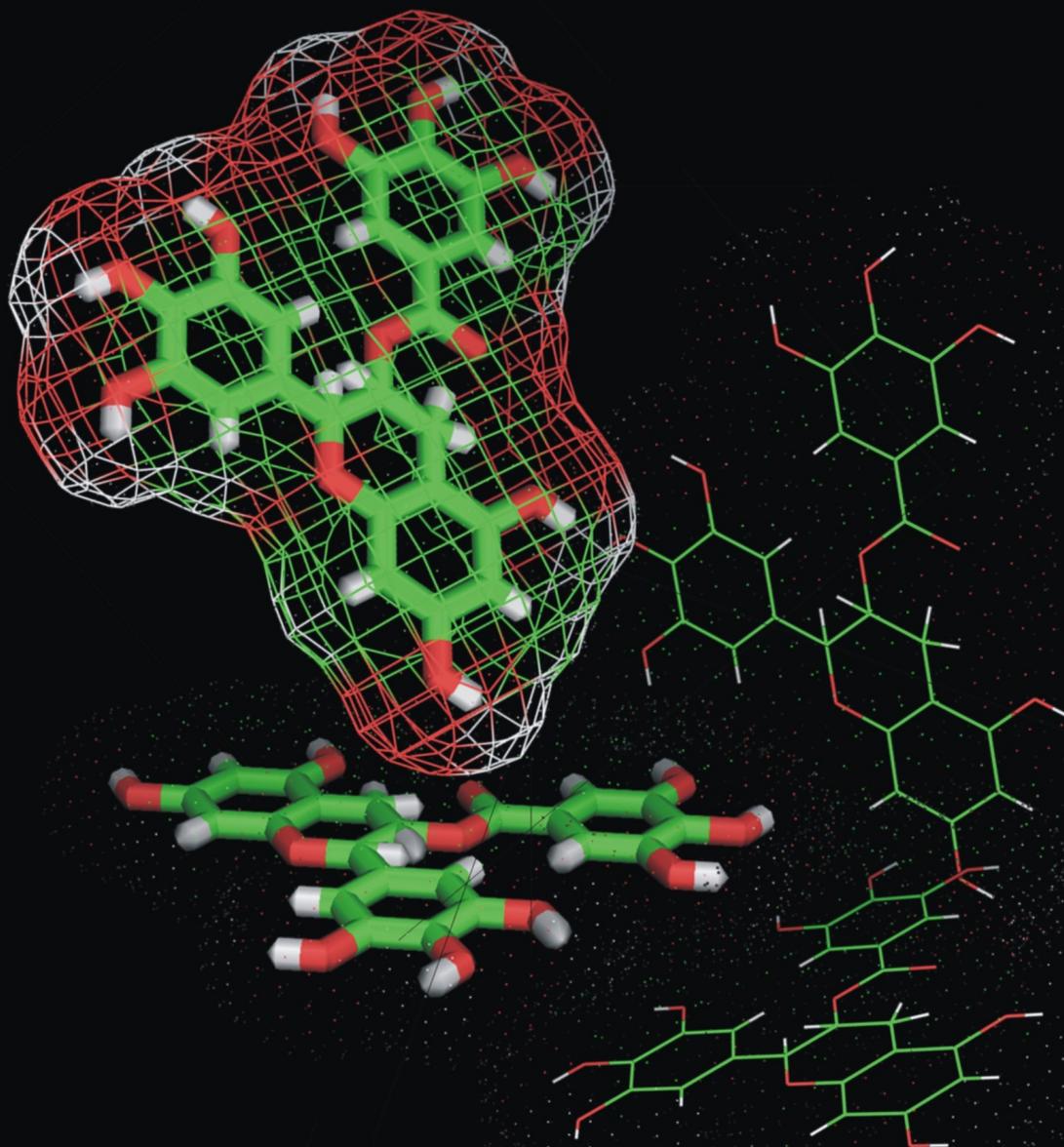


The Journal of
Experimental
Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology



J. Exp. Life Sci.

Vol. 1

No. 2

Hal. 55-110

2011

Diterbitkan oleh
Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
bekerjasama dengan
Masyarakat Nano Indonesia (MNI)

The Journal of Experimental Life Science

Discovering Living System Concept through Nano, Molecular and Cellular Biology

Dewan redaksi

Ketua Penyunting

M. Sasmito Djati, Dr. Ir. MS.

Anggota Penyunting

Aida Sartimbul, M.Sc. Ph.D - UB

Adi Santoso, M.Sc. Ph.D - LIPI

Nurul Taufiq, M.Sc. Ph.D - BPPT

Arifinnur Sugiharto, M.Sc. Ph.D -UB

Sukoso, Prof. MSc. Ph.D-UB

Etik Mardiyati, Dr. - BPPT

Soemarno, Ir., MS., Dr., Prof. - UB

Reviewer

Ahmad Faried, MD. Ph.D – UNPAD

Trinil Susilawati, Ir., MS., Dr., Prof. - UB

Muhaimin Rifai, Ph.D - UB

Rer.nat. Ronny Martien, Dr. – UGM

Moch. Ali, Dr. - UNRAM

Widodo, S.Si., M.Si., Ph.D MED Sc - UB

Irwandi Jaswir, Prof. – UII Malaysia

Sarjono, Dr. - ITB

Muhammad Askari, Dr. – UTM Malaysia

Sutiman Bambang S., Dr., Prof. - UB

Moh. Aris Widodo, Sp.FK., Ph.D., Prof. - UB

Yanti, Dr. – UNIKA ATMAJAYA

Brian Yulianto, Dr. - ITB

Bambang Prijambudi, Dr. - ITB

Arief Boediono, drh., PhD., Prof. - IPB

M. Yedi Sumaryadi, Ir., Dr., Prof. - UNSOED

Wasmen Manalu, Dr., Prof. - IPB

Moch. Syamsul Arifin Zein, Ir., M.Si. - LIPI

Gono Semiadi, Ir. MSc. PhD. - LIPI

Yaya Rukayadi, MS., Dr. – Yonsei University Seoul

Muhaimin Rifa'i, Ph.D - UB

Widjiati, drh.,MS.,Dr. – UNAIR

Amin Setyo Leksono, S.Si.,M.Si.,Ph.D - UB

Editor Pelaksana

Afidatul Muji Astuti, S.Si.

Illustrator

Tegas Iman Prasojo, M.Si

Alamat Redaksi

Redaksi The Journal of Experimental Life Science
Gedung A, Lt.2, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya
Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145
Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801
Email: jels@ub.ac.id
Web: <http://www.jels.org>

Daftar Isi

Hambatan EGCG terhadap Ekspresi <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF) dan Ekspresi <i>Vascular-endothelial Cadherin</i> (VE-Cadherin) dalam Vaskulo-angiogenesis Embrio Ayam (Indriati Dwi Rahayu, Mochammad Sasmito Djati, Mohammad Rasjad Indra)	56-63
Peranan Curcumin terhadap Proliferasi, Apoptosis dan Diferensiasi Hepatosit <i>Mice Balb/C</i> yang Dipapar dengan Benzapyrene (Candra Rini Hp., Edi Widjajanto, Rm. Loekito)	64-71
Penurunan Motilitas dan Daya Fertilitas Sperma Ikan Lele Dumbo (<i>Clarias spp</i>) Pasca Perlakuan <i>Stress</i> Kejut Listrik (Abdul rahem faqih)	72-82
Pemberian Beberapa Kombinasi ZPT Terhadap Regenerasi Tanaman Gloxinia (<i>Sinningia speciosa</i>) dari Eksplan Batang dan Daun Secara <i>In Vitro</i> (Imelda Jeanette Lawalata)	83-87
Penggunaan Kultur Starter Bakteri Asam Laktat pada Pengolahan Sosis Fermentasi Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC-1194 (Happy Nursyam).....	88-94
Biosistem Pertanian Apel Lokal Malang (Dian Siswanto, Irfan Mustafa, Gustini Ekowati, Muhamad Imam, Endri Purnomo)	95-101
Efek Penghambatan Ekstrak Teh Rosella Merah (<i>Hibiscus Sabdariffa Linn</i>) terhadap <i>NF-κB</i>, <i>TNF-α</i> dan <i>ICAM-1</i> pada <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Cultured</i> yang dipapar <i>Low Density Lipoprotein (LDL)</i> Teroksidasi (Dwi Sarbini, Djangan Sargowo, M. Saifur Rohman).....	102-110

Hambatan EGCG terhadap Ekspresi *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) dan Ekspresi *Vascular-endothelial Cadherin* (VE-Cadherin) dalam Vaskulo-angiogenesis Embrio Ayam

Indriati Dwi Rahayu^{1*}, Mochammad Sasmito Djati², Mohammad Rasjad Indra³

¹Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan ilmu pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya

³Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Keamanan konsumsi EGCG terhadap kehamilan, terutama dampaknya terhadap perkembangan embrio sejauh ini belum diketahui. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EGCG terhadap mekanisme vaskulo-angiogenesis pada embrio ayam secara *in ovo*. Telur tetas diinjeksi dengan EGCG sebelum diinkubasi. Kemudian *survival rate* embrio, ekspresi VEGF dan ekspresi VE-Cadherin pada embrio dibandingkan dan dievaluasi. Dalam penelitian ini, nampak adanya penurunan *survival rate* embrio, ekspresi VEGF dan VE-Cadherin, sesuai dengan peningkatan dosis paparan EGCG. Hasil tersebut menunjukkan bahwa EGCG dapat mempengaruhi pertumbuhan embrio ayam, melalui hambatan terhadap ekspresi VEGF dan VE-Cadherin.

Kata Kunci: EGCG, embrio, angiogenesis, VEGF, VE-Cadherin

PENDAHULUAN

Perkembangan embrio membutuhkan peningkatan nutrisi, oksigen, serta pembuangan zat-zat sisa metabolime sel. Peningkatan kebutuhan tersebut tidak bisa dipenuhi secara difusi [1], sehingga dibutuhkan sistem baru untuk menjamin kelangsungan hidup dan proses perkembangan embrio. Hal pertama yang terjadi adalah diferensiasi sel-sel mesenkhimal (*hemangioblast*) menjadi sel endothel sehingga terbentuk pembuluh darah baru secara *de novo*. Peristiwa ini disebut vaskulogenesis [2,3].

Vaskulogenesis diregulasi oleh berbagai faktor dengan rangkaian peristiwa kompleks. Sel prekursor dari *hemangioblast* bersifat tergantung terhadap berbagai *growth factor* antara lain *basic fibroblast growth factor 2* (FGF2) dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [4]. VEGF sangat penting dalam peristiwa angiogenesis embrional [3]. VE-cadherin (*Vascular-endothelial cadherin*), suatu protein yang berperan dalam adhesi bagi endothel juga memiliki kaitan interaksi molekuler dengan reseptor VEGF [5]. VE-Cadherin secara eksklusif diekspresikan di sel endothel dan hanya diekspresikan di angioblast.

VE-Cadherin diketahui berperan dalam mengorganisir *adherent junction* di sel endothel yang mengatur adhesi antar sel, permeabilitas, dan migrasi sel endothel [3,6]. Peristiwa ini diikuti dengan angiogenesis, yaitu terbentuknya cabang pembuluh darah baru melalui pemanjangan pembuluh darah kecil yang ada sebelumnya [7]. Angiogenesis diperlukan dalam proses pertumbuhan embrio, maupun proses-proses perbaikan fisiologis saat *postnatal*. Proses vaskulo-angiogenesis pada embrio sering dipelajari dengan menggunakan embrio ayam (maupun famili aves lainnya) karena lebih mudah dipelajari [3,8], serta untuk mengurangi penggunaan mamalia sebagai hewan coba [9].

Angiogenesis yang berjalan abnormal mengakibatkan berbagai proses patologis. Istilah abnormalitas ini meliputi proses angiogenesis yang berlebihan maupun yang mengalami hambatan [10]. Proses angiogenesis yang berlebihan dapat dihambat oleh zat yang disebut sebagai anti angiogenik [7]. Salah satu zat antiangiogenik yang akhir-akhir ini menjadi pusat perhatian adalah EGCG (*Epigallocatechin-3-gallate*), zat aktif utama dalam teh hijau [11].

Mekanisme EGCG dalam menghambat angiogenesis ditunjukkan dalam beberapa laporan penelitian, meskipun masih belum sepenuhnya diketahui [12]. Secara *in vitro*, EGCG dilaporkan dapat menghambat pembentukan tabung vaskular dari sel pembentuknya, melalui inhibisi terhadap VEGF serta hambatan terhadap

* Alamat korespondensi:

Indriati Dwi Rahayu

Email : indri_fkub@yahoo.com

Alamat : Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

fosforilasi VE-cadherin [13]. Berdasarkan hasil penelitian Park pada tahun 2006 diketahui efek anti-angiogenik EGCG terjadi melalui hambatan terhadap ekspresi VEGF yang diinduksi PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) di berbagai level signaling [14]. Sejalan dengan itu, Zhu *et al.*, membuktikan bahwa EGCG menghambat proliferasi sel endothel (yang diinduksi VEGF), migrasi sel endothelial, dan pembentukan tabung vaskular, bahkan EGCG diketahui dapat mengurangi densitas vaskular pada beberapa jenis tumor [15,16].

Penelitian mengenai pengaruh EGCG terhadap embrio masih sangat terbatas. Sejauh ini belum diketahui dampak EGCG terhadap kehamilan pada manusia tetapi EGCG pernah dilaporkan dapat menyebabkan hambatan pertumbuhan caudal pada embrio tikus mulai dosis 25mg l^{-1} [17]. Gangguan pertumbuhan kaudal disebabkan oleh gangguan mekanisme vaskulo-angiogenesis, yang dapat dihambat oleh EGCG. Sejauh ini belum ada penelitian yang menjelaskan keterkaitan hal tersebut. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EGCG pada embrio secara *in ovo* terutama terkait dengan proses vaskulo-angiogenesis. Beberapa parameter representatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekspresi VEGF, VE-cadherin, serta sirkulasi *yolk sac*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan rancangan *randomized control group post test design*. Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Hewan coba yang digunakan adalah ayam (*Gallus gallus* strain Cobb) fase embrio dalam telur ayam. Telur yang telah dibuahi, diperoleh dari perusahaan pembibitan ayam PT Randu Agung Jaya, Kabupaten Malang. Tahap perkembangan embrio ayam mengikuti tabel Hamburger and Hamilton [18]. Hewan coba dibagi secara acak menjadi 4 kelompok ($n=7$) yaitu kelompok kontrol negatif (hanya injeksi PBS), kelompok perlakuan EGCG dengan dosis $12,5\text{ mg l}^{-1}$, kelompok perlakuan EGCG dengan dosis 25 mg l^{-1} , dan kelompok perlakuan EGCG dengan dosis 25 mg l^{-1} .

Semua perlakuan dilakukan *in ovo* secara injeksi dengan menggunakan *disposable syringe* 1 cc sedalam 0,5 cm. Injeksi dilakukan pada ujung tumpul telur. Sebelum injeksi, area injeksi diusap dengan alkohol *disposable*. Setelah selesai

injeksi, ditutup dengan *vinyltape*. Kemudian posisi telur dibalik 180° sesuai aksisnya. Kemudian diinkubasi pada suhu $37,5\text{--}38,5^\circ\text{C}$ selama 48 jam [19].

Perhitungan Sirkulasi Yolk sac.

Telur dipecahkan, dan isinya dituang ke dalam cawan yang setengahnya berisi Larutan NaCl 0,9% (NS). Embrio dengan sirkulasi *yolk sac* atau setidaknya *blood island* dianggap embrio yang berhasil bertahan hidup (*survive*). Jumlah embrio yang dapat bertahan hidup dibagi dengan jumlah telur dalam tiap kelompok dinyatakan sebagai *survival rate*.

Pengambilan dan penyimpanan bahan coba

Bingkai kertas saring diletakkan di atas blastodisk (embrio), kemudian *vitelinne membrane* digunting di sisi luar bingkai kertas. Bingkai kertas saring diangkat, sehingga embrio berada dalam lubang pada bingkai kertas saring. Spesimen dimasukkan dalam larutan NaCl 0,9% yang lain, kemudian dipindahkan lagi dalam larutan NS yang lain dan digoyang-goyangkan beberapa kali. Spesimen dimasukkan dalam *Carnoy's fluid* (CF), dan dibiarkan beberapa jam (antara 4-12 jam) [20].

Larutan CF diganti dengan cara diaspirasi dengan pipet, kemudian diganti dengan alkohol 70% dengan menggunakan pipet. Alkohol diganti dengan alkohol 70% yang baru. Spesimen siap untuk dicat, dalam hal ini dengan pengecatan imunohistokimia. Spesimen dapat disimpan paling lama satu bulan [21].

Immunohistokimia

Pengecatan imunohistokimia dilakukan untuk melihat ekspresi VEGF dan VE-Cadherin dengan menggunakan anti VEGF dan anti VE-Cadherin (Sigma). Sediaan (preparat) diamati dengan mikroskop perbesaran mikroskop 50 kali. Gambar 2D diambil dengan menggunakan kamera digital *Olympus Camedia C-4000*, dengan perbesaran maksimal. Hasil foto dicetak dalam ukuran 5R.

Perhitungan dengan pendekatan Stereologis.

Ekspresi VEGF dan ekspresi VE-Cadherin dinyatakan dalam persentase area dan estimasi luas area. Perhitungan dilakukan secara manual dengan pendekatan stereologis menggunakan kisi-kisi atau *test grid* (Gambar 1).

Batasan embrio ditentukan terlebih dahulu secara manual. Gambar 2D ditempatkan tumpang tindih dengan kisi-kisi yang tercetak di atas mika. Jumlah titik potong (*intersection*) dihitung pada area yang diperlukan. Perhitungan dilakukan oleh 2 (dua) orang observer. Jumlah titik potong adalah perhitungan manual jumlah titik potong (*intersection*) yang berada di area

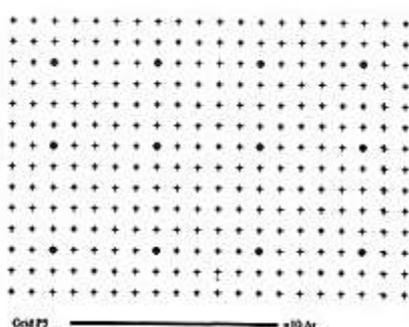
yang dimaksud (*area of interest*), pada gambar yang telah dipasang *test grid*. Hasil perhitungan titik kemudian dirata-rata untuk perhitungan lebih lanjut. Dilakukan persentase area dengan rumus perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Persentase area (\%)} = \frac{\sum \text{titik dengan reaksi positif} \times 100}{\sum \text{titik dalam embrio}}$$

Dilakukan penghitungan estimasi luas area ekspresi VEGF dan VE-Cadherin dengan rumus:

$$\text{Luas area (mm}^2\text{)} = \sum \text{titik dengan reaksi positif} \times (a/p)$$

$$(a/p) = (\text{jarak 2 titik dalam grid})^2 / \text{perbesaran}^2$$



Gambar 1. Test Grid

Analisis Data

Uji hipotesis Chi Square digunakan terhadap data sirkulasi *yolk sac* dan *survival rate*, karena merupakan variabel nominal. Data dengan variabel numerik (ekspresi VEGF dan VE-Cadherin) dianalisa dengan analisis varian (ANOVA) [23].

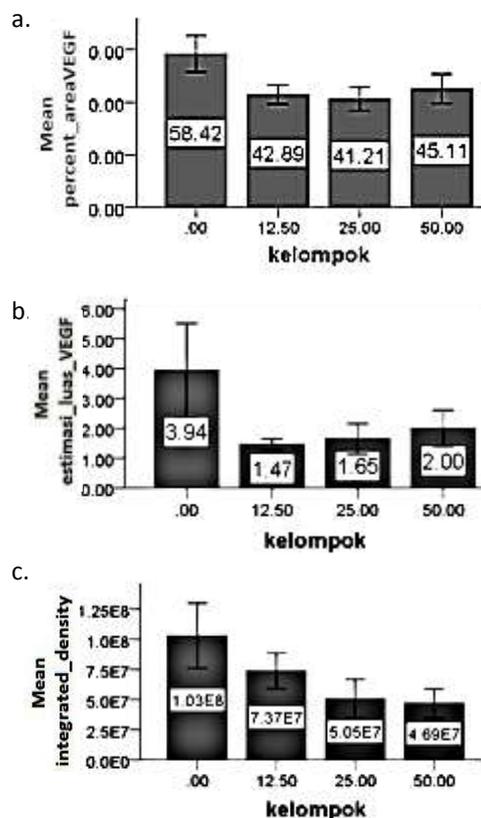
HASIL DAN PEMBAHASAN

Vaskulo-angiogenesis merupakan rangkaian kejadian yang melibatkan banyak mekanisme dan faktor. Proses vaskulo-angiogenesis memerlukan berbagai jalur *signaling* kompleks yang terintegrasi. Koordinasi sinyal mitogenik dan antiproliferatif berperan dalam mengatur perkembangan sistem vaskular embrio [24]. Faktor vaskulo-angiogenesis yang menjadi fokus dalam penelitian ini adalah VEGF dan VE-Cadherin, sebagai molekul yang sangat penting dalam vaskulo-angiogenesis. Selain itu, dalam penelitian ini juga diamati sirkulasi *yolk sac*, sebagai indikator keberhasilan proses vaskulo-angiogenesis ekstraembrional pada embrio ayam

Ekspresi VEGF

Ekspresi VEGF dinyatakan dalam persentase area, estimasi luas area (area yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi primer dengan pengecatan imunohistokimia), serta *integrated*

density yang diperoleh dari perhitungan software ImageJ. Pada penelitian ini didapatkan bahwa paparan EGCG dapat menurunkan ekspresi VEGF (Gambar 2).



Gambar 2. Grafik Hasil Perhitungan Ekspresi VEGF

Keterangan:

- a. Persentase area VEGF
- b. Estimasi Luas VEGF
- c. Integrated density VEGF

Persentase area merepresentasikan perbandingan area yang mengandung VEGF dengan keseluruhan embrio. Hasil perhitungan kuantifikasi dengan stereologi, didapatkan persentase area VEGF kelompok perlakuan berkurang dibanding kelompok kontrol, meski secara statistik tidak bermakna ($p=0,62$). Hal tersebut mengindikasikan bahwa paparan EGCG dapat menurunkan persentase area VEGF. Fakta ini menunjukkan kemungkinan bahwa VEGF diekspresikan lebih sedikit, atau dengan distribusi yang lebih sempit.

Berdasarkan area yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi primer VEGF, didapatkan perkiraan luas VEGF kelompok perlakuan berkurang dibanding kelompok kontrol, meski secara statistik tidak bermakna ($p=0,28$). Hal ini disebabkan VEGF diekspresikan dengan area distribusi yang lebih sempit.

Densitas seringkali diasumsikan sebagai representasi konsentrasi. Hasil metode kuantifikasi densitas VEGF dengan *software "imageJ"*, diperoleh data penurunan densitas VEGF pada kelompok kontrol dibandingkan dengan kelompok perlakuan, meski secara statistik tidak bermakna ($p=0,17$). Hasil tersebut menggambarkan kemampuan EGCG dalam mempengaruhi densitas VEGF. Semakin besar dosis EGCG, penurunan densitas VEGF juga semakin besar, sehingga diduga konsentrasi VEGF yang diekspresikan juga semakin kecil.

Salah satu fungsi utama VEGF adalah untuk mendukung diferensiasi angioblast menjadi endothel [25]. VEGF juga berperan penting dalam melindungi sel endothel dari kematian akibat apoptosis selama perkembangan embrional [3]. Fungsi supresi apoptosis oleh VEGF dimediasi oleh aktivasi MAPK dan PI3K/Akt [26].

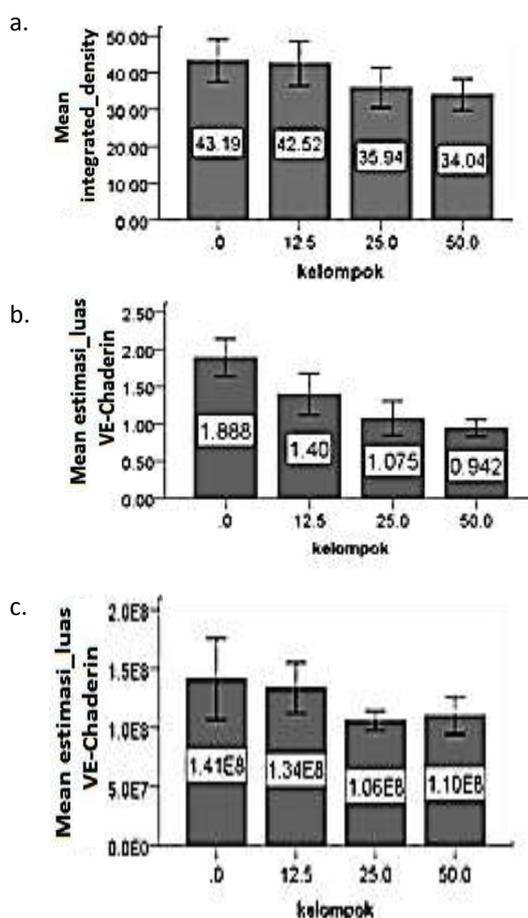
VEGF pada mulanya diekspresikan pada bagian anterior embrio. Sedangkan sel yang mengekspresikan VEGFR-1 dan VEGFR-2 berada pada bagian posterior. Maka Interaksi VEGF-A dan Reseptor-reseptor VEGF (VEGFRs) diduga terlibat dalam migrasi sel prekursor hemangioblast pada awal embrio. Migrasi sel prekursor hemangioblast pada embrio merupakan tahap penting dalam pembentukan anyaman kapiler [4]. VEGFR-2/Flk1 juga diekspresikan oleh hemangioblast yang berasal dari wilayah di mana mesoderm berhubungan dengan endoderm visceral dan berpartisipasi dalam pembentukan pembuluh darah ekstraembrionik pada *yolk sac* [27].

Interaksi VEGF dan VEGFR menjadi salah satu dasar mekanisme dalam angiogenesis. Substansi yang menghambat salah satu atau keduanya dapat menghambat angiogenesis, sehingga disebut sebagai zat/substansi antiangiogenik. Salah satu substansi antiangiogenik yang cukup banyak mendapat perhatian akhir-akhir ini adalah EGCG.

EGCG sebagai zat anti angiogenik bekerja melalui beberapa cara. Di tingkat hulu, EGCG dapat menekan HIF-1A, yang berakibat pada penurunan ekspresi VEGF [27]. EGCG juga menghambat pembentukan tabung vaskular dari sel pembentuknya, melalui inhibisi terhadap VEGF serta hambatan terhadap fosforilasi VE-cadherin [13]. Park *et al.*, melaporkan bahwa EGCG dapat menunjukkan efek anti-angiogenik melalui hambatan terhadap ekspresi VEGF yang diinduksi PDGF (*Platelet-derived Growth Factor*) melalui berbagai level signaling [14]. Zhu *et al.*, membuktikan EGCG menghambat proliferasi sel

endothel (yang diinduksi VEGF), serta menghambat migrasi sel endothelial dan pembentukan tabung vaskular [15,28]. Kemampuan anti-angiogenik lain EGCG juga ditunjukkan dalam hambatan terhadap diferensiasi sel endothel serta hambatan potensi *remodeling* matriks ekstraseluler [29]. EGCG juga dilaporkan mampu menghambat pembentukan kompleks VEGF dengan VEGFR-2, serta mengganggu signaling VEGF intraseluler [13].

Hambatan kinerja VEGF dalam berbagai level dan mekanisme oleh EGCG sebagaimana banyak penelitian yang telah dilakukan, sesuai dengan hasil penelitian ini. Hal tersebut dapat menjelaskan tren penurunan ekspresi VEGF dalam penelitian ini. Hambatan EGCG terhadap proliferasi, migrasi, dan pembentukan tabung vaskular sejalan dengan penurunan luas ekspresi dan persentase area VEGF dalam penelitian ini. Penurunan densitas VEGF dipengaruhi oleh hambatan EGCG terhadap ekspresi VEGF oleh sel-sel embrional.



Gambar 3. Grafik Hasil Perhitungan Ekspresi VEGF

Keterangan:

- a. Persentase area VE-Cadherin
- b. Estimasi Luas VE-Cadherin
- c. Integrated density VE-Cadherin

Ekspresi VE-Cadherin

Dalam penelitian ini diketahui bahwa paparan EGCG juga dapat menurunkan ekspresi VE-Cadherin (Gambar 3). Hasil metode kuantifikasi dengan stereologi, didapatkan persentase area VE-Cadherin kelompok perlakuan menunjukkan kecenderungan menurun dibanding kelompok kontrol, meski secara statistik tidak bermakna ($p=0,57$). Hal tersebut mengindikasikan bahwa paparan EGCG dapat menurunkan persentase bahwa VE-Cadherin diekspresikan lebih sedikit, atau dengan distribusi yang lebih sempit.

Perkiraan luas area yang memberikan reaksi positif terhadap antibodi primer VE-Cadherin, didapatkan luas VE-Cadherin kelompok perlakuan berkurang secara nyata dibanding kelompok kontrol ($p=0,048$). Hal ini menunjukkan kemungkinan distribusi ekspresi VE-Cadherin menjadi lebih sempit dengan paparan EGCG.

Hasil metode kuantifikasi densitas VE-Cadherin dengan *software imageJ*, menunjukkan terdapat tren penurunan densitas VE-Cadherin pada kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan, meski secara statistik tidak bermakna ($p=0,78$). Hasil tersebut secara tidak langsung menggambarkan kemampuan EGCG dalam mempengaruhi konsentrasi VE-Cadherin, karena konsentrasi dalam hal ini direpresentasikan oleh densitas VE-Cadherin.

VE-Cadherin atau Cadherin-5 atau CD144 secara eksklusif diekspresikan di sel endothel. VE-cadherin hanya diekspresikan di angioblast, bukan di sel progenitor hematopoietik, meski pernah dilaporkan ekspresi sesaat VE-Cadherin di hepar fetus. VE-Cadherin diketahui memiliki peran dalam mengorganisasi *adherent junction* di sel endothel. VE-Cadherin mengatur adhesi antar sel, permeabilitas, dan migrasi sel endothel [3,6]. VE-cadherin memediasi interaksi antara sel-sel endothel yang bersifat *calcium-dependent homophilic* [30]. Defisiensi atau putusnya gen ini bersifat lethal, akibat apoptosis sel endothel [5,30]. VE-cadherin, juga memiliki kaitan interaksi molekuler dengan VEGFR [5].

Hambatan pada VE-Cadherin juga akan menghambat angiogenesis. Dengan demikian, zat yang dapat menghambat VE-Cadherin juga bersifat anti angiogenik. Salah satu contoh substansi angiogenik adalah EGCG.

EGCG menghambat pembentukan tabung vaskular dari sel pembentuknya, melalui inhibisi terhadap VEGF serta hambatan terhadap fosforilasi VE-cadherin, sehingga terjadi gangguan ekspresi VE-Cadherin [13]. Gangguan ekspresi VE-Cadherin akan mengakibatkan

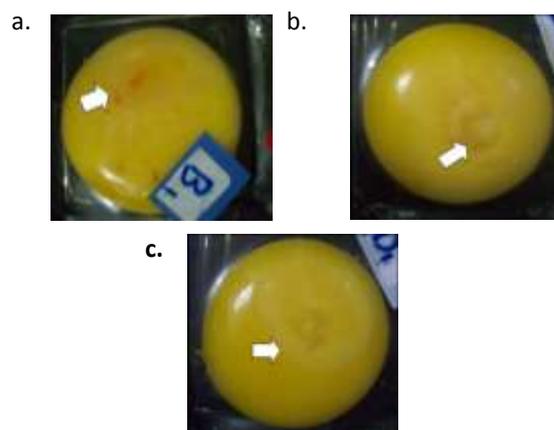
gangguan dalam *tube formation* pembuluh darah, sehingga pembuluh darah yang terbentuk tidak berfungsi optimal. Hal tersebut menjelaskan tren penurunan ekspresi VE-Cadherin dalam penelitian ini.

Dalam penelitian ini, efek EGCG dalam menghambat pembentukan tabung vaskular memberikan dugaan keterkaitan dengan penurunan persentase area dan luas area ekspresi VE-cadherin. Penurunan densitas VE-Cadherin diduga disebabkan hambatan ekspresi VE-Cadherin oleh sel-sel endothel. Tetapi, karena embrio masih dalam tahap awal, VE-Cadherin belum terekspresi secara maksimal. Sehingga perubahan tersebut tidak terlalu besar.

Luas area VEGF lebih luas dibandingkan dengan luas VE-Cadherin. Hal ini diduga disebabkan distribusi VEGF yang meliputi intraseluler hingga ekstra seluler, sedangkan ekspresi VE-Cadherin hanya terbatas pada permukaan sel. Selain itu, VEGF juga terlebih dahulu terekspresi bila dibandingkan dengan VE-Cadherin.

