekor tiap kandang. Sebelum

proses pembedahan dan setelah proses *euthanasia*, dilakukan pengukuran berat badan pada setiap tikus. Tabel 1 menunjukkan berat badan tikus sebelum proses pembedahan (*pre-op*) dan sesudah euthanasia (*postop*). Terlihat kenaikan berat badan yang signifikan pada semua tikus, yang diberikan bubuk HA maupun yang tidak diberikan bubuk HA. Hal ini menunjukkan bahwa keberadaan bubuk hidroksiapatit sebagai benda asing terhadap sistem imun tikus tidak menimbulkan hipersensitifitas sehingga metabolisme tikus dapat terjadi secara normal. Hal ini juga didukung oleh fakta bahwa selama pemeliharaan hewan coba tidak ada yang mati karena sakit, namun ada beberapa hewan coba yang *missing* dari kandangnya. Hasil penelitian pada peneliti sebelumnya juga menunjukkan adanya kenaikan berat badan pada hewan coba yang berarti eksperimen tersebut tidak mempengaruhi pola makan dan gaya kunyah pada hewan coba.³⁵

Tabel 1. Pengaruh pemakaian hidroksi apatit pada perubahan berat badan tikus sebelum operasi (*pre-op*) dan sesudah operasi (*post-op*).

Waktu (minggu)	Sampel	Berat (gr)	
		Pre-op	Post-op
2	HA-2.1	161	262
	HA-2.2	173	121
	HA-2.3	179	245
	HA-2.4	216	272
	C-2.1	182	217
	C-2.2	196	243
	C-2.3	215	249
	C-2.4	175	X
4	HA-4.1	214	234
	HA-4.2	173	203
	HA-4.3	177	284
	HA-4.4	177	X
	C-4.1	151	236
	C-4.2	178	234
	C-4.3	166	246
	C-4.4	188	201
6	HA-6.1	180	224
	HA-6.2	165	199
	HA-6.3	180	284
	HA-6.4	177	X
	C-6.1	174	257
	C-6.2	207	260
	C-6.3	180	270
	C-6.4	179	X

Catatan :

HA =tikus yang dimplantkan hidroksi apatit

C= tikus normal/control

Hasil pembedahan pada hewan coba ditinjau dengan pemeriksaan radiografi, pada hari pertama pembedahan dan setelah 2, 4, dan 6 minggu. Gambar 6 merupakan gambar defek pada area angulus mandibula kanan tikus *Sprague-Dawley* setelah pembedahan (hari ke-1). Defek tulang mandibula tikus dibuat dengan bur tulang *carbide* bulat, dengan ukuran awal yaitu 3 mm.



Gambar 4. Hari ke-1 : Defek (panah merah) pada area angulus mandibula kanan tikus *Sprague -Dawley*, dengan diameter 3 mm

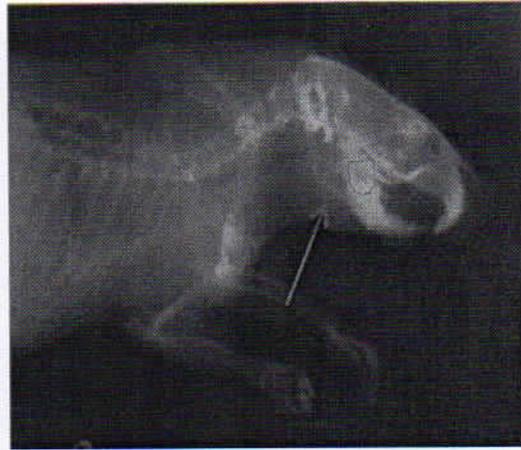
Foto radiografi dari defek pada area angulus mandibula kanan tikus setelah dua minggu. Defek tulang yang diberikan bubuk HA menunjukkan adanya penyusutan (gambar 5a), sedangkan yang tidak diberikan bubuk HA menunjukkan tidak ada perubahan (gambar 5b).



2minggu (kontrol)



4 minggu



4 minggu



6 minggu



3. Daya antimikroba Kitosan iradiasi terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* dan *Salmonella typhi* untuk digunakan sebagai Bahan Biomaterial

ABSTRAK

Kitosan merupakan polimer alam terbesar kedua setelah selulosa. Kitosan diperoleh melalui proses deasetilasi kitin dari kulit udang. Kitosan mempunyai banyak manfaat dalam berbagai bidang termasuk kesehatan, pertanian, industri dan lingkungan. Dalam bidang kesehatan, kitosan dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba, anti kanker, dan anti inflamasi. Kitosan mempunyai berat molekul tinggi sehingga efektifitasnya menjadi terbatas. Salah satu cara untuk menurunkan berat molekul kitosan adalah dengan iradiasi gamma. Manfaat kitosan dalam bidang kesehatan adalah sebagai anti mikroba. Pada penelitian ini kitosan diiradiasi dengan sinar gamma pada dosis 25, 50, 75 dan 100 kGy. Beberapa mikroba yang dipelajari yaitu bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escheria. Coli*, dan *salmonella typhi*. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa dosis iradiasi mempunyai pengaruh terhadap daya antimikroba kitosan. Semakin tinggi dosis radiasi (semakin rendah BMv) maka daya antimikroba kitosan semakin tinggi. Kitosan menunjukkan kemampuan membunuh atau bakterisidal terhadap ke tiga mikroba yang diteliti

Kata kunci: biomaterial, kitosan, sinar gamma, *minimum bactericidal concentration*, *minimum bactericidal concentration*

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara maritim yang kaya akan sumberdaya laut. Salah satu sumberdaya laut terbesar adalah udang. Kulit udang merupakan limbah hasil proses udang yang diekspor dalam bentuk daging. Kulit udang mencapai 40% dari sisa proses produksi yang belum dimanfaatkan secara maksimal. Kitosan merupakan polimer alam yang diperoleh melalui proses deasetilasi kitin yang bisa didapat dari berbagai sumber seperti kulit udang, kepiting, rajungan [1]. Kitosan mempunyai beberapa keunikan sifat seperti biokompatibel terhadap tubuh, non toksik, mudah dibentuk film sehingga menyebabkannya potensi digunakan dalam bidang kesehatan [2]. Selain dibidang kesehatan, kitosan baik tunggal maupun kombinasi dengan berbagai polimer dapat

digunakan dalam bidang pangan sebagai pengawet makanan, bidang farmasi, tekstil, pertanian, pengolahan air maupun industri kosmetik. Kitosan mempunyai spektrum antimikroba yang luas terhadap beberapa bakteri, jamur, kapang maupun alga [3]. Daya antimikroba kitosan sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti faktor intrinsik kitosan seperti berat molekul, adanya muatan positif, kondisi fisik kitosan seperti dalam keadaan larutan atau padat dan faktor mikroorganisme seperti [3]. Beberapa studi menyebutkan bahwa berat molekul sangat berpengaruh terhadap daya antimikroba kitosan antara. Suatu studi menyebutkan bahwa bertambahnya berat molekul akan menurunkan daya antimikroba kitosan terhadap *E.coli*. Sebaliknya studi yang lain menyebutkan bahwa kitosan dengan berat molekul tinggi mempunyai aktivitas anti mikroba yang tinggi terhadap *E. Coli* [4].

PAIR BATAN telah berhasil mensistesis kitosan dari limbah kulit udang melalui proses demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi menggunakan bahan kimia dengan standar yang baik. Selain itu kitosan dengan berbagai berat molekul juga telah dihasilkan melalui proses degradasi rantai molekul utama kitosan menggunakan sinar gamma. Kitosan dengan berbagai berat molekul yang dihasilkan melalui iradiasi gamma pada dosis 25, 50, 75 dan 100 kGy digarapkan mempunyai kemampuan daya antimikroba yang berbeda terhadap bakteri patogen yaitu *Staphylococcus aureus*, *E. Coli* dan *Salmonella thypi*.

BAHAN DAN METODE

Bahan.

Kitosan produksi PAIR BATAN, mikroba *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *Nutrient Agar*, dan bahan-bahan lain yang diperlukan

Metode

Kitosan yang berasal dari limbah kulit udang dibuat dengan cara proses demineralisasi, deproteinasi dan deasetilasi

Iradiasi Kitosan

Kitosan dikemas dalam plastik PE diiradiasi dengan sinar gamma yang dipancarkan dari sumber Co-60 dengan dosis 25, 50, 75 dan 100 kGy pada suhu kamar dengan kecepatan dosis 7 kGy/jam.

Pengujian daya hambat

Daya hambat dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat pada media agar. Prosedur yang dilakukan adalah: silinder *stainless steel* steril diletakkan di atas permukaan lempeng agar yang telah ditanami bakteri. Teteskan larutan uji dari masing masing sampel yang sudah diencerkan sesuai dengan kebutuhan dan juga larutan asam asetat sebagai kontrol pelarut menggunakan mikropipet *Eppendorf* sebanyak 100 μ l atau dengan pipet ukur 0,10 ml ke dalam silinder. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian amati zona hambat yang terbentuk dan diukur zona hambatnya dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran diameter zona hambat ditunjukkan pada zona bening yang terbentuk di sekeliling silinder.

Pengujian Konsentrasi Hambat/bakterisida Minimum (KHM/KBM)

Metode yang digunakan adalah metode Dilusi dengan cara penipisan lempeng agar yaitu dengan cara mencampurkan zat antimikroba(bahan uji) dengan media yang kemudian ditanami mikroba. Metode ini bertujuan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) zat antimikroba terhadap bakteri. Larutan khitosan dibuat pengenceran dengan berbagai konsentrasi dan kemudian larutan khitosan dicampur dengan media Nutrient agar (yang telah dicairkan dan dijaga pada suhu 45°C - 50°C dengan perbandingan yang tertentu dan terukur konsentrasinya, kemudian dikocok dan sampai homogenlalu dituang kedlam cawan petri steril dan dibiarkan dingin hingga membeku. Lalu pada setiap media cawan petri ditanamkan dengan suspensi mikroba yang mengandung konsentrasi kira kira 10^6 Sel mikroba per ml. Kemudian media cawan petri tersebut diinkubasi pada posisi terbalik selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C . Hasil pengamatan KHM dibaca berdasarkan konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berat molekul viskositas (MW_v) rata-rata kitosan sebagai hasil iradiasi gamma dengan dosis 25 sd 100 kGy disajikan pada Tabel 1. Dari Tabel terlihat bahwa iradiasi gamma sangat efektif menurunkan berat molekul kitosan. Radiasi ionisasi seperti sinar gamma dapat mendegradasi polisakarida seperti selulosa (kitosan), starch, dan pektin melalui pemutusan ikatan glikosidik sehingga berat molekul menjadi berkurang dan kelarutan bertambah [5].

Tabel 1. Hubungan antara Dosis radiasi gamma dan berat molekul rata-rata (MW_v) kitosan

Dosis Radiasi (kGy)	BMv Kitosan
0	$2,3 \times 10^5$
25	$1,3 \times 10^5$
50	$8,4 \times 10^4$
75	$3,5 \times 10^4$
100	$3,1 \times 10^4$

Zona hambat kitosan iradiasi terhadap beberapa bakteri patogen yaitu mikroba *S. Aureus*, *E. Coli* dan *S. typhi*, ditunjukkan pada Tabel 2. Terlihat bahwa kitosan mempunyai daya hambat terhadap bakteri *S. Aureus*, *E. Coli* dan *S. typhi*. Kemampuan kitosan dengan konsentrasi 5000 ppm menghambat pertumbuhan bakteri *E. Coli* dibandingkan dengan bakteri *S. aureus* dan *S. typhi*.

