

**KONSUMSI PANGAN, BIOAVAILIBILITAS ZAT BESI DAN
STATUS ANEMIA SISWI DI KABUPATEN BOGOR**
(Food Consumption, Iron Bioavailability and Anemia Status of School Girls
in Bogor District)

**Dodik Briawan^{1,2)}, Yudhi Adrianto²⁾, Dian Hernawati^{1,3)},
Elvira Syamsir^{1,3)}, Muh Aries²⁾**

¹⁾Seafast Center, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB.

²⁾Dep. Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, IPB.

³⁾Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan mengetahui hubungan konsumsi pangan, bioavailabilitas dan status anemia pada siswi remaja. Studi *cross sectional* dilakukan di SMK Pelita Ciampea Kabupaten Bogor. Data dikumpulkan dari 74 orang siswi remaja yang meliputi konsumsi pangan dengan *recall* 2x24 jam dan kadar hemoglobin. Estimasi bioavailabilitas besi dihitung dari konsumsi pangan menggunakan metode Du *et al.* (1999). Rata-rata konsumsi daging dan buah berturut-turut 68 g/hari dan 73 g/hari. Asupan protein, besi, dan vitamin C berturut-turut 38,3 g, 10,8 mg dan 25 mg; dengan tingkat kecukupan gizi berturut-turut 76,6%, 41,7% dan 33,4%, Estimasi bioavailabilitas zat besi 1,09 mg atau 10,04% dan termasuk dalam kategori sedang. Bioavailabilitas zat besi (mg) berhubungan nyata dengan konsumsi daging sapi dan ayam ($r=0,381$) dan asupan vitamin C ($r=0,340$) ($p<0,05$). Prevalensi anemia siswi sebesar 10,8%, dan kadar hemoglobin berhubungan nyata dengan asupan vitamin C ($r=0,002$) dan vitamin A ($r=0,022$) ($p<0,05$).

Kata kunci: Anemia, konsumsi pangan, bioavailabilitas besi, siswi remaja.

ABSTRACT

The research objective was to analyze the profile of food consumption, iron bioavailability and anemia status of school girls in High School. The cross sectional study was conducted at SMK Pelita in Bogor District. The baseline data was collected from 74 school girls including 2x24 hours food record and hemoglobin (Hb). Du *et al.* (1999) method was applied to estimate the iron bioavailability from food consumption. The meat and fruits consumption is 68 g/day and 73 g/day respectively. Most of the subjects (83.2%) consume less food compared to the Indonesian Dietary Guidelines. The mean protein, iron and vitamin C intakes are 38.3 g, 10.8 mg, and 25 mg respectively. Compared to the Indonesian's RDA these intakes are low i.e. 76.6%, 41.7%, and 33.4% respectively. The mean iron bioavailability is 1.09 mg or 10.04%, and it's categorized as moderate. Iron bioavailability (mg) is significantly associated with the meat and chicken consumption ($r=0.381$) and vitamin C intake ($r=0.340$) ($p<0.05$). The anemia prevalence is 10.8%, and haemoglobin concentration is significantly related to the intake of vitamin C ($r=0.002$) and vitamin A ($r=0.022$) ($p<0.05$).

Keywords: Anemia, food consumption, iron bioavailability, schoolgirls.

PENDAHULUAN

Dalam siklus hidup manusia, salah satu kelompok yang berisiko tinggi terhadap kejadian anemia adalah remaja wanita. Jumlah populasi anak usia sekolah (usia 10–19 tahun) sekitar 40 juta dari 230 juta penduduk Indonesia, dan sebanyak 50% diantaranya adalah kelompok wanita yang berisiko tinggi terhadap anemia. Pada anak sekolah, penderita anemia akan menurunkan tingkat kesehatan, prestasi akademik, dan kemampuan fisik (Grantham and Cornelius, 2001). Penelitian Soewondo *et al.* (1989) yang dilakukan di Bandung dengan melibatkan remaja anemia dan non anemia menunjukkan bahwa anak remaja tidak anemia belajar dengan cepat dibandingkan anak remaja anemia ($p < 0,01$).

Di Indonesia prevalensi anemia remaja wanita masih cukup tinggi, yaitu antara 20–40%. Besarnya prevalensi tersebut menunjukkan perbaikan program pemerintah hasilnya kurang signifikan dalam menurunkan prevalensi anemia. Penanggulangan anemia di Indonesia mempunyai tiga strategi, yaitu suplementasi besi, pendidikan gizi, dan fortifikasi pangan. Penyebab anemia 50–80% di antaranya karena rendahnya kualitas konsumsi pangan masyarakat, termasuk diantaranya asupan zat besi (Depkes, 2003). Berdasarkan pola konsumsi pangan masyarakat seperti saat ini, asupan besi yang hanya berasal dari konsumsi pangan sehari-hari sulit untuk memenuhi kebutuhan zat besi yang tinggi pada remaja wanita. Konsumsi pangan pada 37,9% masyarakat masih di bawah 50,0% kecukupan zat besi, yang apabila tanpa didukung program lainnya, maka perbaikan kualitas konsumsi pangan masyarakat akan sulit dipenuhi (Depkes, 2005).

Program suplementasi yang dilakukan pemerintah adalah Pencegahan dan Penanggulangan Anemia Gizi Besi (PPAGB) dengan sasaran anak sekolah menengah (SMP dan SMA) (Depkes, 2005). Meskipun demikian, program PPAGB tidak selalu berhasil karena di beberapa kabupaten/kota prevalensi anemia tidak menurun. Di Kota Bekasi hanya menurunkan prevalensi anemia pada siswi SMP dan SMK sebesar 3,4%. Hal tersebut diantaranya karena penerimaan (*compliance*) suplemen yang rendah (Briawan, Adriani, dan Pusporini, 2009).

Salah satu penyebab anemia adalah rendahnya asupan zat besi terkait dengan nilai bioavailabilitas zat besi pada konsumsi pangan. Pada menu makanan yang porsi sumber hewannya besar maka bioavailabilitas zat besi menjadi tinggi. Sebaliknya menu makanan yang sebagian besar terdiri dari sumber nabati, bioavailabilitas zat besi menjadi rendah. Secara umum bioavailabilitas zat besi di Indonesia masih tergolong rendah karena menu makanannya masih mengandung tinggi zat penghambat seperti sereal dan kacang-kacangan. Dalam penetapan AKG zat besi di Indonesia diasumsikan bioavailabilitasnya sebesar 10% (Kartono dan Soekatri, 2004). Berdasarkan pertimbangan tersebut di atas, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis konsumsi pangan, bioavailabilitas zat besi dan anemia pelajar siswi.

METODE PENELITIAN

Naskah penelitian ini merupakan data *baseline* dari penelitian "Efikasi pangan lokal bergizi untuk perbaikan anemia dan peningkatan prestasi akademik". Lokasi penelitian ini dilakukan di SMK Pelita Ciampea, Kabupaten Bogor. Pengumpulan data dilaksanakan pada bulan Mei–Juni 2012.

Jumlah dan Cara Penarikan Contoh

Contoh adalah siswi kelas X jurusan butik dan X–XI keperawatan di SMK Pelita Ciampea yang berjumlah 74 orang. Kedua jurusan ini dipilih secara *purposive* karena dibandingkan jurusan lainnya terdapat banyak siswa putri. Kriteria inklusi adalah remaja putri yang sudah menstruasi, bersedia berpartisipasi penelitian dan diwawancarai sampai selesai dan tidak sedang menderita sakit.

Jenis dan Cara Pengumpulan Data

Jenis data yang dikumpulkan meliputi karakteristik siswi yaitu umur, usia pertama menstruasi, lama menstruasi, siklus menstruasi, dan uang saku. Selain itu juga dikumpulkan data karakteristik orangtua seperti pendapatan. Berat dan tinggi badan subjek diukur langsung dengan stadiometer dan timbangan badan. Data tersebut dikumpulkan melalui pengisian sendiri terhadap kuesioner yang telah disiapkan. Data konsumsi pangan dikumpulkan dengan cara penjelasan dan

diikuti pengisian kuesioner dengan *recall* 2x24 jam. Status anemia siswi diketahui dari pemeriksaan kadar hemoglobin (Hb) darah.

Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh kemudian dikumpulkan untuk diolah dan dianalisis secara statistik. Proses pengolahan data meliputi *editing*, *coding* dan *entry data*. Selengkapnya variabel dan kategori dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Variabel dan Kategori Penilaian

No	Variabel	Kategori
1	Status gizi (IMT/U)	Sangat Kurus $z < -3$, Kurus $-3 \leq z < -2$, Normal $-2 \leq z \leq +1$, Gemuk $+1 < z \leq +2$, Obese $z > +2$
2	Status gizi (TB/U)	Sangat pendek $z \leq -3$, Pendek $-3 \leq z \leq -2$, Normal $z > -2$
3	Tingkat kecukupan energi dan protein	Defisit berat $< 70\%$ AKG, Defisit sedang $70-79\%$ AKG, Kurang $< 90\%$ AKG, Cukup $90-119\%$ AKG, Lebih $\geq 120\%$ AKG
4	Tingkat kecukupan vitamin dan mineral	Kurang $< 77\%$ AKG, Cukup $\geq 77\%$ AKG
5	Status anemia	Anemia < 12 g/dL, Tidak Anemia $12-14$ g/dL

Bioavailabilitas zat besi konsumsi pangan dalam penghitungannya ditentukan oleh besi heme dan non heme, zat pendorong dan penghambat penyerapan besi dari pangan. Estimasi yang digunakan untuk menghitung bioavailabilitas (tingkat ketersediaan biologis) zat besi adalah metode Du *et al.* (1999). Bioavailabilitas heme diasumsikan sebesar 23% dan faktor heme sebesar 40%. Bioavailabilitas non heme dengan menggunakan persamaan: $1,7653 + 1,1252 \ln (EFs/IFs)$. Adapun EFs merupakan penjumlahan vitamin C (mg), jumlah konsumsi pangan sumber hewani (g), sayuran dan buah (g), dan koefisien 1. Sedangkan IFs merupakan penjumlahan sereal (g), kacang-kacangan (g), teh (g) dan koefisien 1.

Uji korelasi *Pearson* digunakan untuk melihat signifikansi hubungan bioavailabilitas zat besi dengan variabel independen seperti asupan zat besi, vitamin C dan protein, konsumsi pangan hewani; serta kadar Hb dengan asupan zat besi, bioavailabilitas besi, asupan protein, vitamin A dan vitamin C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Subjek

Remaja merupakan masa peralihan antara masa anak dan masa dewasa. Umur siswi berkisar antara 14,7–18,5 tahun dan rata-rata $16,6 \pm 0,7$ tahun. Pada remaja kebutuhan zat besi yang tinggi terjadi terutama saat periode *growth spurt*. Rata-rata kebutuhan zat besi untuk pertumbuhan pada remaja 0,55 mg/hari (Hallberg, 2001). WNPG (2004) menetapkan AKG zat besi sama baik pada kelompok usia remaja maupun dewasa (13–49 tahun) yaitu 26 mg/hari.

Umur pertama kali mengalami menstruasi berkisar antara 9–15 tahun, dengan rata-rata $12,8 \pm 1,1$ tahun. Lama menstruasi berkisar antara 4–7 hari, dengan rata-rata $4,0 \pm 1,1$ hari, dengan siklus menstruasi antara 14–90 hari dan rata-rata $28,6 \pm 9,0$ hari. Tambahan kebutuhan besi untuk remaja wanita diantaranya diperlukan untuk menggantikan kehilangan zat besi selama menstruasi. Pada usia remaja, kehilangan darah menstruasi tidak berbeda dengan usia reproduktif lainnya. Rata-rata kehilangan darah selama menstruasi 84 mL, sehingga setiap hari membutuhkan tambahan zat besi 0,56 mg. Rata-rata kehilangan zat besi pada siklus menstruasi 28 hari sebesar 0,56 mg/hari (Hallberg 2001).

Uang saku subjek dibagi menjadi tiga kelompok yaitu kurang dari Rp 5.000 sebanyak satu orang (1,4%), Rp 5.000–10.000 sebanyak 33 orang (44,6%) dan >Rp 10.000 sebanyak 40 orang (54,1%). Uang saku berkisar Rp 3.000–Rp 33.000 dengan rata-rata Rp 13.360 ± 5502 .

Rata-rata berat badan (BB) siswi adalah $47,9 \pm 7,4$ kg, dan tinggi badan (TB) $152,6 \pm 4,9$ cm. Sebaran status gizi subjek sebagian besar berada dalam kategori normal yaitu 61 siswi (82,0%). Terdapat satu siswi berstatus gizi kurang (1,4%) dan empat siswi gizi kurus (5,4%). Kisaran IMT antara 12,4–30,9 kg/m² dengan rata-rata $20,5 \pm 3,2$ kg/m². Ukuran antropometri lainnya adalah lingkar pinggang dan lingkar pinggul, yaitu berturut-turut sebesar $70,7 \pm 12,2$ cm dan $81,9 \pm 5,8$ cm. Rasio lingkar pinggang-pinggul siswi sebesar 0,86 masih dibawah kriteria metabolik sindrom <0,90.

Konsumsi Pangan

Kebanyakan remaja yang mempunyai status gizi besi rendah disebabkan oleh kebiasaan konsumsi pangan yang tidak benar. Kelompok risiko remaja yang berisiko anemia adalah vegetarian, konsumsi pangan hewani yang rendah, atau terbiasa menghindari makan (*skip meal*) (Krummel & Kris-Etherton, 1996). Menurut Depkes (2003) remaja sering menderita anemia dikarenakan lebih banyak mengonsumsi makanan nabati dibandingkan hewani, lebih sering melakukan diet karena ingin langsing, dan mengalami haid setiap bulan.

Konsumsi pangan merupakan jumlah dan jenis pangan yang dikonsumsi oleh subjek sesuai dengan kelompok pangan (Tabel 2). Semua sampel (100,0%) mengonsumsi nasi sebagai makanan pokok, namun rata-rata konsumsi nasi sangat rendah (123 g/hari). Jika dibandingkan dengan anjuran Pedoman Gizi Seimbang (PUGS) untuk kelompok remaja, konsumsi nasi per hari adalah 500 g/hari (5 porsi) (Depkes, 2005), maka rata-rata konsumsi sampel baru mencapai 25%.

Tabel 2. Rata-rata Konsumsi Pangan Siswi Per Hari

Jenis Pangan	Konsumsi pangan (g)	Energi (kkal)	Protein (g)	Fe (mg)	Vit A (RE)	Vit C (mg)
Sereal & Umbi-Umbian	122,6±74,4	394	6,7	1,1	0	0
Kacang & Biji-Bijian	45,8±42,0	43	4,3	3,8	10	0
Daging Sapi	39,4±34,8	48	5,4	0,8	12	0
Daging Ayam	38,5±21,3	41	4,5	0,5	10	0
Telur	50,0±29,2	45	6,2	0,7	90	0
Ikan, Kerang, Udang	20,1±68,8	39	3,1	0,6	11	0
Sayuran	43,3±34,3	15	0,1	0,9	258	0
Buah-Buahan	73,4±82,7	56	0,3	0,7	36	13
Susu	72,0±48,8	42	2,1	0,1	22	11
Min, Kemasan Industri (ml)	493,0±360,6	65	0	0	0	1
Mak, Kemasan Industri	38,8±24,7	43	0,8	0,4	0	0
Mie ayam	23,6±20,9	25	0,7	0,1	0	0
Pempek	15,6±6,5	22	0,8	0,1	0	0
Bakso	72,4±52,5	98	2,1	0,7	0	0
Batagor	16,5±16,1	21	0,5	0,1	0	0
Siomay	12,9±9,1	11	0,4	0,1	0	0
Jumlah		1.008	38,2	10,7	448	25

Konsumsi kacang-kacangan yang banyak adalah tahu dan tempe sebagai lauk pauk nabati yang paling populer di masyarakat. Konsumsi kacang-kacangan tersebut sebanyak 46 g/hari. Jumlah ini tidak besar karena tidak lebih dari satu potong tempe ukuran sedang. Dibandingkan anjuran PUGS konsumsi lauk nabati

sebesar 150 g/hari (3 porsi), maka rata-rata konsumsi buah tersebut baru mencapai 30% (Depkes, 2005).

Lauk daging yang paling banyak dikonsumsi adalah daging ayam dan daging sapi. Rata-rata konsumsi daging sebesar 78 g/hari. Selain konsumsi daging, konsumsi telur 50 g/hari, dan konsumsi ikan 58 g/hari. Total konsumsi pangan hewani tersebut sudah mendekati anjuran PUGS untuk konsumsi lauk hewani sebesar 150 g/hari (3 porsi) (Depkes, 2005). Masalah utama pemanfaatan zat besi oleh tubuh adalah rendahnya penyerapan di dalam usus. Penyerapan zat besi dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu absorpsi besi heme dan non-heme yang menunjukkan keberadaan dua jenis zat besi yang berbeda di dalam pangan. Sumber heme pada pangan manusia adalah daging, ikan, dan unggas, sedangkan sumber non-heme adalah sereal, kacang-kacangan, sayur dan buah (UNICEF/FAO/WHO, 2001).

Konsumsi sayuran siswi sangat rendah yaitu 43 g/hari dibandingkan anjuran PUGS sebesar 300 g/hari (3 porsi) (Depkes, 2005). Konsumsi sayuran yang paling banyak dikonsumsi adalah sop sayuran, sop wortel dan kentang, tumis kangkung, sayur bayam, tumis labu, urap sayuran, sayur sawi. Namun demikian, konsumsi buah-buahan siswi relatif lebih banyak dibandingkan konsumsi sayuran yaitu sebanyak 73 g/hari. Dibandingkan anjuran PUGS konsumsi buah sebesar 200 g/hari (4 porsi), maka rata-rata tersebut baru mencapai 25–35% (Depkes, 2005). Buah yang banyak dikonsumsi adalah pisang, pepaya, apel, dan jambu biji.

Konsumsi susu diukur dari susu siap minum, baik yang disiapkan sendiri (susu bubuk, SKM) maupun susu UHT. Rata-rata konsumsi sebesar 112 g/hari. Minum susu tidak menjadi keharusan untuk kelompok remaja Depkes (2005). Minuman kemasan yaitu dari 493 g/hari. Jenis dan merk minuman kemasan yang banyak dikonsumsi siswi SMK adalah teh sisri, green tea, fruit tea, teh gelas, teh botol, coca cola, dan fanta.

Konsumsi makanan *snack* dalam kemasan sebanyak 39 g/hari. Adapun jenis dan merk makanan kemasan yang banyak dikonsumsi adalah chitatos, geri chocolates, keripik kentang, momogi, biskuit, ciki steak & ciki singkong balado, energen sereal, oreo, astor, potato, sosis. Makanan sepinggan yang banyak

dikonsumsi adalah mie ayam, pempek, bakso, batagor, dan siomay. Konsumsi makanan sepinggan sebesar 321 g/hari.

Asupan zat gizi

Asupan zat gizi subjek merupakan hasil konversi konsumsi pangan yang terdiri dari energi, protein, zat besi, vitamin A, dan vitamin C. Rata-rata asupan energi dan zat gizi per hari adalah 1008 ± 446 kkal, protein $38,3 \pm 19,8$ g, zat besi $10,8 \pm 6,3$ mg, vitamin C 25 ± 16 mg dan vitamin A 448 ± 410 RE. Rata-rata Tingkat Kecukupan Gizi (TKG) energi adalah defisit tingkat berat (45,8%), sedangkan TKG protein defisit tingkat sedang (76,6%) dan TKG vitamin A tergolong kategori cukup (89,7%). Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kecukupan siswi remaja defisit untuk zat gizi makro maupun zat gizi mikro (Tabel 3). Studi sebelumnya pada mahasiswa IPB juga menunjukkan defisiensi asupan zat gizi mikro. Proporsi subjek yang mengalami defisit asupan vitamin dan zat besi cukup tinggi, yaitu untuk vitamin A dan C (40–70%) dan zat besi 85% (Briawan *et al.* 2007).

Tabel 3. Rata-rata Asupan Zat Gizi Subjek Per Hari

Zat gizi	Asupan	TKG (%)
Energi (kkal)	$1\ 008 \pm 446$	$45,8 \pm 20,3$
Protein (g)	$38,3 \pm 19,8$	$76,6 \pm 39,5$
Zat Besi (mg)	$10,8 \pm 6,3$	$41,7 \pm 24,2$
Vitamin C (mg)	25 ± 16	$33,4 \pm 14,7$
Vitamin A (RE)	448 ± 410	$89,7 \pm 82,0$

Proporsi subjek dengan TKG energi dan protein kategori tingkat defisit berat berurut-turut sebesar 86,5% dan 51,4%. Hasil analisis data Riskesdas (2010) TKG energi remaja usia 16–18 tahun berkisar antara 69,5%–84,3%, dan sebanyak 54,5% remaja mengonsumsi energi dibawah kebutuhan minimal. Adapun TKG protein remaja berkisar antara 88,3%–129,6%, dan yang asupannya dibawah kebutuhan minimal sebanyak 35,6% (Depkes, 2011).

Berdasarkan konsumsi pangan tersebut di atas, asupan zat gizi makro (energi dan protein), maupun zat gizi mikro (vitamin dan zat besi) subjek masih rendah dibandingkan standar AKG. Terdapat 5 orang siswi (6,8%) yang pada saat ini sedang melakukan diet untuk menurunkan berat badan atau menghindari

kegemukan. Sebanyak 5 siswi yang melakukan diet tersebut ternyata yang IMT-nya kegemukan/obese hanya satu orang, sedangkan 4 siswi lainnya berstatus normal.

Rata-rata asupan zat gizi siswi seperti tersebut di atas termasuk rendah, yang diantaranya disebabkan oleh perilaku konsumsi pangan yang salah. Terdapat kecenderungan pada remaja meskipun tidak kegemukan, tetapi melakukan diet, sehingga rata-rata asupan energi dan protein menjadi rendah. Studi lainnya di Bogor menunjukkan remaja yang melakukan diet penurunan berat badan, yaitu 10,7% laki-laki dan 32,0% wanita lebih besar dari pada jumlah remaja dengan kategori gemuk, yaitu berturut-turut 7% dan 8% (Briawan, Martianto dan Harahap, 2008). Sebanyak 30% remaja yang menginginkan tubuh ideal melakukannya dengan cara sengaja melewati waktu makan, baik makan pagi, siang atau malam (Septiadewi dan Briawan, 2010).

Bioavailabilitas Zat Besi

Bioavailabilitas zat besi dalam makanan sangat dipengaruhi oleh faktor pendorong dan penghambat. Selain itu bioavailabilitas zat besi juga terkait dengan zat besi heme dan non heme yang memiliki nilai bioavailabilitas berbeda (FAO/WHO, 2001).

Almatsier (2002) menyatakan bahwa protein, terutama protein hewani dan vitamin C membantu penyerapan zat besi dalam tubuh. Pangan yang mengandung zat besi dalam jumlah yang cukup tinggi adalah hati, daging, makanan laut, buah kering, dan sayuran hijau. Penelitian ini menunjukkan rata-rata konsumsi vitamin C sebesar 25 mg dan konsumsi sayuran dan buah berada dalam kategori kurang dengan rata-rata 117 g.

Almatsier (2003) menyatakan bahwa zat yang menghambat penyerapan zat besi antara lain tanin dan kalsium yang terdapat dalam teh, kopi, coklat, oregano, dan susu. Hal ini berkaitan dengan adanya oksalat dan tanin yang menghambat absorpsi. Subjek mengkonsumsi sereal rata-rata 214 g, kacang-kacangan 45,8 g dan konsumsi teh 0,8 g.

Rata-rata bioavailabilitas heme dan non-heme berturut-turut 23% dan 1,4%. Berdasarkan estimasi, rata-rata besi terserap dari heme dan non-heme sebesar

1 mg dan 0,09 mg. Sehingga rata-rata bioavailabilitas zat besi sebesar 1,09 mg. Rata-rata bioavailabilitas zat besi tersebut sebesar $10,0 \pm 0,5\%$ atau dalam kategori penyerapan besi sedang. Rentang persen bioavailabilitas besi tersebut antara 8,7–11,2%. Studi konsumsi pangan mahasiswa di Bogor (Briawan *et al.* 2008) dengan menggunakan metode estimasi bioavailabilitas zat besi oleh Monsen *et al.* (1978) menunjukkan subjek dengan konsumsi *meat*, *fish*, dan *poultry* (MFP) antara 60–80 g/hari dan asupan vitamin C 50–60 mg/hari, diperkirakan skor bioavailabilitas besi sebesar 10%.

Uji korelasi *Pearson* menunjukkan bioavailabilitas zat besi (mg) secara signifikan berhubungan dengan konsumsi daging sapi dan ayam ($r=0,381$) dan asupan vitamin C ($r=0,340$) ($p<0,05$). Adapun bioavailabilitas zat besi tidak berhubungan dengan asupan zat besi dan asupan protein ($p>0,05$).

Status Anemia

Secara subyektif sampel siswi selama satu bulan sebelum pengumpulan data diminta untuk menyebutkan kemungkinan mengalami gejala anemia seperti lemas, lelah, mata berkunang, cepat lesu, sering pingsan. Sebanyak 20–30% sampel merasa sepat lemas dan lelah, 15% mata berkunang-kunang.

Anemia adalah kondisi sel darah merah dan hemoglobin jumlahnya sedikit sehingga kemampuan membawa oksigen ke jaringan tubuh berkurang. Anemia dengan indikator biokimia darah ditunjukkan oleh beberapa parameter, yang utama adalah konsentrasi hemoglobin. Batas yang digunakan untuk kondisi anemia pada remaja wanita (tidak hamil) adalah <12 g/dL (UNICEF/UNU/WHO, 2001).

Pada remaja, anemia dapat dipengaruhi oleh rendahnya asupan zat besi dan bioavailabilitas zat besi. Hasil penelitian menunjukkan rata-rata kadar Hb sebesar $13,4 \pm 1,4$ g/dL. Sebanyak 8 siswi (10,8%) menderita anemia dengan rata-rata kadar Hb $10,6 \pm 0,9$ g/dL. Dan sebanyak 66 siswi (89,2%) dengan status hemoglobin normal dengan kadar rata-rata $13,7 \pm 1,0$ g/dL. Anemia dapat mengganggu kegiatan akademik berkaitan dengan gejala anemia yang dapat ditimbulkan, yaitu lemah, letih, lesu, dan lunglai yang dapat mengganggu konsentrasi serta motivasi belajar. Studi Briawan, Adriyani dan Pusporini (2009)

pada evaluasi program suplementasi besi di Kota Bekasi menunjukkan rata-rata kadar Hb sebelum suplementasi 12,4 g/dL dan prevalensi anemia antara siswi sebesar 22,0%.

Uji korelasi *Pearson* kadar hemoglobin (g/dL) secara signifikan berhubungan dengan asupan vitamin C ($r=0,002$) dan vitamin A ($r=0,022$) ($p<0,05$). Namun demikian, kadar Hb tidak berhubungan dengan asupan zat besi, bioavailabilitas zat besi dan asupan protein ($p>0,05$).

KESIMPULAN

Rata-rata konsumsi pangan siswi untuk semua kelompok pangan lebih rendah dibandingkan dengan rekomendasi PUGS, kecuali untuk lauk pangan hewani sudah mendekati anjuran. Oleh karena itu, asupan zat gizi siswi juga rendah, baik untuk zat gizi makro (energi dan protein) dan mikro (zat besi, vitamin A, C). Estimasi bioavailabilitas zat besi sebesar 1,09 mg atau 10,0% dan termasuk dalam kategori sedang. Terdapat hubungan yang nyata antara bioavailabilitas zat besi dengan konsumsi daging sapi dan ayam dan asupan vitamin C. Rata-rata kadar Hb sebesar $13,4\pm1,4$ g/dL, dan sebanyak 10,8% siswi menderita anemia. Kadar hemoglobin berhubungan nyata dengan asupan vitamin C dan vitamin A.

DAFTAR PUSTAKA

- Almatsier S. 2002. Prinsip Dasar Ilmu Gizi. Jakarta: Gramedia Pustaka.
- Briawan D, Harahap H, Martianto M. 2008. Hubungan konsumsi pangan dan status gizi dengan *body image* pada remaja di perkotaan. *Gizi Indonesia*, 30(2):51–56.
- Briawan D, Hardinsyah, Setiawan B, Marliyati SA, Muhial. 2008. Efikasi suplemen besi-multivitamin untuk perbaikan status besi remaja wanita. *Jurnal Gizi Indonesia*. 30(1):30–36.
- Briawan D, Adriani A, Pusporini. 2009. Determinan keberhasilan program suplementasi zat besi pada remaja putri (siswi SMP dan SMK) di Kota Bekasi, *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*; 6(2):78–83.

- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2003. Program Penanggulangan Anemia pada Wanita Usia Subur (WUS). Jakarta.
- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2005. Pedoman Umum Gizi Seimbang (PUGS). Jakarta.
- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2011. Riset Kesehatan Dasar 2010. Jakarta.
- Du S, Zhai F, Wang Y, & Popkin BM. 1999. Current Methods for Estimating Dietary Iron Bioavailability Do Not Work in China. *America Society for Nutritional Science* 130: 193–198.
- FAO/WHO [Food Agricultural Organization /World Health Organization]. 2001. *Human vitamin and mineral requirements*. Rome.
- Grantham S & Cornelius A. 2001. A Review of Studies on the Effect of Iron Deficiency on Cognitive Development in Children. *The Journal of Nutrition* 131, 649–668.
- Kartono D dan Soekatri M. Angka Kecukupan Mineral: Besi, Iodium, Seng, Mangan, Selenium. Dalam Soekirman dkk. [Eds], *Ketahanan Pangan dan Gizi di Era Otonomi Daerah dan Globalisasi, Prosiding Widyakarya Nasional Pangan dan Gizi VIII* [hlm. 393–429], 17–19 Mei. LIPI, Jakarta.
- Krummel DA, Kris-Etherton PM. 1996. *Nutrition in women's health*. USA: An Aspen.
- Monsen ER, *et al.* 1978. Estimation of available dietary iron. *Am J Clin Nutr* January:134–141.
- Soewondo S, Husaini M & Pollitt E. 1989. Effect of Iron Deficiency on Attention and Learning Processes in School Children: Bandung, Indonesia. *Am J Clin Nutr*, 50, 667–74.
- Septiadewi D dan Briawan D. 2010. Penggunaan Metode *Body Shape Questionnaire* (BSQ) dan *Figure Rating Scale* (FRS) untuk Pengukuran Persepsi Tubuh Remaja Wanita. *Jurnal Gizi Indonesia*, 33(1): 29–36.
- UNICEF/UNU/WHO [United Nation for Children Education Fund/United Nation University/World Health Organization]. 2001. *Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control a guide for programme managers*. New York.

