

**KAJIAN AKTIVITAS EKSTRAK RIMPANG KUNYIT (*Curcuma Tonga*)
DALAM PROSES PERSEMBUHAN LUKA PADA MENCIT SEBAGAI
MODEL PENDERITA DIABETES**

(Activity of Turmeric Extract (*Curcuma Tonga*) on the Wound Healing
Process in Induced Diabetic Mice)

Winarsih, W., I.Wientarsih E. Handharyani, S. Estuningsih, SD.Widhyari
Dep. Klinik, Reproduksi dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak rimpang kunyit dalam proses persembuhan luka pada mencit yang diinduksi diabetes dengan streptozotocin. Ekstrak rimpang kunyit yaitu fraksi etil asetat dan hexan dibuat sediaan farmasi salep. Enam puluh ekor mencit diinduksi streptozotocin dengan dosis 40mg/kg secara intraperitoneal (ip). Mencit dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kontrol positif (obat komersial neomycin sulfat 5%), kelompok diabetes (diinduksi diabetes, tidak diobati); kelompok III (salep fraksi etil asetat) dan kelompok IV (salep fraksi hexan). Salep diberikan secara topikal 2 kali/hari. Tiga mencit dari setiap kelompok nekropsis pada hari ke 2, 4, 7, 14 dan 21 hari pasca perlukaan untuk pemeriksaan patologi anatomi dan histopatologi. Secara patologi anatomi kelompok yang diberi salep fraksi etil asetat dan hexan menunjukkan persembuhan yang lebih baik dari kelompok diabetes. Secara mikroskopis kelompok yang diberi salep fraksi etil asetat dan hexan menunjukkan pembentukan neovaskularisasi dan reepitelisasi yang lebih cepat dibanding kelompok diabetes. Jumlah sel neutrofil pada kelompok diabetes lebih banyak dibandingkan kelompok yang diberi salep fraksi etil asetat dan hexan, hal ini menunjukkan kemampuan anti inflamasi pada fraksi etil asetat dan hexan. Berdasarkan perubahan makroskopik dan mikroskopik, sediaan salep fraksi etil asetat dan hexan dapat memperbaiki proses persembuhan luka pada mencit diabetes.

Kata kunci : Penyembuhan luka, diabetes, ekstrak rimpang kunyit, salep, patologi

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effectiveness of turmeric extract on the wound healing process in streptozotocin-induced diabetic mice. Turmeric extract (ethyl acetate and hexane fractions) were studied for their wound-healing properties in the formulation of ointment. Sixty mice were i.p injected with 40mg/bw of streptozotocin and divided into 4 groups; positive control (treated with commercial gel which contained neomycin sulfat 5%); diabetic group (without treatment); group III (treated with ethyl acetate fraction ointment), group IV (treated with hexane fraction ointment). The ointment of ethyl acetate and hexane fractions were given topically twice a day. Three mice from each groups were necropsied at 2nd, 4th, 7th, 14th and 21st days post incision (pi) for gross pathology and histopathological evaluation of the injured skin. Gross examination revealed that the ethyl acetate and hexane fractions ointment groups showed better result on wound-healing process compared to the diabetic group. Microscopically, the ethyl acetate and hexane fractions ointment group showed faster neovascularization and reepithelialization compared to the

diabetic group. The amount of neutrophyl infiltration revealed that the diabetic group showed more cells than ethyl acetate and hexane fractions groups, which indicated anti inflammatory activities of ethyl acetate and hexane fractions. Based on the macroscopic and microscopic observation, the ointment of ethyl acetate and hexane fractions have got properties which promotes wound healing in diabetic mice.

Keywords: Wound healing, diabetic, turmeric extract, ointment, pathology

PENDAHULUAN

Diabetes melitus adalah penyakit yang disebabkan oleh gangguan metabolisme karbohidrat dengan salah satu gejala umum yaitu hiperglikemia (Mayfield, 1998). Akibat hiperglikemia yang kronis dapat menimbulkan berbagai kerusakan pada organ (Mayfield, 1998; Singh *et al.* 2005). Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO, 2002) diabetes melitus merupakan epidemi di dunia.

Diabetes biasanya berjalan kronis dan menimbulkan berbagai komplikasi (WHO, 2002; Singh *et al.* 2005; Yeh *et al.* 2003) antara lain kerusakan pada mata (retinopathy), ginjal (nephropathy), syaraf (neuropathy), pembuluh darah (angiopathy) dan *kaki diabetik*. Pada penderita diabetes proses persembuhan luka terjadi sangat lambat. Akibat persembuhan luka yang terhambat akan terbentuk luka ulkus terutama pada bagian ekstemitas atau disebut *kaki diabetik* (Singer *et al.* 1999; Kampfer *et al.* 2005). Di Amerika serikat setiap tahun 6,5 juta orang menderita luka kulit yang kronis akibat diabetes melitus atau trauma. *Kaki diabetik* terjadi pada 10-25% penderita diabetes dan harus diamputasi dengan tingkat kematian 13-40%.

Kulit mempunyai fungsi utama sebagai barrier pelindung dari lingkungan (Singer *et al.* 1999). Luka pada kulit adalah terdapatnya kerusakan morfologi jaringan kulit atau jaringan yang lebih dalam. Persembuhan luka adalah kembali menjadi normalnya integritas kulit dan jaringan yang berada dibawahnya (Singer *et al.* 1999; Halper *et al.* 2003). Proses persembuhan luka merupakan suatu proses yang kompleks yang meliputi proses inflamasi (peradangan), granulasi dan regenerasi sel/jaringan (Singer *et al.* 1999).

Kunyit (*Curcuma longa* Linn atau *Curcuma domestica* Val.) termasuk dalam famili Zingiberaceae, telah lama dikenal oleh masyarakat sebagai tanaman yang sangat banyak manfaatnya dan digunakan sebagai obat tradisional .

Curcumin merupakan bahan terpenting dalam kunyit. Menurut Singh *et al* (2002) dan Araujo dan Leon (2001) kunyit berkhasiat sebagai anti-peradangan, obat luka, anti-protozoa, anti bakteri, anti-viral, anti-fungi dan anti-kanker. Pemberian kunyit dapat menurunkan gula darah pada tikus yang diinduksi diabetes (Arun *et al*, 2002; Hussain, 2002). Penelitian Sidhu *et al* (1998) menunjukkan bahwa pemberian curcumin dapat mempercepat proses persembuhan luka pada hewan. Curcumin dapat mencegah terjadi fibrosis pada jaringan/organ (Chattopadhyay *et al*. 2004). Oleh karena itu dalam penelitian ini akan dikaji potensi ekstrak rimpang kunyit dalam proses persembuhan luka pada hewan coba yang diinduksi diabetes.

METODE PENELITIAN

Rimpang Kunyit

Rimpang kunyit yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah kunyit yang dipanen pada umur 9 bulan. Kunyit diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO) Bogor. Identifikasi tanaman kunyit dilakukan di Herbarium Bogoriensi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI).

Ekstraksi Rimpang Kunyit

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Simplisia kunyit dimasukkan ke dalam wadah, setelah itu ditambahkan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 10 : 1 dan direndam selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penampungan filtrat dan dilakukan evaporasi hingga dihasilkan ekstrak etanol semi padat. Kemudian dilakukan fraksinasi dan evaporasi, sehingga diperoleh fraksi hexan dan etil asetat semi solid.

Induksi Diabetes pada Mencit

Induksi diabetes dilakukan menurut metode (Eshrat and Hussain, 2002; Srinivanan dan Menon, 2003) yaitu menggunakan streptozotocin (STZ) dengan dosis 40 mg/kg bb secara intraperitoneal. Kemudian secara interval dilakukan pemeriksaan kadar glukosa darah. Mencit dianggap menderita diabetes bila menunjukkan kadar gula darah 200 mg/dl .

Preparasi Sediaan Ekstrak Rimpang Kunyit Sebagai Obat Luka Hewan Diabetes

Fraksi etil asetat dan fraksi hexan ekstrak etanol rimpang kunyit dalam penelitian ini disajikan dalam bentuk sediaan farmasi salep dengan konsentrasi tertentu.

Perlukaan pada Hewan Coba Diabetes

Pada penelitian ini digunakan 60 ekor mencit yang dibagi menjadi 4 kelompok. Kelompok hewan coba terdiri dari :

- a. Kontrol positif (diinduksi diabetes, obat komersial Neomycin sulfat 5%)
- b. Kelompok diabetes (diinduksi diabetes, tidak diobati)
- c. Kelompok yang diinduksi diabetes dan diberi salep fraksi etil asetat
- d. Kelompok yang diinduksi diabetes dan diberi salep fraksi hexan

Perlukaan dilakukan pada punggung mencit dengan sayatan sepanjang 1,5 cm (Halper *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005). Sediaan salep fraksi etil asetat dan hexan diberikan secara topikal pada bagian luka mencit 2 kali/hari. Pemberian salep fraksi etil asetat dan hexan dilakukan selama 21 hari (Halper *et al.* 2003).

Pengamatan Patologi Anatomi dan Histopatologi pada Mencit Diabetes

Perubahan patologi anatomi yang diamati adalah merapatnya kulit, keringnya luka dan keropeng (Winarsih dkk, 2007). Mencit dinekropsi pada hari ke 2, 4, 7, 14 dan 21 hari pasca perlukaan (Halper *et al.* 2003).

Sampel kulit diambil dan difiksasi dalam larutan buffer normal formalin (BNF) 10%, didehidrasi dengan alkohol berbagai konsentrasi (70%, 80%, 90% dan alkohol absolut I dan II), *clearing* dengan xylol dan diembedded dalam parafin. Jaringan dipotong dengan ketebalan 5 mikron. Kemudian dilakukan rehidrasi dan sediaan diwarnai dengan hematoksilin eosin (HE) dan pewarnaan khusus (*Masson Trichrome*).

Pengamatan histopatologi dilakukan secara deskriptif (Chen *et al.* 2005 an Winarsih dkk, 2007) yaitu hiperemi, edema, pendarahan, reepitelisasi, pembentukan jaringan ikat serta jumlah sel radang neutrofil dan neovaskularisasi (pembuluh darah baru). Penghitungan dilakukan pada 5 lapang pandang dengan pembesaran objektif 40 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan pada penelitian ini terlihat bahwa pemberian salep fraksi etil asetat dan hexan ekstrak rimpang kunyit secara topikal dapat memperbaiki proses persembuhan luka bila dibandingkan dengan kelompok diabetes (mencit yang diinduksi diabetes dan tidak diobati). Pada kelompok mencit yang diinduksi diabetes dan diobati salep fraksi etil asetat dan hexan pada hari ke 14 pasca perlukaan, luka sudah tertutup sempurna (Tabel 1). Kelompok diabetes menunjukkan persembuhan yang lebih lambat dibandingkan kelompok lainnya. Pada kelompok diabetes, pada hari 21 pasca perlukaan menunjukkan luka berkeropeng dengan panjang luka 0,98 cm. Menurut Nayak (2006) persembuhan luka pada penderita diabetes lambat membutuhkan waktu berminggu-minggu. Hal ini terjadi karena berbagai komplikasi akibat diabetes yang mengganggu proses fisiologis dan proses persembuhan luka.

Tabel 1. Perubahan Patologi Anatomi kulit mencit yang diinduksi diabetes

Kelompok	Perubahan PA Luka pada hari ke				
	2	4	7	14	21
Kontrol positif	Luka masih terbuka, basah dan merah Panjang luka 1cm	Kering, masih terbuka, keropeng Panjang luka 1cm	Kering & mulai tertutup Panjang luka 0,8 cm	Luka mulai tertutup Panjang luka 0,15 cm	Luka tertutup sempurna & ditumbuhi rambut
Diabetes	Luka masih terbuka, basah dan merah Panjang luka 1,5 cm	Luka masih terbuka, basah dan merah Panjang luka 1,35 cm	Luka masih terbuka, basah, merah dan keropeng Panjang luka 1,25cm	Luka masih terbuka, mulai mengering dan keropeng Panjang luka 1,10 cm	Luka masih terbuka, mulai mengering & keropeng Panjang luka 0,98 cm
Salep Etil asetat	Luka masih terbuka, basah dan merah Panjang luka 1,20 cm	Luka mulai tertutup & mengering Panjang luka 0,80cm	Tertutup sempurna, masih keropeng Panjang luka 0,80cm	Luka sudah tertutup sempurna	Luka tertutup sempurna & ditumbuhi rambut
Salep Hexan	Luka masih terbuka, basah dan merah Panjang luka 1,25 cm	Luka mulai tertutup & mengering Panjang luka 1,10 cm	Luka mulai tertutup & mengering & keropeng Panjang luka 0,75 cm	Luka sudah tertutup sempurna	Luka tertutup sempurna & ditumbuhi rambut

Pada pengamatan histopatologi jumlah sel neutrofil pada kelompok gel dan salep fraksi etil asetat lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol positif dan diabetes. Pada kelompok salep fraksi etil asetat dan salep fraksi hexan hari ke 2 pasca perlukaan infiltrasi sel radang neutrofil mulai terjadi dan jumlahnya menurun pada hari ke 4 pasca perlukaan. Kelompok diabetes menunjukkan peradangan yang hebat dan lama dibandingkan kelompok lainnya (Tabel 2, 3, 4).