Sirkulasi *Yolk sac*

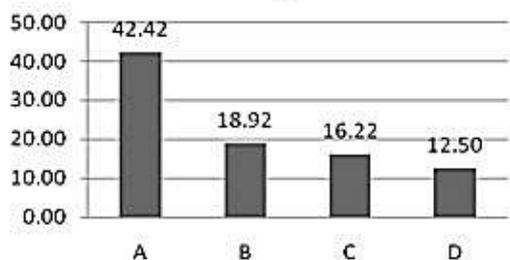
Pengamatan proses vaskulo-angiogenesis ekstraembrional, diwakili dengan adanya *blood island* atau sirkulasi *yolk sac* pada telur ayam. *Blood island* atau sirkulasi *yolk sac* menunjukkan bahwa embrio mampu bertahan hidup, dan telah terjadi proses vaskulo-angiogenesis pada embrio. Dalam penelitian ini terdapat penurunan sirkulasi *yolk sac* yang bermakna ($p= 0,01$) dengan paparan EGCG selama 48 jam (Gambar 4 dan 5)



Gambar 4. Penentuan *Yolk sac Circulation*, *Blood island*, dan kematian embrio

Keterangan:

- a :Embrio dengan *Yolk sac Circulation*
- b :Embrio dengan *blood island*
- c :Embrio yang gagal tumbuh, tanpa *blood island* maupun *Yolk sac Circulation*. Embrio diasumsikan mati



Gambar 5. Grafik hasil pengamatan keberadaan sirkulasi pada *yolk sac* embrio 48 jam

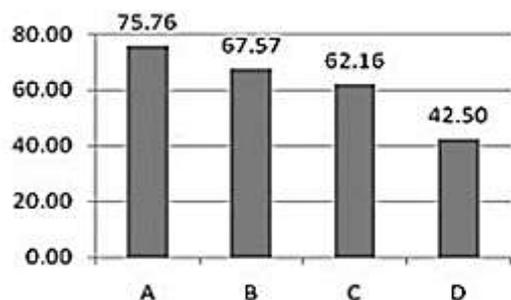
Keterangan :

- a : Kelompok telur yang hanya diinjeksi PBS.
- b : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 12,5mg^l⁻¹
- c : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 25 mg^l⁻¹
- d : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 50 mg^l⁻¹

Kelangsungan hidup (*Survival rate*) embrio

Embrio dianggap hidup jika pada saat telur dibuka, nampak ada *blood island* atau pembuluh darah pada blastodisk. Jika tidak terdapat *blood island* maka embrio tersebut sudah mati atau gagal tumbuh.

Pada kelompok A, sebanyak 75,76% embrio menunjukkan tanda-tanda kehidupan dalam batas normal. Sedangkan pada kelompok perlakuan, nilai *survival rate* menurun sesuai dengan peningkatan dosis perlakuan (Gambar 6). Berdasarkan hasil perlakuan yang ditampilkan pada Gambar 6, diketahui terdapat penurunan *survival rate* yang signifikan ($p = 0,024$).



Gambar 6. Grafik *Survival rate* embrio 48 jam

Keterangan

- a : Kelompok telur yang hanya diinjeksi PBS
- b : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 12,5mg^l⁻¹
- c : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 25 mg^l⁻¹
- d : Kelompok telur yang diinjeksi EGCG 50 mg^l⁻¹

Vaskulo-angiogenesis merupakan hal penting dalam *survival* embrio, karena tanpa *supply* darah yang memadai, maka kebutuhan nutrisi dan oksigenasi sel akan terhenti, dan mengakibatkan kematian sel. Hal ini dapat menjelaskan hasil penelitian oleh Wang pada tahun 2007 bahwa paparan EGCG menyebabkan retardasi caudal pada embrio tikus [17]. Selain

itu, penurunan *survival* dari embrio dalam penelitian ini diduga juga terkait dengan hambatan angiogenesis, di mana telah diketahui bahwa angiogenesis dapat dihambat oleh EGCG secara *in vitro* dan *in vivo* [13,14]. Paparan EGCG yang mengakibatkan gangguan angiogenesis akan menyebabkan gangguan *supply* pembuluh darah ke jaringan perifer, sehingga berujung pada kegagalan tumbuh hingga kematian jaringan. Hal inilah yang kemungkinan mengakibatkan terjadinya retardasi kaudal pada penelitian Wang tersebut. Untuk memastikan hal tersebut, tentunya diperlukan penelitian lebih lanjut.

Dalam penelitian ini, *survival* embrio nampak menurun dengan peningkatan dosis perlakuan EGCG. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh banyak faktor. Faktor internal diakibatkan kondisi embrio pada awal-awal kehidupan merupakan masa yang rentan terhadap pengaruh luar. Embrio ayam hingga usia 48 jam, serupa dengan embrio masa preimplantasi pada mamalia (tikus dan manusia). Embrio masa preimplantasi sangat rentan terhadap pengaruh dari luar. Faktor eksternal yang berperan dalam penelitian adalah EGCG, yang diduga mempengaruhi banyak faktor internal, yang mengakibatkan penurunan *survival* embrio. Beberapa faktor *survival* dalam preimplantasi dipengaruhi oleh paparan EGCG. Faktor tersebut antara lain glukosa, faktor antiapoptosis, dan angiogenesis.

Penggunaan glukosa sangat penting dalam fase preimplantasi. Penurunan transpor glukosa meski tidak serta merta menyebabkan kematian, diduga dapat memicu proses apoptosis. Transpor glukosa banyak dimediasi oleh jalur PI-3K. PI-3K adalah jalur yang merupakan target kerja dari EGCG. Hal ini dapat mengakibatkan gangguan jalur signaling PI-3K, yang mengakibatkan gangguan transpor dan utilisasi glukosa, sehingga dapat memicu proses apoptosis. Selain itu, dilaporkan bahwa *30-phosphorylated PtdIns* yang dihasilkan PI3 kinase berperan dalam *cell survival* serta memediasi ligan tropic dalam embrio fase preimplantasi pada mamalia [31]. Dalam penelitian yang lain dilaporkan bahwa hambatan PI3K dan selanjutnya dapat menghambat sel HUVEC dalam bermigrasi dan *tube formation*[32].

Faktor *survival* lain yang dapat dipengaruhi EGCG adalah Bcl-2 [33]. Bcl-2 diketahui berfungsi sebagai faktor anti apoptosis [34]. Dalam hal ini adalah antiapoptosis terhadap sel-sel angioblast. Apoptosis akibat hambatan Bcl-2 mengakibatkan kegagalan pembentukan pembuluh darah dari sel-sel angioblast.

Efek EGCG terhadap kemungkinan terjadinya apoptosis sel-sel pada embrio dalam penelitian ini, sejalan dengan penelitian Wang pada tahun 2007. Wang menunjukkan paparan EGCG mengakibatkan kematian sel-sel embrio tikus akibat apoptosis [17].

Kajian Metode

Hasil analisa statistik dalam penelitian ini seringkali memberikan 'P' yang tidak signifikan atau tidak bermakna ($P > 0,05$). Nilai P yang tidak bermakna tersebut diduga karena sampel yang digunakan terlalu sedikit. Semakin banyak sampel, maka nilai P semakin kecil. Oleh karena itu, hasil dapat dibandingkan dengan *Cohen's d-type effect size* [35].

Rumus *Cohen's d type effect size* [36] :

Rerata Kelompok Kontrol – Rerata Kelompok Perlakuan
Standar Deviasi Kelompok Kontrol

Interpretasi *Cohen's d type effect size* :

0,2 – 0,5 : kecil
0,5 – 0,8 : sedang
> 0,8 : luas

Berdasarkan perhitungan *Cohen's d-type effect size*, beberapa hasil menjadi cukup signifikan, karena memiliki hasil effect size > 0,5 (data tidak ditampilkan). Tetapi, perhitungan *effect size* ini tidak dapat diterapkan pada data nominal seperti pada data *survival rate* dan sirkulasi *yolk sac*.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Paparan EGCG pada embrio ayam menyebabkan hambatan vaskulo-angiogenesis melalui penekanan ekspresi VEGF dan VE-Cadherin yang berakibat sirkulasi darah pada *yolk sac* berkurang. Hal tersebut mengakibatkan penurunan daya hidup (*survival*) serta menghambat pertumbuhan embrio ayam.

Saran

Immunohistokimia dengan analisis bersifat semikuantitatif dipergunakan dalam penelitian ini. Meskipun metode ini secara ilmiah dapat dipertanggungjawabkan, tetapi sebaiknya dilakukan penelitian lanjutan dengan metode kualitatif, misalnya ELISA.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sadler, TW. 1995. Langman's Medical Embriology. 7th edition. William & Wilkins. Baltimore.
2. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. 2005. Transforming Growth Factor- β Signal

- Transduction in Angiogenesis and Vascular Disorders. *Chest*. 128. 585S-590S
3. Ferguson J., Kelley RW, Patterson C. 2005. Mechanisms of Endothelial Differentiation in Embryonic Vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25. 2246-2254.
4. Hiratsuka S, Kataoka Y, Nakao K, et al. 2005. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) Is Involved in Guidance of VEGF Receptor-Positive Cells to the Anterior Portion of Early Embrios. *Molecular and Cellular Biology*. 25. 1: 355-363.
5. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. 2000. Regulation of Angiogenesis via Vascular endothelial growth factor Receptor. *Cancer Research*. 60. 203-212
6. Abbas AK, Lichtman AH. 2003. Cellular and Molecular Immunology. 6th edition. Elsevier Science. Philadelphia.
7. Felmeden DC, Blann AD, Lip GYH. 2003. Angiogenesis : Basic Pathophysiology and Implications for Disease. *European Heart Journal*. 24. 586-603.
8. Flamme I, Risau W. 1992. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 116: 435-439,
9. Yoshiyama Y, Sugiyama T, Kanke M. 2005. Experimental Diabetes Model in Chick Embrios Treated with Streptozotocin. *Biol. Pharm. Bull*. 28. 10: 1986-1988.
10. Folkman J, Shing Y. 1992. Angiogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 16: 10931-10934,1392.
11. Fassina G, Roberta Vene` R, Morini M, et al. 2004. Mechanisms of Inhibition of Tumor Angiogenesis and Vascular Tumor Growth by Epigallocatechin-3-Gallate. *Clinical Cancer Research*. 10:4865-4873
12. Jung YD, Ellis LM. 2001. Inhibition of Tumour Invasion and Angiogenesis by epigallocatechin gallate (EGCG), a Major Component of Green Tea. *Int J. Exp. Path*. 82:309-316.
13. Rodriguez S.K., et al. 2006. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int J Cancer*. 118 7:1635-1644
14. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, et al. 2001. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med*. 30. 2: 95A02.
15. Zhu BH, Zhan WH, Li ZR, et al. 2007. Epigallocatechin-3-gallate inhibits growth of

- gastric cancer by reducing VEGF production and angiogenesis. *World Journal of Gastroenterology*. 13. 8: 1162-1169.
16. Spinella F, Rosanò L, Di Castro V, et al. Green Tea Polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the endothelia axis and downstream signaling pathways in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2006; 5(6):1483-1492
 17. Wang CC, Chu KO, Chong WS, et al. 2007. Tea epigallocatechin-3-gallate increases 8-isoprostane level and induces caudal regression in developing rat embryos. *Free Radical Biology & Medicine*. 43:519-527
 18. Hamburger V, Hamilton L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*. 88:49-92.
 19. Drake VJ, Koprowski S, Lough JW, Smith SM. 2006. Gastrulating Chick Embryo as a Model for Evaluating Teratogenicity: A Comparison of Three Approache. *Birth Defects Research (Part A)*. 66–71
 20. Mason I. 1999. Chick Embrios, Incubation and Isolation. In Sharpe PT, Mason I (eds). *Molecular Embrology, Methods and Protocols*. Humana Press. New Jersey:
 21. Desmond ME, Haas PA. 2000. Experimental Manipulation and Morphometric Analysis of Neural Tube Development. In Tuan RS, Lo CW, (eds). *Developmental Biology Protocols Volume II*. Humana Press. New Jersey
 22. Howard V, Reed MG. 1998. Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy. Bios Scientific.
 23. Dahlan MS. 2004. Statistika untuk Kedokteran dan Kesehatan. Cetakan 1. PT. Arkans. Jakarta
 24. Bohnsac BL, Hirchi KK. 2004. Red Light, Green Light: Signals that Control Endothelial Cell Proliferation During Embrionic Vascular Development. *Cell Cycle*. 3. 12: 1506-1511.
 25. Kubo H. and Alitalo K. 2003. The Bloody Fate of Endothelial Stem cells. *Genes & Dev*. 17:322-329
 26. Dimmeler S, Zeiher A. 2000. Endothelial Cell Apoptosis in Angiogenesis and Vessel Regression. *Circ Res*. 87 :434-439.
 27. Zhang QZ, Tang XD, Lu QY, Zhang ZF, Rao JY, Le AD. 2006. Green tea extract and (–)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1A protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*. 5.5:1227–38.
 28. Lamy S, Gingras D, B'liveau R. 2002. Green Tea Catechins Inhibit Vascular endothelial growth factor Receptor Phosphorylation. *Cancer Research*. 62:381-385.
 29. Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, et al. 2007. (–)-Epigallocatechin-3-gallate interferes with mast cell adhesiveness, migration and its potential to recruit monocytes. *Cell. Mol. Life Sci*. 64: 2690 – 2701
 30. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. 2001. Angiogenesis: regulators and clinical applications, *Biochemical Pharmacology*. 61 : 253-270
 31. Riley JK, Moley KH. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*. 2006; 131 823–835
 32. Shankar S, Chen QH, Srivastava RK. 2008. Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to hrough activation of FOXO transcription enhance antiangiogenic effects of EGCG tfactor. *Journal of Molecular Signaling*. 3:7: 1-11
 33. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Res*. 2006; 66(5): 2500-2505
 34. Hardy K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction*. 4. 125–134
 35. Kain ZN, MaClaren J. Less Than .05: What Does It Really Mean? *Pediatrics*. 2007. 119. 608-610
 36. Feys H, De Weerd W, Verbeke G. 2004. Early and repetitive stimulation of the arm can substantially improve the long-term outcome after stroke: a 5-year follow-up study of a randomized trial. *Stroke*. 35. 4:924-9

Peranan Curcumin terhadap Proliferasi, Apoptosis dan Diferensiasi Hepatosit Mice Balb/C yang Dipapar dengan Benzapyrene

Candra Rini^{1*}, Edi Widjajanto², Rm.Loekito³

¹Program Studi Biomedik Pasca Sarjana Universitas Brawijaya

²Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Laboratorium Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Pengobatan neoplasma hepar belum memuaskan. Kini sedang dikembangkan pengobatan baru yang berasal dari alam, diantaranya curcumin (bahan aktif spesies *Curcuma*), yang dinyatakan mempunyai aktifitas anti kanker, dan penelitiannya masih dikembangkan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh anti-karsinogenesis curcumin pada proliferasi, apoptosis dan differensiasi hepatosit pada mencit yang dipapar dengan bahan karsinogen *benzapyrene*. Penelitian ini menggunakan 20 ekor mencit jantan (*Mus musculus Outbred BABL/c*) usia 5 minggu, dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok normal, kelompok yang diinjeksi *corn oil* 3,2 ml tiap kgBB (i.p), kelompok dengan *benzapyrene* 16 mg tiap kgBB dalam *corn oil* secara intraperitoneal (i.p), dan kelompok yang diinjeksi *benzapyrene* dalam *corn oil* secara i.p dan diberi 0,2% curcumin dalam pakannya. Hari ke-120 mencit dikorbankan, organ hepar diperiksa secara histopatologis. Pemeriksaan proliferasi diukur dengan satuan indeks *Cyclin-PCNA* secara immunohistokimia. Apoptosis diukur dengan satuan indeks apoptosis, diferensiasi diperiksa dengan mengukur N/C ratio hepatosit, menggunakan pengecatan hematoxillin-eosin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian 0,2% curcumin dalam pakan mencit yang dipapar *benzapyrene* menurunkan indeks *Cyclin-PCNA* ($P<0,05$), meningkatkan indeks apoptosis ($P<0,01$) dan menurunkan N/C ratio hepatosit ($P<0,01$) dibandingkan dengan mencit yang dipapar *benzapyrene* tanpa diberi curcumin. Kesimpulan penelitian ini bahwa pemberian curcumin selama periode inisiasi dan post-inisiasi terbukti memberikan efek anti kanker, ditandai dengan penurunan proliferasi, peningkatan apoptosis, dan perbaikan pola diferensiasi sel.

Kata kunci: apoptosis, *benzapyrene*, curcumin, hepatosit

PENDAHULUAN

Neoplasma (tumor) terutama yang bersifat ganas (kanker), diketahui masih mempunyai mortalitas yang tinggi, dan pengobatannya saat ini belum memuaskan. Mortalitas karena kanker di Indonesia menduduki urutan ke-6. WHO memperkirakan kejadian kanker adalah 180 per 100.000 penduduk [1]. *Hepatocellular Cell Carcinoma* (HCC) adalah salah satu dari neoplasma organ dalam yang paling umum terdapat pada manusia [2,3].

Frekuensi kanker cenderung meningkat, disebabkan oleh perbaikan derajat kesehatan dan umur rata-rata harapan hidup yang meningkat sehingga makin banyak orang yang dapat mencapai usia yang lebih tua dan mudah terkena kanker (*cancerous age*), adanya peningkatan taraf pengetahuan tentang kebersihan sehingga kedudukan penyakit infeksi yang sebelumnya merupakan penyakit utama di Indonesia menjadi

bergeser digantikan oleh penyakit kanker. Selain itu, peningkatan polutan, meningkatkan paparan bahan karsinogenik sehingga dapat menambah frekuensi kanker [1].

Seiring dengan perkembangan industri di Indonesia mengakibatkan tingkat pencemaran lingkungan semakin meningkat. Salah satu bahan toksik yang dihasilkan akibat proses industri tersebut diantaranya *benzapyrene* (BaP). *Benzapyrene* merupakan suatu bahan karsinogen, yang mengandung inisiator maupun promoter, tetapi BaP lebih aktif sebagai inisiator tumor [4].

Salah satu organ yang penting untuk detoksifikasi bahan bersifat toksik yang masuk dalam tubuh akibat pencemaran lingkungan tersebut adalah hepar. Hepar memiliki fungsi vital dalam detoksifikasi bahan toksik. Hal ini menyebabkan hepar menjadi sering terpapar dengan zat-zat toksik yang mengakibatkan kerusakan sel hepar. Kerusakan sel hepar dapat berakibat proliferasi sel yang berlebihan, sehingga terjadi tumor atau kanker hepar.

Perkembangan tumor dipengaruhi oleh keseimbangan antara proliferasi, apoptosis dan

* Alamat korespondensi penulis:

Candra Rini Hp.

E-mail : candra_rini@gmail.com

Alamat : Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65154

differentiasi [5]. Hal ini dapat dinilai dengan parameter biologis perkembangan tumor, antara lain melalui penilaian pada perubahan proliferasi, apoptosis, dan diferensiasi. Peningkatan proliferasi menunjukkan terjadinya peningkatan keganasan tumor. Penurunan apoptosis menunjukkan adanya kegagalan lokal dalam mekanisme melawan perkembangan kanker dan menunjukkan terjadinya peningkatan metastase [6]. Sedangkan perubahan diferensiasi sel ke arah pola yang tidak normal menunjukkan perubahan sel ke arah keganasan [7]. Berdasarkan hal tersebut parameter-parameter biologis tersebut dapat dinilai dengan cara mengukur frekuensi mitosis, frekuensi apoptosis, dan perubahan pola diferensiasi sel.

Saat ini sedang dikembangkan berbagai pengobatan baru yang diambil dari alam. Salah satunya adalah pengembangan berbagai penelitian mengenai khasiat dari spesies *Curcuma* (sebangsa kunyit). Tumbuhan golongan ini juga dikenal bermanfaat dalam pengobatan tradisional terhadap berbagai penyakit pada hepar. Penelitian terbaru diketahui bahwa bahan aktif dari berbagai spesies *Curcuma* tersebut adalah curcumin. Curcumin (*diferuloylmethane*) adalah pigmen kuning yang banyak didapatkan dari isolasi spesies *Curcuma*, Zingiberaceae [8]. Curcumin berupa senyawa *polyphenolic* dengan *β -diketone moiety* [9]. Curcumin disebutkan mempunyai aktifitas sebagai anti kanker, dan hingga kini penelitian mengenai hal ini masih dikembangkan [3, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16].

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek pemberian curcumin terhadap perkembangan tumor yang diinduksi dengan *benzopyrene*, untuk mengetahui pengaruh pemberian curcumin pada perubahan frekuensi proliferasi (indeks proliferasi), frekuensi apoptosis (indeks apoptosis) dan perubahan pola differensiasi (N/C ratio) sel hepar pada perkembangan tumor hepar.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dengan metode *post test only design*, pada hewan coba mencit *BALB/c* jantan, yang dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Biomedik, Fakultas Kedokteran, serta di Laboratorium Biologi Molekuler, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang.

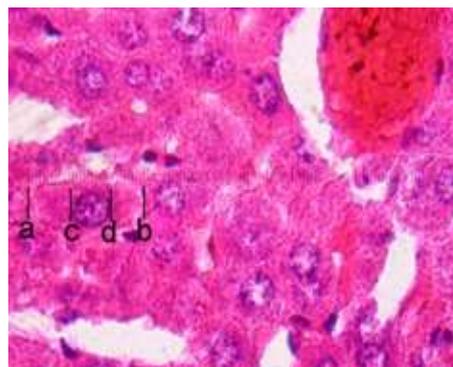
Hewan Coba

Penelitian menggunakan 20 ekor mencit (*Mus musculus Outbred BALB/c*) jantan dari Pusvetma

Waru-Surabaya, dengan usia 5 minggu, yang terbagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok normal (kelompok 1), kelompok yang diberi injeksi *corn oil* (i.p) 3,2 ml tiap kgBB, tanpa BaP, tidak diberi curcumin dalam pakannya (kelompok 2), kelompok yang diberi injeksi BaP 16 mg tiap kgBB dalam pelarut *corn oil* 3,2 ml tiap kgBB (i.p), tidak diberi curcumin (kelompok 3), kelompok yang diberi injeksi BaP 16 mg tiap kgBB dalam pelarut *corn oil* 3,2 ml tiap kgBB (i.p), diberi 0,2% curcumin dalam pakannya (kelompok 4)

Injeksi BaP dan Corn Oil

Injeksi dimulai pada minggu pertama (minggu ke-2, setelah aklimatisasi 1 minggu), dilakukan tiap minggu hingga minggu ke-12. Untuk kelompok 3 dan 4, dosis injeksi BaP adalah 16 mg tiap kgBB. Injeksi BaP dilakukan dalam pelarut *corn oil* sebanyak $\frac{1}{3}$ dari angka yang didapatkan untuk dosis BaP (dalam ml) atau sama dengan 3,2 ml tiap kgBB. Cara perhitungan dosis *corn oil* ini diterapkan pula untuk kelompok 2 (Gambar 1).



Gambar 1. Diameter nukleus (N) diukur dari garis c ke garis d. Diameter sitoplasma (C) diukur dari garis a ke garis b. Diukur dengan mikrometer pada perbesaran 1000x.

Pemberian Curcumin

Khusus untuk kelompok 4, curcumin diberikan sejak hari pertama perlakuan, sejumlah 0,2% dari berat total seluruh makanan dan perlakuan lainnya sesuai dengan pembagian perlakuan.

Pembuatan Sediaan (del) untuk Pemeriksaan Patologi Anatomi

Pada hari ke 120, mencit dimatikan, kemudian diambil heparnya, lalu masing-masing dibuat dua slide, yang pertama dilakukan pengecatan immunohistokimia untuk mewarnai *Cyclin-PCNA* sel, slide kedua diberi pewarnaan hematoxillin eosin untuk pemeriksaan apoptosis dan diferensiasi.

Pemeriksaan Proliferasi

Pemeriksaan proliferasi dilakukan dengan menghitung indeks *Cyclin-PCNA*, yaitu jumlah sel hepar yang mengekspresikan *Cyclin-PCNA* per 500 sel pada lapang pandang yang diambil secara acak pada perbesaran 400 kali [13]. PCNA (*Cyclin-PCNA*) adalah suatu protein inti dengan BM 36 kDa yang diekspresikan secara spesifik oleh semua sel yang sedang berproliferasi, yaitu pada fase G1 akhir dan fase S dalam siklus sel Pembuatan Slide Untuk Pemeriksaan Patologi Anatomi

Hari ke-120, mencit dimatikan kemudian diambil organ heparnya, lalu masing-masing dibuat dua slide, yang pertama dilakukan pengecatan immunohistokimia untuk mewarnai *Cyclin-PCNA* sel, slide kedua diberi pewarnaan hematoxillin eosin untuk pemeriksaan apoptosis dan diferensiasi.

Pemeriksaan Apoptosis

Pemeriksaan apoptosis dilakukan dengan menghitung indeks apoptosis, yaitu jumlah sel yang mengalami apoptosis per 500 sel hepar pada lapang pandang yang diambil secara acak, dan dilihat dengan mikroskop cahaya pada perbesaran 400 kali [13]. Menurut Sel apoptosis diidentifikasi dengan pengecatan HE, sebagai sel hepar yang menunjukkan *shrinkage cell*, *nuclear condensation*, dan *apoptotic bodies formed* [6, 13, 17].

Pemeriksaan diferensiasi sel

Pemeriksaan diferensiasi dilakukan dengan menghitung *nucleus/citoplasma ratio* (N/C ratio) dari 10-30 hepatosit. Diameter nukleus dan sitoplasma yang diukur adalah diameter yang terbesar dari sel tersebut, yang diukur dengan mikrometer dan dilihat dengan menggunakan mikroskop cahaya pada perbesaran 1000 kali [1].

Analisa Statistik

Data dianalisa dengan menggunakan metode ANOVA One-way. Perbedaan dinyatakan signifikan bila $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan data hasil penelitian ini membuktikan bahwa curcumin yang diberikan pada periode inisiasi dan akhir inisiasi mampu menghambat karsinogenesis yang terjadi pada sel hepar mencit akibat paparan *benzapyrene*. Hal tersebut tampak dari adanya hambatan proliferasi yang berupa penurunan indeks PCNA (Tabel 1. dan Gambar 2.).

Peningkatan apoptosis ditunjukkan dengan adanya peningkatan indeks apoptosis (Tabel 2. dan Gambar 3.) dan perbaikan pola diferensiasi

sel yang ditandai dengan penurunan N/C ratio ke arah normal (Tabel 3. dan Gambar 4.) pada kelompok mencit yang diinduksi *benzapyrene* dengan ditambah pemberian 0,2% curcumin dalam pakan (kelompok 4), dibanding dengan kelompok mencit dengan induksi *benzapyrene* tanpa tambahan curcumin dalam pakan (kelompok 3).

Tabel 1. Indeks *Cyclin-PCNA* dari hepatosit 4 kelompok hewan coba

Kelompok	Indeks PCNA
1 (normal)	25,9340 ± 1,84451
2 (+corn oil)	32,1080 ± 6,82102 ^a
3 (+corn oil,+BaP)	50,5460 ± 7,38648 ^b
4 (+corn oil, + BaP,+curcumin)	38,626 ± 6,84331 ^c

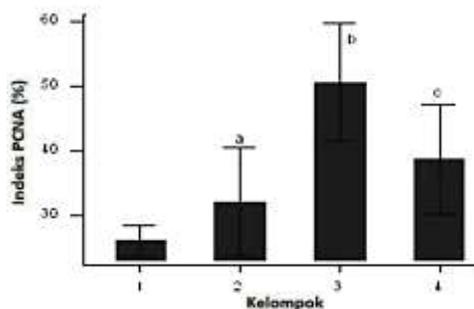
keterangan:

Data adalah rata-rata ± SD

^a : tidak berbeda bermakna dengan kelompok 1 ($p > 0,05$)

^b : berbeda bermakna dengan kelompok 2 ($p < 0,01$)

^c : berbeda bermakna dengan kelompok 3 ($p < 0,05$) ; berbeda bermakna dengan kelompok 1 ($p < 0,05$); tidak berbeda bermakna dengan kelompok 2 ($p > 0,05$)



Gambar 2. Indeks *Cyclin-PCNA* dari hepatosit ke 4 kelompok hewan coba. Curcumin menurunkan indeks proliferasi hepatosit pada hewan coba yang dipapar dengan BaP

Tabel 2. Indeks apoptosis dari hepatosit ke-4 kelompok hewan coba

Kelompok	Indeks Apoptosis
1 (normal)	12,2660 ± 0,84539
2 (+corn oil)	13,7840 ± 2,23866 ^a
3 (+corn oil,+BaP)	8,1600 ± 1,58584 ^b
4 (+corn oil, + BaP,+curcumin)	21,0400 ± 3,25129 ^c

keterangan:

Data adalah rata-rata ± SD

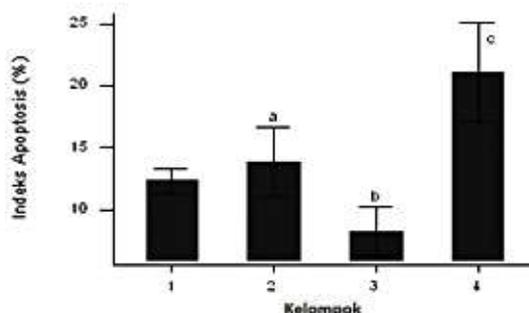
^a : tidak berbeda bermakna dengan kelompok 1 ($p > 0,05$)

^b : berbeda bermakna dengan kelompok 2 ($p < 0,01$)

^c : berbeda bermakna dengan kelompok 3 ($p < 0,05$) ; berbeda bermakna dengan kelompok 1 ($p < 0,05$); tidak berbeda bermakna dengan kelompok 2 ($p > 0,05$)

Kesetimbangan antara proliferasi, apoptosis, dan pola diferensiasi sel adalah tiga hal penting yang mempengaruhi pertumbuhan dari suatu

tumor [19]. Hasil penelitian ini menambah bukti adanya potensi curcumin dalam pencegahan terjadinya neoplasma khususnya pada organ hepar, dan juga memberikan salah satu dasar ilmiah bagi pengobatan tradisional yang menggunakan tumbuhan species *Curcuma* (kunyit, curcumin adalah bahan aktif di dalamnya) untuk terapi neoplasma hepar.



Gambar 3. Indeks apoptosis dari hepatosit ke-4 kelompok hewan coba. Curcumin meningkatkan indeks apoptosis hepatosit pada hewan coba yang dipapar dengan BaP

Hasil perhitungan N/C ratio hepatosit dari 4 kelompok mencit adalah sebagai berikut :

Tabel 3. N/C Ratio dari hepatosit ke-4 kelompok hewan coba

Kelompok	N/C ratio
1 (normal)	0,3540 ± 0,01817
2 (+corn oil)	0,3560 ± 0,02074 ^a
3 (+corn oil, +BaP)	0,6080 ± 0,02864 ^b
4 (+corn oil, + BaP, +curcumin)	0,5180 ± 0,02049 ^c

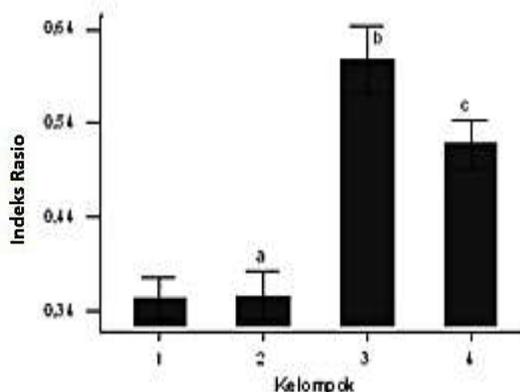
keterangan:

Data adalah rata-rata ± SD

^a : tidak berbeda bermakna dengan kelompok 1 (p > 0,05)

^b : berbeda bermakna dengan kelompok 2 (p < 0,01)

^c : berbeda bermakna dengan kelompok 3 (p < 0,05) ; berbeda bermakna dengan kelompok 1 (p < 0,05); tidak berbeda bermakna dengan kelompok 2 (p > 0,05)



Gambar 4. N/C Ratio dari hepatosit ke-4 kelompok hewan coba. Curcumin menurunkan N/C ratio hepatosit pada hewan coba yang dipapar dengan BaP.

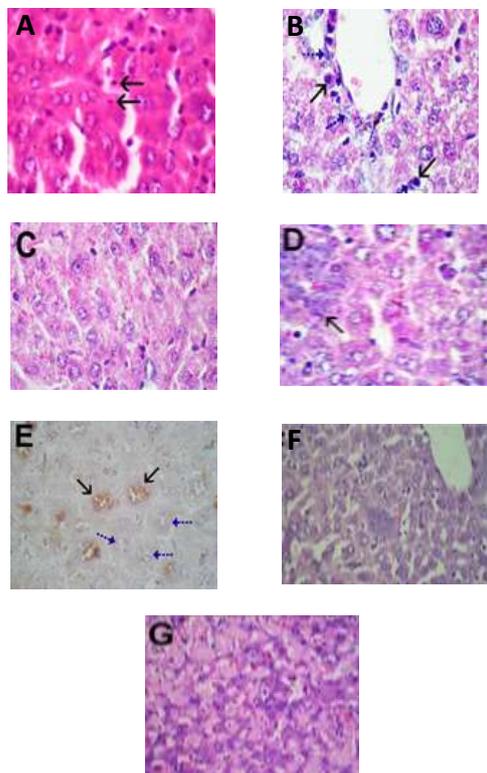
Hasil Proliferasi Sel

Pengukuran proliferasi pada penelitian ini menggunakan indeks PCNA, berdasarkan hasil perhitungan tersebut diketahui bahwa curcumin 0,2% dalam pakan secara efektif dapat menghambat peningkatan indeks proliferasi pada mencit yang dipapar dengan *benzopyrene*. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Chuang *et. al.*, (2000) [3]. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa pemberian curcumin juga dapat mengembalikan kadar PCNA menuju ke arah normal. Hasil penelitian ini dan penelitian oleh Chuang *et. al.*, (2000), diketahui bahwa curcumin sama-sama menurunkan kadar PCNA, walaupun metode yang digunakan berbeda, pada penelitian ini pemeriksaan PCNA dilakukan dengan immunohistokimia, sedang penelitian Chuang *et. al.*, (2000) menggunakan metode *Western blotting*. Persamaan hasil ini memperkuat bukti adanya kemampuan curcumin dalam mempengaruhi protein khusus PCNA pada proses karsinogenesis yang terjadi pada mencit, bahkan meskipun proses karsinogenesisnya diinduksi dengan bahan karsinogen yang berbeda. Pada penelitian ini menggunakan *benzopyrene* sedangkan penelitian Chuang *et. al.*, (2000) menggunakan *diethylnitrosamine*/DEN [3]. Aksi *benzopyrene* dalam menimbulkan karsinogenesis yaitu melalui mutasi yang terjadi akibat guanin terbaca sebagai timin (transversi). Hal ini sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh King (2000) [5]. Tetapi, menurut Halliwell *et al.* (1998), mutasi pada BaP bukan hanya karena ikatan kovalen antara *ultimate carcinogen* dengan guanin, tapi juga akibat terbentuknya O₂⁻ radikal karena oksidasi metabolit BaP [18].

