

LAPORAN TEKNIS 2013

BATAN-TIR-OT- 01 04-2013-520402

**PEMBUATAN PAKET TEKNOLOGI PERUNUT ISOTOP
STABIL ^{13}C UNTUK DETEKSI MALNUTRISI**

**Maria Lina, Hendig Winarno, Ermin Katrin, Susanto,
Adji K., Rika Heryani, dan Almaida**



**PUSAT APLIKASI ISOTOP DAN RADIASI
BADAN TENAGA NUKLIR NASIONAL
2014**

LAPORAN TEKNIS 2013

BATAN-TIR-OT- 01 04-2013-520402

PEMBUATAN PAKET TEKNOLOGI PERUNUT ISOTOP STABIL 13C UNTUK DETEKSI MALNUTRISI

Maria Lina, Hendig Winarno, Ermin Katrin, Susanto,
Adji K., Rika Heryani, dan Almaida

Mengetahui/Menyetujui	
Kepala Bidang Proses Radiasi	Kepala PAIR
 <u>Dr. Darmawan, Apt</u> NIP. 19610108 198803 1 002	 <u>Dr. Hendig Winarno, M.Sc</u> NIP. 19600524 198801 1 001

ABSTRAK

Pada pengembangan teknik perunut isotop stabil untuk mendeteksi status gizi, penelitian dimulai dengan sampling darah dari 120 orang anak-anak sebagai relawan. Lokasi penelitian dilakukan di 4 lokasi, yaitu Pusat Kesehatan Masyarakat (PKM) di Bogor, Bandung, Tangerang dan Serang. Telah dilakukan pendataan usia anak (U), penimbangan berat badan (BB) dan pengukuran tinggi badan anak telah dilakukan untuk mendapatkan data *Z-score* berdasarkan berat badan/umur anak (BB/U). Serum darah yang diperoleh dianalisis kadar retinol dan beta karotennya dengan alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Hasil perhitungan *Z-score* (BB/U) dari 120 relawan yang berasal dari 4 Pusat Kesehatan Masyarakat di Bogor, Bandung, Tangerang dan Serang menunjukkan bahwa terdapat 58 anak dengan status gizi baik dan 62 anak dengan status gizi kurang dan buruk. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat 81 anak yang kadar retinol dalam serumnya $\geq 20 \mu\text{g/dL}$ dan 39 anak $\leq 20 \mu\text{g/dL}$. Berdasarkan data hasil analisis kadar retinol dan beta karoten dalam serum darah dengan KCKT belum dapat diketahui kadar cadangan vitamin A dalam hati anak. Uji stabilitas dan standarisasi formula ekstrak benalu teh berbasis senyawa *octadeca triynoic acid* sebagai anti kanker telah dilakukan. Formula ekstrak kering benalu teh dibuat tablet pada berbagai perbandingan formula (11 jenis formula). Formula 1 merupakan formula terbaik, namun tingkat kekerasan masih kurang baik. Pada uji stabilitas formula terbaik dibuat dalam bentuk kapsul. Uji stabilitas ekstrak dalam kapsul dilakukan pada suhu 40°C dan diamati tiap 2 minggu selama 3 bulan. Sebagai finger print digunakan zat aktif kuersetin yang terdapat dalam fraksi 5, dianalisis dengan KCKT. Pada uji coba, diseminasi dan konfirmasi teknik molekuler untuk deteksi tipe HPV High Risk digunakan sampel sebanyak 23 *swab* serviks/ mulut rahim pasien normal dari RSKD Ibu dan Anak, Siti Fatimah, Makasar. Hasil proses PCR dupleks dengan menggunakan primer untuk HPV dan β globin menunjukkan bahwa 9 sampel positif PCR dari RSKD Siti Fatimah (3 sampel yaitu HPV tipe 16), semua sampel positif PCR dari RS Wahidin Sudirohisodo, Makasar. Sampel dari RSCM Jakarta positif, sedangkan dari 32 sampel RS Hasan Sadikin, Bandung, hanya 28 sampel yang positif. Dari 32 sampel biopsi dari rumah sakit Hasan Sadikin, Bandung, 31 sampel teinfeksi HPV *high risk* dan 1 sampel hasilnya negatif. Hasil genotyping 4 sampel biopsi dari RSCM, Jakarta menunjukkan adanya infeksi HPV 16 pada 2 sampel, HPV 59 pada 1 sampel dan HPV 68 juga pada 1 sampel.

Kata Kunci : status gizi, isotop stabil, retinol, beta karoten, KCKT, uji stabilitas, benalu teh, HPV High Risk kanker serviks.

PENDAHULUAN

Pada tahun 2012 Indonesia berada di peringkat kelima negara dengan kekurangan gizi sedunia. Jumlah balita yang kekurangan gizi di Indonesia saat ini sekitar 900 ribu jiwa, yaitu 4,5 persen dari balita Indonesia yang berjumlah 23 juta jiwa. Daerah yang kekurangan gizi tersebar di seluruh Indonesia, tidak hanya daerah bagian timur Indonesia. Sepuluh propinsi di Indonesia dengan penderita gizi buruk terbanyak dengan urutan pertama sampai ke sepuluh,

yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Sumatera Utara, Banten, NTT, Riau, Sumatera Selatan, Lampung, dan Sulawesi Selatan. Data Kementerian Kesehatan menyatakan, dengan jumlah 5.043 anak penderita gizi buruk pada 2012, Provinsi Banten menempati peringkat ketiga se-Indonesia sebagai daerah dengan jumlah penderita gizi buruk terbanyak. Kekurangan gizi disebabkan gangguan hormon tiroid akibat kekurangan yodium, anemia akibat kekurangan zat besi, gangguan pada mata akibat kekurangan vitamin A, kurang energi dan protein. Kekurangan vitamin A (KVA) merupakan masalah gizi kedua setelah anemia defisiensi besi yang sering terjadi di negara berkembang. Saat ini terdapat lebih dari 200 juta balita di dunia mengalami KVA dan KVA adalah penyebab utama kebutaan pada anak (1). Herman dkk. dalam penelitiannya melaporkan bahwa 14,6% Balita di Indonesia mengalami kekurangan vitamin A yang ditandai dengan kadar serum retinol $< 20 \mu\text{g/dL}$ (2).

Vitamin A sangat penting untuk pertumbuhan, fungsi reproduksi, fungsi immunitas dan penglihatan. KVA berkaitan dengan peningkatan risiko kematian pada Balita, mengingat fungsi vitamin A pada sistem immunitas dan integritas jaringan epitel. Selain itu, suplementasi vitamin A terbukti dapat menurunkan risiko kematian anak maupun ibu (1).

Penilaian status vitamin A yang akurat sangat diperlukan untuk memberikan informasi pada pengambilan keputusan program intervensi. Kadar vitamin A di hati merupakan indikator terbaik status vitamin A seseorang karena vitamin A terutama disimpan di jaringan ini, namun pemeriksaannya sulit dilakukan. Teknik biokimia yaitu dengan mengukur kadar retinol serum atau dengan *relative dose response* (RDR) test merupakan teknik pengukuran status vitamin A secara tidak langsung. Kadar retinol serum sebagai indikator status vitamin A mempunyai kelemahan karena kadarnya dipengaruhi beberapa faktor seperti adanya infeksi dan defisiensi zat besi. Teknik lain yang dapat digunakan adalah dengan menggunakan *stable isotope dilution technique*. Dengan teknik ini dapat diukur perubahan kadar vitamin A di jaringan hati penyimpan vitamin A (3).

Salah satu langkah awal upaya perbaikan gizi salah satunya dilakukan berdasarkan data hasil pengukuran status gizi anak dengan teknik perunut isotop stabil. Isotop stabil tidak memancarkan radiasi sehingga dapat digunakan untuk mempelajari nutrisi, salah satunya yaitu teknik penggunaan isotop pro vitamin A (retinol dan β -karoten). Saat ini Pusat Aplikasi Teknologi Isotop dan Radiasi - Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) sedang mengembangkan ilmu pengetahuan dan teknologi (iptek) nuklir yang mendukung penelitian di bidang kesehatan khususnya penggunaan isotop stabil. BATAN mengharapkan dapat berkontribusi pada penyelesaian masalah bangsa Indonesia yaitu perbaikan gizi anak yaitu dengan mempromosikan teknik nuklir menggunakan isotop stabil untuk mengetahui status gizi pada bayi dan anak-anak secara dini dan akurat.

Dalam mengembangkan penggunaan teknik perunut isotop diperlukan laboratorium biokimia yang relatif canggih, selain petugas laboratorium yang memiliki kemampuan untuk melakukan analisis kuantitatif menggunakan metode *high performance liquid chromatography* (HPLC). Untuk melakukan analisis isotop stabil yang dilabel dengan analog vitamin A, maka petugas laboratorium harus mampu untuk melakukan analisis kuantitatif dari serum retinol ataupun beta-karoten dengan metode HPLC (3).

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti akan mengembangkan teknik perunut isotop stabil dalam penilaian status vitamin A, terutama pada Balita. Penelitian penentuan status vitamin A menggunakan isotop stabil pernah dilakukan di Indonesia namun masih tergantung dari teknologi negara lain. Selain itu, sampai saat ini masih diperlukan pengembangan metode analisis kuantitatif untuk pengukuran kadar retinol dan beta-karoten dengan metode HPLC sebagai langkah awal pengembangan penggunaan isotop stabil untuk penentuan status vitamin A.

Berdasarkan hasil koordinasi antara Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Barat dan Banten dengan tim peneliti BATAN bekerjasama dengan peneliti dari Pusat Teknologi Terapan

Kesehatan dan Epidemiologi Klinik (PTTKEK-Kemenkes) Bogor, maka disepakati penelitian dilakukan di 4 lokasi sampling, yaitu daerah yang masih rawan penderita kekurangan gizi. Sampling darah dilakukan di PKM Sindang Barang (Bogor), Babakan Sari (Bandung), Pasir Nangka (Tangerang) dan Cikande (Serang). Penelitian ini akan dilakukan pada anak balita usia 12 – 59 bulan dengan status gizi normal dan gizi buruk (menurut BB/U) sebagai langkah awal pengembangan penggunaan isotop stabil untuk penentuan status vitamin A.

Dalam penelitian ini ekstrak etanol benalu teh yang mempunyai aktivitas sebagai antikanker diformulasi dalam bentuk sediaan tablet/kapsul dan ditambah bahan pengisi kemudian dilakukan evaluasi kestabilan fisik dan kimia. Tujuan penelitian ini adalah untuk merancang formula obat herbal berbasis benalu teh dan uji stabilitas sediaan formula tersebut untuk mengetahui masa simpan sediaan tersebut (4). Untuk obat herbal, uji di bawah kondisi dipercepat atau intermediet mungkin bisa diabaikan, karena hampir semua produk herbal gagal pada pengujian stabilitas pada suhu 30°C, 65% RH dan suhu 40°C, 75% RH (5,6).