Tabel 2. Zona hambat kitosan pada *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* dengan berbagai dosis radiasi

Diameter Zona Hambat (mm)				
Dosis radiasi	Konsentrasi kitosan(ppm)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>
0 kGy	5000	9	11	14
25 kGY	5000	9	11	9
50 kGy	5000	9	11	15
75 kGy	5000	9	15	15
100 kGy	5000	9	15	15

Setelah didapat daya hambat kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi* maka dilanjutkan dengan menentukan Konsentrasi hambat minimum kitosan dengan cara menentukan konsentrasi terkecil yang mempunyai kemampuan hambat terhadap bakteri. Tabel 3, 4 dan 5 menunjukkan konsentrasi hambat minimum kitosan terhadap *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*. Tabel 3 menunjukkan pengaruh radiasi terhadap KHM *E coli*. Semakin tinggi dosis radiasi menunjukkan daya antimikroba yang meningkat. Hal ini ditunjukkan dengan semakin kecil dosis kitosan yang diperlukan untuk membunuh. Selain itu dari media pertumbuhan terlihat bahwa media agar terlihat jernih. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan mempunyai kemampuan membunuh (bakterisid) terhadap *E. coli*. Konsentrasi bakterisid minimum (KBM) kitosan dalam ppm pada dosis radiasi 0, 25, 50, 75 dan 100 kGy berturut-turut adalah 4000, 4000, 1600, 1400, dan 1200 ppm. Sedangkan kemampuan kitosan terhadap

bakteri *S. Typhi* ditunjukkan oleh Tabel 4. Seperti pada bakteri *E. Coli*, kitosan juga mempunyai daya bakterisid terhadap *S. typhi* dengan konsentrasi bakterisid minimum (KBM) yang diiradiasi pada dosis 0, 25, 50, 75 dan 100 kGy berturut-turut adalah 1800, 4000, 1600, 1600, 1400. Semakin tinggi dosis radasi maka semakin kecil nilai KBM kitosan terhadap bakteri *S. typhi*. Tabel 5 memperlihatkan konsentrasi bakterisid minimum kitosan terhadap bakteri *S. aeruginosa*. KBM semakin kecil dengan bertambahnya dosis radiasi hingga 75 kGy dan kemudian meningkat pada dosis radiasi 100 kGy. Konsentrasi bakterisid minimum (KBM) kitosan dalam ppm pada dosis radiasi 0, 25, 50, 75 dan 100 kGy berturut-turut adalah 4000, 1400, 1600, 1200, dan 1600 ppm.

Tabel 3 konsentrasi Bakterisid minimum Khitosan Radiasi terhadap bakteri *E. coli*

Konsentrasi Khitosan (ppm)	Dosis Radiasi				
	0 kGy	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy
200	++	++	++	++	++
400	++	++	++	++	++
600	++	++	++	++	++
800	++	++	++	++	++
1000	++	++	+	++	+
1200	++	++	+	+	-
1400	++	++	+	-	-
1600	++	++	-	-	-
1800	+	++	-	-	-
2000	+	++	-	-	-
4000	-	-	-	-	-
6000	-	-	-	-	-
10.000	-	-	-	-	-

Tabel 4. konsentrasi bakterisid minimum Khitosan Radiasi terhadap bakteri *S. typhi*

Konsentrasi Khitosan (ppm)	Dosis radiasi				
	0 kGy	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy
200	++	++	++	++	++
400	++	++	++	++	++
600	++	++	++	++	++
800	++	++	++	++	++
1000	++	++	+	++	+
1200	++	++	+	+	+
1400	++	++	+	+	-
1600	++	++	-	-	-
1800	-	++	-	-	-
2000	-	++	-	-	-
4000	-	-	-	-	-
6000	-	-	-	-	-
5000	-	-	-	-	-

Tabel 5 konsentrasi bakterisid minimum Khitosan Radiasi terhadap bakteri *S. aureus*

Konsentrasi Khitosan (ppm)	Dosis radiasi				
	0 kGy	25 kGy	50 kGy	75 kGy	100 kGy
200	++	++	++	++	++
400	++	++	++	++	++
600	++	++	++	++	++
800	++	++	++	++	++
1000	++	++	+	+	+

1200	++	+	+	-	+
1400	++	-	+	-	+
1600	++	-	-	-	-
1800	++	-	-	-	-
2000	++	-	-	-	-
4000	-	-	-	-	-
6000	-	-	-	-	-
10.000	-	-	-	-	-

KESIMPULAN

Kitosan mempunyai daya antimikroba terhadap bakteri *S. Aureus*, *E. Coli*, *S. typhi*. Kemampuan antimikroba kitosan menunjukkan adanya kemampuan membunuh (bakterisid) dibandingkan dengan menghambat (bakteriostatik). Dosis radiasi mempunyai pengaruh terhadap konsentrasi KBM kitosan. Semakin tinggi dosis radiasi maka semakin tinggi daya bakterisid terhadap ketiga bakteri yang diuji.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rejane C.Goy, Sinarat.B. Morais, Odilio B.G.Assis, Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. Coli* and *S. Aureus* growth, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26 (2016)
2. Ming Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing, Hyun Jin Park, Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *International Journal of Food Microbiology* 144 (2010)
3. ejane C. Goy, Douglas de Britto, Odilio B. G. Assis, A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 19, n° 3, p. 241-247, 2009
4. Nan Liu, Xi-Guang Chen, Hyun-Jin Park, Chen-Guang Liu, Cheng-Sheng Liu, Xiang-Hong Meng, Le-Jun Yu, Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli*, *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 60–65
5. Eui-Hong Byun, Jae-Hun Kim, Nak-Yun Sung, Jong-il Choi, Seong-Taek Lim, Kwang-Hoon Kim, Hong-Sun Yook, Myung-Woo Byun, Ju-Woon Lee, Effects of gamma

irradiation on the physical and structural properties of b-glucan, Radiation Physics and Chemistry 77 (2008) 781–786

4. Uji Aktivitas Daun Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia* Lamk.) Iradiasi Sebagai Antidiare Dan Antihiperkolesterol Pada Tikus Wistar

Abstrak

Salah satu tanaman yang wajib kita kenal adalah jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.). Tanaman yang satu ini banyak dijumpai di Indonesia dan daunnya populer dimanfaatkan dalam dunia pengobatan tradisional dan khasiatnya secara empiris sudah nyata. Di Indonesia penggunaan bahan alam juga meningkat pesat, lebih dari 1.500 perusahaan farmasi, jamu dan kosmetik yang menggunakan bahan baku bahan alam memenuhi pasar dalam negeri. Untuk meningkatkan daya saing produk kesehatan bahan alam Indonesia baik untuk keperluan pasar domestik maupun ekspor maka mutu, khasiat, keamanan dan higienis bahan baku dan produk jadi perlu ditingkatkan. Saat ini animo masyarakat industri dalam penggunaan teknik iradiasi gamma untuk pasteurisasi dengan tujuan untuk membasmi cemaran mikroba patogen cukup besar. Untuk mewujudkan tujuan tersebut, maka pada tahun 2016 telah dilakukan penelitian pengaruh dosis pasteurisasi radiasi simplisia daun jati belanda sampai dengan 10 kGy. Simplisia daun jati belanda diekstraksi dengan etnol 95 %, kemudian diuji aktivitasnya sebagai antidiare dan antihiperkolesterol pada tikus wistar. Hasilnya menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi dosis 10 kGy tidak menurunkan khasiatnya sebagai antidiare dan antihiperkolesterol pada tikus wistar. Dokumen hasil penelitian tersebut akan dipakai untuk menyokong BPOM KemenKes RI, agar dicantumkan pada Farmakope Herbal Indonesia, dalam pemakaian teknik pasteurisasi iradiasi simplisia daun jati belanda, agar bahan yang diiradiasi tetap berkhasiat, aman, bermutu, higienis dan memperpanjang masa simpan.

Kata kunci: jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.), iradiasi gamma, antidiare, antihiperkolesterol

BAB I. LATAR BELAKANG

Obat tradisional telah lama dikenal dan digunakan oleh semua lapisan masyarakat untuk tujuan pencegahan, pengobatan maupun perawatan kesehatan. Perkembangan obat tradisional diawali dari ramuan tradisional yang berasal dari nenek moyang sejak berabad-abad lalu. Seiring dengan perkembangan di bidang kesehatan yang sejalan dengan perkembangan ekonomi, budaya, sosial serta ilmu pengetahuan dan teknologi, obat tradisional harus mempunyai mutu sesuai dengan persyaratan yang ditetapkan, aman dan benar khasiatnya sehingga obat tradisional mampu meningkatkan kualitas hidup dan kesehatan. Obat tradisional saat ini telah diterima secara luas di berbagai negara berkembang dan negara maju. Badan kesehatan internasional (WHO) telah merekomendasikan penggunaan obat tradisional termasuk obat herbal dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit terutama untuk penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker. Hal ini menunjukkan dukungan terhadap

pengobatan kembali ke alam atau dikenal dengan “Back to Nature”.

Salah satu yang wajib kita kenal adalah Jati Belanda. Tanaman yang satu ini banyak dijumpai di Indonesia. Bagian daunnya populer dimanfaatkan utamanya dalam dunia pengobatan. Secara empiris khasiatnya sudah nyata sebagai obat pelangsing atau susut perut, untuk mengusir rematik, menurunkan kadar kolesterol, menurunkan kadar lipid di dalam darah (anthiperlipidemia) dan masih banyak lagi lainnya. Khasiat daun Jati Belanda yang beragam tersebut bersumber dari kandungan senyawa yang ada di dalamnya. Penelitian menemukan fakta bahwa di dalam ekstrak daun Jati Belanda ditemukan berbagai senyawa antara lain tannin, resin, musilago, flavanoid, asam fenolat, zat pahit, karotenoid, terpen, sterol, friendelon-3-alfa-asetat, alkaloida, minyak lemak dan masih banyak lagi lainnya. Tannin yang banyak terdapat pada daun jati Belanda mampu mengurai absorbs makanan dengan mengedaplan mukosa senyawa protein di permukaan organ usus. Adapun senyawa musilago berperan sebagai pelicin.

Meningkatnya kebutuhan obat tradisonal di Indonesia menyebabkan industri jamu, farmasi dan kosmetik bahan alam meningkatkan produksi jamu, farmasi dan kosmetik menggunakan bahan baku berbagai tanaman berkhasiat obat. Kebutuhan bahan baku tanaman obat meningkat pesat, berbagai industri baik kecil maupun industri besar memerlukan pasokan bahan baku tanaman obat dalam jumlah besar yang diperoleh dari berbagai petani binaan. Setelah proses pasca panen, bahan baku obat atau simplisia disimpan menunggu untuk proses lebih lanjut. Pada tahapan ini, penyimpanan simplisia dalam jumlah banyak dengan iklim Indonesia subtropis dan kelembaban yang cukup tinggi menimbulkan suatu permasalahan yaitu memicu pertumbuhan bakteri, jamur dan kapang pada bahan baku. Kontaminasi pada bahan baku menyebabkan kerusakan senyawa kimia yang terkandung didalamnya dan penurunan khasiat. Hal ini menyebabkan penurunan kualitas dari produk jadi obat tradisonal. Untuk mempertahankan kualitas sediaan obat tradisonal perlu dilakukan penanganan yang baik mulai dari bahan baku yang dipergunakan karena jika digunakan bahan baku yang berkualitas baik maka akan menghasilkan produk jadi yang berkualitas juga. Permasalahan akibat kontaminasi mikroba, jamur dan kapang dapat diatasi dengan penggunaan teknik pasteurisasi gamma karena radiasi gamma berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh PAIR – BATAN mampu menurunkan angka bakteri, jamur dan kapang pada berbagai simplisia rimpang. Penggunaan teknologi radiasi dalam pengembangan obat tradisonal di Indonesia saat diminati karena tidak meninggalkan residu pada bahan, tidak menyebabkan kenaikan suhu

sehingga baik untuk simplisia yang mengandung banyak minyak atsiri dan bahan yang tidak tahan terhadap pemanasan.

Terkait dengan penggunaan radiasi yang sangat menguntungkan dari segi pembasmian cemaran mikroba maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh dosis pasteurisasi terhadap khasiat dan aktivitas yang dikandung dalam simplisia sehingga permasalahan penyimpanan bahan baku dapat diatasi dan menghasilkan produk jadi obat tradisional yang bermutu berkualitas baik, dan aman. Selanjutnya dokumen hasil penelitian akan dipakai untuk menyokong BPOM KemnenKes RI, agar dicantumkan pada Farmakope Herbal Indonesia tentang aplikasi teknologi pasteurisasi iradiasi bahan baku dan produk obat herbal tradisional.