Hasil Apoptosis Sel

Pengaruh curcumin pada apoptosis sel dalam penelitian ini sesuai pula dengan hipotesis, yaitu pemberian curcumin 0,2% dalam pakan menyebabkan peningkatan sel apoptosis pada mencit yang dipapar dengan *benzopyrene*. Hasil ini konsisten dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Mahmoud *et. al* (2000) [11] dan Kawamori *et al.* (1999) [13] meskipun sel yang diamati berbeda. Persamaan hasil ini menunjukkan bahwa walaupun jenis sel yang diteliti berbeda, tetapi kemampuan curcumin dapat meningkatkan apoptosis adalah sama. Persamaan hasil dengan penelitian Kawamori *et al.*, (1999) [13] semakin menguatkan bukti bahwa curcumin mungkin bekerja dengan cara yang sama sebagai anti kanker. Hal ini ditunjukkan dengan adanya

peningkatan sel apoptosis pada mencit yang diinjeksi dengan *benzapyrene*, dan hal ini dapat dilihat dengan pemeriksaan yang lebih sederhana dengan pengecatan HE (Gambar 5.).



Gambar 5. Histopatologi Hepar dengan pewarnaan Hematoxillin-Eosin dan Immunohistokimia (1000x).

Keterangan:

- A : Mencit normal, tampak hepatosit apoptosis yaitu sebagai *councilman bodies*
- B : Mencit dengan injeksi *corn oil* Tampak hepatosit apoptosis, (↑) = sel kupffer/makrofag menandakan adanya proses fagositosis dalam eliminasi sel apoptosis
- C : Mencit dengan injeksi BaP
- D : Mencit dengan injeksi BaP dan diberi curcumin. Tampak kumpulan sel kupffer, (↑) = menunjukkan adanya peningkatan aktifitas fagositik sel kupffer pada pemberian curcumin
- E : Mencit dengan injeksi *corn oil* (immunohistokimia). Tampak inti sel yang tercat positif dengan pengecatan immunohistokimia terhadap PCNA (↑), dan tampak pula inti sel yang tercat negatif (↓)
- F : Mencit dengan injeksi BaP dan diberi curcumin (Hematoxillin-eosin,400x). Tampak ruang-ruang kosong akibat apoptosis yang meningkat.
- G :Mencit dengan injeksi BaP dan diberi curcumin (Hematoxillin-eosin,400x). Tampak ruang-ruang kosong akibat apoptosis yang meningkat.

Dalam penelitian ini, pemberian curcumin 0,2% pada mencit jantan yang dipapar

benzapyrene menyebabkan peningkatan indeks apoptosis yang sangat tinggi, bahkan melampaui indeks apoptosis mencit normal ($P < 0,01$). Walaupun terdapat peningkatan indeks proliferasi juga, tetapi tampaknya proliferasi tersebut kurang mengimbangi peningkatan apoptosis, sehingga tampak banyak ruang kosong diantara sel-sel hepatosit (Gambar 5). Hal ini karena dosis curcumin yang diberikan dalam penelitian ini (0,2% dari total pakan) termasuk dosis tinggi, sesuai dengan penelitian Banjerdpongchai *et al.* (2002), pada penelitian tersebut pengaruh curcumin pada apoptosis tampak bergantung pada dosis yang diberikan. Penelitian tersebut menyatakan bahwa curcumin pada dosis rendah (0,27nM-0,27μM) dapat mencegah apoptosis sel HL60, sedangkan pada dosis yang lebih tinggi (2,71-27,15μM), curcumin bekerja secara sinergis dengan doxorubicin, menyebabkan apoptosis sel HL60 [19]. Hal ini sesuai dengan Banjerdpongchai *et al.*, (2002) [19] dan Leu *et al.*, (2002) [9] bahwa curcumin menunjukkan efek antioksidan maupun prooksidan, pada dosis rendah curcumin berperan dalam *scavenger* radikal bebas dan donasi elektron atau hidrogen, dan hal ini yang menyebabkan adanya efek protektif curcumin. Sedangkan efek prooksidan curcumin dapat terjadi karena adanya ion Cu(II), dengan adanya ion tersebut, curcumin dapat menyebabkan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) khususnya *hydroxyl radical*. Hal ini dapat terjadi karena struktur curcumin mengandung *diferuloylmethane* sebagai komposisi mayor dan beberapa derivat minor misalnya *monomethoxy-curcumin*, *demethoxy-curcumin*, dan *bisdemethoxycurcumin*. Semua derivat tersebut mempunyai perlengkapan yang berbeda-beda sebagai aktifitas prooksidan dan antioksidan. Pada penelitian ini, ROS yang dihasilkan akibat pemberian 0,2% curcumin sangat tinggi, sehingga terjadi peningkatan apoptosis yang berlebihan dan mengakibatkan ruang-ruang kosong yang tidak diisi oleh sel hepar.

Hasil Pola Diferensiasi Sel

Selama ini, penelitian terhadap pengaruh curcumin pada pola diferensiasi sel belum diperhatikan. Secara sederhana, peneliti memeriksa pola diferensiasi sel tersebut dengan cara mengukur *nucleus/citoplasma (N/C) cell ratio*. Hasil penelitian ini sesuai dengan hipotesis, dimana pemberian curcumin dapat memperbaiki pola diferensiasi sel, yang ditandai dengan adanya penurunan N/C ratio yang bermakna

pada hewan coba yang diinduksi *benzopyrene* dengan pemberian 0,2% curcumin dalam makanannya (kelompok 4) dibandingkan dengan hewan coba yang diinduksi *benzopyrene* tanpa pemberian curcumin (kelompok 3). Pada kelompok 3, N/C ratio meningkat mendekati 1, menunjukkan adanya gangguan pola diferensiasi yang mengarah pada keganasan sel.

Cara Kerja Benzopyrene dalam Meningkatkan Proliferasi, Menurunkan Apoptosis dan Mengganggu Pola Diferensiasi Sel

Pada teori yang dikemukakan Halliwell *et al.* (1998) [18] menyatakan bahwa di dalam tubuh, *benzopyrene* diubah menjadi *7,8-diol-9,10-epoxide* (ultimate carcinogene) oleh enzim sitokrom P-450, dan kemudian berikatan dengan guanin pada DNA, sehingga menimbulkan kerusakan pada DNA. Aktifitas peroksidase dari sintesis prostaglandin, *myeloperoxidase*, dan *lactoperoxidase* juga mengubah BaP menjadi *6-hydroxybenzopyrene* yang kemudian teroksidasi sehingga menjadi campuran quinone dengan menghasilkan O_2^- radikal yang kemudian semakin menyebabkan kerusakan DNA. Kerusakan DNA disebabkan ikatan kovalen antara *ultimate carcinogen* atau ROS dengan DNA. Ikatan kovalen tersebut merusak struktur DNA, sehingga replikasi DNA terganggu. Jika kerusakan DNA terjadi pada gen suppressor tumor p53, maka menyebabkan mutan p53, sesuai dengan penelitian sebelumnya mengungkapkan bahwa secara normal bila terdapat kerusakan DNA, p53 normal (*wild type*) akan berperan dalam menghambat proliferasi, dan mendorong terjadinya repair DNA atau apoptosis [5, 17, 20, 21, 22]. Tetapi bila gen p53 mengalami mutasi (mutan p53), hal ini akan menghasilkan kegagalan perbaikan DNA, dan semakin mengakibatkan timbulnya mutasi DNA. Mutasi juga dapat terjadi pada gen yang terlibat dalam regulasi gen p53. Hal ini menyebabkan kegagalan fungsi p53 pula, sesuai dengan teori Chumakov (2000) [23].

Jika mutasi terjadi pada proto-onkogen, seperti yang dinyatakan oleh Sukardja (2000) [1], maka akan menyebabkan perubahan proto-onkogen menjadi onkogen yang selanjutnya mengkode pembuatan peptida yang bersifat pertumbuhan. Selain itu, aktifitas dari beberapa protein sinyal transduksi juga diubah oleh ROS, yaitu *tyrosine phosphatase*, *mitogen-activated protein kinase*, NF- κ B, dan AP-1, dimana efek dari oksidasi oleh ROS tersebut mengakibatkan

peningkatan transkripsi dan bersifat mitogenik, sesuai dengan teori King (2000) [5].

Cara Kerja Curcumin dalam Menghambat Peningkatan Proliferasi dan Memperbaiki Pola Diferensiasi Sel

Aksi kemopreventif curcumin melawan *benzopyrene* yaitu dengan kemampuan aktifitas metabolik, seluler dan molekuler curcumin yang luas. Leu *et al.* (2002) menjelaskan bahwa curcumin bekerja sebagai pengganti karsinogen (dalam penelitian ini adalah BaP) untuk menjadi ligan bagi *Aryl Hydrocarbon Receptor* (AHR), yaitu reseptor bagi enzim detoksifikasi, atau bahkan bekerja menghambat berbagai isoenzim sitokrom P450, sehingga BaP sebagai pro-karsinogen tidak diubah menjadi ultimate karsinogen [9].

Curcumin juga berperan sebagai *scavenger* bagi radikal bebas dan meningkatkan ekspresi *glutathione S-transferase* (GST) hepar, sesuai dengan pendapat beberapa peneliti lain [8, 9, 24]. Hal ini menyebabkan hambatan pada kerusakan DNA akibat radikal bebas yang terbentuk karena oksidasi *6-hydroxybenzopyrene*, salah satu metabolit BaP. Titik kerja curcumin yang lain adalah pada hambatan sintesis DNA dan RNA yang mengakibatkan hambatan proliferasi, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Huang *et al.* (1997) [15].

Beberapa penelitian lain dijelaskan bahwa dalam efek anti proliferaatif, curcumin juga menekan ekspresi c-jun melalui hambatan pada *c-Jun N-Terminal Kinase* (JNK), dan menekan ekspresi c-fos melalui hambatan pada *extracellular signal-regulated protein kinase* (ERK) sehingga mempunyai efek inhibisi pada aktifitas *Activator Protein-1* (AP-1), yang berakibat menghambat aktifitas enzim *Ornithine decarboxylase* (ODC) dan menurunkan kadar mRNA ODC [8,9,16].

Curcumin juga dapat menghambat aktifitas faktor transkripsi NF- κ B, dengan cara menghambat fosforilasi dan degradasi I κ B serta mengganggu aktifasi I κ B kinase (IKK), sesuai dengan teori beberapa peneliti sebelumnya [9,25,26]. Hambatan pada AP-1 dan NF- κ B mengakibatkan inhibisi Galectin-3. Galectin 3 adalah suatu lectin 32 kD yang secara spesifik mengenali struktur galaktosida dari glikan, dan berperan penting pada berbagai proses biologis. Lokasi galectin 3 adalah di dalam nukleus, sitoplasma, pada membran sel dan dalam matriks ekstraselular, dengan menunjukkan fungsi berbeda-beda, termasuk mengubah sifat adesi sel dan mengatur motilitas sel. Galectin-3

menunjukkan sifat anti apoptosis, meningkatkan pertumbuhan, dan meningkatkan kemampuan invasi sel [27]. Teori yang dikemukakan oleh beberapa peneliti hambatan pada AP-1 dan NF- κ B juga menyebabkan inhibisi aktifitas enzim iNOS dan inhibisi transkripsi gen dan aktifitas enzim COX-2 [9,14]. Curcumin juga berperan dalam inhibisi ekspresi *oncoprotein β -catenin*, suatu komponen dari *adherent junction* pada sel epitel intestinal dan berperan penting pada komunikasi interselular dan migrasi sel [11].

Curcumin juga menyebabkan inhibisi pada berbagai protein lain yang terlibat dalam proliferasi, termasuk Protein Kinase C (PKC), PCNA, p21, CDC2, dan *epidermal growth factor receptor* (EGFR) *Tyrosine Kinase* (termasuk p185^{neu}). Hambatan pada Protein Kinase C (PKC) dan protein *tyrosine kinase* menyebabkan hambatan aktivasi transkripsi dari *Early Growth Response Gene Product* (Egr-1) [3,9,12].

Cara Kerja Curcumin dalam Meningkatkan Apoptosis Sel

Curcumin menyebabkan peningkatan apoptosis dengan berbagai cara, antara lain dengan meningkatkan pembentukan *reactive oxygen species* khususnya *hydroxyl radical*, seperti telah dijelaskan sebelumnya [19]. Stres oksidatif akibat ROS yang terbentuk ini kemudian menyebabkan pelepasan sitokrom c dari mitokondria, yang lebih jauh menimbulkan aktivasi pro-caspase 3 dan fragmentasi DNA. Selanjutnya menyebabkan terjadinya kematian sel melalui apoptosis [28].

Selain itu, kemampuan curcumin dalam meningkatkan apoptosis berhubungan dengan efek inhibisi curcumin pada NF- κ B. Inhibisi pada NF- κ B menyebabkan peningkatan apoptosis, karena adanya persamaan agen yang menginduksi (misalnya TNF- α), meskipun hal ini belum pasti kejelasannya. Menurut Dumic *et al.* (2002) [27], mekanisme NF- κ B dalam memblokir apoptosis disebabkan pula oleh adanya hubungan antara NF- κ B dengan galektin-3, protein yang mempunyai sifat anti apoptosis. Jadi adanya hambatan pada NF- κ B akibat pemberian curcumin menyebabkan galektin-3 terhambat, sehingga terjadi peningkatan apoptosis.

Curcumin juga menyebabkan peningkatan apoptosis melalui penurunan bcl-xL, protein yang berfungsi menghambat apoptosis dengan mengikat dan mengasingkan *bax*. Selain itu, curcumin juga dapat menghambat Akt, suatu protein kinase yang menyebabkan ketahanan sel melalui hambatan pada apoptosis, yaitu dengan

cara memfosforilasi *bad* sehingga terjadi pelepasan bcl-2 dan menghambat proses apoptosis. Selain itu, mekanisme curcumin dalam meningkatkan apoptosis adalah melalui penurunan ekspresi IAP. IAP merupakan protein yang dapat menghambat apoptosis melalui fungsinya sebagai inhibitor langsung dari caspase efektor teraktivasi, caspase 3 dan caspase 7, serta sebagai penghambat aktivasi caspase 9 yang diinduksi oleh sitokrom c [28].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian curcumin sebanyak 0,2% dalam pakan selama periode inisiasi dan *post* inisiasi dapat menghambat peningkatan ekspresi PCNA, meningkatkan apoptosis, dan memperbaiki pola diferensiasi hepatosit yang dipapar dengan *benzopyrene* serta curcumin. Curcumin mempunyai kemampuan dalam menghambat karsinogenesis yang terjadi pada hepatosit mencit akibat paparan *benzopyrene*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh curcumin pada fungsi hepar, dan penelitian yang melibatkan berbagai dosis curcumin untuk mendapatkan dosis optimal dalam menghambat karsinogenesis hepatosit. Perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh curcumin terhadap jenis-jenis sel lain atau sel yang berasal dari organ lain dan mekanisme kerja curcumin terhadap tubuh.

DAFTAR PUSTAKA

1. Sukardja, IDE. 2000. Onkologi Klinik edisi 2. Airlangga University Press. Surabaya
2. Grisham, J.W. 1996. Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications of cancer risk assessment. *Carcinogenesis*, 18(1): 59-81
3. Chuang, S.E., Cheng, A.L., Lin, J.K., and Kuo, M.L. 2000. Inhibition by Curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene product and cell-cycle-related protein in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38:991-995
4. Wang, Y., *et al.* 1997. Public Health Goal for Benzo(a)pyrene in Drinking Water. (http://www.oehha.ca.gov/water/phg/pdf/bap_c.pdf). Tanggal akses 17 Desember 2003
5. King, R.J.B. 2000. *Cancer Biology*. Prentice Hall Pearson Education. New York.
6. Lyng, H., *et al.* 2000. Disease Control of Uterine Cervical Cancer: Relationships to Tumor Oxygen Tension, Vascular Density, Cell Density, and Frequency of Mitosis and Apoptosis Measured before Treatment and during radiotherapy. *Clin. Cancer Res*, 6:1104-1112

7. Damjanov, I., et al. 1996. Histopathology. A Color Atlas and Textbook. Williams and Wilkins
8. Lin, J.K., Shiau, S.Y.L. (2001). Mechanisms of Cancer Chemopreventive by Curcumin. *Proc. Natl. Sci. Counc. ROC(B)*, 25:59-66
9. Leu, T.H., et al. 2002. The Molecular Mechanisms for the Antitumorigenic Effect of Curcumin. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agent.* 2:357-370
10. Perkins S, et al. 2002. Chemopreventive Efficacy and Pharmacokinetics of Curcumin in the Min/+ Mouse, a Model of Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11:535-540
11. Mahmoud, NN., et al. 2000. Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis*, 21:921-927
12. Hong, R.L., et al. 1999. Curcumin Inhibits Tyrosine Kinase Activity of p185^{neu} and Also Depletes p185^{neu}. *Clin Cancer Res*, 5:1884-1891
13. Kawamori, T., et al. 1999. Chemopreventive Effect of Curcumin, a Naturally Occurring Anti-Inflammatory Agent, during the Promotion/Progression Stages of Colon Cancer. *Cancer Res*, 59:597-601
14. Zhang, F., et al. 1999. Curcumin inhibits cyclooxygenase-2 transcription in bile acid- and phorbol ester-treated human gastrointestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 20:445-451
15. Huang, M.T., et al. 1997. Inhibitory effects of topical application of low doses of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion and oxidized DNA bases in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 18:83-88
16. Lu, Y.P., et al. 1994. Effect of curcumin on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate- and ultraviolet B light-induced expression of c-Jun and c-Fos in JB6 cells and in mouse epidermis. *Carcinogenesis*, 15:2363-2370
17. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1998. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford University Press
18. Wong, K.M.T., et al. 2002. Lung-Specific Expression of Dominant-Negative Mutant p53 in Transgenic Mice Increases Spontaneous and Benzo[a]pyrene-Induced Lung Cancer. *Am.J.Respir. Cell Mol.Biol*, 26:186-193
19. Banjerdpongchai, R., et al. 2002. Effect of Curcumin on HL60 Cell Apoptosis Induced by Doxorubicin. *Chiang Mai Med Bull.* 41(2):59-66
20. Yoon, J.H., et al. 2001. Methylated CpG Dinucleotides Are the Preferential Targets for G-to-T Transversion Mutations Induced by Benzo[a]pyrene Diol Epoxide in Mammalian Cells: Similarities with the p53 Mutation Spectrum in Smoking-associated Lung Cancer. *Cancer Res*, 61:7110-7117
21. Smith, L.E., et al. 2000. Targeting of Lung Cancer Mutational Hotspots by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J of the National Cancer Institute*, 92:803-811
22. Denissenko, M.F., et al. 1996. Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in p53. *Science (Washington DC)*, 274:430-432
23. Chumakov, P.M. 2000. Function of the p53 Gene: Choice between Life and Death. *Biochemistry (Moscow)*, 65 (1):28-40.
24. Balasubramanyam, M., et al. 2003. Curcumin-induced inhibition of cellular reactive oxygen species generation : Novel therapeutic implications. *J. Biosci.* 28 715–721
25. Bharti, A.C., et al. 2003. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor- κ B and I κ B α kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. *Blood*, 101:1053-1062
26. Jobin, C., et al. 1999. Curcumin Blocks Cytokine-Mediated NF- κ B Activation and Proinflammatory Gene Expression by Inhibiting Inhibitory Factor I- κ B Kinase Activity. *The Journal of Immunology*, 163: 3474–3483.
27. Domic, J., et al. 2002. Curcumin – A Potent Inhibitor of Galectin-3 Expression. *Food Technol. Biotechnol.* 40 (4) 281–287
28. Woo, J.H., Kim, Y.H., Choi, Y.J., Kim, D.G., Lee, K.S., Bae, J.H., Min, D.S., Chang, J.S., Jeong, Y.J., et al., 2003. Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity: induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species, down regulation of Bcl-XL and IAP, the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Carcinogenesis*, 24(7):1199-1208. [doi:10.1093/ carcin/bgg082]

Penurunan Motilitas dan Daya Fertilitas Sperma Ikan Lele Dumbo (*Clarias spp*) Pasca Perlakuan Stress Kejutan Listrik

Abdul Rahem Faqih*

Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Transgenik pada ikan lele dumbo (*Clarias spp*) dengan menggunakan metode elektroporasi pada sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum pernah dilakukan di Indonesia, sehingga perlu dilakukan percobaan pemberian tegangan pada sperma ikan lele dumbo tersebut. Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh stress kejutan listrik (V) terhadap (motilitas) sperma dan daya fertilitasi sperma ikan lele dumbo. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Breeding (Budidaya Perairan) Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan serta di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang, Jawa Timur mulai bulan Januari sampai Juni 2009. Rancangan percobaan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan 3 kali ulangan dan 1 kontrol. Sebagai perlakuan adalah perbedaan pemberian stress kejutan listrik dengan Gene pulser pada tegangan: A (40 V), B (160 V), C (280 V), D (400 V), E (520 V). Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian stress kejutan listrik dengan tingkat voltase yang berbeda berpengaruh nyata terhadap motilitas sperma namun tidak berpengaruh nyata terhadap daya fertilitasi dan viabilitas sperma serta daya tetas telur. Berdasarkan analisis *polynomial orthogonal* didapatkan hubungan antara perlakuan tegangan dengan hasil motilitas sperma berbentuk linier dengan persamaan $y=39,198-0,04x$ dengan $R^2=0,933$ dan $r=0,966$. Semakin tinggi tegangan yang diberikan maka semakin rendah motilitas sperma yang dihasilkan. Dari hasil penelitian ini dapat disarankan bahwa elektroporasi pada sperma ikan lele dumbo (*Clarias spp*) sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan pada tegangan 40 Vcm^{-1} dengan satu kali kejutan dan lama kejutan 0,05 ms.

Kata kunci: *Clarias spp*, sperma, elektroporasi, tegangan, transgenik

PENDAHULUAN

Sperma memiliki kelebihan dalam bertindak sebagai media transfer gen, karena sperma menggunakan vektor alami dalam mentransfer gen [1]. Sel sperma telah digunakan sebagai vektor transfer gen pada ikan [2]. Masuknya konstruksi gen ke dalam sperma dapat dipermudah dengan penggunaan elektroporator dan efektifitas transfer gen dengan elektroporasi sperma sangat dipengaruhi kondisi listrik dan parameter biologi [3].

Metode elektroporasi menggunakan serangkaian listrik arus pendek untuk melemahkan membran sel untuk membantu transgen atau DNA rekombinan masuk dalam sel tertentu [4]. Menurut Taghyr (2008), tegangan listrik adalah perbedaan potensi listrik antara dua titik dalam rangkaian listrik, dinyatakan dalam

satuan volt. Besaran ini mengukur energi potensial sebuah medan listrik untuk menyebabkan aliran listrik dalam sebuah konduktor listrik [5].

Integrasi DNA kedalam sperma tergantung pada tegangan listrik (kVcm^{-1} atau Vcm^{-1}), jumlah kejutan yang dikenakan dan konsentrasi DNA. Sedangkan efisiensi transfer DNA, dengan media sperma yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan dan lama kejutan [6]. Elektroporasi memfasilitasi terbentuknya pori-pori temporal pada permukaan membran sel target [7]. Metode elektroporasi adalah suatu metode yang berhasil dalam transfer gen pada sel jaringan yang dikultur dan metode ini pada tahun 1990 dianggap metode terbesar yang berhasil dalam transgenik ikan [8].

Transgenik pada ikan lele dumbo (*Clarias spp*) dengan menggunakan metode elektroporasi pada sperma ikan sebagai media transfer gen masih belum pernah dilakukan di Indonesia, sehingga perlu dilakukan percobaan pemberian tegangan yang berbeda untuk mendapatkan tegangan yang optimal karena menurut Symond

* Alamat korespondensi penulis:
Abdul Rahem Faqih
Email : faq_ub@yahoo.com
Alamat : Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang

et al., (1994), efisiensi transfer DNA dengan media sperma yang dielektroporasi sangat dipengaruhi oleh tegangan dan lama kejutan [6]. Selain itu ditambahkan oleh Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah, oleh sebab itu maka perlu diketahui tegangan yang sesuai sehingga tidak sampai terjadi kerusakan pada sel sperma [9].

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh stress kejutan listrik dengan gene pulser pada tegangan berbeda (V) terhadap pergerakan (motilitas) sperma dan daya fertilisasi sperma ikan lele dumbo dalam membuahi telur.

METODE PENELITIAN

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan kontrol yang masing-masing diulang sebanyak 3 kali. Dalam penelitian ini, perlakuan yang diberikan adalah sebagai berikut:

Perlakuan A = pemberian kejutan listrik dengan tegangan 40 volt

Perlakuan B = pemberian kejutan listrik dengan tegangan 160 volt

Perlakuan C = pemberian kejutan listrik dengan tegangan 280 volt

Perlakuan D = pemberian kejutan listrik dengan tegangan 400 volt

Perlakuan E = pemberian kejutan listrik dengan tegangan 520 volt

Perlakuan K = tanpa pemberian kejutan listrik

Prosedur Penelitian

Persiapan Penelitian

Menyiapkan induk jantan ikan lele dumbo yang sudah matang gonad untuk diambil spermanya dengan cara membedah tubuhnya. Kemudian menyiapkan alat elektroporasi.

Pengambilan Sperma

Induk jantan ikan lele dumbo yang sudah matang gonad diukur panjangnya dan ditimbang beratnya, kemudian kepalanya dipotong dan dibedah untuk diambil gonadnya. Setelah itu gonad ditimbang dan sperma dikeluarkan dengan cara memeras gonad, sperma ditampung dalam botol film.

Pengamatan Sperma Pra Elektroporasi

Sperma dalam botol film diambil menggunakan mikropipet kemudian dimasukkan dalam gelas ukur 10 ml. Setelah itu dilakukan

penghitungan jumlah sel sperma menggunakan dan juga diamati motilitas dan viabilitas sperma.

Proses Elektroporasi

Sperma dimasukkan sebanyak 25 µl kedalam *cuvette* setelah itu tutup rapat. Kemudian masukkan *cuvette* dalam *shock pod*, setelah itu pilih tegangan yang akan diberikan dan tekan tombol "pulse" untuk memberikan tegangan. Perlakuan pada tiap tegangan diulang sebanyak tiga kali.

Pengamatan Sperma Pasca Elektroporasi

Setelah sperma diberi kejutan kemudian ditambahkan larutan Natrium Fisiologis pada sperma dalam *cuvette*. Setelah itu sperma dituang kedalam mikrotube dan diambil untuk pengamatan motilitas dan viabilitas sperma masing-masing 5 µl. Sperma yang tersisa digunakan untuk membuahi telur yang sudah disiapkan sebanyak ± 271 butir. Setelah itu diamati daya fertilisasi sperma dan juga telur diamati hingga menetas untuk mengetahui HR.

Parameter Uji Penelitian

Motilitas Spermatozoa

Motilitas spermatozoa adalah parameter yang berguna untuk memperkirakan kelangsungan hidup spermatozoa. Sperma yang hidup adalah sperma yang bergerak cepat, lambat atau pergerakannya pada kepala atau ekor, sedangkan sperma yang mati adalah sperma yang tidak memperlihatkan pergerakan sama sekali baik kepala maupun ekor.

Lama motilitas dan daya fertilisasi sperma tiap jenis ikan berbeda-beda, tetapi pada umumnya motilitas dan kemampuan sperma untuk membuahi telur adalah sejalan. Menurut Sucipto (2008), spermatozoa akan bergerak (motil) menuju mikrofil (lubang berukuran mikro pada sel telur) [11].

Fertilitas (Pembuahan)

Fertilitas adalah kemampuan sperma ikan untuk mampu membuahi telur. Pada proses fertilisasi terjadi penggabungan inti spermatozoa dengan inti telur dalam sitoplasma sehingga membentuk zigot. Fertilitas merupakan persentase keberhasilan proses penyatuan sel gamet jantan dan sel gamet betina untuk membentuk satu sel (zygot) [12]. Telur yang terbuahi dan yang tidak terbuahi dihitung kemudian dilanjutkan dengan menghitung persentase fertilitas dengan rumus sebagai berikut [12]:

$$\text{Fertilitas} = \frac{\sum \text{telur yang terbuahi} \times 100\%}{\sum \text{Total telur}}$$

Viabilitas Spermatozoa

Viabilitas spermatozoa adalah parameter yang diukur untuk mengetahui kelangsungan hidup spermatozoa setelah diberi perlakuan dengan tegangan yang berbeda. Setelah sperma diberi kejutan listrik kemudian diwarnai menggunakan eosin-negrosin dan selanjutnya diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

$$\text{Viabilitas} = \frac{\sum \text{sel sperma hidup} \times 100\%}{200}$$

Hatching Rate (HR)

Hatching Rate (daya tetas) menunjukkan persentase telur dari awal fertilisasi hingga telur yang menetas. Daya tetas telur merupakan prosentase telur yang menetas dibandingkan dengan telur awal. Menurut Sin (2001), kondisi saat proses elektroporasi juga dapat mempengaruhi daya tetas telur. Daya tetas telur dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut [13]:

$$\text{HR} = \frac{\sum \text{telur yang menetas} \times 100\%}{\sum \text{telur awal fertilisasi}}$$

Kualitas Air

Pengamatan inkubasi telur yang dibuahi oleh sperma perlu dilakukan pengamatan kualitas air, pengukuran kualitas air meliputi pengukuran suhu, (DO) oksigen terlarut dan derajat keasaman (pH). Pengukuran suhu dilakukan dengan menggunakan termometer, pengukuran oksigen terlarut dilakukan dengan menggunakan oxymeter dan pengukuran derajat keasaman dilakukan dengan menggunakan pH meter.

Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman (ANOVA), sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jika dari data sidik ragam diketahui bahwa perlakuan menunjukkan pengaruh beda nyata (*significant*) atau berbeda sangat nyata (*highly significant*), maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dan analisa regresi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Spermatozoa Ikan Lele

Kondisi sperma ikan lele yang digunakan pada saat penelitian mempunyai kualitas yang cukup baik, sperma yang diambil dari indukan dengan berat rata-rata 1,15 kg dan didapatkan volume sperma rata-rata yaitu 1,5 ml dengan berat

gonad rata-rata 6,6 gr, ciri-ciri fisik sperma yaitu berwarna putih susu dan cukup kental. Menurut Harvey dan Hoar (1979), beberapa karakteristik semen ikan antara lain berwarna putih susu dan berbau khas, produksi spermatozoa setiap gram berat badan, 4000 juta dan motilitas spermatozoa 10 menit di air tawar [14].

Dari hasil perhitungan jumlah kepadatan sel sperma ikan lele didapatkan sekitar $5,6 \times 10^9$ selml⁻¹ menurut Dacie dan Lewis (1984) dan Rustidja (2000), konsentrasi sperma ikan berkisar $\pm 3,7-11,9 \times 10^9$ spermatozoa ml⁻¹ cairan, karena untuk ikan yang mampu menghasilkan telur sampai ratusan ribu butir selain konsentrasinya yang tinggi, maka akan membutuhkan volume sperma yang lebih banyak pula [15,16]. Kualitas sperma dapat dilihat dari dua parameter yaitu motilitas dan viabilitas sperma.

Motilitas Sperma Kontrol

Sebelum sperma diberikan perlakuan, maka perlu diketahui motilitas sperma kontrol. Dari hasil pengamatan diketahui rata-rata motilitas sperma kontrol sebesar 60% (Tabel 1), hal ini sudah menunjukkan sperma tersebut dalam kondisi yang cukup bagus karena menurut Toelihere (1981), persentase motilitas spermatozoa yang dikatakan kurang baik dalam proses pembuahan telur apabila di bawah 40%, karena sering menyebabkan pembuahan tidak berhasil [17].

Tabel 1. Motilitas Sperma kontrol (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Kontrol	60	60	60	180	60.00

Kualitas sperma dengan tingkat motilitas 60% dapat dikatakan bagus karena menurut Tabares (2007), pada penelitiannya menggunakan ikan *Brycon henni* (ikan air tawar) menunjukkan bahwa pada sperma kontrol memiliki tingkat motilitas 78% karena dalam cairan seminal plasmanya terdapat ion yang lengkap seperti KCl, NaCl, CaCl₂ dan MgCl₂. Fungsi cairan seminal antara lain mengembangkan kapasitas sperma dalam bergerak [19]. Selain itu, fungsi cairan seminal juga mempertahankan motilitas sperma saat bergerak dalam air [20].

Viabilitas Sperma Kontrol

Dari hasil pengamatan preparat sperma yang sudah diwarnai dengan eosin-negrosin, diketahui viabilitas sperma yaitu sekitar 85% (Tabel 2). Seperti diketahui bahwa persentase viabilitas sperma menentukan kualitas sperma tersebut karena hal itu menunjukkan bahwa jumlah

spermatozoa yang hidup cukup tinggi sehingga dapat meningkatkan keberhasilan proses pembuahan. Persentase hidup sel spermatozoa dalam sperma yang baik minimal 70%. Semakin besar jumlah viabilitas sperma, maka kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil pada sel telur juga semakin tinggi [24].

Tabel 2. Viabilitas Sperma Kontrol (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
Kontrol	99	81,5	74,5	255	85

Kualitas Spermatozoa Pasca Elektroporasi

Setelah sperma diberi kejutan listrik dilakukan penambahan larutan Natrium fisiologis sebanyak 375 µl, yang bertujuan untuk mempermudah pengambilan sperma karena sedikitnya jumlah sperma (25 µl) yang dimasukkan ke dalam cuvet (2 mm). Selain itu penambahan pengencer juga diharapkan akan membantu mempertahankan kondisi sperma [21].

Pengamatan motilitas dan viabilitas dilakukan dengan mengambil larutan sperma yang sudah ditambahkan Natrium fisiologis masing-masing 5 µl (7×10^5 sel sperma μl^{-1}). Untuk mengamati motilitas sperma, sperma yang sudah diambil ditetaskan pada *object glass* dan diletakkan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x, setelah didapatkan fokus kemudian ditetaskan air pada preparat sperma dan ditutup dengan *cover glass*, setelah itu seketika diamati oleh minimal 3 orang agar mendapatkan nilai rata-rata motilitas. Sedangkan untuk mengetahui viabilitas sperma, 5 µl sperma yang sudah diambil ditetaskan pada *object glass* kemudian diwarnai dengan pewarna eosin-negrosin, setelah preparat kering kemudian diamati di bawah mikroskop dan dihitung sel sperma yang hidup dan mati sejumlah 200.