**PEMANFAATAN BIODIVERSITAS INDONESIA UNTUK
NANOBIOSENSOR ANTIOKSIDAN**
(Utilization of Indonesia's Biodiversity for Antioxidant Biosensor)

Dyah Iswantini^{1,3)}, Novik Nurhidayat²⁾, Lyonawati¹⁾, Trivadila¹⁾

¹⁾Dep. Kimia, Fakultas Matematika dan IPA, IPB.

²⁾Divisi Mikrobiologi R & D Biologi, LIPI, Bogor.

³⁾Pusat Studi Biofarmaka, Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB.

ABSTRAK

Deteksi antioksidan dari suatu sediaan menggunakan metode spektrofotometri mempunyai kelemahan yaitu biaya yang mahal dan terkendala karena tingginya konsentrasi. Biosensor elektrokimia merupakan alternatif metode yang dikembangkan untuk mengukur sifat-sifat antioksidan. Biosensor untuk mengukur kapasitas antioksidan berbasis superoksida dismutase (SOD) menunjukkan performa yang menjanjikan. Maka telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk memanfaatkan biodiversitas Indonesia untuk biosensor antioksidan dengan menggunakan mikroba Indonesia (ekstrak protein sitoplasma *E. coli* ATC25922) sebagai penghasil yang diimobilisasi pada zeolit alam Indonesia sebagai material nano. Modifikasi SOD pada biosensor dengan teknik imobilisasi bertujuan untuk meningkatkan aktivitas, stabilitas dan efisiensi penggunaan enzim tersebut. Selain itu, molekul enzim yang terikat pada permukaan matriks, memungkinkan enzim untuk mempertahankan aktivitas katalitiknya. Hasil penelitian menunjukkan SOD dari ekstrak *E. coli* yang diimobilisasi pada zeolit alam memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan tanpa diimobilisasi dengan zeolit. Penggunaan zeolit alam sebagai matriks imobilisasi ini menghasilkan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* relatif stabil selama 4 jam sebesar 88.91%. Nilai K_m SOD dalam ekstrak *E. coli* terimobilisasi lebih kecil dibandingkan tanpa imobilisasi. Ini menunjukkan afinitas SOD dalam ekstrak *E. coli* terimobilisasi lebih besar dibandingkan tanpa imobilisasi.

Kata kunci: Biodiversitas Indonesia, nanobiosensor antioksidan, *E.coli*, elektrokimia, zeolit.

ABSTRACT

Antioxidant detection of sample using spectrophotometry method have weakness including the expensive price, long sample preparation time and less sensitive especially for sample with high concentration. Electrochemistry biosensor is alternative method which is developed to measure antioxidant capacity. Antioxidant biosensor using superoksida dismutase (SOD) is the promising performance. Therefore, utilization of Indonesia's biodiversity using Indonesia's microbe and nano material for antioxidant biosensor has been conducted. The purpose of using SOD is to improve the activity, stability and enzyme utilization efficiency. The result of research indicated that SOD of *E. coli* extract immobilized on natural zeolite had a higher activity than without zeolite. Utilization of natural zeolite as immobilization matrix resulted the stabil antioxidant activity of *E. coli* extract relatively of 88.91% for 4 hours. K_m value of SOD in *E. coli* extract immobilized was less than that of without immobilization. This result indicated that affinity of SOD in *E. coli* extract immobilized was much than that of without immobilization.

Keywords: Indonesia's biodiversity, antioxidant nanobiosensor, *E.coli*, electrochemistry, zeolite.

PENDAHULUAN

Aktivitas sehari-hari sering membuat tubuh terpapar radikal bebas yang dihasilkan dari pencemaran udara, makanan yang mengandung pengawet, stres, infeksi virus, dan bakteri hasil metabolisme tubuh. Radikal bebas sangat berbahaya karena sifatnya yang reaktif dalam mencari pasangan elektron, bereaksi cepat pada biomolekul melalui berbagai jenis reaksi antara lain penangkapan hidrogen, donor elektron, dan penggunaan elektron bersama. Radikal bebas akan melepaskan elektron pada molekul sekitarnya untuk menghasilkan pasangan elektron sehingga menjadi molekul yang stabil. Reaksi ini akan berlangsung terus-menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya (Pourmorad *et al.* 2006).

Sifat-sifat antioksidan seperti kapasitas dan aktivitas antioksidan dapat ditentukan dengan metode spektrofotometri, fluoresensi, kromatografi gas atau cair, dan sebagainya (Budnikov & Ziyatdinova, 2005). Metode-metode tersebut memiliki beberapa kelemahan, khususnya metode spektrofotometri yakni biaya mahal, waktu preparasi sampel lama, dan kurang sensitif terutama dalam menguji sampel berwarna dan sangat dipengaruhi oleh kekeruhan atau turbiditas. Oleh karena itu, dibutuhkan metode yang lebih tepat, cepat, dan sensitif untuk mengukur sifat-sifat antioksidan.

Biosensor antioksidan merupakan metode alternatif yang dikembangkan untuk mengukur sifat-sifat antioksidan. Metode ini sangat menjanjikan karena waktu analisis cepat, membutuhkan instrumen yang tidak mahal, dan protokol operasi yang sederhana, yaitu biosensor amperometri dan biosensor untuk menguji kapasitas antioksidan berdasarkan aktivitas penangkapan radikal bebas berbasis sitokrom *c*, DNA, dan superoksida dismutase (SOD) (Prieto-Simon *et al.* 2008). Biosensor antioksidan pada penelitian ini berbasis enzim SOD, akan tetapi penggunaan enzim SOD murni memiliki kekurangan, yaitu harga yang mahal dan kestabilan enzim yang rendah. Solusi dari kekurangan tersebut adalah penggunaan bakteri yang menghasilkan enzim SOD sebagai sensor.

Bakteri penghasil enzim SOD antara lain *Deinococcus radiodurans*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, dan sebagainya (Benov *et al.* 1996). Alasan pemilihan *Escherichia coli* sebagai sumber SOD pada penelitian ini karena pertumbuhannya sangat cepat dan mudah dalam penanganannya. Jenis SOD yang dihasilkan *E. coli*, yaitu Mn-SOD dan Cu/Zn-SOD. Enzim Mn-SOD termasuk jenis homotetramer yang terdiri dari satu atom mangan pada setiap sub unit. Enzim Cu/Zn-SOD memiliki dua sub unit yang identik, berperan dalam melindungi sel dari radikal superoksida, dan dapat ditemukan pada *E. coli* dalam konsentrasi tinggi (Mates *et al.* 1999).

Modifikasi enzim pada biosensor dengan teknik imobilisasi bertujuan untuk meningkatkan aktivitas, stabilitas dan efisiensi penggunaan enzim tersebut. Selain itu, molekul enzim yang terikat pada permukaan matriks, memungkinkan enzim untuk mempertahankan aktivitas katalitiknya. Bahan yang dapat digunakan sebagai matriks imobilisasi enzim antara lain biopolimer seperti kitosan, alginat, selulosa, karagenan, dan kitin (Nazaruddin, 2007), serta polimer sintetik seperti nilon, polianilin, polistirena, dan poliakrilamida. Akan tetapi, penggunaan polimer sebagai matriks imobilisasi memiliki kelemahan utama, yaitu stabilitas kimia dan mekaniknya yang masih rendah (Park, 2000).

Bahan anorganik seperti tanah liat, alumina berpori, silika (Bhatia *et al.* 2000), dan zeolit (Balal *et al.* (2009), Kirdeciler *et al.* (2011), Goriushkina *et al.* (2010)) juga dapat digunakan sebagai matriks imobilisasi enzim. Zeolit adalah salah satu bahan yang banyak terdapat di Indonesia dan berpotensi sebagai matriks imobilisasi SOD. Rangka dan pori dari struktur zeolit yang seragam menyebabkan selektivitas dan reproduibilitas yang dihasilkan tinggi (Valdes *et al.* 2006).

Penggunaan zeolit sebagai matriks imobilisasi enzim pada biosensor telah dilakukan oleh Goriushkina *et al.* (2010) untuk imobilisasi glukosa oksidase, Kirdeciler *et al.* (2011), untuk imobilisasi urease dan menghasilkan stabilitas kerja biosensor yang baik, dan Balal *et al.* (2009), untuk modifikasi elektrode pasta karbon yang digunakan untuk mengukur kadar dopamin dan triptofan. Hasil tersebut juga menunjukkan bahwa elektrode pasta karbon yang termodifikasi

zeolit, akan menghasilkan arus yang lebih tinggi dan memiliki stabilitas yang baik dalam percobaan berulang-ulang dan membuat pengukuran menjadi lebih sensitif dan selektif. Selain itu, Weniarti (2011) juga menggunakan zeolit untuk imobilisasi SOD *D. radiodurans*. Hasil penelitian Weniarti (2011) menunjukkan bahwa penggunaan zeolit sebagai *co-immobilization* untuk enzim SOD *D. radiodurans* yang diimobilisasi pada permukaan elektrode pasta karbon yang dimodifikasi dengan ferrosena sebagai mediator dapat meningkatkan aktivitas SOD dalam biosensor antioksidan.

Penelitian bertujuan menentukan aktivitas dan stabilitas SOD dari ekstrak protein sitoplasma *E. coli* ATC25922 yang diimobilisasi pada zeolit alam sebagai biosensor antioksidan.

METODE PENELITIAN

Penumbuhan Sel Bakteri *E. coli* dan Ekstraksi SOD *E. coli*

Bakteri *E. coli* ditumbuhkan media LB agar miring, kemudian diinkubasi selama 24 jam, 37°C. Bakteri yang tumbuh selanjutnya ditanam ke dalam 5 mL media LB cair sebagai *starter*, diinkubasi sampai mencapai nilai OD₆₁₀=0.5 kemudian diinokulasi ke dalam 50 mL media LB cair dan diinkubasi kembali selama 24 jam, 37°C. Sel bakteri dipanen dengan cara disentrifugasi pada kecepatan 10 000 rpm selama 20 menit. Pelet dipisahkan dari supernatan dan dicuci dengan air destilata steril dan diresuspensikan dalam bufer fosfat pH 7.5. Suspensi biomassa sel bakteri kemudian disonikasi dengan *Ultrasonic Homogenizer* dengan *pulse* 50% dan *output* 5, dengan interval 10×2 menit dan interval berhenti 1 menit. Sonikasi bertujuan untuk memecah sel bakteri. Selama sonikasi, suspensi biomassa sel bakteri diletakkan dalam penangas es. Hasil sonikasi kemudian disentrifugasi dengan gaya sentrifugasi 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit untuk memisahkan pelet membran dan fraksi ekstrak sitoplasma sel bakteri. Konsentrasi protein yang mengandung enzim SOD dari ekstrak sitoplasma diketahui dengan cara pengukuran absorbansi larutan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Aktivasi Zeolit

Sebanyak 50 gram zeolit Bayah dicuci dengan akuades sampai pH netral, disaring, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C. Zeolit yang telah dikeringkan, diaktivasi dengan menambah 250 mL HCl 3 M dalam gelas piala dan diaduk selama 1 jam. Zeolit yang telah diaktivasi disaring, kemudian dicuci dengan akuades sampai pH netral. Larutan hasil saringan diuji kandungan klorin dengan AgNO₃ dan dicuci kembali dengan akuades sampai tidak mengandung klorin. Setelah pH netral dan bebas klorin, zeolit dikeringkan pada suhu 300°C selama 3 jam. Zeolit yang telah diaktivasi kemudian dihaluskan dan diayak dengan ayakan 100 mesh (Arif, 2011).

Imobilisasi Ekstrak Kasar Enzim SOD *E.coli* dan Sel Bakteri *E.coli*

Sebanyak 30 mg zeolit Bayah dicampurkan dengan 10 mL akuades, sehingga membentuk suspensi 3 mg/mL. Sebanyak 20 µL ekstrak *E. coli* dalam bufer fosfat pH 7.5 dicampur dengan 10 µL suspensi zeolit, didiamkan 10 menit, dan ditetaskan sebanyak 10 µL pada permukaan elektrode, didiamkan hingga pelarutnya menguap, dilapisi dengan membran dialisis, ditutup dengan jaring nilon, dan diikat dengan parafilm. Elektrode dapat langsung digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* menggunakan metode voltametri siklik. Elektrode direndam dalam bufer fosfat pH 7.5 pada suhu 4°C ketika tidak digunakan untuk memberikan keadaan yang sama dengan lingkungan sebenarnya. Prosedur yang sama dilakukan untuk imobilisasi sel bakteri *E. coli* (Modifikasi Dai *et al.* 2004, Ikeda *et al.* 1998).

Pengukuran Aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*

Uji aktivitas dilakukan dengan variasi rentang konsentrasi substrat xantina 0.1-1.00 mM (interval 0.1 mM), kemudian dibuat kurva hubungan antara konsentrasi substrat xantina dengan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*. Sebagai parameter adanya hubungan linier digunakan koefisien korelasi r pada analisis regresi linier $y = a + bx$.

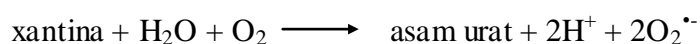
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penumbuhan Sel *E. coli* dan Ekstraksi Enzim SOD *E. coli*

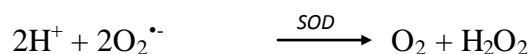
Sel bakteri *E. coli* dipecah menggunakan *Ultrasonic Homogenizer* untuk mengekstraksi protein sitoplasma yang mengandung SOD. Konsentrasi ekstrak protein sitoplasma yang diperoleh sebesar 1068.06 µg/mL. Ekstrak protein sitoplasma yang diperoleh tersebut diduga mengandung SOD jenis Mn-SOD dan Cu/Zn-SOD. Penelitian Yuan *et al.* (2002) menyebutkan SOD yang terkandung dalam ekstrak protein sitoplasma sel *E. coli* sebesar 26% dan aktivitas spesifiknya sebesar 920 U/mg (setelah dimurnikan). Aktivitas ini lebih besar dibandingkan aktivitas spesifik SOD dari *Macrobrachium nipponense* sebesar 96.29 U/mg (Yao *et al.* 2004).

Optimasi Aktivitas Antioksidan Ekstrak *E. coli* dan Sel Bakteri *E. coli*

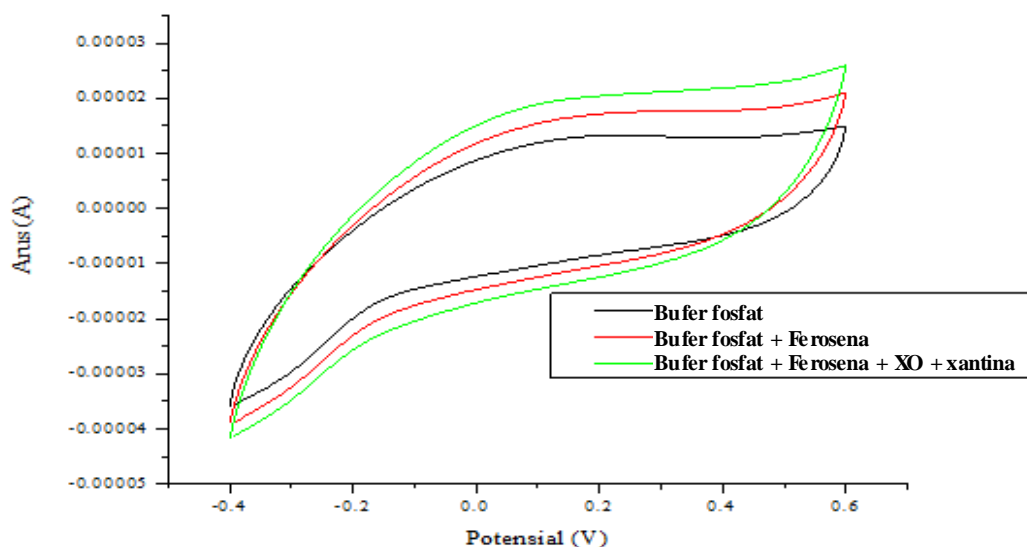
Aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* ditentukan menggunakan metode voltametri siklik. Metode ini sering digunakan sebagai eksperimen awal pada studi elektroanalisis untuk menentukan lokasi potensial redoks dari spesi elektroaktif secara cepat dan memberikan evaluasi yang baik dari pengaruh media terhadap proses redoks secara keseluruhan. Voltametri siklik merupakan salah satu metode elektroanalitik berdasarkan proses reduksi oksidasi pada permukaan elektrode kerja, yaitu elektrode pasta karbon termodifikasi mediator ferosena. Pemilihan ferosena sebagai mediator, karena sifatnya yang stabil, tidak bereaksi langsung dengan substrat enzim, potensial redoks yang lebih rendah dari potensial oksidasi zat-zat pengganggu, dan tidak dipengaruhi oleh pH dan efek kekuatan ion pada media (Trivadila, 2011). Elektrode pasta karbon yang termodifikasi ferosena pada penelitian Trivadila (2011) menghasilkan puncak anode dan katode, sehingga pada voltamogram blanko (tanpa penambahan substrat) akan dihasilkan arus yang berasal dari ferosena sebagai mediator. Setelah penambahan substrat xantina, terjadi reaksi enzimatik xantina dengan xantin oksidase (XO) yang menghasilkan radikal superoksida menurut reaksi:



Selanjutnya, radikal yang dihasilkan akan didismutasi membentuk O_2 dengan katalis SOD melalui reaksi:



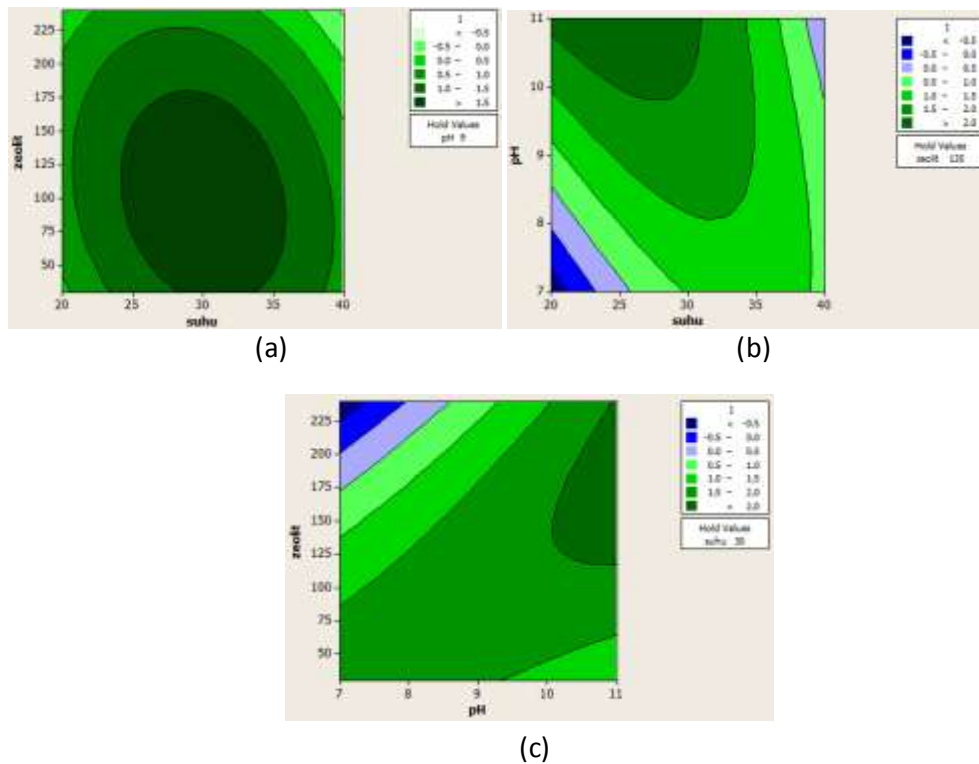
Reaksi yang terjadi pada permukaan elektrode pasta karbon ini akan menghasilkan arus puncak oksidasi yang lebih tinggi dibandingkan arus blanko (bufer fosfat) pada voltamogram siklik (Gambar 1). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak *E.coli* yang diimobilisasi pada permukaan pasta karbon termodifikasi ferosena menghasilkan aktivitas yang dapat terukur menggunakan metode voltametri siklik.



Gambar 1. Voltamogram siklik.

Optimasi aktivitas antioksidan ekstrak dan *E. coli* terimobilisasi meliputi suhu 20-40°C, pH 7-11, dan zeolit 30-240 mg. Hasil optimasi tersebut kemudian dianalisis menggunakan *Response Surface Methods* (RSM) pada perangkat lunak Minitab. Metode ini merupakan suatu teknik matematika dan statistika yang berguna untuk memodelkan dan menganalisis respon yang diteliti dipengaruhi oleh beberapa variabel dan bertujuan mengoptimalkan respon (Montgomery, 2001). Respon yang diperoleh digambarkan dalam bentuk plot kontur yang merepresentasikan garis-garis yang menunjukkan nilai ekspektasi respon aktivitas berupa arus dari minimum hingga maksimum. Gambar 2 menampilkan plot

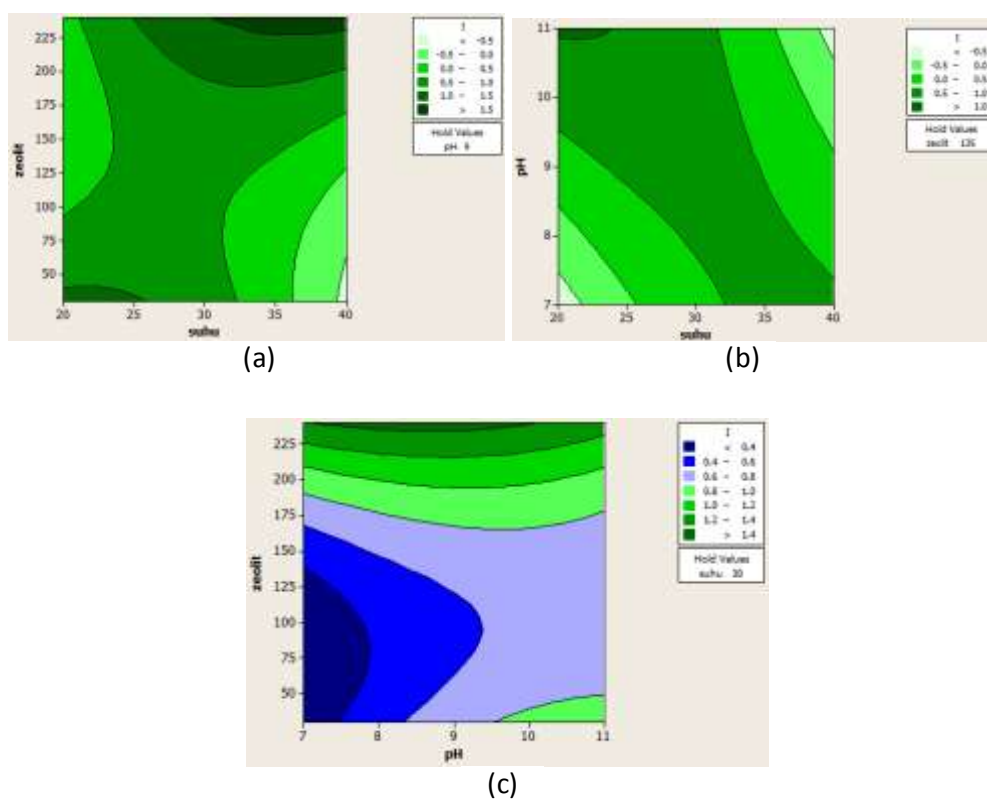
kontur hubungan antara suhu-pH, suhu-zeolit, dan pH-zeolit terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*.



Gambar 2. Plot kontur hubungan antara suhu dan zeolit (a), suhu dan pH (b), pH dan zeolit (c) terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*.

Kondisi optimum ekstrak *E. coli* yang diperoleh berdasarkan *respon optimizer* pada Minitab, yaitu suhu 37°C, pH 7, dan zeolit 30 mg. Hasil ini hampir sama dengan hasil yang diperoleh Endo *et al.* (2002) yang mengimobilisasi SOD dengan mediator ferosena-karboksialdehida bertaut silang dengan glutaraldehida pada permukaan elektrode Pt, memiliki aktivitas optimum pada suhu 37°C dan pH 7.4. Proses imobilisasi yang berbeda akan memengaruhi pH dan suhu optimum yang diperoleh. Enzim terimobilisasi menunjukkan perubahan ketergantungan pada keadaan pH, suhu, matriks imobilisasi, dan kekuatan ionik, khususnya jika parameter-parameter tersebut diubah oleh reaksi enzim itu sendiri. Akumulasi produk reaksi oleh batasan difusi dapat menggeser pH nyata optimum enzim 1-2 nilai pH dibandingkan dengan enzim bebas. Pergeseran serupa juga terjadi ketika enzim diimobilisasi pada matriks yang bermuatan positif atau negatif. Pergeseran

suhu terjadi karena imobilisasi enzim menyebabkan ketidakhomogenan sehingga terjadi penyimpangan pada plot Arrhenius (Bisswanger, 2008). Aktivitas optimum ekstrak *Deinococcus radiodurans*, yaitu pada suhu 30 °C, pH 9, dan zeolit 137.5 mg (Weniarti, 2011). Perbedaan kondisi optimum tersebut dapat disebabkan oleh perbedaan bakteri yang digunakan sebagai sumber SOD, jenis SOD, konsentrasi SOD, dan proses imobilisasi yang digunakan. Selain itu, penelitian ini menggunakan matriks imobilisasi zeolit yang telah diaktivasi terlebih dahulu sehingga memungkinkan tidak terdapat pengotor-pengotor yang mempengaruhi aktivitas optimum ekstrak *E. coli*.



Gambar 3. Plot kontur hubungan antara suhu dan zeolit (a), suhu dan pH (b), dan pH dan zeolit (c) terhadap aktivitas sel bakteri *E. coli*.

Optimasi aktivitas sel bakteri *E. coli* terimobilisasi meliputi suhu 20-40°C, pH 7-11, dan zeolit 30-240 mg. Hasil optimasi tersebut kemudian dianalisis menggunakan RSM pada perangkat lunak Minitab. Gambar 3 menampilkan plot kontur hubungan antara suhu-pH, suhu-zeolit, dan pH-zeolit terhadap aktivitas sel bakteri *E. coli*. Kondisi optimum sel bakteri *E. coli* yang diperoleh, yaitu suhu

40°C, pH 7, dan zeolit 240 mg. Hasil optimasi menunjukkan bahwa aktivitas maksimum sel bakteri *E. coli* sebesar 1.972 μA lebih kecil daripada aktivitas maksimum ekstrak *E. coli* sebesar 2.885 μA . Hasil tersebut disebabkan karena enzim SOD terdapat dalam membran sel *E. coli*, sehingga dinding selnya harus dipecah terlebih dahulu untuk mendapatkan ekstrak. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan sel bakteri *E. coli* utuh kurang berpotensi untuk digunakan sebagai komponen pengenalan hayati pada biosensor antioksidan.

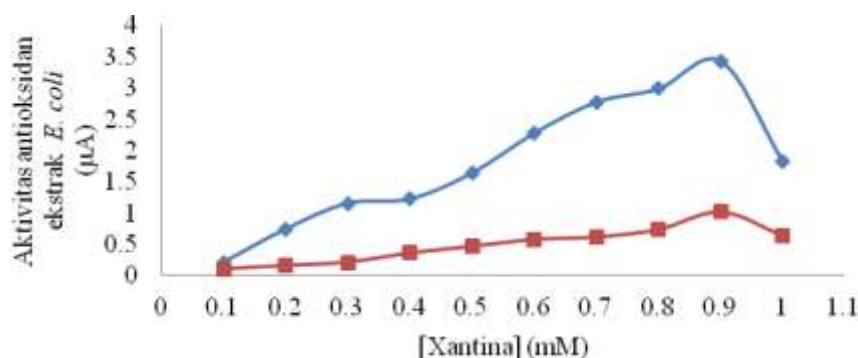
Aktivitas Antioksidan Ekstrak *E. coli*

Pengaruh substrat xantina terhadap aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* yang diimobilisasi pada zeolit alam dilakukan pada rentang konsentrasi 0.1 – 1.0 mM (interval 0.1 mM), pH 7, zeolit 30 mg, dan suhu 28°C. Pemilihan 28°C (suhu ruang) ini memudahkan dalam aplikasi biosensor antioksidan yang lebih praktis sehingga dapat langsung digunakan pada suhu ruang. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* pada rentang konsentrasi substrat xantina 0.1–1.0 mM.

Gambar 4 menunjukkan hubungan antara konsentrasi substrat xantina dengan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi yang hampir identik dengan persamaan Michaelis-Menten. Kurva tersebut menjelaskan bahwa reaksi yang dikatalisis oleh ekstrak kasar enzim SOD *E. coli* terjadi dalam dua tahap. Tahap pertama terjadi pada rentang 0.1–0.8 mM, yaitu reaksi berada pada fase pertama, tidak semua sisi aktif enzim mengikat radikal superoksida. Ketika konsentrasi xantina mencapai 0.9 mM, aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* mulai mencapai maksimum, yaitu sebesar 3.425 μA (terimobilisasi) dan 1.025 μA (tanpa imobilisasi), dan kondisi ini menunjukkan bahwa reaksi berada pada fase kedua, artinya enzim telah bekerja pada kapasitas penuh, semua sisi aktif enzim telah mengikat radikal superoksida. Penambahan substrat xantina dengan konsentrasi lebih tinggi berpengaruh pada penurunan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*, hal ini ditunjukkan pada saat penambahan konsentrasi xantina 1.0 mM, aktivitasnya turun menjadi 1.818 μA (terimobilisasi) dan 0.637 μA (tanpa imobilisasi).