BAB II : METODOLOGI

1. Metode Penanganan Pasca Panen (Pembuatan Simplisia).

Pengolahan daun jati belanda dilakukan melalui beberapa tahapan, meliputi: penyortiran, dan pencucian. Daun jati belanda dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C, kemudian setelah kering digiling lalu dikemas dalam plastik polietilen tebal 0,1 mm dan diiradiasi dengan menggunakan sinar gamma pada dosis 0 dan 10 kGy. Simplisia daun jati belanda ditentukan persyaratan dan senyawa fitokimianya. Simplisia juga diekstraksi dengan cara dimaserasi dalam etanol 96 %, diperkolasi dan dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kental. Ekstrak tersebut dipakai sebagai sampel untuk diuji aktivitas antidiare, dan antihiperkolesterol pada tikus wistar.

2. Metode Pemeriksaan Persyarat Simplisia Berdasarkan Materia Medika Indonesia.

a. Kadar abu. Sebanyak 2 g serbuk daun jati belanda masing-masing dimasukkan ke dalam krus platina yang telah dipijar dan diratakan. Jika arang tidak bisa dihilangkan, ditambah air panas, lalu disaring dengan kertas saring bebas abu. Sisa abu dan kertas saring dipijarkan dalam krus yang sama. Filtrat dimasukkan ke dalam krus, diuapkan, dipijarkan hingga bobot tetap, lalu ditimbang.

b. Kadar abu yang tidak larut dalam asam. Abu yang diperoleh dari pemeriksaan kadar abu seperti tersebut di atas, dididihkan dengan 25 ml asam klorida encer selama lima menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring dengan kertas saring bebas abu, dicuci dengan air panas, dipijarkan hingga bobot tetap, lalu ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah

dikeringkan di udara.

c. Kadar sari yang larut dalam air. Serbuk daun jati belanda yang telah dikeringkan di udara sebanyak 5 g dimaserasi selama 24 jam dengan 100 ml kloroform dalam labu bertutup sambil berkali-kali dikocok selama enam jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam, lalu disaring. Filtrat 20 ml diuapkan hingga kering dalam cawan ceper, lalu dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam air, lalu dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

d. Kadar sari yang larut dalam etanol. Serbuk yang diperlakukan seperti percobaan di atas, disaring cepat dengan menghindarkan penguapan etanol 95 %. Filtrat 20 ml diuapkan hingga kering dalam cawan ceper, sisanya dipanaskan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Kadar dihitung dalam persen sari yang larut dalam etanol 95 %, terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

e. Kadar air. Sebanyak 5 g serbuk dalam cawan porselen, lalu dipanaskan dalam oven pada suhu 110 °C, selama dua jam. Setelah itu diangkat, didinginkan dalam eksikator lalu ditimbang sampai bobot tetap. Kadar dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara.

3. Penapisan Senyawa Fitokimia Simplisia Daun Jati Belanda. Penapisan senyawa kimia simplisia daun jati belanda dianalisa dengan metode meliputi;

a. Alkanoid. Larutan simplisia daun jati belanda diambil 20 ml lalu dipanaskan di atas penangas air, ditambah 10 ml asam klorida dan larutan ammonium klorida 10 % pH 8 - 9, kemudian diekstraksi dengan kloroform. Larutan kloroform diuapkan, lalu residunya ditambahkan 1,5 ml asam klorida 2 % dan dibagi menjadi tiga tabung; tabung pertama sebagai kontrol, kedua ditambah dua tetes pereaksi Mayer, reaksi positif jika terjadi endapan putih kekuningan, ke tiga ditambahkan dua tetes pereaksi Bertand, reaksi positif jika endapan putih kekuningan. Hasil pemeriksaan alkaloid masing-masing rimpang memberikan reaksi positif, hal ini berarti menunjukkan bahwa masing-masing rimpang mengandung alkaloid.

b. Saponin. Kocok 2 ml larutan simplisia daun jati belanda dalam tabung reaksi selama 15 menit. Jika terbentuk busa yang stabil selama 15 menit, maka di dalam ekstrak tersebut mengandung saponin. Hasil pemeriksaan saponin untuk masing-masing rimpang menunjukkan reaksi negatif, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada senyawa saponin dalam ekstrak.

c. Flavonoid. Sekitar 5 ml larutan simplisia daun jati belanda diuapkan di atas panangas air sampai kering, kemudian residunya dilarutkan dengan metanol 50 % sebanyak 2 ml, panaskan. Tambahkan logam magnesium dan 6 tetes asam klorida pekat. Larutan menjadi merah menunjukkan adanya flavonol dan jingga menunjukkan flavonon. Hasil pemeriksaan flavonoid dari simplisia memberikan reaksi negatif, hal ini berarti simplisia tidak mengandung flavonoid. Sedangkan ekstrak lainnya, memberikan hasil positif, hal ini berarti bahwa dalam ekstrak tersebut mengandung flavonoid.

d. Tanin. Larutan simplisia daun jati belanda diambil sebanyak 1 ml, diencerkan dengan dua tetes air suling dan ditambahkan tiga tetes larutan besi (III) klorida. Bila terjadi warna biru kehitaman menunjukkan tanin galat dan bila menunjukkan warna hijau kehitaman menunjukkan tannin katekol [4]. Hasil pemeriksaan tanin pada masing-masing ekstrak rimpang memberikan reaksi positif. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tanin terdapat dalam masing-masing ekstrak rimpang tersebut.

e. Pemeriksaan steroid/triterpenoid. Sebanyak 5 gram simplisia dimaserasi dalam 20 mL eter selama 2 jam kemudian disaring. Sebanyak 5 mL filtrat diuapkan dalam cawan penguap sampai kering. Ke dalam residu ditambahkan dua tetes asam asetat glasial dan setetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah-ungu menunjukkan triterpenoid, dan jika terbentuk warna hijau-biru menunjukkan steroid

f. Pemeriksaan Glikosida. Tiga gram sampel di sari dengan 30 ml campuran 7 bagian volume etanol 95 % dan 3 bagian volume air dalam alat pendingin alur balik selama 10 menit, dinginkan dan saring. Pada 20 ml filtrate tambahkan 25 timbal(II) asetat 0,4 M, kocok, diamkan selama 5 menit, saring filtrate 3 kali, tiap kali dengan 20 ml campuran 3 bagian volume kloroform dan 2 bagian volume isopropanol. Pada ekstrak yang sudah terkumpul di tambahkan natrium sulfat anhidrat, saring dan uapkan pada suhu tidak lebih dari 50° C sisa yang di peroleh dilarutkan dengan 2 ml metanol.

Cara pengujian : Uapkan 0,1 ml larutan sampel percobaan diatas penangas air, larutkan sisa dalam 5 ml anhidrat asetat. Tambahkan 10 tetes asam sulfat, terjadi warna biru atau hijau, menunjukkan adanya glikosida (reaksi Liebermann-Bourchard).

4. Metode Pengujian Praktinis Daun Jati Belanda pada Tikus Wistar

4.1. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah dua macam ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy dan 10 kGy, air suling, CMC-Na, propiltiourasil (Dexa Medica), simvastatin.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan tikus, timbangan analitik, kandang tikus, sonde oral tikus, botol minum mencit, mortir dan stamper, spektrofotometer (Mikrolab®).

4.2. Hewan Uji

Hewan uji adalah tikus Wistar jantan, usia 2 bulan dari Pusat Penelitian Biosains dan Biogenetika ITB, Bandung.

4.3. Metode uji antidiare simplisia jati belanda tanpa dan yang telah diiradiasi.

A. Pengujian efek anti diare dengan metode induksi oleum ricini

Prosedur pengujian dilakukan sesuai Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka. Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik (1991).⁽²⁾ Prosedur pengujian adalah sebagai berikut:

1. Hewan dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit
 - kelompok kontrol (CMC 0,5%),
 - kelompok pembanding (Loperamid dosis 1,56 mg/kg bb),
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 0 kGy dosis 1,25 g/kg bb,
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 10 kGy dosis 1,25 g/kg bb,
2. Pemberian sediaan uji dilakukan pada awal pengujian (T0).
3. Enam puluh menit (60) menit kemudian diberikan 1 mL oleum ricini sebagai induktor.
4. Pengamatan dilakukan setiap 30 menit selama 3 jam setelah pemberian oleum ricini. Parameter yang diamati adalah : waktu timbulnya diare, konsistensi diare, jumlah/bobot feses dan jangka waktu berlangsungnya diare.
5. Data yang diperoleh diuji statistik menggunakan Uji-t dan ANOVA.

B. Pengujian efek antidiare dengan metode transit intestinal

Prosedur pengujian dilakukan sebagai berikut:

1. Hewan uji (mencit) dipuasakan selama 18 jam sebelum digunakan.
2. Hewan dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus
 - kelompok kontrol (CMC 0,5%),
 - kelompok pembanding (Loperamid dosis 1,56 mg/kg bb),
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 0 kGy dosis 1,25 g/kg bb,
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 10 kGy dosis 1,25 g/kg bb,

3. Pemberian sediaan uji dilakukan pada awal pengujian (T₀).
4. Empat puluh lima (45) menit kemudian diberikan tinta cina 0,1 mL/10 g bb tikus.
5. Pada menit ke-65, hewan uji dikorbankan, kemudian diukur panjang usus yang dilewati marker tinta cina dan panjang usus total. Dilakukan juga perhitungan rasio panjang usus yang dilewati marker terhadap panjang usus total
6. Data yang diperoleh diuji statistik menggunakan Uji-t dan ANOVA.

4.4. Metode Pengujian Aktivitas Anti Hiperkolesterol pada Tikus Wistar

Pengujian efek anti hiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda yang tidak diradiasi dan diradiasi 10 kGy. Pengujian efek antihiperkolesterol dilakukan dengan dua metode, yaitu a) metode preventif dan b) metode kuratif. Metode preventif dilakukan dengan cara pemberian sediaan uji bersama dengan induksi, sedangkan metode kuratif dilakukan dengan cara induksi kolesterol selama 3 minggu dan dilanjutkan dengan pemberian sediaan.

4.4.1. Pengujian Efek Antihiperkolesterol Metode Preventif⁽²⁾

Prosedur pengujian dilakukan sebagai berikut:

1. Hewan dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus
 - kelompok kontrol (CMC 0,5%),
 - kelompok pembanding (Simvastatin dosis 0,9 mg/kg bb),
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 0 kGy dosis 50 mg/kg bb,
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 10 kGy dosis 50 mg/kg bb,
 - Ditentukan kadar kolesterol awal (T₀).
2. Hewan uji diinduksi secara eksogen dan endogen. Induksi secara eksogen dilakukan dengan pemberian makanan tinggi kolesterol. Induksi secara endogen dilakukan dengan pemberian minum mengandung propiltiourasil 0,01% ad libitum. Komposisi makanan tinggi kolesterol untuk 1 kg pakan : Kolesterol murni 1% (10 gram), Lemak kambing 20% (200 gram), Kuning telur itik 5% (50 gram), Minyak goreng 10% (100 gram), Hati sapi 10% (100 gram), Pakan standar 55% (550 gram).
3. Pemberian sediaan uji dilakukan setiap hari selama 21 hari pengujian
4. Penentuan kadar kolesterol dilakukan pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21. Pengambilan sampel darah dilakukan melalui vena ekor. Pengujian kadar kolesterol dilakukan menggunakan reaksi enzimatik dan diukur menggunakan Spektrofotometer (Mikrolab) pada panjang gelombang λ 546 nm.