Tabel 2 Histopatologi kulit mencit yang diinduksi diabetes

Kelompok	Histopatologi kulit pada hari ke				
	2	4	7	14	21
Kontrol positif	Infiltrasi sel radang, hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang meningkat hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang menurun hiperemi, edema	Infiltrasi sel radang menurun, jaringan ikat, terbentuk reepitelisasi	Infiltrasi sel radang tidak ada, jaringan ikat dan neovaskularisasi (++) I terbentuk reepitelisasi dan folikel rambut
Diabetes	Infiltrasi sel radang, hiperemi, edema, pendarahan & nekrotik	Infiltrasi sel radang meningkat, hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang meningkat, hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang meningkat, hiperemi, dan nekrotik peradangan meluas ke bagian dermis	Infiltrasi sel radang masih tinggi, nekrotik bertambah, neovaskularisasi mulai terbentuk peradangan meluas ke bagian dermis
Salep Etil asetat	Hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang menurun, hiperemi, edema, terbentuk jaringan ikat (+) dan neovaskularisasi	Infiltrasi sel radang neutrofil tidak ada, jaringan ikat dan neovaskularisasi (++) , terbentuk reepitelisasi dan folikel rambut	Jaringan ikat dan neovaskularisasi (++) , terbentuk reepitelisasi dan folikel rambut	Jaringan ikat, neovaskularisasi, reepitelisasi dan folikel rambut bertambah
Salep Hexan	Hiperemi, pendarahan, edema & nekrotik	Infiltrasi sel radang menurun, hiperemi, edema, terbentuk jaringan ikat (+) dan neovaskularisasi	Infiltrasi sel radang neutrofil tidak ada, jaringan ikat dan neovaskularisasi (++) , terbentuk reepitelisasi dan folikel rambut	Jaringan ikat dan neokapilerisasi (++) , terbentuk reepitelisasi dan folikel rambut	Jaringan ikat neovaskularisasi, reepitelisasi dan folikel rambut bertambah

Tabel 3. Rataan jumlah sel neutrofil pada kulit mencit yang diinduksi Diabetes

Kelompok	Jumlah neutrofil pada hari ke				
	2	4	7	14	21
Kontrol positif	30,00	23,00	2,33	1,30	0,00
Diabetes	33,65	34,34	41,50	26,00	36,00
Salep Etil asetat	21,67	8,50	0,00	0,00	0,00
Salep Hexan	19,67	7,50	0,00	0,00	0,00

Tabel 4 Rataan jumlah neovaskularisasi pada kulit mencit yang diinduksi diabetes

Kelompok	Jumlah neovaskularisasi pada hari ke				
	2	4	7	14	21
Kontrol positif	0,00	0,00	2,67	4,00	2,17
Diabetes	0,00	0,00	0,00	0,00	2,17
Salep Etil asetat	0,00	1,00	7,83	2,33	0,83
Salep Hexan	0,00	0,33	11,84	4,17	1,20

Pada kelompok diabetes infiltrasi sel radang neutrofil mulai terjadi hari ke 2 pasca perlukaan dan jumlahnya terus meningkat sampai pada hari ke 21 pasca perlukaan. Demikian pula jaringan yang mengalami nekrose meningkat sampai ke bagian dermis kulit. Edema dan pendarahan masih terjadi pada hari ke 7 pasca perlukaan pada kelompok diabetes. Hal ini menunjukkan proses peradangan masih terjadi sampai hari ke 21 pasca perlukaan. Pada kelompok diabetes, walaupun secara patologi anatomi luka sudah mengering dan tertutup epitel akan tetapi peradangan masih terjadi dan meluas ke bagian dermis kulit.

Secara normal proses persembuhan luka segera dimulai setelah terjadi perlukaan pada jaringan (Nayak, 2006). Proses persembuhan terdiri dari tiga tahap yaitu inflamasi (peradangan), proliferasi dan *remodeling*. Proses persembuhan dimulai dengan pembentukan fibrin untuk menutup luka serta infiltrasi sel radang terutama neutrofil. Neutrofil, akan membersihkan area luka dari benda asing, sel-sel mati dan bakteri serta mengeluarkan sitokin seperti *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Plateled-derived Growth Factor* (PDGF) dan *Transforming Growth Factor beta* (TGF-(3) yang mengaktivasi fibroblast lokal dan keratinosit. Infiltrasi neutrofil hanya berlangsung beberapa hari.

Hasil pemeriksaan neutrofil menunjukkan pada kelompok salep fraksi etil asetat dan hexan peradangan lebih cepat berhenti. Dari uji fitokimia yang dilakukan pada tahun pertama, fraksi etil asetat mengandung flavonoid dan kuinon. Fraksi hexan mengandung alkaloid, saponin, dan kuinon (Winarsih dkk, 2007). Flavonoid, tanin dan triterpenoid bersifat sebagai astringensia dan antimikroba, sehingga mengurangi peradangan dan mempercepat proses kontraksi dan reepitelisasi (Nayak *et al.* 2006). Saponin bersifat sebagai imunostimulator yang menggerakkan tanggapan kebal inang, sehingga mempercepat proses regenerasi dan reepitelisasi. Sedangkan alkaloid mempercepat persembuhan luka dengan meningkatkan *transforming growth factor /31* (TGF-13P) dan *Epidermal growth factor* (EGF) (Porras-Reyes *et al.* 1993; Dong *et al.* 2005).

Pada penelitian ini terlihat bahwa pemberian fraksi etil asetat dan hexan secara topikal pada mencit yang diinduksi diabetes, dapat mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (neovaskularisasi) (Tabel 4). Pada kelompok salep fraksi etil asetat dan hexan, neovaskularisasi mulai terjadi pada hari ke 4 pasca perlukaan. Pada kelompok obat neovaskularisasi dimulai pada hari ke 7 pasca perlukaan. Sedangkan pada kelompok diabetes neovaskularisasi dimulai pada hari ke 21 pasca perlukaan. Hal ini sejalan penelitian Sidhu *et al.*, (1998) yang menyatakan bahwa pemberian curcumin pada tikus dan marmot dapat mempercepat reepitelisasi dan meningkatkan migrasi sel radang, fibroblas dan myofibroblas pada daerah luka.

Pembentukan pembuluh darah baru sangat mempengaruhi proses persembuhan. Menurut Chen *et al.* (2005) proses persembuhan luka dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jaringan yang terlibat, vaskularisasi, infeksi, gizi, umur, suhu dan ukuran jaringan yang rusak. Regenerasi setiap jaringan sangat penting dalam proses persembuhan luka. Neovaskularisasi sangat diperlukan dalam proses persembuhan luka untuk membawa oksigen dan nutrisi yang sangat diperlukan untuk metabolisme sel dan regenerasi jaringan (Singer and Clark, 1999). Nayak (2006) menyatakan persembuhan luka tergantung pada sirkulasi darah di daerah yang mengalami luka serta pembentukan dan deposisi kolagen.

Pada kelompok salep fraksi etil asetat dan hexan, pembentukan jaringan ikat mulai terjadi pada hari ke 4 pasca perlukaan. Pada kontrol positif jaringan ikat

dimulai pada hari ke 7 pasca perlukaan. Sedangkan pada kelompok diabetes jaringan ikat dimulai pada hari ke 21 pasca perlukaan. Dari uji *in vitro* yang dilakukan pada tahun kedua diperoleh hasil yaitu penambahan fraksi hexan dan etil asetat dapat meningkatkan proliferasi sel kultur MDBK (Winarsih *et al.* 2008). Menurut Thaloor *et al.*, (1999) dalam Joe *et al.*, (2004) pada uji *in vitro* penambahan curcumin dapat meningkatkan proliferasi sel myoblas.

Pada penderita diabetes persembuhan luka terhambat akibat banyak faktor antara lain hambatan sirkulasi darah dan oksigen akibat peningkatan kadar gula darah, sehingga terjadi penurunan sintesis kolagen dan fibronektin (Nayak, 2006). Hal ini juga mengakibatkan penurunan sistem imun, akibat penurunan fungsi neutrofil yaitu kemampuan migrasi, kemotaksis, aktivitas fagositosis dan bakterisidal.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini disimpulkan pemberian salep fraksi etil asetat dan hexan rimpang kunyit dapat mempercepat proses persembuhan luka pada mencit yang diinduksi diabetes. Pemberian fraksi etil asetat dan hexan dapat mengurangi proses peradangan, mempercepat pembentukan pembuluh darah baru (neovaskularisasi), reepitelisasi dan jaringan ikat.

DAFTAR PUSTAKA

- Araujo, C.A.C and L.L. Leon. 2001. Biological activities of *Curcuma longa* L. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 96 (5) : 723 – 728
- Arun, N. and Nalini. 2002. Efficacy of turmeric on blood sugar and polyol pathway in diabetic albino rats. *Biochem. Pharmacol.* 56 : 1607 – 1614
- Chattopadhyay. L, K. Biswas, U. Bandyopadhyay and R.K. Banerjee. 2004. Turmeric and curcumin ; biological actions and medicinal applications. *Current Sci.* 87 (1) : 44 – 53
- Chen, J., *et al.* 2005. Tissue factor as a link between wounding and tissue repair. *Diabetes* 52 : 2143 – 2154
- Dong, Y., He. L, Chen, F. 2005. Enhancement of wound healing by taspine and its effect on fibroblast. *Zhang Yao Cai.* 28 (7) : 579-582 (Abstract)

- Eshrat H. and M. A. Hussain. 2002. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from *Curcuma longa*, Linn and partially purified product from *Abroma augusta*, Linn in streptozotocin induced diabetes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 17 (2) : 33-43
- Halper, J., L.S.Leshin, S.J. Lewis and W.L Li. 2003. Wound healing and angiogenic properties of supernatant from *Lactobacillus* cultures. *Exp. Biology and Med.* 228: 1329- 1337
- Hussain, H.E.M.A. 2002. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant properties of combination of curcumin from *Curcuma longa*, Linn and partially purified product from *Abroma augusta*, Linn in streptozotocin induced diabetes. *Indian J. of Clin.Biochem.* 17 : 33 – 43
- Joe, B., M. Vijaykumar and B.R. Lokesh. 2004. Biological Properties of Curcumin-Cellular and Molecular Mechanisms of Action. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:97-111
- Kampfer, H., R.Schnidt, G. Geisslinger, J. Pfeilschifter and S. Frank. 2005. Wound inflammation in diabetic *ob/ob* mice : functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. *Diabetes* 54 : 1543 – 1551
- Mayfield, J. 1998. Diagnosis and classification of diabetes mellitus : new criteria. *American Family Physician* 58 (6) : 1-8
- Nayak, B.S. and L. M. P. Pereira. 2006. *Catharanthus roseus* flower extract has wound -healing activity in Sprague Dawley rats. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6: 41.
- Nayak, S. 2006. Influence of ethanol extract of *Vinca rosea* on wound healing in diabetic rats. *J. of Biological Sci.* 6(2) 51-55
- Porras-Reyee, BH., WH. Lewis, J. Roman, L. Simchowit, TA. Mustoe. 1993. Enhancement of wound healing by the alkaloid taspine defining mechanism of action. *Proc Soc Exp Biol Med*;203(1):18-25.
- Singer, A.J and R.A.F. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of medicine* 341 : 738 – 746
- Sidhu GS, Singh AK, Thaloor D, Banaudha KK, Patnaik GK, Srimal RC, Maheshwari RK. 1998. Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen.* 6(2):167-77
- Singh, N., D.G. Amstrong, B.A. Lipsky. 2005. Preventing foot ulcers in patient with diabetes. *JAMA* 293 (2) : 217 – 228