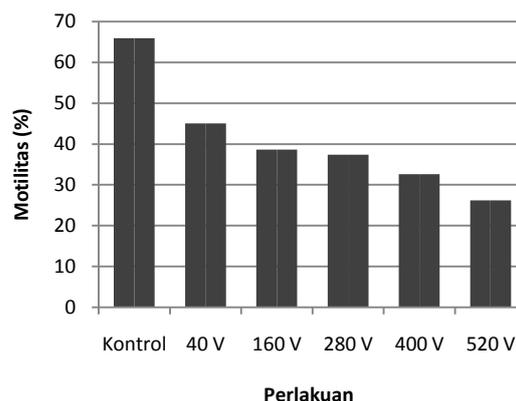
Motilitas Spermatozoa

Dari hasil penelitian diketahui pengaruh pemberian tegangan A(40 V), B(160 V), C(280 V), D(400 V) dan E(520 V) telah menunjukkan hasil yang berbeda terhadap motilitas sperma. Persentase motilitas sperma setelah diberi tegangan dapat dilihat pada Tabel 3.

Dari data pada Tabel 3 dapat diketahui bahwa rerata persentase motilitas yang dihasilkan dari beberapa perlakuan yaitu A (40%), B (30%), C (28,33%), D (23,33%) dan E (18,33%), jika dibandingkan dengan motilitas sperma kontrol (60%) maka terlihat terjadi penurunan seperti ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 3. Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Motilitas Sperma Ikan Lele (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
40 V	40	30	50	120	40.00
160 V	30	30	30	90	30.00
280 V	30	25	30	85	28.33
400 V	30	30	10	70	23.33
520 V	20	20	15	55	18.33
Total				420	
Kontrol	60	60	60	180	60.00



Gambar 1. Diagram Motilitas Sperma

Pada Gambar 1 menunjukkan bahwa motilitas sperma semakin menurun hal ini menunjukkan bahwa pemberian kejutan listrik pada sperma menyebabkan adanya pembukaan pori-pori yang bersifat sementara namun dikatakan oleh Weaver (1995), apabila tegangan yang diberikan terhadap sperma terlalu berlebihan maka dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah dan hal ini memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma [9]. Permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan motilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting perannya dalam metabolisme sel. Sel sperma cenderung akan mengecil setelah dilakukan elektroporasi dan hal ini memungkinkan menurunnya persentase motilitas sperma [3].

Berdasarkan hasil sidik ragam pada Tabel 4 didapatkan hasil yang berbeda nyata. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan tegangan memberikan pengaruh terhadap persentase motilitas sperma ikan lele, yang berarti menerima H1 dan menolak H0. Selanjutnya dilakukan uji BNT didapatkan hasil seperti pada Tabel 5.

Tabel 4. Hasil Sidik Ragam Persentase Ragam Motilitas Sperma

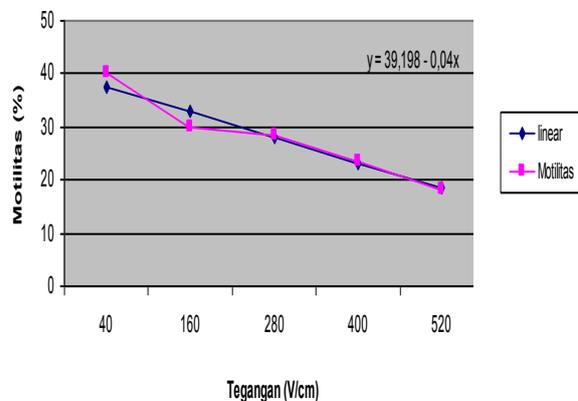
Sumber ragam	db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	790	197,5	3,95*	3,48	5,99
Acak	10	500	50			
Total	14	1290				

Keterangan : * = F 5% < F Hitung > F 1 %

Tabel 5. Uji Beda Nyata Terkecil

Rerata Perlakuan	Rata-rata	Notasi
E	18,33	a
D	23,33	a
C	28,33	ab
B	30	ab
A	40	b

Keterangan: notasi sama berarti tidak berbeda



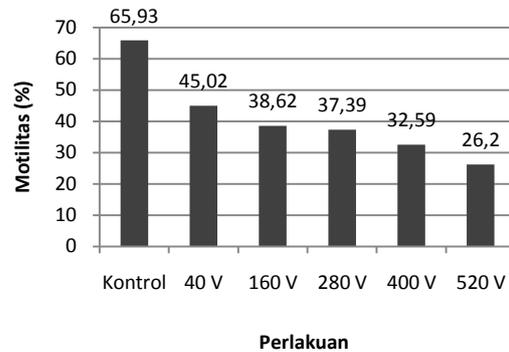
Gambar 2. Grafik hubungan perbedaan tegangan dengan motilitas sperma

Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) menunjukkan bahwa perlakuan A (40 V) memberikan hasil motilitas terbaik diikuti oleh perlakuan C(280 V) dan B(160 V) dan yang terakhir adalah perlakuan D(400 V) dan E(520 V). Perlakuan A memiliki jumlah motilitas tertinggi karena sel sperma masih dalam kondisi yang optimal dibandingkan tegangan yang lebih tinggi yaitu perlakuan B, C, D, E dengan nilai motilitas sperma yang semakin menurun, sesuai pendapat Sun *et al* (2004), pada tegangan 40 Vcm⁻¹ menghasilkan daya tetas dan kelulushidupan udang tertinggi, hal ini menunjukkan bahwa tegangan tersebut menimbulkan kerusakan yang minim pada sel [22].

Tabel 6. Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Lele (%)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	332,58	83,14	3,23 ^{ns}	3,48	5,99
Acak	10	257,17	25,7			
Total	14	589,75				

Selanjutnya berdasarkan uji polinomial orthogonal didapatkan persamaan linear $y = 39,198 - 0,04x$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,968 yang berarti bahwa hubungan antara perbedaan tegangan dengan motilitas mempunyai kaitan sangat erat atau hasil motilitas sesuai dengan perlakuan yang diberikan seperti terlihat pada Gambar 2.



Gambar 3. Diagram Lama motilitas sperma kontrol dan setelah diberi tegangan.

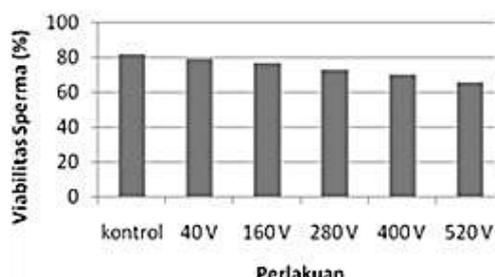
Seperti yang digambarkan pada Gambar 3., bahwa pemberian perlakuan tegangan menimbulkan penurunan waktu motilitas sperma dengan semakin besarnya tegangan, jika dibandingkan dengan sperma kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa sel sperma yang sudah diberi kejutan listrik mengalami pembukaan pori-pori secara sementara dan terjadi difusi molekul asing ke dalam sel [13]. Berdasarkan pendapat tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran cairan makanan untuk metabolisme spermatozoa dengan cairan di luar sel sehingga hal ini menyebabkan waktu motilitas menurun. Hal ini karena pergerakan spermatozoa memerlukan energi [21].

Penurunan waktu motilitas tidak terlihat signifikan karena dilakukan penambahan Na fisiologis. Menurut Soehartojo (1995) dalam Hidayaturrahmah (2007), pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas spermatozoa [21].

Viabilitas Spermatozoa

Dari data pada Tabel 6 dapat diketahui bahwa rerata persentase viabilitas yang dihasilkan dari beberapa perlakuan yaitu A (80%), B (78,5%), C (73,67%), D (70,5%) dan E (67,5%), jika dibandingkan dengan viabilitas sperma kontrol (85%) maka terlihat terjadi penurunan.

Penurunan viabilitas pada kebanyakan perlakuan terjadi karena tegangan yang diberikan terhadap sperma dapat menyebabkan pembukaan pori-pori yang terlalu lebar dan gagal untuk menutup seperti semula, sehingga dapat mengakibatkan sel rusak atau pecah dan hal ini memicu kerusakan pada membran atau selaput sperma [9]. Permeabilitas membran spermatozoa erat kaitannya dengan viabilitas spermatozoa karena seperti diketahui permeabilitas membran sangat berkaitan dengan transportasi nutrisi yang penting perannya dalam metabolisme sel. Ditambahkan oleh Jones dan Stewart (1979) dalam Rustidja, (2000) bahwa perubahan infrastruktur pada membran plasma, hilangnya beberapa matrik mitokondria dan penurunan densitas elektron dari matrik mitokondria menyebabkan hilangnya viabilitas spermatozoa [16].



Gambar 4. Diagram Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Viabilitas Sperma Ikan Lele Dumbo

Pada perlakuan dengan tegangan 400 V dan 520 V memiliki nilai viabilitas lebih rendah. Hal ini disebabkan karena terjadi peningkatan suhu pada sperma ketika diberi tegangan, hal ini dimungkinkan karena sperma tercampur dengan Na fisiologis (terdapat kandungan ion) saat pengambilan dengan mikropipet atau juga karena pada saat proses pendinginan *cuvette* dengan es kurang maksimal. *Resistance* sampel dapat ditingkatkan dengan cara mengurangi temperatur sampel, mengurangi kadar ion pada pengencer, mengurangi volume cairan dalam *cuvette* pada kasus media dengan *resistance* rendah [23]. Sehingga jika sperma (*sample*) banyak mengandung ion maka *resistance* dari sampel meningkat sehingga waktu pemberian tegangan semakin lama (*pulse length*) sehingga

suhunya akan meningkat dan menyebabkan sperma mati. Hal ini menurut Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000) kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah [16].

Selanjutnya dilakukan perhitungan sidik ragam dan didapatkan hasil sidik ragam seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Sidik Ragam Viabilitas Sperma

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
40 V	78	87,5	74,5	240	80
160 V	81,5	73,5	80,5	235,5	78,50
280 V	72,5	70,5	68,5	211,5	70,50
400 V	67	75	60,5	202,5	67,50
520 V	70,5	75	75,5	221	73,67
	Total			1110,5	
Kontrol	99	81,5	74,5	255	85

Keterangan: ^{ns} tidak berbeda nyata

Pada Gambar 4 menunjukkan terjadinya penurunan persentase viabilitas sperma pada tiap perlakuan, namun dari hasil perhitungan sidik ragam (Tabel 7) diketahui bahwa perbedaan tegangan tidak berpengaruh terhadap viabilitas sperma ikan lele dumbo, yang berarti menerima H0 dan menolak H1. Hal ini terjadi dimungkinkan karena metode kejutan yang dipakai yaitu metode *square wave* karena menurut Chen *et al.*, (2009) bahwa metode ini menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio [24].

Daya Fertilitasi Sperma

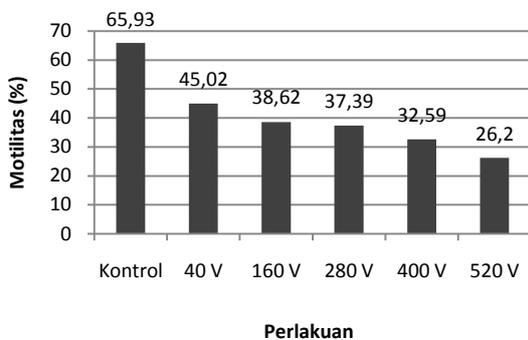
Setelah sperma diberi tegangan kemudian sperma tersebut digunakan untuk membuahi telur dengan jumlah 0,5 g (\pm 271 butir) dan untuk lebih jelasnya daya fertilitasi sperma dapat dilihat pada Tabel 8 dan Gambar 5.

Dari data Tabel 8 dan Gambar 5 diketahui bahwa rata-rata persentase daya fertilitasi sperma yang telah diberi tegangan, jika dibandingkan dengan rata-rata daya fertilitasi sperma kontrol terlihat terjadi penurunan. Hal ini berhubungan dengan tingkat motilitas sperma yang menunjukkan adanya penurunan dengan semakin besarnya tegangan yang diberikan. Ciereszko *et al.*, (2001) mengungkapkan bahwa keberhasilan suatu pembuahan telur oleh sperma sangat dipengaruhi oleh motilitas sperma [25]. Keadaan viabilitas yang panjang belum

tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi, karena pada keadaan ini spermatozoa sangat membutuhkan banyak energi untuk membuahi sel telur [21].

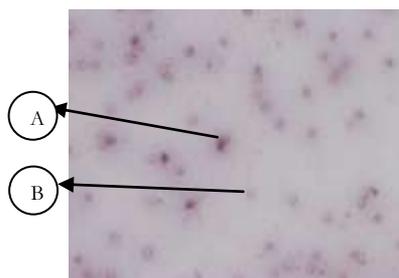
Tabel 8. Daya Fertilisasi Sperma Ikan Lele Dumbo Setelah Diberi Tegangan (%)

Perlakuan	Ulangan (%)			Total (%)	Rata-rata (%)
	1	2	3		
40 V	47,23	52,77	35,05	135,05	45,02
160 V	37,27	43,54	35,05	115,86	38,62
280 V	38,01	16,97	57,19	112,17	37,39
400 V	26,57	39,85	31,36	97,78	32,59
520 V	26,20	26,57	25,83	78,60	26,20
Total				539,46	
Kontrol	71,58	65,68	60,52	197,78	65,93



Gambar 5. Diagram Pengaruh Pemberian Tegangan Terhadap Daya Fertilitas Sperma.

Hasil sidik ragam (Tabel 9) menunjukkan bahwa pemberian perbedaan tegangan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap daya fertilisasi sperma, yang berarti menerima H0 dan menolak H1.



Gambar 6. Gambar Sperma setelah diberi tegangan 280V/cm. Keterangan (A) sperma yang mati, (B) sperma yang masih hidup

Tabel 9. Hasil Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	592,83	148,2	1,34 ^{ns}	3,48	5,99
Acak	10	1103,63	110,36			
Total	14	1696,46				

Keterangan: ^{ns} tidak berbeda nyata

Menurut Sin (2001), motilitas sperma ikan merupakan parameter kelangsungan hidup sperma, yang akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan [13]. Namun kelulushidupan dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan, dan pada penelitian ini volume sperma yang diberi perlakuan yaitu 25 µl dengan jumlah sel sperma ± 5,6 juta sel tiap µl digunakan untuk membuahi 0,5 gr telur dengan jumlah sel telur ± 271 butir.

Hal ini menunjukkan bahwa meskipun motilitas sperma yang cenderung menurun tetapi masih tetap bisa membuahi telur dengan ditunjang jarak pembuahan antara sperma dan telur yang dekat (pemijahan buatan) seperti dikatakan oleh Hidayaturrahmah (2007), kondisi motilitas sperma *slow progressive* mempunyai kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil cukup lemah, pembuahan bisa saja terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat. Sperma pada kondisi viabil, kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi sangat kecil yaitu hanya sekitar 10%. Kondisi spermatozoa yang bergerak perlahan atau berdenyut di tempat dalam mempertahankan viabilitasnya membutuhkan kecepatan dan energi yang besar untuk masuk ke saluran lubang mikropil sel telur [21].

Secara umum sperma yang sudah dielektroporasi masih mampu untuk membuahi karena menurut Sin *et al.*, (1995) setelah diamati dengan mikroskop elektron, sperma yang diberi kejutan listrik tidak nampak adanya kerusakan namun sel sperma menjadi kerdil dan hal ini yang memungkinkan berkurangnya tingkat motilitas tetapi tidak diketahui apakah sel sperma yang kerdil tersebut masih hidup [3].

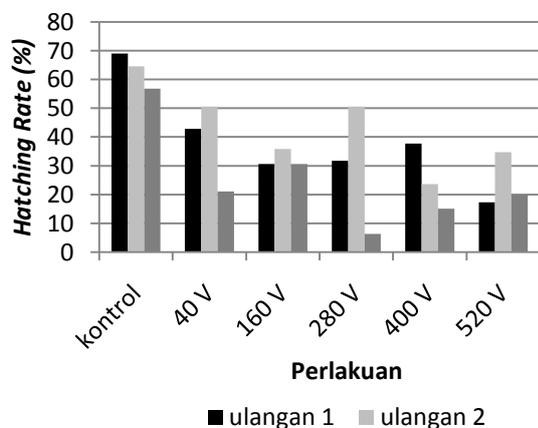
Daya Tetas Telur (Hatching Rate)

Telur yang sudah dibuahi kemudian dipelihara dan diamati selama 40 jam sampai menetas didapatkan data daya tetas telur (*hatching rate*, HR) dari tiap perlakuan sebagaimana ditampilkan pada Tabel 10 dan Gambar 7.

Tabel 10. Daya Tetas Dari Telur yang Dibuahi dengan Sperma Terelektroporasi (%)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
40 V	42,8	50,55	21,03	114,38	38,13
160 V	30,63	35,79	30,63	97,05	32,35
280 V	31,73	6,27	50,55	88,55	29,52
400 V	17,34	34,69	19,93	71,96	23,99
520 V	37,69	23,62	15,12	76,43	25,48
	Total			448,37	
Kontrol	69	64,58	56,83	190,41	63,47

Dari Tabel 10., diketahui bahwa perlakuan yang mempunyai nilai HR tertinggi yaitu pemberian tegangan 40 V dengan nilai rata-rata 38,13 % hal ini menunjukkan bahwa nilai HR dipengaruhi oleh tingkat motilitas (Tabel 10) yang menunjukkan bahwa pada tegangan 40 V memiliki nilai motilitas tertinggi sehingga daya fertilisasinya juga tinggi. Keberhasilan dari suatu pembuahan telur oleh sperma sangat dipengaruhi oleh motilitas sperma, karena keadaan viabilitas yang panjang belum tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi, karena pada keadaan ini spermatozoa sangat membutuhkan banyak energi untuk membuahi sel telur [21, 25].



Gambar 7. Diagram Daya Tetas Telur yang Dibuahi dengan Sperma Terelektroporasi

Dari grafik pada Gambar 7 dapat diketahui bahwa terdapat beberapa perlakuan yang memiliki nilai HR di bawah 20%, hal ini disebabkan karena rendahnya daya fertilisasi sperma yang dipicu oleh terjadinya peningkatan suhu pada proses pemberian kejutan. Peningkatan suhu yang terjadi pada sperma dalam cuvet yang menyebabkan sperma mati seperti disampaikan Toelihere (1981) dalam Rustidja (2000), kemampuan hidup (viabilitas) spermatozoa sangat dipengaruhi oleh suhu dan

secara umum akan hidup lebih lama dalam suhu rendah [16].

Tabel 11. Hasil Sidik Ragam *Hatching Rate* (HR)

Sumber ragam	db	JK	KT	F		
				F Hit	5%	F 1%
Perlakuan	4	385,1	96,28	0,50 ^{ns}	3,48	5,99
Acak	10	1909	190,90			
Total	14	2294,1				

Keterangan: ^{ns} tidak berbeda nyata

Perhitungan sidik ragam pada Tabel 11, menyatakan bahwa HR yang dibuahi dengan sperma yang diberi perlakuan kejutan listrik tidak berbeda nyata.

Motilitas dari sperma ikan merupakan parameter dari kelangsungan hidup sperma, disini terlihat akan menurun dengan semakin meningkatnya tegangan dan lama kejutan [13]. Tingkat *survival* dari embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan. Tsai *et al* (1995) mengungkapkan bahwa memang tidak begitu banyak perbedaan daya tetas telur antara yang dibuahi dengan sperma terelektroporasi dan sperma kontrol hanya selisih 4% lebih besar pada sperma kontrol [26].

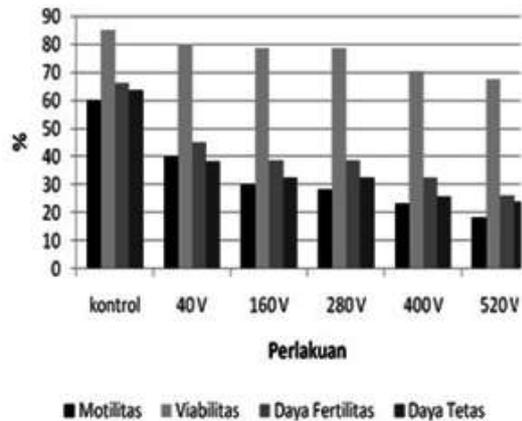
Hal ini juga tidak terlepas dari metode kejutan yang dipakai yaitu metode *square wave*. Metode ini dapat menghasilkan tegangan yang besar sehingga efisiensi pemasukkan DNA asing lebih besar karena pembukaan pori relatif lebih besar, namun gelombangnya sangat pendek (*pulse length*) sehingga mencegah sel rusak dan dapat kembali seperti semula karena panas yang ditimbulkan relatif kecil [27].

Hubungan Antar Motilitas dengan Viabilitas Sperma

Dari Gambar 8., dapat diketahui bahwa motilitas sperma menurun dengan semakin meningkatnya tegangan yang diberikan, begitu juga dengan viabilitas sperma yang secara umum menunjukkan kecenderungan penurunan.

Selain itu dari gambar tersebut juga menunjukkan bahwa persentase viabilitas sperma lebih tinggi daripada persentase motilitas sperma karena sel sperma cenderung akan mengecil setelah dilakukan elektroporasi dan hal ini memungkinkan menurunnya tingkat motilitas sperma [3]. Selain itu sel sperma yang sudah diberi kejutan listrik mengalami pembukaan pori-pori secara sementara dan terjadi difusi molekul asing ke dalam sel [13]. Hal tersebut memungkinkan terjadinya pertukaran zat makanan sperma dengan cairan yang ada diluar

sel sehingga menyebabkan penurunan motilitas sel sperma, namun viabilitas sperma tetap terjaga karena setelah pori-pori menutup maka sel sperma akan kembali seperti semula.



Gambar 8. Perbandingan Tiap Parameter dengan Tegangan Berbeda

Motilitas Dengan Daya Fertilisasi Sperma

Hubungan antara motilitas sperma terelektroporasi dengan daya fertilisasi sperma seperti ditampilkan pada Gambar 8 menunjukkan bahwa nilai motilitas berbanding lurus dengan nilai daya fertilisasi sperma, pada setiap tegangan. Keberhasilan pembuahan oleh sperma dipengaruhi oleh motilitas sperma karena ketika sel telur mengeluarkan zat *chemoattractants* dalam air maka sperma akan mengikuti sinyal tersebut [25]. Sehingga dari pernyataan tersebut, apabila sperma tidak memiliki tingkat motilitas yang tinggi maka nilai daya fertilisasinya cenderung rendah.

Daya fertilisasi sperma juga ditunjang dengan penambahan larutan pengencer Natrium fisiologis. Pemberian larutan fruktosa sebagai pengencer untuk spermatozoa ikan dimaksudkan untuk memberikan energi dan nutrisi untuk spermatozoa ikan agar dengan energi yang berupa ATP tersebut dapat meningkatkan atau memperpanjang waktu motilitas spermatozoa [21].

Viabilitas Dengan Daya Fertilisasi Sperma

Dari Diagram pada Gambar 8 menunjukkan bahwa tingkat viabilitas sperma tidak mempengaruhi daya fertilisasi sperma. Menurut Hidayaturrahmah (2007) bahwa keadaan viabilitas yang panjang belum tentu dapat menghasilkan fertilisasi yang tinggi karena untuk membuahi sel telur, spermatozoa memerlukan banyak energi [21].

Viabilitas sperma tetap tinggi karena metode pemberian kejutan yang digunakan yaitu

metode *square wave*, sehingga kemungkinan kerusakan pada sel sperma lebih kecil. Chen *et al* (2009) menyatakan bahwa metode square wave dapat menghantarkan tegangan tinggi dalam gelombang yang pendek sehingga menimbulkan sedikit panas, sehingga transfer DNA dapat terjadi tanpa membunuh sel atau embrio [24].

Sperma dalam kondisi viabil (pergerakannya rendah) masih memungkinkan untuk melakukan pembuahan karena menurut Hidayaturrahmah (2007), kondisi motilitas sperma *slow progressive* mempunyai kemampuan spermatozoa untuk menembus lubang mikropil cukup lemah, pembuahan bisa saja terjadi apabila jarak antara spermatozoa dan sel telur sangat dekat. Sperma pada kondisi viabil, kemampuan spermatozoa untuk melakukan fertilisasi sangat kecil yaitu hanya sekitar 10% [21].

Daya fertilisasi Sperma Dengan Daya Tetas Telur

Pada Gambar 8., menunjukkan bahwa jumlah telur yang menetas mengalami penurunan dari jumlah telur yang terbuahi, hal yang sama juga terjadi pada telur kontrol. Menurut Sin (2001), kelulushidupan embrio yang dibuahi dengan sperma yang dielektroporasi dan dengan sperma tanpa perlakuan tidak tampak perbedaan [13]. Ditambahkan oleh Tsai *et al* (1995) bahwa memang tidak begitu banyak perbedaan daya tetas telur antara yang dibuahi dengan sperma terelektroporasi dan sperma kontrol hanya selisih 4% lebih besar pada sperma control [26].

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian tegangan listrik berpengaruh nyata terhadap motilitas sperma, tetapi tidak berpengaruh terhadap viabilitas, daya fertilisasi sperma dan daya tetas telur ikan lele dumbo. Pemberian tegangan listrik dapat menurunkan tingkat motilitas sperma ikan lele dumbo (*Clarias spp*).

Saran

Elektroporasi pada sperma ikan lele dumbo (*Clarias sp*) sebagai media transfer gen sebaiknya dilakukan pada tegangan 40 Vcm⁻¹ dengan 1 kali kejutan dan lama kejutan 0.05 ms.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lavitrano, M., Marcho, B., Maria, G. C., Roberto, G., Stefano, M. and Alessia. 2006. Sperm Mediated Gene Transfer, *Reprod. Fertility and Development* 18. CSIRO Publishing. Victoria.

2. Muller, F., Ivich, Z., Erdelyi, F., Papp, T., Varadi, L., Horvart, L and Maclean, N. 1992. Introducing Foreign Gene Into Fish Eggs With Electroporated Sperm as Carrier. *Mol. Biol. Biotechnol.* 1 : 276 – 281.
3. Sin, F.Y.T., Mukherjee, U.K., McKenzie, J.C and Sin, I. L. 1995. Abalone Sperm-DNA Interaction. In: *Proceedings Of International Symposium On Biotechnology Applications In Aquaculture.* National Taiwan University :95-99.
4. Chen, T. T. 1995. Transgenic Fish: Ideal Models for Basic Research and Biotechnological Applications In: *Proceedings Of International Symposium On Biotechnology Applications In Aquaculture.* National Taiwan University :55-70.
5. Taghyr. 2008. Pengertian Hambatan, Arus, Tegangan dan Bunyi Hukum OHM. <http://taghyr.wordpress.com/2008/08/20/pengertian-hambatan-arus-tegangan-dan-bunyi-hukum-ohm/>. Tanggal akses 20 Agustus 2008.
6. Symond, J. E., Walker S. P. and Sin, F. Y. T. 1994a. Elektroporation of Salmon Sperm With Plasmid DNA ; Evidence of Enchanted Sperm/ DNA Assosiation. *Aquaculture* 199:313 – 327.
7. Samarsik, A., Warr, G and Chen, T. T. 2002. Production Transgenik Fish With Elevated Levels of Innet Devense Activity to Bacterial Pathogen. *Mar. Biotech.* 4:310 – 322.
8. Hackett, P. B. 1993. The Molecular Biology of Transgenic Fish. In Hocacha and Hommesen (eds) *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes.* Elvsevier Publisher BV. 2:218 – 221.
9. Weaver, J. C. 1995. Electroporation Theory: Concepts and Mechanisms. In: Nickoloff JA, editor. *Electroporation Protocols for Microorganisms.* Humana Press. Totowa.
10. Arie, Usni. 2008. Budidaya Ikan Mas (*Cyprinus Carpio* L.). <http://solusiikanmas.blogspot.com/2008/04/sperma-ikan-mas.html>. Tanggal akses 1 April 2008.
11. Sucipto, Adi. 2008. Petunjuk Teknis Gynogenesis pada Ikan Mas. <http://nak.sara.net/Aquaculture/Genetic/Page-3.html>. Tanggal akses 27 Februari 2008.
12. Gilbert S.F. 2000. *Developmental Biology.* Sixth Edition. Sinauer Associates. Sunderland.
13. Sin, F.Y.T. 2001. Gene Transfer Technology for Salmon. In *Recent Advances in Marine Biotechnology Vol 10, Molecular Genetics of Marine Organism.* Milton, F., Rachakonda, N., (ed). Science Publisher. USA.
14. Harvey, B.J., Hoar, W.S. 1979. *The Teory and Practice of Induced Breeding in Fish.* Ont. IDRC-TS 21e. Ottawa.
15. Dacie, J.V and Lewis, S.M. 1984. *Practical haematology.* Churchill Livingstone. London.
16. Rustidja. 2000. *Prospek Pembekuan Sperma.* Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
17. Toelihere, M.R. 1981. *Inseminasi Buatan pada Ternak.* Angkasa. Bandung.
18. Tabares, J., T. Ruiz, Lucy A and Martha O. 2007. Effect of Some Ions on Sperm Activation in *Brycon henni* (Eigenmann, 1913). *Scielo. Acta biol Colomb.* Vol. 12 no 1. Bogota
19. Mochida K, Kondo T, Matsubara T, Adachi S and Yamauchi K. 1999. A High Molecular Weight Glycoprotein in Seminal Plasma is a Sperm Immobilizing Factor in the Teleost Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Dev Growth Differ.* 41:619627
20. Morosawa, M., Suzuki K. 1980. Osmolality and Potassium Ion; Their Role in Initiation of Sperm Motility in Teleosts. *Science, N.Y.* 210:1145-1147
21. Hidayaturrahmah. 2007. Waktu Motilitas dan Viabilitas Spermatozoa Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L.) Pada Beberapa Konsentrasi Larutan Fruktosa. Program Studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat. Kalsel. <http://www.unlam.ac.id/bioscientiae>. Tanggal akses 1 Januari 2007.
22. Sun, S.P., N.C. Venzon Jr., Fernanda R.O.C and David, M.E. 2004. Evaluation of Methods for DNA Delivery into Shrimp Zygotes of *Panaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Science direct. Aquaculture* 243:19-26.
23. BIO-RAD. 2006. Gene Pulser Xcell Electroporation System. Instruction Manual. BIO-RAD.
24. Chen, T.T., M.J. Chen, Tzu-Ting Chiou dan J.K. Lu. 2009. Transfer of Foreign DNA into Aquatic Animals by Electroporation. In H. Nakamura (ed.), *Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology.* Springer :229-237
25. Cierezsko, A., K. Dabrowski., B. Piros., M. Kwasnik and J. Glogowski. 2001. Characterization of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) sperm motility: duration of movement, effects of cations, pH and gossypol. *Kluwer Academic. Netherlands. Hydrobiologia.* 452:225–232
26. Tsai, H. J., F.S. Tseng and I.C. Liao. 1995. Electroporation of sperm to introduce foreign DNA into the genome of Loach (*Misgurnus*

- anguillicaudatus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 52: 776-787
27. Huang, K.S., Lin, Y.C., Su, K.C., Chen, H.Y. 2007. An Electroporation Microchip System for Transfection of Zebrafish Embryos using Quantum Dots and GFP Genes for Evaluation. Biomed Microdevice 9:761-768

Pemberian Beberapa Kombinasi ZPT Terhadap Regenerasi Tanaman Gloxinia (*Sinningia speciosa*) dari Eksplan Batang dan Daun Secara In Vitro

Imelda Jeanette Lawalata*

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Pattimura

Abstrak

Beberapa kombinasi Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) seperti auksin, *Fulvic acid* dan sitokinin dicobakan untuk memacu regenerasi tanaman gloxinia (*Sinningia speciosa*) dari eksplan batang dan daun secara in vitro. Auksin terdiri dari NAA (0, 2.5, 5.0 mg^l⁻¹), *fulvic acid* (0 dan 1.0 mg^l⁻¹) serta sitokinin (BA 5 mg^l⁻¹, Novelgro 5 ml^l⁻¹, air kelapa 20%). Setiap perlakuan diulang 10 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa eksplan yang mendapat perlakuan BA 5 mg^l⁻¹ (M1) dan perlakuan sitokinin tanpa auksin (M1 – M6) memberikan jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan perlakuan auksin. Jumlah daun tertinggi diperoleh pada Media 3 (NAA 0 mg^l⁻¹ + *Fulvic acid* 0 mg^l⁻¹ + Air kelapa 20%) dan Media 6 (NAA 0 mg^l⁻¹ + *Fulvic acid* 1 mg^l⁻¹ + Air kelapa 20%). Hampir semua perlakuan NAA dan *Fulvic acid* yang dikombinasikan dengan air kelapa menunjukkan pertumbuhan jumlah daun yang lebih tinggi dibandingkan kombinasi perlakuan lainnya.

Kata kunci: auksin, *fulvic acid*, Gloxinia, *Sinningia speciosa*, sitokinin

PENDAHULUAN

Kondisi ekonomi dan budaya yang semakin baik membuat masyarakat mulai memikirkan hal-hal yang dapat memenuhi kebutuhan rohani disamping kebutuhan jasmaniahnya, termasuk meningkatnya estetika sejalan dengan meningkatnya pendapatan. Selain itu, kesadaran masyarakat akan pentingnya keasrian lingkungan bagi kehidupan, mendorong peningkatan laju permintaan tanaman hias dalam pot dan salah satunya adalah gloxinia.

Gloxinia (*Sinningia speciosa*) merupakan tanaman hias yang akhir-akhir ini sangat diminati masyarakat. Daun-daun Gloxinia besar dan berbulu serta bunga berbentuk lonceng dengan warna yang beragam memberi kesan eksklusif sebagai daya tarik tanaman tersebut [1,2,3,4]. Namun demikian permintaan akan bunga ini harus diimbangi dengan ketersediaannya. Tanaman ini dapat diperbanyak dengan benih, stek daun dan anakan. Teknik tersebut tidak cukup banyak menghasilkan tanaman serta membutuhkan waktu yang lama untuk mendapatkan tanaman berbunga. Salah satu alternatif memperbanyak suatu tanaman

termasuk gloxinia dapat dilakukan dengan teknik kultur jaringan [5].