Pada kegiatan penelitian ini juga telah dilakukan uji coba teknik PCR dupleks - RLB dengan menggunakan 14 *probe* pendeteksi HPV *high risk* pada beberapa laboratorium seperti di Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanudin, Makasar, Fakultas Kedokteran, Universitas Andalas, Padang. Fakultas Kedokteran, Universitas Pajajaran, Bandung. Uji coba teknik tersebut menggunakan sampel klinis dari rumah sakit setempat maupun dari tempat lain seperti sampel dari RSCM, Jakarta.

BAHAN METODE

a. Pembuatan Paket Teknologi Perunut Isotop Stabil beta Karoten untuk Deteksi Malnutrisi

Bahan dan alat.

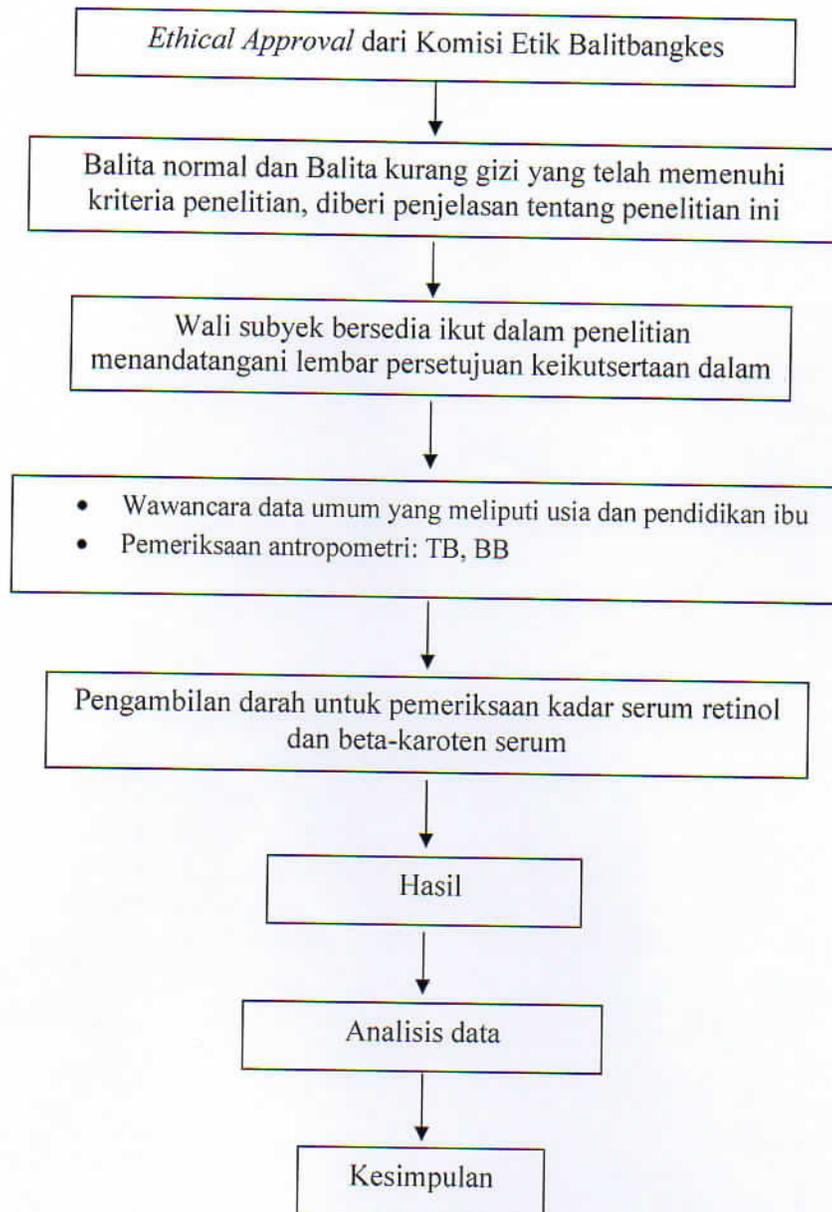
Bahan. Sampling darah dari 120 anak balita sebagai subyek dari 4 lokasi penelitian yaitu PKM Sindang Barang (Bogor), Babakan Sari (Bandung), Pasir Nangka (Tangerang)

dan Cikande (Serang). Bahan kimia di Laboratorium disiapkan pelarut *n*-heksan, etanol, methanol, standar retinol dan β -karoten.

Alat. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu timbangan berat badan (*elektrodigital 'SECA' alpha Hamburg, Germany*, dengan ketelitian 0,1 kg), alat ukur tinggi badan (*Microtoise Stature Meter 2M* dengan ketelitian 0,1 cm), peralatan sampling darah (kapas alkohol 70%, spuit lengkap dengan jarum steril (*syringe* ukuran 5 ml dan *wing needle* 23 ½ G), karet pembendung atau *tourniquet*, tabung *vacutainer*, tabung darah serum), sentrifuge, termos es wadah sampel, freezer -80°C, vortex, dan alat KCKT.

Metode

Langkah-langkah Penelitian. Pada Skema 1 dijelaskan bahwa sebelum dilakukan penelitian, diajukan terlebih dahulu Persetujuan Kode Etik penelitian dari Komisi Etik Balitbangkes. Setelah diperoleh Surat ijin dari Komisi Etik, maka dilakukan sosialisasi penelitian kepada orang tua relawan anak-anak. Bila orang tua setuju mengikuti penelitian, maka mereka menandatangani surat persetujuan di lembar persetujuan. Selanjutnya dilakukan wawancara untuk skrining mendapatkan subyek sesuai persyaratan penelitian ini. Subyek yang sesuai dan telah mendapat persetujuan orang tua, selanjutnya dilakukan penimbangan berat badan dan pengukuran tinggi badan. Pada hari yang ditetapkan subyek diambil darahnya, darah disentrifuge sehingga diperoleh serum. Serum darah disimpan dalam termos bersuhu suhu dingin dan dibawa ke Laboratorium untuk dianalisis kadar retinol dan beta karotennya dengan KCKT.



Skema 1. Flowchart langkah-langkah penelitian

Pertimbangan Etik Penelitian. Pada penelitian ini akan menggunakan subjek manusia, dimana akan dilakukan wawancara kepada Ibu/Wali Balita dan pengambilan sampel darah pada Balita untuk pemeriksaan kadar retinol dan beta-karoten serum. Oleh karenanya perlu dimintakan ijin etik penelitian. Pertimbangan etik penelitian akan diajukan kepada Komisi Etik Penelitian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi. Anak-anak yang diperbolehkan turut serta dalam penelitian ini, yaitu anak-anak yang memenuhi syarat tidak menderita TBC, tidak mempunyai kelainan/ cacat bawaan dan tidak menderita infeksi akut.

Cara Pengumpulan Data Sampel dipilih secara *non-probability sampling* yaitu dengan purposive sampling, diperoleh subyek sebanyak 120 anak balita usia dari 12 sampai 59 bulan. Para ibu anak balita dikumpulkan dan diwawancara untuk pengisian data anak, data status gizi diperoleh dari hasil pengukuran antropometri. Pengukuran antropometri yang dilakukan meliputi berat badan (BB) dan tinggi badan (TB). Hasil pengukuran BB dan TB dan umur digunakan untuk menentukan status gizi berdasarkan nilai Z-skor. Pengukuran berat badan anak dilakukan dengan menggunakan timbangan anak. Dan pengukuran tinggi badan dengan *Microtoise*.

Cara Penarikan Sampel (sampling). Sampling dilakukan pada pagi hari dengan mengambil sampel darah sebanyak 5 ml pada vena kubiti. Sampel darah ditampung dalam *vacutainer* dan dikirim ke laboratorium. Pemeriksaan kadar retinol dan beta karoten serum dilakukan di Laboratorium Terpadu Pusat Teknologi Terapan Kesehatan dan Epidemiologi Klinik di Bogor.

Prosedur pemisahan plasma. Darah disentrifuge selama dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Bagian darah yg berwarna kuning jernih dipipet untuk mengambil serumnya, vial diberi label sesuai dengan nama responden. Serum disimpan dalam freezer - 80°C.

Prosedur preparasi serum. Serum ditambah standar retinil asetat, dikocok, ditambah etanol, lalu divorteks. Ekstraksi dengan 300 μ L heksan, sentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm, lapisan heksan diambil dan dipindahkan ke test tube yang baru (tabung pengumpul) dan diekstraksi lagi dengan 300 μ L heksan, ambil lapisan heksan dan masukkan ke tabung

pengumpul. Hasil tampungan dikeringkan dengan gas nitrogen. Residu dilarutkan dengan metanol/diklorometan, sampel siap diinjeksikan ke alat KCKT.

Prosedur analisis retinol secara kromatografi. Kondisi HPLC menggunakan kolom RP C18, eluen metanol/H₂O, kecepatan alir 1 mL/menit pada panjang gelombang 325 dan 450 nm masing-masing untuk retinol dan β -karoten.

Sampel darah di sentrifugasi sampai di dapatkan bagian serumnya. Pipet 100 μ l plasma serum lalu tambahkan SDS, campuran dikocok, lalu tambahkan 200 μ l larutan etanol absolut. Campuran dikocok lagi dengan vortex, ke dalam campuran ditambahkan heptan sebanyak 1 ml, lalu vortex lagi. Sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm. Supernatan diambil dan ditaruh ke dalam tabung kecil lalu keringkan dengan nitrogen cair. Setelah kering tambahkan fase gerak KCKT (metanol : asetonitril : diklorometan). Campuran dikocok dengan vortex, lalu diinjeksikan ke alat KCKT sebanyak 50 μ l

b. Uji Stabilitas dan Standarisasi Formula Benalu Teh

Bahan dan alat.

Bahan. Bahan penelitian benalu teh dikumpulkan dari daerah Gunung Mas, Bogor kemudian dikeringkan sampai kadar air 8% dan digiling kasar. Bahan uji adalah ekstrak etanol benalu teh tanpa radiasi (setelah jadi bubuk diiradiasi gamma dengan dosis 7,5 kGy untuk menghilangkan kontaminasi mikroba), air suling, dan metanol.

Alat. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu neraca, tangki stainless steel wadah untuk maserasi, penguap putar vakum, desikator vakum, alat-alat gelas, mortar, pencetak tablet, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) merk KNAUER dengan detektor PDA dengan kolom Inertsil ODS 3 dengan flow 1 ml dan eluen yang dipakai adalah MeOH:TFA 0,1 % (50:50) standar marker yang dipakai derivat kuersetin, dan seperangkat alat untuk uji stabilitas di Laboratorium Teknologi Farmasi dan Medika, Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, BPPT Serpong.