- Singh,R., R.Chandra, M. Bose, PM. Luthra. 2002. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome on pathogenic bacteria. *Current &i*. 83 :737-740
- Srinivasan, A., V.P. Menon, V. Periaswamy, K.N. Rajasekaran. 2003. Protection of pancreatic b-cell by potential antioxidant bis-o-hydroxycinnamoyl methane, analogue of natural curcuminoid in experimental diabetes. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 6 : 327 – 333
- Winarsih, W., 1. Wientarsih dan E. Handharyani. 2007. Kajian aktivitas ekstrak rimpang kunyit (*Curcunia longa*) dalam proses persembuhan luka pada mencit sebagai model penderita diabetes. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XV Perguruan Tinggi. FKH-IPB.
- Winarsih, W., 1. Wientarsih, E. Handharyani dan S. Estuningsih. 2008. Kajian aktivitas ekstrak rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dalam proses persembuhan luka pada mencit sebagai model penderita diabetes. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XV Perguruan Tinggi. FKH-IPB.
- Yeh, G.Y., D.M. Eisenberg, T.D. Kaptchuk and R.S. Phillips. 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycernic control in diabetes. *Diabetes Care* 26: 1277 – 129

**EFEK ANTIHIPERGLIKEMIK EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA
(*Azadirachta indica J*) PADA TIKUS DIABETES YANG DIINDUKSI
ALOKSAN DAN PENGEMBANGANNYA MENJADI SEDIAAN TABLET
MENGUNAKAN METODE GRANULASI BASAH**

(Antihyperglycaemic Effect Of *Azadirachta Indica J* Extract On Alloxan –
Induced Diabetic Rat And Tablet Formulation Used Wet Granulation)

**Bambang Pontjo Priosoeryanto, Bayu Febram Prasetyo, Ietje Wientarsih,
Rini Madyastuti**

Dep. Klinik, Reproduksi, dan Patologi
Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antihyperglukemik ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica J*) pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan, indentifikasi senyawa aktif dengan GC-MS, dan pengembangan formulasi tablet. Untuk uji antihyperglukemik menggunakan 18 ekor tikus galur *Sprague Dawley* dibagi menjadi 6 kelompok. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak yang diberikan secara oral dosis 30, 60 dan 90mg /kg bobot badan menunjukkan penurunan kadar glukosa darah mencit diabetes aloksan yang bermakna ($P < 0,05$) sebesar 7%, 8%, dan 14,8% setelah pemberian ekstrak secara berulang pada hari kesepuluh yang dibandingkan dengan hari keenam. Identifikasi golongan senyawa flavonoid menunjukan keberadaan fraksi gabungan 1 yaitu antosianidin yang mempunyai struktur umum ion flavylum (2-fenil-benzopyrylium), sedangkan fraksi gabungan 2 diduga mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu antosianidin yang mempunyai struktur umum ion flavylum (2-fenil-benzopyrylium) dan beberapa senyawa yang diduga turunan antosianidin yaitu 7-hidroksi flavylum, 4'-hidroksi flavylum, dan 3,4,7'-trihidroksi flavylum. Ekstrak kental daun mimba dapat dibuat sediaan tablet menggunakan PVP K-30 sebagai pengikat dengan metode granulasi basah.

Kata kunci: *Azadirachta indica J*, antihyperglycaemic, alloxan, ethanol extract.

ABSTRACT

This study was aimed to determine antihyperglycaemic effect of *Azadirachta indica J* extract on alloxan-induced diabetic rat, active compound identification, and tablet formulation. This study used 18 mice *Sprague Dawley* strains are divided into 6 groups. The results of this study indicate that extracts dose given orally 30, 60 and 90mg / kg body weight showed a decrease of blood glucose levels of diabetes mice alloxan significant ($P < 0.05$) by 7%, 8%, and 14.8% after giving repeatedly extracts on the tenth day compared with the sixth day. Identification of flavonoid compound showed antocianidin which have flavylum (2-fenil-benzopyrylium) ion on the first fraction and the second fraction showed antocianidin : ion flavylum (2-fenil-benzopyrylium), 7-hidroksi flavylum, 4'-hidroksi flavylum, and 3,4,7'-trihidroksi flavylum. Mimba extract could be made on tablet formulation used PVP K-30 on wet granulation.

Keywords: *Azadirachta indica J*, antihyperglycaemic, alloxan, ethanol extract.

PENDAHULUAN

Diabetes merupakan penyakit yang disebabkan oleh peningkatan kadar glukosa dalam darah akibat kekurangan hormone insulin baik absolute maupun relatif (Suyono 1999). Hormon insulin dihasilkan oleh sel-sel β pulau Langerhans yang terdapat dalam kelenjar pancreas, kekurangan hormone ini menyebabkan glukosa tidak dapat diubah menjadi glikogen, akibatnya terjadi kelebihan kadar glukosa dalam darah (Rajasekaran et al, 2005). Gejala yang ditimbulkan oleh diabetes mellitus antara lain poliurea (banyak mengeluarkan urin), polidipsi (haus terus menerus), berat badan berkurang dengan cepat, polifagia (banyak makan), hiperglikemia, glukosuria, ketosis, gatal-gatal, penglihatan kabur, gairah sex menurun, luka sukar sembuh, cepat lelah, kesemutan pada jari tangan dan kaki, pada wanita hamil dapat menyebabkan bobot bayi diatas 4 Kg (Suyono 1999). Akibat lain yang disebabkan oleh diabetes mellitus adalah kerusakan pada mata, syaraf, jantung, dan pembuluh darah.

Kadar glukosa normal pada manusia adalah 80-110 mg/dL, sedangkan pada penderita diabetes mellitus kadar glukosa darah saat puasa ≥ 126 mg/dL dan setelah makan ≥ 200 mg/dL, ditambah gejala khas diabetes. (Can et al . 2004). Faktor yang menyebabkan terjadinya diabetes antara lain keturunan, obesitas, pola makan yang tidak sehat, malnutrisi, gangguan toleransi glukosa, dan lingkungan (Tjokroprawiro 1989). Penggunaan obat sintetis untuk mengobati diabetes memiliki efek samping seperti mual, muntah, dan pusing, oleh karena itu perlu juga dicari alternatif didalam proses pengobatan untuk menghindari berbagai efek samping yang ditimbulkan. Salah satunya menggunakan tanaman obat yang secara ilmiah dapat digunakan untuk menurunkan kadar gula darah seperti tanaman mimba (*Azadirachta indica* A Juss). Tanaman mimba yang sudah lama dikenal merupakan pohon yang memiliki berbagai manfaat yaitu bijinya untuk obat gatal, daunnya digunakan untuk mengusir lalat pada sapi, batangnya dapat digunakan untuk keperluan rumah tangga (Soewita, 1995). Tumbuhan ini sangat kaya dengan kandungan kimia antara lain : azadirachtin, minyak gliserida, asetiloksifuranil, oksosiklopentanotolfuran, hidroksitetrametil, fenantenon, nimbol (Wijayakusuma 2000).

METODE PENELITIAN

Bahan

Simplician daun mimba yang berasal dari BALITRO BOGOR, ethanol 70%, n-heksana, etil asetat, pelarut Mayer, Dragendorf, kloroform, aquadest, asam asetat, n-butanol, NH₄OH, NaOH 1 M, H₂SO₄ 2 M, kertas saring, serbuk Mg, HCl pekat, amil alkohol, anhidrida asetat, pereaksi Wagner, AlCl₃. etanol 95%, aquadest, polivinilpirolidon K 30, amylum manihot, dekstrin, aerosil, talk, dan Mg stearat.

Metode

Pembuatan ekstrak daun mimba

Ekstraksi daun mimba kering dilakukan dengan metoda refluks. Daun mimba kering sebanyak 25 g dimasukan kedalam erlenmeyer ditambah etanol 70% dan direfluks selama 4 jam. Disaring dan direfluks kembali dengan 300 ml etanol 70%. Hasil saringan dicampur dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰C dan 50 rpm sampai pekat . Setelah itu ditimbang rendemennya.

Analisis Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Mimba

Analisis fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, tannin, saponin, dan triterpenoid. (Harborne. 1987)

Uji aktivitas antihiperglikemik dengan tikus putih.

Penelitian mengenai aktivitas hipoglikemik dari daun mimba ini dilakukan dengan menggunakan tikus putih jantan galur *Sparaque dawley* yang diinduksi menderita hiperglikemia dengan aloksan. Untuk uji aktivitas daun mimba pada percobaan ini digunakan 30 tikus sehat yang terbagi dalam 6 kelompok yaitu : Kelompok kontrol normal (kel I) : tikus disuntik dengan NaCl 0.90 % dan dicekok aquades, kelompok kontrol negatif (Kel II) : tikus disuntik aloksan dan dicekok aquades, kelompok kontrol positif (kel III) : tikus disuntik aloksan dan dicekok obat glibenklamid, Kelompok perlakuan (kel IV,V,VI) : tikus disuntik aloksan dan dicekok ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 30,60,90 mg/kgBB .(Sebelum diberi perlakuan, kadar glukosa darah hewan uji diukur terlebih dahulu.

Kelompok II sampai VI ditingkatkan kadar glukosa darahnya dengan cara disuntik aloksan dosis 120 mg/kgBB sampai terjadi hiperglikemia secara intraperitoneal. Pengukuran kadar glukosa darah dilakukan 3 hari setelah penyuntikan aloksan, selanjutnya pengukuran kadar glukosa darah dilakukan pada hari ke-7,14 dan 21.

Identifikasi dengan Kromatografi Gas – Spektrometri Massa (GC-MS)

Terhadap Fraksi yang didapat dilakukan identifikasi secara kromatografi gas-spektrometri massa. Satu ml fraksi disaring dengan filter ukuran 0,45 µm dan siap diinjeksikan. Untuk GC-MS, volume yang diinjeksikan adalah 1 µl. suhu injektor diprogram konstan pada suhu 290°C, sedangkan suhu detektor diprogram konstan pada 150°C dengan. Helium sebagai gas pembawa di set pada kecepatan tetap 1 ml/menit dan tekanan 8,73 psi. Untuk analisis fraksi daun mimba digunakan kolom Agilent 19091J-433 HP-5 berukuran 0.25mm x 30m x 0.25µm. Dalam analisis fraksi daun mimba ini suhu kolom di program dari 70°C sampai 290°C dengan 1 tahap kenaikan. Pada tahap awal suhu kolom dinaikkan dari 70°C menjadi 290°C dan kemudian dibuat konstan 290°C selama 30 menit dengan kecepatan kenaikan suhu 15°C/menit. Spektrum massa fraksi yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi dengan cara membandingkannya dengan bank data Wiley7Nist05.L yang memuat 62.345 spektrum massa senyawa yang telah diketahui.

Pembuatan dan Evaluasi Sediaan Tablet

Granul yang telah jadi kemudian dicetak dengan menggunakan mesin pencetak tablet *single punch*, kemudian dilakukan pengujian sediaan tablet yang telah jadi meliputi uji penampilan, uji keseragaman ukuran, uji keseragaman bobot, uji kekerasan, uji friabilita dan uji waktu hancur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Antihiperglikemik

Berdasarkan pada Tabel 1, kadar glukosa darah pada kondisi awal, yaitu sesaat sebelum di suntik aloksan dari semua kelompok mempunyai kadar yang

hampir sama. Kadar glukosa darah tikus semua kelompok dalam keadaan normal adalah 84-101mg/dL. Pada penelitian antidiabetes ekstrak daun mimba dengan metode induksi aloksan, semua kelompok tikus yang disuntik aloksan secara intraperitoneal memperlihatkan peningkatan kadar glukosa (hiperglikemia) sebesar 10-82% dibandingkan kadar awalnya, sedangkan pada hari ke-10 pasca induksi aloksan terlihat penurunan pada kadar glukosa darah mencit kontrol positif, kontrol perlakuan dosis 30,60,90 mg/kgBB sebesar 7%, 8%, dan 14,8%.