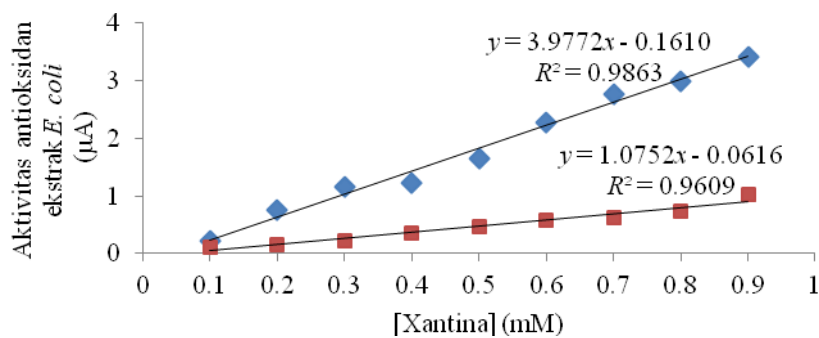
Arus puncak oksidasi ekstrak *E. coli* diimobilisasi pada permukaan zeolit yang lebih tinggi menunjukkan bahwa telah terjadi proses transfer elektron dari

reaksi enzimatik dismutasi superoksida oleh SOD dalam zeolit pada permukaan elektrode pasta karbon. Penggunaan zeolit sebagai matriks imobilisasi ekstrak *E. coli* diduga memengaruhi arus puncak oksidasi yang dihasilkan. Kemampuan zeolit dalam meningkatkan arus puncak oksidasi disebabkan oleh sifatnya yang hidrofilik karena adanya gugus $-OH$ di sekitar pori yang sangat sesuai untuk imobilisasi enzim (Valdes *et al.* 2006). Kemampuan zeolit dalam meningkatkan puncak arus oksidasi yang dihasilkan juga diperlihatkan pada penelitian Dai *et al.* (2004). Penelitian tersebut menggunakan zeolit NaY sebagai matriks imobilisasi sitokrom c untuk mendeteksi H_2O_2 .



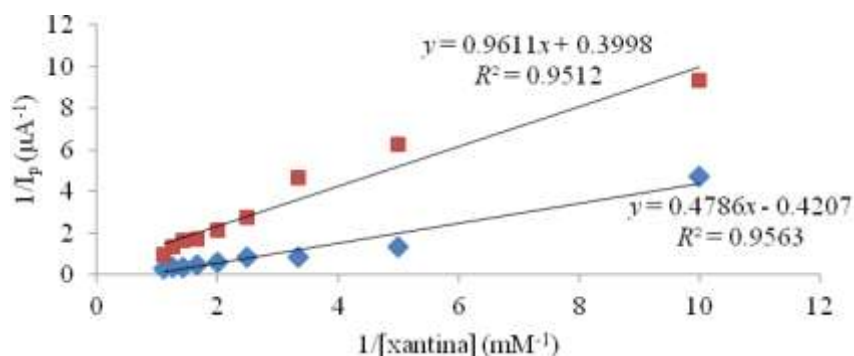
Gambar 4. Hubungan konsentrasi xantina dengan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli*
 —◆— + zeolit, —■— tanpa zeolit.

Penentuan linieritas pengukuran bertujuan untuk mengetahui daerah kerja maksimum dari elektrode yang digunakan. Gambar 5 menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi substrat xantina dengan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi. Berdasarkan gambar tersebut, diperoleh hubungan linier pada rentang konsentrasi substrat xantina 0.1–0.9 mM. Persamaan garis linier $y=3.9772x-0.1610$ dengan nilai $R^2=98.63\%$ (menggunakan zeolit sebagai matriks imobilisasi) dan $y=1.0752x-0.0616$ dengan nilai $R^2=96.09\%$ (tanpa matriks zeolit). Kisaran linier ekstrak *E. coli* yang diperoleh lebih lebar daripada penelitian Trivadila (2011), yaitu 0.1–0.7 mM untuk SOD murni dan 0.1–0.6 mM untuk ekstrak *D. radiodurans*.



Gambar 5. Linearitas konsentrasi xantina dengan aktivitas antioksidan ekstrak *E. Coli*
 ◆ + zeolit, ■ tanpa zeolit.

Penentuan parameter kinetika ekstrak *E. coli* bertujuan untuk melihat kespesifikan ekstrak *E. coli* yang diimobilisasi pada zeolit alam. Parameter kinetika yang digunakan, yaitu konstanta Michaelis-Menten nyata ($K_{m\ app}$) dan laju reaksi maksimum nyata ($V_{maks\ app}$) yang dianalogikan sebagai arus maksimum nyata ($I_{maks\ app}$). Kedua parameter kinetika tersebut ditentukan dengan metode Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf, dan Eadie-Hofstee. Linearitas metode Lineweaver-Burk lebih besar daripada Hanes-Woolf, dan Eadie-Hofstee, sehingga dapat disimpulkan bahwa kinetika reaksi enzimatik ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi mengikuti kinetika Lineweaver-Burk.



Gambar 6. Plot Lineweaver-Burk ekstrak *E. coli* ◆ + zeolit, ■ tanpa zeolit.

Nilai K_m merupakan suatu ukuran kuat atau lemahnya enzim mengikat substrat. Nilai K_m kecil maka enzim mengikat kuat substrat sehingga untuk menjenuhkan enzim hanya memerlukan substrat yang lebih sedikit dan sebaliknya

jika nilai K_m besar maka enzim tidak terlalu mengikat kuat substrat sehingga membutuhkan substrat yang lebih banyak untuk menjenuhkan enzim. Nilai I_{maks} merupakan indikator aktivitas enzim. Semakin besar I_{maks} , semakin tinggi aktivitas enzim dan sebaliknya. Nilai K_m ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi, yaitu 1.1376 mM dan 2.4039 mM. Nilai I_{maks} ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi, yaitu 2.3770 μA dan 2.5012 μA . Analisis kinetika ekstrak *E. coli* terimobilisasi dan tanpa imobilisasi dengan metode Lineweaver-Burk. Nilai K_m dan I_{maks} enzim SOD murni yang diperoleh pada penelitian Weniarti (2011), yaitu 1.096 mM dan 0.9890 μA .

Perbedaan nilai I_{maks} dan K_m yang diperoleh berhubungan dengan tingkat kemurnian enzim dan penggunaan zeolit sebagai matriks imobilisasi enzim. Enzim yang murni dan terjerap di permukaan zeolit memungkinkan sisi-sisi aktifnya dapat bereaksi secara lebih baik, sehingga meningkatkan aktivitasnya yang berdampak pada penurunan nilai K_m . Selain itu, enzim yang diekstraksi dari sumber bakteri yang berbeda akan memiliki sifat-sifat yang berbeda terutama responnya terhadap kondisi lingkungan seperti suhu, pH, dan konsentrasi substrat.

KESIMPULAN

Superoksida dismutase dari ekstrak *E. coli* yang diimobilisasi pada zeolit alam memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan tanpa diimobilisasi dengan zeolit. Penggunaan zeolit alam sebagai matriks imobilisasi ini menghasilkan aktivitas antioksidan ekstrak *E. coli* relatif stabil selama 4 jam sebesar 88.91%. Nilai K_m SOD dalam ekstrak *E. coli* terimobilisasi lebih kecil dibandingkan tanpa imobilisasi. Ini menunjukkan afinitas SOD dalam ekstrak *E. coli* terimobilisasi lebih besar dibandingkan tanpa imobilisasi.

DAFTAR PUSTAKA

Arif Z. 2011. Karakterisasi dan modifikasi zeolit alam sebagai bahan media pendeteksi studi kasus: kromium heksavalen [tesis]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.

- Arya SK, Datta M, Malhotra BD. 2007. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 23: 1083–1100.
- Balal K, Mohammad H, Bahareh, Ali B, Maryam H, Mozghan Z. 2009. Zeolite nanoparticle modified carbon paste electrode as a biosensor for simultaneous determination of dopamine and tryptophan. *J Chin Chem* 56: 789–796.
- Bell RG. 2001. What are Zeolites?. [terhubung berkala]. <http://www.bza.org/zeolites.html>. [14 Feb 2012].
- Benov LT, Beyer Jr WF, Stevens RD, Fridovich I. 1996. Purification and characterization of the Cu,Zn SOD from *Escherichia coli*. *Free Rad Bio Med* 21 (1): 117–121.
- Bhatia R, Gupta AK, Anup KS, Brinker CJ. 2000. Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem. Mater* 12: 2434–2441.
- Bisswanger H. 2008. *Enzyme Kinetics Principles and Methods*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Budnikov GK, Ziyatdinova. 2005. Antioxidants as analytes in analytical chemistry. *Journal of Analytical Chemistry* 60: 600–613.
- Campanella L, Bonanni A, Favero G, Tomassetti M. 2003. Determination of antioxidant properties of aromatic herbs, olives and fresh fruit using an enzymatic sensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 375: 1011–1016.
- Campanella L, Bonanni A, Finotti E, Tomassetti M. 2004. Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods. *Biosens. Bielectron.* 19: 641–651.
- Dai Z, Liu S, Ju H. 2004. Direct electron transfer of cytochrome c immobilized on a NaY zeolit matrix and its application in biosensing. *Electro Acta* 49: 2139–2144.
- Donnelly JK, McLellan KM, Walker JL, Robinson DS. 1989. Superoxide dismutase in foods. A Review *J Food Chem* 33: 243–270.
- Endo K *et al.* 2002. Development of superoxide sensor by immobilization of superoxide dismutase. *Sens. Actuators B* 83:30–34.
- Ginting A, Anggraini D, Indrayati S, Kriswarini R. 2007. Karakteristik komposisi kimia, luas pori, dan sifat termal zeolit dari daerah Bayah, Tasikmalaya, dan Lampung. *Jurnal Tek Bahan Nuklir* 3: 1–48.
- Goriushkina TB, Kurç BA, Sacco A, Dzyadevych SV. 2010. Application of zeolites for glucose oxidase in amperometric biosensors. *Sensor Electronics & Microsystem Technologies* 1: 36–42.

- Gort AS, Ferber DM, Imlay JA. 1999. The regulation and role the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 32 (1) 179–191.
- Grieshaber D, Mackenzie R, Janos V, Erik R. 2008. Electrochemical biosensor-sensor principles and architectures. *Sensor* 8: 1400–1458.
- Hadiyawarman, Rijal A, Nuryadin BW, Abdullah M, Khairurrijal. 2008. Fabrikasi material nanokomposit superkuat, ringan, dan transparan menggunakan metode *simple mixing*. *J Nano Nanotek* 1: 14–21.
- Hartati YW, Rochani S, Bahti HH, & Agma M. 2005. Biosensor elektrokimia untuk deteksi urutan DNA tanpa indikator hibridisasi. [Seminar]. Bandung: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadjaran.
- Holt *et al.* 1994. *Determinative Bacteriology*. NSA: Lippincot William & Wilkins.
- Ikeda T, Matsubara H, Kato H, Iswantini D. 1998. Electrochemical monitoring of *in vivo* reconstitution of glucose dehydrogenase in *Escherichia coli* cells with externally added pyrroloquinoline quinone. *Electroanal Chem* 449 (1-2): 219-224.
- Iswantini D, Nurhidayat N, Trivadila. 2011. Glucose biosensor using selected Indonesian bacteria. *Microbiology* 5 (1) 9–14.
- Kirdeciler SK, Soy E, Ozturk S, Kucherenko I, Soldatkin O, Dzyadevych S, Akata B. 2011. A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease. *Talanta* 85: 1435–1441.
- Martin C. 2011. Prinsip biosensor. [terhubung berkala]. [http://www.newsmedical.net/health/Biosensor-Principle-\(Indonesian\).aspx](http://www.newsmedical.net/health/Biosensor-Principle-(Indonesian).aspx). [4 Feb 2012].
- Mates JM, Gomez CP, Castro IN. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem* 32(8): 595–603.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase An enzyme for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 224 (22): 6049–6055.
- Montgomery DC. 2001. *Design and Analysis Of Experiments 5th Edition*. Canada: John Wiley & Sons Inc.
- Nazaruddin. 2007. Biosensor Urea Berbasis Biopolimer Khitin sebagai Matriks Imobilisasi. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan* 6: 41–44.
- Nezamzadeh A, Amini MK, Faghihian H. 2007. Square-wave voltametric determination of ascorbic acid based on its electrocatalytic oxidation at zeolite-modified carbon-paste electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.* 2: 583–594.

- Park JK, Chang HN. 2000. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Advances* 18: 303–319.
- Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod* 63: 1035–1042.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. 2006. Antioxidant activity, phenols, flavanoid contents of selected Iranian medicinal plants. *S. Afr. J. Biotechnol* 5: 1142-1145.
- Prieto-Simon B, Cortina M, Campas M, Calas-Blanchard C. 2008. Electrochemical biosensor as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sens. Actuators B* 129: 459–466.
- Purwoko T. 2007. *Fisiologi Mikroba*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Scott AO. 1998. *Biosensors for Food Analysis*. UK: The Royal Society of Chemistry.
- Svancara I, Ogorevc B, Hocevar SB, Vytras K. 2002. Perspectives of carbon paste electrode in stripping voltametry. *Analytical Sciences* Vol 18: 95–100.
- Trivadila. 2011. Biosensor antioksidan menggunakan superoksida dismutase *Deinococcus radiodurans* yang diimobilisasi pada permukaan elektrode pasta karbon dan parameter kinetiknya. [Tesis]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Valdes MG, Perez-Cordoves AI, Diaz-Garcia ME. 2006. Zeolites and zeolite based materials in analytical chemistry. *J. Trends Anal Chem* 25: 24–30.
- Vastarella W. 2001. Enzyme modified electrodes in amperometric biosensors. [Tesis]. Bari: University of Degli Studi di Bari.
- Weniarti. 2011. Biosensor antioksidan berbasis superoksida dismutase *Deinococcus radiodurans* diimobilisasi pada nanokomposit zeolit alam Indonesia. [Tesis]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Yao C, Way AL, Wang WN, Sun RY. 2004. Purification and partial characterization of Mn-SOD from niusele tissue of shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* 24: 621–631.
- Yuan QS, He HJ, Yang GZ, Wu XF. 2002. High-level expression of human extracellular superoxide dismutase in *Escherichia coli* and insect cells. *Protein Expression and Purification* 24: 13–17.

STUDI KINETIKA PRODUKSI GLUKOSAMIN DALAM WATER-MISCIBLE SOLVENT DAN PROSES SEPARASINYA

(Study on Kinetic and Separation Process of Glucosamine Production in Water-miscible Solvent)

Eko Hari Purnomo^{1,2)}, Azis Boing Sitanggang^{1,2)}, Dias Indrasti^{1,2)}

¹⁾Dep. Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB.

²⁾Pusat Pengembangan ILTEK Pertanian dan Pangan Asia Tenggara (Seafast Center), Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat, IPB.

ABSTRAK

Glukosamin (GlcN) umumnya diproduksi melalui hidrolisis eksoskeleton hewan laut dan fermentasi mikroorganisme. Akan tetapi, produksi dengan hidrolisis memiliki keterbatasan pada ketersediaan bahan baku, alergi, maupun kontaminasi lingkungan. Sementara, produksi menggunakan mikroorganisme terbatas oleh waktu produksi yang lama dan proses pemisahan. Oleh karena itu, pada studi ini produksi GlcN dilakukan secara kimia non-enzimatis antara sumber karbon (fruktosa atau glukosa) dan sumber amonium (campuran amonium asetat dan amonium klorida) dalam metanol dengan asam asetat sebagai buffer. Hasil menunjukkan bahwa fruktosa sebagai sumber karbon dapat membentuk solid GlcN dengan rendemen sebesar 544,79 mg/g karbon. Jumlah rendemen ini jauh lebih besar dibandingkan dengan hasil fermentasi (220 mg/g karbon). Akan tetapi, penelitian lebih lanjut terhadap proses pemurnian GlcN perlu dilakukan.

Kata kunci: Glukosamin, non-enzimatis, fruktosa, amonium.

ABSTRACT

Glucosamine (GlcN) has traditionally been produced by hydrolysis of shellfish exoskeleton and microbial fermentation. However, production by hydrolysis has limitations including the availability of raw material, shellfish allergy, and environmental contamination. Meanwhile, production by microorganism is limited due to long fermentation time and separation process. In regards to these limitations, in this study, production of GlcN was conducted by non-enzymatic chemical reaction between carbon source (glucose or fructose) and ammonium source (mixture of ammonium acetate and ammonium chloride) in the presence of methanol containing acetate acid as buffer system. The result showed that production with fructose as carbon source can form solid GlcN with yield of GlcN was 544.79 mg/g carbon. The yield was much higher than production by fermentation (220 mg/g carbon). However, further study on purification process of GlcN is required.

Keywords: Glucosamine, non-enzymatic, fructose, ammonium.

PENDAHULUAN

Osteoarthritis (OA, penyakit sendi degeneratif) adalah sindrom klinis dimana inflamasi tingkat rendah dihasilkan dari nyeri pada sendi. OA dapat disebabkan oleh beberapa hal, seperti (i) abnormalitas tulang rawan yang berfungsi sebagai bantalan dalam sendi dan (ii) kerusakan atau penurunan cairan

sinovial yang melumasi sendi tersebut (Conaghan, 2008). Ada sejumlah pilihan pengobatan yang tersedia untuk penderita OA, mulai dari perubahan gaya hidup yang sederhana sampai dengan penggunaan obat-obatan (obat anti-inflamatori) atau produk *nutraceuticals* lainnya (Ishiguro *et al.* 2002).

Glukosamin (GlcN; $C_6H_{13}NO_5$) dan N-asetil glukosamin (GlcNAc; $C_8H_{15}NO_6$) dapat disintesis dalam tubuh dari glukosa dan juga bertindak sebagai prekursor untuk biosintesis beberapa makromolekul, termasuk glikolipid, glikoprotein, glukosaminoglikan (mukopolisakarida) dan proteoglikan. Sebagai komponen dari makromolekul, GlcN memiliki peran dalam sintesis membran lapisan sel, kolagen, osteoid, dan tulang matriks. GlcN juga diperlukan untuk pembentukan cairan pelumas dan agen perlindungan. Karena konsentrasinya yang tinggi dalam sendi, hipotesis menyebutkan bahwa suplemen GlcN dapat membantu menurunkan gejala osteoarthritis (D'Ambrosio *et al.* 1981).

GlcN hidroklorida (GlcN-HCl) dan sulfat umumnya digunakan sebagai suplemen. Selanjutnya, pada tahun 2004 GlcN termasuk ke dalam GRAS melalui pengumuman GRN 000150: 21 CFR 170.3(n) (3), (7), (16), (31), (36). Dengan demikian, GlcN dapat digunakan bukan hanya sebagai suplemen tetapi juga sebagai ingredien dalam pembuatan berbagai jenis pangan seperti yang disebutkan di dalam 21 CFR 8 170.3-*Broad food categories* dan USDA's CSFII-*Food categories* (Mattia, 2004; Rogers, 2004).

Saat ini sebagian besar GlcN berasal dari hidrolisis dan deasetilasi eksoskeleton kerang, kepiting yang mengandung kitin dengan menggunakan asam klorida pekat (Mojarrad *et al.* 2007). Namun ada beberapa keterbatasan produksi GlcN menggunakan metode ini seperti: alergi, kontaminasi logam berat, waktu panen yang bersifat musiman maupun faktor sosial yang menggarisbawahi kontribusi terhadap penurunan sumberdaya laut dunia (Cao *et al.* 2008). Produksi lainnya dapat juga menggunakan mikroorganisme seperti *E. coli* (Deng *et al.* 2005) maupun kapang (Hsieh *et al.* 2007; Liao *et al.* 2008; Sitanggang *et al.* 2010). Akan tetapi produksi GlcN menggunakan mikroorganisme ini juga memiliki beberapa kelemahan, yaitu waktu fermentasi yang cukup lama

(umumnya lebih dari lima hari) serta purifikasinya yang cenderung terlalu lama (Sitanggang *et al.* 2011).

Penelitian ini bertujuan mencari alternatif pemecahan masalah terhadap produksi GlcN yang berasal dari laut maupun mikroorganisme melalui sintesis GlcN dari substrat yang sederhana (monosakarida dan senyawa amonium) dengan reaksi kimia. Beberapa hal yang ingin didapatkan pada penelitian ini adalah:

- a. Substrat spesifikitas, yaitu kecocokan jenis senyawa yang memiliki struktur monosakarida dan amonium yang dapat digunakan sebagai reaktan dalam memproduksi GlcN secara optimum dengan memperhatikan rasio molaritasnya.
- b. Kondisi optimum reaksi pembentukan GlcN dari reaktan (senyawa monosakarida dan amonium) yang meliputi suhu optimum reaksi (°C).

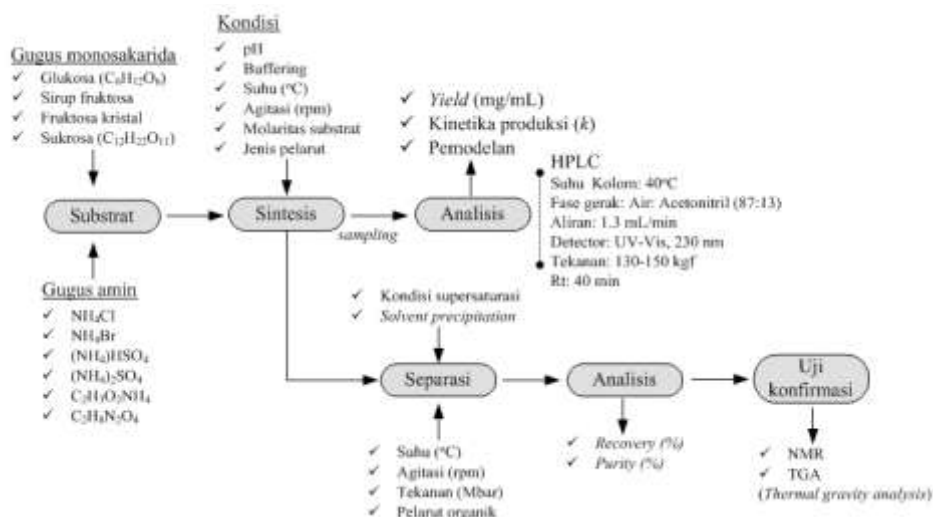
METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini GlcN disintesis melalui reaksi kimia non-enzimatis dengan molekul berstruktur monosakarida dan senyawa yang mengandung gugus amin sebagai substrat. Parameter proses sintesis berupa kecocokan substrat (*substrate fingerprint*), kondisi reaksi (suhu, agitasi) akan dikontrol. Larutan sistem berupa pelarut yang larut air (*water-miscible*) dengan nilai solubilitas GlcN lebih rendah di dalamnya digunakan dengan pertimbangan senyawa-senyawa substrat dapat larut dengan baik sehingga ketika proses pengadukan berlangsung, masing-masing reaktan akan terdistribusi secara sempurna sehingga kontak diantara reaktan memiliki peluang yang lebih besar. Selanjutnya, karakteristik larutan ini akan memudahkan proses separasi karena GlcN yang terbentuk diharapkan secepat mungkin mencapai titik metastabil-labil (kondisi supersaturasi), sehingga kristal GlcN dapat dipisahkan dengan mudah. Secara keseluruhan *roadmap* penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 1 di bawah ini.

Validasi Metode Analisis GlcN dan Kurva Standar

Glukosamin dianalisis dengan menggunakan HPLC dengan metode yang diadopsi dari Sitanggang *et al.* (2009a; 2010a). Sebanyak 0,1 mL sampel dan 0,1 mL internal standar berupa 0,1% (b/b) 3,5-dinitrobenzonitril di dalam

asetonitril diderivatisasi dengan menggunakan 0,3 mL 1-naftil isotiosianat di dalam piridin (40 mol/m^3) di dalam *constant bath shaker* selama 1 jam, 50°C , 100 rpm. Selanjutnya derivatif disaring menggunakan filter berukuran $0,45 \text{ }\mu\text{m}$. Sebanyak 0.1 mL sampel disuntikkan ke dalam kolom HPLC.



Gambar 1. Roadmap produksi GlcN melalui sintesis kimia.

Kolom HPLC yang digunakan adalah Eclipse XDB yang berukuran $5 \text{ }\mu\text{m}$, $4.6 \text{ mm i.d.} \times 150 \text{ mm}$. Detektor yang digunakan adalah UV-Vis detektor (Simadzu SPD-20A, Jepang) dan diatur pada panjang gelombang (λ) 230 nm. Tekanan diatur pada interval 130-150 kgf. Fase gerak yang digunakan adalah campuran antara acetonitril dan air dengan komposisi 87:13 dengan kecepatan aliran sebesar 1,3 mL/menit. Waktu analisis dilakukan selama 40 menit dengan kromatogram GlcN akan muncul pada menit ke-11 dan internal standar pada menit ke-29. Kondisi ini tidak berbeda jauh dengan kromatogram menggunakan metode Sitanggang *et al.* (2010) dimana puncak GlcN dan internal standar pada menit ke 10 dan ke 25. Untuk pembuatan kurva standar, larutan stok dibuat dengan konsentrasi 0,25% (b/b) dan rentang titik kurva standar berada diantara 0,05-0,25% (b/b).

Sintesis GlcN

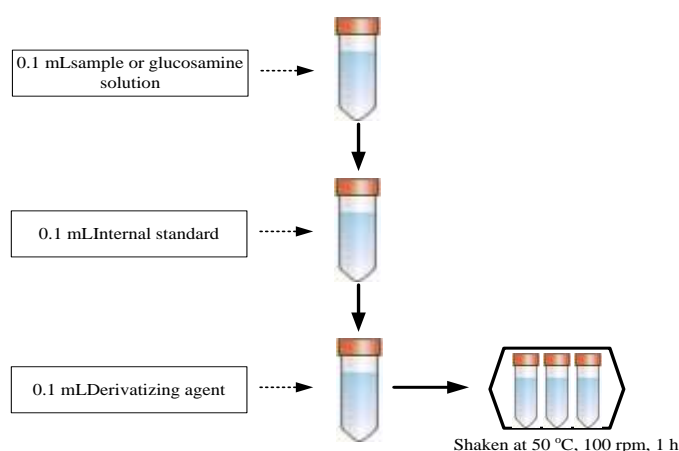
GlcN adalah molekul yang tersusun dari satu molekul yang bergugus glukosa dan satu molekul amin. Oleh karena itu sintesis GlcN non-enzimatis dapat dilakukan dengan menggunakan substrat seperti glukosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), sirup

fruktosa, fruktosa kristal, sukrosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$), serta molekul yang mengandung amin, seperti: NH_4Cl , NH_4Br , $(NH_4)HSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $C_2H_3O_2NH_4$, $C_2H_8N_2O_4$. Pada penelitian ini substrat yang digunakan adalah glukosa dan fruktosa kristal sebagai sumber karbon serta amonium klorida (NH_4Cl) dan amonium asetat ($C_2H_3O_2NH_4$) sebagai sumber amin. Pelarut yang digunakan adalah metanol pada berbagai konsentrasi dengan asam asetat sebagai buffer.

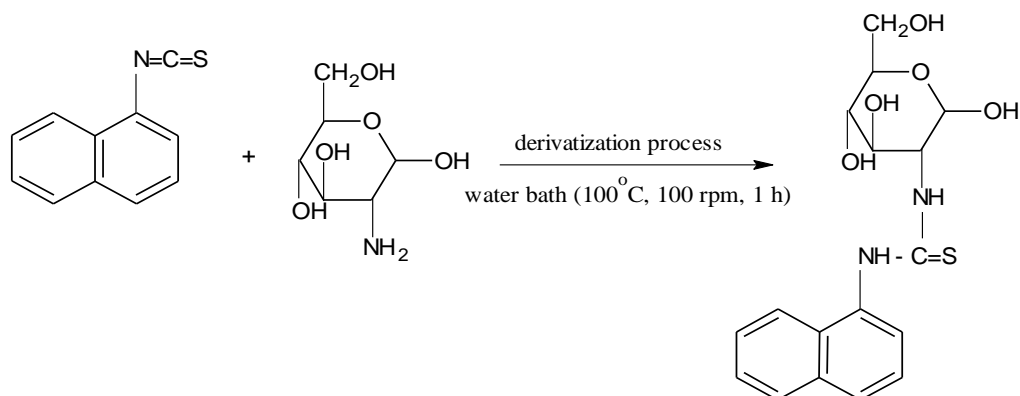
HASIL DAN PEMBAHASAN

Validasi Metode Pengukuran GlcN: Derivatisasi Proses

Glukosamin (GlcN), atau 2-amino-2-deoxy-D-Glukosa, tidak memiliki kromofor, karena strukturnya yang hanya terdiri atas ikatan karbon tunggal (*single bond*, -C-) (Hsieh *et al.* 2007). Oleh karena itu, untuk dapat menganalisisnya pada panjang gelombang (λ) visible (230 nm) maka GlcN harus direaksikan dengan suatu senyawa kimia kompleks yang memiliki ikatan ganda (*double bond*). Senyawa ini dapat disebut sebagai agen derivatisasi; dan senyawa kompleks GlcN dan agen derivatisasi akan dengan mudah menyerap cahaya pada panjang gelombang analisis (230 nm). Dalam hal ini, senyawa 1-Naphthylisothiocyanate dipilih berdasarkan studi literatur sebelumnya (Sitanggang, 2009; 2010). Prosedur derivatisasi dapat dilihat pada Gambar 2, sementara rekasi antara kedua senyawa (GlcN versus agen derivatisasi) tersebut dapat dilihat pada Gambar 3. Reaksi ini memerlukan panas, sehingga proses derivatisasi dilakukan dalam *water bath* dengan suhu $50^\circ C$, dengan kecepatan 100 rpm selama 1 jam.