Kultur jaringan merupakan suatu metode untuk mengisolasi bagian tanaman, seperti protoplasma, sel, sekelompok sel, jaringan atau organ serta menumbuhkannya dalam kondisi aseptik sehingga bagian-bagian tersebut dapat memperbanyak diri dan beregenerasi menjadi tanaman utuh kembali [6]. Melalui teknik ini bibit dapat diproduksi dalam jumlah yang besar, seragam, bebas hama dan penyakit serta penyediaannya secara kontinyu. Teknik ini juga memungkinkan manipulasi sel dan molekul untuk memperbaiki sifat tanaman serta mempertinggi produksi dan kualitasnya [7].

Zat pengatur tumbuh merupakan senyawa organik bukan nutrisi tanaman, aktif dalam konsentrasi rendah yang merangsang, menghambat atau merubah pertumbuhan serta perkembangan tanaman secara kuantitatif maupun kualitatif. Penggunaan jenis dan konsentrasi zat pengatur tumbuh tertentu dapat mengatur arah pertumbuhan suatu tanaman [8].

Auksin merupakan salah satu golongan ZPT yang cukup penting dalam pertumbuhan tanaman. Auksin berperan dalam mempengaruhi pembesaran, pemanjangan dan pembelahan sel serta mempengaruhi metabolisme asam nukleat dan metabolisme protein [9,10]. Taraf auksin dalam sel tergantung dari bagian tanaman yang diambil, jenis tanamannya dan umur tanaman. Pengaruh fisiologis auksin yang lain adalah penghambatan tunas lateral akibat peran auksin

* Alamat Korespondensi:

Imelda Jeanette Lawalata

E-mail : Jeanette_nona@yahoo.com

Alamat : Fakultas Pertanian Jurusan Budidaya
Pertanian, Universitas Pattimura Ambon, Jl. Ir. M.
Putuhena Poka Ambon 97233

dalam dominansi apikal, yang bergerak dari bagian apikal secara basipetal [10].

Sitokinin merupakan ZPT yang mendorong pembelahan (sitokinesis), pertumbuhan dan perkembangan kulkur sel tanaman. Sitokinin juga menunda penuaan daun, bunga dan buah dengan cara mengontrol dengan baik proses kemunduran yang menyebabkan kematian sel-sel tanaman. Pada tumbuhan, efek sitokinin sering dipengaruhi oleh keberadaan auksin, misalnya jumlah akar yang banyak akan menghasilkan sitokinin dalam jumlah banyak [8] Peningkatan konsentrasi sitokinin ini akan menyebabkan sistem tunas membentuk cabang dalam jumlah yang lebih banyak.

Pada penelitian ini dicobakan berbagai kombinasi zat pebgatur tumbuh untuk memacu regenerasi tanaman gloxinia (*Sinningia speciosa*) secara in vitro dan diharapkan dapat diperoleh formula yang cocok untuk perbanyak tanaman gloxinia.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan berupa eksplan batang dan tunas gloxinia (yang telah diperbanyak sebelumnya pada media MS0), media MS, gula, *fulvic acid*, auksin, sitokinin (BA, Novelgro dan air kelapa).

Tanaman gloxinia dikeluarkan dari botol kultur dengan menggunakan pinset, kemudian dipindahkan ke cawan yang telah diberi 5 ml air steril dan satu tetes betadine. Batang dan tunas dipotong, kemudian ditanamkan pada media MS yang telah diberikan tambahan ZPT sebagai perlakuan Tabel 1). Pada setiap botol kultur ditanam dua eksplan (batang atau tunas).

Perlakuan yang digunakan adalah kombinasi ZPT yang terdiri dari auksin, *fulvic acid* dan sitokinin. Auksin yang digunakan yaitu NAA (0; 2,5; 5,0 mg^l⁻¹), *fulvic acid* (0; 1,0 mg^l⁻¹) dan sitokinin (BA 5 mg^l⁻¹; Novelgro 5 ml^l⁻¹; air kelapa 20%). Setiap perlakuan diulang 10 kali. Pengamatan dilakukan setiap minggu sampai kultur berumur 8 minggu. Peubah yang diamati terdiri dari pembentukan tunas (jumlah tunas) dan jumlah daun.

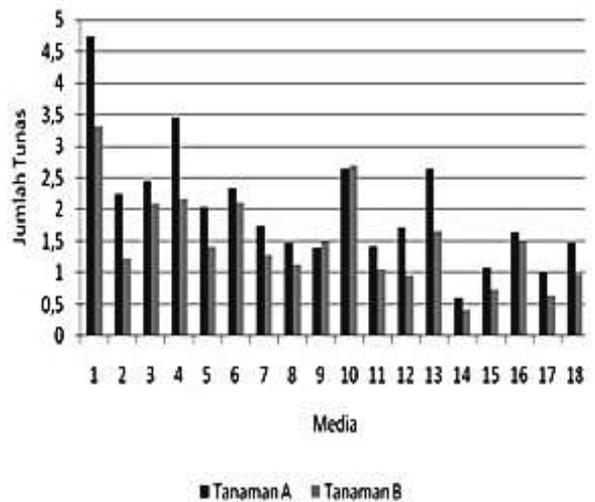
HASIL DAN PEMBAHASAN

Secara keseluruhan, eksplan gloxinia yang ditanam dapat tumbuh membentuk tunas dan daun pada semua perlakuan, tetapi dengan tingkat pertumbuhan (persentase rata-rata pembentukan tunas dan rata-rata jumlah daun) yang berbeda-beda. Eksplan yang tumbuh diawali dengan semakin membesarnya ukuran

eksplan dan warnanya menjadi hijau segar, pada luka bekas potongan terjadi pembengkakan (kalus) dan selanjutnya tumbuh menjadi tunas adventif. Ukuran eksplan juga mempengaruhi tingkat persentase pertumbuhan tunas dan potensi morfogenesis eksplan. Eksplan yang kecil ukurannya daya tumbuhnya kurang bila dikulturkan.

Tabel 1. Komposisi ZPT yang ditambahkan pada media MS untuk berbagai perlakuan

Media	NAA (mg ^l ⁻¹)	Fulvic acid (mg ^l ⁻¹)	Sitokinin
1	0	0	BA 5 mg ^l ⁻¹
2	0	0	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
3	0	0	Air kelapa 20%
4	0	1	BA 5 mg ^l ⁻¹
5	0	1	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
6	0	1	Air kelapa 20%
7	2,5	0	BA 5 mg ^l ⁻¹
8	2,5	0	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
9	2,5	0	Air kelapa 20%
10	2,5	1	BA 5 mg ^l ⁻¹
11	2,5	1	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
12	2,5	1	Air kelapa 20%
13	5,0	0	BA 5 mg ^l ⁻¹
14	5,0	0	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
15	5,0	0	Air kelapa 20%
16	5,0	1	BA 5 mg ^l ⁻¹
17	5,0	1	Novelgro 5 ml ^l ⁻¹
18	5,0	1	Air kelapa 20%



Gambar 1. Rata-rata jumlah tunas gloxinia pada berbagai media

Pembentukan Tunas Gloxinia

Jumlah tunas gloxinia yang terbentuk dan diamati pada semua perlakuan menunjukkan tingkat pertumbuhan yang berbeda-beda. Pada hasil pengamatan terlihat bahwa pada Media 1

(M1) yang hanya diberi perlakuan BA 5 mg l^{-1} menunjukkan pembentukan tunas yang paling baik, dimana jumlah tunas yang terbentuk paling banyak dibandingkan perlakuan yang lain (Gambar 1). Pada Gambar 1 terlihat bahwa umumnya jumlah tunas yang terbentuk pada perlakuan sitokinin saja (M1 – M6) memberikan jumlah tunas yang lebih banyak. Hal ini menunjukkan bahwa sitokinin merupakan hormon tumbuh yang mempengaruhi pembelahan sel. Menurut Skoog dan Miller (1957) dalam Nurhayati (1987) bahwa terbentuknya tunas diperlukan sitokinin yang tinggi tanpa atau dengan sedikit auksin. Sitokinin baik faktor tunggal maupun kombinasinya dengan auksin dalam kultur jaringan berperan dalam menginduksi maupun penggandaan tunas (Winarsih dan Priyono, 2000) Hal ini menunjukkan bahwa auksin endogen sudah cukup tersedia untuk menstimulir pembentukan akar [11].

Pembentukan tunas paling sedikit ditunjukkan oleh Media 14 (M14) dengan kombinasi perlakuan NAA 5 mg l^{-1} + Novelgro 5 ml l^{-1} . Hal ini menunjukkan bahwa pada tumbuhan, efek sitokinin sering dipengaruhi oleh keberadaan auksin. Sebagian besar tanaman memiliki pola pertumbuhan yang kompleks yaitu tunas lateral tumbuh bersamaan dengan tunas terminal. Menurut Karjadi dan Buchory (2007), pola pertumbuhan tanaman merupakan hasil interaksi antara auksin dan sitokinin dengan perbandingan tertentu. Sitokinin diproduksi dari akar dan diangkut ke tajuk, sedangkan auksin dihasilkan di kuncup terminal kemudian diangkut ke bagian bawah tumbuhan [8].

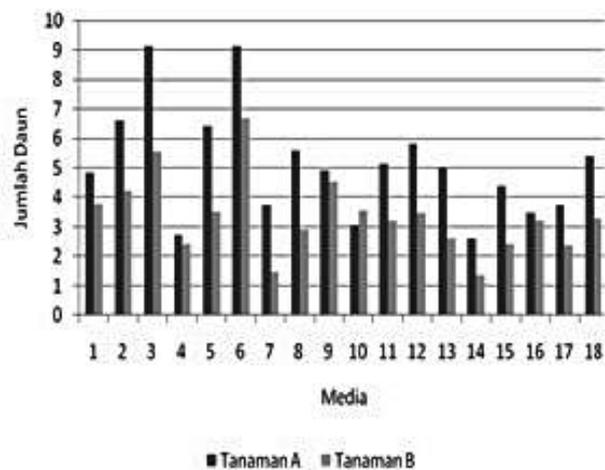
Auksin cenderung menghambat aktivitas meristem lateral yang letaknya berdekatan dengan meristem apical sehingga membatasi pembentukan tunas-tunas cabang dan fenomena ini disebut dominasi apical [13]. Kuncup aksilar umumnya mulai terbentuk pada ketiak daun yang terdapat di bagian bawah tajuk (daerah yang berdekatan dengan akar) dan biasanya akan tumbuh memanjang dibandingkan dengan tunas aksilar yang terdapat dekat dengan kuncup terminal [14]. Hal ini menunjukkan rasio sitokinin terhadap auksin yang lebih tinggi pada bagian bawah tumbuhan.

Interaksi antara auksin dan sitokinin juga merupakan salah satu cara tumbuhan dalam mengatur derajat pertumbuhan akar dan tunas.

Pembentukan Daun *Gloxinia*

Hasil pengamatan pada jumlah daun menunjukkan bahwa hampir semua perlakuan

NAA dan *Fulvic acid* yang dikombinasikan dengan air kelapa memberikan pertumbuhan jumlah daun yang lebih tinggi dibandingkan kombinasi perlakuan lainnya. Hasil tertinggi diperoleh pada Media 3 (NAA 0 mg l^{-1} + *Fulvic acid* 0 mg l^{-1} + Air kelapa 20%) dan Media 6 (NAA 0 mg l^{-1} + *Fulvic acid* 1 mg l^{-1} + Air kelapa 20%), sedangkan hasil terendah ditunjukkan oleh perlakuan Media 14 (Gambar 2).



Gambar 2. Rata-rata jumlah daun tanaman gloxinia pada berbagai media

Hal ini menunjukkan bahwa air kelapa memiliki manfaat untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman. Air kelapa yang sering dibuang ternyata dapat dimanfaatkan sebagai penyubur tanaman.

Selama ini, air kelapa banyak digunakan di Laboratorium sebagai nutrisi tambahan di dalam media kultur jaringan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa air kelapa kaya akan kalium hingga 17%. Selain kaya mineral, air kelapa juga mengandung gula antara 1,7 – 2,6% dan protein 0,07 – 0,55%. Mineral lainnya yang terdapat di dalam air kelapa antara lain natrium (Na), kalsium (Ca), magnesium (Mg), ferum (Fe), cuprum (Cu), fosfor (P) dan sulfur (S). Air kelapa juga mengandung berbagai macam vitamin seperti asam nitrat, asam nikotinat, asam pantotenat, asam folat, niacin, riboflavin dan thiamin [15]. Terdapat pula 2 hormon alami yaitu auksin dan sitokinin sebagai pendukung pembelahan sel embrio kelapa.

Penelitian yang dilakukan oleh National Institute of *Molecular Biology and Biotechnology* (BIOTECH) UP Los Banos mendapatkan bahwa dari air kelapa dapat diekstrak hormon yang kemudian dapat dibuat suatu produk suplemen yang disebut cocogro [16]. Hasil penelitian itu

menunjukkan produk hormon dari air kelapa ini mampu meningkatkan hasil kebele hingga 64%, kacang tanah hingga 15% dan sayuran 20 – 30%. Dengan adanya kandungan unsur kalium yang cukup tinggi, air kelapa dapat merangsang pembungaan pada anggrek.

Patiroi (1992) juga melakukan penelitian yang mengujicobakan air kelapa muda dengan konsentrasi yang berbeda (0, 20%, 40%, 60%, 80%) untuk merangsang pertumbuhan algae dengan menggunakan fitoplankton jenis *Skeletonema costatum*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari kelima konsentrasi yang dicobakan ternyata konsentrasi 40% air kelapa muda memberikan kelimpahan *Skeletonema costatum* tertinggi, selanjutnya berturut-turut 60%, 80%, 20% dan 0 % memperlihatkan penurunan kelimpahan dari *Skeletonema costatum*. Berdasarkan hasil penelitian itu disimpulkan bahwa pemberian sitokinin bermanfaat dalam mempercepat pertumbuhan dan perkembangan *Skeletonema costatum* sampai konsentrasi tertentu. Konsentrasi yang terlalu tinggi atau rendah justru tidak memberikan efek positif [17].

KESIMPULAN

Pembentukan tunas dan daun dipengaruhi oleh komposisi zat pengatur tumbuh yang digunakan yaitu auksin dan sitokinin. Jumlah tunas terbanyak ditunjukkan oleh eksplan yang mendapat perlakuan BA 5 mg^l⁻¹ (M1) dan perlakuan sitokinin saja tanpa auksin (M1 – M6) memberikan jumlah tunas yang lebih banyak dibandingkan perlakuan yang mendapat auksin. Jumlah daun tertinggi diperoleh pada Media 3 (NAA 0 mg^l⁻¹ + *Fulvic acid* 0 mg^l⁻¹ + Air kelapa 20% dan Media 6 (NAA 0 mg^l⁻¹ + *Fulvic acid* 1 mg^l⁻¹ + Air kelapa 20%). Hampir semua perlakuan NAA dan *Fulvic acid* yang dikombinasikan dengan air kelapa menunjukkan pertumbuhan jumlah daun yang lebih tinggi dibandingkan kombinasi perlakuan lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Crockett J.M. 1974. *Flowering House Plants*. Time Life Books. New York.
2. Larouse. 1995. *Complete Guide to Indoor Plant : the most complete and practical colour guide to over 500 conservatory & indoor plant*. Larouse pcl.
3. McHoy P. 1995. *The complete House Plant Book :the essential guide to successful indoor gardening*. Anness Publishing, Ltd. London.
4. Syafni. 2006. Induksi Keragaman Genetik *Gloxinia (Sinningia speciosa. Benth)* melalui Radiasi Sinar Gamma. [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana, IPB.
5. Saraswati R.D. 2006. Pengaruh sinar ultraviolet dan fotoperioda terhadap pertumbuhan dan perkembangan kultur in vitro mawar mini (*Rosa hybrida L.*). Undergraduate Theses dari JBPTITBRI. Bandung: Sekolah Ilmu dan Teknologi hayati. ITB. Bandung.
6. Purwito A., Muklisa P., Maharijaya A. 2005. Perbanyak Ruskus (*Ruscus hypophyllum L.*) secara in vitro. *Bul. Agron.* 33. 2:39-45.
7. Lizawati, Novita T., Purnamaningsih R. 2009. Induksi dan Multiplikasi Tunas Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) Secara *In Vitro*. *Jurnal Agron. Indonesia* 37. 1:78-85.
8. Karjadi A.K., Buchory A. 2007. Pengaruh NAA dan BAP terhadap Pertumbuhan Jaringan Meristem Bawang Putih pada Media B5. *Jurnal Hort.* 17. 3:217-223
9. Moore C.T. 1979. *Biochemistry and Physiology Plant Hormone*. Springer – Verlag New York, Inc. New York.
10. Davies P.J. 2004. *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht Boston London.
11. Nurhayati A.M. 1987. Keseimbangan Konsentrasi Auksin dan Sitokinin dengan Inhibitor Ancymidol pada Perkembangan Bahan Tanaman *Dianthus caryophyllus* Linn secara *In Vitro*. Tesis. Fakultas Pascasarjana IPB. Bogor.
12. Winarsih S.P. 2000. Pengaruh Zat Pengatur Tumbuh Terhadap Pembentukan dan Pengakaran Tunas Mikro pada Asparagus secara *In Vitro*. *Jurnal Hort.* 10. 1:11-17.
13. Catala C, Rose JKC, Bennett AB. 2000. Auxin-Regulated Genes Encoding Cell Wall - Modifying Proteins are Expressed During Early Tomato Fruit Growth - *Plant. Physiol.* 122:527–534.
14. Winarto B. Rianawati S. Herlina D. 2007. Pengaruh Media Regenerasi terhadap Pembentukan Tunas Aksilar dan Adventif pada *Philodendron c.v. Moon Light*. *Jurnal Hort.* 17. 1:8-16.
15. Sri Djayawati. 1993. Pengaruh Penggunaan Air Kelapa Muda dan Hydrasil Terhadap Laju Pertumbuhan Rumput Laut (*Gracilaria verocosa*). Tesis. Jurusan Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan UMI. Ujung Pandang.
16. Mindforum. 2009. <http://www.mindforum.com>. Air Kelapa Pemacu Pertumbuhan dan

Pembungaan Anggrek. Tanggal akses 20 Juli 2010.

17. Patiroi S. 1992. Pengaruh Penggunaan Air Kelapa Muda Terhadap Kelimpahan *Skeletonema costatum*. Tesis. Jurusan Perikanan Universitas Hasanudin. Ujung Pandang.

Penggunaan Kultur Starter Bakteri Asam Laktat pada Pengolahan Sosis Fermentasi Ikan Lele Dumbo yang Diinfeksi *Listeria monocytogenes* ATCC-1194

Happy Nursyam*

Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang

Abstrak

Penggunaan biopreservatif bakteri asam laktat pada bahan makanan sangat efektif dalam mengontrol pertumbuhan bakteri patogen dan mikroorganisme pembusuk. Bakteri asam laktat pada produk fermentasi, selain berperan sebagai biopreservatif juga berperan penting dalam meningkatkan kualitas nutrisi bahan mentah yang difermentasi. Penelitian ini merupakan kajian tentang penggunaan kultur starter *Pediococcus acidilactici*; *Lactobacillus casei*; dan kombinasi *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus casei*; serta tanpa starter kultur sebagai kontrol, terhadap karakter biopreservatif sosis fermentasi ikan lele dumbo yang diinfeksi *Listeria monocytogenes* selama pematangan 28 hari pada suhu inkubasi 15-22 °C. Berdasarkan hasil penelitian diketahui komponen biopreservatif yang dihasilkan didominasi oleh senyawa alkohol, keton, asam-asam lemak, ester dari asam lemak, fenol, benzene, dan senyawa volatil lain. Fenol merupakan senyawa yang terbanyak. Semakin besar rasio C15:0/C17:0 dalam sosis fermentasi ikan lele dumbo, pertumbuhan *Listeria monocytogenes* makin sedikit. Sosis yang difermentasi menggunakan kombinasi *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus casei* starter memiliki rasio C15:0/C17:0 terbesar, dan mampu mematikan pertumbuhan *Listeria monocytogenes*. Rasio C15:0/C17:0 dengan nilai 79,84 merupakan dosis yang mematikan bagi *Listeria monocytogenes* pada suhu inkubasi 15-21,2 °C secara *in vitro*.

Kata kunci: BAL, biopreservatif, Ikan Lele Dumbo, *Listeria monocytogenes*

PENDAHULUAN

Sosis ikan merupakan sebuah produk, yang berasal dari daging ikan segar dicampur dengan beberapa aditif, kemudian dimasukkan ke dalam casing dan diproses melalui pemanasan [1]. Pengolahan sosis ikan mulai berkembang pesat pada tahun 1950 sampai 1975 di Jepang, dan merupakan pengembangan dari industri kamaboko [2]. Perlakuan panas yang diberikan pada pengolahan sosis ikan pada suhu 88 – 90 °C selama 45 menit, belum cukup untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan spora bakteri pembusuk, sehingga pada era tahun 1980 dikembangkan penggunaan suhu tinggi, namun masih terjadi hambatan terutama biaya yang sangat tinggi dan menurunnya karakter tekstur produk akhir [3].

Penggunaan strain bakteri penghasil bakteriosin sebagai kultur starter atau protektif kultur, akhir-akhir ini banyak dikembangkan dan mampu mengontrol keberadaan bakteri patogen

maupun bakteri pembusuk dalam produk pangan siap saji (Hugas, 1995). Kultur strain yang digunakan sebagian besar berasal dari bakteri asam laktat, antara lain *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Carnobacterium*, tetapi penggunaan kultur starter BAL yang tidak tepat belum mampu menghambat pertumbuhan *Listeria monocytogenes* pada sosis [4, 5, 6, 7, 8, 9].

Penggunaan biopreservatif bakteri asam laktat ke dalam sistem pangan terlihat sangat efektif dalam mengontrol pertumbuhan bakteri patogen dan mikroorganisme pembusuk. Bakteri asam laktat pada produk fermentasi, selain berperan sebagai biopreservatif juga penting peranannya dalam meningkatkan kualitas nutrisi bahan mentah yang difermentasi [10]. Penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri patogen dan pembusuk diakibatkan oleh biopreservatif yang diproduksi bakteri asam laktat, seperti asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, diasetil dan bakteriosin [11]. Bakteri yang memproduksi bakteriosin sebagai antimikroba terhadap *Listeria monocytogenes* diantaranya *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus*

* Alamat Korespondensi

Happy Nur Syam

E-mail : happy_nursyam@yahoo.com

Alamat : Jurusan Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Jl.Veteran, Malang

sake, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Carnobacterium piscicola*, *Pediococcus acidilactici*, *Propionibacterium thoenii*, dan *Enterococcus* spp. [10]. Penelitian ini merupakan kajian tentang penggunaan kultur starter *Pediococcus acidilactici* 0094<TGA-3; *actobacillus casei* NRRL-B1992; dan kombinasi *Pediococcus acidilactici* 0094<TGA-3 dan *actobacillus casei* NRRL-B1992; serta tanpa starter kultur sebagai kontrol, terhadap karakter biopreservatif sosis fermentasi ikan lele dumbo yang diinfeksi *Listeria monocytogenes* ATCC-1194 selama 28 hari pada suhu inkubasi 15-22 °C.

METODE PENELITIAN

Kultur bakteri

Pediococcus acidilactici 0094<TGA-3 (PA), *Lactobacillus casei* NRRL-B1992 (LC), dan *Listeria monocytogenes* ATCC-1194 (LM), diperoleh dari PAU (Pusat Antar Universitas) pangan dan gizi, Universitas Gajahmada-Yogyakarta. PA dikultur pada MRS broth (Oxoid) suhu 30 °C, dan *Listeria monocytogenes* pada BHI broth (Oxoid) yang ditambahkan NaCl 3% pada suhu 37 °C. Sel bakteri dipanen setelah 24 jam inkubasi, dan dilarutkan ke dalam pepton 0,1% steril untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.

Preparasi sosis

Lele dumbo segar (*Clarias gariepinus*) yang didapat dari penangkar kota Batu-Jawa Timur dipotong kepalanya, dikuliti dan difilet, kemudian dicincang menggunakan blender (Phillip), selanjutnya *preblending*. Formula sosis untuk 1000 gram lele adalah: NaCl 20 g, sodium nitrat 0,2 g, sodium nitrit 0,1 g, sukrosa 4 g, glukosa 3 g, fruktose 3 g, lada putih 1 g, lada hitam 1 g, lengkuas 0,7 g, jahe 0,7 g, kayu manis 0,6 g, bawang putih 0,5 g, dan cengkeh 0,5 g. Resep tersebut diambil berdasarkan Aryanta, *et al.*, (1991), dengan modifikasi formula dan proses oleh Nursyam, *et al.*, (2006 dan 2007) [12, 13, 14]. Semua bahan tersebut dicampur dengan lele cincang, kemudian ditambahkan kultur starter *P. acidilactici* dan *Lactobacillus casei* masing-masing 10^8 cfuml⁻¹ sebanyak 2 ml untuk 500 g daging. *Listeria monocytogenes* ATCC-1194 masing 2 ml 10^5 cfuml⁻¹ diinokulasikan secara individual kedalam sosis, selanjutnya adonan dimasukkan casing kolagen diameter 2 cm sepanjang 10 cm, pra-inkubasi, pengasapan, dan diinkubasi pada suhu komersial (15-22 °C) selama 28 hari.

Analisa Biopreservatif

Kajian biopreservatif sosis fermentasi ikan lele diamati melalui 2 percobaan yaitu identifikasi

komponen biopreservatif menggunakan GC-MS (Shimadzu 20), dan pengujian *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) biopreservatif terhadap *Listeria monocytogenes* secara *in-vitro*. Pengujian komponen biopreservatif dianalisis dengan menggunakan "*Gas Chromatography Mass Spectrometri*". Sebanyak 2 µL sampel sosis hasil refluksi diinjeksikan dalam GCMS (Shimadzu QP2010S).

Minimum Bactericidal Concentration komponen biopreservatif terhadap *survival* (log) *Listeria monocytogenes*, dianalisis berdasar modifikasi metode dari Nichols *et al.*, (2003) untuk persiapan media, Erkkila *et al.*, (2001) untuk *survival Listeria monocytogenes*; dan Kronvall (1982) untuk penarikan MBC [9, 15, 16]. *Survival Listeria monocytogenes* terhadap rasio C15:0/C17:0 diukur menggunakan metode *spread*, setelah ditaman dan diinkubasi 48 jam pada media TSA-Oxoid 37 °C. Minimum konsentrasi antimikroba bagi *Listeria monocytogenes* dari asam lemak didefinisikan sebagai rasio C15:0/C17:0 yang tidak terdapat pertumbuhan koloni *Listeria monocytogenes* setelah diinkubasi 48 jam pada suhu 37 °C [17].

Analisis Data

Data dianalisis secara deskriptif berdasarkan rerata ± standar deviasi diantara variabel independen percobaan, menggunakan *microsoft excell*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis Kromatogram senyawa volatil dan asam lemak sosis fermentasi ikan lele dumbo, disajikan pada Tabel 1. Data dalam Tabel 1 menunjukkan bahwa fenol dan derivat fenol merupakan komponen terbanyak pada semua jenis sosis. Hal ini disebabkan fenol adalah senyawa *pyrolisis* dari lignin tempurung kelapa yang mampu terikat dalam asam-asam lemak. Hamm (1977) menyatakan bahwa semakin tinggi keasaman suatu produk, makin tinggi fenol yang terikat [18]. Terbentuknya senyawa metil-palmitat pada sosis, diduga akibat interaksi antara asam palmitat (C16:0) dengan minyak atsiri yang terkandung dalam ketumbar. Harris *et al.*, (1989) menyatakan bahwa ketumbar (*Coriandrum sativum*) mengandung 0,5% - 1% minyak atsiri [6].

Sosis yang difermentasi menggunakan kombinasi *Ped. acidilactici* dan *Lb. casei* starter (kolom VI) mengandung lebih banyak senyawa alkohol, asam, phenol, dan benzene. Sosis yang difermentasi menggunakan kultur starter *Ped.*

acidilactici (kolom V) lebih banyak mengandung senyawa keton; sedangkan indigenous sosis (kolom IV) lebih banyak pada senyawa ester. Apabila dibandingkan dengan *reference* (kolom III), sebagian besar masih berada dibawahnya, kecuali phenol, asam lemak, dan toluene. Komponen *volatil* dan asam lemak pada sosis fermentasi ikan lele dumbo ini rendah diduga enzim eksogeneus (protease dan lipase) dari BAL tidak cukup untuk memunculkan *volatil* dan asam lemak yang lebih banyak.

Senyawa *volatil* dan asam lemak sosis fermentasi terbanyak adalah fenol, kemudian keton, asam lemak, ester, fenol, benzene, alkohol, dan *benzene acetic acid* (Tabel 1.). Montel *et al.* (1999), menyatakan *volatil* dan asam lemak dibentuk oleh reaksi enzimatik (glikolisis, proteolisis, oksidatif deaminasi, transaminasi, dan dekarboksilasi) atau proses kimia (oksidasi lemak, degradasi protein, dan reaksi Maillard) yang terjadi selama pematangan sosis [19].

Tabel 1. Data kadar senyawa *volatil* dan asam lemak (ppm) sosis fermentasi ikan lele dumbo pada akhir inkubasi

No.	Komponen <i>volatil</i> dan asam lemak	Rumus Molekul	Referen	<i>Listeria monocytogenes</i>						
				Tanpa Starter Kultur Sosis			Diinfeksi			
				Indigenus	PA	PA+LC	Indigenus	PA	PA+LC	
I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX		
1.	Alkohol	Furyl alkohol	C ₅ H ₆ O ₂	191 ^b	14	15.5	9	17	11,5	29
		Ethanol	C ₈ H ₁₀ O	44 ^a		24	31	33.6	31,5	55
2.	Keton	JUMLAH			14	39.5	40	50.6	43	84
		Corylone	C ₆ H ₈ O ₂	276 ^a	56	72.5	65	55	52,5	55,5
		3-Ethyl-2-hydroxy-2-cyclopentene-1-one	C ₇ H ₁₀ O ₂	Nd	27	32	31.5	28	31,5	6
3.	Fatty Acids	3-Decen-2-one; ethanon	C ₁₁ H ₂₁ N O	Nd	13.5	20	12.5	16.8	15,5	19
		JUMLAH			96.5	124.5	109	99.8	99,5	80,5
		Pentadecanoic acid	C ₁₅ H ₃₀ O ₂	37 ^a	430	418	588.5	494.5	588	192,5
		Hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	186 ^a	222.5	162	186	171.5	228,5	141
4.	Ester - Fatty acid	JUMLAH			652,5	580	774,5	666	814,5	333,5
		Hexadecanoic acid; Methyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	209 ^a	254	138	40,5	128	116.5	-
5.	Phenol	Dodecanoic acid; Ethyl ester	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	351 ^b	44,5	28	46	46.5	48,5	52,5
		JUMLAH			298,5	166	86,5	174,5	165	52,5
6.	Benzene	Phenol	C ₆ H ₆ O	121 ^a	1529	1738,5	1656	1512	1483,5	1516
		Guajol	C ₇ H ₈ O ₂	182 ^b	383	397	361,5	366,5	380,5	465
		Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	99 ^b	445,5	426,5	435,5	486,5	458	586,5
		Isoeugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	207 ^a	131	110,5	95,5	125	103	155,5
		2-methoxy-4-methyl-phenol	C ₈ H ₁₀ O ₂	264 ^b	221,5	218	199	220	207,5	272
		4-ethyl-2-methoxy-phenol	C ₉ H ₁₂ O ₂	654 ^b	139	134	118	156	133,5	186
		4-methyl-phenol	C ₇ H ₈ O	52 ^a	124,5	136,5	132	139,5	136	145
		3-methyl-phenol	C ₇ H ₈ O	123 ^a	70,5	74,5	78,5	75	68,5	76
7.	Various <i>volatil</i>	2-methyl-phenol	C ₇ H ₈ O	93 ^a	70	59,5	68	75	75	88,5
		JUMLAH			3114	3295	3144	3155,5	3045,5	3490,5
		Toluene	C ₆ H ₆ O ₄ S	24 ^a	160,5	180,5	173	170	174,5	182,5
Rasio	C15:0/C17:0	Syringol	C ₈ H ₁₀ O ₃	152 ^b	644,5	609	646	661	624,5	658,5
		JUMLAH			805	789,5	819	831	799	841
		Benzene acetic acid	C ₁₁ H ₁₄ O ₄	93 ^b	14,5	5,5	13,5	16,5	15	25,5

Keterangan:

LM : *Listeria monocytogenes*

PA : *Pediococcus acidilactici*

LC : *Lactobacillus casei*.