Tabel 1. Data kadar glukosa darah

Kelompok	Kadar Glukosa Awal (H0)	Kadar Glukosa Induksi (H6)	Kadar Glukosa Perlakuan (H10)
Perlakuan	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)
K N	93,3± 18,505	103,3± 3,21	91,6 ±18,4
K (-)	101 ± 10,81	155,3± 3,05	164,6 ±2,88
K (+)	86,6 ± 5,03	132,3 ± 4,16	112 , 6 ± 4,04
KP 1	88,5 ± 8,5	147,7± 3,05	136 ,3 ± 6,11
KP 2	96,3 ± 18,4	139,6 ± 13,57	128 ,3 ± 8,08
KP 3	84,6 ± 7,57	154,6 ± 3,51	131,6 ± 2,51

Ket :

KN : kontrol normal; disuntik NaCl fisiologis dan diberi larutan aquades

K (-) : kontrol negatif : disuntik aloksan dan diberi larutan aquades

K (+) : kontrol positif: disuntik aloksan dan diberi obat glibenklamid 0,9mg/kgBB

KP1 : kontrol perlakuan 1; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 30 mg/kgBB.

KP2 : kontrol perlakuan 2; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 60 mg/kgBB.

KP3 : kontrol perlakuan 2; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 90 mg/kgBB.

Berdasarkan hasil tersebut kontrol perlakuan yang diberi ekstrak daun mimba pada dosis 90 mg/kgBB memberikan hasil yang sama dengan kontrol positif. Data kadar glukosa dapat dilihat pada Tabel 1. Perbandingan kadar glukosa darah tikus pada hari ke-0, hari ke-6, dan hari ke-10 pasca induksi untuk kontrol positif, dan perlakuan mengalami penurunan tetapi untuk kontrol normal tetap mengalami hiperglikemik karena tidak diinduksi aloksan. Bobot badan tikus untuk kontrol negatif, positif, dan perlakuan pada hari ke-6 pasca induksi mengalami penurunan akibat pemberian induksi aloksan sehingga terjadi kerusakan pada pulau Langerhans sehingga pankreas tidak bisa memproduksi insulin. Rata-rata data bobot badan tikus dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rata-rata Data Bobot Badan Tikus

Kelompok	Bobot Awal	Bobot Sebelum Induksi	Bobot Setelah Induksi	Bobot Setelah Perlakuan
Perlakuan	(gram)	(gram)	(gram)	(gram)
Kontrol Normal	152,3 ± 10,06	192,3 ± 1,5	212,3 ± 19,6	220,3 ± 23,0
Kontrol Negatif	137,0 ± 12,7	159,7 ± 8,14	156,7 ± 8,87	163,7 ± 18,14
Kontrol Positif	134,0 ± 7,1	179,3 ± 24,09	165,7 ± 16,86	177,3 ± 13,7
KP 1	142,3 ± 13,05	177,7 ± 12,58	159,7 ± 9,45	170,7 ± 5,13
KP 2	130,7 ± 4,16	170,0 ± 14,0	159,3 ± 11,23	175,7 ± 7,50
KP 3	141,3 ± 10,01	172,3 ± 5,7	157,0 ± 9,5	171,0 ± 12,52

Ket :

KN : kontrol normal; disuntik NaCl fisiologis dan diberi larutan aquades

K (-) : kontrol negatif : disuntik aloksan dan diberi larutan aquades

K (+) : kontrol positif: disuntik aloksan dan diberi obat glibenklamid 0,9mg/kgBB

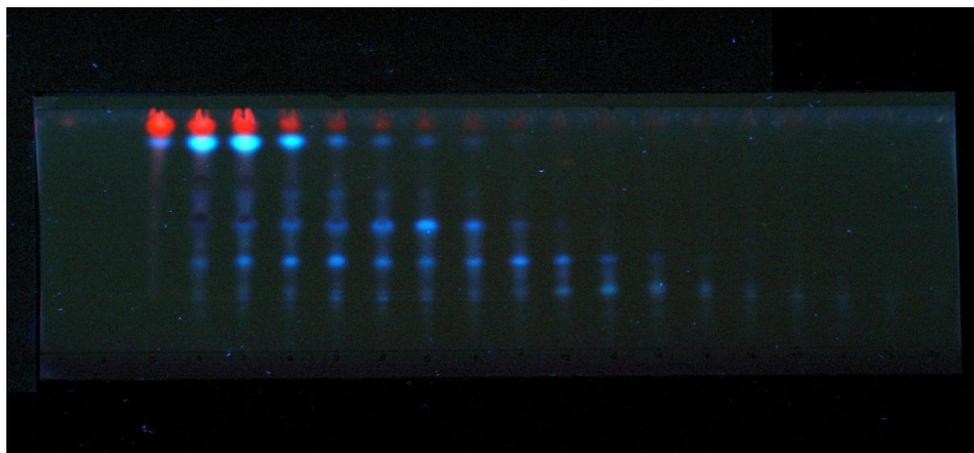
KP1 : kontrol perlakuan 1; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 30 mg/kgBB.

KP2 : kontrol perlakuan 2; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 60 mg/kgBB.

KP3 : kontrol perlakuan 2; disuntik aloksan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dosis 90 mg/kgBB.

Identifikasi Senyawa Flavonoid

Pada pengujian flavonoid, fraksi gabungan hasil kromatografi kilas diperoleh sebanyak 6 buah fraksi, kemudian dilakukan uji flavonoid terhadap 6 buah fraksi gabungan tersebut dengan menggunakan KLTa dengan larutan pengembang yang sama yaitu n-butanol:asam asetat:air (6:1,5:6) dan pereaksi $AlCl_3$ sebagai pereaksi khusus flavonoid. Hasil yang diperoleh menunjukkan fraksi gabungan 1 dan fraksi gabungan 2 bereaksi positif menunjukkan kemungkinan adanya senyawa flavonoid di tandai dengan adanya bercak yang berfluorosensi kuning dibawah sinar UV 366 nm (Gambar 1) sedangkan fraksi gabungan 3,4,5, dan 6 tidak menunjukkan adanya bercak yang berfluorosensi kuning dibawah sinar UV 366 nm.



Gambar 1 Kromatogram fraksi-fraksi hasil kromatografi kilas

Berdasarkan uji kualitatif flavonoid bahwa fraksi gabungan 1 dan fraksi gabungan 2 menunjukkan kemungkinan adanya senyawa flavonoid, maka lebih lanjut fraksi gabungan 1 dan fraksi gabungan 2 diidentifikasi dengan kromatografi gas-spektrometri massa. Kedua buah eluat tersebut disuntikkan secara bergantian ke dalam GC-MS, dari identifikasi secara kromatografi gas-spektrometri massa, setelah dicocokkan dengan senyawa yang terdapat dalam bank data Wiley7Nist05.L, fraksi gabungan 1 diduga mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu antosianidin yang mempunyai struktur umum ion flavylum (2-fenil-benzopyrylium) dengan tingkat kemiripan 35%, neoflavonoid dengan struktur umum (4-fenil-2H-1-benzopyran) dengan tingkat kemiripan 27%. Selain itu diduga terdapat senyawa kimia lain dalam fraksi gabungan 1 diantaranya metil palmitat (tingkat kemiripan 99%), asam laurat (tingkat kemiripan 96%), etil linoleat (tingkat kemiripan 94%), asam hexadecanoat (tingkat kemiripan 95%) seperti terlihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil identifikasi kromatografi gas-spektrometri massa fraksi gabungan 1

No.	Waktu retensi (menit)	Nama senyawa	BM	Rumus molekul	Tingkat kemiripan (%)
1.	8.19	Asam Laurat	200,18	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	96%
2.	10.84	Metil Palmitat	270,26	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	99%
3.	11.08	Asam Hexadecanoat	256,24	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	95%
4.	11.99	Etil Linoleat	308,27	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	94%
5.	16.456	Flavylium	207	C ₁₅ H ₁₁ O	35%
6.	20.315	4-fenil-2H-1-benzopyran	208	C ₁₅ H ₁₂ O	27%

Fraksi gabungan 2 diduga mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu golongan antosianidin yang memiliki struktur umum ion flavylium (2-fenil-benzopyrylium) dengan tingkat kemiripan 30% dan dari pencarian secara acak dengan bank data Wiley7Nist05.L, diduga terdapat beberapa senyawa flavonoid golongan antosianidin seperti terlihat pada tabel 3. Senyawa kimia lain juga diduga terdapat dalam fraksi gabungan 2 diantaranya metil salisilat (tingkat kemiripan 70%), asam syringat (tingkat kemiripan 93%), asam stearat (tingkat kemiripan 98%), etil linoleat (tingkat kemiripan 94%) seperti pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil identifikasi kromatografi gas-spektrometri massa fraksi gabungan 2

No.	Waktu retensi (menit)	Nama senyawa	BM	Rumus molekul	Tingkat kemiripan (%)
1.	5.15	Metil Salisilat	152,05	C ₈ H ₈ O ₃	70%
2.	10.21	Asam Syringat	198,05	C ₉ H ₁₀ O ₅	93%
3.	12.35	Asam Stearat	200,18	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	98%
4.	13.52	Etil Linoleat	308,27	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	94%
5.	14.250	Flavylium	207	C ₁₅ H ₁₁ O	30%

Hasil Evaluasi Tablet Menggunakan Metode Granulasi Basah

Dari hasil penelitian daya alir granul untuk ketiga formula tersebut mudah mengalir, hal ini sesuai dengan persyaratan (Aulton 1988) pada daya alir yaitu 4 – 10 g/det dengan kategori mudah mengalir. Ketiga formula untuk sudut diam antara 26° - 37° , menunjukkan aliran massa tablet baik. Berdasarkan persyaratan tersebut formula 2 dan 3 secara umum masuk dalam kategori sangat baik yaitu antara 14,4 % - 17,51 % kompresibilitas. Sifat dari ekstrak kering mempengaruhi indeks kompresibilitas dalam tablet. Ketebalan tablet pada ketiga formula memiliki ukuran antara 0,37 cm – 0,42 cm dan diameter 1.01 cm – 1.02 cm, berarti memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia Edisi III yaitu diameter tablet tidak lebih dari 3 kali dan tidak kurang dari $1 \frac{1}{3}$ kali tebal tablet. Pada penelitian ini diperoleh range bobot tablet yaitu untuk formula 1 sebesar 290 – 330 mg, formula 2 sebesar 280 – 310 mg dan formula 3 sebesar 290 – 330 mg. Hasil penelitian formula 1 diperoleh range kekerasan sebesar 4,8 – 7,0 Kp, formula 2 sebesar 2,8 – 3,2 Kp dan formula 3 sebesar 2,6 – 3,0 Kp. Kekerasan tablet hanya formula 1 yang memenuhi persyaratan yaitu antara 4 – 8 Kp. Nilai keregangan untuk formula 1 adalah 0,33 %, formula 2 sebesar 0,51 % dan pada formula 3 sebesar 0,53 %. Dari hasil penelitian ini diperoleh bahwa ketiga formula memenuhi persyaratan. Pada ketiga formula diperoleh waktu hancur yaitu pada formula 1 sebesar 28,31 menit, formula 2 sebesar 14,15 menit dan formula 3 sebesar 19,17 menit.