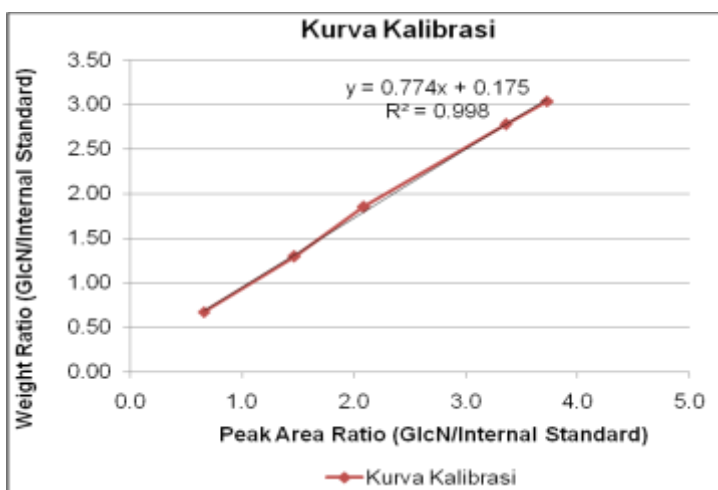
Gambar 2. Reaksi derivatisasi untuk analisis GlcN.



Gambar 3. Proses derivatisasi antara 1-naphthyl isothiocyanate dengan GlcN menghasilkan senyawa kompleks 1-naphthyl isothiocyanate-GlcN.

Selektivitas Metode

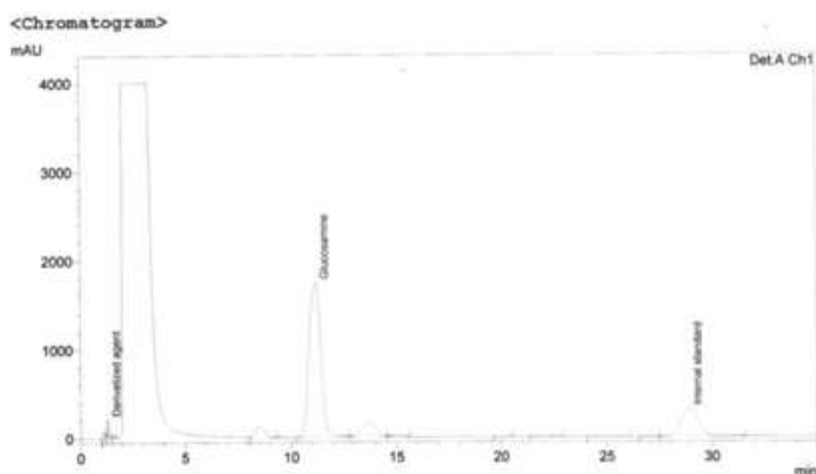
Hubungan yang linear antara persentasi rasio luas area antara GlcN dan internal standar pada berbagai konsentrasi GlcN (0.006-0.25% wt) dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Linearitas kurva GlcN.

Untuk melihat selektivitas dari metode, materi lain seperti GlcN, internal standar juga diderivatisasi menggunakan 1-naphthyl isothiocyanate. Dari hasil kromatogram HPLC didapatkan beberapa *noise* pada waktu retensi lima (5) menit pertama, akan tetapi setelah itu tidak didapatkan puncak-puncak lainnya selain dari puncak agen derivatisasi, GlcN dan internal standar. Lebih lanjut, pemisahan puncak GlcN dan internal standar terjadi dengan baik dan jelas, yaitu sekitar

11 menit dan 29 menit untuk puncak GlcN dan internal standar. Kromatogram hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 5 di bawah ini.



Gambar 5. Kromatogram dari agen derivatisasi, GlcN dan standar internal menggunakan analisis HPLC kolom Eclipse (4.6*150 mm) pada panjang 230 nm, 40 menit.

Validasi Metode Pengukuran GlcN: Akurasi dan Presisi Metode

Untuk analisis secara sederhana dari presisi dan akurasi metode, satu konsentrasi larutan GlcN standar dimana konsentrasinya berada pada rentang kurva linearitas dianalisis. Baik presisi dan akurasi dari metode menunjukkan nilai kesalahan relatif (*relative error*, RE) dan nilai relatif standar deviasi (*relative standard deviation*, RSD) di bawah dari 5%. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1 di bawah ini dan dibandingkan dengan literatur yang ada.

Tabel 1. Analisis presisi (% RSD) dan akurasi (% RE)

Nama larutan	Kon. (%wt)	Rataan (%wt)	RE (%)	RSD (%)	Pustaka
Larutan std	0,06	0,06	4.65	2,99	Studi ini
Larutan std	0.10	0.10	3.99	2.53	Sitanggang <i>et al.</i> 2009
Triple flex	0.08	0.08	3.07	1.25	Sitanggang <i>et al.</i> 2009

Dari tahapan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa metode analisis GlcN menggunakan HPLC pada panjang gelombang cahaya tampak (230 nm) dapat dilakukan dengan nilai presisi (% RSD) dan akurasi (% RE) di bawah 5%.

Sintesis Glukosamin (GlcN)

Sintesis GlcN dilakukan menggunakan rangkaian alat yang terdiri dari labu leher tiga yang ditempatkan di dalam penangas air dan dilengkapi dengan termometer, *magnetic stirrer*, dan kondensor (Gambar 6).



Gambar 6. Rangkaian alat sintesis GlcN.

Di dalam labu tersebut direaksikan sumber karbon dan sumber amonium untuk membentuk GlcN. Pengaduk *magnetic stirrer* berfungsi untuk melakukan pengadukan mekanis di dalam labu leher tiga. Pada penangas dan labu dipasang termometer untuk mengukur suhu masing-masing larutan. Penggunaan kondensor yang dipasang pada labu leher tiga diperlukan untuk mencegah larutan menguap selama pemanasan. Pada penelitian ini, *stirring hot plate* digunakan untuk memanaskan larutan.

Sebelum sintesis dilakukan kalibrasi suhu terlebih dahulu pada *stirring hot plate*. Alat *stirring hot plate* sebagai pemanas pada rangkaian alat sintesis GlcN tidak menunjukkan suhu larutan ketika dipanaskan. Oleh karena itu, kalibrasi suhu pada *stirring hot plate* perlu dilakukan untuk mengetahui suhu dan laju kenaikan suhu pada larutan GlcN dan penangas air selama pemanasan. Kalibrasi suhu dilakukan dengan memasang termometer pada penangas dan labu leher tiga untuk mengukur suhu masing-masing larutan. Pengukuran dilakukan setiap 5 menit sampai dengan menit ke-270 atau selama 4.5 jam pada setiap skala pemanasan pada tombol pengatur suhu yaitu dari skala 0.5 sampai dengan skala 4. Gambar 7 menunjukkan hasil pengukuran suhu larutan pada berbagai skala pemanasan.



Gambar 7. Suhu larutan pada berbagai skala suhu pemanasan.

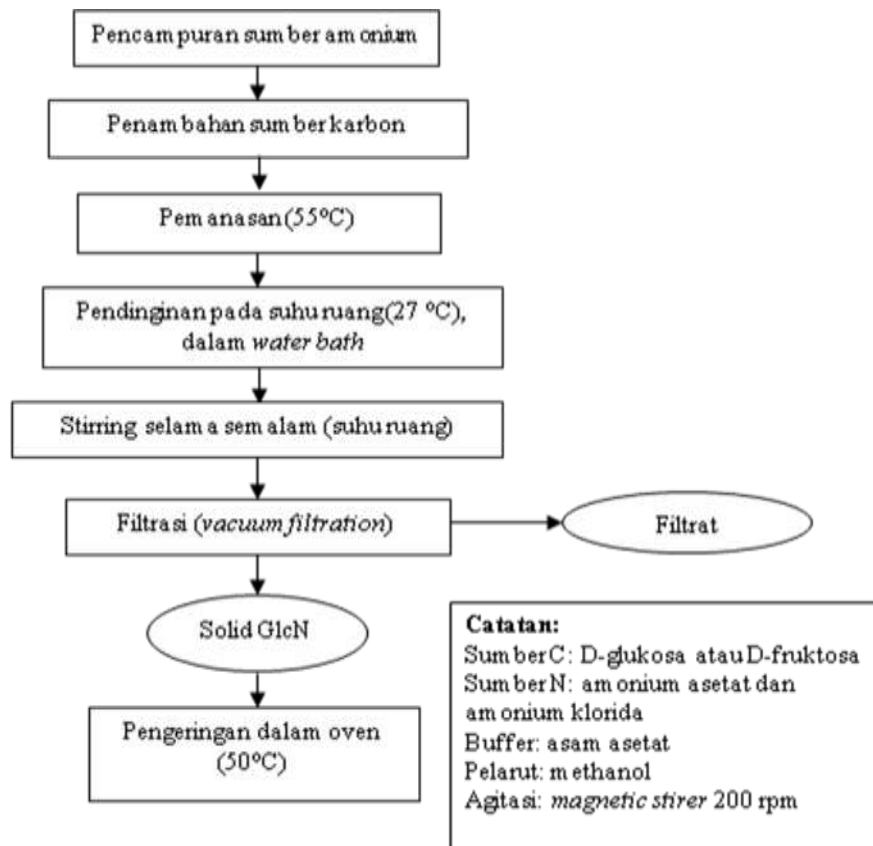
Dengan terkalibrasinya suhu pada labu leher tiga maka sintesis GlcN dapat dilakukan dengan menggunakan sistem ini.

Sintesis GlcN dilakukan mengadopsi metode Hubbs (2007) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan meliputi perlakuan 1) sumber karbon yang berbeda yaitu fruktosa dan glukosa, 2) konsentrasi metanol (50% dan 99.9%), dan 3) tanpa penambahan HCl agar diperoleh GlcN murni. Diagram alir metode sintesis GlcN dapat dilihat pada Gambar 8. Sintesis GlcN dilakukan dengan mereaksikan substrat gula (glukosa atau fruktosa kristal) sebagai sumber karbon dan campuran amonium asetat ($C_2H_3O_2NH_4$) dan amonium klorida (NH_4Cl) sebagai sumber amonium.

Tahap awal sintesis dilakukan dengan cara mencampurkan amonium klorida (7.29 g, 119 milimol), amonium asetat (9.27 g, 12 mmol), asam asetat (7.13, 119 mmol), dan metanol (100.66 g) di dalam labu leher tiga. Pengaduk magnetik digunakan untuk mengaduk campuran tersebut. Kemudian pada campuran tersebut ditambahkan sumber karbon (fruktosa atau glukosa murni) sebanyak 24.03 g (133 mmol) dan kemudian dipanaskan sampai dengan suhu 55°C dan suhu dipertahankan selama 5 jam.

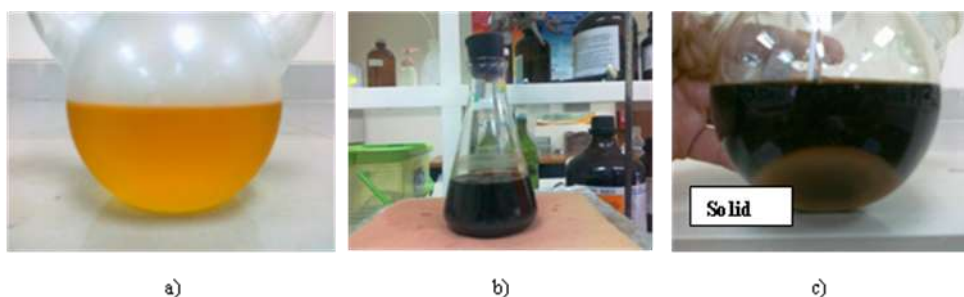
Setelah pemanasan selama 30 menit, pada campuran terbentuk padatan dengan jumlah yang terus bertambah selama waktu pemanasan. Kemudian campuran didinginkan dalam *water bath* dan selanjutnya diaduk selama semalam pada suhu ruang. Setelah pengadukan selesai, campuran disaring menggunakan pompa vakum untuk memperoleh padatan tersebut. Padatan tersebut kemudian

dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C sampai diperoleh bobot konstan. Mengacu pada Hubbs (2007) padatan yang dihasilkan tersebut merupakan glukosamin. Selanjutnya padatan tersebut dihaluskan sehingga diperoleh serbuk glukosamin berwarna putih kecoklatan.



Gambar 8. Prosedur sintesis GlcN.

Untuk menentukan kecocokan substrat dan pelarut dilakukan pengamatan secara visual, yaitu ada tidaknya terbentuk solid selama proses sintesis. Dari hasil pengamatan visual tersebut didapatkan bahwa sintesis GlcN dengan glukosa sebagai sumber karbon tidak membentuk solid baik dengan pelarut metanol 50% maupun 99.9%, sedangkan sintesis GlcN dengan fruktosa sebagai sumber karbon membentuk solid yang diduga memuat kristal GlcN (Gambar 9). Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa fruktosa dapat dijadikan sebagai substrat dalam sintesis GlcN secara kimiawi.



Gambar 9. Perbandingan hasil sintesis GlcN a) glukosa+metanol 50%, tidak membentuk GlcN, b) glukosa+metanol 99.9%, tidak membentuk GlcN; c) fruktosa+metanol 99.9%, membentuk solid GlcN.

Analisis dari solid yang terbentuk tersebut dipresentasikan serta dibandingkan dengan beberapa studi literatur yang ada dengan sistem yang berbeda dan dapat dilihat pada Tabel 2 di bawah ini.

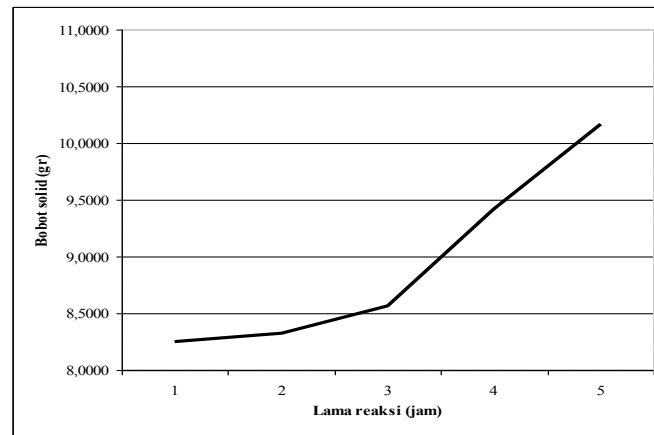
Tabel 2. Perbandingan produksi GlcN melalui proses fermentasi dan sintesis kimia.

Metode	Medium	Konsentrasi GlcN (g/L)	Konten (mg/bk sel)	GlcN yield (mg/g carbon)	Sumber
<i>R. oligosporus</i> NRRL 2710	SDB	-	0,11	-	Sparringa and Owens (1999)
<i>Aspergillus sp.</i>	WBS	-	24,10	-	Carter <i>et al.</i> (2004)
<i>M. pilosus</i>	RSA	0,26	-	13,20	Yu <i>et al.</i> (2005)
<i>M. pilosus</i> BCRC31527	RSA	0,72	40,40	35,90	Hsieh <i>et al.</i> (2007)
<i>R. oryzae</i> ATCC 20344	Limbah susu	-	160	-	Liao <i>et al.</i> 2008
<i>Aspergillus sp</i> BCRC 31742	WF	7,05	210	210	Sitanggang <i>et al.</i> 2010
<i>Aspergillus sp</i> BCRC 31742	WF-M	7,48	260	220	Sitanggang <i>et al.</i> 2010
Secara kimia	fruktosa dan amonium	-	-	544,79	Studi ini

Dari tabulasi di atas terlihat dengan jelas bahwa sintesis GlcN melalui reaksi kimia menghasilkan nilai *yield* yang lebih besar dibandingkan dengan proses fermentasi yang telah ada berdasarkan dari penggunaan karbon (nilai C).

Dari hasil analisis, GlcN kristal terinkorporasi di dalam solid yang terbentuk selama reaksi. Dengan demikian, kenaikan bobot dari solid yang terbentuk selama

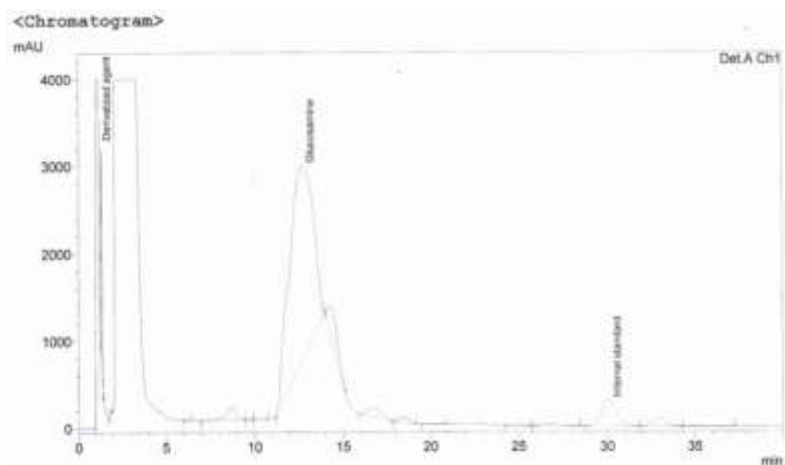
reaksi secara proporsional meningkatkan konsentrasi yang terbentuk. Kenaikan bobot solid dapat dilihat pada Gambar 10 di bawah ini.



Gambar 10. Kenaikan bobot solid yang mengandung kristal GlcN dalam selang waktu reaksi.

Kendala Proses Purifikasi Glukosamin (GlcN)

Seperti yang terlihat pada Gambar 10, seiring dengan berjalannya reaksi, terjadi kenaikan bobot solid yang mengandung kristal GlcN sepanjang reaksi sekitar 5 jam. Hal ini menunjukkan adanya indikasi kenaikan konsentrasi GlcN. Akan tetapi terdapat kendala di dalam proses purifikasi GlcN tersebut. Hal ini diindikasikan dengan adanya kesulitan selama menganalisis konsentrasi GlcN yang didapatkan karena proses pemisahan *peak* dengan kontaminan lainnya tidak dapat dilakukan dengan sempurna seperti yang ditunjukkan pada Gambar 11 berikut ini.



Gambar 11. Kromatogram analisis solid GlcN dan standar internal menggunakan analisis HPLC kolom Eclipse (4.6*150 mm) pada panjang 230 nm, 40 menit.

Untuk kelanjutan penelitian ini, proses separasi GlcN dari kontaminan solid lainnya merupakan sesuatu yang harus dapat dipecahkan. Pemisahan ini mungkin dapat dilakukan dengan cara pemansan atau destruksi menggunakan asam dengan molaritas tinggi.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan *yield* GlcN sebesar 544,79 mg/g karbon dengan sumber karbon berasal dari fruktosa dengan pelarut metanol 99.9% dan sumber amonium campuran dari amonium asetat dan amonium klorida di dalam buffer asam asetat. Sebagai penelitian awal hasil ini menunjukkan adanya peluang yang cukup besar untuk memproduksi (sintesis) GlcN menggunakan reaksi kimia sederhana dibandingkan dengan menggunakan metode ekstraksi asam/basa pada eksoskeleton atau cangkang dari binatang laut ataupun melalui proses fermentasi menggunakan mikroorganisme yang cenderung memakan waktu yang cukup lama (*time consuming*). Akan tetapi masih didapatkan beberapa kendala di dalam proses pemurnian GlcN yang dihasilkan dari padatan GlcN yang didapatkan selama reaksi berlangsung. Hal ini terlihat dengan jelas dari kromatogram analisis HPLC yang didapatkan, dimana *peak* GlcN berimpit dengan *peak* senyawa kontaminan lainnya yang terdapat pada padatan GlcN yang terbentuk selama proses sintesis. Kedepannya, masalah ini harus dipecahkan untuk menjadikan sintesis GlcN melalui reaksi kimia sederhana menjadi *feasible* dalam proses penggandaan skala (*scale up*).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada DIPA IPB yang telah mendanai penelitian melalui program Penelitian Unggulan Strategis Perguruan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

Alphen JV. 1929. Preparation of glucosamine hydrochloride. *Chem. Weekblad*, 26, 602.

- Badan Pusat Statistik (BPS). 2011. Penduduk 15 tahun keatas yang bekerja menurut lapangan pekerjaan utama 2004-2010. http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php?tabel=1&daftar=1&id_subyek=06¬ab=2 [Diakses 10 Maret 2011].
- Bao W, TP Binder, Hanke PD, Solheim L. 2006. Cell-free production of glucosamine. US Patent. No. 7,094,582 B2.
- Brooks PM. 1998. Rheumatology. Medical Journal of Australia (Practice Essentials) pp 8–45.
- Carter SB, Nokes SE and Crofcheck CL. 2004. The influence of environmental temperature and substrate initial moisture content on *Aspergillus niger* growth and phytase production in solid state cultivation, *Transaction-American Society of Agricultural Engineers*, 47(3), 945–949.
- Cao L, Jiang Y, Yu Y, Wei X, Li W. 2008. Methods for producing glucosamine from microbial biomass, US Patent 0188649 A1.
- Conaghan P. 2008. Osteoarthritis-National clinical guideline for care and management in adults. The National Collaborating Centre for Chronic Conditions, *Royal College of Physicians of London*. UK.
- D'Ambrosio E, Casa B, Bompani R, Scali B. 1981. Glucosamine sulfate: a controlled clinical investigation in arthrosis, *Pharmacotherapeutica*, 2, 504–508.
- Deng M, Severson KD, Grund DA, Wassink SL, Burlingame RP. 2005. From concept to process: metabolic engineering for production of glucosamine and *N*-Acetyl glucosamine, *Metab. Eng.*, 7, 201–214.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28 (3): 350–356.
- Heyns K, Koch CM, Koch W. 1954. The behaviour of d-glucosamine in aqueous solutions. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.*, 296(3–4):121–9.
- Haupt JB, Mc Millan R, Wein C and Paget-Dellio SD. 1999. Effect of Glucosamine hydrochloride in the treatment of pain of osteoarthritis of the knee, *Journal of Rheumatology*, 26, 2423–2430.
- Hsieh JW, Wu HS, Wei Y and Wang SS. 2007. Determination and kinetics of producing glucosamine using fungi, *Biotechnol. Prog.*, 23, 1009–1016.
- Hubbs JK. 2007. Preparation of glucosamine. United States Patent Application 20070088157.
- Institute of Medicine (IOM). 2003. Safety review: Draft 3 prototype monograph on glucosamine. Pp Washington, DC, National Academy of Sciences.

- Ishiguro N, Kojima T dan Poole AR. 2002. Mechanism of cartilage destruction in osteoarthritis, *Nagoya J. Med. Sci.*, 65, 73–84.
- Liao W, Liu Y, Frear C and Chen S. 2008. Co-production of fumaric acid and chitin from a nitrogen-rich lignocellulosic material-dairy manure using a pelletized filamentous fungus *Rhizopus oryzae* ATCC 20344, *Bioresour. Technol.*, 99, 5859–5866.
- Mattia A. 2004. Agency response letter GRAS Notice No. GRN 000150. CFSAN/Office of Food Additive Safety. <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucml53990.htm> [accessed 14 July 2010].
- Mojarrad JS , Nemati M, Valizadeh H, Ansarin M. 2007. Preparation of Glucosamine from exoskeleton of shrimp and predicting production yield by response surface methodology, *J. Agric. Food. Chem.*, 55, 2246–2250.
- Murray CJL, Lopez AD. 1997. Mortality by Cause for Eight Regions of the World. Global. Burden of Disease Study.
- Rogers BD. 2004. Notification of GRAS Determination for REGENASURE™ Glucosamine Hydrochloride. www.accessdata.fda.gov/scripts/cfn/gras_notices/400760A.PDF [accessed 14 July 2010].
- Shao Y, Alluri R, Mummert M. 2004. A stability-indicating HPLC method for the determination of glucosamine in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed* 35, 625.
- Sitanggang AB, Wu HS and Wang SS. 2009a. Determination of fungal glucosamine using HPLC with 1-naphthyl isothiocyanate derivatization and microwave heating. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, 14, 1–9.
- Sitanggang AB, Wu HS. 2009b. Developed strategy for production of fungal glucosamine using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *J. Biosci. Biotechnol.*, 108, S115.
- Sitanggang AB and Wu HS. 2009c. Developed strategy for production of fungal glucosamine using *Aspergillus* sp. BCRC 31742, Proceedings of 9th Conference on *Asia Pacific Biochemical Engineering*, Kobe, Japan, p115.
- Sitanggang AB and Wu HS. 2009d. Strategy for production of fungal glucosamine from *Aspergillus* sp. BCRC 31742, Proceedings of 14th Conference on *Biochemical Engineering Society of Taiwan*, Taiwan, p26.
- Sitanggang, AB. 2010. Optimization of Glucosamine Production Using *Aspergillus* sp. BCRC 31742 and Screening Zygomycotina Fungi as Potential Strain Cultivated in Submerged Fermentation. Thesis: Yuan Ze University, Taiwan.

- Sitanggang AB, Lin S, Wu HS and Wang SS. 2011. Review Paper: Aspects of glucosamine production using microorganisms, *Appl. Microbiol.*, Submitted.
- Sitanggang AB, Wu HS, Wang SS, and Ho YC. 2010. Effect of pellet size and stimulating factor on the glucosamine production using *Aspergillus* sp. BCRC 31742. *Bioresour. Technol.*, 101 (10): 3595–3601.
- Sparringa RA and Owens JD. 1999. Short communication: glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, *Int. J. Food Microbiol.*, 47, 153-157 (1999).
- Symmons D, Mathers C, Pflieger B. 2003. Global burden of osteoarthritis in the year 2000. Geneva: World Health Organization.
- Taha MI. 1961. The reaction of 2-amino-2-deoxy-D-glucose hydrochloride with aqueous ammonia, *J. Chem. Soc.*, 2468–2472.
- World Health Organization (WHO). 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva. WHO Report, Geneva.
- World Health Organization (WHO). 2004. WHO Scientific Group On the Assessment of Osteoporosis at Primary Healthcare Level. WHO Report, Belgium.
- Yu KW, Kim YS, Shin KS, Kim JM. 2005. Macrophage stimulating activity of exo-biopolymer from cultured rice bran with *Monascus pilosus*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 126, 35–48.
- Zamani A, Jeihanipour A, Edebo L, Niklasson C and Taherzadeh MJ. 2008. Determination of Glucosamine and N-Acetyl Glucosamine in fungal cell walls, *J. Agric. Food Chem.*, 56, 8314–8318.

**FORMULASI MINUMAN EMULSI MINYAK BEKATUL DENGAN
BERBAGAI FLAVOR DAN PENGARUH PENYIMPANAN TERHADAP
KARAKTERISTIK KIMIA DAN MIKROBIOLOGI**

(Formulation of Rice Bran Oil Emulsion Beverages with Various Flavors and the
Effect of Storage on Chemical Characteristics and Microbiology)

Evy Damayanthi, Cesilia Meti Dwiriani, Ilma Ovani

Dep. Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, IPB.

ABSTRAK

Bekatul padi merupakan limbah penggilingan padi dengan efek kesehatan yang besar namun mempunyai kelemahan dari aspek organoleptiknya. Teknologi yang sesuai untuk memformulasikannya menjadi minuman yang dapat diterima akan dapat mengoptimalkan pemanfaatan bahan limbah ini menjadi minuman fungsional. Penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan daya terima organoleptik minuman emulsi minyak bekatul sebagai alternatif minuman fungsional. Desain penelitian ini adalah *experimental study*. Minuman minyak bekatul terbaik dianalisis kandungan vitamin E (metode HPLC), orizanol (metode spektrofotometer) dan aktivitas antioksidan (metode DPPH). Hasil penelitian pada tahap *trial and error* jenis emulsifier di dalam formula minuman minyak bekatul, menunjukkan bahwa emulsifier *sugar ester* lebih baik dibandingkan gliserol mono stearat (GMS). Dari lima jenis flavor yang ditambahkan ke dalam minuman minyak bekatul, yang terbaik adalah minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor stroberi 0.5%. Produk terbaik ini mengandung 0.003% orizanol, 0.085 mg/100 ml vitamin E dan aktivitas antioksidan 37.09%. Penyimpanan produk pada suhu rendah selama 2 hari memperlihatkan adanya penurunan karakteristik kimia, sedangkan jumlah mikroba produk yang disimpan pada suhu rendah selama 8 hari fluktuasi. Namun demikian jumlah mikroba produk masih cukup rendah yaitu 11.3 koloni/mL atau 1.05 log₁₀ CFU/mL. Produk minuman minyak bekatul ini diharapkan dapat menjadi minuman fungsional yang dapat diterima untuk mencegah penyakit tidak menular.

Kata kunci: Minyak bekatul, minuman emulsi, uji organoleptik, antioksidan.

ABSTRACT

Rice bran is waste product of rice mill with huge health effect, but its have a weakness on organoleptic aspect. The appropriate techonology process for formulating into acceptance beverage product will optimize the use of this waste material to become funcional drink. This study aims to incerease organoleptic acceptance of rice bran oil-emulsion beverage as functional drink alternative. This research design is experimental laboratory. The best rice bran oil (RBO) beverage analyzed the content of vitamin E (HPLC method), oryzanol (spectrofotometer method) and antioxidant activity (DPPH method). The result of trial and error phase in rice bran beverage formulation showed that emulsifier sugar ester better than gliserol mono stearat (GMS). From five types of flavor added in RBO beverage, the best one is strawberry flavor 0.5%. This best product has 0.003% oryzanol, 0.085 mg/100 ml vitamin E dan antioxidant activity 37.09%. The storage in refrigerator temperature during 2 days showed decreasing of its chemical characteristic, meanwhile the product microbe total stored in refrigerator temperature during 8 days showed fluctuation, eventhough the total of microbe in product still low enough (11.3 colony/mL or 1.05 log₁₀ CFU/mL). Overall, this RBO beverage may become acceptable functional drink to prevent non-communicable diseases.