Metode.

Pembuatan ekstrak benalu teh. Hasil maserasi benalu teh dengan etanol, diuapkan dan dipekatkan. Ekstrak etanol benalu teh dikumpulkan sampai seberat 850 gr untuk bahan uji stabilitas.

Standardisasi Ekstrak Benalu Teh. Standardisasi ekstrak kental benalu teh dilakukan terhadap parameter spesifik dan nonspesifik. Parameter spesifik meliputi identitas, organoleptik, dan kandungan senyawa marker. Sedangkan parameter nonspesifik dilakukan terhadap kadar air, kadar abu, kadar abu tidak larut asam, kadar cemaran logam berat, kadar cemaran mikroba berupa angka lenpeng total dan angka kapang khamir.

Pembuatan Ekstrak Kering Benalu Teh. Ekstrak kental benalu teh dikeringkan dengan bahan pengering (adsorban). Sejumlah ekstrak kental benalu teh dan bahan pengering ditimbang sesuai dengan komposisi (dibuat dengan komposisi ekstrak: bahan pengering 1:1) kemudian dicampur hingga homogen dan dikeringkan dengan bantuan oven vakum dengan suhu 40°C sampai mengering dan dijadikan bubuk..

Evaluasi Ekstrak Kering Benalu Teh. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian dilakukan evaluasi terhadap parameter fisik, kadar susut pengeringan, kandungan dan kromatogram senyawa marker.

Formulasi dan pembuatan tablet benalu teh. Pada pembuatan kapsul benalu teh di tambahkan zat aditif dan pengisi lalu masukkan ke dalam cangkang kapsul secara manual.

Formulasi Sediaan Kapsul Ekstrak Benalu Teh. Formulasi sediaan kapsul ekstrak benalu teh dibuat dalam batch dengan cara: ditimbang masing-masing bahan sesuai dengan komposisi formula yang dibuat. Massa ekstrak kering dimasukkan dalam wadah beaker glass tambahkan pengisi sedikit demi sedikit sampai homogen, selanjutnya tambahkan aditif yang lain aduk dengan menggunakan mixer hingga homogen. Massa kapsul yang didapat siap untuk dilakukan evaluasi dan dimasukkan dalam cangkang kapsul.

Evaluasi Massa Kapsul Ekstrak Benalu Teh. Evaluasi massa kapsul ekstrak benalu teh dilakukan terhadap parameter fisik, kadar susut pengeringan dan sifat alir dan index kompresibilitas.

Evaluasi Sediaan Kapsul Ekstrak Benalu Teh. Evaluasi sediaan kapsul ekstrak benalu teh dilakukan terhadap parameter keseragaman bobot. Penetapan keseragaman bobot kapsul benalu teh dilakukan dengan cara ditimbang saksama 10 kapsul, satu per satu, keluarkan isi tiap kapsul dengan cara yang sesuai. Timbang saksama tiap cangkang kapsul kosong dan hitung bobot netto dari isi tiap kapsul dengan cara mengurangkan bobot cangkang kapsul dari masing-masing bobot kapsul.

Data stabilitas. Data stabilitas fisik, kimia dan mikrobiologi tablet benalu teh pada penyimpanan suhu kamar (27 °C) dan suhu yang dipercepat adalah 40°C (RH 75 %).

Standarisasi ekstrak benalu teh dengan seyawa marker.

Kapsul benalu teh di timbang sebanyak 500 ppm yang dilarutkan dengan MeOH dan masukan ke dalam cup kecil, lalu di sonifikasi selama 30 menit dilakukan 2 kali pengambilan ekstrak kemudian di saring dan disentrifugasi lalu bagian atasnya diambil dan disaring dengan filter milipore 0.45 dan diukur dengan menggunakan KCKT .

c. Diseminasi dan konfirmasi teknik molekuler untuk deteksi tipe HPV High Risk

Sampel penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah spesimen klinis *swab* serviks / mulut rahim dan biopsi jaringan serviks. *Swab* serviks diperoleh dari 23 pasien normal dari RSKD Ibu dan Anak, Siti Fatimah, Makasar. Biopsi jaringan serviks pasien prakanker dan kanker yang digunakan berjumlah 48 sampel terdiri dari 12 sampel diperoleh dari rumah sakit Wahidin Sudirohusodo, Makasar, 32 sampel dari rumah sakit Hasan Sadikin, Bandung dan 4 spesimen dari RSCM, Jakarta.

Ekstraksi DNA spesimen klinis. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan kit *QIAamp DNA Mini* (Qiagen). Proteinase-K dan bufer lisis digunakan untuk melisis sel dari *swab* serviks maupun jaringan biopsi serviks.

PCR dan elektroforesis. Proses PCR dilakukan adalah PCR dupleks yaitu menggunakan 2 pasang primer untuk deteksi HPV dan gen β globin sebagai kontrol internal. dalam campuran pereaksi yang terdiri dari air suling steril, 1x larutan bufer Tris-HCl + KCl, 2,0 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP mix, 1U/50 μ l enzim *Taq polymerase*. Proses PCR dilakukan dengan 3 tahap untuk setiap siklus meliputi tahap denaturasi awal 95°C, 15 menit; denaturasi 94°C, 1 menit, *annealing* 40°C, 2 menit, *extension* 72°C. 1 menit 30 detik dan *extended extension* 72°C, 7 menit. Produk PCR dideteksi dengan teknik elektroforesis dengan menggunakan 1,5% gel agarosa kemudian diwarnai dengan larutan *gel red staining* dan divisualisasi di bawah *UV transilluminator*

Hibridisasi Reverse Line Blot (RLB). *Genotyping* HPV dilakukan dengan teknik hibridisasi RLB menggunakan 14 *probe* oligonukleotida dengan sekuens hasil modifikasi, yaitu untuk mendeteksi tipe HPV *high risk* 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 58, 35, 51, 56, 59, 66, dan 68 dan *probe* β globin. Proses *blotting* dilakukan dengan merekatkan *probe* pada membran nitroselulosa dengan menggunakan *slot blotter* kemudian membran difiksasi dengan pemanasan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

a. Pembuatan Paket Teknologi Perunut Isotop Stabil beta Karoten untuk Deteksi Malnutrisi

Status gizi anak berdasarkan BB/U. Setelah diperoleh data berat badan dan tinggi badan anak, nilai BB/U disesuaikan dengan tabel antropometri, dan diperoleh simpangan baku (4). Z-skor dihitung berdasarkan rumus perhitungan *Z-score* adalah : Bila nilai riil hasil pengukuran > nilai median BB/U, maka rumusnya :

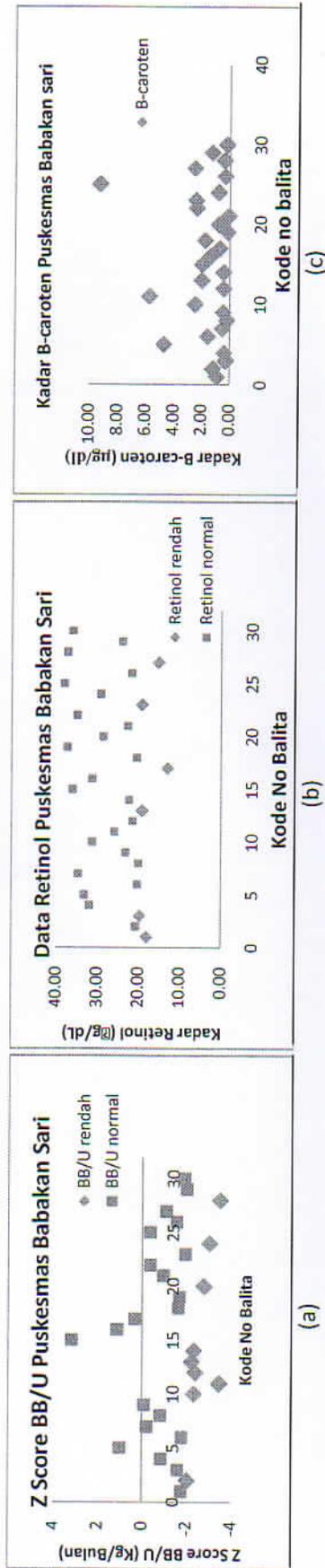
$$\frac{\text{Nilai riil} - \text{Nilai Median}}{\text{SD Upper}}$$

Bila nilai riil hasil pengukuran < nilai median BB/U, maka rumusnya :

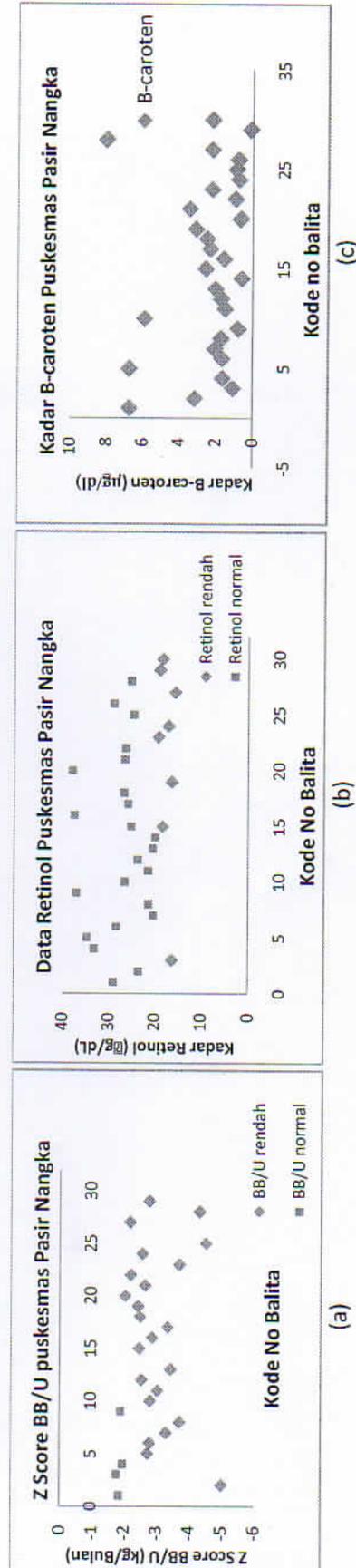
$$\frac{\text{Nilai riil} - \text{Nilai Median}}{\text{SD Lower}}$$

Berdasarkan data Z-score anak BB/U pada lokasi PKM Babakan Sari status gizi anak yang mengikuti penelitian secara umum bergizi baik, hanya terdapat 7 anak yang kurang gizi dan 2 anak mengalami gizi buruk, dan 21 anak termasuk mempunyai gizi baik (Gambar 2). Pada PKM Pasir Nangka diperoleh hasil bahwa dari 30 anak yang mengikuti penelitian ini terdapat hanya 5 anak yang mempunyai gizi baik, 25 anak lainnya berada pada Z-skor yang rendah (kurang gizi bahkan masuk kategori gizi buruk (Gambar 3). Gambaran status gizi dan hasil analisis serum darah anak-anak di PKM Cikande ditampilkan dalam bentuk grafik pada Gambar 4. Terdapat 15 anak dengan status gizi baik berdasarkan BB/U, 8 anak kurang gizi, dan 7 anak termasuk gizi buruk. Terdapat 15 anak mempunyai kadar retinol yang cukup. Di PKM Sindang Barang, Bogor terdapat 16 anak bergizi baik, 10 anak bergizi kurang dan 4 anak termasuk gizi buruk berdasarkan BB/U (Gambar 5).