KESIMPULAN

1. Dosis 90 mg/kgBB ekstrak etanol daun mimba memberikan efek antihiperlipidemia lebih baik dibandingkan kontrol perlakuan lainnya sebesar 14,8% hampir sama dengan dosis pada pemberian glibenklamid.
2. Fraksi gabungan 1 diduga mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu antosianidin yang mempunyai struktur umum ion flavylum (2-fenil-

- benzopyrylium) neoflavonoid dengan struktur umum (4-fenil-2H-1-benzopyran) dengan tingkat kemiripan 27%.
3. Fraksi gabungan 2 diduga mengandung senyawa golongan flavonoid yaitu golongan antosianidin yang memiliki struktur umum ion flavylum (2-fenil-benzopyrylium) dengan tingkat kemiripan 30% dan beberapa senyawa turunannya.
 4. Formula I merupakan formula yang paling baik jika dilihat dari kekerasannya yaitu 4 – 8 Kp, sedangkan pada formula 2 dan formula 3 kekerasannya adalah kurang dari 4 Kp

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi-Depdiknas RI. atas program Hibah Bersaing dengan No 318/SP2H/PP/DP2M/III/2008

DAFTAR PUSTAKA

- Can A, A Nuriye, N Ozov, S Bolkent, BP Arda, R Yanardag, A Okyar. 2004. Affect of Aloe vera leaf gel and pulp extracts on the liver in type II diabetic rat models. *Biol. Pharm. Bull.* 27(5):694-698.
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, Edisi II, Diterjemahkan oleh Padmawinata, Bandung, ITB, hal.21-7
- Rajasekaran S, K Sivagnanam, S Subramanian. 2005. Antioxidant effect of aloe vera gel extract in streptozocin-induced diabetes in rats. *Pharmaco. Rep.* 57:90-96
- Soewita, O.S. 1995. *Ramuan Pusaka Prima Raga, Resep-Resep Pengobatan*
- Suyono S.1999. *Patofisiologi Diabetes Melitus di dalam Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu*, Jakarta : Aksara Buna

Tjokoprawiro A. 1989. *Diabetes Melitus Klasifikasi,Diagnosis, dan Dasar-Dasar Terapi*, Jakarta : Gramedia

Wijayakusuma H, 2000. *Tanaman Berkhasiat obat di Indonesia. Jilid III*, Jakarta : Pustaka kartini

**PENGARUH TEMPERATUR TERHADAP PERKEMBANGAN
PRADEWASA, DAYA TAHAN, JANGKA HIDUP, FEKUNDITAS, DAN
SIKLUS GONOTROFIK NYAMUK *ANOPHELES*, VEKTOR PENYAKIT
MALARIA DI INDONESIA**

(Effect of Temperatures on Pre-Adult Development and Gonotrophic Cycle of
Anopheles aconitus (Diptera: Culicidae), Malaria Vector in Indonesia)

**Upik Kesumawati Hadi Dwi Jayanti Gunandini, Susi Soviana
Sugiarto**

Bagian Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Departemen Ilmu Penyakit
Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, FKH IPB

ABSTRAK

Siklus gonotrofik dan perkembangan pradewasa *Anopheles aconitus* telah diteliti di laboratorium. Sebanyak 50 ekor *A. aconitus* dewasa berumur empat hari yang terdiri dari 25 jantan dan 25 ekor betina dipelihara di insektarium Entomologi FKH IPB pada suhu kamar. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari satu generasi nyamuk mampu melewati masa gonotrofik sebanyak delapan kali. *Anopheles aconitus* betina kenyang darah mulai bertelur pada hari kedua dan selesai pada hari keempat. Rata-rata jumlah telur yang dihasilkan 38 butir, menetas paling cepat dalam waktu satu hari dan paling lama setelah lima hari. Panjang periode L1 rata-rata selama 3,4 hari, L2 3 hari, L3 3 hari dan L4 3,9 hari dan dari stadium pupa hingga eklosi menjadi dewasa membutuhkan waktu 1,25-1,5 hari. Rata-rata total waktu yang diperlukan dari telur hingga dewasa adalah 17,97 hari. Pemeliharaan dan perkembangan pradewasa juga diamati enam suhu yang berbeda yaitu 18°, 21°, 24°, 27°, 30° dan 33°C, setiap perlakuan diulang tiga kali, pada *environmental chamber*. Pengamatandilakukan setiap 12 jam sekali sejak periode telur hingga dewasa. Pada berbagai tingkat suhu terlihat makin tinggi suhu maka panjang periode pada setiap stadium semakin singkat dan sebaliknya. Periode perkembangan dari mulai telur hingga eklosi menjadi nyamuk dewasa pada masing-masing suhu adalah 27,11 hari pada suhu 18°C, 20,11 hari (21°C), 17,32 hari (24°C), 15,70 hari (27°C), 11,83 hari (30°C), dan 10,34 hari (33°C). Tahapan paling rawan dalam perkembangan nyamuk *An. aconitus* adalah tahapan larva, khususnya L1 dan L2 yang menunjukkan angka kematian tertinggi atau daya tahan hidup yang rendah dibandingkan stadium lainnya.

Kata kunci: Suhu, pradewasa, dewasa, *Anopheles aconitu*.

ABSTRACT

Gonotrophic cycle and pre-adult development of *Anopheles aconitus*, malaria vector were examined in the laboratory. Fifty mosquitoes out 25 females and 25 males were reared under ambient temperature in insectarium of Medical Entomology, Faculty of Veterinary Medicine, Bogor Agricultural University, Bogor. The result showed that from one generation, the mosquito pass through eight gonotrophic cycles. The blood-fed of *Anopheles aconitus* laid their eggs on the second and the fourth days after blood feeding. The average number of egg laid was 38 eggs, and developmental period of eggs was one to five days from oviposition to hatch. The average length periods of each larval instar and pupa were 3,4 days for L1, 3 days for L2, 3 days for L3, 3,9 days for L4, and 1,25-1,5 days for pupal period. Total time needed for the development from egg period to adult was 17,97 days in ambient temperature. Pre-adult development of the mosquito was also reared under six different temperatures, i.e. 18°, 21°, 24°, 27°, 30° dan 33°C, in

environmental chamber. Observation was done every 12 hours from period of eggs to adult. The result showed that development period shortened with increase of temperature, and it required 27,11 at 18°C, 20,11 days at 21°C, 17,32 days at 24°C, 15,70 days at 27°C, 11,83 days at 30°C, and 10,34 days at 33°C. The critical development of *An. aconitus* was larval period, especially on L1 and L2 that showing the highest mortality or the lowest of survival rate compared other stadium.

Keywords: Temperature, pre-adult, adult, *Anopheles aconitus*.

PENDAHULUAN

Malaria merupakan satu di antara permasalahan kesehatan masyarakat yang masih menjadi prioritas sebagai penyakit yang menjadi perhatian serius bagi Departemen Kesehatan Indonesia (DEPKES 2008). Malaria dapat menyebabkan kematian pada bayi, balita dan ibu hamil, serta dapat menurunkan produktifitas kerja. Indonesia termasuk negara dengan transmisi malaria yang tinggi, terutama di daerah luar Jawa, Madura dan Bali (Lien *et al.* 1975, Joshi *et al.* 1977). Perubahan bioekologi vektor mempunyai korelasi positif terhadap meningkatnya kasus malaria di dunia. Sampai saat ini Indonesia belum mempunyai data base mengenai bioekologi vektor secara komprehensif. Pemanasan muka bumi (*global warming*) diduga juga mempunyai andil dalam peningkatan kasus penyakit, khususnya malaria (Myers *et al.* 2000, Schreiber 2001). Untuk menghitung dan menganalisis sejauh mana pengaruh pemanasan global terhadap peningkatan malaria di Indonesia diperlukan data detail tentang nyamuk malaria yang menjadi vektornya.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh temperatur terhadap perkembangan stadium pradewasa (larva instar 1,2,3,4 dan pupa) dan dewasa nyamuk *Anopheles aconitus* yang meliputi *survival*, *longevity*, *fecundity* dan siklus gonotrofik pada berbagai tingkat suhu.

Data yang diperoleh pada penelitian ini dapat digunakan sebagai *base data* dalam penyusunan model penularan malaria di Indonesia dan bisa digunakan dalam menghitung dan membuat analisis dampak perubahan iklim global terhadap penyebaran malaria, maka penelitian tentang bioekologi untuk *Anopheles aconitus* ini sangat diperlukan.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Insektarium, Bagian Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. Penelitian dilaksanakan selama enam bulan, mulai Mei 2009 sampai dengan November 2009.

Perkembangan Nyamuk pada Suhu Kamar

Rearing nyamuk *Anopheles aconitus* dilakukan selama tiga bulan, sampai dihasilkannya koloni nyamuk dewasa dan pradewasa pada suhu kamar (24-26 °C) dengan jumlah banyak. Sebanyak 50 nyamuk *Anopheles aconitus* (25 jantan dan 25 betina) strain Salatiga dipelihara di Insektarium, Bagian Parasitologi dan Entomologi Kesehatan, Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

Nyamuk dewasa diberi 10% larutan sukrosa *ad libitum* dan secara periodik diberi makan darah berupa umpan marmot. Di dalam kandang nyamuk juga disediakan pendil dari tanah liat dan diisi air filtrasi sepertiganya untuk tempat bertelur nyamuk. Setiap siklus, telur dipanen pada hari keempat sejak pemberian darah marmot. Telur hasil panen dari setiap siklus dipelihara pada bak-bak perbanyakkan larva yang diisi air filtrasi. Larva instar 1 dan 2 diberi makanan berupa campuran tepung hari ayam, dog food dan ragi sebanyak satu takaran seberat 1 mg, sedangkan untuk larva instar 3 dan 4 diberi makanan 2 mg setiap hari. Stadium pupa dikumpulkan di dalam gelas plastik berisi air kemudian dimasukkan kedalam kandang nyamuk dewasa. Setelah dewasa nyamuk ini diberi makan darah marmot secara berulang hingga kenyang. Jumlah telur yang dihasilkan oleh nyamuk kenyang darah pada setiap gonotrofik diamati dan ditetaskan kembali, serta pengamatan periode setiap stadium juga dilakukan hingga siklus terakhir yang dapat diamati.

Pemeliharaan Pradewasa Nyamuk pada Berbagai Suhu

Penelitian dilakukan di dalam *environmental chamber*, dengan enam suhu yang berbeda yaitu 18°, 21°, 24°, 27°, 30° dan 33°C, setiap perlakuan diulang tiga kali dengan rancangan acak lengkap. Setiap unit percobaan 20 butir telur. Setiap ulangan terdiri dari 10 pengamatan (gelas plastik) yang ditempatkan di baki plastik. Gelas plastik yang digunakan berukuran 8,5 x 7 cm, diisi dengan air sebanyak 100 ml. Perkembangan telur dan pradewasa diamati setiap 12 jam sekali sampai menjadi dewasa. Selain periode perkembangan dalam setiap stadium, diamati juga persentase kematiannya dan keberhasilannya.

Analisis Data

Data pada penelitian ini akan dianalisis secara deskriptif dan statistik menggunakan anova. Anova (uji F) digunakan untuk mengkaji perbedaan pengaruh temperatur terhadap perkembangan pradewasa dan dewasa nyamuk. Jika hasil anova menunjukkan beda nyata, maka dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkembangan Nyamuk *Anopheles Aconitus*

Hasil penelitian pada suhu kamar di insektarium (24 - 26 °C) menunjukkan bahwa nyamuk *Anopheles aconitus* betina akan bertelur pertama kali pada hari kedua setelah kenyang darah dan akan bertelur kembali pada hari keempatnya. Hasil ini konsisten sama pada seluruh (delapan) siklus gonotrofik yang dapat teramati dari kelompok nyamuk yang sama. Jumlah telur yang dihasilkan lebih banyak pada hari kedua dibandingkan dengan hari keempat. Rata-rata telur yang dihasilkan pada hari kedua sebanyak 345,38 butir sedangkan pada hari kedua tidak satu ekorpun yang bertelur, dan pada hari keempat sebanyak 153,75 butir (Tabel 1). Dengan kata lain, telur yang dihasilkan pada hari kedua 44,52 % lebih banyak dibanding hari keempat. Setelah hari keempat tidak terjadi proses oviposisi telur. Berdasarkan jumlah telur yang dihasilkan dari 25 nyamuk *Anopheles aconitus* betina pada siklus gonotrofik 1 (sebanyak 957 butir), dapat

diartikan bahwa setiap nyamuk betina mampu menghasilkan rata-rata 38 butir telur. Barodji *et al.* (1985) melaporkan setiap nyamuk betina *Anopheles aconitus* dapat menghasilkan 2-168 butir. Jumlah telur (fekunditas) yang dihasilkan dari setiap ekor nyamuk betina tergantung dari volume darah yang dihisap, semakin banyak volume darah yang dihisap, semakin banyak pula telur yang akan dihasilkan (Clement 1963).

Tabel 1 Jumlah telur (fekunditas) rata-rata *Anopheles aconitus* yang dihasilkan setelah menghisap darah pada suhu kamar.