Keywords: Rice bran oil, emulsion beverage, organoleptic test, antioxidant.

PENDAHULUAN

Jumlah penderita obesitas di negara-negara berkembang cenderung meningkat, seiring dengan perubahan gaya hidup dan pola makan yang tinggi energi dan kurangnya aktivitas fisik. Di Indonesia masalah gizi saat ini sudah bergeser dari masalah gizi buruk dan kurang menjadi gizi lebih dan obes. Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Depkes, 2010), prevalensi obesitas nasional orang dewasa 21.7 persen dan prevalensi wanita lebih tinggi dibandingkan pria. Di Jawa Barat prevalensi obesitas masih di bawah angka nasional, yaitu 12.8 persen. Data Riskesdas juga menunjukkan prevalensi obes cenderung lebih tinggi pada orang dewasa dengan tingkat pendidikan yang lebih tinggi.

Obesitas dihubungkan dengan berbagai penyakit seperti resistensi insulin, hipertensi, diabetes melitus tipe 2 dan penyakit jantung. Dengan meningkatnya prevalensi obesitas, jumlah penderita penyakit-penyakit tersebut juga meningkat, bahkan menjadi penyebab kematian paling tinggi. Pada individu dengan obesitas, peningkatan asam lemak bebas intrasel yang terjadi akan meningkatkan *uncoupling* mitokondrial dan oksidasi β sehingga menyebabkan peningkatan spesies reaktif oksigen (*Reactive Oxygen Species, ROS*). Stres oksidatif ini akan menyebabkan disregulasi produksi adipositokin, yakni meningkatnya produksi molekul biologis tertentu dan penurunan produksi molekul yang lain, yang pada gilirannya akan mengakibatkan berkembangnya sindroma metabolik (Furukawa *et al.* 2004). Terapi yang ditujukan untuk menghambat proses oksidatif diduga dapat mencegah atau paling tidak memperlambat timbulnya dan atau berkembangnya komplikasi penyakit terkait obesitas.

Bekatul, khususnya fraksi minyaknya memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Bekatul padi merupakan limbah penggilingan padi yang meskipun memiliki efek kesehatan namun mempunyai kelemahan dari aspek organoleptiknya. Teknologi yang tepat untuk memformulasikannya menjadi minuman yang dapat diterima akan dapat mengoptimalkan pemanfaatan bahan limbah ini menjadi minuman fungsional.

Secara umum, penelitian ini bertujuan untuk meningkatkan daya terima organoleptik minuman emulsi minyak bekatul sebagai alternatif pangan fungsional tinggi antioksidan. Tujuan khususnya: 1) Mempelajari pembuatan minuman emulsi minyak bekatul; 2) Mempelajari sifat organoleptik minuman emulsi minyak bekatul dengan berbagai flavor; 3) Mempelajari sifat kimia (proksimat; vitamin E; oryzanol dan aktivitas antioksidan) minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor terpilih; dan 4) Mempelajari pengaruh penyimpanan terhadap sifat kimia dan mikrobiologi (TPC) minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor terpilih

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah *experimental study*. Lokasi penelitian dilakukan di empat laboratorium yang meliputi Laboratorium Percobaan Makanan, Laboratorium Analisis Zat Gizi, Laboratorium Organoleptik, dan Laboratorium Biokimia Gizi Departemen Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, Institut Pertanian Bogor, Laboratorium Saraswanti Indo Genetech dan Laboratorium KK Farmakokimia, ITB. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret sampai bulan November 2012.

Bahan-bahan yang digunakan dalam pengembangan produk minuman emulsi minyak bekatul adalah Rice Bran Oil (Oryza Grace™), 5 jenis flavor cair dari PT. Corindo Flavor, emulsifier sugar ester dan gliserol mono stearat (GMS), *carboxy methyl cellulose* (CMC), sorbitol, sukralosa, garam, serta air. Bahan kimia yang digunakan untuk analisis abilangan *Thiobarbituric Acid* (TBA), dan nilai Total Asam Titrasi (TAT) adalah metanol, aquades, aluminium foil, asam askorbat, HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N, indikator Phenolphthalein, TBA dan asam asetat.

Peralatan yang digunakan dalam pembuatan minuman emulsi adalah homogenizer, wadah plastik, timbangan, panci, termometer, dan kompor gas. Alat-alat untuk analisis selama penyimpanan adalah timbangan analitik, sudip, tabung reaksi, erlenmeyer, labu destilasi, gelas piala, alat titrasi, destilator, spektrofotometer, penangas air, pipet volumetrik 5 ml, pipet tetes, sentrifus, dan

vorteks. Analisis vitamin E menggunakan HPLC dan Orizanol menggunakan spektrofotometer.

Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, yaitu tahap penelitian pendahuluan dan lanjutan. Pada penelitian pendahuluan dilakukan formulasi dan pembuatan minuman emulsi minyak bekatul. Tahap kedua adalah mempelajari pengaruh penyimpanan terhadap formula terbaik selama penyimpanan.

Penelitian Pendahuluan

Formulasi dan pembuatan minuman emulsi minyak bekatul

***Trial and error* formulasi dan pembuatan**

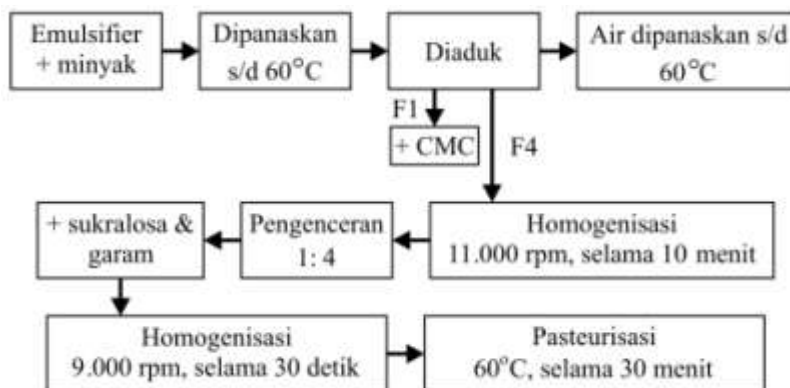
Penelitian pendahuluan mula-mula dilakukan dengan membuat minuman emulsi minyak bekatul sebanyak empat formula berbeda, yaitu F1, F2, F3, dan F4. F1 merupakan formula yang telah digunakan pada penelitian minuman emulsi minyak bekatul terdahulu (Rachman, 2012), sedangkan F2 adalah formula yang diadaptasi dari penelitian mengenai keju putih rendah lemak yang dilakukan oleh Syakdiyah (2011). F3 dan F4 dibuat berdasarkan kombinasi F1 dan F2.

Tabel 1. Formula minuman emulsi minyak bekatul

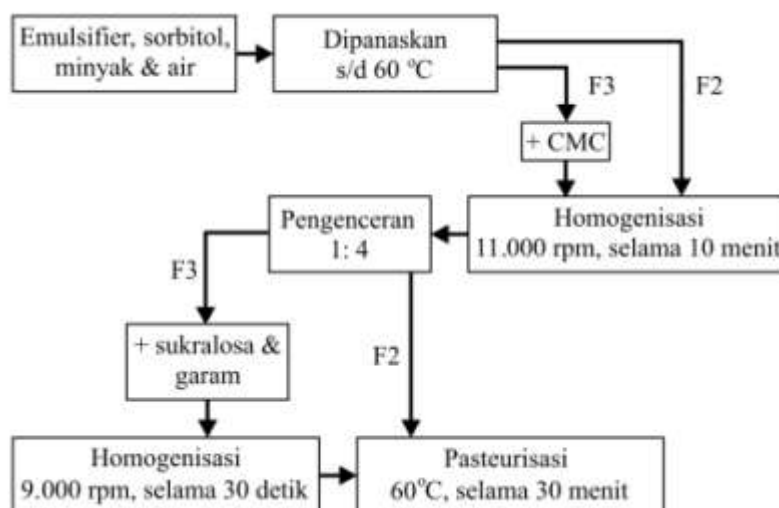
Bahan	F1	F2	F3	F4
Minyak bekatul	50 g	50 g	50 g	50 g
Air (biang)	140 ml	30 ml	80 ml	140 g
Air (pengenceran)	150 ml	200 ml	200 ml	200 ml
Sugar ester	1 g	-	1g	-
CMC	0,1 g	-	0,1 g	-
Sukralosa	0,03 g	-	0,03 g	0,03 g
Garam	0,1 g	-	0,1 g	0,1 g
GMS	-	10 g	-	10 g
Sorbitol	-	120 g	60 g	-
Perisa coklat	0,6 g	0,6 g	0,6 g	0,6 g

Proses pembuatan minuman emulsi minyak bekatul pada penelitian ini dilakukan sesuai Gambar 1 dan 2. Perisa coklat digunakan untuk memperkaya cita rasa dari produk, sebagai pengganti coklat bubuk yang digunakan oleh Rachman (2012). Garam digunakan untuk meminimalkan efek negatif pada rasa yang

ditimbulkan dari sukralosa. Emulsifier yang digunakan adalah sugar ester dan GMS.



Gambar 1. Proses pembuatan minuman emulsi minyak bekatul F1 dan F4.



Gambar 2. Proses pembuatan minuman emulsi minyak bekatul F2 dan F3.

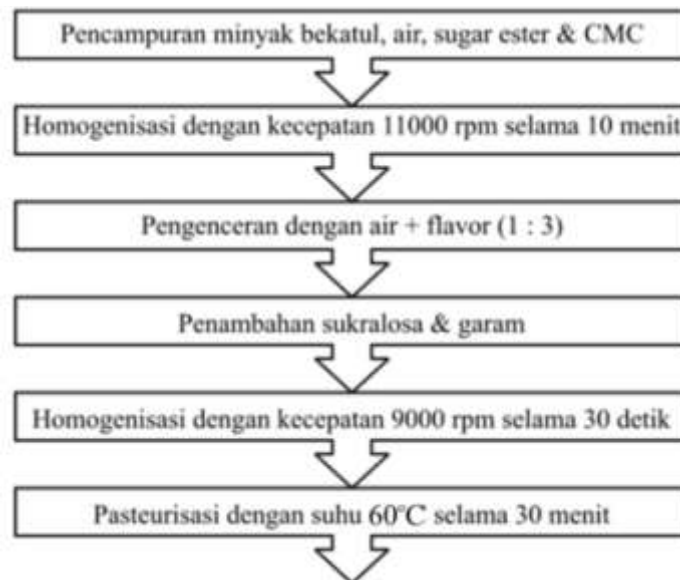
Formulasi dan pembuatan yang digunakan dalam pengembangan dengan flavor

Penelitian pada tahap ini menggunakan formula minuman emulsi minyak bekatul terpilih dari penelitian Rachman (2012) tanpa penambahan coklat bubuk. Perlakuan terdiri dari dua faktor, yakni jenis dan konsentrasi flavor. Digunakan 5 jenis flavor dengan konsentrasi masing-masing sebesar 0,1%, 0,3% dan 0,5%. Berdasarkan penjelasan pihak PT. Corindo Flavor, batas maksimal penggunaan flavornya adalah sebesar 0,5% dari jumlah total produk.

Tabel 2. Komposisi minuman emulsi minyak bekatul dengan berbagai flavor

No.	Bahan	Komposisi (%)		
		Flavor 0,1%	Flavor 0,3%	Flavor 0,5%
1	Minyak bekatul	6.25	6.25	6.25
2	Sugar ester	0.13	0.13	0.13
3	CMC	0.01	0.01	0.01
4	Sukralosa	0.02	0.02	0.02
5	Garam	0.05	0.05	0.05
6	Air	93.45	93.25	93.05
7	Flavor	0.10	0.30	0.50

Proses pembuatan minuman emulsi minyak bekatul dengan penambahan flavor ditunjukkan pada Gambar 3. Minuman emulsi minyak bekatul tersebut diperbanyak untuk keperluan uji organoleptik dan analisis selama penyimpanan.



Gambar 3. Proses pembuatan minuman minyak bekatul dengan flavor.

Uji Organoleptik

Uji organoleptik pada penelitian ini dilakukan untuk menentukan formula minuman emulsi minyak bekatul dengan konsentrasi flavor terbaik dari setiap jenis flavor. Uji organoleptik yang dilakukan terdiri dari uji hedonik dan mutu hedonik. Parameter yang digunakan adalah aroma dan rasa. Skor yang ditetapkan yaitu 1 hingga 5. Skor uji hedonik yaitu 1=sangat tidak suka, 2=tidak suka, 3=biasa, 4=suka, dan 5=sangat suka. Uji mutu hedonik parameter aroma yaitu

1=sangat harum, 2=harum, 3=biasa, 4=langka, dan 5=sangat langka, sedangkan pada parameter rasa yaitu 1=sangat manis, 2=manis, 3=biasa, 4=pahit, dan 5=sangat pahit.

Penelitian Lanjutan

Formulasi terpilih kemudian dilakukan pengamatan karakteristik kimia (analisis proksimat, kandungan vitamin E, oryzanol, dan aktivitas antioksidan) dan jumlah mikrobiologi melalui uji *total plate count* selama 8 hari penyimpanan.

Rancangan Percobaan dan Pengolahan Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu konsentrasi flavor dengan 3 taraf dan dua kali ulangan. Analisis dilakukan menggunakan uji sidik ragam (ANOVA) dan apabila berpengaruh secara nyata ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan.

Data hasil uji organoleptik dianalisis secara deskriptif berdasarkan persentasi penerimaan panelis dan skor modus dari masing-masing taraf perlakuan. Penerimaan panelis dihitung dengan menjumlahkan persentasi panelis yang menyatakan biasa (3), suka (4), dan sangat suka (5) terhadap minuman instan yang dihasilkan. Panelis dikategorikan dapat menerima minuman instan jika memiliki persentase penerimaan yaitu $> 70\%$. Data ini juga dianalisis dengan menggunakan uji Friedman. Jika hasil analisis memberikan pengaruh yang nyata antar taraf maka dilakukan uji lanjutan yaitu *Multiple Comparison Test* (O'Mahony, 1985). Rumus uji Friedman (Fr) adalah sebagai berikut:

$$Fr = [12 / (Nk(k+1)) \sum R_j^2] - [3N(k+1)]$$

Keterangan

N = banyaknya panelis

k = banyaknya perlakuan

R_j = rata-rata dari rangking skor perlakuan ke -j

j = banyaknya ulangan

$\sum R_j^2$ = jumlah kuadrat total perlakuan

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemanfaatan minyak bekatul dalam produk makanan adalah dengan menggunakan teknik emulsi. Emulsi merupakan suatu dispersi cairan dalam

cairan lain dimana molekul-molekul kedua cairan tersebut tidak saling berbaaur tetapi saling antagonistik (Charley, 1982). Jenis produk pada penelitian ini yang dikembangkan menggunakan teknik emulsi adalah berupa minuman emulsi.

Penentuan formula minuman emulsi minyak bekatul diperoleh melalui *trial and eror* berdasarkan kestabilan emulsi serta daya terima panelis terbatas. Pembuatan minuman emulsi dilakukan dengan mencampurkan *emulsifier sugar ester*, flavor, CMC, minyak bekatul, sukralosa, garam dan air menggunakan homogenizer selama 10 menit dengan kecepatan 11.000 rpm. Selanjutnya dispasteurisasi dengan suhu 60°C selama 30 menit. Minuman emulsi dibuat per takaran saji yaitu 200 ml.

CMC (*Carboxymethyl Celulose*) merupakan sebuah *gum* yang terlarut dalam eter selulosa yang dihasilkan dari reaksi natrium monokloro asetat dengan selulosa alkali untuk membentuk natrium karboksimetilselulosa. Karboksimetilselulosa berfungsi sebagai pengental, *stabilizer*, pengikat, pembentuk film, dan agen suspensi (Igoe, 2011).

Pemanis yang dipilih dalam produk ini adalah sukralosa, yaitu pemanis intensitas tinggi yang diproduksi melalui penggantian tiga kelompok hidroksil pada molekul sukrosa dengan tiga atom klor. Hasilnya adalah pemanis 0 kal yang tidak dapat dicerna serta memiliki kemanisan 650 kali dibandingkan gula. Pemilhan sukralosa dikarenakan cukup stabil pada suhu tinggi, mudah larut, dan tidak mengandung kalori sehingga produk ini aman dikonsumsi oleh penderita diabetes (Igoe, 2011).

Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian ini dilakukan menggunakan emulsifier sugar ester dan CMC serta emulsifier Gliserol mono stearat (GMS) untuk mendapatkan kemungkinan emulsifier yang lebih baik. Menurut Charley (1982), syarat *emulsifier* yang digunakan dalam bahan pangan yaitu memiliki gugus polar dan non-polar, dapat menurunkan tegangan permukaan salah satu cairan, dapat diabsorpsi oleh partikel fase terdispersi, secara kimia stabil dan tidak mudah berubah, memiliki flavor dan rasa yang menarik atau tidak berflavor sama sekali, dapat dimakan, dan tidak bersifat toksik. *Sugar ester* merupakan kompleks sukrosa asam lemak yang

memiliki kisaran HLB cukup lebar yaitu 1 hingga 16 (Riken, 2002), sedangkan GMS memiliki HLB 3,8. Sugar ester nampaknya memang merupakan emulsifier yang lebih sesuai karena memiliki nilai HLB dengan rentang yang lebar cocok untuk membuat emulsi *oil in water* (o/w) yaitu berada pada rentang 8-18.

Penentuan konsentrasi *emulsifier* yang tepat dilakukan melalui *trial and eror*. Penetapan konsentrasi *emulsifier* didasarkan pada SNI 01-0222-1995 mengenai jumlah maksimal dan jumlah minimal penggunaan bahan aditif dan *emulsifier* dalam bahan pangan.

Produk F1 memiliki aroma yang manis. Rasanya manis seperti susu coklat dan terdapat *after taste* yang sedikit agak pahit. Rasa pahit diduga berasal dari penggunaan sukralosa sebagai pemanis buatan yang tidak mengandung kalori. Setelah didiamkan selama 30 menit, warna minuman F1 terpisah, yaitu putih di bagian atas dan bening kecoklatan di bagian bawah. Proses pembuatan F4 hanya sampai pada homogenisasi pertama karena larutan yang dihasilkan sangat kental dan cepat membeku sehingga tidak dapat diencerkan. Hal ini diduga bahwa penggunaan GMS sebagai emulsifier pada penelitian ini perlu disertai dengan sorbitol agar larutan yang dihasilkan tidak terlalu cepat membeku.

Formula F2 dan F3 dibuat dengan proses yang agak berbeda pada pemanasan awal. Proses pembuatan F2 dan F3 dapat dilihat pada Gambar 2. F2 tidak menggunakan CMC sebagai pengental karena sudah kental tanpa ditambahkan bahan tersebut. Hal ini dikarenakan pada F2 tidak ditambahkan sukralosa dan garam, maka langsung dipasteurisasi setelah diencerkan. Produk F2 yang dihasilkan rasanya hambar dan memiliki aroma yang manis. Warnanya lebih putih bila dibandingkan dengan produk F1.

Formula F2 sudah menggunakan sorbitol sebagai pemanis, namun dirasakan rasa yang dihasilkan hambar. Oleh karena itu, pada formula F3 penggunaan sorbitol dikurangi, yaitu sebanyak setengah dari jumlah yang digunakan pada formula F2, namun kemudian ditambahkan sukralosa dan garam agar rasanya manis. Produk F3 memiliki rasa yang manis dan warnanya putih seperti produk F1, serta memiliki aroma yang manis seperti produk F2. Oleh karena itu dalam penelitian ini ditetapkan bahwa penggunaan emulsifier GMS tidak memberikan

hasil yang baik, dan sugar ester tetap merupakan emulsifier yang sampai saat ini masih merupakan emulsifier yang tepat untuk minuman minyak bekatul.

Formulasi minuman emulsi minyak bekatul untuk penelitian lanjutan

Penelitian pada tahap ini menggunakan formula minuman emulsi minyak bekatul Rachman (2012) tanpa penambahan cokelat bubuk. Hal ini dilakukan untuk menambah *varian* produk. Pengenceran yang dilakukan pada penelitian ini mencoba menggunakan perbandingan 1 :3.

Pembentukan emulsi yang dihasilkan dari biang sudah baik. Namun setelah dipanaskan (pasteurisasi), emulsinya mulai pecah. Globula-globula minyak mulai terpisah dan muncul di permukaan. Hal ini terjadi diduga karena ada tahap pengenceran yang mengakibatkan kadar air pada minuman menjadi lebih besar, sedangkan emulsi tidak dapat terbentuk dengan baik pada kondisi tersebut. Untuk itu, minuman dihomogenisasi kembali dalam keadaan masih panas dengan kecepatan 9.000 rpm selama kurang lebih lima menit, baru kemudian minuman dikemas. Kestabilan emulsi yang kurang baik menjadikan emulsi mengalami pemisahan kurang dari satu jam setelah dikemas. Proses pemisahan tersebut yaitu *creaming*, seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Oleh karena itu, minuman ini perlu dikocok terlebih dahulu sebelum diminum.



Gambar 4. Penampakan hasil *creaming* dari minuman emulsi minyak bekatul-flavor.

Organoleptik Minuman Emulsi Minyak Bekatul berbagai macam flavor

Untuk menentukan penerimaan panelis terhadap minuman emulsi minyak bekatul dengan penambahan berbagai macam flavor maka dilakukan uji organoleptik yang meliputi uji mutu hedonik dan uji hedonik (kesukaan). Uji organoleptik merupakan uji dengan indera yang banyak digunakan untuk menilai

mutu suatu produk. Uji organoleptik merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui tingkat kesukaan atau ketidaksukaan panelis terhadap suatu produk.

a. Uji Hedonik

Hasil uji hedonik menunjukkan aroma yang paling disukai adalah perlakuan flavor stroberi 0.5% dengan skor 3.93; rasa yang paling disukai adalah perlakuan sirsak 0.5% dengan skor 3.60; kekentalan yang paling disukai adalah perlakuan coklat 0.1% dengan skor 3.37 (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil uji hedonik minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor

Jenis flavor	Konsentrasi flavor (%)	Uji hedonik		
		Aroma	Rasa	Kekentalan
Vanila	0.1	3.57	3.43	3.23
	0.3	3.40	3.37	3.17
	0.5	3.43	3.20	3.20
Coklat	0.1	3.37	3.27	3.13
	0.3	3.43	2.73	3.37
	0.5	3.40	3.10	3.33
Stroberi	0.1	3.57	3.47	3.30
	0.3	3.57	3.47	3.27
	0.5	3.93	3.50	2.87
Sirsak	0.1	3.00	2.93	3.17
	0.3	3.43	3.40	3.17
	0.5	3.70	3.60	3.30
Teh hijau	0.1	2.53	2.50	3.20
	0.3	2.87	2.23	3.10
	0.5	2.50	2.13	3.03

b. Uji Mutu Hedonik

Hasil uji mutu hedonik menunjukkan bahwa perlakuan stroberi 0.5% adalah yang paling harum dengan skor sebesar 1.63; perlakuan sirsak 0.5% adalah yang paling manis dengan skor sebesar 1.80; dan yang paling kental adalah coklat 0.5% dan teh hijau 0.5% dengan skor yang sama yaitu 2.97 (Tabel 4).

Formula terbaik yang diperoleh adalah minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor stroberi 0,5% yang selanjutnya diamati pengaruh penyimpanannya terhadap karakteristik kimia. Formula ini melengkapi alternatif produk minuman emulsi minyak bekatul yang sudah dikembangkan sebelumnya dengan menggunakan bubuk coklat (Rachman, 2012). Pengembangan formula

menggunakan perisa non kalori diperlukan untuk memberikan pilihan yang lebih beragam kepada konsumen sehingga pemanfaatan minuman emulsi minyak bekatul ini semakin optimal.

Tabel 4. Hasil uji mutu hedonik minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor

Jenis flavor	Konsentrasi flavor (%)	Uji mutu hedonik		
		Aroma	Rasa	Kekentalan
Vanila	0.1	2.30	1.87	3.30
	0.3	2.10	2.03	3.27
	0.5	2.17	1.97	3.53
Coklat	0.1	2.37	2.17	3.00
	0.3	2.67	2.40	3.00
	0.5	2.20	2.03	2.97
Stroberi	0.1	2.27	2.10	3.07
	0.3	1.93	2.00	3.17
	0.5	1.63	1.87	3.67
Sirsak	0.1	2.97	2.17	3.03
	0.3	2.23	2.03	3.10
	0.5	2.00	1.80	3.00
Teh hijau	0.1	3.13	2.63	3.30
	0.3	3.33	2.57	3.03
	0.5	3.30	2.90	2.97

Karakteristik Kimia Minuman Emulsi Minyak Bekatul

Analisis Proksimat

Karakteristik kimia analisis proksimat minuman emulsi minyak bekatul untuk kadar air 93.9%, kadar karbohidrat 3.02% (b.b), kadar protein 0% (b.b) kadar lemak 3.03% (b.b), dan kadar abu 0.05% (b.b) (Tabel 5).

Produk minuman emulsi minyak bekatul merupakan minuman siap minum (*ready to drink*) sehingga mengandung banyak air (93.9%). Kadar air yang tinggi dapat mengakibatkan produk mengalami kerusakan dengan cepat karena dapat digunakan oleh mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Dalam penelitian ini dilakukan pasteurisasi untuk meminimalisir kerusakan tersebut. Kandungan karbohidrat diduga berasal dari emulsifier yang digunakan.

Tabel 5. Hasil Analisis proksimat minuman emulsi minyak bekatul

Kandungan Zat Gizi	Persentase (%)
Air	93.90
Karbohidrat	3.02
Protein	0 (ttd)
Lemak	3.03
Abu	0.05

Kandungan protein sebesar 0% dikarenakan bahan penyusun minuman emulsi minyak bekatul ini tidak mempunyai kandungan protein. Kandungan lemak (3.03%) berasal dari minyak bekatul yang ditambahkan. Minyak bekatul mengandung komponen bioaktif yaitu orizanol yang bersifat sebagai antioksidan yang tinggi (Damayanthi *et al.* 2004; Damayanthi *et al.* 2010). Most *et al.* (2005) menyatakan bahwa bahwa ternyata bagian minyak bekatul yang dapat menurunkan kolesterol darah manusia dan bukan karena adanya serat bekatul. Pada studi tersebut dilakukan pemberian minyak bekatul dan kontrol berupa minyak yang diformulasikan sedemikian rupa sehingga profil asam lemak baik jumlah maupun jenisnya menyerupai asam lemak minyak bekatul. Namun perbedaannya adalah adanya komponen orizanol yang khas terdapat pada minyak bekatul. Penurunan kolesterol serum manusia tersebut ternyata bukan merupakan akibat profil asam lemak dari minyak bekatul namun akibat adanya kandungan orizanolnya.

Kadar abu 0.05% menunjukkan bahwa pada minuman emulsi minyak bekatul terdapat kandungan mineral. Kandungan abu mengandung mineral-mineral yang dibutuhkan tubuh bagi kesehatan.

Kadar Vitamin E, Oryzanol dan Aktivitas Antioksidan minuman emulsi minyak bekatul dengan flavor stroberi

Hasil analisa vitamin E, kandungan Orizanol dan aktivitas antioksidan minuman emulsi bekatul dengan flavor stroberi 0.5% disajikan pada Tabel 6. Hasil tersebut menunjukkan bahwa minuman ini berpotensi sebagai minuman fungsional dan untuk itu perlu dikaji khasiat minuman ini pada manusia dalam mencegah penyakit tidak menular misalnya penyakit terkait obesitas seperti hiperlipidemia, diabetes dan kanker. Aktivitas antioksidan pada minyak bekatul

Tabel 6. Kandungan vitamin E, Oryzanol dan aktivitas antioksidan minuman emulsi minyak bekatul

	Kadar
Vitamin E	0.085 mg/100 ml
Oryzanol	0.003%
Aktivitas antioksidan	37.09%.

Karakteristik kimia minuman emulsi minyak bekatul selama penyimpanan

Karakteristik kimia yang diukur pada minuman emulsi minyak bekatul yaitu nilai pH, nilai TAT dan bilangan TBA. Selama penyimpanan 2 hari minuman emulsi minyak bekatul sudah terlihat penurunan mutu (Tabel 7).

Tabel 7. Karakteristik kimia minuman emulsi minyak bekatul selama penyimpanan

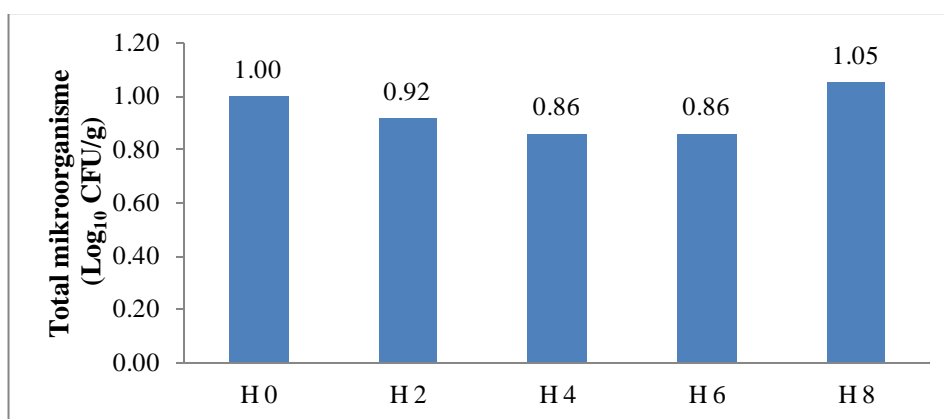
Sifat Fisik dan Kimiawi	Hari ke-0	Hari ke-2
Nilai pH	6.6±0.09	6.4±0.05
Nilai TAT (ml NaOH 0.1 N/100 g sampel)	$3.45 \times 10^{-3} \pm 1,37 \times 10^{-5}$	$3.49 \times 10^{-3} \pm 1,02 \times 10^{-5}$
Bilangan TBA (mg MA eq/Kg sampel)	Tidak terdeteksi	0.355±0.073

Nilai pH merupakan parameter yang sangat penting untuk diketahui di dalam pengolahan pangan maupun pengawetan bahan pangan. Selama penyimpanan Nilai pH sudah mengalami penurunan. Nilai TAT berbanding terbalik dengan nilai pH, semakin rendah nilai pH maka semakin tinggi nilai TAT dan sebaliknya. Oleh karena itu nilai pH cenderung turun, sebaliknya nilai TAT cenderung naik. Asam yang terbentuk selama penyimpanan akan menurunkan nilai pH minuman emulsi minyak bekatul.