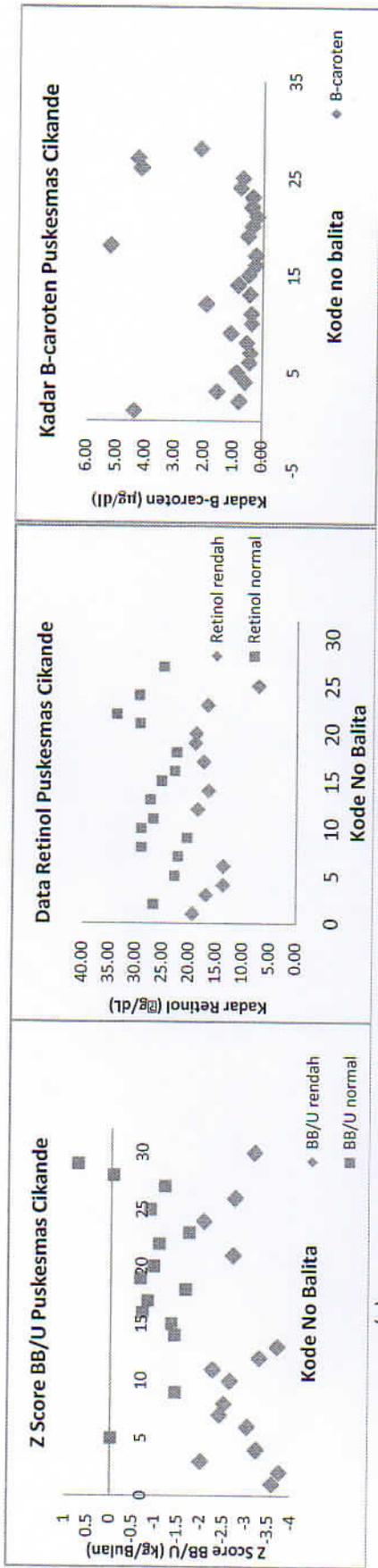
Berdasarkan hasil analisis kadar retinol dalam serum darah 120 anak yang mengikuti penelitian di 4 lokasi, belum dapat dihitung berapa kadar retinol yang tersimpan di jaringan hati. Beberapa dari anak yang bergizi baik juga mempunyai kadar retinol yang rendah, sedangkan anak yang termasuk kategori gizi buruk mempunyai kadar retinol normal yaitu melebihi 20 µg/dL. Hasil penelitian tidak menunjukkan hubungan yang linier antara status gizi anak berdasarkan BB/U dengan kadar retinol dalam serum darah anak balita.



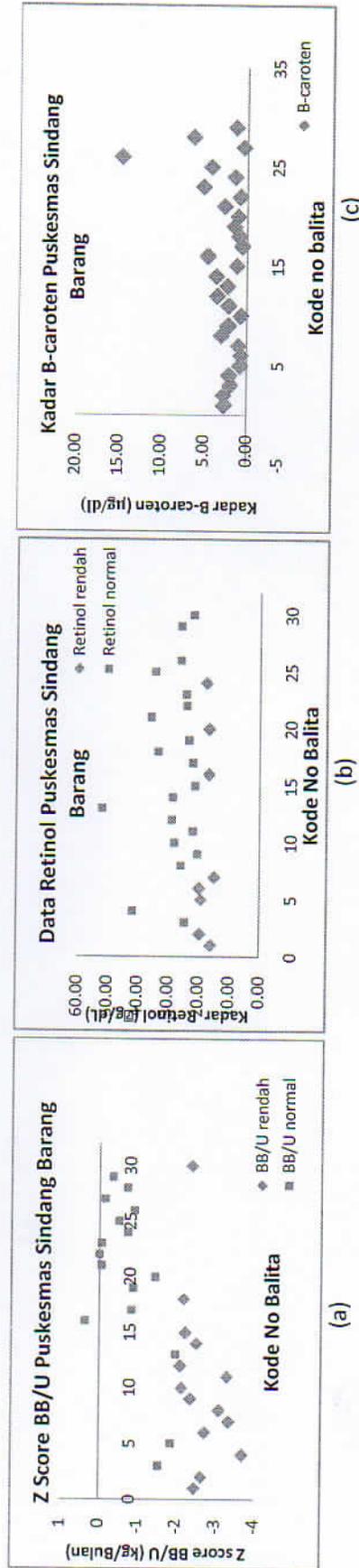
Gambar 2. Grafik data dari PKM Babakan Sari (a) nilai Z Score BB/U (b) Nilai Kadar Retinol, dan (c) nilai kadar B-caroten.



Gambar 3. Grafik data dari Puskesmas Pasir nangka (a) nilai Z score BB/U (b) nilai kadar Retinol dan (c) nilai kadar B-Caroten.



(a) (b) (c)
 Gambar 4. Grafik dari Puskesmas Cikande, (a) Nilai Z Score BB/U, (b) Nilai kadar retinol, dan (c) Nilai kadar B-Caroten



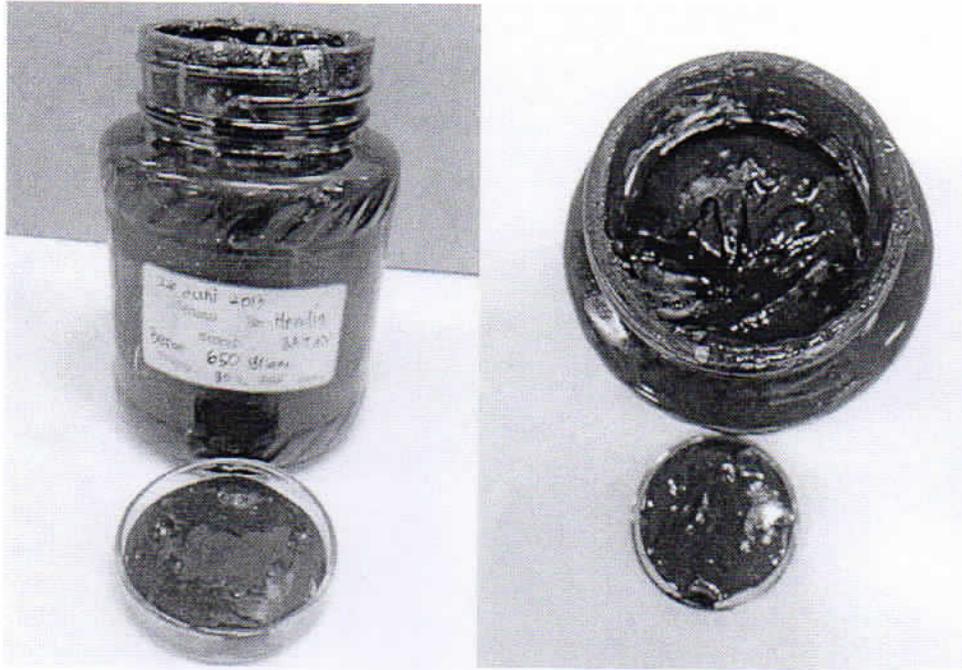
(a) (b) (c)
 Gambar 5. Grafik dari Puskesmas Sindang Barang (a) Nilai Z Score BB/U, (b) Nilai kadar Retinol, dan (c) Nilai B-Caroten.

b. Uji Stabilitas dan Standarisasi Formula Benalu Teh

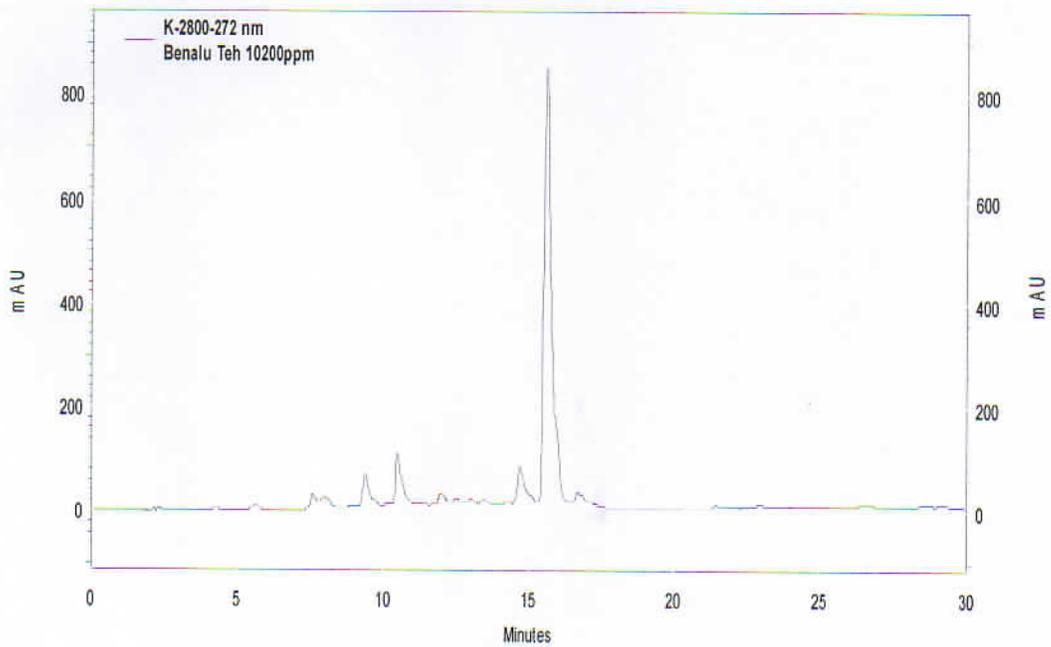
Standardisasi Ekstrak Kental Benalu Teh. Hasil standardisasi ekstrak kental Benalu teh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil standardisasi ekstrak kental benalu teh