^a) : Schmidt dan Berger (1998)

^b) : Ansoerena, *et al.* (2000)

Nd : No data

^{*}) : Tidak terhitung

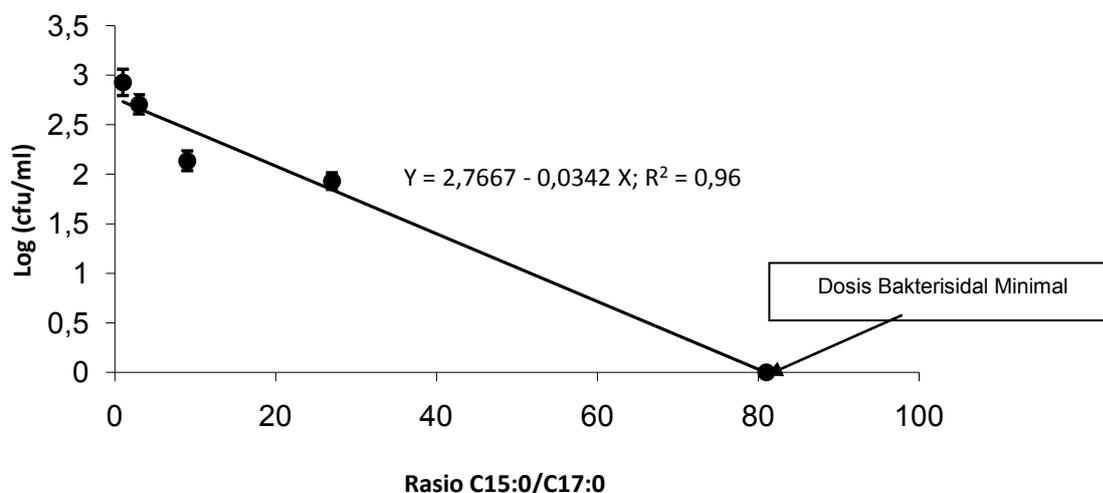
Metil palmitat sosis kombinasi *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus casei* starter (tanpa diinfeksi *Listeria monocytogenes*) lebih kecil dibanding sosis indigenous dan *Ped. acidilactici* starter. Begitu juga yang diinfeksi *Listeria monocytogenes*, kecuali sosis kombinasi *Ped. acidilactici* dan *Lb. casei* starter (kolom IX) tidak dijumpai senyawa *hexadecanoic acid-metil ester* (metil palmitat). Menurut Sasser (1990), metil palmitat terletak diantara prokariot *Listeria monocytogenes* [20]. Welch (1991), menyatakan bahwa *L. monocytogenes* dikarakterisasi oleh ranting ikatan CFAs yang panjangnya 15 dan 17 [21]. *Listeria monocytogenes* disusun oleh C₁₅ dan C₁₇ sebagai komponen utama, dan 88% asam lemak yang terkandung bersifat polar-lipid, 46% sebagai anteiso C15:0; 24% sebagai anteiso C17:0; dan 11% sebagai iso C15:0 [22]. Persentase komponen C17:0 meningkat linier seiring dengan peningkatan pertumbuhan pada kondisi lingkungan yang sesuai [15].

Semakin besar rasio C15:0/C17:0 pada sosis fermentasi, semakin sedikit kandungan *Listeria monocytogenes* (Tabel 1) pada sosis fermentasi. Hal ini mengindikasikan hidro-fobisitas berperan dalam transportasi lipid ke dalam membran sel *Listeria monocytogenes*. Tabel 5.19 (kolom VI) tertera bahwa rasio C15:0/C17:0 lebih besar dibanding indigenous dan *Ped. acidilactici* starter (kolom IV dan V). Keadaan ini menyebabkan karakter C15:0 yang kurang hidrofobik dibanding C17:0 berperan semakin kuat, sehingga transfer lipid melalui membran fosfolipid *Listeria monocytogenes* menjadi berkurang. Kondisi ini memperkuat hasil percobaan 8 (Gambar 1), bahwa *Listeria monocytogenes* tidak mampu

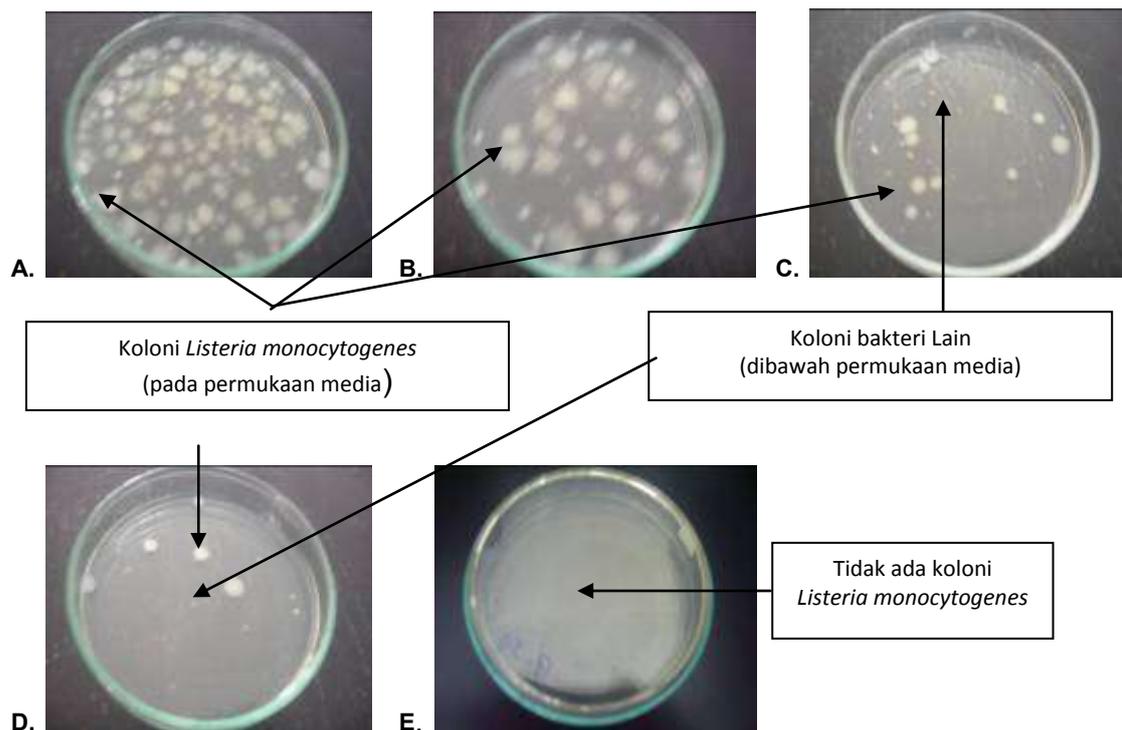
beraktifitas, dan akhirnya mati. Rasio 1,69 pada indigenous sosis (kolom IV) adalah paling hidrofobik dibanding lainnya, sehingga *Listeria monocytogenes* dapat tumbuh dan berkembang biak (Tabel 1).

Membran sel bakteri gram negatif terdiri dari *bilayer fosfolipid* [23]. Semakin berkurang karakter hidrofobik asam lemak C15:0/C17:0 semakin sulit menembus fosfolipid bilayer. Membran fosfolipid terdiri dari rantai *acyl* yang bersama-sama membentuk kesatuan yang kuat dan molekul air mampu berpenetrasi ke dalamnya. Protein dikirim kedalam membran melalui matriks fosfolipid, juga di degradasi dan dikeluarkan dari membran dengan adanya enzim proteolitik [21]. Komposisi dan tipe asam lemak bakteri dibedakan pada derivat rantai karbon dari gliserol. Derivat yang terbentuk adalah *dimetil acetat* dan *metil ester* [25].

Perubahan rasio protein atau lemak dan asam lemak jenuh atau tidak jenuh dalam membran lipid *L. monocytogenes*, dapat mempengaruhi fluiditas membran fosfolipid [22]. Oleh karena ketersediaan *hexadecanoic acid* (Tabel 1) pada sosis yang difermentasi dengan kombinasi kultur starter *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus casei* (kolom VI) lebih kecil dibanding dua sosis lainnya (kolom IV dan V) menyebabkan *Listeria monocytogenes* tidak dijumpai pada akhir fermentasi (kolom IX). Hal ini sesuai dengan pernyataan Mastronicolis, *et al.* (1996), bahwa penurunan proporsi C17:0 anteiso berpengaruh terhadap aktifitas transpor dalam membran lipid, sehingga tidak tercapainya rasio C15:0/C17:0 yang seharusnya 1,5 menyebabkan penurunan pertumbuhan *L. monocytogenes* [24].



Gambar 1. Plot kuadrat penghambatan kelangsungan hidup (log) *Listeria monocytogenes* terhadap rasio C15:0/C17:0.
- : data pengamatan. Bar adalah SD.



Gambar 2. Koloni *Listeria monocytogenes* pada media blood agar; Merck (Pengenceran 10^{-1}). Rasio C15:0/C17:0 = 1 (A); 3 (B); 9 (C); 27 (D); dan 81 (E). Foto diambil pada 48 hari inkubasi menggunakan kamera digital "Logitech" 510.

Hasil pengujian rasio C15:0/C17:0 terhadap kelangsungan hidup *Listeria monocytogenes* yang diinkubasi pada suhu 15-21,2 °C, terdapat pada Gambar 1 dan 2. Berdasarkan persamaan garis regresi pada Gambar 1, diperoleh bahwa rasio C15:0/C17:0 dengan nilai 79,84 merupakan *Minimum Bactericidal Concentration* bagi *Listeria monocytogenes*, dan pada rasio tersebut tidak ditemukan pertumbuhan *Listeria monocytogenes*.

Hal ini diduga semakin panjang rantai atom C dari asam-asam lemak, solubilitasnya semakin menurun, dan semakin sulit menembus membran sitoplasma. Semakin hidrofobik asam-asam lemak masih cukup untuk berinteraksi dengan hidrofobik protein dan lemak-lemak pada permukaan sel bakteri. Nichols *et al.* (2002) menyatakan bahwa suhu inkubasi berpengaruh terhadap pertumbuhan serta kebutuhan C15:0 dan C17:0 bagi *Listeria monocytogenes* [15]. Pertumbuhan *L. monocytogenes* pada suhu inkubasi 15-21,2 °C adalah pada fase lag. Kebutuhan C17:0 lebih tinggi dibanding C15:0. Komposisi asam-asam lemak C17:0 *Listeria monocytogenes* dibedakan menjadi 3 region, yaitu *supraoptimal* (42 dan 45°C); *optimal* (37°C); dan *suboptimal* (30, 20, 10, dan 5 °C) [22]. Ross *et*

al. (2000), menyatakan bahwa C15:0 merupakan agen aktifitas membran sel dan dalam konsentrasi tinggi akan merusak fungsi membran sitoplasma, sehingga sel *Listeria monocytogenes* mati [26]. Asam-asam lemak mempengaruhi permeabilitas sel dan transpor nutrisi. Sejumlah mikromol asam-asam lemak dapat berpengaruh terhadap aktifitas enzim dalam membran sel. Asam lemak *polyunsaturated* juga dilaporkan menghambat mikroba melalui autooksidasi dan formasi peroksida [27]. Knapp and Melly (1986) melaporkan bahwa pengaruh bakterisidal dari asam lemak *polyunsaturated* dijumpai oleh proses peroksidasi yang melibatkan hidrogen peroksida, dan ion Fe dari bakteri. Penelitian yang dilakukan ini memperlihatkan bahwa C15:0 lebih menghambat *Listeria monocytogenes* dibandingkan C17:0, hal ini berhubungan dengan mekanisme peroksidasi [28].

KESIMPULAN

Semakin besar rasio C15:0/C17:0 dalam sosis fermentasi ikan lele dumbo, pertumbuhan *Listeria monocytogenes* makin sedikit. Sosis yang difermentasi menggunakan kombinasi *Pediococcus acidilactici* dan *Lactobacillus casei* starter memiliki rasio C15:0/C17:0 terbesar, dan

mampu mematkan pertumbuhan *Listeria monocytogenes*. Rasio C15:0/C17:0 dengan nilai 79,84 merupakan dosis antilisterial (*Minimum Bactericidal Concentration*) pada suhu inkubasi 15-21,2 °C secara *in-vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Choupohuk,P., N. Raksakulthai, and Worawattanamateekul, 2001. Process Development of Fish Sausage. *Int. Journal of Food Properties*. 4 (3): 523 – 529.
2. Kurokawa,T., 1979. Kamaboko-forming ability of frozen and ice stored lizard fish. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 45:1551 –1555.
3. Raju, C.V., Shamasundar, B.A., and Udupa, K.S., 2003. The Use of Nisin as a Preservative in Fish Sausage Stored at Ambient (28 °C) and refrigerated (6 °C) Temperature. *Journal of food Sci.* (38): 171-185.
4. Hugas,M., M.Garriga, T. Aymerich, and J.M.Montfort, 1995. In-hibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 322– 330.
5. Sobrino, O.J., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Fernandez, M.F., Sanz, B., Hernandez, P.E., 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 13, 1– 10.
6. Harris, L.J., Daechel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R., 1989. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 53, 384–387.
7. Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 39–86.
8. Muriana PM, Klaenhamer TR., 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
9. Erkkila, S, Petaja, E. 2001. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Sci.* 55: 297-300.
10. Loessner, M., S. Guenther, S. Steffan, and S. Scherer., 2003. A Pediocin-Producing *Lactobacillus plantarum* Strain Inhibits *Listeria monocytogenes* in a Multispecies Cheese. *J. App. Environ. Microbiology.* 69: 1854–1857.
11. Carvalho, A.A., R.A. Paula, H.C. Mantovani, C.A. Moraesa, 2005. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium. *International Journal of Food Microbiology* 59, 301– 309
12. Aryanta, R.W., Graham H. Fleet and Ken A. Buckle, 1991. The occurrence and growth of microorganisms during the fermentation of fish sausage. *International Journal of Food Microbiology.* 13: 143-156.
13. Nursyam, H, S.B Widjanarko, Sukoso, and Yunianta., 2006. Combination of *Pediococcus acidilactici* 0110<TAT-1 and *Lactobacillus casei* NRRL-B1922 starter on the Microbiological characteristic of Clarias Catfish Fermented Sausage which Infected by *Listeria monocytogenes* ATCC-1194. National fisheries science seminar, Agriculture Faculty, Gajah Mada University, July 26th 2006.
14. Nursyam, H, S.B Widjanarko, Sukoso, and Yunianta., 2007. The use of *Pediococcus acidilactici* 0110<TAT-1 Starter on Catfish Fermented Sausage which Infected by *Escherichia coli* IFO-3301 and *Listeria monocytogenes* ATCC-1194. National fisheries science seminar, Fisheries Faculty-UB, Apryl 24th 2007.
15. Nichols, D.S., K.A. Presser, J.Olley, T. Ross, and T.A. McMeekin, 2002. Variation of Branched-Chain Fatty Acids Marks the Normal Physiological Range for Growth in *Listeria monocytogenes*. *Appl. and Environmental Mic.* p. 2809–2813.
16. Kronval, G., 1982. Analysis of single reference strain for determination of gentamicin regression line constants and inhibition zone diameter breakpoints in quality control of disk diffusion antibiotic susceptibility testing. *J. Clin. Microbiol.* 16(5) 734-793.
17. Wang L.L., and E.A. Johnson., 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *App. Environ. Microbiology.* 12: 624-629.
18. Hamm. 1977. Analysis of Smoke and Smoken Foods. *Pure and Apl.Chem.* Pangomon Press. 49:1665-1666.
19. Montel, M., Reitz, J., Talon, R., Berdagué, J. and Rousset-Akrim, S., 1999. Biochemical activities of *Micrococcaceae* and their effects on the aromatic profiles and odours of a dry sausage model. *Food Microbiol.* 13: 489-499.
20. Sasser, M. 1990. Identification of bacteria through fatty acid analysis, p. 199-204. In Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands ed.), *Methods in phytobacteriology.* Akademiai Kiado, Budapest.
21. Welch, D.F., 1991. American Society for Microbiology Applications of Cellular Fatty

- Acid Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, Oct. 1991, p. 422-438.
22. Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, and B. J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3887–3894.
 23. Gutierrez, J.A., 1999. Mechanisms conferring a *Rhodococcus* species with high resistance to benzene. School of Microbiology. UNSW. Australia. Pp. 242.
 24. Mastronicolis, S. K., J. B. German, and G. M. Smith. 1996. Diversity of the polar lipids of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Lipids* 31:635–640.
 25. Weintraub, A., U. Zahringer, H.-W. Wollenweber, U. Seydel, and E. T. Rietschel. 1989. Structural characterization of the lipid A component of *Bacteroides fragilis* strain NCTC 9343 lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 183:425-431.
 26. Ross, J.A., Dalgaard., 2002. Dietary flavonoids, bioavailability, metabolic effect and safety. *Ann. Rev. Nutr.* 22: 19-34.
 27. Greenway, D. L. A., and K. G. H. Dyke. 1979. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 115:233-245.
 28. Knapp, H. R., and M. A. Melly. 1986. Bactericidal effect of polyunsaturated fatty acids. *J. Infect. Dis.* 154:84-94

Biosistem Pertanian Apel Lokal Malang

Dian Siswanto, Irfan Mustafa, Gustini Ekowati, Muhamad Imam, Endri Purnomo

Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang, Indonesia

Abstrak

Biosistem yang digambarkan pada hasil observasi di sini adalah suatu keadaan faktor biotik dan abiotik pada pertanian apel yang tidak terbatas pada suatu nilai yang tetap. Data yang diperoleh dari tiga tahapan penelitian ini diharapkan dapat dipergunakan sebagai informasi yang mendukung upaya konsevasi pertanian apel. Tahapan penelitian tersebut meliputi evaluasi nutrisi makro tanah dan tanaman, formulasi pengomposan kotoran sapi diperkaya (menggunakan bakteri indigenus) dan eksplorasi tanaman penutup tanah pertanian apel. Kandungan beberapa nutrisi makro untuk tanah pertanian apel Bumiaji menunjukkan nilai rata-rata yang berada pada kisaran sedang dan tinggi. Hasil analisis makro nutrisi daun apel yang kemudian dibandingkan dengan standar menurut *Utah Fertilizer Guide* menunjukkan bahwa makro nutrisi N, P, Ca berada pada status normal, K berada pada status kurang dan Mg berlebih. Ketersediaan nutrisi di tanah dapat dipelihara dengan penambahan kompos. Kotoran sapi yang diperkaya dengan bakteri indigen mampu mendekomposisi kotoran sapi dalam waktu 2-3 minggu. Proses dekomposisi kotoran sapi berlangsung lebih cepat pada pemberian bakteri indigenus yang mempunyai kemampuan selulolitik dan sekaligus proteolitik serta amilolitik apabila dibandingkan kontrol yang tanpa pemberian inokulum bakteri. Pada pertanian apel di Poncokusumo, kondisi lahan dengan sistem penyiangan cs (cukup sering) dan sj (sangat jarang) tampak lebih stabil daripada ss (sering sekali) berdasarkan nilai ID (indek diversitas), DR (dominansi relatif) dan INP (indek nilai penting). Hal ini diperjelas oleh nilai biomassa tanaman. Biomassa yang lebih tinggi menyebabkan suhu tanah yang lebih rendah karena jumlah TPT yang banyak mempunyai konsekuensi mengandung banyak air pada jaringannya.

Kata kunci: Apel, nutrisi makro, kompos diperkaya, tanaman penutup tanah

PENDAHULUAN

Apel (*Malus sylvestris* Mill) merupakan produk buah-buahan unggulan di Malang Raya dan telah menjadi ikon pariwisata daerah. Namun, produk unggulan lokal tersebut mulai menghadapi tantangan serius terutama sejak masuknya produk impor. Ukuran buah apel lokal yang relatif kecil, permukaan buah yang terkadang kusut, rasa dan aroma buah yang terkadang juga masam, serta warna buah yang kurang menarik menjadi kendala utama untuk bersaing dengan produk impor. Meningkatnya volume buah apel impor ke pasar semakin menurunkan harga jual apel lokal. Sudah hampir delapan tahun para petani selalu merugi akibat harga apel yang terus merosot. Harga apel yang melemah membuat banyak petani apel yang telah mencabut pohon apelnya dan mengganti lahannya dengan tanaman sayur [1]. Hal ini

berpotensi menghilangkan ikon pariwisata daerah. Oleh karena itu diperlukan suatu upaya konservasi tanaman apel supaya tanaman tersebut tidak menjadi langka.

Para petani mengembangkan sistem pertanian apel berdasarkan pengetahuan yang mereka miliki secara turun temurun. Seiring dengan perkembangan teknologi pemupukan, sistem pertanian apel lokal malang menggabungkan kearifan tradisional dengan sistem pertanian intensif. Bagaimanapun, sistem pertanian apel lokal yang telah berjalan ini perlu dievaluasi kelebihan dan kekurangannya sehingga dapat dilakukan perbaikan sistem yang melibatkan partisipasi masyarakat petani secara aktif sebagai suatu upaya mengkonservasi pertanian apel.

Selama ini, petani selalu memberikan pemupukan NPK secara rutin tanpa mengetahui kandungan mineral tersebut di tanah, meskipun pupuk kandang juga masih digunakan. Pengetahuan tentang kandungan mineral tanah sangat penting diketahui sebelum adanya pemupukan karena tanaman membutuhkan nutrisi dalam konsentrasi tertentu untuk

* Alamat korespondensi penulis:

Dian Siswanto

E-mail : diansiswanto@brawijaya.ac.id

Alamat : Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

mendapatkan pertumbuhan yang optimum. Kekurangan atau kelebihan nutrisi di tanah justru akan mengganggu pertumbuhan tanaman sehingga kualitas buah juga akan terpengaruh. Adapun perbaikan kualitas tanah dapat dilakukan dengan penambahan kompos yang dapat dibuat sendiri oleh petani dari bahan baku kotoran sapi. Umumnya, para petani apel di Malang Raya terutama di Kecamatan Poncokusumo juga beternak sapi selain berkebun. Kotoran sapi yang dihasilkan bisa dimanfaatkan sebagai bahan baku organik untuk pembuatan kompos. Sebagian petani apel di Kecamatan Poncokusumo telah melakukan pengomposan kotoran sapi. Namun proses pengomposan berlangsung hingga berbulan-bulan sehingga kotoran sapi yang sedang mengalami pengomposan nampak menumpuk. Proses pengomposan yang berlangsung lama tersebut bisa dipersingkat dengan pengayaan bakteri pada kotoran sapi.

Selain sistem pemupukan, sistem pengaturan tanaman penutup tanah pada tanaman apel juga sangat menarik. Pertanian apel lokal banyak dijumpai menggunakan tiga sistem penyiangan yang berbeda, yaitu dengan frekuensi sangat sering (ss) karena pertanian apel dikombinasikan dengan tanaman palawija (diantaranya adalah kacang tanah), cukup sering (cs) untuk pengkombinasian tanaman apel dengan tanaman jagung dan pohon sengon serta sangat jarang (sj) yang menyebabkan lahan apel banyak ditumbuhi rerumputan. Perbedaan sistem ini menyebabkan perbedaan komposisi tanaman penutup tanah (TPT) yang sangat menarik untuk dikaji nilai relatif dari kerapatan, frekuensi dan dominansinya sehingga didapatkan Indeks Nilai Penting (INP) yang dapat digunakan dalam pendugaan sifat habitat dari lingkungan yang diduduki vegetasi tersebut serta memperkirakan kondisi lingkungan yang bersangkutan.

METODE PENELITIAN

Data yang dituliskan dalam studi kasus biosistem pertanian apel lokal Malang ini didapatkan dari tiga tahapan penelitian. Tahapan penelitian tersebut meliputi: evaluasi nutrisi makro tanah dan tanaman, formulasi pengomposan kotoran sapi diperkaya (menggunakan bakteri indigenus) serta eksplorasi tanaman penutup tanah pertanian apel.

Penelitian evaluasi nutrisi makro tanah dan tanaman dilakukan di Laboratorium Tanah Jurusan Pertanian, Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Universitas Brawijaya serta lahan pertanian apel di Kecamatan Bumiaji, Batu.

Pengambilan contoh tanah dan daun apel dilakukan sebanyak tiga kali, dua kali pada bulan Mei dan satu kali pada bulan September 2007. Pengambilan contoh dilakukan secara komposit dengan tiga kali ulangan. Contoh tanah diambil berdasarkan *Utah Fertilizer Guide* untuk lahan pertanian yang seragam dengan kedalaman 0-12 inci (*Sampling Uniform Field*) sedangkan contoh daun diwakili oleh daun keempat termuda dari sebuah cabang [11]. Masing-masing contoh tanah dan daun dianalisis kandungan N, P, K, Ca dan Mg. Kandungan N diukur menggunakan metode *Kjeldahl*, P menggunakan metode *Olsen*, metode HCl 25% untuk K, Ca dan Mg dianalisis menggunakan metode kapasitas tukar kation.

Penelitian formulasi pengomposan kotoran sapi menggunakan bakteri indigenus berlangsung mulai bulan Agustus sampai dengan bulan Desember 2009 dan dilaksanakan di lahan pertanian apel Pandansari, Kecamatan Poncokusumo. Bakteri selulolitik, amilolitik, dan proteolitik diisolasi dari kotoran sapi menggunakan media *CMC broth*, media *starch broth*, dan media *skim broth*. Masing-masing suspensi tersebut diaerasi dengan menggunakan shaker dengan kecepatan 120 rpm pada suhu ruang selama 48 jam kecuali untuk selulolitik masa inkubasinya diperlama hingga 7 hari. Setelah inkubasi selesai, dilakukan pencawanan (metode *pour plate*) dengan menginokulasikan 1 ml suspensi dari masing-masing media. Pengujian potensi selulolitik, amilolitik, dan proteolitik dilakukan secara kualitatif dengan metode total, yaitu mengukur indeks zona bening di sekitar koloni yang tumbuh pada media selektif. Visualisasi indeks zona bening dilakukan dengan menggunakan pewarna *Congo red* (1 mgml^{-1}) untuk selulolitik dan reagen Iodium untuk amilolitik. Isolat yang memiliki indeks zona bening terbesar dipilih sebagai inokulum untuk proses dekomposisi. Stok inokulum dibuat dengan menginokulasikan 1 oose isolat yang sudah diremajakan ke media 2% molase *broth* dan diaerasi dengan menggunakan *shaker* berkecepatan 120 rpm selama 48 jam. Kemudian, semua stok inokulum diinokulasikan menjadi satu ke dalam media produksi inokulum 3% molase *broth* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 72 jam. Volume stok yang diinokulasikan sebanyak 10% dari media produksi inokulum. Selanjutnya kultur dalam media produksi inokulum tersebut digunakan sebagai starter untuk proses pengomposan (dekomposisi) kotoran sapi dan serasah tanaman. Densitas starter yang digunakan adalah sebesar 10^8 cfuml^{-1} . Inokulum

sebanyak 10% dari bahan baku kompos dicampur merata dengan bahan baku kompos. Bahan baku kompos yang digunakan adalah 95 kg kotoran sapi dan 5 kg serasah. Sebagai kontrol dilakukan pengomposan tanpa pemberian inokulum. Masing-masing perlakuan tersebut dilakukan perulangan sebanyak 3 kali. Selama proses pengomposan berlangsung dijaga kadar airnya supaya berada di kisaran 40% dengan penambahan air. Suhu, pH, CN rasio, dan kandungan organiknya diamati sampai proses pengomposan selesai. Setiap empat hari kompos dibalik untuk mencegah terbentuknya kondisi anaerob. Kompos yang sudah jadi kemudian diujicobakab terhadap bibit apel.

Eksplorasi tanaman penutup tanah pertanian apel dilakukan pada bulan Mei 2010 di lahan apel yang sudah ditentukan sebelumnya, meliputi lahan tanaman apel dengan sistem penyiangan ss, cs dan sj. Setiap lahan ditentukan 3 lokasi sampling secara acak. Metode analisis vegetasi yang dilakukan menggunakan metode Garis Menyinggung sepanjang 2 m diambil secara acak. Keragaman dan kepadatan setiap TPT pada setiap lokasi sampling ditentukan dengan cara menghitung semua jenis dan jumlah tanaman yang dilalui oleh garis yang sudah dipasang dan dicatat datanya. Contoh setiap tanaman yang ditemukan diberi label, dan disimpan kemudian dilakukan determinasi menggunakan nama lokal yang sering digunakan oleh petani apel di Poncokusumo. Suhu tanah setiap lokasi diukur menggunakan termometer digital. Dibuat plot kecil dengan ukuran 25 cm x 25 cm untuk pengambilan sampel semua tanaman yang ada di dalam plot tersebut kemudian dianalisis biomasnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ketersediaan nutrisi di dalam tanah akan mempengaruhi keberadaan nutrisi tersebut di dalam jaringan tanaman. Hubungan antar ketersediaan nutrisi di tanah dengan di tanaman dapat disimpulkan apabila pengukuran sifat kimia tanah telah dilakukan secara temporal dan berkesinambungan sebelum dilakukan pengukuran kandungan nutrisi tersebut di jaringan tanaman. Kandungan beberapa nutrisi makro untuk tanah pertanian apel Bumiaji menunjukkan nilai rata-rata yang berada pada kisaran sedang dan tinggi. Hal ini berbeda dengan data sifat tanah Poncokusumo yang digunakan sebagai pembanding. Pada lahan Poncokusumo, semua parameter cenderung rendah, kecuali N dan K (tabel 1).

Tabel 1. Sifat Kimia Tanah Pertanian Apel Lokal Malang

Parameter	Lahan Bumiaji, Batu		Lahan Poncokusumo, Malang *)
	Mei 2007	September 2007	
N (%)	0.26	0.26	0.203
P (ppm)	136.24 (P Bray1)	306.6 (P. Bray1)	11.635
K (me/100g)	2.36	18.3	1.5
Ca (me/100g)	7.84	9.93	1.76
Mg (me/100g)	5.28	1.85	3.22

Keterangan: *) analisis tahun 2004 [12]

Intrepretasi ketersediaan nutrisi pada tanaman dapat dilakukan berdasarkan jumlah nutrisi yang ada pada daun (data lengkap tidak ditampilkan). Hasil analisis makro nutrisi daun yang kemudian dibandingkan dengan standar menurut *Utah Fertilizer Guide* menunjukkan bahwa makro nutrisi N, P, Ca berada pada status normal, K berada pada status kurang dan Mg berlebih [11]. Gejala kekurangan makronutrisi kalium tidak dapat terdeteksi dengan cepat. Gejala awal yang mungkin terjadi adalah pengurangan kecepatan pertumbuhan kemudian klorosis dan nekrosis akan muncul sesudahnya, adapun pengaruh yang muncul pada buah adalah berkurangnya tingkat keasaman apel. Kekurangan kalium juga menyebabkan berkurangnya ketahanan tanaman terhadap kekeringan dan memudahkan tanaman terserang berbagai fungi patogen [13]. Berbeda dengan status makro nutrisi kalium yang kurang, magnesium berada pada status lebih. Pada tumbuhan, magnesium merupakan makro nutrisi yang berfungsi sebagai aktivator reaksi enzimatik dan juga merupakan komponen utama dari molekul klorofil [14]. Tidak ada gejala-gejala khusus yang disebabkan langsung oleh kelebihan magnesium. Magnesium yang berlebih di dalam jaringan tanaman dapat menghambat penyerapan kalsium, kalium dan kadangkala menghambat penyerapan besi [15].

Ketersediaan nutrisi di tanah dapat dipelihara dengan penambahan kompos. Petani seringkali menambahkan kotoran sapi yang sudah kering pada tanaman apelnnya. Pengomposan kotoran sapi akan menyediakan bentuk anorganik yang lebih mudah diserap oleh tanaman. Kotoran sapi yang diperkaya dengan bakteri indigen mampu mendekomposisi kotoran sapi dalam waktu 2-3 minggu. Proses dekomposisi kotoran sapi berlangsung lebih cepat pada pemberian bakteri indigenus dibandingkan kontrol yang tanpa pemberian inokulum bakteri.

Isolasi bakteri dari kotoran sapi dengan menggunakan tiga jenis media mendapatkan empat koloni berbeda pada media Skim agar, empat koloni berbeda pada media *Starch* agar, dan delapan koloni berbeda pada media CMC agar. Masing-masing koloni yang terdeteksi tersebut dipisahkan dari koloni lainnya ke mediana masing-masing di cawan petri. Kemudian dilakukan seleksi dengan mengamati keberadaan zona bening yang merupakan aktivitas enzimatik ekstraselular. Seleksi tersebut menunjukkan bahwa dari empat koloni berbeda yang terisolasi sebelumnya pada media Skim agar, hanya dua koloni yang menunjukkan adanya zona bening. Sedangkan dua koloni berbeda pada *Starch* agar, keduanya menunjukkan adanya zona bening. Delapan koloni berbeda yang terisolasi pada media CMC agar, hanya lima koloni yang menunjukkan adanya zona bening.

Tabel 1. Uji silang untuk mendeteksi kemampuan dekomposisi berbagai senyawa.

Isolat bakteri	Media CMC	Media starch	Media skim
Proteolitik 1	-	-	+
Proteolitik 2	-	-	+
Amilolitik 1	-	+	-
Amilolitik 2	-	+	+
Selulolitik 1 (S1)	+	+	+
Selulolitik 2 (S2)	+	+	+
Selulolitik 3 (S3)	+	+	+
Selulolitik 4 (S4)	+	+	+
Selulolitik 5 (S5)	+	+	+

Keterangan:

- (-) : tidak menunjukkan adanya zona
- (+) : menunjukkan adanya zona bening

Semua isolat bakteri yang menunjukkan adanya zona bening dipilih untuk menjadi subjek dalam uji silang. Jadi bakteri proteolitik yang tumbuh di media Skim agar juga dikulturkan di media *Starch* agar dan CMC agar untuk mengetahui potensinya dalam mendegradasi *Starch* dan CMC (selulosa). Begitu juga untuk bakteri amilolitik (yang terisolasi dari *Starch* agar) dan bakteri selulolitik (yang terisolasi dari CMC agar) dikulturkan di media berbeda dari media isolasinya. Adapun hasil yang diperoleh ditampilkan pada Tabel 1. Berdasarkan hasil uji silang tersebut, diputuskan bahwa bakteri yang digunakan sebagai inokulum untuk proses pengomposan adalah kelima bakteri selulolitik tersebut. Hal ini disebabkan karena hanya kelima bakteri selulolitik tersebut yang memiliki

kemampuan untuk mendegradasi protein, amilum, dan selulosa sekaligus.