TBA merupakan salah satu tes yang paling banyak digunakan untuk menguji adanya oksidasi lemak. Hasil oksidasi asam lemak tidak jenuh akan membentuk warna jika bereaksi dengan pereaksi TBA. Warna yang terbentuk ini merupakan hasil kondensasi dua molekul TBA dengan satu molekul malonaldehida (Nawar, 1996). Selama penyimpanan terjadi peningkatan nilai TBA yang berarti terjadi pula peningkatan laju reaksi oksidasi. Peningkatan ini diduga karena pada produk sudah terbentuk malondialdehyde.

Uji Mikroorganisme Minuman Emulsi Minyak Bekatul (TPC)

TPC menunjukkan populasi seluruh mikroorganisme yang terdapat dalam produk bahan pangan tanpa menunjukkan jenis mikroorganisme tertentu, sehingga dapat digunakan sebagai gambaran umum mikroorganisme dalam suatu bahan pangan. Total bakteri (TPC) pada produk minuman emulsi minyak bekatul flavor terpilih selama masa penyimpanan 8 hari pada suhu refrigerator disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Perubahan jumlah mikroorganisme pada minuman emulsi minyak bekatul.

Total bakteri minuman emulsi minyak bekatul setelah 8 hari penyimpanan pada suhu refrigerator sebesar 11.3 koloni/mL atau 1.05 log₁₀ CFU/mL, jumlah ini masih dibawah penelitian Faigayanti (2012) yaitu sebesar 3.6x10² koloni/mL. Hal ini diduga karena pada penelitian Faigayanti (2012) ditambahkan bahan baku bubuk coklat sebagai flavor sehingga menjadi salah satu sumber zat gizi bagi pertumbuhan mikroba. Namun, minuman emulsi minyak bekatul setelah penyimpanan 8 hari pada suhu refrigerator masih dikatakan aman untuk dikonsumsi karena menurut standar SNI 7388 tahun 2009 tentang batas maksimum cemaran mikroba pada makanan dan minuman pasteurisasi dalam kemasan yaitu 1x10⁴ kol/ml.

KESIMPULAN

Formula terbaik dari uji hedonik dan mutu hedonik yang diperoleh untuk minuman minyak bekatul adalah produk dengan flavor stroberi 0,5% yang mengandung 0,003% orizanol, 0,085 mg/100 ml vitamin E dan aktivitas

antioksidan 37,09%. Setelah dilakukan penyimpanan selama 2 hari sudah terlihat terjadinya penurunan karakteristik kimianya. Selain itu, terjadi fluktuasi jumlah mikroba selama penyimpanan 8 hari namun demikian jumlah mikroba produk masih cukup rendah yaitu 11,3 koloni/mL atau 1,05 log₁₀ CFU/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Charley H. 1982. Food Science. New York: Ronald Press.
- Damayanthi E, Muchtadi D, Syarief H, Wijaya CH dan Damardjati DS. 2004. Aktivitas antioksidan minyak bekatul awet dan fraksinya secara *in vitro*. J. Teknologi dan Industri pangan. Vol. XV No. 1 Tahun 2004. ISSN 0216-2318.
- Damayanthi E, Kustiyah L, Khalid M dan Farizal H. 2010. Aktivitas antioksidan bekatul lebih tinggi daripada jus tomat dan penurunan aktivitas antioksidan serum setelah intervensi minuman kaya antioksidan. Jurnal Gizi dan Pangan, 5(3):205-210.
- Faigayanti A. 2012. Angka Lempeng Total Minuman Emulsi Minyak Bekatul-Cokelat dan Pengaruh Intervensinya terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Plasma Mahasiswa Obes. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Ekologi Manusia. Institut Pertanian Bogor.
- Furukawa *et al.* 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. J. Clin. Invest 114:1752-1761.
- Igoe RS. 2011. Dictionary of Food Ingredients. Ed ke-5. San Diego: Springer.
- Kementerian Kesehatan. 2010. Riset Kesehatan Dasar Tahun 2010. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Most MM, Tulley R, Morales S, Lefevre M. 2005. Rice bran, not fiber, lowers cholesterol in humans. *Am J Clin Nutr* 81: 64-68.
- Nawar WW. 1996. Lipids. Di dalam: *Food Chemistry*. 3th ed. Fennema O R., editor. New York: Marcel Dekker Inc.
- Rachman PH. 2012. Pangan tinggi aktivitas antioksidan berbasis minyak bekatul padi berupa minuman emulsi coklat dan keju rendah lemak untuk pencegahan penyakit degeneratif [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Riken.2002. Emulsifiers. <http://www.rikenvitamin.jp/int/emulsifier/basic/property1.html> [18 Februari 2013].

- UNC. 2013. Emulsions. <http://pharmlabs.unc.edu/labs/emulsions/hlb.htm> [18 Februari 2013].
- SNI 7388-2009. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan. Badan standardisasi nasional.
- Syakdiyah C. 2011. Pengaruh penggunaan minyak nabati dalam emulsi W1/O/W2 terhadap karakteristik keju putih rendah lemak [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

REPLIKASI MODEL GEULIS (GERAKAN UNTUK LINGKUNGAN SEHAT) DALAM UPAYA MENINGKATKAN PERILAKU HIDUP SEHAT SISWA PONDOK PESANTREN DA'WATUL QURAN AL-ROZIE DAN DARUSSALAM DI BOGOR

(Geulis (Healthy Environment Movement) Model Reflication to Improve Healthy Behavior of Student at Da'watul Quran Al Rozie and Darussalam Islamic Boarding School, Bogor)

Ikeu Tanziha¹⁾, Clara M. Kusharto¹⁾, Hangesti Emi Widyasari²⁾

¹⁾Dep. Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, IPB.

²⁾Dep. Pemanfaatan Sumberdaya Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB.

ABSTRAK

Tujuan kegiatan adalah mengaplikasikan model GEuLIS (Gerakan untuk Lingkungan Sehat) untuk meningkatkan perilaku hidup sehat di Pondok Pesantren Da'watul Quran Al-Rozie dan Darussalam. Kegiatan ini merupakan kegiatan kaji tindak pada bulan Juli-November 2012, dengan menganalisis perubahan pengetahuan, sikap dan perilaku setelah diberi penyuluhan. Data yang dikumpulkan berupa karakteristik anak (umur, jenis kelamin, status gizi), pengetahuan, sikap dan perilaku gizi, keamanan pangan jajanan dan kesehatan lingkungan. Data dianalisis dengan menggunakan uji t. Hasil studi menunjukkan bahwa sebelum intervensi, lingkungan disekitar pesantren beresiko terhadap kejadian demam berdarah yaitu dengan banyaknya jentik nyamuk *Aedes aegypti*. Disamping itu pengetahuan, sikap dan perilaku gizi, keamanan pangan jajanan dan kesehatan lingkungan sebanyak 41,5% dalam kategori kurang dan sedang. Setelah intervensi, terjadi perubahan signifikan pada pengetahuan, sikap dan praktik siswa. Proporsi siswa dengan Pengetahuan kesehatan lingkungan dalam kategori baik meningkat dari signifikan dari 58,7% siswa dalam kategori baik menjadi 85,2%. Proporsi siswa dengan sikap baik meningkat signifikan dari 87,0% menjadi 100%. Demikian pula telah terjadi perubahan perilaku menjadi lebih baik dari 50,0% siswa dengan perilaku baik, meningkat signifikan menjadi 96,3%.

Kata kunci: Geulis, lingkungansehat, siswa, pesantren.

ABSTRACT

The objective of this activity was to apply healthy environment movement model to improve healthy behavior at Islamic Boarding School Da'watul Quran Al-Rozie and Darussalam. This activity was an action research conducted on July-November 2012. Data collected were student characteristic, knowledge, attitude and practice on healthy environment, food safety and nutrition. The data was analyzed by paired t-test. Result showed that before intervention the environment around the islamic boarding school had high risk of dengue hemorrhagic fever due to high number of mosquito larva. Besides, 41.5% of subjects had low and middle knowledge, attitude and practice on nutrition, food safety and healthy environment. After intervention, there was significant change in students' knowledge, attitude and practice. Proportion of subjects who had good knowledge on healthy environment increase significantly from 58.7% to 85.2%. Proportion of students who had good attitude increase significantly from 87.0% to 100%. It also happened to students' practice which increase significantly from 50.0% to 96.3% in good practice category.

Keywords: Geulis, healthy environment, student, islamic boarding school.

PENDAHULUAN

Saat ini terdapat 2 persoalan besar di bidang kesehatan selain upaya pelayanan kesehatan dasar. Persoalan pertama yaitu aspek perilaku ditandai dengan masih rendahnya kesadaran masyarakat dan peran sertanya dalam pembangunan kesehatan, hal ini ditunjukkan dengan lambatnya kemajuan peningkatan Perilaku Hidup Bersih dan Sehat (PHBS) baik di tatanan rumah tangga, tatanan pendidikan, tatanan tempat kerja, tatanan tempat umum maupun tatanan institusi kesehatan. Persoalan yang kedua yaitu aspek lingkungan yang ditandai dengan besarnya dampak perubahan iklim terhadap ekosistem kehidupan sehingga mengundang sejumlah penyakit yang semula sudah dapat diturunkan menjadi berkembang kembali (*reemerging diseases*) seperti malaria, demam berdarah dengue, diare dan ISPA.

Data di Indonesia menunjukkan bahwa angka kejadian DBD di Indonesia mencapai lebih dari 50 kasus per 100.000 penduduk dengan angka kematian sekitar 1-2 persen. Selain itu data hasil Riset Kesehatan Dasar tahun 2010 menyebutkan prevalensi penyakit demam berdarah dengue mencapai 0,6% (Depkes, 2010).

Di Kota Bogor terhitung sampai bulan Oktober 2010 penderita Demam Berdarah Dengue (DBD) telah mencapai 1.429 penderita (Pemda Kota Bogor, 2010). Kota Bogor masih dinyatakan sebagai endemis demam berdarah dengue (DBD), dan menjadi satu dari 10 kota di Jawa Barat dengan jumlah penderita terbanyak. Data Dinas Kesehatan (Dinkes) Bogor menunjukkan penderita DBD bermunculan hampir setiap bulan, dan diantaranya terjadi di pondok pesantren. Kurang terjaganya kebersihan lingkungan di pesantren menjadi salah satu penyebabnya. Selain itu, padatnya populasi santri di sejumlah pesantren menjadikan penyebaran demam berdarah semakin cepat, satu nyamuk bisa menularkan DBD kepada dua hingga tiga santri (Widianto, 2009). Oleh karena itu perlu suatu upaya di pesantren untuk meningkatkan perilaku hidup sehat dari siswanya serta membangun lingkungan sehat yang mendukung terhadap pembangunan derajat kesehatan santrinya.

Tujuan kegiatan adalah mengaplikasikan model GEuLIS (Gerakan untuk Lingkungan Sehat) dalam upaya membangun lingkungan pesantren sehat serta meningkatkan perilaku hidup sehat dari siswa di Pondok Pesantren Da'watul Quran Al-Rozie dan Darussalam.

METODE PENELITIAN

Desain penelitian ini adalah *experimental study*, dimana penelitian dilakukan untuk melihat pengaruh intervensi terhadap perubahan pengetahuan, sikap dan perilaku gizi, keamanan pangan, sanitasi lingkungan dan penyakit yang berhubungan dengan lingkungan. Tahapan pelaksanaan penelitian ini meliputi: 1) persiapan (perumusan instrumen, protokol lapangan, koordinasi dan konsolidasi tim peneliti, pengurusan izin dan sosialisasi), 2) pelaksanaan (pengumpulan data awal, penentuan intervensi yang dibutuhkan, perumusan bahan-materi intervensi, pelaksanaan intervensi, pengumpulan data akhir), dan 3) analisis data, penulisan laporan, dan diseminasi hasil penelitian aksi.

Penelitian dilakukan di dua lokasi yaitu Pondok Pesantren Dawatul Quran Al-Rozie dan Pondok Pesantren Darussalam. Pondok Pesantren Dawatul Quran Al-Rozie terletak di Kelurahan Gunung Batu, Kecamatan Bogor Barat Kota Bogor sedangkan Pondok Pesantren Darussalam berlokasi di Desa Padasuka, Kecamatan Ciomas Kabupaten Bogor. Jarak kedua pesantren ke Perguruan tinggi sekitar 6,5 km dan 5 km, secara berurutan. Penelitian dilaksanakan selama 4 bulan mulai Bulan Juli sampai dengan Bulan November 2012.

Cara Pemilihan Contoh

Responden penelitian adalah siswa SMP dan SMA di Pondok Pesantren Dawatul Quran Al-Rozie dan Darussalam. Teknik penarikan contoh dari populasi dilakukan dengan cara *purposive* yaitu berdasarkan data siswa yang diberikan pihak pesantren, dengan kriteria inklusi adalah siswa yang aktif dalam kegiatan pesantren dan dianggap dapat menularkan ilmunya kepada siswa lainnya yang tidak menjadi peserta. Jumlah peserta dari Pesantren Dawatul Quran Al-Rozie sebanyak 29 siswa yang terdiri dari 20 siswa laki-laki dan 9 siswa perempuan. Sedangkan jumlah peserta dari Pesantren Darussalam sebanyak 25 siswa, yang

terdiri dari 14 siswa laki-laki dan 11 siswa perempuan. Sehingga total peserta pelatihan sebanyak 54 siswa.

Kegiatan Pelatihan, Materi dan Jenis Data yang Dikumpulkan

Kegiatan pelatihan dilaksanakan selama 2 bulan, yang dilakukan seminggu sekali sebanyak 8 kali pertemuan. Setiap pertemuan siswa dilatih memantau jentik dan cara-cara pengendaliannya, serta diberi materi terkait kesehatan lingkungan, gizi dan keamanan pangan, khususnya pangan jajanan. Data yang dikumpulkan berupa data primer dan sekunder. Data primer berupa karakteristik anak (umur, jenis kelamin dan asal daerah), status gizi, pengetahuan, sikap dan perilaku terkait kesehatan lingkungan, gizi dan keamanan pangan.

Pengolahan dan Analisis Data

Data yang diperoleh akan di *coding*, *entry*, *cleaning*, *scoring*, untuk kemudian dianalisis menggunakan SPSS. Data status gizi dianalisis berdasarkan IMT/U yang dikategorikan menjadi sangat kurus, kurus, normal, gemuk dan obes. Data pengetahuan, sikap dan perilaku di skor dari masing-masing pertanyaan kemudian dijumlahkan dan dikategorikan berdasarkan interval yang sudah baku.

Analisis statistik yang digunakan adalah analisis deskriptif dan inferensia. Analisis deskriptif untuk menggambarkan variabel yang diteliti dalam kuisioner, sedangkan analisis inferensia yang digunakan adalah uji paired T-Test

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gambaran Umum Kasus Kejadian Demam Berdarah di Lingkungan Sekitar Pesantren serta Penyebaran Jentik Nyamuk

Kasus Kejadian Demam Berdarah di Lingkungan Sekitar Pesantren

Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus *Dengue* yang ditularkan melalui nyamuk *Aedes* dan ditandai dengan demam mendadak 2 – 7 hari tanpa penyebab yang jelas, lemah/lesu, gelisah, nyeri ulu hati, seringkali disertai pendarahan di kulit berupa bintik pendarahan. Kadang-kadang mimisan, berak darah, muntah darah, dan kesadaran menurun (Depkes RI, 1998).

Demam Berdarah *Dengue* (DBD) disebabkan oleh virus *Dengue*. Virus ini termasuk dalam group B *Arthropod Borne Viruses* (Arbovirus) kelompok *flavivirus* dari famili *togavirus*, yang terdiri dari empat serotipe yaitu *Dengue 1*, *Dengue 2*, *Dengue 3* dan *Dengue 4*. Ke-empat jenis virus ini masing-masing saling berkaitan sifat antigennya dan dapat menyebabkan sakit pada manusia. Keempat tipe virus ini telah ditemukan di berbagai daerah di Indonesia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Dengue 3* merupakan serotipe virus yang dominan yang menyebabkan gejala klinis yang berat dan penderita banyak yang meninggal (Wuryadi, 1990). Data kasus kejadian demam berdarah di daerah sekitar pesantren disajikan pada tabel berikut.

Tabel 1. Data kasus kejadian demam berdarah di lokasi sekitar pesantren

No	Bulan	2007		2008		2009		2010		2011	
		P	M	P	M	P	M	P	M	P	M
1	Januari	16	1	0	0	11	0	4	0	4	0
2	Februari	12	0	1	0	20	0	13	0	6	0
3	Maret	15	0	3	0	7	0	6	0	2	0
4	April	11	0	2	0	15	0	29	0	3	0
5	Mei	14	0	9	0	12	0	7	0	0	0
6	Juni	14	0	0	0	17	0	13	0	1	0
7	Juli	6	0	3	0	15	0	7	0	2	0
8	Agustus	8	0	4	0	27	0	16	0	0	0
9	September	2	0	1	0	9	0	9	0	1	0
10	Oktober	3	0	9	0	4	0	8	0	3	0
11	November	7	0	8	0	6	0	14	0	8	0
12	Desember	4	0	10	0	11	0	3	0	5	1
Jumlah		112	1	50	0	154	0	129	0	35	1

Keterangan: P= penderita M= meninggal

Sumber: Puskesmas Pasir Mulya, Bogor

Jumlah penderita demam berdarah di sekitar pesantren mengalami fluktuasi dari tahun 2007 sampai 2011. Jumlah kasus tertinggi terjadi sepanjang tahun 2009 yaitu 154 kejadian. Menurut Fitriyani (2007) wilayah Jawa-Bali memiliki kabupaten/kodya yang termasuk kategori rawan dan sangat rawan paling tinggi diantara seluruh wilayah yang ada di Indonesia. Daerah-daerah yang termasuk kategori rawan dan sangat rawan pada umumnya terletak di kota-kota besar dan ibukota provinsi.

Penyebaran dan jenis jentik nyamuk di Pondok Pesantren

Hasil pemeriksaan laboratorium (Tabel 2) menunjukkan terdapat berbagai jenis jentik nyamuk di Pondok Pesantren Darussalam yaitu *Aedes albopictus*, *Aedes aegypt* maupun *Culex sp*. Jenis jentik nyamuk yang terbanyak tersebar ditemukan yaitu jenis jentik nyamuk *Culex sp* yang tersebar hampir disemua lokasi pengambilan sampel.

Tabel 2. Hasil identifikasi nyamuk di Pondok Pesantren Darussalam

No	Lokasi	Jumlah (Ekor)			Keterangan Spesies
		Larva	Pupa	Dewasa	
1	Kamar mandi Nabawi	10	6	4	<i>Aedes aegypti</i>
2	Kamar mandi guru	4	-	-	<i>Culex sp</i>
3	Pohon tumbang	2	-	2	<i>Aedes albopictus</i>
4	Disamping gerbang	10	2	1	<i>Culex sp</i>
5	Rawa-rawa	3	2	1	<i>Culex sp</i>
6	Comberan	4	1	-	<i>Culex sp</i>
7	Ember bekas asahan	6	2	2	<i>Aedes albopictus</i>
Total		33	11	8	

Tabel 3. Hasil identifikasi nyamuk di Pondok Pesantren Dawatul Quran Al Rozie

No	Lokasi	Jumlah (Ekor)			Keterangan Spesies
		Larva	Pupa	Dewasa	
1	Kamar mandi guru	6	2	-	<i>Aedes aegypti</i>
2	Kamar mandi siswa	6	1	-	<i>Aedes aegypti</i>
3	Kamar mandi pesantren	10	2		<i>Aedes aegypti</i>
4	Kamar mandi penduduk sekitar pesantren -1	1	1	-	<i>Aedes aegypti</i>
5	Kamar mandi penduduk sekitar pesantren -1	1	1		<i>Aedes aegypti</i>
6	Dispenser pesantren	-	-	2	<i>Aedes aegypti</i>
7	Ember di depan pesantren	8	2	1	<i>Aedes albopictus</i>
Total		38	11	5	

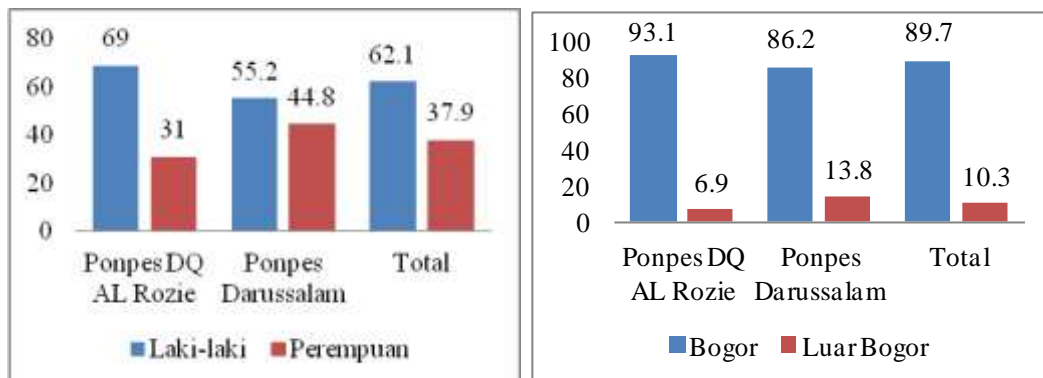
Berbeda dengan hasil analisis jentik nyamuk di Pesantren Darussalam, jenis jentik nyamuk yang banyak terdapat di sekitar pesantren Dawatul Quran Al rozie adalah jenis *Aedes aegypti*. Nyamuk jenis ini adalah vektor penyakit demam berdarah. Hasil pengamatan pada Tabel 2 dan Tabel 3 menyadarkan para siswa akan adanya bahaya yang selalu mengancam kesehatan diri mereka, sehingga para

siswa dengan semangat menyatakan akan berusaha membuat lingkungan mereka menjadi lebih bersih, salah satunya dengan berperan aktif dalam kegiatan Geulis Plus.

Karakteristik Siswa

Usia, Jenis Kelamin dan Asal Daerah

Usia siswa peserta pelatihan Geulis berkisar antara 11-18 tahun yang termasuk ke dalam kategori remaja (Arisman, 2004). Sebagian besar siswa berasal dari daerah Kabupaten dan Kota Bogor seperti dari Kecamatan Ciomas, Leuwiliang, Ciampea, Cibinong dan Kecamatan Bogor Barat. Siswa yang berasal dari luar Bogor berasal dari Kota Serang, Sukabumi dan Cianjur. Data sebaran jenis kelamin dan asal daerah disajikan pada Gambar 1 berikut.

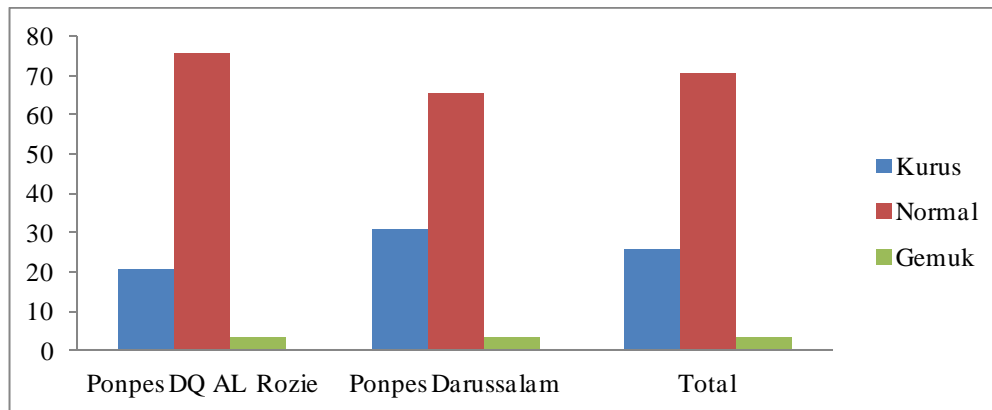


Gambar 1. Sebaran jenis kelamin dan asal daerah siswa.

Berdasarkan data pada Gambar 1 dapat diketahui bahwa siswa laki-laki lebih banyak dibandingkan siswa perempuan yaitu sebanyak 62,1% siswa laki-laki dan 37,9% siswa perempuan. Siswa yang berasal dari daerah Bogor sebesar 89,7% dan dari luar Bogor hanya 10,3%.

Status Gizi

Status gizi merupakan keadaan kesehatan tubuh seseorang atau sekelompok orang yang diakibatkan oleh konsumsi, penyerapan, dan penggunaan zat gizi makanan (Riyadi, 2003). Dalam penelitian ini status gizi siswa diukur berdasarkan IMT/U. Sebaran status gizi siswa dapat dilihat pada Gambar 2 berikut.



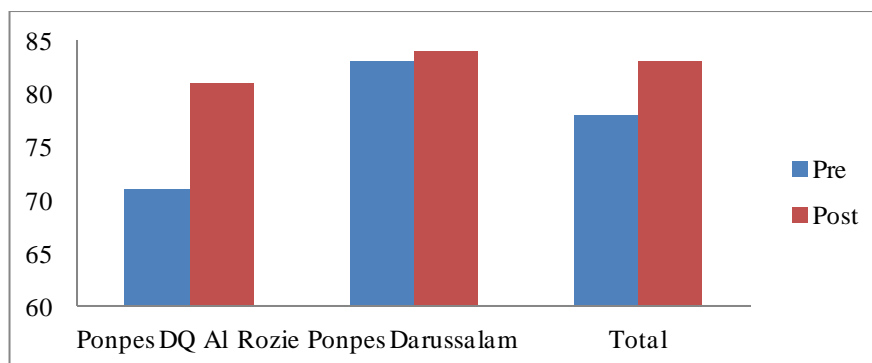
Gambar 2. Sebaran status gizi siswa.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa di kedua pondok pesantren terdapat masalah gizi ganda yaitu masih adanya siswa dengan status gizi kurang (kurus) sebanyak 25,9%, dan disisi lain ada masalah status gizi lebih (3,4%). Prevalensi status gizi kurang di pesantren (25,9%) jauh lebih tinggi dari rata-rata prevalensi kekurusan untuk umur 6-18 tahun pada level nasional (10,4%). Dengan demikian masalah gizi di pesantren perlu mendapat penanganan lebih serius.

Pengetahuan, Sikap dan Prilaku Siswa Terkait Kesehatan Lingkungan, Gizi dan Keamanan Pangan

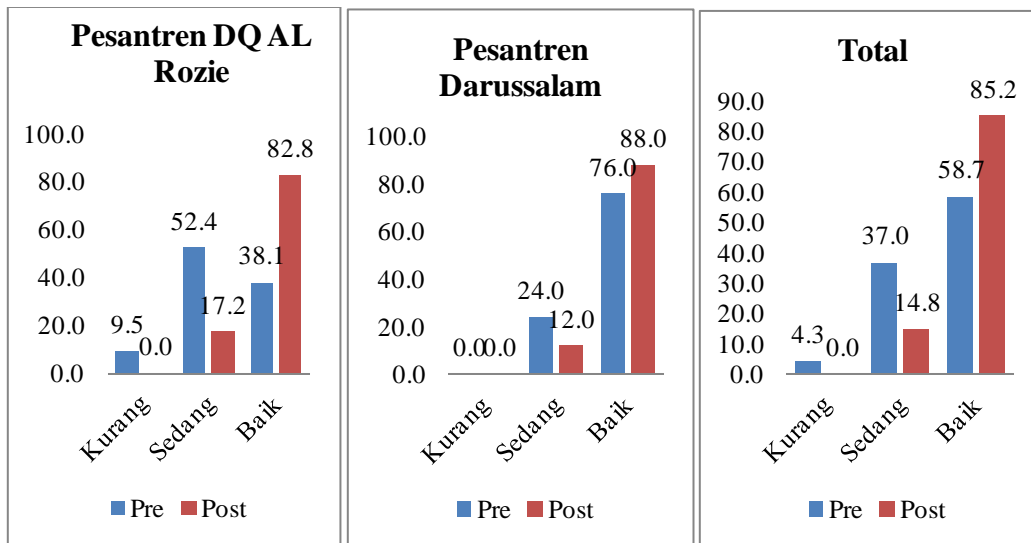
Pengetahuan Kesehatan Lingkungan, Gizi dan keamanan pangan

Pengetahuan siswa tentang jentik dan perkembangbiakannya serta jenis penyakit yang diakibatkannya diharapkan dapat membentuk sikap dan perilaku siswa dalam pengendalian lingkungan sehat. Terjadi peningkatan signifikan ($p < 0,1$) rata-rata skor pengetahuan siswa tentang jentik nyamuk dari 78 sebelum penyuluhan menjadi 83 sesudah penyuluhan (Gambar 3).



Gambar 3. Nilai rata-rata pengetahuan siswa tentang jentik, perkembangbiakannya dan jenis penyakit yang diakibatkannya.