Parameter	Hasil
Deskripsi	
Nama ekstrak	Ekstrak etanol benalu teh
Nama latin	<i>Scurulla airopurpurea</i>
Bagian tanaman	Seluruh bagian tumbuhan (herba)
Organoleptik	
Bentuk	Ekstrak kental
Warna	Coklat tua kehitaman
Bau	Khas sedikit beraroma asam
Rasa	Pahit
Parameter spesifik	
Kadar senyawa larut dalam pelarut air	4,35%
Kadar senyawa larut dalam etanol	3,73%
Parameter nonspesifik	
Susut pengeringan	39,91%
Kadar air	26,19%
Kadar abu total	6,20%
Kadar abu tidak larut asam	0,001%
Cemaran logam berat	
Hg	< 0,005 mg/kg
Pb	< 0,040 mg/kg
As	< 0,003 mg/kg
Cd	< 0,005 mg/kg
Cemaran mikroba	
AKK	< 10 cfu/g
ALT	< 250 cfu/g
Kadar senyawa marker	-
Keterangan: (-)=on going	

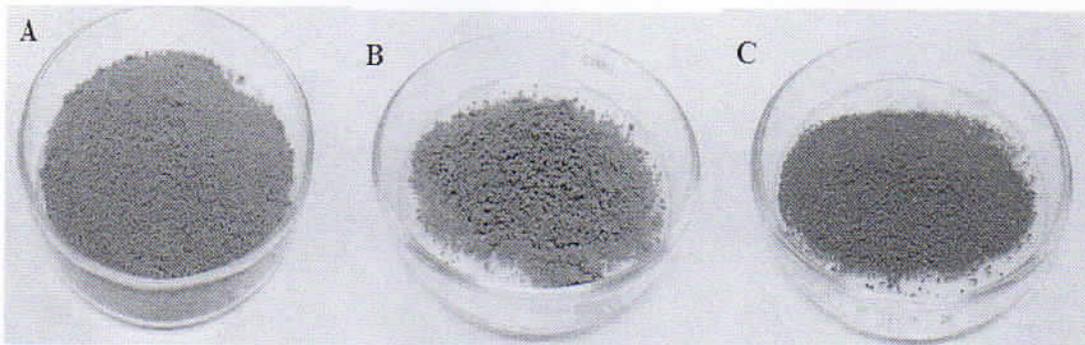


Gambar 1. Ekstrak kental etanol benalu teh (*Scurulla airopurpurea*)

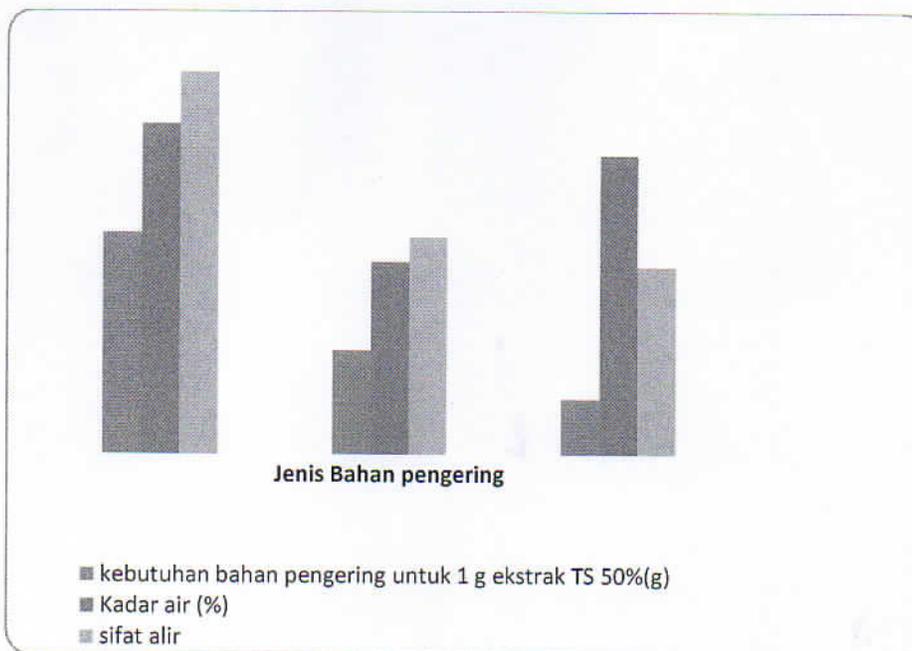


Gambar 2. Profil kromatogram ekstrak kental benalu the pada λ 272 nm dengan fase gerak metanol-air

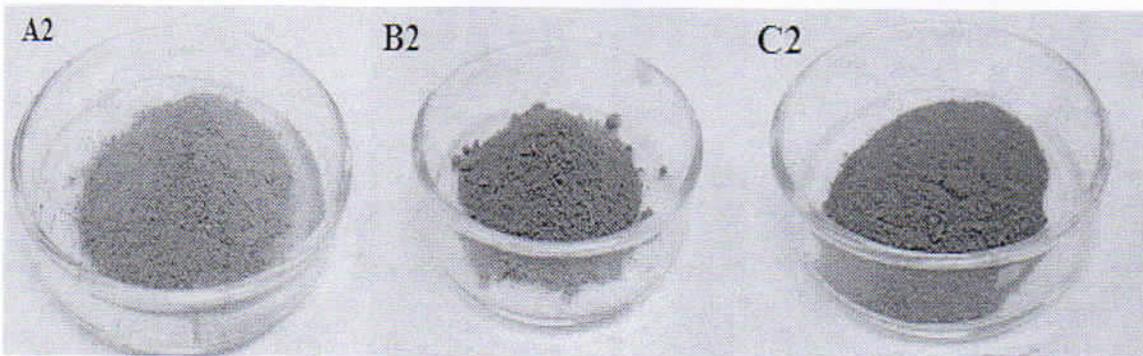
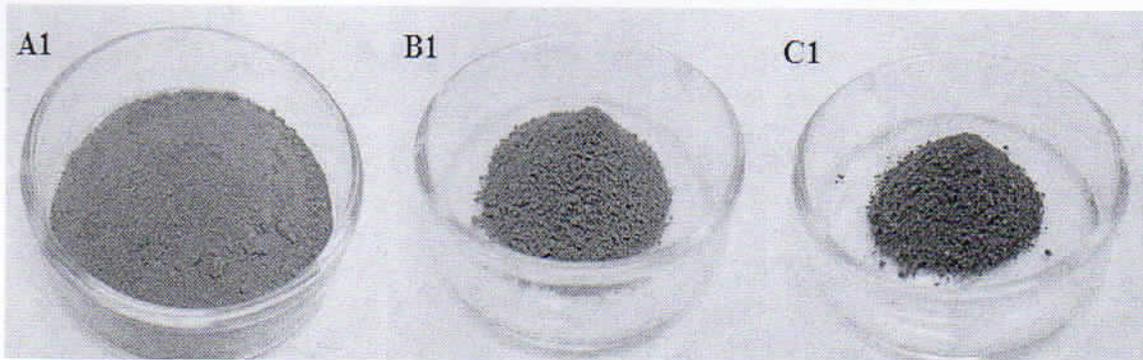
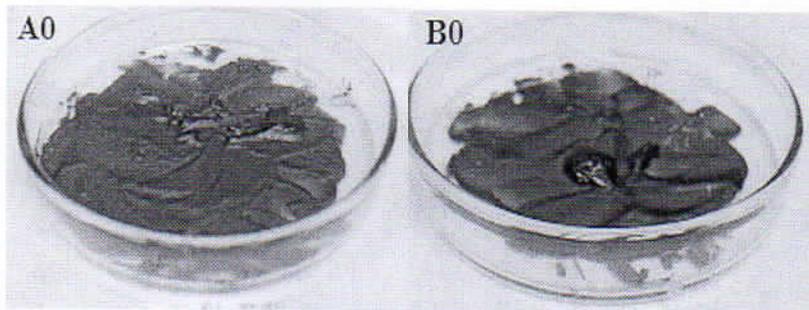
Pembuatan Ekstrak Kering Benalu Teh dan Evaluasinya. Sebelum dibuat sediaan tablet, ekstrak kental benalu the terlebih dahulu dikeringkan menggunakan bahan pengering (absorban) untuk memudahkan dalam proses pencetakan. Bahan pengering yang digunakan yaitu laktosa, amilum dan avicel. Pengeringan ekstrak dilakukan berdasarkan jumlah kebutuhan pengering dan berdasarkan ratio antara ekstrak kental-bahan pengering dengan bantuan pengering vacum. Hasil pembuatan ekstrak kering berdasarkan kebutuhan bahan

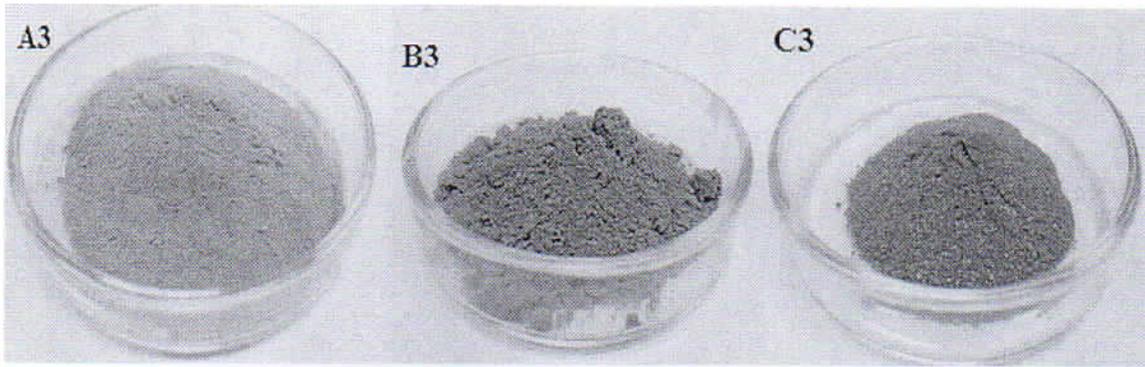


Gambar 3. Ekstrak kering benalu teh berdasarkan kebutuhan bahan pengering. (A) Laktosa, (B) Amilum, dan (C) Avicel.