Uji kualitatif aktivitas selulolitik dilakukan terhadap kelima isolat terpilih. Isolat ditumbuhkan pada media CMC agar kemudian diukur selisih luas keseluruhan zona bening dengan luas koloninya. Hasil pengukuran selisih luas tersebut menunjukkan bahwa kelima isolat memiliki kemampuan berbeda dalam menghasilkan enzim selulolitik (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil pengukuran uji kualitatif aktivitas selulolitik dari kelima isolat

Isolat	Selisih luas zona bening (mm ²)
S1	283
S2	153
S3	207
S4	59
S5	302

Pada saat awal penambahan inokulum bakteri dengan bahan baku kompos yang lain, suhu yang teramati adalah 24 °C. Selanjutnya, terjadi peningkatan suhu secara signifikan pada hari pertama yaitu mencapai 42 °C yang merupakan suhu tertinggi pada perlakuan. Sedangkan, pada kontrol juga mengalami hal yang sama namun panas yang dihasilkan hanya mencapai 40 °C. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas mikroba dalam mendegradasi bahan baku kompos baik pada perlakuan maupun pada kontrol. Aktivitas tersebut dilakukan oleh mikroba indigen yang berasal dari bahan baku kompos dan pada perlakuan dibantu oleh bakteri yang ditambahkan sebagai inokulum. Pada minggu kedua terjadi penurunan suhu secara bertahap dan suhu mulai stabil di titik rendah pada akhir minggu ketiga yang menunjukkan bahwa proses pengomposan telah berakhir. Selama berlangsungnya pengomposan, pH kompos cenderung statis di kisaran 7,9–8,0 baik pada perlakuan maupun pada kontrol. Sedangkan parameter lain seperti suhu, CN rasio dan kandungan organik mengalami perubahan yang berarti.

CN rasio dan kandungan organik pada perlakuan maupun pada kontrol nampak terjadi penurunan. Secara berturut-turut penurunan CN rasio dan kandungan organik pada perlakuan adalah sebesar 24,1% dan 27,7% (Gambar 1). Sedangkan pada kontrol, penurunan CN rasio dan kandungan organik berturut-turut adalah sebesar 11,3% dan 13,6%. Data tersebut menunjukkan bahwa penurunan CN rasio dan kandungan organik pada perlakuan lebih besar daripada

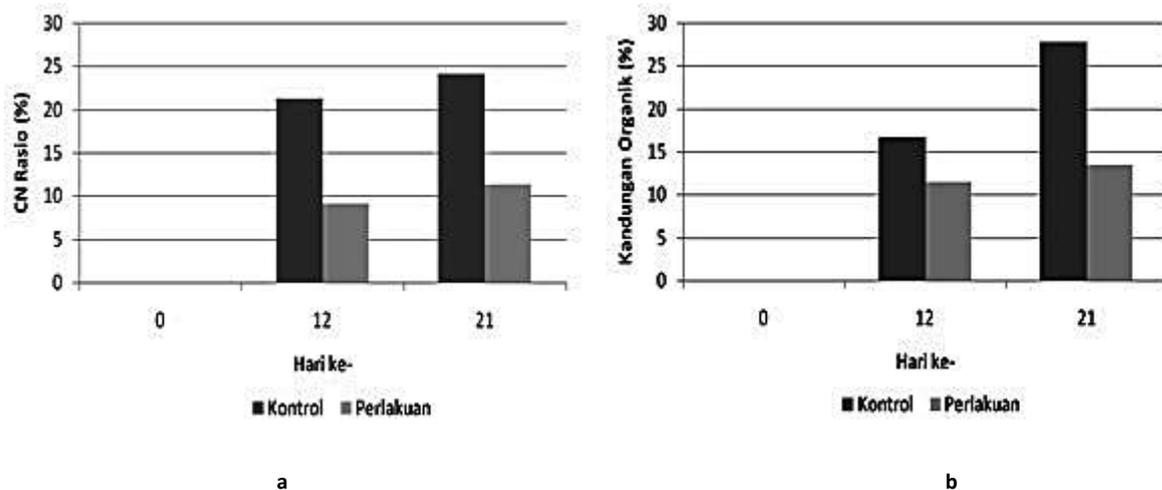
kontrol. Secara statistik persentase penurunan CN rasio antara perlakuan dengan kontrol adalah berbeda nyata sedangkan persentase penurunan kandungan organik tidak berbeda nyata.

Penurunan CN rasio dan kandungan organik yang lebih besar tersebut menunjukkan proses dekomposisi senyawa organik yang terkandung pada bahan baku kompos berlangsung lebih cepat pada perlakuan dibandingkan dengan kontrol. Terjadi mineralisasi C organik beserta kandungan organik menjadi senyawa anorganik yang akan lebih mudah dimanfaatkan oleh tanaman. Data tersebut di atas didukung oleh adanya perubahan tekstur kompos. Tekstur kompos yang terbentuk nampak berbeda antara kompos yang diberi inokulum dengan yang tidak diberi inokulum. Tekstur kompos perlakuan nampak relatif lebih halus dan berwarna lebih gelap dibandingkan dengan kontrol. Ini menunjukkan dekomposisi senyawa organik berlangsung lebih cepat pada perlakuan dibanding pada kontrol. Penambahan kompos kotoran sapi pada media tanam bibit apel menunjukkan adanya respon positif terhadap pertumbuhan tunas tanaman apel. Terbukti dari adanya kecenderungan bahwa tunas yang tumbuh di media berkompos memiliki ukuran lebih panjang daripada yang tumbuh di media tanpa kompos.

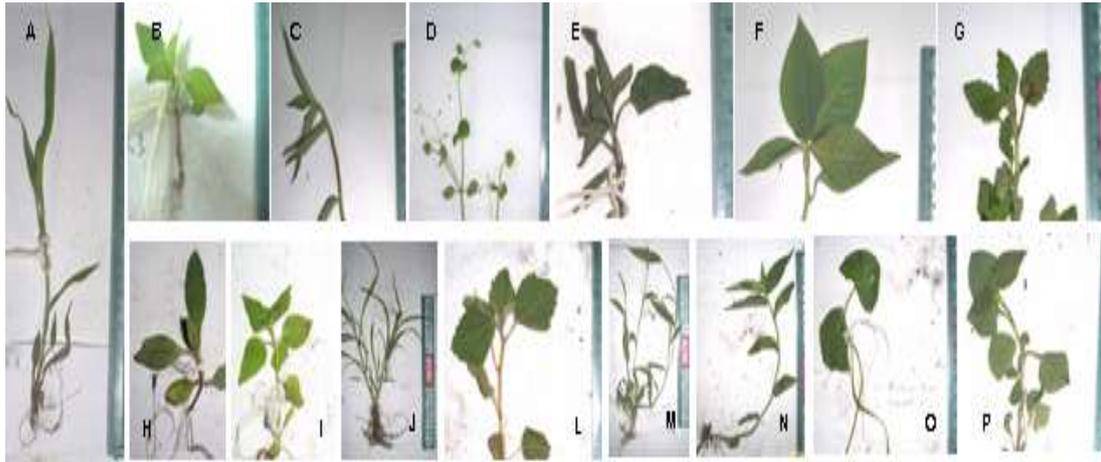
Mikrohabitat tanaman apel akan dipengaruhi oleh penambahan kompos. Manipulasi mikrohabitat ini juga dapat dilakukan dengan menerapkan sistem penyiangan yang berbeda sehingga mempengaruhi keberadaan tanaman penutup tanah (TPT) (gambar 2). Hasil penelitian menunjukkan bahwa Indeks Diversitas (ID) pada lahan pertanian dengan sistem ss (1,03) paling

rendah dan cs (2,04) paling tinggi akibat adanya campur tangan petani apel dalam memanipulasi TPT. Pada lahan ss, diversitas TPT sangat rendah karena lahan apel juga dipergunakan untuk menanam kacang tanah yang memerlukan perawatan intensif terhadap gulma. Sebaliknya, pada lahan cs, diversitas TPT sangat tinggi karena introduksi lebih dari satu jenis tanaman budidaya memberikan mikro habitat yang lebih baik pada berbagai TPT. Introduksi beberapa tanaman budidaya ini juga meningkatkan ID vegetasi pada lahan cs. Berbeda halnya dengan lahan sj yang kurang mendapatkan campur tangan manusia, ID lahan ini (1,75) berada diantara ID lahan ss dan cs.

Data ID tersebut didukung oleh nilai dominansi relatif (Dr) yang menunjukkan adanya dominansi pada lahan ss oleh spesies Blebekan dengan nilai Dr 58,74 (cara perhitungan tidak ditampilkan). Kodominansi terjadi pada lahan pertanian sj oleh spesies Kokrokan (36,08), Banyuan (24,19) dan Blebem (23,78) sedangkan pada lahan pertanian cs juga terjadi kodominansi oleh spesies Kolo (26,92), Patikan (23,55) dan Wedusan (12,56). Adapun INP masing-masing jenis vegetasi pada tiap-tiap lahan adalah berbeda. Pada lahan ss, tiga spesies dengan INP paling tinggi adalah Blebekan, Kacang tanah dan Ulang-ulang sedangkan pada lahan sj adalah Kokrokan, Blebem dan Banyuan adapun pada lahan cs adalah Kolo, Wedusan dan Patikan. Tingginya INP menunjukkan bahwa spesies-spesies tersebut mempunyai peranan yang lebih besar untuk menentukan sifat habitat dan kondisi lingkungan pada masing-masing lahan pertanian apel.



Gambar 1. Grafik persentase penurunan CN rasio dan kandungan organik antara perlakuan dan kontrol



Gambar 2. TPT pada Lahan Apel: A. Grinting, B. Wedusan, C. Kolo, D. Blimbingan, E. Ranti, F. Patikan, G. Gajahan, H. Blebekan, I. Kuningan, J. Ulang-ulang, L. Keresan, M. Kokrokan, N. Blembem, O. Blimbingan Besar, P. Banyuan

Tanaman penutup tanah diduga sangat mempengaruhi habitat tanaman apel. Hal ini ditunjukkan oleh nilai suhu tanah semakin menurun ketika biomassa TPT semakin besar. Kondisi lahan cs dan sj yang tampak lebih stabil berdasarkan nilai ID, Dr, INP, dan nilai biomassa tanaman. Biomassa yang lebih tinggi menyebabkan suhu tanah lebih rendah karena jumlah TPT yang banyak pada lahan sj, meskipun tidak beragam, mengakibatkan air banyak terkandung di jaringan.

KESIMPULAN

Kandungan beberapa nutrisi makro untuk tanah pertanian apel Bumiaji menunjukkan nilai rata-rata yang berada pada kisaran sedang dan tinggi. Hasil analisis makro nutrisi daun apel yang kemudian dibandingkan dengan standar menurut *Utah Fertilizer Guide* menunjukkan bahwa makro nutrisi N, P, Ca berada pada status normal, K berada pada status kurang dan Mg berlebih. Ketersediaan nutrisi di tanah dapat dipelihara dengan penambahan kompos. Kotoran sapi yang diperkaya dengan bakteri indigen mampu mendekomposisi kotoran sapi dalam waktu 2-3 minggu. Proses dekomposisi kotoran sapi berlangsung lebih cepat pada pemberian bakteri indigenus yang mempunyai kemampuan selulolitik dan sekaligus proteolitik serta amilolitik apabila dibandingkan kontrol yang tanpa pemberian inokulum bakteri. Pada pertanian apel di Poncokusumo, kondisi lahan cs (cukup sering) dan sj (sangat jarang) tampak lebih stabil daripada ss (sering sekali) berdasarkan nilai ID (indek diversitas), Dr (dominansi relatif) dan INP (indek nilai penting). Hal ini diperjelas oleh

nilai biomassa tanaman. Biomassa yang lebih tinggi menyebabkan suhu tanah yang lebih rendah karena jumlah TPT yang banyak mempunyai konsekuensi mengandung banyak air pada jaringannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Surabaya Post. 2009. *Harga Naik, Para Petani Apel Kembali Tersenyum*. <http://www.surabayapost.co.id>. Tanggal akses 9 Oktober 2009
2. Ristek. tanpa tahun. *Apel (Malus sylvestris Mill)*. Kantor Deputy Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. <http://www.ristek.go.id>. Tanggal akses 12 Februari 2007
3. Rideout, J. W. 2002. *Soil Facts, Soil and Plant Analysis for Apple Trees*. North Carolina Cooperative Extension Service. Carolina. US
4. Nachtigall, G. R. and Dechen, A. R. 2006. *Seasonality of Nutrients in Leaves and Fruits of Apples Trees*. *Sci.Agric. (Pirocacadaba, Braz.)* 63.5:493-501
5. Paul, E. A. 2007. *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. 3rd ed. Elsevier. Singapore
6. Apun, K, B. C. Jong, and M. A. Salleh. 2000. *Screening and Isolation of a Cellulolytic and Amylolytic Bacillus from Sago Pith Waste*. *J. Gen Appl. Microbiol* 46: 263-267.
7. Cotta, M. A. 1988. *Amylolytic Activity of Selected Species of Ruminant Bacteria*. *Applied & Environmental Microbiology*
8. Meager dan Meyer. 1990. *Effects of Ground Cover Management on Certain Abiotic and Biotic in Peach Orchard Ecosystems*. *Crop Protection Journal* 9: 65-72

9. Smith, G. D., W. C. Stiles dan R. W. Weires. 1989. *The Effects of Ground Cover Manipulations on Pest and Predator Mite Populations on Apple in Eastern New York*. New York's Food and Life Sciences Bulletin Number 128.
10. Hartley, M. J., A. Rahman, K. C. Harrington dan T. K. James. 2000. *Assessing Ground Covers in a Newly Planted Apple Orchard*. New Zealand Plant Protection Journal 53: 22-27
11. James, D. W. And K. F. Topper. 1993. *Utah Fertilizer Guide*. Utah State University. Utah.
12. Sari, Y. M. 2004. *Hubungan Kelas Kesesuaian Lahan dengan Nilai Baku N, P, K untuk Tanaman Apel (Malus sylvestris Mill) di Poncokusumo, Malang*. Skripsi. Jurusan Tanah. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya.
13. Dris, R. 2002. *Influence of Potassium Nutrition in Commercial Apple Orchards*. Plant Nutrition Growth and Diagnosis. Science Publishers, Inc. Enfield. New York.
14. Dris, R. 2002. *Magnesium Nutrition in Apple Orchards*. Plant Nutrition Growth and Diagnosis. Science Publishers, Inc. Enfield. New York.
15. Merhaut, J. D. 2007. Chapter 6: *Magnesium*. *Handbook of Plant Nutrition*, edited by A. V. Barker and D. J. Pibeam. CRC Press Taylor and Francis Group. USA. New York.

***Hibiscus Sabdariffa* Linn) terhadap NF- κ B, TNF- α dan ICAM-1 pada Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Cultured yang dipapar Low Density Lipoprotein (LDL) Teroksidasi**

Dwi Sarbini^{1*}, Djangan Sargowo², M. Saifur Rohman³

¹Program Studi Biomedik Universitas Brawijaya

²Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Abstrak

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui efek dan mekanisme kerja ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 yang menjadi mediator inflamasi pada aterosklerosis. Penelitian ini menggunakan kultur sel endotel yang diisolasi dari vena umbilikal manusia (HUVECs). Kelompok kontrol digunakan HUVECs tanpa paparan ox-LDL (kontrol negatif) dan HUVECs yang dipapar 40 μ gml⁻¹ Ox-LDL (kontrol positif). Kelompok perlakuan adalah HUVECs yang dipapar dengan berbagai dosis teh Rosella merah (0,01 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,001 mgml⁻¹) dan diberikan selama 2 jam sebelum dipapar ox-LDL. Pengukuran aktivasi NF- κ B dilakukan setelah 30 menit paparan Ox-LDL menggunakan imunohistokimia. Ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 diukur setelah 24 jam dipapar Ox-LDL menggunakan imunohistokimia. Berdasarkan analisis ANOVA ($p < 0.01$) terdapat efek penghambatan ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 yang menjadi mediator terjadinya inflamasi pada aterosklerosis melalui penghambatan aktivasi NF- κ B. Terdapat hubungan negatif antara aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 dengan dosis ekstrak teh Rosella merah (Analisis Spearman's [$p < 0,01$, *Correlation Coeff* = -1]).

Kata kunci: atherosklerosis, ICAM-1, NF- κ B, Ox-LDL, Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), TNF- α

PENDAHULUAN

Penyakit kardiovaskuler menjadi masalah kesehatan di dunia dan di Indonesia. Kardiovaskuler juga merupakan penyebab kematian utama di dunia sampai tahun 2020, termasuk juga penyakit jantung koroner dan pembuntuan pembuluh darah otak yang diantaranya disebabkan oleh aterosklerosis [1]. Aterosklerosis merupakan proses inflamasi atau peradangan kronis yang dihasilkan sel radang. Peradangan ini dipicu oleh modifikasi *Low Density Lipoprotein* (LDL) yang poten sebagai penyebab aterosklerosis adalah *oxidized LDL* [2].

Oxidized LDL (Ox-LDL) meningkatkan ROS (*Reactive Oxygen Species*). *Oxidized LDL* bersifat sitotoksik dan berfungsi sebagai kemotaksis faktor bagi monosit yang mengakibatkan penumpukan sel-sel radang. Peradangan terjadi karena Ox-LDL mengaktifkan faktor transkripsi *Nuclear Factor Kappa Beta* (NF- κ B). NF- κ B yang teraktivasi akan menginduksi terbentuknya

protein-protein sistem imun dan zat perantara yang dapat meningkatkan progresifitas aterosklerosis atau memicu ruptur dari plak aterosklerosis dan mengakibatkan pembuntuan arteri koroner (*infark miokard*), pembuluh darah otak (*stroke*) dan lain-lain [3]. Mengingat peradangan menjadi faktor utama dari patogenesis aterosklerosis maka NF- κ B terlibat dalam patogenesis aterosklerosis dengan merangsang sel radang dan molekul adesi maka pencegahan dan pengobatan aterosklerosis dapat di mulai dengan penghambatan aktivasi protein penting yang menimbulkan proses peradangan, yaitu NF- κ B sebagai target [4].

Upaya pencegahan melalui obat-obatan, diantaranya dengan pemanfaatan tumbuhan daerah tropis. Salah satu tumbuhan tropis yang dapat digunakan sebagai fitofarmaka untuk pencegahan terjadinya aterosklerosis adalah teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn.). Teh rosella merah mempunyai aktifitas antioksidan. Berdasarkan penelitian oleh Chang *et al.*, (2003), di Jepang telah dibuktikan bahwa pemberian ekstrak kering *Hibiscus sabdariffa* L 0,5-1% pada diet dapat menghambat arterosklerosis dengan menurunkan kadar kolesterol, LDL, trigliserid dan menghambat pembentukan *foam cell* serta

* Alamat korespondensi penulis:

Dwi Sarbini

Email : dwi_sarbini@yahoo.com

Alamat : Program Studi Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145

mencegah migrasi sel otot polos dan kalsifikasi pembuluh darah pada kelinci [5].

Senyawa bioaktif utama yang berperan sebagai antioksidan dalam Rosella merah adalah *protocatechuic acid* (PCA) dan *antocyanin* serta *asam askorbat*. Selain itu, *Hibiscus sabdariffa* Linn dapat menangkap ROS dan radikal bebas, menurunkan O₂ reaktif, metabolisme peroksidasi lemak menjadi produk non radikal, dan mencegah generasi radikal bebas sehingga melindungi jantung dengan netralisasi radikal bebas sampai 44% tetapi mekanisme kerja teh Rosella merah pada penghambatan aterosclerosis belum banyak diketahui.

Melihat patomekanisme aterosclerosis, Ox-LDL merupakan salah satu penyebab utama proses aterosclerosis diantaranya melalui pembentukan *Reactive Oxygen Species (ROS)*, menyebabkan aktivasi NF- κ B. NF- κ B merangsang protein gen antara lain molekul adesi ICAM-1 dan sitokin TNF- α yang dapat memicu perkembangan aterosclerosis sehingga dapat menyebabkan serangan jantung mendadak (*infark miokard*) akibat pembuntuan arteri koroner sebagai komplikasi klinik dari aterosclerosis. Teh Rosella merah diduga mempunyai efek pada jalur ini, tetapi hal ini perlu dibuktikan berikut dosis pemberian teh Rosella Merah. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dan mekanisme kerja dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B dan penurunan ekspresi protein TNF- α serta ekspresi protein ICAM-1 yang memediasi terjadinya inflamasi pada aterosclerosis.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true eksperimental*) secara *in vitro* dengan menggunakan HUVECs sebagai model.

Pengambilan Umbilikus

Umbilikus diambil melalui persalinan spontan dengan duduk atau melalui persalinan caesar, dengan kriteria inklusi adalah kehamilan fisiologis. Sedangkan eksklusinya adalah kehamilan dengan preeklampsia atau eklampsia, kehamilan dengan infeksi, kehamilan dengan hipertensi dan kehamilan dengan diabetes melitus. Beberapa tahapan yang perlu diperhatikan dalam penelitian adalah pengerjaan kultur sel endotel tidak melebihi 12 jam setelah waktu kelahiran. Disiapkan botol berisi *cord solution* dari refrigerator (suhu 4 °C), umbilikus dipotong

sepanjang \pm 20 cm kemudian dimasukkan larutan *cord solution* segera setelah kelahiran.

Isolasi dan Pembuatan Kultur Sel Endotel (HUVECs)

Umbilikus dicuci PBS yang bebas kalsium sampai bersih. Selanjutnya dilakukan isolasi enzim kolagenase 6-7 menit pada 37 °C dan dicuci dengan PBSa. Disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 8 menit. Supernatan atau bagian atas dibuang, *presipitant* (endapan) yang terbentuk merupakan sel endotel dan ditambahkan medium 20% NBS. Kemudian didispersi dan ditanam dalam *plate*. Dilakukan inkubasi selama 30 menit. Dicuci medium dasar. Ditambahkan medium kultur (RPMI+NBS 20%). Dinkubasi selama 3-4 hari sampai kultur sel endotel *confluent* dan monolayer

Pemberian Ekstrak Teh Rosella Merah Merujuk Lopez (2003) [6]

Kultur primer sel endotel yang telah monolayer diinkubasi dengan atau tanpa ekstrak teh Rosella merah selama 2 jam (dosis 0,01 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,001 mgml⁻¹), kemudian ditambahkan Ox-LDL 40 μ gml⁻¹, selama 30 menit. Kemudian langsung diamati pengaruhnya terhadap aktivasi NF- κ B. Setelah 24 jam diamati peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1.

Ekstraksi Teh Rosella Merah

Teh Rosella merah dihaluskan dan ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan corong pisah yang telah diberi kertas saring pada ujungnya. Ditambahkan etanol absolut 2 liter (1:4). Diagitasi selama 4-6 jam selanjutnya didiamkan selama semalam sampai \pm daya tampung 1 labu (\pm 12 jam). Diambil fraksi terlarut. Diulangi kembali untuk agitasi dan inkubasi semalam sampai larutan jernih. Diambil fraksi terlarut dan hasil ekstraksi dievaporasi.

Pemeriksaan aktivasi NF- κ B, ekspresi TNF- α dan ICAM-1 merujuk pada Calara (2000) [7] secara imunohistokimia

Biakan sel dicuci dengan PBS selama 30 menit dan difiksasi dengan methanol selama 5 menit. Biakan sel dikeringanginkan dan cuci dengan PBS pH 7,4. Diaplikasikan 3% H₂O₂ selama 10 menit dan dicuci dengan PBS pH 7,4. Dilakukan *blocking* dengan serum 5% FBS yang mengandung 0,25% Triton X-100 dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang. Biakan sel dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi dengan *monoclonal anti p50/p65*, anti TNF- α dan ICAM-1 dan diinkubasi semalam. Sel dicuci dengan PBS pH 7,4 kemudian ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin dan

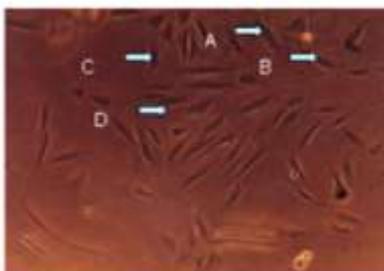
diinkubasi selama 1 jam. Dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi SA-HRP (*Strep-Avidin Horse Radish Peroxidase*) selama 40 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 dan ditetesi substrat *cromogen* untuk HRP, yaitu DAB (Diamono Benzidine). *Counterstain* dengan Mayer hematoxilen selama 10 menit, dibilas dengan air mengalir dan dicuci dengan dH_2O . Preparat dikeringkan dan ditutup *coverglass*.

Analisis Data

Untuk mengetahui adanya pengaruh bermakna pada berbagai perlakuan maka dilakukan analisis statistik dengan menggunakan *Anova*. Untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan dilanjutkan uji Duncan ($p < 0,01$). Hubungan antar perlakuan diketahui melalui uji korelasi non parametrik Spearman's ($p < 0,01$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Dan Kultur Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs)



Gambar 1. Morfologi sel endotel vena umbilikalis manusia primer normal hari ke-4 kultur, diambil dengan mikroskop inverted merk nikon dengan perbesaran 400x.

Keterangan :

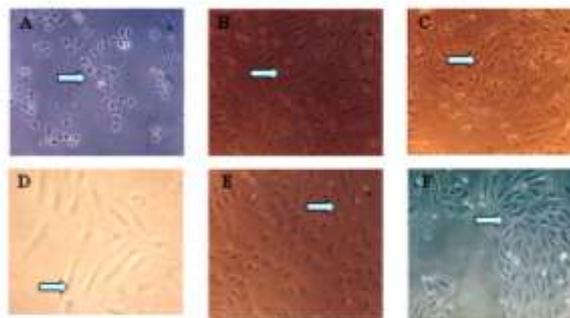
A. Inti sel; B. Sitoplasma; C. Membran plasma; D. Matrik Ekstra Seluler (ECM)

Morfologi sel endotel vena umbilikalis manusia primer normal pada hari ke-4 kultur tampak normal (Gambar 1). Menurut Arjita *et al.*, (2002), ciri-ciri sel endotel normal secara morfologis adalah bentuk sel endotel *cobblestone* dengan ciri spesifik sel pada bagian tengah tampak bulat dan terang (menyala), bentuk sel pipih dengan jarak antara sel teratur dan rapat, permukaan sel halus ditandai dengan penampakan inti, membran plasma, sitoplasma, *extra cellular matriks* (ECM) dan tidak terdapat sel yang apoptosis serta monolayer primer [8].

Optimalisasi Dosis Ekstrak Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

Berdasarkan hasil pengamatan pada sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak teh Rosella merah berbagai dosis, diketahui terjadi respon yang berbeda terhadap masing-masing

dosis perlakuan. Sel endotel mengalami kematian 2 jam setelah perlakuan teh Rosella dosis tinggi ($0,2 \text{ mgml}^{-1}$; $0,1 \text{ mgml}^{-1}$; dan $0,5 \text{ mgml}^{-1}$). Sel endotel yang diinkubasi dengan ekstrak Sedangkan inkubasi sel endotel dengan ekstrak teh dosis $0,01 \text{ mgml}^{-1}$, $0,005 \text{ mgml}^{-1}$ dan $0,001 \text{ mgml}^{-1}$ terlihat sel hidup (Gambar 2).



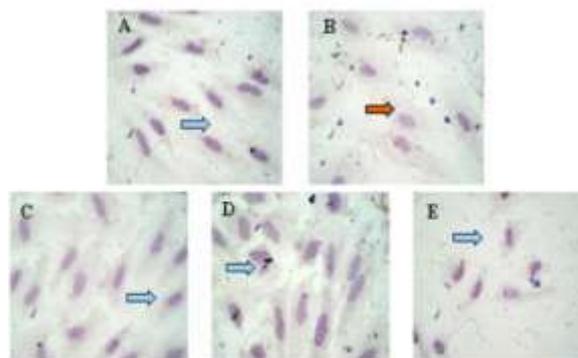
Gambar 2. Sel Endotel Vena Umbilikalis Manusia Primer Normal Hari Ke-4 kultur, setelah dipapar dengan ekstrak Teh Rosella Merah Selama 2 Jam, diambil dengan mikroskop inverted merk nikon dengan perbesaran 400x.

Keterangan :

A. $0,2 \text{ mgml}^{-1}$, semua sel mati; B. $0,1 \text{ mgml}^{-1}$, sebagian besar sel *shrinkage* dan *floating*; C. $0,05 \text{ mgml}^{-1}$, semua sel *shrinkage*; D. $0,01 \text{ mgml}^{-1}$, semua sel hidup; E. $0,005 \text{ mgml}^{-1}$, semua sel hidup; F. $0,001 \text{ mgml}^{-1}$, semua sel hidup

Pengukuran Aktifasi $NF-\kappa\beta$ secara Imunohistokimia

Hasil hasil pengecatan imunohistokimia untuk aktifasi $NF-\kappa\beta$ pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil sediaan sel endotel dengan pengecatan imunohistokimia untuk melihat aktifasi $NF-\kappa\beta$, diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan :

A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat aktifasi $NF-\kappa\beta$ dengan inti sel biru terang
B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL $40 \mu\text{gml}^{-1}$ (kontrol positif), $NF-\kappa\beta$ banyak teraktifasi dengan inti sel lebih pucat dan tipis

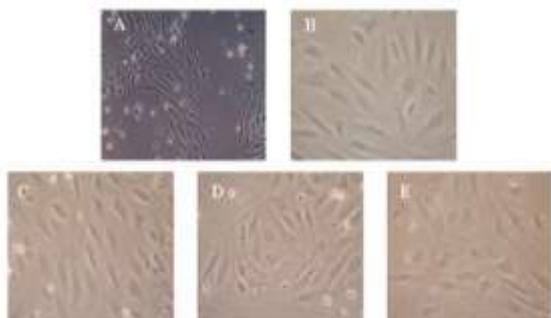
- C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis mgml⁻¹, terjadi penurunan aktivasi NF- κ B dengan inti sel lebih biru
- D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,005 mgml⁻¹, terjadi penurunan aktivasi NF- κ B lebih banyak dengan inti sel lebih biru terang
- E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0,01 mgml⁻¹, tidak terjadi NF- κ B dengan inti sel lebih biru dan terang. Panah biru = positif aktivasi NF- κ B, panah merah = negatif aktivasi NF- κ B.

Pada penghitungan aktivasi NF- κ B, pemberian ox-LDL meningkatkan aktivasi NF- κ B. Hasil perhitungannya dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Efek pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Aktivasi NF- κ B ((X \pm SD)%)
1.	Kontrol negatif	251	2.21 \pm 7.28 ^a
2.	Kontrol positif	175	48.40 \pm 17.84 ^b
3.	TM1 (0,001 mgml ⁻¹)	166	1.70 \pm 4.2 ^a
4.	TM2 (0,005 mgml ⁻¹)	402	0.73 \pm 2.39 ^a
5.	TM3 (0,01 mgml ⁻¹)	533	0.00 \pm 0.00 ^a

Keterangan: Data adalah rerata \pm SD. Berdasarkan analisis statistik Duncan (p<0.01), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.



Gambar 6. Sel endotel vena umbilikalis manusia setelah dipapar ekstrak teh merah selama 2 jam dan dipapar ldl teroksidasi selama 24 jam sebelum dilakukan pengecatan imunohistokimia, diambil dengan mikroskop inverted merk nikon dengan perbesaran 400x.

Keterangan: Semua sel dalam keadaan hidup. A. Sel Endotel normal (kontrol negatif); B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ gml⁻¹ (kontrol positif); C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mgml⁻¹; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mgml⁻¹; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mgml⁻¹.

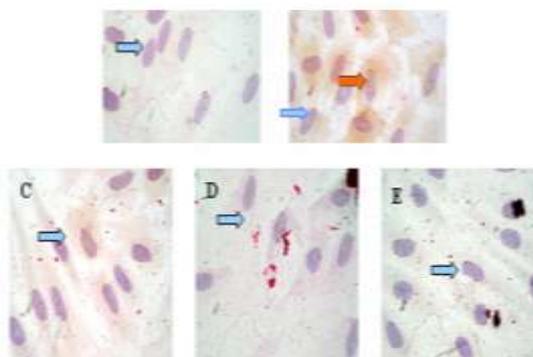
Optimalisasi Kadar LDL Teroksidasi (Ox-LDL)

Berdasarkan hasil pengukuran aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 pada berbagai perlakuan dengan kadar Ox-LDL 50 μ gml⁻¹ dan 40 μ gml⁻¹ secara lengkap dapat diketahui bahwa kadar LDL teroksidasi (Ox-

LDL) 50 μ gml⁻¹ bersifat toksik bagi sel endotel ditandai dengan kematian sel endotel yang sebelumnya diinkubasi dengan ekstrak teh dosis tertinggi (0,01 mgml⁻¹) sedangkan pada kadar 40 μ gml⁻¹ sel nampak hidup sehingga untuk melihat efek pemberian ekstrak teh Rosella merah terhadap aktivasi NF- κ B dan ekspresi protein TNF- α serta ICAM-1 digunakan kadar Ox-LDL 40 μ gml⁻¹.

Pengukuran Ekspresi Protein TNF- α Secara Imunohistokimia

Hasil kultur sel endotel Vena Umbilikalis Manusia (HUVECs) yang telah dipapar ekstrak teh rosella merah selama 2 (dua) jam dan selanjutnya dipapar Ox-LDL selama 24 menit ditunjukkan pada Gambar 6. dan hasil pengecatan secara imunohistokimia pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein TNF- α , diambil dengan mikroskop Olympus cx21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan : A. Sel Endotel normal (kontrol negatif), tidak terdapat ekspresi protein TNF- α ditandai warna inti sel biru; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL 40 μ gml⁻¹ (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein TNF- α dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian sitoplasma berwarna merah; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.001 mgml⁻¹, terjadi penurunan ekspresi protein TNF- α dengan sebagian besar inti sel warna biru; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.005 mgml⁻¹, ekspresi protein TNF- α berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis 0.01 mgml⁻¹, ekspresi protein TNF- α semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif TNF- α , panah merah = negatif TNF- α .

Berdasarkan hasil pengukuran ekspresi protein TNF- α menunjukkan bahwa pemberian LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada kelompok kontrol positif (40,28 \pm 16,81) meningkatkan jumlah ekspresi protein TNF- α 100 kali lipat dibanding kelompok normal (0,00 \pm 0,00). Jumlah protein TNF- α yang terekspresi pada kelompok perlakuan

yang diberikan ekstrak teh rosella Merah dengan berbagai dosis yaitu $0,001 \text{ mgml}^{-1}$, $0,005 \text{ mgml}^{-1}$ dan $0,01 \text{ mgml}^{-1}$ menurun secara bermakna ($p < 0,01$) berturut-turut 36,23%, 38,19%, 38,61% dibanding pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak teh rosella merah (kontrol positif) yang dapat dilihat pada Tabel 2. Peningkatan ekspresi protein $TNF-\alpha$, tertinggi ditunjukkan kelompok kontrol positif (sel yang dipapar dengan ox-LDL) dan ekspresi terendah pada kelompok yang diberikan ekstrak teh rosella merah dosis terbesar yaitu $0,01 \text{ mgml}^{-1}$.