Siklus Gonotrofik ke-	Jumlah Telur Hari Ke- (butir)				Total (butir)
	1	2	3	4	
1	0	948	0	9	957
2	0	914	0	1	915
3	0	489	0	277	766
4	0	120	0	756	876
5	0	170	0	2	172
6	0	118	0	34	152
7	0	0	0	45	45
8	0	4	0	106	110
Rata-rata	0	345,38	0	153,75	498,88

Panjang periode stadium pradewasa *Anopheles aconitus* pada suhu kamar disajikan pada Tabel 2. Selama delapan siklus gonotrofik, telur menetas rata-rata pada hari ke 3,13 setelah telur tersebut diletakkan di permukaan air. Pada suhu kamar, telur menetas paling cepat membutuhkan waktu satu hari dan paling lama menetas setelah lima hari. Tahap pupa merupakan tahap dorman yang tidak membutuhkan makanan. Telur sampai menjadi dewasa membutuhkan waktu 16 – 23,75 hari dengan rata-rata 17,97 hari pada suhu kamar (Tabel 2).

Tabel 2. Rata-rata Panjang Periode Stadium Pradewasa *Anopheles aconitus* pada Delapan Siklus Gonotrofik pada suhu kamar

Siklus Gonotrofik Ke-	Stadium Pradewasa (Hari)						Total (Hari)
	Telur	Larva 1	Larva 2	Larva 3	Larva 4	Pupa	
1	3,5	4,5	4,5	1,5	3,25	1,25	18,5
2	5	4	2	5,5	4,5	1,5	22,5
3	4	4	2,5	4	2	1,5	18
4	3,25	4,5	3,5	3	8	1,5	23,75
5	3,5	3,5	2,5	2,5	2,5	1,5	16
6	3,75	3,25	3,75	2	3,75	1,5	18
7	1	2,75	1,75	2	3,25	1,5	12,25
8	1	1	3,5	3,5	4,25	1,5	14,75
Rata-rata	3,13	3,44	3	3	3,94	1,47	17,97

Pengaruh Temperatur Terhadap Perkembangan Pradewasa

Perkembangan pradewasa mulai dari stadium telur, larva instar 1,2,3,4 dan pupa pada berbagai tingkat suhu disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Periode perkembangan dari telur sampai dewasa (hari) *Anopheles aconitus* pada berbagai suhu 18-33° C

T (°C)	Telur Mean SD	L1 Mean SD	L2 Mean SD	L3 Mean SD	L4 Mean SD	Pupa Mean SD	L1 - adult Mean SD
18	2.36 ± 0.11	3.80 ± 0.08	5.14 ± 0.07	5.56 ± 0.06	6.29 ± 0.12	3.95 ± 0.05	24.75 ± 0.07
21	1.96 ± 0.05	3.03 ± 0.07	4.35 ± 0.09	4.58 ± 0.22	4.86 ± 0.16	3.41 ± 0.13	20.11 ± 0.38
24	1.58 ± 0.09	2.55 ± 0.06	3.88 ± 0.11	3.95 ± 0.05	4.08 ± 0.09	2.88 ± 0.03	17.32 ± 0.06
27	1.36 ± 0.12	2.36 ± 0.09	3.11 ± 0.07	3.36 ± 0.16	4.10 ± 0.04	2.76 ± 0.06	15.70 ± 0.14
30	0.83 ± 0.07	2.17 ± 0.06	2.35 ± 0.10	2.40 ± 0.04	2.69 ± 0.06	2.19 ± 0.04	11.83 ± 0.05
33	0.80 ± 0.06	1.69 ± 0.06	2.24 ± 0.14	2.29 ± 0.06	2.42 ± 0.11	1.70 ± 0.06	10.34 ± 0.05

Periode telur *An. aconitus* terlihat makin singkat dengan meningkatnya suhu. Demikian pula yang terjadi pada periode larva yang dimulai dengan larva instar I, II, III dan IV, serta periode pupa. Periode telur pada masing-masing suhu adalah 2,36 hari pada suhu 18°C, 1,96 hari (21°C), 1,58 hari (24°C), 1,36 hari (27°C), 0,83 hari (30°C), dan 0,80 hari (33°C). Pada suhu tinggi (30-33 °C) menunjukkan hasil yang hampir sama.

Adapun daya tahan hidup (*survival rate*) dari masing-masing tahapan tersebut tercermin dari persentase keberhasilan yang terjadi ketika proses penetasan pada stadium telur, dan proses molting pada masing-masing instar larva dan pupa. Hal ini tercermin pada Tabel 4. Daya tetas telur *An. aconitus* pada berbagai suhu cukup tinggi berkisar antara 63,64% (27 °C) – 94,83% (18 °C). Daya tetas telur terbaik terlihat pada suhu 18-21 °C . Telur yang tidak menetas dapat terjadi karena telur steril atau tidak terbentuk embrio. Selain itu telur yang tidak menetas dapat terjadi karena telur mengalami kekeringan. Daya tetas telur juga dipengaruhi oleh fase previtelogenik dan fase vitelogenik. Fase ini menentukan daya tetas dan perkembangan telur melalui peran asam amino yang terkandung didalam darah sewaktu nyamuk betina kenyang darah (Slansky dan Rodriguez 1987). Fase previtelogenik terjadi selama 18 jam setelah kenyang darah, pada fase ini mulai dibentuk organel-organel seperti ribosom, badan golgi dan retikulum endoplasma. Fase vitelogenik terjadi antara 18-24 jam setelah kenyang darah, pada fase ini mulai disintesis vitelogenin yang berguna sebagai sumber makanan bagi embrio. Kedua fase ini perkembangannya sangat dipengaruhi oleh kandungan asam amino yang diperoleh dari darah (Clements 2000). Apabila jumlah asam amino yang dibutuhkan cukup, maka proses previtelogenik dan fase vitelogenik berlangsung baik sehingga telur menetas sempurna.

Tabel 4 Daya tahan hidup (*survival rate*) *Anopheles aconitus* dari telur hingga dewasa pada berbagai suhu

T (C)	T-L1 (%)	L1-L2 (%)	L2-L3 (%)	L3-L4 (%)	L4-P (%)	P-dewasa (%)	L1-Dewasa (%)
18	94.83	34.55	68.42	61.54	25.00	100	3.64
21	92.05	87.5	80	92.5	87.5	90	45,00
24	76.46	90	95	95	97.5	90	45.00
27	63.64	57.14	62.50	100.00	90.00	90	32.14
30	77.78	42.86	33.33	60.00	66.67	100	5.71
33	89.61	42.03	34.48	70.00	28.57	100	2.90

Keterangan: L1, L2, L3, L4 = larva instar 1,2,3,4; P= pupa

Daya tahan hidup L1-L2 berkisar antara 34,55% (18 °C) – 90% (24 °C) dengan daya tahan terbaik pada suhu 21-24 °C. Perkembangan L2-L3 juga terbaik pada suhu 21 °C (80%) dan 24 °C (95%). Perkembangan L3-L4, L4-Pupa dan P-Dewasa terbaik masing-masing pada pada suhu 24-27 °C. Proses *molting* pada

larva melalui dua tahap, tahap pertama disebut apolisis dan tahap kedua disebut ekdisis. Apolisis adalah proses terlepasnya kutikula dari epidermis sedangkan ekdisis adalah proses terlepasnya sisa-sisa kutikula lama (Chapman 1971). Pada proses ini protein memegang peranan penting.

Tabel 4 juga memperlihatkan bahwa titik kritis perkembangan terjadi pada stadium perkembangan larva instar 1 dan 2. Secara umum tahapan paling rawan dalam perkembangan larva nyamuk adalah tahapan larva yang membutuhkan media air sebagai tempat utama agar bisa bertahan hidup.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Anopheles aconitus betina kenyang darah pada suhu kamar mulai bertelur pada hari kedua dan selesai pada hari keempat. Dari satu generasi nyamuk mampu melewati masa gonotrofik sebanyak delapan kali. Nyamuk betina mampu menghasilkan rata-rata 38 butir telur, menetas paling cepat membutuhkan waktu satu hari dan paling lama menetas setelah lima hari. Panjang periode L1 rata-rata selama 3,4 hari, L2 3 hari, L3 3 hari dan L4 3,9 hari dan dari stadium pupa hingga eklosi menjadi dewasa membutuhkan waktu 1,25-1,5 hari. Rata-rata total waktu yang diperlukan dari telur hingga dewasa adalah 17,97 hari pada suhu kamar. Pada berbagai tingkat suhu terlihat makin tinggi suhu maka panjang periode pada setiap stadium semakin singkat dan sebaliknya. Periode perkembangan dari mulai telur hingga eklosi menjadi nyamuk dewasa pada masing-masing suhu adalah 27,11 hari pada suhu 18°C, 20,11 hari (21°C), 17,32 hari (24°C), 15,70 hari (27°C), 11,83 hari (30°C), dan 10,34 hari (33°C). Tahapan paling rawan dalam perkembangan nyamuk *An. aconitus* adalah tahapan larva, khususnya L1 dan L2 yang menunjukkan angka kematian tertinggi atau daya tahan hidup yang rendah dibandingkan stadium lainnya.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yang dapat menjawab kaitan bioekologi nyamuk *Anopheles aconitus* dan proses transmisi malaria, kaitannya dengan pemanasan global.

DAFTAR PUSTAKA

- Barodji, T Sularto, Bambang Haryanto, Widiarti, GD Pradhan, dan RF Shaw. 1985. Life Cycle Study of Malaria Vector *Anopheles aconitus* Donitz in the Laboratory. *Bull. Penelit. Kes.* 13: (1) 7 hal.
- Depkes. 2008. Kebijakan Pengendalian Malaria di Indonesia, disampaikan oleh Rita Kusriastuti, Bogor, November 2008.
- Hadi & Kusharto. 2006. Nyamuk dalam buku Hama Permukiman Indonesia, Pengenalan, Biologi dan Pengendalian. UKPHP FKH IPB, Bogor.
- Joshi, G.P., L.S. self, S. Usman, C.P. Pant, M.J. Nelson dan Supalin. 1977. Ecological Studies on *Anopheles aconitus* in the Semarang Area of Central Java, Indonesia. Dokumen WHO/VBC/77.677.
- Lien, J.C., S. Atmosoedjono, A.U. Usfinit, and B.F. Gundelfinger. 1975. Observations on The Natural Plasmodial Infections in Mosquitoes and a Brief Survey of Mosquito Fauna in Belu Regency, Indonesia Timor. *J. Med. Entomol* 12 : 333-337.
- Myers, M.F., Rogers, D.J., Cox, J., Flahault, A., and Hay, S.I. 2000. Forecasting Disease Risk for Increased Epidemic Preparedness in Public Health. *Advances in Parasitology* (47): 310-326. Academic Press.
- Schreiber, K.V. 2001. An Investigation of Relationship between Climate and Dengue using a Water Budgeting Technique. *International Journal of Biometeorology*. 45: 81-89.
- WHO. 1975. Manual on Practical Entomology in Malaria, Part. II, Geneva. 191 halaman.

**EFEK SINBIOTIK PREBIOTIK ASAL PANGAN LOKAL DENGAN
ENTEROCOCCUS FAECIUM IS 27526 TERHADAP BAL DAN BERAT
BADAN PADA TIKUS PERCOBAAN**

(Synbiotic Effect of Prebiotic Local Food and *Probiotic Enterococcus faecium*
IS 27526 to viable fecal lactic acid bacteria and Body Weight of Mice)

Clara M. Kusharto¹⁾, Ingrid S. Surono²⁾, Annis Catur Adi³⁾

¹⁾Dep. Gizi Masyarakat Fakultas Ekologi Manusia IPB, SEAMEO – TROPMED
RCCN, UI²⁾, Departemen Gizi, FKM – Unair³⁾

ABSTRAK

Guna mempercepat penanganan masalah KEP balita, selain diversifikasi pangan perlu dilandasi inovasi pengembangan formulasi makanan tambahan fungsional yang memenuhi standar gizi dan mampu meningkatkan imunitas bagi balita dengan teknologi pengolahan yang mempertimbangkan keunggulan sumberdaya pangan lokal. Efek sinbiotik potensial untuk meningkatkan kesehatan melalui peningkatan survival dan keberadaan mikroorganisme positif didalam usus, namun demikian masih memerlukan penelitian lebih lanjut yaitu sebelum diberikan pada anak balita, perlu diuji terlebih dahulu pada hewan percobaan. Tujuan penelitian mengamati pengaruh (efikasi) sinbiotik pemberian makanan tambahan (PMT) biskuit fungsional berbasis prebiotik pangan lokal (garut dan ubi) dan probiotik *Enterococcus faecium* IS 27526 terhadap pertumbuhan BAL dan pertambahan berat badan tikus. Hasil penelitian menunjukkan selama 21 hari pengamatan, nyata sekali terjadi penambahan berat badan, nilai tertinggi (86,8 g atau 151,48% dari berat awal) pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) dan biskuit garut + krim probiotik (A2) (80,8 g atau 138,59%) dibandingkan dengan perlakuan lainnya. Peningkatan jumlah BAL fekal tikus yang paling tinggi terdapat pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4), sedangkan garut + krim probiotik saja (A2) juga ada peningkatan yang berbeda nyata pada $p < 0,05$. Pengamatan antara 2 jenis bahan yang dipergunakan yaitu garut dan ubi jalar, ternyata garut lebih potensial sebagai prebiotik dibandingkan dengan ubi jalar.