Bila pengetahuan siswa tentang jentik dan perkembangbiakannya serta jenis penyakit akibat jentik dikelompokkan menjadi kategori kurang, sedang dan baik, maka terlihat dari Gambar 4, proporsi siswa yang memiliki tingkat pengetahuan baik mengalami peningkatan dari 58,7% sebelum penyuluhan menjadi 85,2% sesudah penyuluhan (Gambar 4). Jumlah peningkatan tertinggi ada di pesantren DQ Al Rozie sebesar 30%

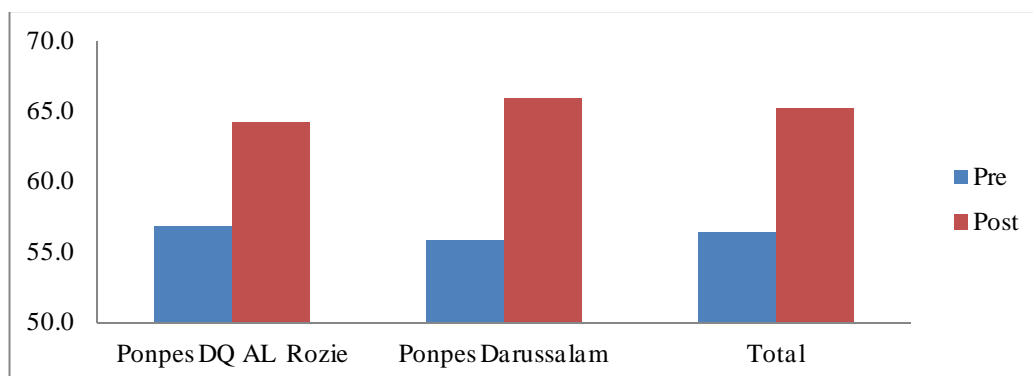


Gambar 4. Sebaran siswa berdasarkan jenis kategori pengetahuan tentang jentik dan perkembangbiakannya serta jenis penyakit akibat jentik pada sebelum dan setelah pelatihan.

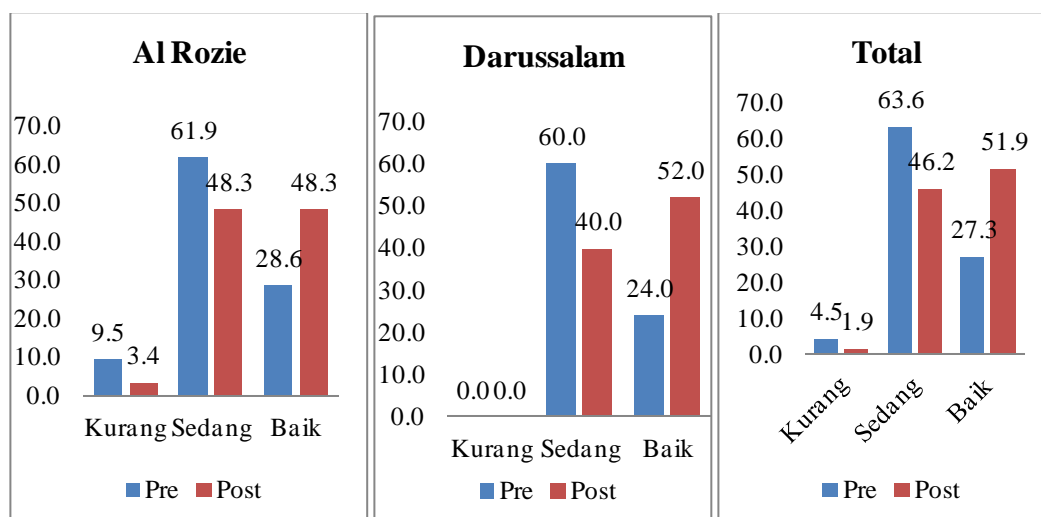
Pengetahuan Gizi dan keamanan pangan

Tingkat pengetahuan gizi dan keamanan pangan seseorang berpengaruh terhadap sikap dan perilaku dalam pemilihan makanan yang pada akhirnya akan berpengaruh pada keadaan gizi dan kesehatan individu yang bersangkutan. Semakin tinggi tingkat pengetahuan gizi seseorang diharapkan semakin baik pula keadaan gizi dan kesehatannya (Sukandar, 2009). Berdasarkan data Badan POM (2010) menunjukkan bahwa 44 persen pangan jajanan di Indonesia terkategori tidak memenuhi syarat keamanan pangan yang disebabkan oleh penggunaan bahan tambahan pangan yang berlebihan, penggunaan bahan tambahan non pangan seperti formalin, boraks, zat pewarna rhodamin b, dan metanil yellow, serta adanya cemaran mikroba. Menurut Kanazawa (2010), banyaknya pangan jajanan yang tidak aman dapat berakibat pada rendahnya kualitas tumbuh kembang anak

yang dicerminkan oleh terhambatnya perkembangan kognitif. Gambaran pengetahuan siswa dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Nilai rata-rata pengetahuan gizi dan keamanan pangan.



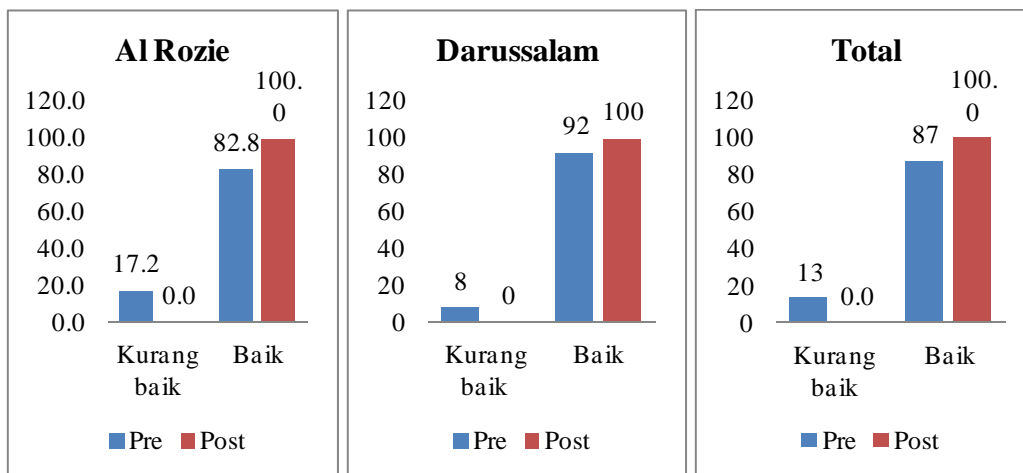
Gambar 6. Sebaran siswa berdasarkan jenis kategori pengetahuan gizi dan keamanan pangan.

Berdasarkan Gambar 5 dapat diketahui bahwa nilai rata-rata pengetahuan siswa masih sangat rendah yaitu 56,4 dan hanya sebagian kecil (27,3%) siswa masuk dalam kategoribaik (Gambar 6). Namun pengetahuan siswa meningkat signifikan ($p < 0,05$) setelah penyuluhan menjadi 65,2, serta proporsi sebagian besar siswa meningkat dalam kategori baik menjadi 51,9%.

Sikap terhadap Kesehatan lingkungan, Gizi dan Keamanan pangan

Sikap merupakan respon evaluatif yang artinya sikap didasari oleh proses evaluasi dalam diri individu dengan memberikan kesimpulan dalam bentuk baik

atau buruk, positif atau negatif, menyenangkan atau tidak menyenangkan serta suka atau tidak suka (Azwar, 1988). Menurut Aaker *et al.* (2000) sikap memiliki 3 komponen yaitu komponen kognitif yang menggambarkan pengetahuan dan keyakinan seseorang terhadap suatu objek; komponen afektif yang menyangkut perasaan/emosional seseorang terhadap suatu objek biasanya diekspresikan dalam bentuk suka atau tidak suka; serta komponen kecenderungan bertindak yang merujuk ke suatu maksud atau tindakan dalam suatu cara tertentu terhadap suatu objek. Sikap siswa sebelum dan sesudah pelatihan terhadap beberapa komponen terkait keamanan makanan dan kesehatan lingkungan disajikan pada Gambar 7 dan Gambar 8.



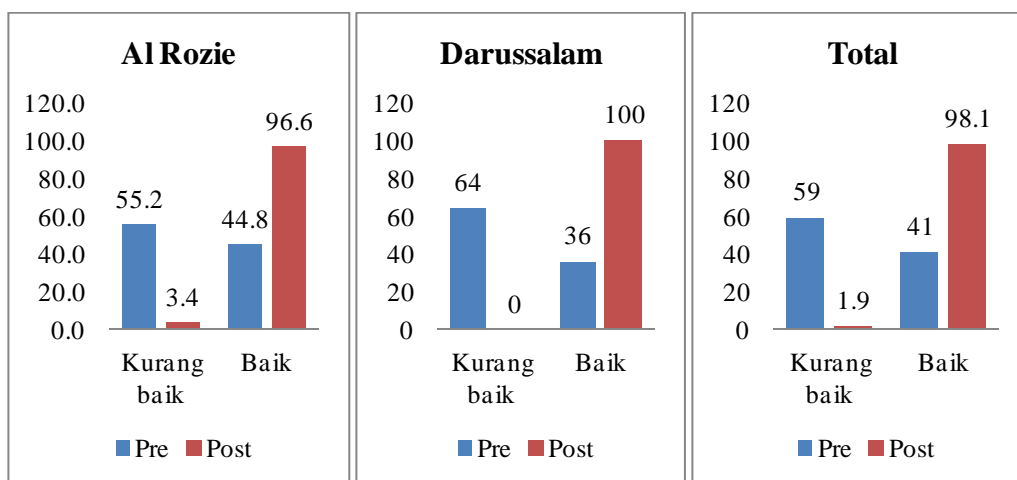
Gambar 7. Sebaran siswa berdasarkan kategori sikap terhadap kesehatan lingkungan.

Tabel 4. Sebaran siswa berdasarkan sikap tidak setuju terhadap beberapa komponen terkait kebersihan lingkungan

No	Sikap	Pesantren DQ AL Rozie			Pesantren Darussalam		
		Pre (%)	Post (%)	Perubahan (%)	Pre (%)	Post (%)	Perubahan (%)
1	Sikap terhadap kamar mandi yang jarang dikuras	86	100	14	100	100	0
2	Sikap terhadap jentik nyamuk yang dibiarkan berada dalam bak mandi	76	100	24	80	100	20
3	Sikap terhadap teman yang sering menggantung baju kotor di kamar	34	97	63	24	84	60
4	Sikap terhadap teman yang sering membuang sampah sembarangan	76	100	24	80	100	20
5	Sikap terhadap sampah yang dibiarkan menumpuk	79	97	18	84	96	12

Data pada Gambar 7 menunjukkan bahwa sebagian besar siswa memiliki sikap yang baik terhadap kesehatan lingkungan. Jumlah siswa yang memiliki sikap kurang baik terhadap kesehatan lingkungan menurun dari adanya 13% menjadi 0%, atau artinya siswa semuanya telah mempunyai sikap yang baik mengenai pengendalian lingkungan sehat setelah pelatihan.

Perubahan sikap siswa sebelum dan setelah pelatihan yang paling tinggi (60%) adalah sikap terhadap teman yang sering menggantung baju kotor di kamar. Hanya 34% siswa di Pesantren Dawatul Quran AlRozie sebelum pelatihan menunjukkan sikap tidak setuju terhadap kebiasaan kurang baik tersebut, namun setelah siswa mengetahui akibat yang ditimbulkan dari kebiasaan itu maka hampir semua siswa (97%) menjadi tidak setuju terhadap sikap tersebut. Begitu juga siswa di Pesantren Darussalam. Hal ini diduga karena dalam materi pelatihan dijelaskan bahwa kebiasaan tersebut dapat menyebabkan hewan pembawa penyakit seperti nyamuk bersarang di tempat kotor tersebut. Sikap siswa terhadap gizi dan keamanan pangan disajikan pada Gambar 8.



Gambar 8. Perubahan sikap siswa terhadap beberapa komponen terkait gizi dan keamanan pangan.

Dari Gambar 8 terlihat bahwa sikap gizi dan keamanan pangan siswa masih banyak yang tergolong kurang (60%) sebelum pelatihan, namun meningkat signifikan ($p < 0,05$) menjadi 99% setelah pelatihan. Sikap yang banyak perubahannya adalah terkait sikap ketidaksetujuan siswa bila ada temannya

sering membeli jajanan tinggi penyedap dan seringnya membeli minuman manis dengan adanya kandungan pemanis buatan (Tabel 5).

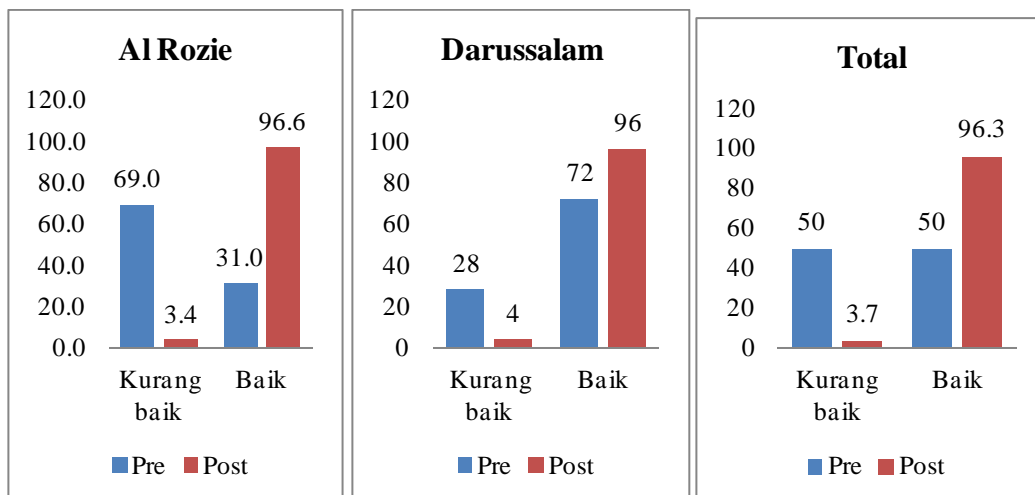
Sikap lain yang cukup tinggi perubahannya adalah sikap ketidak setujuan mereka terhadap teman yang sering jajan bakso, apalagi bila banyak menggunakan saos dalam mengkonsumsinya. Perubahan sikap siswa di kedua pesantren signifikan ($p < 0,05$) antara sebelum dan sesudah pelatihan.

Tabel 5. Sebaran siswa berdasarkan sikap tidak setuju terhadap beberapa komponen terkait gizi dan keamanan pangan

Sikap	Pesantren DQ AL Rozie			Pesantren Darussalam		
	Pre (%)	Post (%)	Perubahan (%)	Pre (%)	Post (%)	Perubahan (%)
Sikap terhadap teman yang sering membeli ciki	31	93	62	28	96	68
Sikap terhadap teman yang sering membeli minuman manis dalam gelas plastik	24	97	73	20	68	48
Sikap terhadap teman yang sering membeli bakso	41	97	56	12	52	40
Sikap terhadap teman yang tidak suka makan buah dan sayur	72	100	28	88	96	8
Sikap terhadap teman yang tidak suka sarapan pagi	69	97	28	84	92	8

Perilaku Sehat, Gizi dan Keamanan pangan

Menurut Goldsmith (1996) perilaku merupakan sesuatu yang benar-benar dilakukan oleh seseorang. Adapun perilaku muncul sebagai hasil interaksi antara individu dengan lingkungannya. Dengan demikian, perilaku juga dapat dikatakan sebagai reaksi yang terjadi karena adanya stimulus atau interaksi antara individu dengan lingkungannya dan benar-benar dilakukan seseorang dalam bentuk tindakan. Sebaran siswa berdasarkan perilaku sehat pada kedua pesantren disajikan pada Gambar 9.



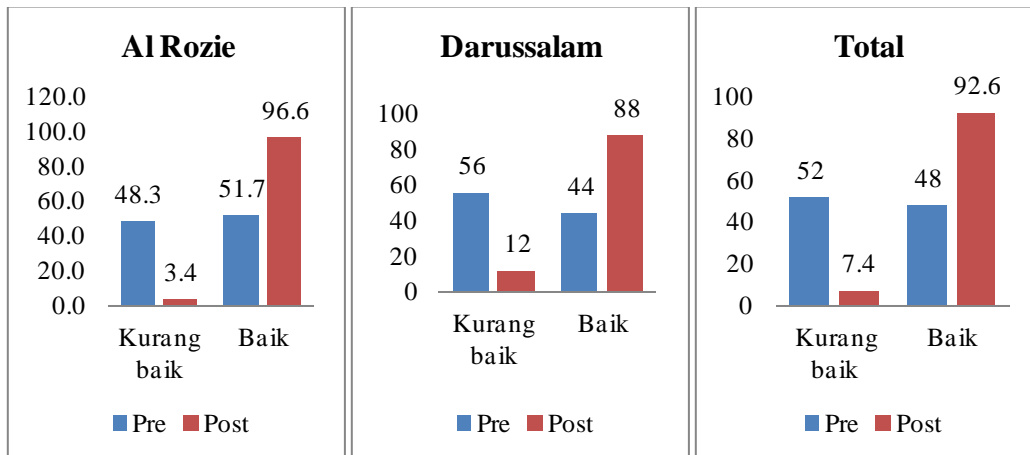
Gambar 9. Sebaran siswa berdasarkan perilaku sehat.

Gambar 9 menunjukkan bahwa perilaku hidup sehat dari 50% siswa masih tergolong kurang baik, namun setelah pelatihan terjadi penurunan proporsi tersebut menjadi hanya 3,7%, atau terjadi peningkatan proporsi siswa dengan perilaku baik yaitu menjadi 96,3%. Menurut Isa (1996) bahwa terjadinya perubahan perilaku bisa disebabkan karena adanya peningkatan pengetahuan yang mendorong terjadinya peningkatan kemampuan seseorang untuk menilai dan menanggapi suatu objek tertentu dalam bentuk sikap dan perilaku.

Seiring dengan terjadinya perubahan perilaku hidup sehat, maka terjadi pula perbaikan dalam perilaku hidup terkait gizi dan keamanan pangan (Gambar 10). Proporsi siswa yang memiliki perilaku gizi dan keamanan pangan yang baik di Pesantren DQ Al Rozie sebesar 51,7% pada awal pelatihan dan meningkat menjadi 96,5% setelah pelatihan. Begitu juga dengan jumlah siswa yang memiliki perilaku gizi dan keamanan pangan yang baik di pesantren Darussalam mengalami peningkatan sebesar 44% setelah pelatihan atau meningkat 2 kali lipat dibanding sebelum pelatihan.

Perilaku merupakan hasil interaksi dari tingkat pengetahuan dan sikap terhadap sesuatu hal. Menurut Sanjur (1982) tingkat pengetahuan dapat membentuk perilaku secara langsung dan dapat juga mempengaruhi perilaku melalui sikap. Menurut Green (1990) bahwa perilaku seseorang terhadap makanan yang aman dipengaruhi oleh predisposisi perorangan (kebiasaan, nilai, pengetahuan, sikap sehubungan dengan makanan tersebut), namun demikian ada

faktor lain yang juga kuat pengaruhnya terhadap perilaku pemilihan makanan seperti dukungan pemerintah maupun swasta terhadap keberadaan makanan yang aman, serta faktor penguat seperti ajakan teman atau guru untuk memilih makanan yang aman.



Gambar 10. Sebaran siswa berdasarkan perilaku gizi dan keamanan pangan.

KESIMPULAN

Menurunnya jumlah dan penyebaran jentik nyamuk di sekitar pesantren menurunkan risiko penyakit yang diakibatkan oleh nyamuk sebagai vektornya. Perbaikan Pengetahuan, sikap dan perilaku siswa terkait kesehatan lingkungan menjadi salah satu penguat menurunnya risiko kejadian penyakit. Perbaikan pengetahuan dan sikap siswa terkait gizi dan keamanan telah berdampak pada perbaikan perilaku dalam pemilihan dan konsumsi pangan jajanan yang aman, dari hanya 48% siswa yang berperilaku baik menjadi 92,6%.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisman MB. 2004. *Gizi dalam Daur Kehidupan*. Jakarta: EGC.
- Azwar S. 1088. *Sikap Manusia, Teori dan Pengukurannya*. Yogyakarta: Liberty.
- Depkes, RI. 1998. *Petunjuk Teknis Penemuan, Pertolongan, dan Pelaporan Penderita Demam Berdarah Dengue*. Direktorat Jenderal Pemberantasan Penyakit Menular dan Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

- _____. 2011. Riset Kesehatan Dasar 2010. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Fitriyani. 2007. Penentuan wilayah rawan demam berdarah dengue di indonesia dan analisis pengaruh pola hujan terhadap tingkat serangan (studi kasus: kabupaten indramayu) [skripsi]. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Riyadi H. 2003. Penilaian Status Gizi. Di dalam: Baliwati YF, Khomsan A, Dwiriani CM, editor. Pangan dan Gizi. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Sanjur D. 1982. Social and Cultur Perspectives in Nutrition. New Jersey: Englewood Cliffs, Prentice-Hall.
- Wuryadi, S. 1990. Isolasi virus dengue daripenderita DBD pada wabah diJakarta tahun 1988. *CerminDunia Kedokteran* 60: 17–23.

**PENGARUH PEMBERIAN FITOESTROGEN PADA MASA
KEBUNTINGAN DAN LAKTASI TERHADAP KINERJA
REPRODUKSI ANAK**

(The Effect of Prenatal and Lactation Exposure to the Phytoestrogen to Pups
Reproduction Performance)

Nastiti Kusumorini, Aryani Sismin S

Dep. Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian fitoestrogen pada masa kebuntingan dan laktasi terhadap kinerja reproduksi anak. Penelitian ini menggunakan ekstraktempe sebagai sumber fitoestrogen. Empat puluh ekor 60 tikus (*Rattus norvegicus*) bunting dibagi menjadi 4 kelompok perlakuan yaitu K (tidak diberi fitoestrogen, sebagai kontrol), AW (diberi ekstraktempe dengan dosis 1 mg/kg BB pada hari ke 2–11 kebuntingan), AK (diberi ekstraktempe dengan dosis 1 mg/ hari /kg BB pada pada hari ke 12 kebuntingan sampai melahirkan dan LAK (diberi ekstraktempe dengan dosis 1 mg/ kg BB pada hari ke 2-12 masa laktasi). Setelah mendapatkan perlakuan, hewan tersebut dibiarkan melahirkan secara alami dan dilakukan pengamatan berupa lama kebuntingan dan tingkat produksi anak serta bobot lahir. Pengamatan tampilan reproduksi pada anak tikus jantan dan betina dilakukan terhadap 5 ekor hewan pada usia 15, 21, 28,42, 56, dan 72 hari. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen mempengaruhi bobot badananak pada usia 15 hari serta kinerja reproduksianak jantan hinggausia 42 hari maupun anakbetina hingga usia 72 hari. Kata

Kata kunci: Phytoestrogen, testis, testosteron, ovarium, uterus, progesteron.

ABSTRACT

This research was conducted to study the administration of phytoestrogen on rat during pregnancy and lactation to pups reproduction performance. The research used extract tempe as phytoestrogen resource. Forty pregnant rats (*Rattus norvegicus*) were divided into 4 groups. They were control , 1 mg/kg BW extract tempeat 2-11 days of pregnancy, 1 mg/kg BW extract tempeat 12 days of pregnancy till birth, and 1 mg/kg BW extract tempeat 2-12 days of lactation. Pups were delivered naturally. They were being observed for days of pregnancy, litter size, and birth body weight. . The observation of body weight and reproductive performance on male and female pups were done at 15,21,28, 42, 56 and 72 days old of 5 pups for each. In general, the result showed that administration of phytoestrogen influenced body weight of 15 days old pups, reproduction performance of male until 56 days old and female pups until72 days old.

Keywords: Phytoestrogen, testis, testosterone, ovarium, uterus.

PENDAHULUAN

Pada saat kebuntingan, sistem peredaran darah induk dan anak merupakan satu kesatuan sistem sirkulasi. Kesatuan sistem sirkulasi ini menyebabkan hadirnya hormon-hormon pada sirkulasi darah induk juga akan masuk kedalam

sirkulasi anak pada saat kebuntingan. Terpaparnya fetus secara berlebihan oleh hormon reproduksi yang ada pada induk diyakini dapat mempengaruhi fungsi reproduksi maupun tingkah laku individu tersebut setelah menjadi dewasa Kusumorini *et al.* (2000).

Fitoestrogen merupakan suatu substrat yang berasal dari tumbuh-tumbuhan yang secara struktur dan fungsi mirip dengan Estradiol (E2). Fitoestrogen dapat ditemukan pada kedelai dan produk-produk kedelai sehingga dipercaya dapat menggantikan fungsi estrogen dalam tubuh (You, 2004). Sejauh ini, konsumsi makanan yang kaya akan fitoestrogen telah dipercaya dapat menurunkan kejadian kanker prostat dan payudara, terutama untuk orang-orang Asia Tenggara yang menu makanannya kaya akan kedelai dan produk dari kedelai (Dai *et al.* 2003).

Isoflavon utama yang bersifat fitoestrogen dan terdapat dalam kedelai berada dalam dua bentuk yaitu daidzin dan genistin (bentuk glikosida) serta daidzein dan genestein (bentuk aglikon) (Astuti 1999). Genistin inilah yang lebih bersifat agonis pada reseptor estrogen baik yang tipe α maupun β (Mueller *et al.* 2004).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengungkapkan khasiat genistin dalam usaha mencegah timbulnya kanker, menurunkan kejadian osteoporosis serta meminimalkan penyakit kardiovaskuler (Albertazzi 2002 , Bhathena *et al.* 2002, Lamartiniere *et al.* 2002). Namun demikian belum banyak informasi mengenai pemaparan genistin pada tahapan masa kritis perkembangan individu. Ada sedikit kekhawatiran bahwa differensiasi organ reproduksi sangat sensitif terhadap hadirnya bahan kimia aktif yang menyerupai kerja hormon (Tuohy, 2003). Kekhawatiran ini didasari oleh adanya pengaruh yang merugikan pada individu yang diberi zat estrogenik seperti diethylbestrol (DES).

Walaupun sudah banyak penelitian yang menunjukkan pengaruh fitoestrogen terhadap fungsi reproduksi hewan, namun masih sedikit informasi yang berkaitan dengan pengaruh fitoestrogen yang diberikan pada saat kebuntingan dan menyusui terhadap perkembangan traktus reproduksi dari fetus yang dikandung serta kinerja reproduksi anak tersebut setelah dewasa.

METODE PENELITIAN

Hewan Coba

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Fisiologi, Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB. Hewan coba yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tikus bunting dari species *Rattus norvegicus*, galur Sprague-Dawley paritas ke 2 (dua) dan berumur ± 16 minggu dan tikus jantan berumur 16 minggu untuk mengawini betina. Selama penelitian, tikus percobaan dipelihara di Fasilitas Hewan Coba FKH IPB dan dikandangkan secara individu dalam kandang yang terbuat dari plastik berukuran 30x2x12 cm yang dilengkapi dengan kawat kasa penutup pada bagian atasnya. Pencahayaan dilakukan selama 12 jam (06.00–18.00) dan pakan serta air minum diberikan *ad libitum*.

Guna mendapatkan tikus bunting, perkawinan dilakukan secara alamiah dengan mencampurkan pejantan dan betina di dalam satu kandang. Perkawinan ditandai dengan adanya sperma dalam ulasan vagina dan ini merupakan hari pertama kebuntingan (H1). Tikus betina yang telah bunting ini yang digunakan pada penelitian dan dikandangkan secara individu.

Fitoestrogen dan Dosis Pemberian

Fitoestrogen yang digunakan dalam penelitian merupakan isoflavon yang bersumber dari ekstrak tempe. Penggunaan bahan tersebut sebagai sumber fitoestrogen karena memiliki kadar isoflavon yang cukup tinggi. Jumlah ekstrak tempe yang diberikan pada hewan coba adalah 1 mg/hari yang dilarutkan dalam 1 ml air. Bila dikonversikan pada kadar isoflavon yang terkandung, maka jumlah isoflavon yang diterima oleh hewan coba adalah 0,8755mg/hari. Pemberian ekstrak tempe dilakukan dengan *force feeding* (pencekogan) yang dilaksanakan pada pagi hari.

Pelaksanaan Penelitian

Sebanyak 60 ekor tikus betina bunting dibagi ke dalam 4 kelompok percobaan yaitu: 1) K: Kelompok yang tidak diberi fitoestrogen selama kebuntingan dan menyusui, 2) AW: Kelompok yang diberi ekstrak tempe pada hari ke 2–11 kebuntingan, 3) AK: Kelompok yang diberi ekstrak tempe pada hari

ke 12 sampai waktu melahirkan, dan 4) LAK: Kelompok yang mendapatkan ekstrak tepe pada hari ke 2-12 masa laktasi.

Setelah mendapatkan perlakuan, kelompok-kelompok hewan tersebut dibiarkan melahirkan secara alami dan dilakukan pengamatan produksi anak dari masing-masing induk berupa lama kebuntingan, jumlah anak sekelahiran dan bobot lahir. Pada usia 15 dan 28 hari, bobot anak diambil, sedangkan jarak celah anogenital diambil pada saat hewan berusia 15 dan 21 hari. Setelah hewan lepas sapih (usia 28 hari), anak-anak tersebut dikelompokkan berdasarkan jenis kelamin dan kelompok perlakuan.