Hasil analisis statistik korelasi non parametrik menggunakan Spearman's ($p < 0,01$) didapatkan bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah ekspresi protein $TNF-\alpha$ pada kelompok kontrol positif dengan jumlah ekspresi protein $TNF-\alpha$ pada kelompok yang diberikan ekstrak teh dengan berbagai dosis dengan koefisien korelasi -1. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak teh pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah ekspresi protein $TNF-\alpha$.

Tabel 2. Efek pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein $TNF-\alpha$

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein $TNF-\alpha$ ($X \pm SD$)%
1.	Kontrol negatif	147	0.00 ± 0.00^a
2.	Kontrol positif	267	40.28 ± 16.81^b
3.	TM1 (0.001 mgml^{-1})	220	4.05 ± 8.72^a
4.	TM2 (0.005 mgml^{-1})	267	2.09 ± 6.56^a
5.	TM3 (0.01 mgml^{-1})	239	1.67 ± 7.45^a

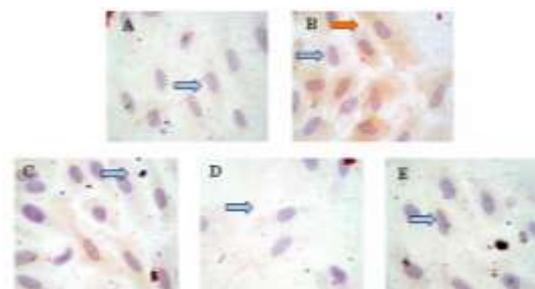
Keterangan: Data adalah rerata \pm SD.

Berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0,01$), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

Pengukuran Ekspresi Protein ICAM-1 Secara Imunohistokimia

Berdasarkan hasil pengukuran ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan bahwa pemberian LDL teroksidasi (Ox-LDL) pada kelompok kontrol positif ($96,17 \pm 12,39$) meningkatkan jumlah ekspresi protein ICAM-1 100 kali lipat dibanding kelompok normal ($0,00 \pm 0,00$). Jumlah protein ICAM-1 yang terekspresi pada kelompok perlakuan yang diberikan ekstrak teh rosella merah dengan berbagai dosis yaitu $0,001 \text{ mgml}^{-1}$, $0,005 \text{ mgml}^{-1}$ dan $0,01 \text{ mgml}^{-1}$ menurun secara bermakna ($p < 0,01$) berturut-turut 71,68%, 94,2%, 95,46% dibanding pada kelompok yang tidak diberikan ekstrak teh rosella merah (kontrol positif) yang ditunjukkan pada Tabel 3. Ekspresi protein ICAM-1 tertinggi pada kelompok kontrol positif dan terendah pada kelompok yang

diberikan ekstrak teh rosella merah dosis terbesar yaitu $0,01 \text{ mgml}^{-1}$.



Gambar 9. Hasil Sediaan Sel endotel dengan Pengecatan Imunohistokimia untuk melihat Ekspresi Protein ICAM-1, diambil dengan mikroskop Olympus CX21 dengan perbesaran 1000x.

Keterangan : A. Sel Endotel normal (kontrol negatif) , tidak terdapat ekspresi protein ICAM-1 ditandai warna inti sel biru, permukaan membran tidak berwarna kecoklatan; B. Sel endotel yang dipapar Ox-LDL $40 \mu\text{gml}^{-1}$ (kontrol positif), banyak terdapat ekspresi protein ICAM-1 dengan inti sel berwarna kecoklatan bagian permukaan membran berwarna coklat; C. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis $0,001 \text{ mgml}^{-1}$, terjadi penurunan ekspresi protein ICAM-1 dengan sebagian inti sel warna biru ; D. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis $0,005 \text{ mgml}^{-1}$, ekspresi protein ICAM-1 berkurang lebih banyak dengan inti sel banyak berwarna biru ; E. Sel endotel yang dipapar ekstrak teh dosis $0,01 \text{ mgml}^{-1}$, ekspresi protein ICAM-1 semakin berkurang dengan lebih banyak inti sel banyak berwarna biru. Panah biru = positif ICAM-1, panah merah = negatif ICAM-1.

Tabel 3. Efek Pemberian Ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Ekspresi Protein

Kelompok Perlakuan	Jumlah Sel	Ekspresi Protein ICAM-1 ($X \pm SD$)%
Kontrol negatif	147	0.00 ± 0.00^a
Kontrol positif	267	96.17 ± 12.39^b
TM1 (0.001 mgml^{-1})	220	7.32 ± 13.53^a
TM2 (0.005 mgml^{-1})	267	1.97 ± 5.46^a
TM3 (0.01 mgml^{-1})	239	0.71 ± 3.19^a

ICAM-1

Keterangan: Data berdasarkan analisis statistik Duncan ($p < 0,01$), perbedaan notasi huruf menunjukkan terdapat perbedaan nyata.

Berdasarkan analisis statistik One Way Anova yang dilanjutkan dengan uji "beda kelompok" Duncan, jumlah ekspresi protein ICAM-1 menunjukkan terdapat perbedaan nyata ($p < 0,01$) pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Pemberian ekstrak teh Rosella Merah pada berbagai dosis yaitu $0,001 \text{ mgml}^{-1}$, $0,005 \text{ mgml}^{-1}$ dan $0,01 \text{ mgml}^{-1}$ berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberikan ekstrak teh Rosella merah, namun

antar dosis ekstrak teh Rosella Merah yaitu dosis 0,001 mgml⁻¹, 0,005 mgml⁻¹ dan 0,01 mgml⁻¹ tidak menunjukkan beda nyata.

Hubungan antar perlakuan pemberian berbagai dosis ekstrak teh Rosella Merah terhadap jumlah ekspresi protein ICAM-1 dilihat dengan menggunakan uji statistik korelasi non parametrik menggunakan Spearman's ($p < 0,01$). Dari hasil analisis tersebut diketahui bahwa terdapat hubungan negatif antara jumlah ekspresi protein ICAM-1 pada kelompok kontrol positif dengan jumlah ekspresi protein ICAM-1 pada kelompok yang diberikan ekstrak teh dengan berbagai dosis dengan koefisien korelasi adalah -1. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pemberian dosis ekstrak teh pada sel endotel yang telah dipapar Ox-LDL semakin kecil jumlah ekspresi protein ICAM-1.

Pada penelitian ini membuktikan bahwa dengan pemberian Ox-LDL dengan konsentrasi 40 μ gml⁻¹ pada sel endotel vena umbilikalis manusia (HUVECs) dapat meningkatkan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ekspresi protein ICAM-1 secara bermakna dibandingkan dengan tanpa pemberian Ox-LDL. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Robbinsyn *et al* (2003) [9] yang dilakukan secara *in vitro* bahwa pemberian Ox-LDL pada HUVECs dapat menyebabkan terjadinya aktivasi NF- κ B. Dijelaskan pula bahwa Ox-LDL sebagai stres oksidatif akan menyebabkan peningkatan pembentukan ROS secara intrasel yang mengakibatkan teraktifasinya proteosom dan selanjutnya terjadi degradasi I κ B dan terjadi aktivasi NF- κ B. Guzik *et al* (2003) [10] menjelaskan bahwa jalur signal untuk kerusakan endotel melalui ox-LDL antara lain melalui ROS yang dibentuk intraseluler dan aktivasi protein kinase dan faktor transkripsi NF- κ B.

Cominacini *et al* (2000) [11] menunjukkan bahwa adanya Ox-LDL akan meningkatkan ikatan ox-LDL pada reseptor endotel LOX-1 yang mengawali aktivasi NF- κ B dan terjadi juga peningkatan pembentukan ROS. Bukti lain ditunjukkan oleh Calara *et al* (2000) [7] bahwa pemberian ox-LDL pada kultur sel endotel manusia (HUVECs) menyebabkan timbulnya stres oksidatif yang berakibat pada pembentuk radikal bebas superoksida dan selanjutnya mengaktifasi NF- κ B. LDL yang termodifikasi oleh lipoxigenase juga dapat mengaktifasi NF- κ B melalui jalur aktivasi CAMP dan *protein kinase A* (PKA). Menurut Brand *et al* (1996) [12], teraktifasinya NF- κ B merangsang gen inflamatori dan proliferasi sel dalam sel endotel.

Dalam penelitian, pemberian Ox-LDL juga meningkatkan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 secara bermakna. Menurut Collins *et al* (2001) [3], teraktifasinya NF- κ B merangsang banyak sekali gen antara lain molekul adesi (ICAM-1, VCAM-1, P selectin), molekul sitokin proinflamatori /kemokin (IL-1, IL-2, IL-6, IL-9, TNF- α , MCP, *C-reactive protein*, *tissue faktor-1*, *Urokinase type Plasminogen aktifator*, COX-2, iNOS, molekul yang terlibat apoptosis (*Fas-ligand*, Bcl-xL), *growth factor* (GCSF, PDGF B, trombospondin) dan masih sangat banyak lagi gen yg menjadi sasaran aktivasi dari NF- κ B. Penelitian lain secara *in vitro* membuktikan bahwa pemberian Ox-LDL pada HUVECs meningkatkan produksi TNF- α dan IL-1 melalui aktivasi NF- κ B [12], dimana TNF- α akan meningkatkan proliferasi sel otot polos pada pembuluh darah dan menyebabkan inflamasi [3].

Efek Ekstrak Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Aktivasi NF- κ B

Pengukuran aktivasi NF- κ B dan analisis ANOVA, didapatkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh Rosella merah terhadap penghambatan aktivasi NF- κ B secara bermakna. Jumlah aktivasi NF- κ B pada kelompok kontrol positif (dipapar Ox-LDL) lebih tinggi signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ox-LDL akan menyebabkan meningkatnya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang mengakibatkan teraktifasinya NF- κ B. Apabila dibandingkan dengan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak teh rosella merah, jumlah aktivasi NF- κ B kelompok kontrol positif lebih tinggi secara signifikan. Penelitian ini mendukung penelitian Tseng *et al* (1996) [13] bahwa ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mempunyai aktifitas antioksidan. Diduga zat bioaktif yang mempunyai aktifitas antioksidan dan berperan dalam menghambat aktivasi NF- κ B adalah senyawa polifenol terutama protocatechuic acid dan flavonoid-antosianin selain vitamin C yang terkandung dalam Rosella merah [14,15]. Dijelaskan pula bahwa protocatechuic acid (PCA) dapat mencegah terlepasnya ikatan p50 dan p65 (bagian dari NF- κ B) sehingga tidak terjadi translokasi p50/p65 ke dalam nukleus dan sebagai inhibitor NADPH oxidase yang menghasilkan radikal superoksida anion.

Ho (2002) [16] dikemukakan bahwa efek penghambatan antioksidan pada aktivasi NF- κ B telah dibuktikan melalui penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim

kinase I κ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus. Dijelaskan juga bahwa efek penghambatan antioksidan terhadap aktivasi NF- κ B melalui penghambatan ikatan pada gen target (*DNA binding domain*). Hal ini diperkuat oleh Stache *et. al* (2002) [17] bahwa PCA terbukti mempunyai kemampuan dalam menghambat aktivasi NF- κ B melalui penghambatan degradasi I κ B alpha pada HUVECs. Lee *et. al* (2002) [18] menjelaskan bahwa aktifitas antioksidan yang dimiliki PCA dalam menghambat oksidasi LDL lebih tinggi dibandingkan vitamin C melalui penghambatan degradasi kolesterol dan fragmentasi apo B.

Sedangkan menurut Jonadet *et. al* (1990) [19], kandungan antosianin dan flavon dalam ekstrak kasar *calyces* Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) secara hidroalkoholik pada *in vivo* terbukti sebagai angio protektif. Penelitian lain membuktikan bahwa antosianin dalam ekstrak kering kelopak Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) mampu menghambat stress oksidatif [20]. Hal ini dipertegas oleh Ranzio (2002) [15] dan Mazza & Miniati (1993) [21] antosianin dan flavon telah terbukti dapat menghambat LDL oksidasi dan menghambat aktivasi NF- κ B serta menurunkan inflamasi.

Berdasarkan analisis beda nyata menggunakan Duncan, ternyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak teh Rosella Merah (dosis 0.01 mgml⁻¹, 0.005 mgml⁻¹, 0.001 mgml⁻¹ tidak menunjukkan beda nyata. Hal ini dimungkinkan oleh jarak (*range*) yang diberikan terlalu dekat dan dosis yang terlalu kecil. Dari hasil analisis korelasi Spearman's didapatkan korelasi negatif dan bermakna antara aktivasi NF- κ B dengan pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Hal ini berarti semakin tinggi dosis pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn), aktivasi NF- κ B semakin berkurang. Hal ini disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap aktivasi NF- κ B akibat induksi Ox-LDL.

Efek Penghambatan Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Peningkatan Ekspresi Protein TNF- α

Berdasarkan pengukuran ekspresi protein TNF- α dan analisis Anova didapatkan bahwa pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat menurunkan ekspresi protein TNF- α secara signifikan dibandingkan pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan

oleh aktifitas antioksidan yang dimiliki oleh teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Duke (2004) menjelaskan bahwa beberapa zat bioaktif dalam *Hibiscus sabdariffa* yaitu senyawa penolik (*protocatechuic acid* dan flavonoid-antosianin) dan vitamin C mempunyai aktifitas antioksidan dan mempunyai aktifitas anti inflamasi [22].

Mekanisme penghambatan ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein TNF- α pada HUVECs adalah melalui penghambatan aktivasi NF- κ B dengan penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I κ B sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF- κ B (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam nukleus [17]. NF- κ B merupakan suatu faktor transkripsi yang berperan penting dalam pengaturan berbagai gen termasuk respon inflamasi dan proliferasi. NF- κ B berperan dalam regulator ekspresi protein/gen inflamasi dengan menginduksi transkripsi protein atau gen-gen proinflamatori akibat adanya stimuli seluler seperti signal-signal oleh adanya patogen atau stress misalnya Ox-LDL. Protein atau gen yang aktif ditranskripsi dapat terjadi pada daerah endotel, otot polos, makrofag.

Efek Penghambatan Teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) Terhadap Peningkatan Ekspresi Protein ICAM-1

Berdasarkan pengukuran ekspresi protein ICAM-1 dan analisis ANOVA didapatkan bahwa terdapat pengaruh pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) pada ekspresi protein ICAM-1. Pemberian ekstrak teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dapat menurunkan ekspresi protein ICAM-1 secara signifikan dibandingkan pada kelompok kontrol positif. Hal ini disebabkan oleh aktifitas antioksidan yang dimiliki teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn). Disamping antioksidan mengurangi toksisitas Ox-LDL pada sel endotel, diduga efek penghambatannya terletak pada kemampuan zat bioaktif dari teh rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terutama senyawa penolik (*protocatechuic acid* dan flavonoid-antosianin) dalam menghambat aktivasi NF- κ B dengan penghambatan degradasi I κ B, penghambatan aktivasi enzim kinase I κ B.

Tidak terdapat beda nyata antar berbagai dosis pemberian ekstrak teh Rosella Merah (dosis 0.01 mgml⁻¹, 0.005 mgml⁻¹, 0.001 mgml⁻¹ yang dimungkinkan oleh jarak (*range*) yang diberikan terlalu dekat dan dosis yang terlalu kecil. Adanya hubungan negatif antara ekspresi protein ICAM-1

dengan pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) disebabkan oleh adanya efek penghambatan dari ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap ekspresi protein ICAM-1 akibat induksi Ox-LDL.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Pemberian LDL teroksidasi pada HUVECs mampu meningkatkan aktivasi NF- κ B, ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis. Pemberian ekstrak teh Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) berbagai dosis (0.001 mg/ml, 0.005 mg/ml, 0.01 mg/ml) pada (HUVECs) yang selanjutnya dipapar LDL teroksidasi dapat menghambat aktivasi NF- κ B, menghambat peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis. Efek penghambatan dari zat bioaktif *protocatechuic acid*, antocyanin dan vitamin C dari ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) pada penghambatan peningkatan ekspresi protein TNF- α dan ICAM-1 yang memediasi terjadinya aterosklerosis pada HUVECs melalui penghambatan aktivasi NF- κ B dan dibuktikan dengan adanya korelasi negatif dengan analisis korelasi Spearman's ($p=0.00$; *correlation coeff*= -1).

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak teh Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) terhadap penghambatan meningkatnya ROS (*Reactive Oxygen Species*) seperti H₂O₂ untuk membuktikan keterlibatan radikal bebas pada aterosklerosis. Diperlukan penelitian lanjut dengan metode pengukuran yang bersifat kuantitatif dan lebih akurat menggunakan analisis *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)* dan perlu penelitian lanjut dengan ekstrak murni zat bioaktifnya, sehingga data lebih akurat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Tjokprawiro, A. 1997. *Diabetes Up Date 1997 Dalam : Proceedings Of The Third Surabaya Diabetes Up Date*, Surabaya, p 1-21
2. Ross, Russell. 1999. *Atherosclerosis-An Inflammatory Disease*. N. Eng J Med, Volume 340, p 115-126
3. Collins, Tucker., Cybulsky, Myron I. 2001. *NF-KB : Pitaval Mediator Or Innocent Bystander In Atherogenesis ?*. The Journal Of Clinical Investigation, Volume 107, Number 3, P. 255-263.
4. Krause, Brian R., et.al. 2002. *Direct Vascular Target For Atherosclerosis Prevention*. Departement Of

- Cardiovascular Therapeutic, Pfizer Global Research And Development, USA
5. Chang-che chew, et al. 2003. *Hibiscus Sabdariffa Extract Inhibits The Development Atherosclerosis In Cholesterol-Fed Rabbit*. Journal Of Agricultural And Food Chemistry.
6. Lopez, Resendiz., et all.2003. *Antimutagenicity Of Natural Phenolic Compounds In Dried Flowers From Hibiscus Sabdariffa Linn*.
7. Calara, Federico. 2000. *An Animal Model To Study Local Oxidation Of LDL And Its Biological Effect In The Arterial Wall*. Arteriosclerosis, Thrombosis And Vascular Biology, Volume 18, p 884-893
8. Arjita et al.2002. *Pengaruh Kadar Glukosa Tinggi Terhadap Sintesa Nitric Oxide Dari Huvecs Culture Dengan Teknik Bioassay*. Biosain, Volume 2 No 1 April
9. Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. 2003. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):743-5. Epub 2003 Feb 5.
10. Guzik, TJ., & Korb R., & Guzik, T. Adamek .2003. *Nitric Oxide And Superoxide In Inflammation And Immun System Regulation*. Juornal Of Physiology And Pharmacology, Volume 54, No 4, p 469-487
11. Cominacini, Luciano., et.all. 2000. *Oxidied Low Density Lipoprotein (Ox-LDL) Binding To Ox-Ldl Receptor-1 In Endothelial Cells Induces The Activation Of NF-KB Through An Increased Production Of Intracelluler Reactive Oxigen Species*. The Journal Of Biological Chemistry, Volume 275, no 17, p 12633-12638
12. Brand, Korbinian., et. all. 1996. *Activated Transcription Factor Nuclear Factor Kappa Beta Is Present In Atherosclerotic Lesion*. J. Clinical Investigation, Volume 97, Number 7, P 1715-1722.
13. Tseng, T.H., et al. 1996. *Hibiscus Protocatechuic Acid Protecct Against Oxidative Damage Induced By Tert. Butylhydroperoxide In Rat Primary Hepatocytes*. Chem Biol Interact., August 14;101(2); p.p.137-148
14. Jamie , et al. 2000. *Hypothesis : A Central Role For The Endothelial NADPH Oxidase In Atherosclerosis*. FEBS, Pubmed, volume 472, Issue 1,p.p 1-4
15. Ranzio B, 2002. *Anti Inflammatory Activities Of Polyphenol-Review : Polyphenol As Anti Inflammatory Agents*. Journal Of Naturopathic Medicine,Volume 9, p.44-50
16. Ho, E. 2002. *The Virtual Free Radical School : NF-KB- What Is It And What'S The Deal With Radicals?*. Linus Pauling Institute Scientist, Departement Of Nutrition & Food Management, Oregon State University.
17. Stache et al.,2002. *Inhibition Of TNF-Alpha Induced Cell Death In Human Umbilical Vein Endothelial Cells And Jurkat Cell By Protocatechuic Acid*. NCBI, Med. Biol. Eng. Comput, 40(6), p 689-703

18. Lee Mj , et al. 2002. *Hibiscus Protocatechuic Acid Or Esculetin Can Inhibit Oxidative LDL Induced By Either Copper Ion Or Nitric Oxide Donor*. Journal Agriculture Food Chemical, Maret 27;50(7);p.p. 2130-2136
19. Jonadet, M, et al. 1990. *In Vitro Enzyme Inhibitory And In Vivo Cardioprotective Activities Of Hibiscus (Hibiscus Sabdariffa Linn)*.Journal Pharmacology .Belg, Maret-april;45 (2); p.p.120-124
20. Ali, BH., Mousa HM., El Mougys.2003. *The Effect Of Water Extract And Anthocyanins Of Hibiscus Sabdariffa Linn On Paracetamol-Induced Hepatotoxicity In Rats*.
21. Mazza G, Miniati E. 1993. *Anthocyanins in Fruits, Vegetables and Grains*. 1st ed. Fla:CRC Press. Florida.
22. Duke, James A. 2004. *Phytochemical Database, USDA-ARS,NGRL*. Agricultural Research Service, Beltsvile Research Center, Maryland

PETUNJUK BAGI PENULIS

1. Jenis Naskah

Naskah yang diterima adalah artikel yang belum pernah dipublikasikan sebelumnya. Naskah dapat berupa jurnal laporan hasil penelitian atau artikel review. Naskah ditulis mempergunakan Bahasa Indonesia atau Bahasa Inggris. Tata cara penulisan dapat dilihat di web JELS dengan alamat <http://www.jels.org>.

2. Kode Etik Penelitian

Penelitian yang mempergunakan probandus hewan, manusia, dan uji coba klinik harus telah memperoleh sertifikat laik etik dari lembaga yang berwenang

3. Format

Naskah diketik dengan program *Microsoft Word* (doc.) pada kertas A4 (21 cm x 29,5 cm) dengan jarak antar baris satu spasi. Batas pengetikan dari tepi kertas diatur sebagai berikut:

- tepi atas : 3 cm
- tepi bawah : 3 cm
- tepi kiri : 4 cm
- tepi kanan : 3 cm

Naskah diketik dengan jenis huruf Calibri dengan spesifikasi ukuran huruf sebagai berikut:

- Judul naskah : ukuran huruf 14 point
- Nama, keterangan penulis, abstrak dan kata kunci : ukuran huruf 10 point
- Isi naskah : ukuran huruf 10 point
- Keterangan gambar dan tabel : ukuran huruf 10 point
- Daftar pustaka : ukuran huruf 10 point

Format penulisan JELS mempergunakan dua kolom (67 karakter), kecuali bagian judul dan abstrak ditulis dalam format satu kolom. Naskah setiap halaman diberi nomor secara berurutan, maksimum 10 halaman termasuk tabel dan gambar. Naskah dikirim melalui e-mail atau file dalam CD ke:

Redaksi The Journal of experimental Life Science (JELS)

**Gedung A, Lt. E, Program Pascasarjana
Universitas Brawijaya
Jl. MT. Haryono 169, Malang, 65145
e-mail: jels@ub.ac.id**

4. Susunan naskah

Naskah disusun secara berurutan terdiri atas:

- Judul makalah
- Nama lengkap penulis (tidak disingkat, tanpa gelar)
- Afiliasi penulis (instansi tempat penulis bekerja dan alamat korespondensi)
- Abstrak dan Kata kunci (Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris)
- Pendahuluan
- Metode Penelitian
- Hasil dan Pembahasan
- Kesimpulan
- Ucapan terimakasih (bila ada)
- Daftar Pustaka
- Tabel
- Gambar dan legenda gambar
- Lampiran

5. Deskripsi Bagian Naskah

JUDUL

Judul dicetak tebal (*bold*) dengan huruf kapital pada setiap awal kata, kecuali kata sambung. Judul maksimum terdiri dari 12 kata (tanpa kata sambung). Naskah dalam Bahasa Indonesia harus disertai judul dalam Bahasa Inggris yang ditulis miring (*Italic*). Judul Bahasa Inggris ditulis setelah judul Bahasa Indonesia sebelum nama penulis. Nama penulis ditulis lengkap, tanpa gelar, alamat lembaga afiliasi penulis. Beri tanda * untuk alamat korespondensi. Alamat untuk korespondensi dilengkapi dengan kode pos, *faksimile* atau nomor telepon, dan e-mail, ditulis pada bagian bawah halaman pertama (*footnote*).

Contoh penulisan judul dan Nama penulis:

Pengaruh Terapi Lidah Buaya terhadap Kadar IL-1 β Mencit (*Mus musculus* BALB-C) Betina Ghaisan Ramadhan^{1*}, Irfan Hakim², Setyawati³
¹Program Pascasarjana, Universitas Brawijaya
^{2,3}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya

ABSTRAK DAN KATA KUNCI

Abstrak memuat tujuan penelitian, metode penelitian dan hasil penelitian yang disusun

dalam satu paragraf dengan format *esei* bukan *enumeratif*. Tidak ada kutipan pustaka di dalam abstrak. Abstrak ditulis dalam Bahasa Indonesia dan Bahasa Inggris, satu paragraf, maksimum 200 kata. Kata kunci ditulis setelah abstrak.

TEKS

Awal paragraf dimulai 5 indent dari sisi kiri naskah. Penulisan sub judul (**PENDAHULUAN, METODE PENELITIAN, HASIL DAN PEMBAHASAN, KESIMPULAN, UCAPAN TERIMA KASIH dan DAFTAR PUSTAKA**) ditulis di bagian kiri naskah dengan huruf kapital dan tidak menggunakan nomor. Sub-sub judul ditulis di kiri halaman dengan cetak miring (*italic*) dan huruf kapital di setiap awal kata.

Penggunaan kalimat dan bahasa yang dipergunakan dalam jurnal harus menggunakan bahasa Indonesia yang baik dan benar sesuai dengan kaidah yang berlaku dalam tata bahasa (EYD). Nama organisme harus diikuti dengan nama ilmiahnya secara lengkap pada pengungkapan pertama. Nama ilmiah ditulis miring, sedangkan nama penulis dari nama ilmiah dan kata seperti "var." ditulis tegak. **Contoh:** *Stellaria saxatillis* Buch. Ham.

Singkatan pertama kali ditulis dalam kurung setelah kata-kata yang disingkatnya. Penulisan satuan menggunakan Standar Internasional (SI). Eksponen negatif digunakan untuk menyatakan satuan penyebut. Contoh: $g\ l^{-1}$, bukan g/l. Satuan ditulis menggunakan spasi setelah angka, kecuali untuk menyatakan persen. Contoh: $25\ g\ l^{-1}$, bukan $25g\ l^{-1}$; 35% bukan 35 %. Penulisan desimal menggunakan koma (bukan titik). Seluruh tabel dan gambar harus dirujuk dalam teks.

DAFTAR PUSTAKA

Ketentuan pustaka yang dipergunakan adalah:

- Sumber pustaka primer terdiri atas jurnal, paten, disertasi, tesis, makalah dalam prosiding dan buku teks.
- Membatasi pustaka yang mengacu pada diri sendiri (*self citation*)
- Sebaiknya dihindari penggunaan pustaka di dalam pustaka, buku populer, dan pustaka dari internet kecuali jurnal dan dari instansi pemerintah atau swasta
- Abstrak tidak diperbolehkan sebagai rujukan

- Referensi yang bisa dipergunakan hanya referensi yang telah dipublikasikan (buku, jurnal penelitian atau prosiding penelitian). Referensi yang tidak dipublikasikan atau data tidak ditampilkan tidak bisa dipergunakan sebagai referensi dalam penulisan jurnal
- Daftar Pustaka ditulis berupa daftar (format nomor 1,2,3,...), disusun berdasar urutan pemuatan referensi pada naskah (sistem *Vancouver* atau *author-number style*)
- Keterangan daftar pustaka pada naskah hanya ditulis nomor referensi (bukan nama pengarang dan tahun), contoh:
Obesitas merupakan penimbunan lemak dalam jumlah besar yang akan menimbulkan berat tubuh yang berlebihan (*overweight*) [1]. Obesitas merupakan faktor resiko terjadinya diabetes, hipertensi dan aterosklerosis [2].

Beberapa contoh penulisan daftar pustaka adalah:

Referensi berupa jurnal

- Shi, Z., M. Rifa'i, Y. Lee, K. Isobe, H. Suzuki. 2007. Importance of CD80/CD86-CD28 interaction in the recognition of target cells by CD8⁺CD122⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*. 124. 1:121-128.

Referensi berupa buku

- Vander, A., J. Sherman., D. Luciano. 2001. Human Physiology: The Mecanisms of Body Function. McGraw-Hill Higher Education. New York.

Referensi berupa bab dalam buku

- Dean, R.G. 1990. Freak waves: A possible explanation. p. 1-65. *In* Torum, A., O.T. Gudmestad (eds). Water wave kinetics. CRC Press. New York.

Referensi berupa artikel di prosiding

- Syafi'i, M., Hakim, L., dan Yanuwiyadi, B. 2010. Analisis Potensi *Indigenous Knowledge* (IK) Desa Ngadas Sebagai Atraksi Wisata. hal.217-234. Dalam Widodo, Y. Noviantari (eds) Prosiding *Basic Science National Seminar 7* Vol.4. Universitas Brawijaya, Malang.

Referensi berupa disertasi atau tesis

- Astuti, A.M. 2008. Pengaruh Fraksi Air Tanaman Tepung Otot (*Stellaria* sp.)

terhadap Kadar TNF- α Mencit (*Mus musculus* BALB-C). Tesis. Jurusan Biologi. Universitas Brawijaya. Malang

TABEL

Tabel selain ditulis di dalam naskah, hendaknya juga ditulis dalam format tabel dari *Microsoft Excel* (xls.) dan dimasukkan dalam file terpisah dari teks. Tabel berukuran maksimal 8 cm (satu kolom) dan 17 cm (dua kolom). Tabel dilampirkan pada lembar terpisah setelah daftar pustaka

Penomoran tabel adalah berurutan. Judul tabel ditulis singkat namun jelas pada bagian atas tabel. Judul dan kepala tabel menggunakan huruf kapital pada awal kalimat. Garis vertikal tidak boleh digunakan. Catatan kaki menggunakan angka dengan kurung tutup dan diketik *superscript*. Tanda (*) atau (**) digunakan untuk menunjukkan tingkat nyata berturut-turut pada taraf 95 dan 99%.

Gambar

Gambar, gambar yang ditampilkan dalam naskah harus jelas, memiliki resolusi tinggi dan kontras yang baik dalam format JPEG atau PDF dengan ketentuan sebagai berikut:

- a. *Monochrome image (line art)*, yaitu gambar berupa diagram dengan warna hitam putih (solid/tanpa ada warna abu-abu), harus memiliki resolusi 1000-1200 dpi (*dot per inch*).
- b. *Combination Halftone*, contohnya adalah gabungan antara gambar dan teks (gambar yang mengandung teks) dan grafik yang berwarna atau dalam format *grayscale*. Gambar jenis ini harus memiliki resolusi 600-900 dpi.
- c. *Halftone*, yang termasuk kelompok ini adalah gambar berwarna atau dalam format *grayscale* tanpa teks. Gambar jenis ini harus memiliki resolusi 300 dpi.
- d. Gambar hitam putih harus dibuat dalam mode *grayscale*, sedangkan gambar berwarna dalam mode RGB.
- e. Gambar dibuat berukuran lebar maksimal 8 cm (satu kolom), 12.5 cm (satu setengah kolom) atau 17 cm (dua kolom).
- f. Judul gambar ditulis dengan jelas pada bagian bawah gambar.

- g. Gambar dengan garis penunjuk (jika ada) hendaknya disatukan (*grouping*).
- h. Gambar dianjurkan hitam putih, apabila ingin mencantumkan gambar berwarna, biaya cetak dibebankan kepada penulis.
- i. Legenda atau keterangan gambar harus jelas dan lengkap. Jika gambar diperkecil maka semua tulisan harus tetap dapat terbaca.
- j. Grafik statistik disertai dengan file data sumbernya untuk memudahkan proses edit.
- k. Gambar yang akan dipublikasikan pada jurnal harus diberi keterangan jelas dan apabila gambar diperoleh dari pihak ketiga harus mendapat ijin dari pemilik gambar (*copyright holder*) baik gambar yang diperoleh secara *online* atau secara langsung

6. Prosedur Publikasi

Penulis wajib mengisi form pernyataan bahwa naskah belum pernah atau tidak sedang diajukan untuk dipublikasikan di jurnal lain. Seluruh naskah yang diterima akan dikirimkan ke Dewan Editor untuk dinilai. Dewan Editor berhak meminta penulis untuk melakukan perbaikan sebelum naskah dikirim ke penelaah. Editor juga berhak menolak naskah jika naskah tidak sesuai dengan format yang telah ditentukan. Naskah selanjutnya ditelaah oleh penelaah (reviewer) yang ahli pada bidang yang bersangkutan. Dewan editor akan menentukan naskah yang dapat diterbitkan berdasarkan hasil penelaahan.

7. Administrasi

Setiap penulis yang naskahnya siap diterbitkan dikenakan biaya minimal Rp.150.000,- untuk setiap naskah yang dimuat. Biaya dikirim ke redaksi pelaksana a.n. Afidatul Muji Astuti.

Gambar sampul:
Struktur Tiga Dimensi Senyawa EGCG (*Epigallocatechin-3-Gallate*)
Komponen Teh Hijau
Dibuat oleh:
Widodo, S.Si.,M.Si.,Ph.D MED Sc.

Alamat Redaksi

Redaksi JELS

Gedung E, Lt.2, Program Pascasarjana Universitas Brawijaya

Jl. Mayor Jenderal Haryono 169, Malang, 65145

Telp: (0341) 571260 ; Fax: (0341) 580801

Email: jels@ub.ac.id

Web: <http://www.jels.org>