5. Data yang diperoleh diuji statistik menggunakan Uji-t.

4.4.2. Pengujian Efek Antihiperkolesterol Metode Kuratif⁽²⁾

Prosedur pengujian dilakukan sebagai berikut:

1. Hewan uji diinduksi secara eksogen dan endogen. Induksi secara eksogen dilakukan dengan pemberian makanan tinggi kolesterol. Induksi secara endogen dilakukan dengan pemberian minum mengandung propiltiourasil 0,01% ad libitum. Komposisi makanan tinggi kolesterol untuk 1 kg pakan : Kolesterol murni 1% (10 gram), Lemak kambing 20% (200 gram), Kuning telur itik 5% (50 gram), Minyak goreng 10% (100 gram), Hati sapi 10% (100 gram), Pakan standar 55% (550 gram)
2. Hewan dibagi menjadi 4 kelompok masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus
 - kelompok kontrol (CMC 0,5%),
 - kelompok pembanding (Simvastatin dosis 0,9 mg/kg bb),
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 0 kgray dosis 50 mg/kg bb,
 - kelompok uji ekstrak jati belanda 10 kgray dosis 50 mg/kg bb,
3. Ditentukan kadar kolesterol awal (T0).
4. Pemberian sediaan uji dilakukan setiap hari selama 21 hari pengujian
5. Penentuan kadar kolesterol dilakukan pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21. Pengambilan sampel darah dilakukan melalui vena ekor. Pengujian kadar kolesterol dilakukan menggunakan reaksi enzimatik dan diukur menggunakan Spektrofotometer (Mikrolab) pada panjang gelombang λ 546 nm.
6. Data yang diperoleh diuji statistik menggunakan Uji-t.

BAB III : HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil dan Pembahasan Penentuan Persyaratan dan Fitokimia Simplisia Daun Jati Belanda.

Hasil pemeriksaan kandungan kimia simplisia daun jati belanda berdasarkan Materia Medika Indonesia (MMI), dapat dilihat pada Tabel 1. Pada Tabel tersebut dapat dilihat bahwa parameter simplisia daun jati belanda yaitu kadar air, abu, abu tak larut asam, sari larut air, sari larut alkohol dan andrograpolid pada umumnya sesuai persyaratan berdasarkan Materia Medika Indonesia.

Tabel 1. Hasil pengujian sampel daun jati belanda tanpa dan iradiasi dosis 10 kGy

No	Pengujian (%)	Dosis iradiasi (kGy)	
		0	10

1	Kadar air	2,61	2,06
2	Kadar abu	14,15	13,76
3	Kadar abu larut dalam asam	1,01	0,91
4	Kadar sari larut dalam air	20,32	22,18
5	Kadar sari larut dalam alkohol	8,58	9,30

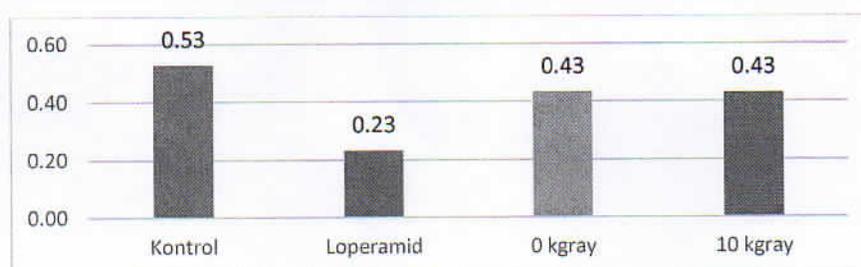
Demikian juga hasil penentuan fitokimia simplisia yang tanpa dan yang diiradiasi tidak terjadi penurunan kandungan alkaloid, saponin, tannin, fenolik, flavonoid, triterfenoid, steroid dan glikosida seperti dapat dilihat pada Tabel 2. Dengan demikian rimpang tersebut dapat dipakai sebagai salah satu bahan baku dalam produksi kosmetik, jamu dan obat tradisional, karena kandungan fitokimia yang memenuhi persyaratan MMI

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia sampel daun jati belanda tanpa dan iradiasi dosis 10 kGy

No	Pengujian	Dosis iradiasi (kGy)	
		0	10
1	Alkaloid	+	+
2	Saponin	+	+
3	Tanin	+	+
4	Flavonoid	+	+
5	Triterpenoid	+	+
6	Steroid	+	+
7	Glikosida	+	+

2. Hasil dan Pembahasan uji Antidiare Jati Belanda pada Tikus Wistar

2.1. Hasil pengujian efek antidiare dengan metode transit intestinal



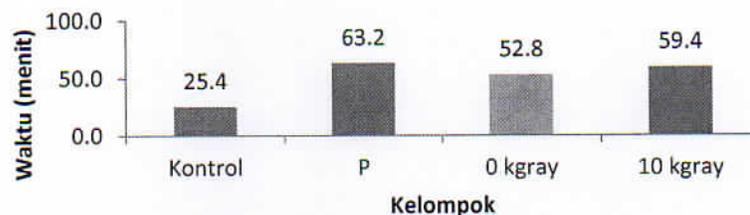
Gambar 1. Rasio panjang usus yang dilewati marker terhadap panjang usus total pada uji antidiare metode transit intestinal

Hasil pengujian menunjukkan bahwa panjang usus yang dilewati pada kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy dan 10 kGy lebih pendek dibandingkan kelompok kontrol. Ratio panjang usus yang dilewati marker terhadap panjang usus total kelompok kontrol adalah 0,53. Ratio panjang usus yang dilewati marker terhadap panjang usus total kelompok pembanding (loperamid) adalah 0,23. Ratio panjang usus yang dilewati marker

terhadap panjang usus total kelompok ekstrak jati belanda 0 kGy adalah 0,43. Ratio panjang usus yang dilewati marker terhadap panjang usus total kelompok ekstrak jati belanda 10 kGy adalah 0,43.

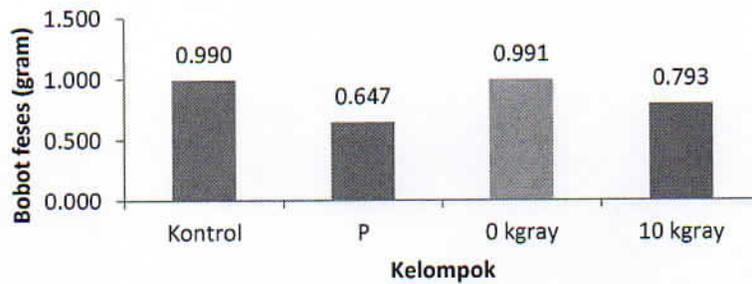
Hasil analisa statistik menggunakan uji T menunjukkan bahwa ratio panjang usus kelompok pembanding loperamid lebih kecil dan berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,001$). Ratio panjang usus kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy menunjukkan berbeda jika dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,082$). Ratio panjang usus kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 10 kGy menunjukkan berbeda jika dibandingkan kelompok kontrol ($p=0,071$). Diare dapat terjadi karena gerakan peristaltik usus yang berlebihan. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol jati belanda 0 kGy dan 10 kGy mampu menurunkan gerakan peristaltik usus, tetapi efeknya lebih rendah dibandingkan pembanding loperamid. Loperamid merupakan obat antidiare yang mempunyai mekanisme sebagai agonis opioid sehingga mampu menurunkan gerakan peristaltik usus.

2.2. Hasil pengujian efek antidiare dengan metode induksi oleum ricini



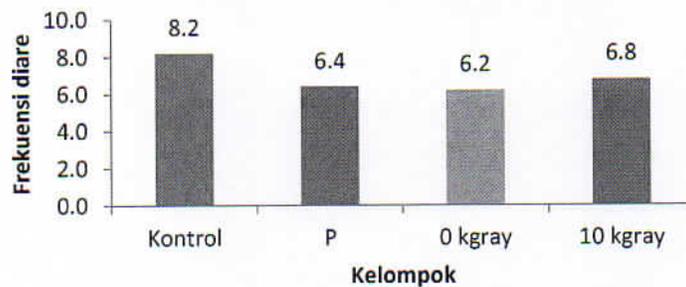
Gambar 2. Onset diare pengujian antidiare metode induksi oleum ricini Hasil pengujian menunjukkan bahwa onset (waktu awal terjadinya) diare pada kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy dan 10 kGy lebih lama dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil analisa statistik menggunakan uji T menunjukkan bahwa onset diare kelompok pembanding loperamid, kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy dan 10 kGy, meskipun lebih lambat, tetapi tidak berbeda jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).



Gambar 3. Bobot feses pengujian antidiare metode induksi oleum ricini Hasil pengujian menunjukkan bahwa bobot feses pada kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 10 kGy lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol.

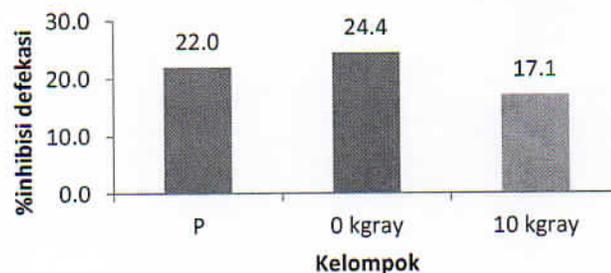
Hasil analisa statistik menggunakan uji T menunjukkan bahwa bobot feses kelompok pembanding loperamid, kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 10 kGy, meskipun lebih sedikit, tetapi tidak berbeda jika dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,05$).



Gambar 4. Frekuensi defekasi pengujian antidiare metode induksi oleum ricini

Hasil pengujian menunjukkan bahwa frekuensi terjadinya diare pada kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy dan 10 kGy lebih sedikit dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil analisa statistik menggunakan uji T menunjukkan bahwa frekuensi defekasi kelompok pembanding loperamid, kelompok yang diberi ekstrak jati belanda 0 kGy dan 10 kGy, meskipun lebih sedikit, tetapi tidak berbeda jika dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,05$).



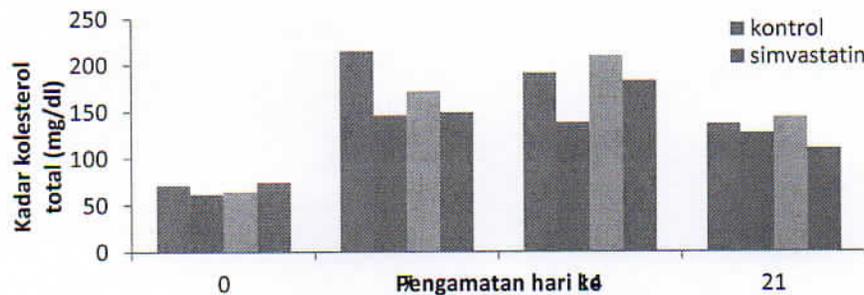
Gambar 5. Persen inhibisi diare metode induksi oleum ricini Persen inhibisi diare dihitung berdasarkan frekuensi terjadinya diare pada kelompok uji

dibandingkan kelompok kontrol. Hasil perhitungan persen inhibisi terjadinya diare menunjukkan bahwa ekstrak etanol jati belanda 0 kGy mampu menghambat diare sebesar 24%, sedangkan ekstrak etanol jati belanda mampu menghambat diare sebesar 17,1%.

3. Hasil dan Pembahasan uij Antihiperkolesterol daun jati belanda pada tikus wistar

3.1. Pengujian Efek Antihiperkolesterol Metode Preventif⁽²⁾.

Parameter pengujian yang diamati pada pengujian efek antihiperkolesterol metode preventif adalah kadar kolesterol total, perhitungan kadar relatif kolesterol total, perhitungan persen hambatan kenaikan kolesterol total dan bobot badan hewan uji.



Gambar 6. Kadar kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode preventif selama 21 hari

Hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma hewan uji yang diberi pembanding simvastatin 0,9 mg/kg bb menunjukkan terjadinya penghambatan peningkatan kadar kolesterol total pada hari ke-7 jika dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,05$).

Hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 0 kGy mampu menekan peningkatan kadar kolesterol total pada hewan uji, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,05$).

Sedangkan hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 10 kgray mampu menekan peningkatan kadar kolesterol total pada hewan uji dan pada hari ke-7 dan ke-21 berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p < 0,05$).