Kata kunci: Prebiotic, probiotic, *enterococcus faecium* IS-27526, garut, ubi jalar.

ABSTRACT

Protein Energy Malnutrition problem in children younger than five can be over come by supplementation functional weaning food utilizing local food which can stimulate the immune response. According to *Nutrition Information Centre of the University of Stellenbosch* (NICUS), synbiotic effect of probiotic and prebiotic is potential in improving health through improvement of survival and availability of gut microbiota in the instestine, however further *in vivo* research is needed before supplemented to young children. The aim of this study is to validate the synbiotic effect of functional biscuit of local food based (arawroot and sweet potato powder) and probiotic *Enterococcus faecium* IS-27526 on viable fecal lactic acid bacteria and bodyweight of mices. The *in vivo* experiment was carried out in Animal Experiment Laboratory, Puslitbang Gizi (PPPG), Bogor. Fecal microbiota of mices were carried out at the laboratory of Microbiology, Fateta IPB. There were 7 groups of mice (5 each): A1 = ransum; A2 = ransum + biscuit with arrawroot powder + probiotic cream; A3 = ransum + biscuit with sweet potato

powder + probiotic cream; A4 = ransum + biscuit with arrowroot powder + probiotic cream + FOS; A5 = ransum + biscuit with sweet potato powder + probiotik cream + FOS; A6 = ransum + probiotic cream; A7 = ransum + probiotic cream + FOS, were randomized and treated for 3 weeks supplementation. The results show that after 3 weeks supplementation, there was a significant different on the body weight of functional biscuit with ararrot plus FOS and *E. faecium* IS-27526 probiotic cream, followed by functional biscuit with ararrot and probiotic cream, 86,8 g (151,48%) from initial body weight, and 80,8 g (138,59%), respectively, as compared to other group of treatments. Viable fecal lactic acid bacteria of mices was increased after supplementation with functional biscuit with ararrot plus FOS and *E. faecium* IS-27526 probiotic cream, significantly ($p < 0,05$), followed by functional biscuit with arawrot and probiotic cream

Keywords: Prebiotic, probiotic, *enterococcus faecium* IS-27526, synbiotic, arawroot, sweet potato.

PENDAHULUAN

Masalah gizi kurang pada balita merupakan hal yang terus berulang, dan masih tetap diangkat sebagai berita aktual, yang dicerminkan dengan masih banyaknya Propinsi-propinsi dengan angka prevalensi Gizi buruk dan gizi kurang diatas angka nasional (18,4%), terutama di daerah-daerah kantong kemiskinan. Laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), 2007 menunjukkan di Indonesia telah terjadi perbaikan gizi yang melampaui target pembangunan jangka menengah (20%), namun masih terdapat 19 Propinsi dengan prevalensi gizi buruk dan gizi kurang yang masih cukup tinggi, bahkan sebanyak 25 provinsi mempunyai prevalensi Balita Kurus diatas prevalensi nasional (7,4%), salah satu diantaranya adalah propinsi Jawa Timur, Banten, dan Nusa Tenggara Barat. Demikian juga prevalensi balita pendek dan sangat pendek (TB/U) dan balita kurus dan sangat kurus (BB/TB). Disisi lain, kejadian sakit akibat berbagai jenis penyakit infeksi masih tinggi, antara lain ISPA (25,50%), Pnemonia (2,13%), TB paru (0,99%) dan diare (9,0%). Bahkan penyebab kematian bayi tertinggi karena diare (31,4%) dan pnemonia (23,8%), demikian pada balita, tertinggi juga karena diare (31,4%) dan pnemonia (15,5%).

Kenyataan adanya KEP dan kejadian penyakit infeksi pada balita tersebut diatas, merupakan masalah yang serius dan mendesak untuk segera dicari penyebab dan upaya penanggulangannya mengingat dampaknya yang serius utamanya pada mutu sumber daya manusia Indonesia. Secara umum gizi kurang pada balita dapat menciptakan generasi yang secara fisik maupun mental lemah. Generasi yang demikian akan menjadi beban masyarakat dan pemerintah,

sebagaimana yang dikaji oleh UNICEF (1998), terdapat berbagai penyebab timbulnya masalah gizi pada balita, *pertama*, sebagai penyebab langsung yaitu makanan anak dan penyakit infeksi, dan *kedua*, penyebab tidak langsung yaitu pola pengasuhan anak, pelayanan kesehatan, kesehatan lingkungan dan ketahanan pangan keluarga. Analisis Atmarita et al (2006) terhadap data status gizi SUSENAS (1989-2005) juga membuktikan determinan utama gizi kurang pada anak balita adalah faktor ekonomi, pendidikan ibu, makanan dan infeksi. Guna mempercepat penanganan masalah KEP balita, selain diversifikasi pangan perlu dilandasi inovasi pengembangan formulasi makanan tambahan (PMT) fungsional yang memenuhi standar gizi dan mampu meningkatkan imunitas bagi balita dengan teknologi pengolahan yang mempertimbangkan keunggulan sumberdaya pangan lokal. Selain mengandung padat gizi, pemberian makanan tambahan (PMT) balita diharapkan juga dapat meningkatkan ketahanan tubuh sehingga menurunkan kejadian sakit yang sering diderita balita gizi kurang dan buruk, diantaranya penyakit diare, ISPA, dll. NICUS (*The Nutrition Information Centre of the University of Stellenbosch*) bahwa sebuah simbiotik antara prebiotik dan probiotik mempunyai efek potensial untuk meningkatkan kesehatan melalui peningkatan survival dan keberadaan mikroorganisme baik (positif) di dalam usus, namun demikian memerlukan penelitian lebih lanjut yaitu, sebelum diberikan pada anak balita, perlu diuji terlebih dahulu pada hewan percobaan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengamati pengaruh (efikasi) sinbiotik pemberian makanan tambahan biskuit fungsional berbasis prebiotik pangan lokal (garut dan ubi) dan probiotik *Enterococcus faecium* IS27526 terhadap pertumbuhan BAL dan peningkatan berat badan tikus percobaan.

METODE PENELITIAN

Penelitian yang dilakukan pada tahap ini adalah penelitian eksperimen di Laboratorium Percobaan Hewan, Puslitbang Gizi, Bogor, dan analisis mikrobiologi dan fecal mikrobiota pada feces tikus di Lab Mikrobiologi Pangan, Fateta IPB. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), terhadap tujuh kelompok tikus, masing2 kelompok 5 ekor tikus (Lihat Tabel 1). Intervensi dilakukan selama 4 minggu, 1 - 27 September 2009.

Tabel 1 Kelompok Tikus Percobaan yang Diberi Perlakuan

Kelompok	Perlakuan
A1	Ransum
A2	Ransum + Biskuit garut + Krim probiotik
A3	Ransum + Biskuit ubi + Krim probiotik
A4	Ransum + Biskuit garut + FOS + Krim probiotik
A5	Ransum + Biskuit ubi + FOS + Krim probiotik
A6	Ransum + Krim probiotik
A7	Ransum + FOS + Krim probiotik

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bahan krim (tepung terigu, susu skim bubuk, gula bubuk, margarin, telur, baking powder), tepung garut, tepung ubi jalar dan bakteri probiotik *Enterococcus faecium* IS 27526 (10^8 cfu/ml), hewan percobaan tikus jenis Sprague Dawley.

Analisis Mikrobiota dan Pengukuran Berat. Pengujian pertumbuhan bakteri asam laktat dilakukan sebelum intervensi, serta pada hari ke 7 intervensi, dengan dua kali ulangan penggunaan media m-MRSB. Analisis ketahanan fekal mikrobiota dilakukan dengan metode *Most Probable Number* (MPN) dan jumlah total Bakteri Asam Laktat (BAL). Perhitungan dilakukan berdasarkan jumlah tabung yang positif yang ditumbuhi mikroba pada suhu dan waktu tertentu. Pengukuran berat badan tikus percobaan dilakukan dengan timbangan digital setiap dua hari sekali.

Analisis statistik. Perbedaan diantara rata-rata berat tikus dan BAL dalam kelompok perlakuan, digunakan *2-tailed student's test* dengan *level of significance* $P < 0,05$, sedangkan perbedaan antar kelompok digunakan one way ANOVA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertambahan Berat Badan Tikus

Pengukuran berat badan tikus dilakukan setiap dua hari sekali. Rata-rata berat badan tikus pada awal penelitian berkisar antara 56,0 g – 58,4 g dan di akhir penelitian rata-rata berat badan tikus mengalami peningkatan dengan kisaran berat badan antara 122,7 g – 144,4 g (Tabel 2). Hasil analisis anova menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok ($p < 0,05$). Peningkatan berat badan tikus di

akhir pengamatan antara lain dipengaruhi oleh perlakuan yang diberikan dan lingkungan yang di kontrol, dengan indikasi berat badan tikus pada awal penelitian menunjukkan kondisi yang homogen.

Tabel 2 Rata-rata berat badan tikus pada awal dan akhir penelitian

Perlakuan	Rata-rata Berat Badan Tikus (g)	
	Awal	Akhir
A1	57,7	127,4
A2	58,3	139,1
A3	57,3	122,7
A4	57,3	144,4
A5	58,4	133,7
A6	57,8	129,9
A7	56,0	126,2

Tikus merupakan hewan yang tidak pernah berhenti tumbuh, walaupun kecepatan tumbuh akan menurun saat mencapai usia dewasa (Muchtadi 1989). Hasil penimbangan terhadap berat badan tikus selama 21 hari pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata berat badan tikus dari ke tujuh perlakuan mengalami peningkatan (Gambar 1).



Gambar 1 Rata-rata berat badan tikus selama 21 hari pengamatan

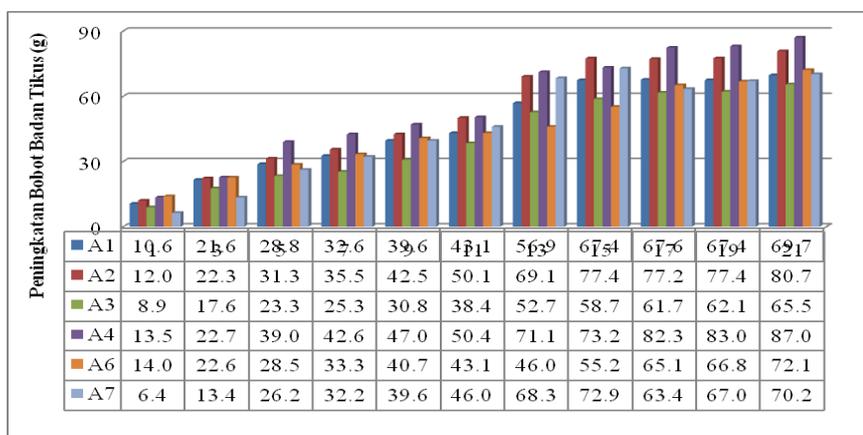
Keterangan:

- A1 = Ransum
- A2 = Ransum + Biskuit garut + Krim probiotik
- A3 = Ransum + Biskuit ubi + Krim probiotik
- A4 = Ransum + Biskuit garut + FOS + Krim probiotik
- A5 = Ransum + Biskuit ubi + FOS + Krim probiotik
- A6 = Ransum + Krim probiotik
- A7 = Ransum + FOS + Krim probiotik

Tikus yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah tikus umur sapih dengan rata-rata berat badan yaitu 50 g. Pertumbuhan dan perkembangan yang baik dari makhluk hidup ditandai dengan terjadinya kenaikan berat badan. Pertumbuhan dan perkembangan berat badan sangat dipengaruhi oleh kandungan gizi makanan. Rata-rata penambahan berat badan tikus selama 21 hari pengamatan yang tertinggi (86,8 g atau 151,48%) terdapat pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4), berikutnya perlakuan biskuit garut + krim probiotik (80,8 g atau 138,59%) dibandingkan perlakuan lainnya.