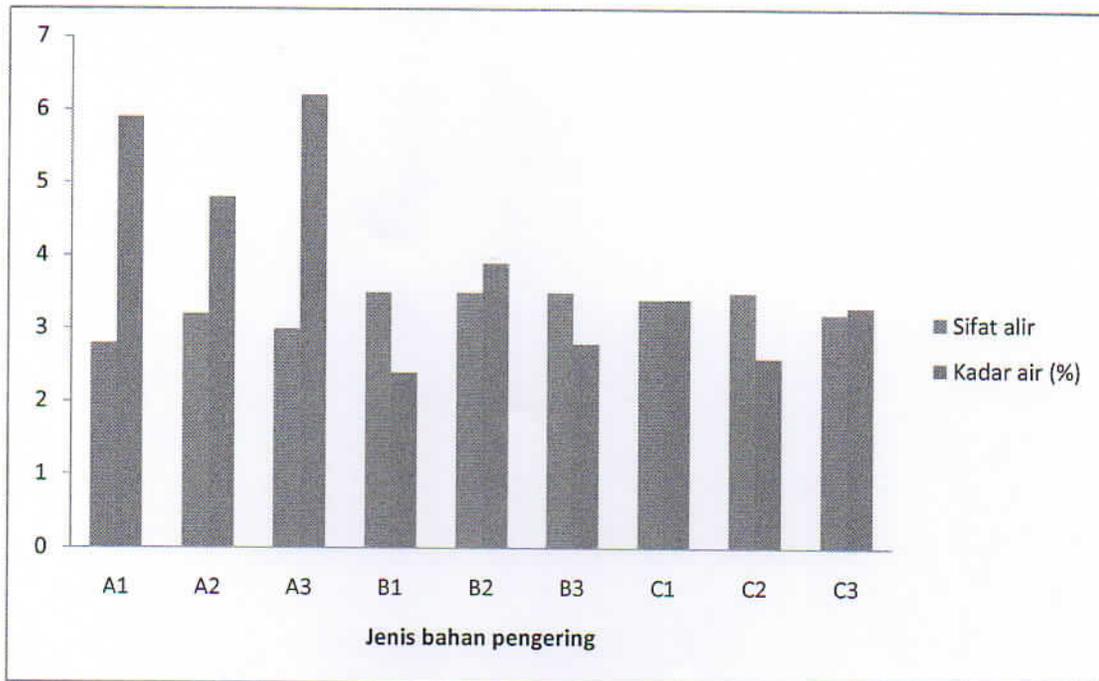


Gambar 4. Hasil evaluasi ekstrak kering berdasarkan kebutuhan bahan pengering. (A) Laktosa, (B) Amilum, dan (C) Avicel.





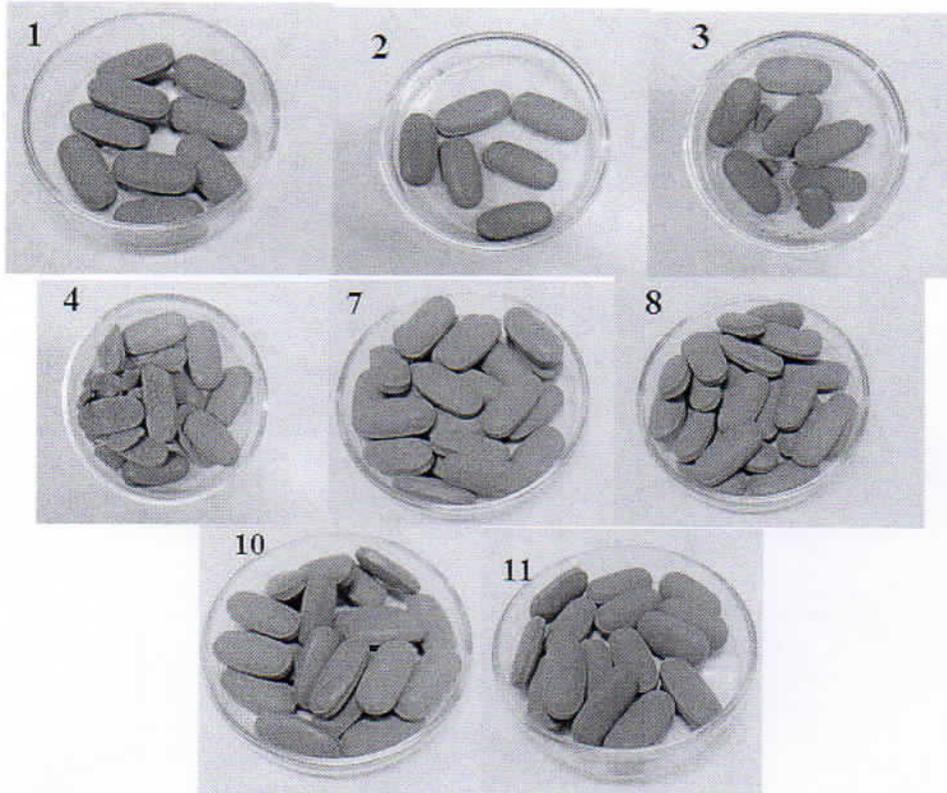
Gambar 5. Ekstrak kering benalu teh berdasarkan ratio antara ekstrak-bahan pengering A1, A2, A3, B2, B3, B4, C1, C2, dan C3



Gambar 6. Hasil evaluasi ekstrak kering berdasarkan ratio antara ekstrak kental-bahan pengering laktosa, amilum dan avicel yang diformulasi dengan berbagai variasi A1,A2, A3, B2, B3, B4, C1, C2, dan C3

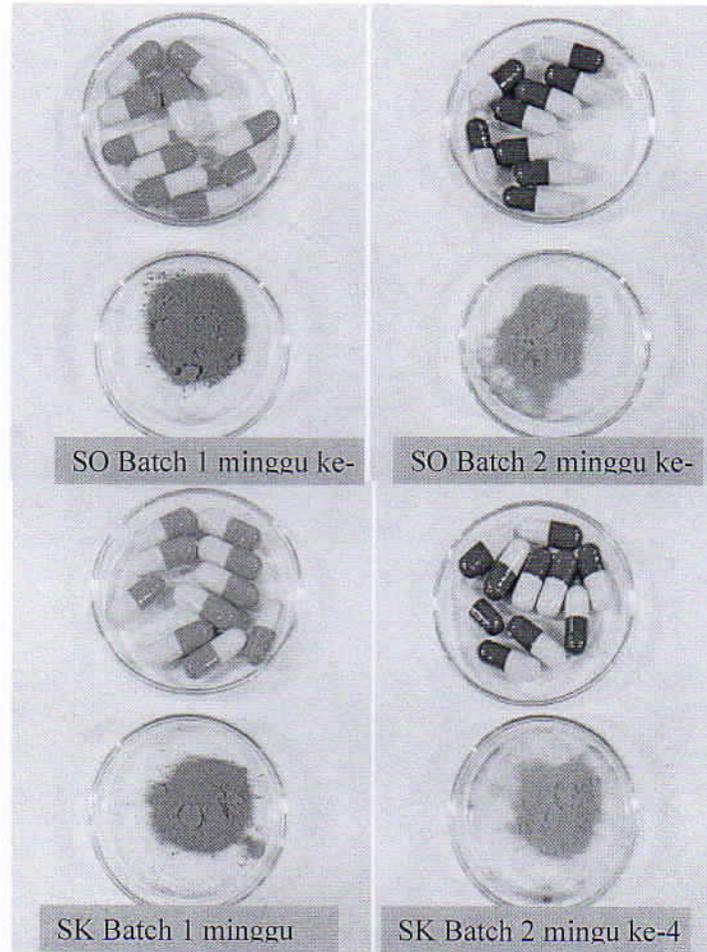
pengering dapat dilihat pada Gambar 3-4 dan berdasarkan ratio ekstrak kental-bahan pengering dapat dilihat pada Gambar 5-6.

Formulasi dan pembuatan tablet benalu teh. Formulasi ekstrak benalu teh dibuat pada berbagai variasi perbandingan antara ekstrak benalu teh dan bahan pengisi. Formulasi 1 merupakan formulasi tablet yang terbaik dengan kekerasan 4,42, namun kekerasannya rendah 2,26. Sehingga dibuat formula dalam bentuk kapsul pada pengujian uji stabilitas.



Gambar 7. Tablet ekstrak benalu teh hasil beberapa praformulasi

Pengujian stabilitas. Hasil uji stabilitas sediaan kapsul ekstrak benalu teh yang disimpan pada suhu kamar dan suhu 40°C RH 75% selama penyimpanan 4 minggu dapat Tabel 2-3 dan Gambar 8 berikut.



Gambar 8. Penampilan fisik cangkang kapsul dan serbuk yang disimpan selama 4 minggu. (SO) suhu 40°C RH 75% dan (SK) suhu kamar 25°C

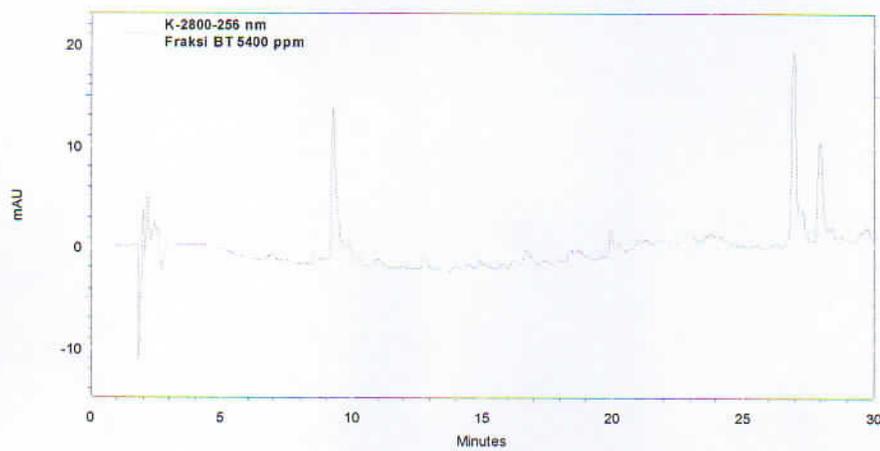
Tabel 2. Pengamatan fisik, kimia dan mikrobiologi sediaan kapsul ekstrak benalu teh pada penyimpanan suhu kamar selama 4 minggu

Batch	Parameter	Minggu ke-		
		0	2	4
1	Keseragaman bobot	0,5558 g	0,5652 g	0,5958 g
	Kadar susut pengeringan	6,04 %	6,38%	6,77%
	Kadar air	3,49 %	2,07%	5,05%
	Laju dan waktu alir	7,33 (1,52detik)	10,53 (2,28 detik)	18,95 (0,59 detik)
	pH	5,04	4,94	4,83
	Kadar flavonoid (quersetin)	1,95 %	1,40 %	1,91 %
	Batas cemaran mikroba	*	*	*
2	Keseragaman bobot	0,5446 g	0,5598 g	0,5558 g
	Kadar susut pengeringan	6,24 %	6,68%	6,52%
	Kadar air	3,84 %	1,70%	5,63%
	Laju dan waktu alir	15,22 (1,92 detik)	10,72 (1,89 detik)	16,33 (0,62 detik)
	pH	4,97	4,88	4,83
	Kadar flavonoid (quersetin)	1,99 %	1,98 %	1,94 %
	Batas cemaran mikroba	*	*	*