Berdasarkan data kadar kolesterol total, dilakukan perhitungan persentase hambatan kenaikan kadar kolesterol total kelompok uji terhadap kelompok kontrol. Cara perhitungan dilakukan sebagai berikut:

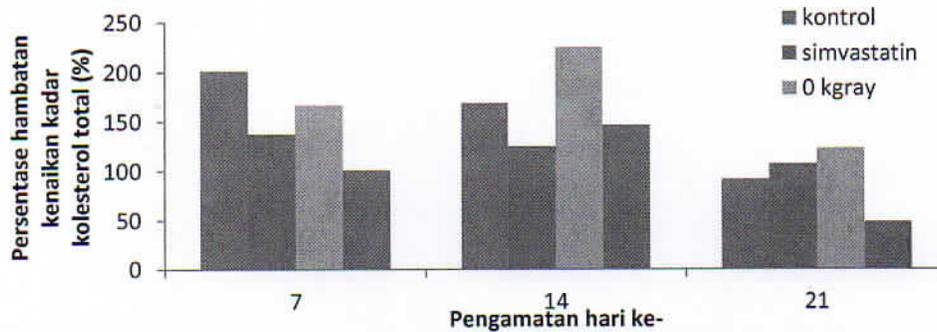
$$PK_n = \frac{Kn - K0}{K0} \times 100\%$$

PK_n = Hambatan kenaikan kolesterol total pada hari ke-n (%)

Kn = Kadar kolesterol total pada hari ke-n (mg/dl)

K0 = Kadar kolesterol total pada hari ke-0 (mg/dl)

Hasil perhitungan persentase hambatan kenaikan kadar kolesterol total menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy mampu menghambat kenaikan pada hari ke-7 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kgray mampu menghambat kenaikan kadar kolesterol total pada hari ke-7, 14, dan 21.



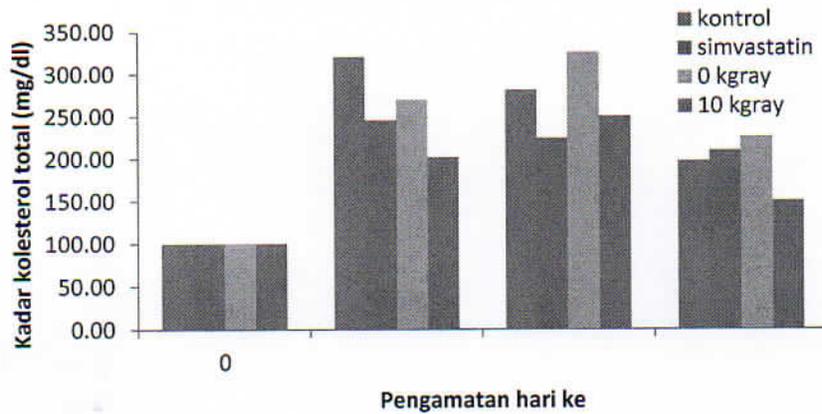
Gambar 7. Diagram batang persentase hambatan kenaikan kadar kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda **metode preventif** selama 21 hari

Hasil perhitungan persentase hambatan total kelompok kontrol adalah 462,09%, pembanding simvastatin adalah sebesar 370,52%, kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy adalah 515,21%, sedangkan kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kGy adalah 296,20%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kgray mempunyai efek antihiper-kolesterol yang lebih baik jika dibanding ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy.

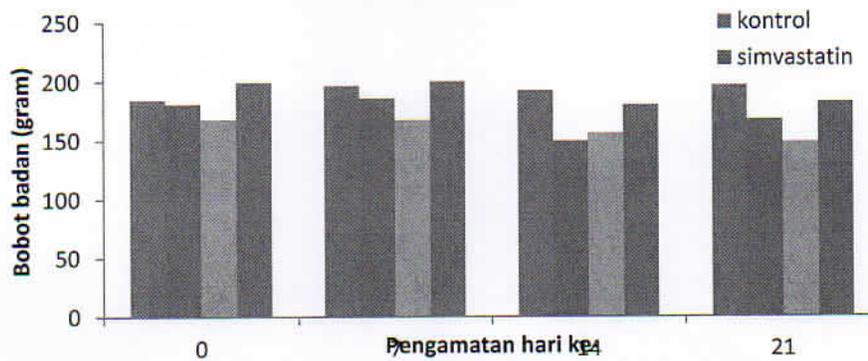
Perhitungan kadar relatif kolesterol total dilakukan dengan nilai 100 sebagai nilai awal kadar kolesterol total. Cara menghitung kadar kadar relatif kolesterol total adalah sebagai berikut:

$$KRn = \frac{Kn}{k0} \times 100\%$$

KRn = Kadar relatif kolesterol total pada hari ke-n (%)
 Kn = kadar kolesterol total pada hari ke-n (mg/dl)
 K0 = kadar kolesterol total pada hari ke-0 (mg/dl)



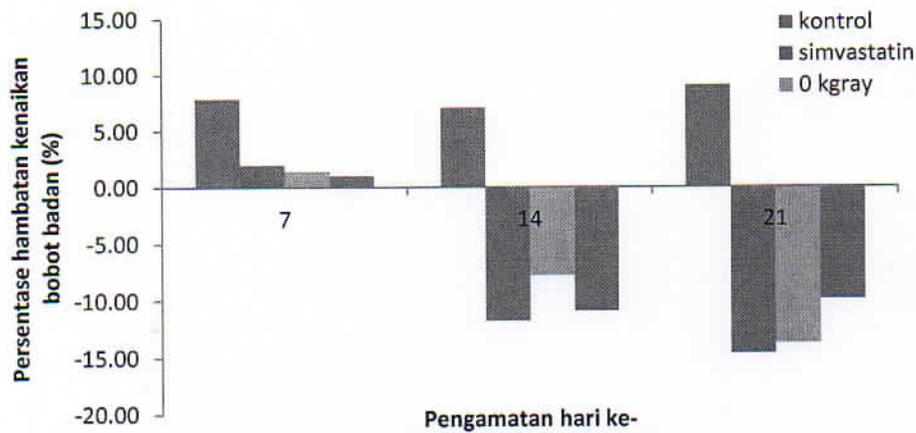
Gambar 8. Kadar relatif kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode preventif selama 21 hari
 Hasil penimbangan bobot badan hewan uji yang diberi pembanding simvastatin 0,9 mg/kg bb menunjukkan simvastatin 0,9 mg/kg bb mampu menekan peningkatan bobot badan, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).
 Hasil penimbangan bobot badan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 0 kGy mampu menekan peningkatan bobot badan, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).



Gambar 9. Bobot badan hewan uji pada pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode preventif selama 21 hari
 Hasil penimbangan bobot badan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 10 kGy mampu menekan peningkatan bobot badan, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).
 Berdasarkan data bobot badan hewan uji, dilakukan perhitungan persentase hambatan kenaikan bobot badan kelompok uji terhadap kelompok kontrol. Cara perhitungan dilakukan sebagai berikut:

$$PBBn = \frac{Bn - B0}{B0} \times 100\%$$

$PBBn$ = Hambatan kenaikan bobot badan pada hari ke-n (%)
 Bn = Bobot badan pada hari ke-n (g)
 $B0$ = Bobot badan pada hari ke-0 (g)



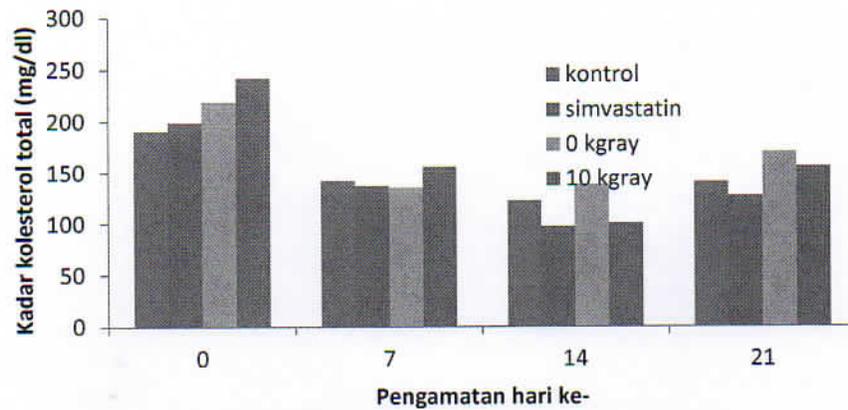
Gambar 10. Persentase hambatan kenaikan bobot badan pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode preventif selama 21 hari

Hasil perhitungan persentase hambatan kenaikan bobot badan menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy dan 10 kGy mampu menghambat kenaikan pada hari ke-7, 14, dan 21 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil perhitungan persentase hambatan total bobot badan menunjukkan kelompok kontrol mengalami kenaikan bobot badan sebesar 24,05,09%, sedangkan pembanding simvastatin mengalami penurunan bobot badan sebesar 24,45%, kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kgray mengalami penurunan bobot badan sebesar 20,16%, sedangkan kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kgray mengalami penurunan bobot badan sebesar 19,80%.

3.2. Hasil Pengujian Efek Antihiperkolesterol Metode Kuratif

Parameter pengujian yang diamati pada pengujian efek antihiperkolesterol metode kuratif adalah kadar kolesterol total, perhitungan kadar relatif kolesterol total, perhitungan persen hambatan kenaikan kolesterol total dan bobot badan hewan uji.



Gambar 11. Kadar kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode kuratif selama 21 hari

Hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma hewan uji yang diberi pembandingan simvastatin 0,9 mg/kg bb menunjukkan terjadinya penurunan kadar kolesterol pada hewan uji, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).

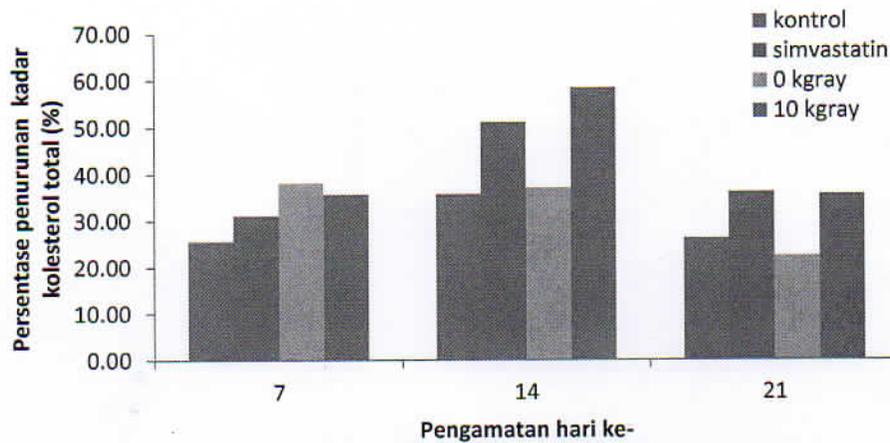
Hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 0 kGy mampu menurunkan kadar kolesterol total pada hewan uji, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).

Hasil pengukuran kadar kolesterol total dalam plasma menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 10 kGy juga mampu menurunkan kadar kolesterol total pada hewan uji, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p>0,05$).