Analisis data terhadap perubahan berat badan tikus didasarkan pada peningkatan berat badan tikus pada pengamatan hari ke-1 hingga pengamatan hari ke-21 (selang penimbangan 2 hari) dengan data hari pengamatan ke-0. Hasil penimbangan berat badan tikus dari ke tujuh perlakuan menunjukkan bahwa tikus mengalami peningkatan berat badan yang selalu meningkat (Gambar 1).

Pertumbuhan antara lain ditentukan oleh asupan makanan yang diberikan. Semua tikus mendapatkan jenis ransum yang sama, namun perbedaan terdapat pada perlakuan yang diberikan pada setiap kelompok tikus. Peningkatan berat badan tikus yang mendapatkan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) adalah lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan lainnya karena selain mendapatkan gizi yang memadai dari ransum dan biskuit, juga mendapatkan FOS dan probiotik yang dapat meningkatkan penyerapan zat gizi di dalam tubuh karena adanya sinbiotik antara prebiotik yaitu FOS + biskuit garut dan probiotik (*Enterococcus faecium* IS-27526).

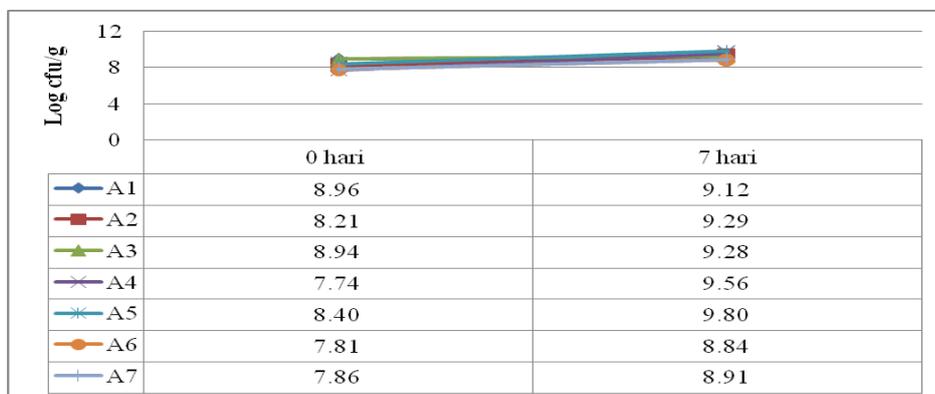


Gambar 2. Rata-rata peningkatan berat badan tikus selama 21 hari pengamatan

Mikrobiota Total Fekal Bakteri Asam Laktat Tikus

Bakteri asam laktat memiliki peranan yang penting pada kehidupan manusia. Bakteri asam laktat merupakan kelompok bakteri gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang, tidak membentuk sitokrom dan memproduksi asam laktat sebagai produk akhir metabolik utama selama fermentasi karbohidrat. Bakteri asam laktat yang secara normal tumbuh di saluran pencernaan dapat memberikan efek positif terhadap kesehatan tubuh melalui kemampuannya menekan pertumbuhan patogen.

Rata-rata jumlah bakteri asam laktat fekal tikus pada awal penelitian berkisar antara $5,49 \times 10^7$ cfu/g (7,74 log cfu/g) – $9,12 \times 10^8$ cfu/g (8,96 log cfu/g), sedangkan pada akhir penelitian mengalami peningkatan, yaitu berkisar antara $6,91 \times 10^8$ cfu/g (8,84 log cfu/g) – $6,30 \times 10^9$ cfu/g (9,80 log cfu/g) (Gambar 2). Hasil uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan antar kelompok ($p < 0,00$). Secara keseluruhan rata-rata jumlah bakteri asam laktat fekal tikus dari ke tujuh perlakuan yang diberikan mengalami peningkatan.



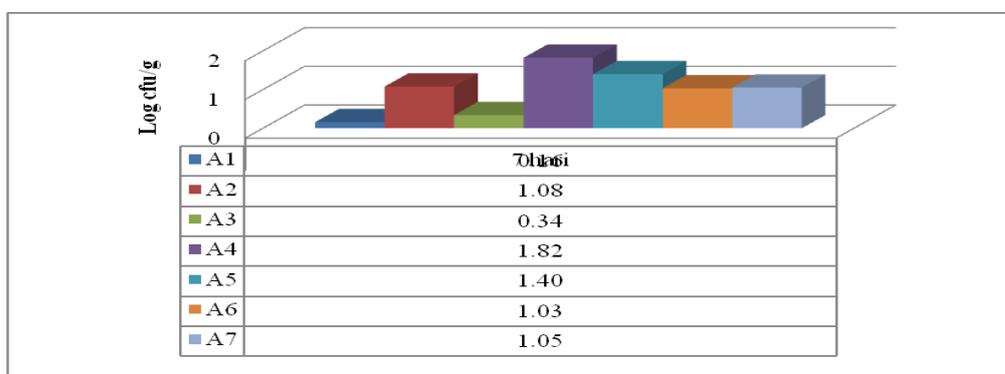
Gambar 3. Jumlah bakteri asam laktat fekal tikus

Perlakuan yang paling baik dalam meningkatkan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus hingga akhir pengamatan adalah perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) beda dan perlakuan biskuit ubi + FOS + krim probiotik (A5) beda secara sangat significant ($p = 0,002$ dan $p = 0,002$), sedangkan perlakuan lain

A2, A3, A6 dan A7 beda secara significant ($p < 0,005$). Lu dan Walker (2001) menyatakan bahwa ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk meningkatkan populasi bakteri non patogen di dalam saluran pencernaan, antara lain adalah dengan pemberian gizi yang baik dan lingkungan yang stabil. Selain itu, Bourlioux *et al.* (2003) juga menyatakan bahwa bakteri dalam saluran pencernaan membutuhkan gizi dan energi untuk tumbuh dan berkembang-biak. Berdasarkan asumsi tersebut, maka peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus dapat dikaitkan dengan kesehatan saluran pencernaan tikus. Tikus yang diberi perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) dan perlakuan biskuit ubi + FOS + krim probiotik (A5) memiliki kesehatan saluran cerna yang lebih baik daripada tikus yang diberikan perlakuan lainnya.

Hasil beberapa penelitian mengenai bakteri asam laktat mengungkapkan bahwa konsumsi susu yang mengandung probiotik berpengaruh terhadap mikrobiota fekal manusia dan hewan percobaan (Alkalin *et al.* 1997; Danielson *et al.* 1989; Gilliland *et al.* 1978; Hosoda *et al.* 1996) yang menyebabkan peningkatan jumlah bakteri yang menguntungkan seperti laktobasili dan bifido serta menekan jumlah bakteri usus yang berpotensi sebagai patogen seperti bakteri koliform dan *enterobacteria*.

Peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus pada pengamatan hari ke-7 disajikan pada Gambar 4. Peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus terbesar akibat perlakuan yang diberikan ditemukan pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) yaitu 1,82 log cfu/g .



Gambar 4. Peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus

Peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus yang lebih tinggi terdapat pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4) dibandingkan perlakuan lainnya. Hal ini diduga karena bakteri asam laktat memerlukan zat gizi yang sangat kompleks. Kolonisasi oleh probiotik untuk membentuk mikroekosistem yang normal dapat dimanipulasi melalui pengaturan diet yang mengandung prebiotik, probiotik atau kombinasi keduanya yaitu sinbiotik. Dalam hal ini merujuk pada komponen yang terdapat pada biskuit garut dan FOS yang memberikan efek prebiotik. Keuntungan dari kombinasi ini adalah meningkatkan daya tahan hidup bakteri probiotik akibat substrat yang spesifik telah tersedia untuk fermentasi.

Penelitian pada tikus dan manusia yang pernah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian FOS menurunkan resiko kanker usus. FOS dalam diet merupakan substrat yang segera difermentasi oleh mikroba kolon. Penggabungan antara probiotik dan prebiotik yang disebut sinbiotik, memberikan pengaruh yang menguntungkan bagi inangnya, dengan cara memperbaiki *survival* dan implantasi suplemen mikroba hidup dalam saluran cerna, stimulasi pertumbuhan secara selektif, dan aktivasi metabolisme dari satu atau sejumlah terbatas bakteri yang mempunyai efek promotif bagi kesehatan, sehingga dapat meningkatkan kesehatan inangnya.

Telah dibuktikan bahwa bila kedua bahan ini digabungkan dalam satu produk tunggal, maka kegunaan masing-masing atau kedua komponennya ditingkatkan. Misalnya gabungan FOS dengan *Bifidobakteri longum* menurunkan risiko kelainan pre-neoplastik kolon lebih banyak dari pada hanya dengan pemberian probiotik atau prebiotik saja pada tikus percobaan. Demikian juga dengan penambahan pati jagung yang kaya akan amilose (RS2) ke dalam suatu preparat probiotik akan mempertahankan densitas yang lebih tinggi dari mikroorganisme probiotik yang hidup, bila dibandingkan dengan tanpa RS2

KESIMPULAN

1. Penambahan berat badan tikus selama 21 hari pengamatan yang tertinggi (86,8 g atau 151,48%) terdapat pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim

- probiotik (A4) dan , biskuit garut + krim probiotik (80,8 g atau 138,59%) dibandingkan perlakuan lainnya.
2. Peningkatan jumlah bakteri asam laktat fekal tikus yang paling tinggi terdapat pada perlakuan biskuit garut + FOS + krim probiotik (A4), sedangkan garut + krim probiotik saja juga meningkat secara nyata ($p < 0,005$).
 3. Pangan lokal Garut lebih potensial sebagai prebiotik dibandingkan dengan ubi jalar.

SARAN

Garut terbukti potensial sebagai sumber prebiotik asal bahan pangan lokal yang dapat dipergunakan sebagai bahan pangan dalam pembuatan makanan tambahan (PMT) biskuit fungsional dengan efek sinbiotik prebiotik dan probiotik yang baik sebagai bahan untuk PMT balita.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami sampaikan kepada pada Direktorat Dikti, Departemen Pendidikan Nasional yang telah memberikan dana penelitian sehingga penelitian ini dapat berlangsung dengan baik. Kami ucapkan juga terimakasih kepada kepada Drh Endi Ridwan, MSc. (Kepala) dan staf di Lab. percobaan hewan Puslitbang Gizi Bogor yang telah membantu pelaksanaan percobaan tikus, juga kepada mahasiswa S1 dan S2, Dept. Gizi Masyarakat, FEMA-IPB yang telah terlibat aktif dalam tahapan penelitian ini (Mervina, SP. dan Rini Harianti, MSi.).

DAFTAR PUSTAKA

- Atmarita. 2006. Mampukan Indonesia Bersepakat untuk Melakukan Peningkatan Sumberdaya Manusia (SDM) yang Cerdas dan Berkualitas. *Gizi Indonesia*, 29 (1): 47-57
- Bourliox P, Kolletzko B, Guarner F, and Braesco V. 2003. The Intestine and Its Microflora are Partners for Protection of The Host: Report on the Danone Symposium "The Intelligent in Intestine" Held in Paris, June 14, 2002. *Am.J.Clin.nutr.* 78:675-683.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. Laporan Hasil Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) Indonesia Tahun 2007.

Gibney, MJ., MK Barie, MK John,. 2005. Public Health Nutrition. Blackwell, Publishing.Ltd, Oxford.

Muchtadi. 1993. Ilmu Pengetahuan Bahan Pangan. Bogor: Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi. Institut Pertanian Bogor

Nicus. 2007. *Probiotics and Prebiotik*: Granny's wisdom takes us back tp future. Nutrition Information Center, University Stellenbosch, Dept of Human Nutrition.

Rosado JL, 1999. Separate and Joint Effect of Micronutrient Deficiencies on Linier Growth. J.Nutr.129 (suppl):531S-533S.