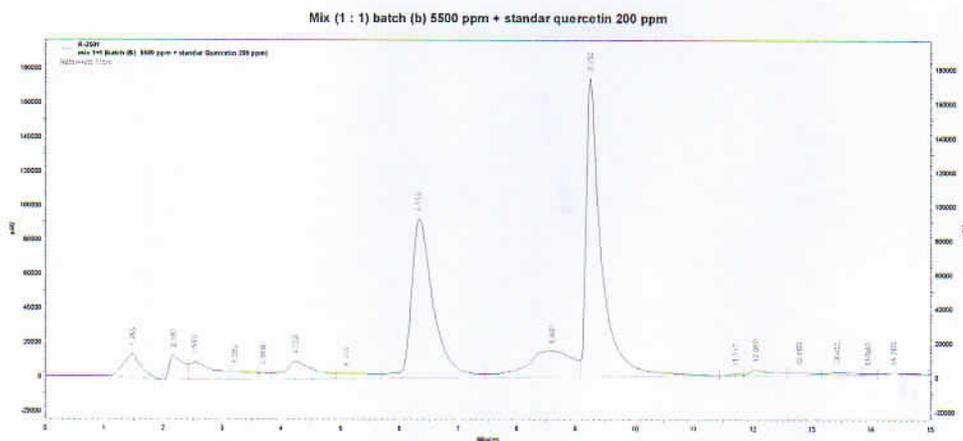
Tabel 3. Pengamatan fisik, kimia dan mikrobiologi sediaan kapsul ekstrak benalu teh pada penyimpanan suhu 40°C RH 75% selama 4 minggu

Batch	Parameter	Minggu ke-		
		0	2	4
1	Keseragaman bobot	0,5558 g	0,5590 g	0,5828 g
	Kadar susut pengeringan	6,04 %	6,81%	6,80%
	Kadar air	5,04 %	4,99%	5,62%
	Laju dan waktu alir	7,33 (1,52detik)	13,56 (2,50 detik)	20,02 (3,85 detik)
	pH	5,04	4,99	4,93
	Kadar flavonoid (quersetin)	1,95 %	2,05 %	2,08 %
	Batas cemaran mikroba	*	*	*
2	Keseragaman bobot	0,5446 g	0,5487 g	0,5710 g
	Kadar susut pengeringan	6,24 %	6,39%	6,88%
	Kadar air	4,97%	5,02%	4,41%
	Laju dan waktu alir	15,22 (1,92 detik)	12,80 (2,33 detik)	14,47 (1,32 detik)
	pH	4,97	5,02	4,82
	Kadar flavonoid (quersetin)	1,99 %	2,05 %	1,94 %
	Batas cemaran mikroba	*	*	*

Standarisasi ekstrak benalu teh dengan senyawa marker. Analisis kimia berdasarkan marker senyawakuersetin. Sampel ekstrak Benalu teh yang telah dilakukan analisis KCKT dengan pelarut asetonitril dan TFA dengan gradien umum menunjukkan bahwa ada peak mayor pada waktu retensi menit ke 6 (Gambar), dengan UV max 256. Sedangkan standar kuersetin dehidrat dengan metode yang sama muncul pada waktu retensi menit ke 9 (Gambar). Meskipun waktu retensi berbeda antara ekstrak dengan standar kuersetin, tetapi berdasarkan spektra UV, dapat diduga bahwa senyawa mayor dari ekstrak benalu teh adalah derivat kuersetin.



Gambar 9. Kromatogram fraksi 5 dari ekstrak etanol benalu teh



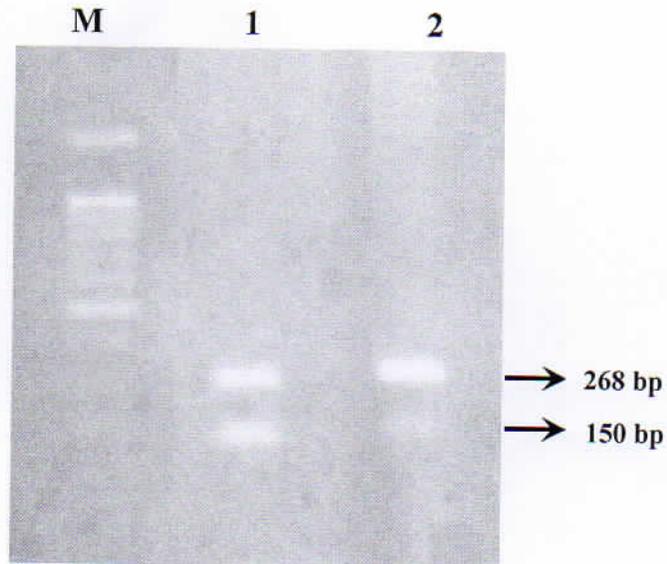
Gambar 10. Kromatogram fraksi 5 dari ekstrak etanol benalu teh dan standar kuersetin

c. Diseminasi dan konfirmasi teknik molekuler untuk deteksi tipe HPV High Risk

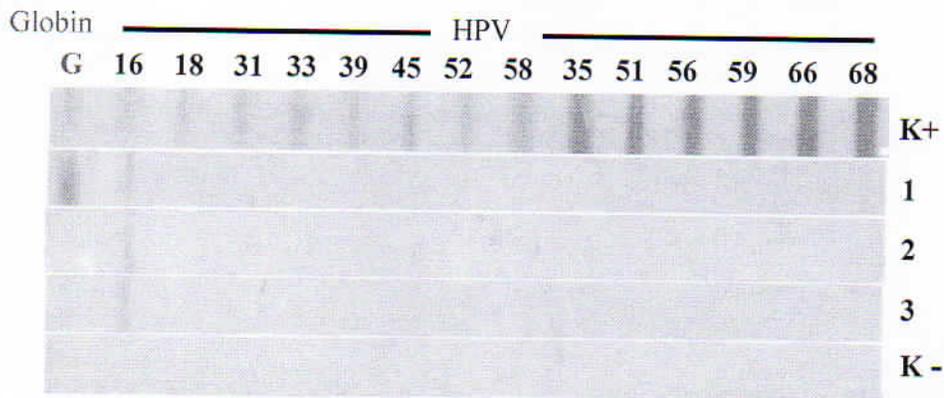
Hasil PCR dupleks dengan menggunakan primer GP 5+ (F) dan GP 6+ (R) biotin dan primer Globin F dan Globin R biotin dari spesimen klinis dinyatakan dalam Gambar 1. Fragmen DNA berukuran 150 bp menunjukkan hasil positif HPV sedangkan fragmen DNA berukuran 268 bp menunjukkan positif gen β globin. Dari 23 sampel swab serviks pasien normal (yang melakukan pemeriksaan rutin) RSKD Ibu dan Anak Siti Fatimah, Makasar, 9 sampel menunjukkan hasil PCR dupleks positif. Hasil ini menyatakan 9 sampel (39,1 %) tersebut terinfeksi HPV. Hasil penelitian peneliti lain menunjukkan DNA HPV yang terdeteksi dari pasien yang melakukan pemeriksaan rutin dengan metode PCR adalah 15,6 %. Sampel biopsi baik dari rumah sakit Wahidin Sudirohusodo, Makasar maupun RSCM, Jakarta semuanya menunjukkan hasil PCR positif sedangkan 32 sampel klinis dari rumah sakit Hasan Sadikin, Bandung, hanya 28 sampel yang positif. Semua sampel/spesimen menunjukkan hasil positif untuk gen β globin sebagai kontrol internal. Hal ini menunjukkan cara pengambilan spesimen benar dan hasil uji dianggap valid. Gen β globin adalah bagian dari sekelompok gen yang terletak pada kromosom 11 (16). β -Globin sebagai kontrol kualitas cetakan DNA sangat penting dalam analisis sampel klinis, kualitas spesimen genital, dan jumlah sel manusia yang adekuat.

Hasil genotyping 23 sampel *swab* serviks dari RSKD Ibu dan Anak, Siti Fatimah, terdeteksi HPV *high risk* pada 3 sampel yaitu HPV tipe 16 (Gambar 2), sedangkan 6 sampel yang lain negatif meskipun hasil PCRnya positif. Kemungkinan yang menyebabkan adalah spesimen tersebut terinfeksi *HPV low risk* atau terinfeksi

HPV high risk tipe lain di luar tipe yang diteliti dalam dalam penelitian ini. Proses PCR dengan

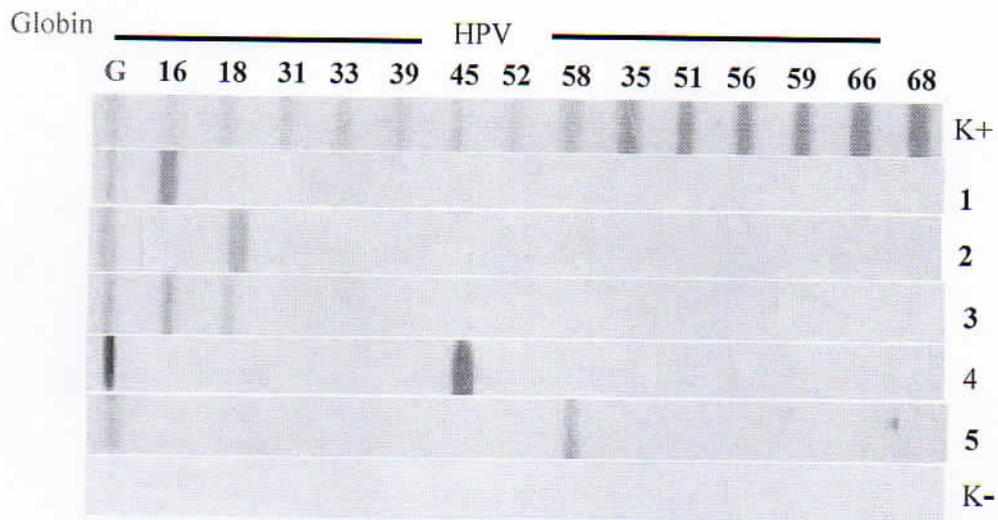


Gambar 1. Hasil PCR dupleks sampel klinis swab dan biopsi dengan primer berlabel biotin
 Lajur M : Marker (Penanda berat molekul)
 Lajur 1 & 2 : Sampel biopsi jaringan serviks dari RSCM, Jakarta.
 Keterangan : Pita DNA 150 bp menunjukkan hasil positif PCR untuk HPV
 Pita DNA 268 bp menunjukkan hasil positif PCR untuk gen β globin