Pada pengujian efek antihiperkolesterol metode kuratif dilakukan juga perhitungan persentase penurunan kadar terhadap kelompok kontrol. Cara perhitungan dilakukan sebagai berikut:

$$PK_n = \frac{K_0 - K_n}{K_0} \times 100\%$$

PK_n = Hambatan kenaikan kolesterol total pada hari ke-n (%)
 K_n = kadar kolesterol total pada hari ke-n (mg/dl)
 K₀ = kadar kolesterol total pada hari ke-0 (mg/dl)

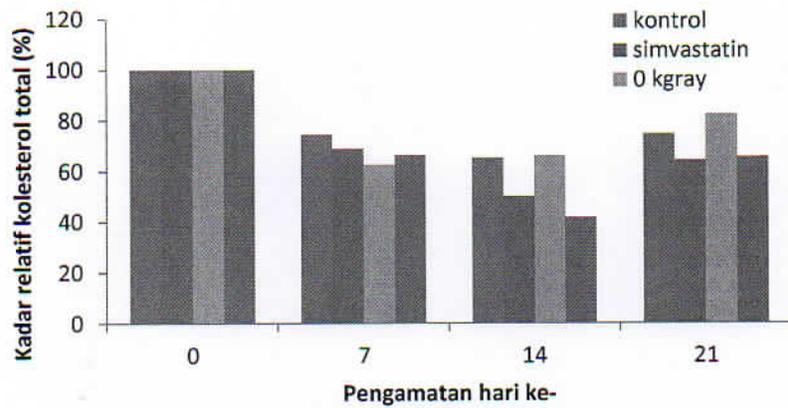


Gambar 12. Persentase penurunan kadar kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode kuratif selama 21 hari

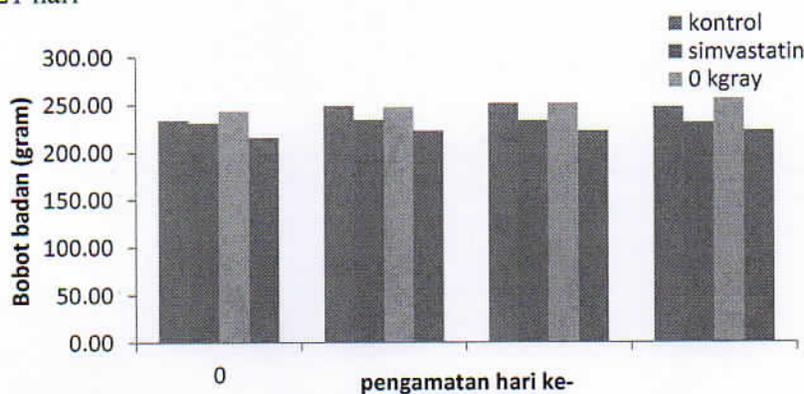
Hasil perhitungan persentase penurunan kadar kolesterol total menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy pada hari ke-7 mampu menurunkan kadar kolesterol lebih besar jika dibandingkan dengan kelompok kontrol, dan ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kGy pada hari ke-7, 14, dan 21 mampu menurunkan kadar kolesterol total lebih besar dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil perhitungan persentase penurunan total kelompok kontrol adalah 87,50%, pembandingan simvastatin adalah sebesar 118,35%, kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy adalah 97,47%, sedangkan kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kgray adalah 129,64%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kGy mempunyai efek antihiperkolesterol yang lebih baik jika dibanding ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy.

Pada pengujian efek antihiperkolesterol metode kuratif dilakukan juga perhitungan kadar relatif kolesterol total seperti pada metode preventif.



Gambar 13. Kadar relatif kolesterol total pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode kuratif selama 21 hari



Gambar 14. Bobot badan hewan uji pada pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode kuratif selama 21 hari

Hasil penimbangan bobot badan hewan uji yang diberi pembanding simvastatin 0,9 mg/kg bb menunjukkan simvastatin 0,9 mg/kg bb mampu menekan peningkatan bobot badan, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,05$).

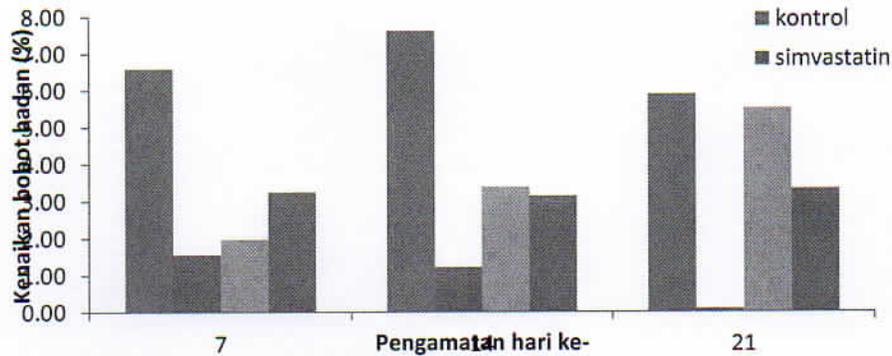
Hasil penimbangan bobot badan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 0 kGy tidak mampu menekan peningkatan bobot badan jika dibandingkan kelompok kontrol.

Hasil penimbangan bobot badan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol jati belanda yang diradiasi 10 kGy mampu menekan peningkatan bobot badan, meskipun tidak berbeda bermakna jika dibandingkan kelompok kontrol ($p > 0,05$).

Berdasarkan data bobot badan hewan uji, dilakukan perhitungan persentase kenaikan bobot badan kelompok uji terhadap kelompok kontrol. Cara perhitungan dilakukan sebagai berikut:

$$PBBn = \frac{Bn - B0}{B0} \times 100\%$$

PBBn = Kenaikan bobot badan pada hari ke-n (%)
 Bn = bobot badan pada hari ke-n (g)
 B0 = bobot badan pada hari ke-0 (g)



Gambar 15. Persentase kenaikan bobot badan pengujian antihiperkolesterol ekstrak etanol jati belanda metode kuratif selama 21 hari

Hasil perhitungan persentase hambatan kenaikan bobot badan menunjukkan bahwa ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy dan 10 kGy mampu menghambat kenaikan pada hari ke-7, 14, dan 21 jika dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Hasil perhitungan persentase kenaikan bobot badan menunjukkan kelompok kontrol mengalami kenaikan bobot badan sebesar 20,10%, sedangkan pembanding simvastatin mengalami kenaikan bobot badan sebesar 2,86%, kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 0 kGy mengalami kenaikan bobot badan sebesar 10,86%, sedangkan kelompok ekstrak jati belanda yang diradiasi 10 kGy mengalami kenaikan bobot badan sebesar 9,73%.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji menunjukkan bahwa perlakuan iradiasi dosis 10 kGy tidak mempengaruhi persyaratan dan senyawa fitokimia simplisia. Hasil pengujian aktivitas antidiare dan antihiperkolesterol metode preventif dan kuratif, pada tikus wistar menunjukkan bahwa ekstrak etanol jati belanda 0 kGy dan 10 kGy mempunyai aktivitas antidiare dan antihiperkolesterol dibandingkan kelompok kontrol. Jadi perlakuan iradiasi 10 kGy tidak mempengaruhi aktivitas antidiare dan antihiperkolesterol.

V. DAFTAR PUSTAKA

1. Jamaluddin, muflich (2008) *Efek antidiare ekstrak etanol daun jati belanda (Guazuma ulmifolia lamk) pada mencit jantan galur Swiss Webster*. Skripsi thesis, universitas

- muhammadiyah surakarta., disitasi dari <http://eprints.ums.ac.id/1393/> tanggal 10 juni 2016.
2. Kelompok Kerja Ilmiah Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica. (1991). Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam. Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka. Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik.
 3. Sutjiatmo, Afifah B., Wahyuningsih, S., Yusriani, R. (2007) Uji efek antidiare ekstrak etanol daun sambang darah (*Exocaria bicolor* Hask.) pada mencit putih galur Swiss Webster, Kongres Ilmiah/Seminar Nasional ISFI ke-52., Jakarta.
 4. Puspa Sari Dewi Sholiha, Afifah B. Sutjiatmo, Kusbudiantoro (2010) Antidiarrhea activity of water extract of sambang getih leaves (*Hemigraphis alternata* (burm. F.) T. Anders in Swiss Webster Mice, Proceeding The International Seminar and Expo on Jamu 2010 (ISEJ 2010) "Herbal Medicines: Indigenous, Molecular aspects, and clinical application", bandung, Nov., 5th 2010.
 5. Sukandar, EY., Elfahmi, Nurdewi (2008) Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) terhadap kadar lipid darah pada tikus jantan. **JKM**. Vol.8 No.2 Februari 2009: 102-112.
 6. Kelompok Kerja Ilmiah Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phyto Medica. (1991). Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam. Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka. Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik.

6. Aktivitas Sitotoksitas Dan Profil Kromatografi Daun Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia Namk*) Yang Telah Diiradiasi Gamma

ABSTRAK

Daun daun jati belanda telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa daun, buah, biji, dan kulit kayu bagian dalam merupakan bagian tanaman yang bisa dipergunakan sebagai obat. Secara umum, zat utama yang terkandung dari seluruh bagian tanaman adalah tanin dan musilago. Tujuan penelitian ini untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada ekstrak daun jati belanda kering yang telah diiradiasi, apakah iradiasi gamma menurunkan aktivitas sitotoksiknya, mengubah profil kromatografinya dan bagaimana keamanan terhadap hewan uji, sehingga dapat diketahui dosis iradiasi gamma yang optimum untuk diaplikasikan pada simplisia daun jati belanda. Dosis iradiasi gamma yang digunakan adalah 5; 7,5 ; 10; dan 15 kGy. Pelarut yang digunakan pada maserasi bertahap, yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Pengujian khasiat anti kanker daun jati belanda telah diperoleh, nilai IC₅₀ terhadap sel leukemia L1210 sebesar 21,01; 6,23; dan 8,42 µg/mL untuk ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Fraksinasi dengan kolom kromatografi dilakukan terhadap ekstrak paling aktif yaitu ekstrak etil asetat. Hasil fraksinasi digabung berdasarkan pola KLT yang sama sehingga diperoleh 8 fraksi, dan fraksi 4 merupakan fraksi paling aktif dengan IC₅₀ 2,67 µg/mL. Dosis iradiasi yang paling maksimum dimana aktivitas sitotoksik tetap baik adalah dosis iradiasi 7,5 kGy. Pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun jati belanda terhadap mencit menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda yang tidak diiradiasi tidak toksik. Ekstrak etanol dari daun jati belanda yang diiradiasi 7,5 kGy sedang dalam proses pengamatan.

Kata kunci: Daun jati belanda, *Guazuma ulmifolia Namk*, iradiasi gamma, aktivitas sitotoksik, profil kromatografi

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki sekitar 30.000 spesies tanaman yang merupakan 80% dari jenis tanaman di dunia dan 90 % dari jenis tanaman di Asia (1). Salah satu dari ribuan tanaman obat tradisional Indonesia adalah daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia Namk*). Daun *Guazuma ulmifolia Namk* berkhasiat sebagai pelangsing, mengatasi sembelit, mengobati diare, mengobati penyakit kaki gajah, menurunkan kolesterol. Hasil analisis kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, dan polifenol. Tanin yang banyak terkandung di bagian daun, mampu mengurangi penyerapan makanan

dengan cara mengendapkan mukosa protein yang ada dalam permukaan usus. Sementara itu, musilago yang berbentuk lendir bersifat sebagai pelicin. Dengan adanya musilago, absorpsi usus terhadap makanan dapat dikurangi. Hal ini yang menjadi alasan banyaknya daun jati belanda yang dimanfaatkan sebagai obat susut perut dan pelangsing. Dalam perkembangannya, daun jati belanda juga banyak dimanfaatkan untuk mengatasi penyakit kolesterol dan rematik gout. Hasil uji sitotoksik menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda menunjukkan efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan IC_{50} 69,00 $\mu\text{g/mL}$ (2).

Kandungan lainnya yaitu resin, flavonoid, karotenoid, asam fenolat, zat pahit, karbohidrat, kafein, terpen, juga senyawa – senyawa lain seperti sterol, beta-sitosterol, friedelin-3-alfa-asetat, friedelin -3-beta-ol,alkoloida serta karbohidrat dan minyak lemak. Ekstrak etanol daun jati belanda tidak mengandung tirosid dan mengandung flavonoid dengan kadar 0,976%. Hasil uji sitotoksitas ekstrak etanol daun jati belanda terhadap sel MCF-7, HeLa, T47D dan Vero secara berturut-turut adalah 36,50; 58,02; 53,36; 1806,22 $\mu\text{g/mL}$ (3). Ekstrak etanol daun jati belanda memiliki potensi sebagai antikanker.

Pada **tahun 2014 dan 2015** telah dipelajari pengaruh radiasi gamma terhadap umbi keladi tikus dan daun sirsak, diperoleh dosis iradiasi gamma yang optimum yang tidak menurunkan aktivitas sitotoksiknya, masing-masing adalah dosis 7,5 kGy. Pada penelitian **tahun 2016** akan dipelajari pengaruh iradiasi gamma terhadap khasiat anti kanker daun jati belanda dan akan dilakukan pengujian aktivitas sitotoksitas terhadap sel kanker leukemia L1210. Tujuan penelitian ini untuk mempelajari pengaruh iradiasi gamma pada ekstrak daun jati belanda kering yang telah diiradiasi, apakah iradiasi gamma menurunkan aktivitas sitotoksiknya, mengubah profil kromatografinya dan bagaimana keamanan terhadap hewan uji, sehingga dapat diketahui dosis iradiasi gamma yang optimum untuk diaplikasikan pada simplisia daun jati belanda. Dosis iradiasi gamma yang digunakan adalah 5; 7,5 ; 10; dan 15 kGy. Pengujian khasiat anti kanker daun jati belanda akan dilakukan di Laboratorium Patologi, FKH, IPB dan pengujian toksitas akut ekstrak daun jati belanda terhadap mencit akan dilakukan di Laboratorium Terpadu UGM, Yogyakarta.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun jati belanda yang diperoleh dari Balitro, Bogor. Pelarut untuk maserasi bertahap berupa *n*-heksan, etil asetat, dan akuades. Selain itu digunakan sel kanker leukemia L1210, dimetil sulfoksida (DMSO), etanol 70%, medium Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin, Streptomycin, plat silica untuk kromatografi lapis tipis, penampak bercak serum sulfat, silika sebagai fasa diam pada fraksinasi, pakan berupa pelet standar dan air minum (sumber air hasil *reverse osmosis*) *ad libitum*. Pada pengujian toksisitas akut ekstrak etanol daun jati belanda digunakan hewan uji mencit jantan dan betina galur DDY, umur 6 minggu dengan bobot badan seragam (25-30 g). Hewan uji diperoleh dari Unit Layanan Penelitian Pra-klinik dan Pengembangan Hewan Coba, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT)-UGM.

Persiapan sampel dan Iradiasi Gamma

Daun jati belanda dibersihkan dan dikeringkan pada suhu ruang 24°C. Setelah kering, daun dijadikan serbuk kasar dan ditimbang 10 bungkus @ 100 gram per bungkus plastik poli etilen. Sampel diiradiasi gamma dengan sumber ⁶⁰Co pada dosis 5; 7,5; 10 dan 15 kGy, perlakuan simplo dan duplo. Bahan untuk uji toksisitas akut disiapkan untuk kontrol dan yang diiradiasi gamma dosis 7,5 kGy, @ 500 gram.

Maserasi dan Fraksinasi

Daun jati belanda kontrol (tanpa iradiasi) dan sampel yang diiradiasi, lalu dimaserasi dengan *n*-heksan, selanjutnya secara bertahap dimaserasi dengan etil asetat dan etanol. Pada uji toksisitas akut daun jati belanda dimaserasi dengan etanol untuk daun jati belanda kontrol dan yang diiradiasi 7,5 kGy. Berdasarkan pengujian aktivitas sitotoksik diperoleh ekstrak yang paling aktif berpotensi sebagai antikanker, ekstrak ini dilanjutkan difraksinasi menggunakan silika sebagai absorbent dan fase gerak beberapa perbandingan eluen *n*-heksan, etil asetat, dan metanol. Fraksi-fraksi dianalisis kualitatif secara KLT menggunakan penampak bercak serum sulfat, sehingga fraksi-fraksi yang mempunyai pola spot yang sama digabung. Selanjutnya diuji aktivitas sitotoksik dari fraksi-fraksi yang diperoleh dari hasil penggabungan.

Kultur Sel

Alat-alat yang digunakan untuk pengujian harus dalam keadaan bersih dan steril. Alat-alat berbahan gelas, wadah dicuci bersih dan dikeringkan. Kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121⁰C tekanan 15 lbs selama 15 menit. Sedangkan microbiological safety cabinet air flow kelas II disterilkan dengan cara disemprot dengan etanol 70% dan disinari lampu UV. Sel leukemia L1210 yang digunakan dikeluarkan dari freezer (-20⁰C), dihangatkan dalam penangas air pada suhu 37⁰C selama 2-3 menit. Setelah mencair, sel dipindahkan ke dalam flask yang telah berisi 10 ml media, diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37⁰C/5% CO₂, kemudian medium pertumbuhan diganti sekali dalam dua hari dan bila jumlah sel di dalam flask mencapai 70-85%, lakukan subkultur sel. Ambil 10 µl suspensi sel, letakkan pada masing-masing kotak penghitungan sel hemasitometer. Lakukan penghitungan di bawah mikroskop. Tentukan rata-rata jumlah sel aktif yang ada untuk dapat membuat suspensi 2000 sel dalam setiap sumur pada plat 96 sumuran.

Pembuatan Larutan dan Uji Sitotoksitas

Ketiga ekstrak diuji aktivitas sitotoksik terhadap sel leukemia L1210 dan dihitung IC₅₀ berdasarkan metode yang mengacu pada penelitian sebelumnya (6) dengan 5 macam variasi konsentrasi, yaitu 5, 10, 20, 40, dan 80 µg/mL dengan ulangan dua kali. Untuk fraksi dilakukan dengan 5 variasi konsentrasi juga, yaitu 1, 2, 4, 8, 16 µg/mL. Masing-masing konsentrasi ditempatkan dalam *multiwell plate tissue's culture* 24 sumuran yang berisi 1 ml suspensi sel leukemia L1210 (mengandung 2 x 10⁵ sel) dalam medium RPMI-1610, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37⁰C selama 48 jam. Sebagai kontrol digunakan 1 ml suspensi sel dan ditambah 10µl methanol yang merupakan pelarut sampel. Perhitungan sel yang masih hidup dilakukan menggunakan mikroskop dalam *haemocytometer Neubauer improved* (label 0,100 mm, luas 0,0025 mm²). Sel hidup dan sel mati dibedakan dengan cara menambahkan biru tripan, sel-sel yang hidup tidak terwarnai dan tampak transparan, sedangkan sel yang mati berwarna biru. Aktivitas sitotoksik yang merupakan kemampuan sampel uji dalam menghambat pertumbuhan sel dinyatakan dalam persentase (%) inhibisi berdasarkan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{[\text{rerata sel dalam kontrol}] - [\text{rerata sel dalam sampel uji}]}{\text{[rerata sel dalam kontrol]}} \times 100\%$$

[rerata sel dalam kontrol]

Hubungan antara log konsentrasi larutan uji dengan viabilitas sel dapat ditampilkan dalam bentuk grafik. Data persentase inhibisi selanjutnya diplotkan ke tabel probit untuk memperoleh nilai probit, kemudian dibuat grafik antara log konsentrasi (x) dan probit (y). Dari grafik tersebut dapat ditentukan nilai IC_{50} dengan persamaan regresi linier, kemudian dimasukkan $y = 50\%$ pada persamaan regresi linier ($Y = aX + b$) dan cari x nya. Antilog dari konsentrasi tersebut dihitung, sehingga diperoleh IC_{50} (konsentrasi yang dapat menghambat 50% pertumbuhan sel) larutan uji (4). Selanjutnya, data hubungan antara konsentrasi sediaan uji dengan absorban dianalisis secara statistik menggunakan analisis varian (ANOVA) satu arah.

Uji Toksisitas Akut (5)

Menurut Peraturan Kepala Badan POM No.7 tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis secara *in vivo*, uji toksisitas akut oral adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul dalam waktu singkat setelah pemberian sediaan uji yang diberikan secara oral dalam dosis tunggal, atau dosis berulang yang diberikan dalam waktu 24 jam (6). Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan dan betina galur DDY, umur 6 minggu dengan bobot badan seragam (25-30g). Hewan uji diperoleh dari Unit Layanan Penelitian Pra-klinik dan Pengembangan Hewan Coba, Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT)-UGM, Yogyakarta dengan kriteria hewan uji meliputi:

- a. Hewan sehat dan dewasa
- b. Hewan betina harus yang belum pernah beranak dan tidak sedang bunting.
- c. Pada permulaan uji, setiap hewan harus berumur 6 minggu dengan variasi berat badan tidak boleh melebihi 20% dari rata-rata berat badan.

Hewan diseleksi secara acak, diberi tanda untuk identifikasi tiap-tiap hewan, dan dilakukan aklimatisasi sekurang-kurangnya 5 hari sebelum diberi perlakuan. Hewan uji dikarantina dan diaklimatisasikan menggunakan kandang fasilitas kandang Unit Layanan Pra-klinik dan Pengembangan Hewan Coba, LPPT-UGM. Hewan uji dipelihara pada kamar hewan yang secara otomatis suhu ruangan dipertahankan pada suhu pada $(25 \pm 2)^{\circ}C$, humiditas relatif $75 \pm 10 \%$, ventilasi udara 11-13 kali perjam, dan iluminasi 12 jam per hari (jam 07.00–19.00). Hewan uji diberi pakan berupa pelet

standar dan air minum (sumber air hasil *reverse osmosis*) *ad libitum*, dalam botol minum kaca. Semua protokol penelitian yang digunakan telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik untuk Penelitian Praklinik, LPPT UGM.

Sekelompok hewan uji dengan jenis kelamin yang sama diberikan dosis bertingkat menggunakan metode *fixed doses* antara lain: 5, 50, 300 dan 2000 mg/kg BB (dosis dapat ditambah hingga 5000 mg/kg BB). Dosis awal dipilih berdasarkan uji pendahuluan sebagai dosis yang dapat menimbulkan gejala toksisitas ringan tetapi tidak menimbulkan efek toksik yang berat atau kematian. Prosedur ini dilanjutkan hingga mencapai dosis yang menimbulkan efek toksik atau ditemukan tidak lebih dari 1 kematian, atau tidak tampak efek toksik hingga dosis yang tertinggi atau adanya kematian pada dosis yang lebih rendah.

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol berasal dari daun jati belanda tanpa radiasi dan yang diiradiasi 7,5 kGy. Pada pengujian ini sediaan uji dibuat dalam bentuk suspensi sediaan uji dalam PGA, Berhubung stabilitas larutan sediaan uji belum diketahui dengan pasti, penyiapan sediaan uji untuk penelitian ini akan selalu dibuat baru (*fresh*) maksimal untuk 1 minggu sekali dan disimpan dalam suhu 2-8°C.

Pemberian sediaan uji dan volume pemberian

Hewan uji dipuaskan selama 14-18 jam, namun air minum boleh diberikan, air minum boleh diberikan). Setelah dipuaskan, hewan ditimbang dan diberikan sediaan uji. Sediaan uji diberikan dalam dosis tunggal dengan menggunakan sonde. Pada keadaan yang tidak memungkinkan untuk diberikan dosis dengan satu kali pemberian, sediaan uji dapat diberikan beberapa kali dalam jangka waktu pemberian zat tidak boleh melampaui 24 jam. Setelah diberikan perlakuan, pakan boleh diberikan kembali setelah 3-4 jam. Bila sediaan uji diberikan beberapa kali, maka pakan boleh diberikan setelah perlakuan tergantung pada lama periode pemberian sediaan uji tersebut.

Pada dasarnya cara pemberian sediaan uji harus disesuaikan dengan cara pemberian atau pemaparan yang diterapkan pada manusia, biasanya diberikan secara oral dengan volume pemberian 1 mL sediaan uji per 100 g berat badan hewan. Jika pada uji pendahuluan tidak ada kematian pada tingkat dosis 2000 mg/kg BB dan pada uji utama hanya 1 ekor atau tidak ada hewan yang mati pada tingkat dosis 2000 mg/kg BB, maka tidak perlu diberikan dosis melampaui 2000 mg/kg BB.

Pengamatan

Hewan uji diobservasi secara individual sekurang-kurangnya pada 30 menit pertama setelah pemberian sediaan uji, dan secara periodik setiap 4 jam selama 24 jam pertama dan sehari sekali setelah itu selama 14 hari. Pengamatan tambahan perlu dilakukan jika hewan menunjukkan gejala toksisitas secara terus-menerus. Pengamatan yang dilakukan termasuk pada: kulit, bulu, mata, membran mukosa dan juga sistem pernafasan, sistem syaraf otonom, sistem syaraf pusat, aktivitas somatomotor serta tingkah laku. Selain itu, perlu juga pengamatan pada kondisi: gemetar, kejang, salivasi, diare, lemas, tidur dan koma. Hal-hal yang harus diamati dalam periode observasi adalah:

- a. Tingkah laku hewan seperti jalan mundur, jalan menggunakan perut
- b. Berat Badan

Berat badan masing-masing hewan harus dimonitor pada saat sebelum diberikan sediaan uji dan sekurang-kurangnya seminggu setelahnya. Perubahan berat badan harus dianalisis sebagai perubahan bobot badan per hari (PKBP) atau *Average Daily Gain* (ADG). Pada akhir penelitian, hewan yang masih bertahan hidup ditimbang dan kemudian dikorbankan.