Gambar 2. Hasil hibridisasi reverse line blot produk PCR berlabel biotin sampel klinis dari RSKD Ibu dan Anak, Siti Fatimah, Makasar

Strip K+ : Kontrol positif
 Strip 1-3 : Sampel swab serviks pasien normal (HPV 16)
 Strip K- : Kontrol negative



Gambar 3. Hasil hibridisasi *reverse line blot* produk PCR berlabel biotin sampel klinis dari Rumah sakit Wahidin Sudirohusodo, Makasar

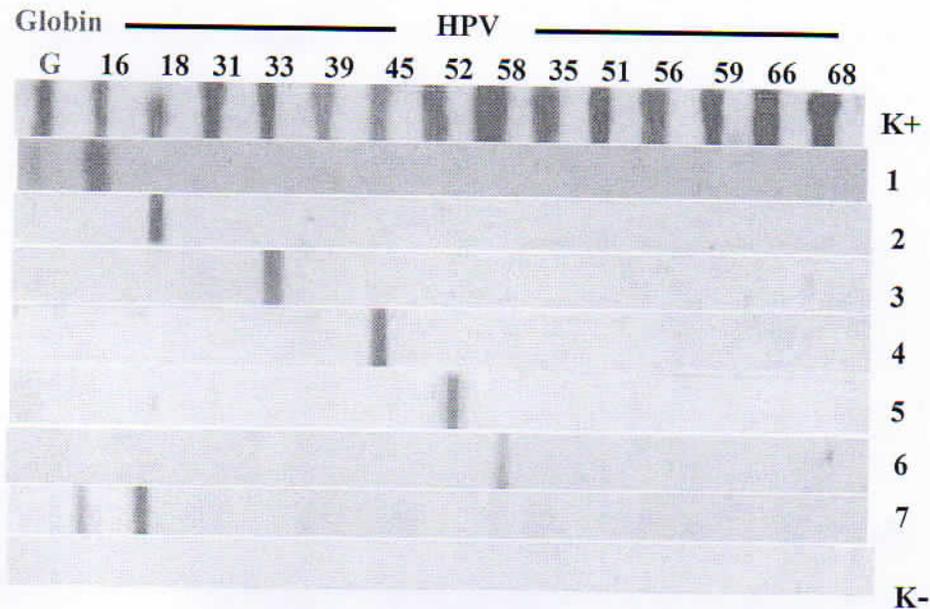
- Strip K+ : Kontrol positif
- Strip 1 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 16) : 5 sampel
- Strip 2 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 18) : 4 sampel
- Strip 3 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 16 +18)
- Strip 4 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 45)
- Strip 5 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 58)
- Strip K- : Kontrol negatif

primer GP 5+/6+ mengamplifikasi daerah L1 konsensus dengan tipe HPV spektrum luas.

Sampel biopsi yang berjumlah 12 sampel dari rumah sakit Wahidin Sudirohusodo, Makasar, menunjukkan 5, 4, dan 1 sampel masing-masing terdeteksi sebagai HPV 16 + HPV 18, dan HPV 16 + HPV 18, sedangkan pada 2 sampel yang lain, terdeteksi HPV 45 dan HPV 58 (Gambar 3).

Dari 32 sampel biopsi jaringan serviks rumah sakit Hasan Sadikin, Bandung, 31 sampel terinfeksi HPV *high risk* dan 1 sampel hasilnya negatif. Tiga sampel di antara 31 sampel tersebut hasil PCRnya negatif. Metode PCR- RLB memberikan hasil yang

lebih sensitif dari pada metode PCR, hal ini tampak pada uji kemampuan mendeteksi minimal DNA PCR dupleks dan PCR dupleks – RLB, dimana hasil negatif dengan



Gambar 4 : Hasil hibridisasi reverse line blot produk PCR berlabel biotin sampel klinis dari rumah sakit Hasan Sadikin, Bandung

K+ : Kontrol positif

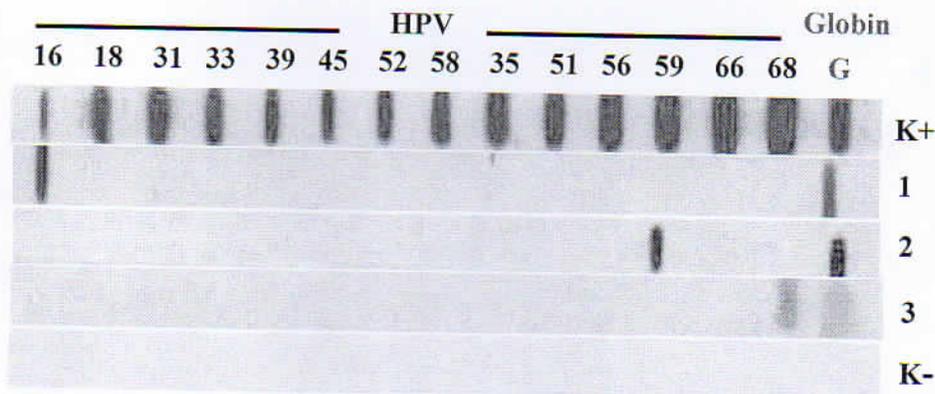
- Strip 1: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 16) : 11 sampel**
- Strip 2: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 18) : 13 sampel**
- Strip 3: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 33) : 1 sampel**
- Strip 4: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 45) : 2 sampel**
- Strip 5: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 52) : 1 sampel**
- Strip 6: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 58) : 1 sampel**
- Strip 7: Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 16 + 18) : 2 sampel**

Strip K- : Kontrol negatif

PCR masih memberikan hasil positif dengan RLB. Tipe HPV *high risk* yang diperoleh dari 31 sampel biopsi tersebut yaitu HPV 16 pada 11 sampel, HPV 18 pada 13 sampel, HPV 33 pada 1 sampel, HPV 45 pada 2 sampel, HPV 52 dan 58 masing masing pada 1 sampel dan infeksi ganda HPV 16 + HPV 18 pada 2 sampel (Gambar 4).

Hasil *genotyping* negatif dari 1 sampel biopsi kemungkinan disebabkan infeksi HPV tipe lain selain 14 tipe HPV yang terdeteksi dalam penelitian ini atau HPV *high risk* tidak terdeteksi karena berada di luar sel (ekstra selular). Sebelum reinfeksi virus harus keluar dari sel terinfeksi dan dapat bertahan hidup ekstra selular.

Hasil *genotyping* baik dari sampel Makasar maupun Bandung menyatakan tipe HPV yang paling banyak menginfeksi adalah tipe 16 dan 18. Beberapa penelitian juga menunjukkan tipe HPV bersifat onkogenik yang paling banyak dan sering menginfeksi adalah tipe 16 dan 18.



Gambar 5. Hasil hibridisasi *reverse line blot* produk PCR berlabel biotin sampel klinis dari RsCM, Jakarta

- K+ : Kontrol positif
- Strip 1 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 16) : 2 sampel
- Strip 2 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 59)
- Strip 1 : Sampel biopsi jaringan serviks (HPV 68)

Hasil *genotyping* 4 sampel biopsi dari RSCM, Jakarta menunjukkan adanya infeksi HPV 16 pada 2 sampel, HPV 59 pada 1 sampel dan HPV 68 juga pada 1 sampel (Gambar 5).

KESIMPULAN

1. Hasil perhitungan Z-score berat badan/umur anak dari 120 relawan (57 anak laki-laki dan 63 anak perempuan) yang berasal dari 4 Pusat Kesehatan Masyarakat di Bogor, Bandung, Tangerang dan Serang menunjukkan bahwa terdapat 58 anak dengan status gizi baik dan 62 anak dengan status gizi kurang dan buruk. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat 81 anak yang kadar retinol dalam serumnya $\geq 20 \mu\text{g/dL}$ dan 39 anak $\leq 20 \mu\text{g/dL}$. Berdasarkan data hasil analisis kadar retinol dan beta karoten dalam serum darah dengan KCKT belum dapat diketahui kadar cadangan vitamin A dalam hati anak. Penelitian ini merupakan bahan pertimbangan untuk pemilihan lokasi sampling penelitian pemanfaatan perunut isotop stabil β -karoten untuk mengetahui status gizi anak (lanjutan) pada tahun 2014.
2. Standardisasi ekstrak kental benalu teh memiliki kadar air 26,19%, susut pengeringan 39,91%, kadar abu total 6,20%, kadar abu tidak larut asam 0,001%. Cemaran logam berat Hg, Pb, as dan Cd masing-masing sebesar $< 0,005$, $< 0,040$, $< 0,003$ dan $< 0,005$ mg/kg. Hasil pengamatan terhadap cemaran mikroba diperoleh nilai AKK < 10 cfu/g dan ALT < 250 cfu/g. Secara umum pengukurun stabilitas sementara pada parameter pengamatan fisik dan kimia dari formula ekstrak kapsul benalu teh belum mengalami perubahan yang signifikan (masih stabil).
3. Metode PCR dupleks berlabel biotin - RLB (PCR-RLB) menggunakan 14 *probe* pendeteksi HPV *high risk* dapat diterapkan untuk spesimen *swab* serviks dan biopsi jaringan serviks dan telah berhasil diuji coba pada beberapa laboratorium klinis di beberapa daerah di Indonesia. Teknik deteksi HPV *high risk* secara molekuler dalam penelitian ini efisien diterapkan untuk pemeriksaan rutin sebagai teknik deteksi dini kanker serviks.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vitamin A Tracer Task Force. *Appropriate uses of Vitamin A Tracer (stable isotope) Methodology*. Washington DC: International Lifesciences Institute Report, 2004.
2. HERMAN S., *Studi Masalah Gizi Mikro di Indonesia, Perhatian Khusus pada Kurang Vitamin A (KVA), Anemia dan Seng*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Gizi dan Makanan, 2007.
3. HASKELL, M.J., Ribaya-Mercado JD and Vitamin A Tracer Task Force. *Tracer Dilution Methods to Assess Status and Evaluate Intervention Programs*. Washington DC: HarvestPlus, 2005.
4. WINARNO, H., . Antiproliferation activity of octadeca-8,10,12-triynoic acid on human cancer cell lines Cervix HeLa, lung carcinoma A-549, lymphoma HUT-78, leukemia THP-1, and melanoma A-375, *Berita Biologi*, LIPI, (2009). Dalam Proses Penerbitan.
5. BANKOTI, K., RANA, M.S., BARDWAJ, M.K., Accelerated Stability Study of Herbal Capsules. *IOSR Journal of Pharmacy* . Volume 2 Issue 5,2012, p. 01-06.
6. EMEA, *Guideline on Stability Testing: Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products*. European Medicines Agency Inspection, 2003.