Pemeriksaan Patologi

Seluruh hewan (termasuk yang mati selama penelitian maupun yang dikorbankan) harus dinekropsi. Semua perubahan gross patologi dicatat untuk setiap hewan uji. Pemeriksaan mikroskopik dari organ yang menunjukkan adanya perubahan secara gross patologi pada hewan yang bertahan hidup selama 24 jam atau lebih setelah pemberian dosis awal dapat dilakukan untuk mendapatkan informasi yang berguna. Pemeriksaan organ-organ vital meliputi antara lain: hati, paru, jantung, ginjal, limpa, lambung, usus, dan otak. Organ yang diambil ditimbang dengan cara dikeringkan terlebih dahulu dengan kertas penyerap, kemudian segera ditimbang untuk mendapatkan bobot organ absolut. Bobot organ relatif dapat diperoleh dengan rumus berikut:

$$\text{Bobot organ relatif} = \text{Berat Badan} / \text{Berat Organ}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi dan Fraksinasi

Hasil maserasi bertahap daun jati belanda menggunakan 3 macam pelarut, yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol ditampilkan pada Tabel 1. Masing-masing berat ekstrak yang diperoleh ekstrak *n*-heksan 3,0 gr, ekstrak etil asetat 1 - 1,5 gr dan ekstrak etanol 7 - 8 gr dari 100 gram serbuk daun jati belanda kontrol. Pada Tabel 2 ditunjukkan berat fraksi yang diperoleh dari sampel daun jati belanda yang tidak diiradiasi.

Tabel 1. Bobot ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol dari daun jati belanda

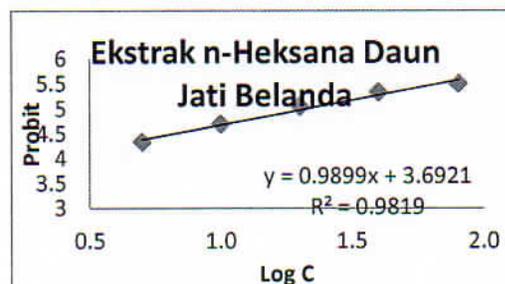
No.	Ekstrak	Dosis iradiasi gamma				
		0 kGy	5 kGy	7,5 kGy	10 kGy	15 kGy
1	<i>n</i> -Heksan					
2	Etil asetat					
3	Etanol					

Tabel 2. Bobot fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom daun jati belanda yang tidak diiradiasi

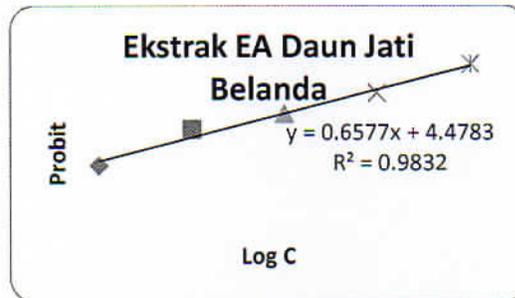
Fraksi	Bobot (gram)
1	0.13
2	0.06
3	0.11
4	0.13
5	0.12
6	0.12
7	0.09
8	0.18

Uji toksisitas ekstrak dan fraksi terhadap sel leukemia L1210

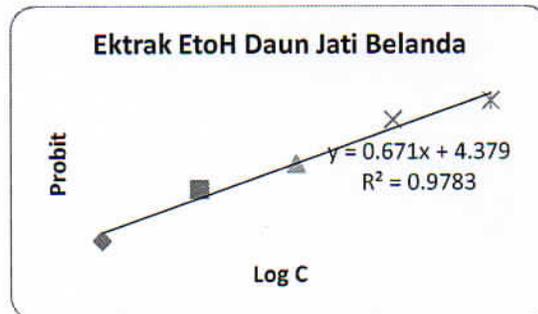
Pengujian khasiat anti kanker daun jati belanda telah diperoleh, nilai IC_{50} terhadap sel leukemia L1210 dihitung berdasarkan grafik linier pada Gambar 1a, 1b, dan 1c. Nilai IC_{50} 21,01; 6,23; dan 8,42 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol.



Gambar 1a. Grafik nilai probit vs log konsentrasi ekstrak *n*-heksan daun jati belanda

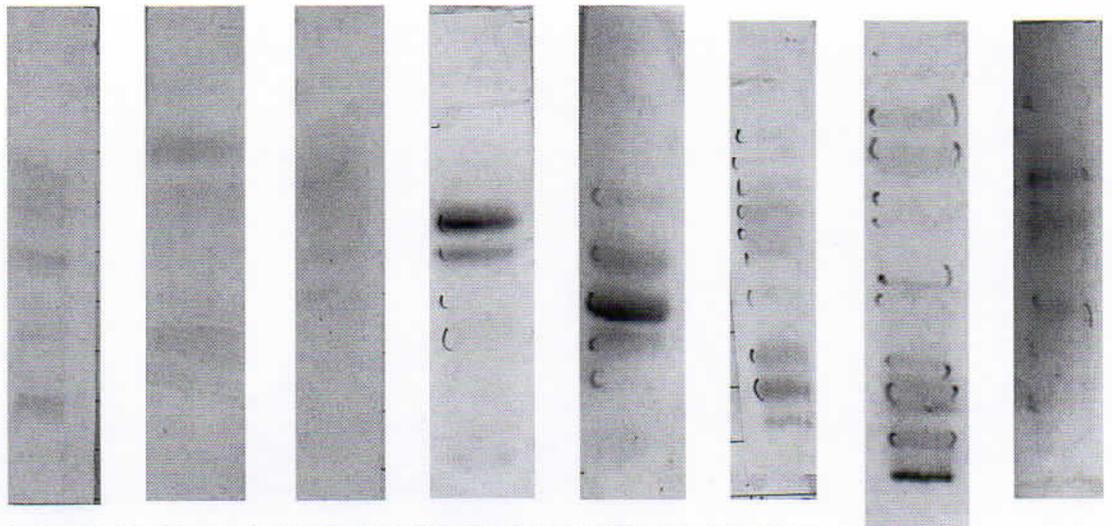


Gambar 1b. Grafik nilai probit vs log konsentrasi ekstrak etil asetat daun jati belanda



Gambar 1c. Grafik nilai probit vs log konsentrasi ekstrak *n*-heksan daun jati belanda

Ekstrak paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210 adalah fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat difraksinasi dalam kolom kromatografi. Hasil kromatografi lapis tipis hasil penggabungan 68 fraksi menjadi 8 fraksi berdasarkan pola spot yang sama (Gambar 2).



Gambar 2. Profil kromatografi lapis tipis fraksi-fraksi hasil penggabungan

Fraksi 1 2 3 4 5 6 7 8
 Ke delapan fraksi diuji aktivitas sitotoksiknya terhadap sel leukemia L1210, fraksi yang paling aktif adalah fraksi 4, mempunyai $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$. Suatu ekstrak tanaman obat dikategorikan aktif berpotensi sebagai antikanker bila IC_{50} nya $< 20 \mu\text{g/mL}$ (5).

Uji Toksisitas Akut terhadap mencit

Pengujian ini dilakukan dengan starting dosis 300 mg/kg BB yang merupakan uji pendahuluan. Dosis ini di berikan pada 1 mencit jantan dan betina, dari hasil pengamatan tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas pada 24 jam pemberian bahan uji ekstrak etanol dari daun jati belanda yang tidak diiradiasi. Berat badan mencit disajikan pada Tabel 3. Pemeriksaan organ-organ vital meliputi antara lain: hati, paru, jantung, ginjal, limpa, lambung, usus, dan otak sedang dilakukan. Uji toksisitas akut ekstrak dari daun jati belanda yang diiradiasi 7,5 kGy sedang dalam pengamatan.

Tabel 3. Data berat badan

Kelompok	no mencit	berat badan
		1
Kontrol Jantan	1	33.2
	2	33.1
	3	34
	4	31.5
	5	31.4
	Rata-rata SD	32.64 1.14
Kontrol Betina	1	22.7
	2	24.6
	3	24.4
	4	28.8
	5	30.4
	Rata-rata	26.18

	SD	3.26
Kelompok 300 mg/kg BB jantan	1	33.9
Kelompok 300 mg/kg BB Betina	1	26.1

KESIMPULAN SEMENTARA

Pengujian khasiat anti kanker daun jati belanda telah diperoleh, nilai IC_{50} terhadap sel leukemia L1210 sebesar 21,01; 6,23; dan 8,42 $\mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Ekstrak etil asetat merupakan ekstrak paling aktif menghambat pertumbuhan sel leukemia L1210. Hasil fraksinasi dengan kolom kromatografi diperoleh 8 fraksi, dan fraksi ke-4 merupakan fraksi paling aktif dengan nilai $IC_{50} < 20$ $\mu\text{g/mL}$. Fraksi ke-4 berpotensi sebagai anti kanker. Analisis data IC_{50} dari fraksi 4 untuk daun jati blanda tanpa iradiasi dan yang diiradiasi sedang diolah. Dosis iradiasi maksimum dimana aktivitas sitotoksik tetap dipertahankan mendekati kontrol adalah dosis iradiasi 7,5 kGy. Pada uji pendahuluan toksisitas akut kepada 1 mencit jantan dan 1 betina diberikan ekstrak etanol 300 mg/kg berat badan. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jati belanda yang tidak diiradiasi tersebut, tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas pada 24 jam setelah pemberian bahan uji ekstrak etanol dari daun jati belanda yang tidak diiradiasi. Pemeriksaan patologi organ-organ hewan uji dan uji toksisitas akut ekstrak etanol dari daun jati belanda yang diiradiasi 7,5 kGy sedang dalam proses pengamatan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih disampaikan kepada para staf Kelompok Irradiator (IRKA), Balai Iradiasi, Elektromekanik dan Instrumentasi, PAIR-BATAN yang telah meradiasi bahan penelitian dan kepada tim pelaksana pengujian toksisitas akut ekstrak daun jati belanda pada Unit Layanan Pra-klinik dan Pengembangan Hewan Coba, LPPT-UGM Yogyakarta.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dewoto, H.R., Pengembangan Obat Tradisional Indonesia Menjadi Fitofarmaka, Majalah Kedokteran Indonesia, Volum: 57, Nomor: 7, Juli 2007, 205-211.
2. WARDANY, RTRI, Uji Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Senggangi (*Melastomae Affinis* D. Don) Dan Daun Jati Belanda (*Guazuma Ulmifolia* Lamk.)

Terhadap Sel Kanker Payudara T47D, Fakultas Farmasi, Universitas Muhamadiyah Surakarta, 2011.

3. DA'I, M., MELANNISA, R., TRISHARYANTI D.K., I., Mekanisme Molekuler Sitotoksitas Ekstrak Daun Jati Belanda Terhadap Sel Kanker, Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2013.
4. WINARNO, H. and WINARNO, EK, Benzophenone Glucoside Isolated From The Ethyl Acetate Extract Of The Bark Of *Mahkota Dewa* [*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl.] And Its Inhibitory Activity On Leukemia L1210 Cell Line, Indo. J. Chem., 2009, 9 (1), 142 – 145.
5. *OECD Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure*, Test Guideline 420, Adopted 17st December 2001, France.
6. Peraturan Kepala Badan POM No.7 tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara *in vivo*.
7. Peraturan Kepala Badan POM No.7 tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara *in vivo*.
8. Swanson, S.M. and Pezzuto, J.M., 1990, Bioscreening Tehnique for Cytotoxic Potential and Ability to Inhibit Macromolecule Biosynthesis, *in: Drug Bioscreening*, Thompson, E. B. Ed., John Wiley & Sons, New York, 273-297.