Pada saat usia hewan mencapai 28, 42, 56, dan 72 hari, lima (5) ekor hewan dari masing-masing kelompok perlakuan dan jenis kelamin dikorbankan untuk diambil data tampilan reproduksi yang mencakup bobot testis, konsentrasi sperma, kadar testosteron untuk hewan jantan serta bobot ovarium, bobot uterus dan kadar progesteron untuk hewan betina. Penetapan kadar hormone dilakukan dengan menggunakan metoda RIA

Analisa Statistik

Parameter yang diukur akan dinyatakan dengan rata-rata \pm simpangan baku. Perbedaan antar kelompok perlakuan akan diuji secara statistika dengan analisa sidik ragam (ANOVA) dengan pola rancangan acak lengkap. Jika perlakuan berpengaruh nyata dan sangat nyata dilanjutkan dengan uji selisih beda terkecil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tingkat Produksi Anak

Tingkat produksi anak yang diamati meliputi lama kebuntingan, jumlah anak sekelahiran, rata-rata bobot lahir anak, bobot anak usia 15 dan 28 hari. Hasil pengamatan disajikan pada Tabel 1.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa pemberian fitoestrogen saat kebuntingan tidak mempengaruhi lama kebuntingan dan jumlah anak sekelahiran. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen pada dosis yang digunakan tidak akan mengganggu proses kebuntingan. Walaupun jumlah anak yang

dilahirkan tidak berbeda nyata, namun demikian ada perbedaan nyata pada bobot lahir anak. Bobot lahir anak kelompok pemberian ekstrak tempe pada awal kebuntingan menunjukkan nilai yang lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok lain. Hasil ini dapat menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen pada awal kebuntingan dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan fetus. Hal ini sesuai dengan apa yang diungkapkan oleh Sachie *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa intervensi fitoestrogen dilakukan pada saat embriogenesis, dapat mengganggu pertumbuhan dan perkembangan fetus setelah dilahirkan. Selain itu, penelitian ini juga menunjukkan bahwa fitoestrogen dapat hadir pada tubuh fetus secara *trans-uterin*. Hasil ini sejalan dengan apa yang dilakukan oleh Todaka (2005) dan melaporkan bahwa fitoestrogen dapat ditransfer dari induk ke fetus.

Tabel 1. Rataan \pm SD lama kebuntingan, jumlah anak sekelaahiran, rataan bobot lahir anak, dan rataan bobot badan anak usia 15 dan 28 hari pada setiap kelompok perlakuan.

Parameter	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
Lama kebuntingan (hari)	22,67 \pm 0,58	22,33 \pm 0,33	22,00 \pm 0,00	22,00 \pm 0,00
Jumlah anak sekelaahiran (ekor)	7,33 \pm 0,58	7,67 \pm 2,08	7,33 \pm 2,08	7,33 \pm 0,58
Bobot lahir anak (gram)	6,22 \pm 0,09 ^{ab}	4,70 \pm 0,36 ^c	7,02 \pm 0,25 ^a	5,67 \pm 0,59 ^{ab}
Bobot anakusia 15 hari (gram)	16,77 \pm 0,22 ^{ab}	13,80 \pm 2,52 ^b	15,23 \pm 1,66 ^b	19,42 \pm 1,84 ^a
Bobot anakusia 28 hari (gram)	29,98 \pm 2,57	29,57 \pm 13,13	30,45 \pm 3,12	25,79 \pm 7,47

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Sejalan dengan adanya perbedaan yang nyata pada rataan bobot badan pada saat lahir, terdapat pula perbedaan yang nyata pada rataan bobot badan pada saat anak-anak tersebut berusia 15 hari. Bila dicermati lebih lanjut, kelompok pemberian fitoestrogen pada saat laktasi menunjukkan bobot badan yang lebih tinggi dibandingkan kelompok perlakuan yang lain. Peningkatan bobot badan usia 15 hari pada kelompok yang diberi fitoestrogen diduga karena adanya peningkatan produksi air susu induk akibat hadirnya fitoestrogen. Seperti

diketahui, fungsi fitoestrogen menyerupai estrogen. Tingginya kadar estrogen pada saat laktasi akan menstimulasi pembentukan air susu, sehingga produksi air susu akan meningkat dan pertumbuhan anak-anaknya pun akan lebih cepat dibandingkan kelompok lain.

Berbeda dengan rata-rata bobot badan anak usia 15 hari, bobot badan anak 28 hari tidak memberikan beda nyata pada semua kelompok. Hal ini dapat dimengerti karena sumber makanan anak tikus saat usia mencapai 28 hari tidak sepenuhnya berasal dari air susu induk. Sejak usia 21 hari, tikus sudah mampu untuk memakan makanan yang disediakan dan mengurangi konsumsi susu induknya.

Pengaruh Pemberian Fitoestrogen pada Anak Jantan

Masuknya *estrogen-like* pada individu jantan saat kebuntingan maupun saat laktasi, diduga dapat mempengaruhi organogenesis alat reproduksi yang akan berdampak pada kinerja reproduksi setelah hewan tersebut menjadi dewasa. Hasil pengamatan terhadap individu jantan diuraikan di bawah ini.

Jarak celah anogenital

Salah satu parameter yang diambil untuk melihat pengaruh paparan fitoestrogen pada saat kebuntingan dan menyusui adalah jarak celah anogenital. Hasil pengamatan jarak celah anogenital usia 15 dan 21 hari ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Rataan \pm SD jarak celah anogenital (mm) hewan jantan pada usia 15 dan 21 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
15	10,33 \pm 0,15	10,43 \pm 1,55	9,47 \pm 0,58	9,07 \pm 0,47
21	14,40 \pm 2,45	13,17 \pm 3,33	11,53 \pm 2,34	12,03 \pm 4,31

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Jarak celah anogenital adalah jarak yang diukur antara anus dan alat genital. Jarak celah anogenital inilah yang dijadikan patokan untuk membedakan jenis kelamin anak tikus pada saat lahir sampai usia 21 hari. Anak tikus jantan memiliki

jarak celah anogenital yang lebih panjang bila dibandingkan dengan anak betina. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian fitoestrogen terhadap jarak celah anogenital baik pada usia 15 hari maupun usia 21 hari. Hasil ini sesuai dengan apa yang telah diungkapkan oleh Tousen *et al.* (2006). Namun demikian, pada usia 21 hari, terlihat jarak celah anogenital kelompok hewan yang mendapat paparan fitoestrogen terlihat lebih pendek bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Bila benar fitoestrogen dapat masuk ke dalam tubuh anak secara *trans-uterin* maupun melalui air susu, maka ada kemungkinan mengalirnya sejumlah *estrogen like* pada tubuh anak jantan. Hal inilah yang diduga memperpendek jarak celah anogenital.

Bobot Testis

Testis adalah organ reproduksi jantan yang bertanggung jawab terhadap produksi sperma dan hormone reproduksi testosteron. Oleh karena itu, salah satu ukuran untuk melihat kemampuan reproduksi hewan jantan adalah testis. Pada penelitian ini, akan dilihat pengaruh fitoestrogen pada bobot testis hewan jantan usian 28, 42, 56 dan 72 hari. Hasil penelitian pada bobot testis anak jantan ditampilkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Rataan \pm SD bobot testis (gram) anak jantan usia 28, 42, 56 dan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
28	0,2032 \pm 0,0101	0,2128 \pm 0,1415	0,1832 \pm 0,0153	0,1880 \pm 0,1188
42	0,5219 \pm 0,0425 ^a	0,3918 \pm 0,0514 ^b	0,4173 \pm 0,0530 ^b	0,3721 \pm 0,0362 ^b
56	2,0294 \pm 0,0959 ^a	1,4578 \pm 0,3350 ^c	1,2355 \pm 0,1784 ^c	1,4050 \pm 0,1104 ^c
72	2,3441 \pm 0,1629 ^{ab}	2,4138 \pm 0,2601 ^a	2,1495 \pm 0,3687 ^{ab}	2,1402 \pm 0,1512 ^{ab}

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen tidak mempengaruhi bobot testis hewan jantan usia 28 hari. Pada usia 28 hari, tikus jantan belum memasuki masa pubertas atau dewasa kelamin sehingga aktifitas kerja dari testosteron terhadap traktus reproduksi jantan khususnya pada organ testis belum maksimal.

Bobot testis terlihat dipengaruhi oleh pemberian fitoestrogen pada usia 42 hari ($p < 0,05$) dan usia 56 hari, ($p < 0,01$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok yang terpapar fitoestrogen memiliki bobot testis yang lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok kontrol. Pada usia ini, tikus jantan mulai memasuki usia pubertas sehingga aktifitas kinerja reproduksi akan meningkat sejalan dengan pertambahan usia dan akan mencapai puncaknya setelah dewasa kelamin tercapai. Pemberian fitoestrogen pada saat perkembangan fetus diduga dapat menekan kinerja reproduksi saat hewan mencapai usia pubertas.

Berbeda dengan usia 56 hari, pada usia 72 hari pemberian fitoestrogen tidak mempengaruhi bobot testis. Pada usia ini, tikus sudah mencapai dewasa kelamin penuh. Sehingga sudah tidak terjadi lagi pertumbuhan dan perkembangan organ reproduksinya.

Kadar Testosteron Darah

Testosteron adalah hormon yang bertanggungjawab terhadap kinerja reproduksi. Rendahnya kadar testosteron diduga berkorelasi dengan rendahnya jumlah sperma dan pada akhirnya akan berpengaruh pada rendahnya kemampuan reproduksi. Pada penelitian ini, akan dilihat pengaruh fitoestrogen terhadap kadar testotestosterone darah hewan usia 28, 42, 56 dan 72 hari. Hasil penelitian ini ditampilkan pada Tabel 4.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian fitoestrogen tidak mempengaruhi kadar testosteron hewan jantan usia 28 hari. Pada usia 28 hari, tikus jantan belum memasuki masa pubertas atau dewasa kelamin sehingga aktifitas kerja dari testosteron terhadap traktus reproduksi jantan khususnya pada organ testis belum maksimal. Testosteron memegang peranan yang sangat penting dalam proses reproduksi jantan terutama untuk spermatogenesis. Sebaliknya, pada usia 42 hari, kadar testosteron darah sudah mulai dipengaruhi oleh pemberian fitoestrogen saat kebuntingan ataupun masa laktasi ($p < 0,01$). Kelompok kontrol terlihat memberikan nilai testosteron yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan fitoestrogen. Sedangkan pada usia 56 dan 72 hari, fitoestrogen tidak mempengaruhi kadar testosteron darah tikus jantan pada semua kelompok. Pada usia ini, hewan sudah mencapai dewasa kelamin sehingga kinerja reproduksi hewan jantan sudah optimal.

Tabel 4. Rataan \pm SD kadar testosteron darah (ng/ml) anak jantan usia 28, 42, 56 dan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
28	2,764 \pm 1,779	2,474 \pm 1,258	2,543 \pm 1,095	2,561 \pm 2,554
42	3,104 \pm 1,357 ^a	0,813 \pm 0,285 ^b	1,023 \pm 0,565 ^b	1,186 \pm 0,944 ^b
56	20,173 \pm 4,214 ^{ab}	16,958 \pm 3,214 ^b	19,052 \pm 1,226 ^b	16,994 \pm 3,627 ^b
72	19,000 \pm 2,143 ^a	14,788 \pm 3,677 ^{ab}	14,208 \pm 2,852 ^{ab}	16,397 \pm 0,627 ^{ab}

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Keberadaan Sperma

Sperma adalah hasil akhir dari kemampuan reproduksi. Keberadaan sperma sangat dipengaruhi oleh fungsi faal dari organ reproduksi dan hormon reproduksi. Rendahnya konsentrasi sperma berkorelasi dengan kemampuan reproduksi hewan jantan. Pada penelitian ini, akan dilihat pengaruh fitoestrogen terhadap keberadaan sperma hewan jantan usia 28, 42, 56 dan 72 hari. Hasil penelitian keberadaan sperma anak jantan ditampilkan pada Tabel 5.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sperma baru mulai dapat dilihat pada saat hewan berusia 56 hari. Namun demikian tidak semua kelompok menghasilkan sperma pada usia tersebut. Pada usia 72 hari, konsentrasi sperma dipengaruhi oleh pemberian fitoestrogen ($p<0,05$). Kelompok perlakuan menunjukkan konsentrasi yang lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 5. Rataan \pm SD keberadaan sperma pada anak jantan usia 28, 42 dan 56 hari serta konsentrasi sperma (butir/ml) pada anak jantan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
28	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
42	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
56	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,2 \pm 0,4	0,4 \pm 0,5
72	14,837 \pm 1,242 ^a	10,816 \pm 6,635 ^{ab}	9,863 \pm 5,666 ^{ab}	6,060 \pm 3,743 ^b

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Pengaruh Pemberian Fitoestrogen pada Anak Betina

Masuknya *estrogen-like* pada individu betina saat kebuntingan maupun saat laktasi, diduga dapat berinteraksi positif saat organogenesis alat reproduksi yang akan berpengaruh pada kinerja reproduksi setelah hewan tersebut dewasa. Hasil pengamatan terhadap individu betina setelah mendapatkan fitoestrogen pada diuraikan di bawah ini.

Jarak celah anogenital

Salah satu parameter yang diambil untuk melihat pengaruh paparan fitoestrogen pada saat kebuntingan dan menyusui adalah melihat jarak celah anogenital. Hasil pengamatan jarak celah anogenital usia 15 dan 21 hari ditunjukkan pada Tabel 6.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh pemberian fitoestrogen terhadap jarak celah anogenital baik usia 15 hari maupun 21 hari. Hal ini sesuai dengan apa yang telah diungkapkan oleh Tosen *et al.* (2006). Kehadiran agen estrogenik pada tahap awal perkembangan anak dapat memacu berbagai reaksi dalam tubuh, yang salah satunya merangsang percepatan pertumbuhan organ reproduksi. Manifestasi yang ditimbulkan dari hal ini adalah kemungkinan terjadinya perubahan onset pubertas (usia datangnya pubertas). Hughes *et al.* (2004) mengatakan bahwa paparan DES pada saat kebuntingan dan laktasi menyebabkan perubahan onset pubertas dan jarak anogenital (*anogenital distance*) pada saat lepas sapih. Namun hal ini tidak terjadi pada penelitian ini mungkin disebabkan kurang kuatnya afinitas fitoestrogen yang digunakan dibanding dengan DES.

Tabel 6. Rataan \pm SD jarak celah anogenital (mm) hewan betina pada usia 15 dan 21 hari pada setiap kelompok perlakuan.

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
15	6,70 \pm 0,35	6,27 \pm 1,42	6,87 \pm 1,29	6,60 \pm 0,61
21	9,13 \pm 1,60	9,20 \pm 1,35	8,70 \pm 0,40	8,68 \pm 1,80

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Bobot Ovarium

Ovarium adalah organ reproduksi primer yang mempunyai peran ganda yaitu sebagai kelenjar eksokrin yang menghasilkan ovum dan sebagai endokrin yang menghasilkan hormon-hormon reproduksi. Fungsi reproduksi hewan betina merupakan hasil kerjasama antara hormon gonadotropin dan hormon ovarium. Oleh sebab itu, salah satu ukuran untuk melihat kemampuan reproduksi hewan betina adalah ovarium. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh fitoestrogen pada bobot ovarium hewan betina usia 28, 42, 56 dan 72 hari. Hasil penelitian ditampilkan pada Tabel 7

Pada usia 28 hari, fitoestrogen mempengaruhi bobot ovarium ($p < 0,01$). Perbedaan terlihat pada pemberian fitoestrogen saat laktasi, yang menunjukkan bobot ovarium yang lebih kecil bila dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain termasuk kontrol. Sebaliknya, pemberian fitoestrogen pada induk baik pada saat kebuntingan maupun pada saat laktasi, terbukti mempengaruhi bobot ovarium pada saat usia 42 hari ($p < 0,01$), 56 hari ($p < 0,01$) dan 72 hari ($p < 0,05$). Bobot ovarium kelompok perlakuan fitoestrogen terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Tingginya bobot ovarium diduga karena masuknya fitoestrogen dari induk ke anak baik melalui plasenta maupun melalui air susu pada saat perkembangan. Fitoestrogen akan berikatan dengan reseptor estrogen pada ovarium dan akan mengaktivasi sel dan menginduksi produksi dan proliferasi sel-sel ovarium sehingga terjadi penambahan jumlah sel dalam ovarium yang akan meningkatkan massa ovarium (Suttner *et al.* 2005).

Tabel 7. Rataan \pm SD bobot ovarium (gram) anak betina usia 28, 42, 56 dan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
28	0,0196 \pm 0,0051 ^{ab}	0,0210 \pm 0,0014 ^a	0,0159 \pm 0,0022 ^{bc}	0,0132 \pm 0,0019 ^c
42	0,0149 \pm 0,0050 ^d	0,0367 \pm 0,0041 ^{ab}	0,0349 \pm 0,0052 ^{ab}	0,0304 \pm 0,0008 ^{bc}
56	0,0617 \pm 0,0012 ^{cd}	0,0907 \pm 0,0053 ^b	0,0610 \pm 0,0071 ^{cd}	0,0630 \pm 0,0095 ^{cd}
72	0,0944 \pm 0,0146 ^b	0,1249 \pm 0,0150 ^a	0,0907 \pm 0,0046 ^b	0,0929 \pm 0,0036 ^b

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p > 0,05$); tn=tidak nyata

Bobot Uterus

Uterus sangat berperan penting bagi perkembangan dan diferensiasi embrio, tempat implantasi dan sebagai penunjang fetus sampai waktu normal kelahiran. Estrogen menyebabkan meningkatnya vaskularisasi dan aktivitas mitosis uterus yang lebih besar sehingga mengakibatkan organ bertambah besar. Oleh sebab itu, salah satu ukuran untuk melihat kemampuan reproduksi hewan betina adalah uterus. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh fitoestrogen pada bobot uterus hewan betina usia 28, 42, 56 dan 72 hari. Hasil penelitian pada bobot uterus anak betina ditampilkan pada Table 8.

Tabel 8. Rataan \pm SD bobot uterus (gram) anak betina usia 28, 42, 56 dan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
28	0,0339 \pm 0,0089	0,0378 \pm 0,0097	0,0357 \pm 0,0024	0,0284 \pm 0,0053
42	0,0360 \pm 0,0051 ^c	0,0790 \pm 0,0124 ^{ab}	0,0657 \pm 0,0019 ^b	0,0823 \pm 0,0027 ^a
56	0,1897 \pm 0,0575 ^b	0,1751 \pm 0,0391 ^b	0,2743 \pm 0,0544 ^a	0,1921 \pm 0,0605 ^b
72	0,3134 \pm 0,0453 ^{cd}	0,4158 \pm 0,0375 ^a	0,3608 \pm 0,0280 ^{bc}	0,3001 \pm 0,0497 ^d

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p>0.05$); tn=tidak nyata

Pemaparan fitoestrogen pada saat kebuntingan atau masa laktasi tidak mempengaruhi bobot uterus anak saat berusia 28 hari. Hal ini dapat dimaklumi karena pada usia tersebut, hewan coba belum mencapai dewasa kelamin. Hadirnya fitoestrogen pada tubuh anak baik secara transplasental maupun melalui air susu telah dibuktikan oleh Franke & Custer (1998) tetapi pada penelitian ini pengaruh masuknya fitoestrogen belum nampak pada usia 28 hari.

Sejalan dengan bobot ovarium, bobot uterus anak betina terlihat berbeda nyata pada usia 42 hari ($p<0,01$), 56 hari ($p<0,01$) dan 72 hari ($p<0,05$). Pemaparan fitoestrogen ini terbukti meningkatkan bobot uterus pada kelompok perlakuan fitoestrogen bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Fitoestrogen kedelai, seperti halnya estrogen memiliki aktivitas *uterotherpic* yang menyebabkan peningkatan masa uterus (Ford *et al.* 2006). Santell *et al.* (1997) membuktikan adanya hubungan ketergantungan dosis (*dose-dependent*)

terhadap peningkatan bobot uterus oleh fitoestrogen. Genestein (isoflavon) bekerja dalam cara yang sama dengan estradiol, yaitu dengan berikatan pada ER dan kompleks reseptor-ligand untuk meninduksi ekspresi dari gen yang responsif terhadap estrogen, sehingga terjadi peningkatan massa uterus. Efek ini masih terlihat dengan pemberian fitoestrogen genestein pada dosis 375 µg/gr diet (Santell *et al.* 1997).

Kadar Progesteron

Progesteron adalah hormon steroid yang disekresikan oleh sel-sel teka interna dan granulosa folikel ovarium. Estradiol dan progesteron bekerja pada uterus dengan jalan merangsang hipertrofi sel-sel epitel dan sintesis protein organel. Oleh sebab itu, salah satu ukuran untuk melihat kemampuan reproduksi hewan betina adalah kadar progesteron. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh fitoestrogen pada kadar progesteron hewan betina usia 56 dan 72 hari. Hasil penelitian pengaruh fitoestrogen pada bobot uterus anak betina ditampilkan pada Table 9.

Pemberian fitoestrogen pada induk baik pada saat kebuntingan maupun pada saat laktasi, terbukti mempengaruhi kadar progesteron tikus usia 56 hari ($p < 0,01$) dan 72 hari ($p < 0,01$). Kadar progesteron terlihat lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol. Semua perlakuan fitoestrogen memiliki kadar progesteron yang lebih besar bila dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 9. Rataan \pm SD kadar progesteron darah (ng/ml) anak betina usia 56 dan 72 hari pada setiap kelompok perlakuan

Usia (hari)	Kelompok Perlakuan			
	K	AW	AK	LAK
56	11,001 \pm 1,359 ^a	16,409 \pm 1,551 ^{cd}	19,822 \pm 1,199 ^b	15,664 \pm 1,822 ^d
72	21,665 \pm 4,100 ^b	38,727 \pm 15,503 ^a	24,970 \pm 1,520 ^b	21,998 \pm 4,955 ^b

Keterangan:

Huruf *superscript* yang sama pada baris yang sama menunjukkan bahwa data tidak berbeda nyata ($p > 0.05$); tn=tidak nyata

Pembahasan Umum

Pemberian fitoestrogen pada penelitian ini tidak dilakukan pada anak, tetapi pada induk bunting dan laktasi. Sejumlah fitoestrogen pada induk akan

mengalami degradasi dan penurunan selama perjalanannya dari tubuh induk hingga akhirnya sampai ke tubuh anak. Penurunan ini terutama terjadi ketika proses absorpsi di tubuh induk, sirkulasi dalam darah, kemampuan perfusi pada plasenta, serta hadirnya dalam air susu (Franke & Custer, 1996). Selain faktor induk, kemampuan absorpsi oleh anak tikus juga berpengaruh pada penurunan aktivitas fitoestrogen tersebut (Hughes *et al.* 2004). Pada penelitian ini, paparan efektif oleh fitoestrogen yang berasal dari susu kedelai fermentasi ataupun ekstrak tempe pada anak tikus tidak diketahui, karena pemeriksaan kadar fitoestrogen serum anak tidak dilaksanakan.

Prinsip kerja hormon sangat dipengaruhi oleh reseptor. Hormon hanya akan bekerja seandainya pada sel target memiliki reseptor hormon tersebut. Fitoestrogen, walaupun bukan hormon namun karena strukturnya yang mirip dengan estradiol dapat pula menduduki reseptor estrogen dan mampu menimbulkan efek layaknya estrogen endogenous sendiri (Harrison *et al.* 1999). Organ yang dipengaruhi oleh fitoestrogen antara lain ovarium, uterus, testis, prostat, dan beberapa organ lainnya (Tsourounis, 2004). Walaupun afinitas terhadap reseptor estrogen tidak setinggi estradiol namun fitoestrogen mampu menimbulkan efek estrogenik (Sheehan, 2005). Kim *et al.* (1998) berpendapat bahwa aktivitas dan implikasi klinis fitoestrogen sangat tergantung pada jumlah reseptor estrogen, letak reseptor estrogen, dan konsentrasi estrogen endogen yang mampu bersaing.

Sebagian besar parameter yang digunakan dalam penelitian ini adalah komponen yang dipengaruhi secara langsung oleh fitoestrogen. Pemberian fitoestrogen pada induk bunting atau menyusui, terbukti memberikan pengaruh terhadap kinerja reproduksi sejak hewan berusia 42 hari. Penelitian yang telah dilakukan Todaka *et al.* (2005) tentang pemaparan fitoestrogen pada fetus dan status fitoestrogen antara induk dan fetus pada saat kebuntingan telah menunjukkan bukti bahwa fitoestrogen dapat ditransfer dari induk ke fetus. Di dalam serum fetus dapat ditemukan genestein, daidzein, equol, coumestrol dengan laju deteksi sebesar 100, 80, 35, dan 0%. Selain itu, diketahui bahwa kadar genestein dan daidzein lebih tinggi pada *cord* (tali pusar) dibandingkan serum induk, dan hal ini berkebalikan untuk equol dimana kadarnya lebih tinggi pada

serum induk. Penelitian ini melaporkan pula bahwa terdapat perbedaan tingkat metabolit dan ekskresi fitoestrogen antara induk dan fetus. Fitoestrogen cenderung bertahan lama di dalam tubuh fetus dibandingkan tubuh induk. Penelitian yang dilakukan oleh Degen *et al.* (2002) juga mengatakan hal yang sama, bahwa plasenta tidak mempunyai pembatas terhadap genestein atau estrogenik isoflavon lainnya karena struktur molekulnya mirip dengan estrogen endogenous yang berukuran kecil sehingga mampu dengan mudah berdifusi menembus membran plasenta.

Pemberian fitoestrogen pada periode laktasi juga berpengaruh pada kinerja reproduksi. Lewis *et al.* (2003), menyatakan bahwa fitoestrogen dapat ditransfer melalui air susu, namun kadarnya kecil sehingga paparan efektif tidak tercapai. Untuk memberikan efek yang nyata, maka fitoestrogen perlu ditransfer dalam jumlah yang cukup antara induk dan anak. Anak akan menerima sejumlah fitoestrogen melalui plasenta dan atau lewat air susu induk.

KESIMPULAN

Pemberian fitoestrogen yang berasal dari ekstrak tempe pada saat bunting dan menyusui dapat mempengaruhi kinerja reproduksi anak jantan hingga usia prapubertas. Sedangkan pada anak betina pemberian fitoestrogen mempengaruhi kinerja reproduksi hingga usia dewasa kelamin.

UCAPAN TERIMA KASIH

1. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberi dana penelitian ini.
2. LPPM-IPB yang telah memfasilitasi penelitian ini

DAFTAR PUSTAKA

- Albertazzi P. 2002. Purified phytoestrogenes in postmenopausal bone health: Is there a role for genistein ? *Climacteric*2: 190–196.
- Astuti S. 1999. Pengaruh tepung kedelai dan tempe dalam ransum terhadap fertilisasi tikus percobaan [Thesis]. Bogor: Pascasarjana IPB.

- Bhatena S, Ali A, Mohamed A, Hansen C, and Velasquez M. 2002. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglycerides and uric acid levels in animal models. *J. Nutr. Biochem.* 13: 684–689.
- Dai Q, Franke AA, Yu H, Shu XO, Jin F, Hebert, JR, Custer LJ, Gao YT, and Zheng W. 2003. Urinary phytoestrogens excretion and breast cancer risk: Evaluating potential effects modifiers, endogenous estrogens and anthropometrics. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 497–502.
- Degen GH, Janning P, Diel P, Michna H, dan Bolt HM. 2002. Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Arch Toxicol.* 76(1): 23–29.
- Ford JA Jr, Clark SG, Walters EM, Wheeler MB dan Hurley WL. 2006. Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts. *J. Anim Sci.* 84:834–842.
- Franke AA, Custer LJ, Tanaka Y. 1998. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 (Suppl): 1466S–1473S.
- Harrison RM, Phillippi PP, Swan KF, dan Henson MC. 1999. Effect of genistein on steroid hormone production in the pregnant rhesus monkey. *Society for Experimental Biology and Medicine* vol 22.
- Hughes CL, Liu G, Beall S, Foster WG, Davise V. 2004. Effect of Genistein or Soy Milk During Late Gestation and Lactation on Adult Uterine Organization in The Rat. *Exp Biol Med* 229: 108–117.
- Kim H, Peterson TG, dan Barnes S. 1998. Mechanism of action of the soy isoflavone genestein: emerging role of its effects through transforming growth factor beta signaling. *Am. J. Clin Nutr.* 68: 1418S–1425 S.
- Kusumorini N, Aryani SS dan Syafri Edwar. 2000. Pengaruh posisi anak tikus betina dalam uterus induk terhadap kemampuan reproduksinya. *Prosiding Seminar Nasional Biologi XVI*: 237–24.
- Lamartiniere CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, and Elgavish A. 2002. Genistein chemoprevention: Timing and mechanism of action in murine mammary and prostate. *J. Nutr.* 132: 552S–558S.
- Lewis R, Brooks N, Milburn G, Soames A, Stone S, Hall M, and Ashby J. 2003. The effects of the phytoestrogens genistein on the postnatal development in the rat. *Toxicol. Sci.* 71: 74–83.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, and Korach KS. 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cell. *Toxicol. Sci.* 80: 14–25.

- Santell RC, Chang YC, Muralee GN, dan William GH. 1997. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic / pituitary axis in rats. *J. Nutr.* 127: 263–269.
- Sheehan DM. 2005. The case for expanded phytoestrogen research. *Proc Soc Exp Biol Med* 208: 3–5.
- Todaka E. 2005. Fetal exposure to phytoestrogens—The difference in phytoestrogen status between mother and fetus. *Environmental Research*, 99(2):195-203.
- Tousen Y, Umeki M, Nakashima Y, Ishimi Y dan Ikegami S. 2006. Effects of genistein, an isoflavone, on pregnancy outcome and organ weights of pregnant and lactating rats and development of their suckling pups. *J Nutr. Sci. Vitaminol*, 52:174–182.
- Tsourounis C. 2004. Clinical Effects of Fitoestrogens. *Clinical Obstetrics and Gynecology* 44 (4): 836–842.
- Tuohy P. 2003. Soy infant formula and phytoestrogens. *J. Pediatr. Child Health*. 39: 401–405.
- You L. 2004. Phytoestrogens genistein and its pharmacological interactions with synthetic endocrine-active compounds. *Current Pharm. Des.* 10: 2749–2757.

**SINTESIS SCAFFOLDS HIDROKSIAPATIT BERPORI BERBASIS
CANGKANG TELUR DAN KITOSAN DENGAN METODE SOL GEL**
(Synthesis of Porous Hydroxyapatite Scaffolds Based on Chicken's Eggshell and
Chitosan by Sol Gel Method)

**Setia Utami Dewi, Setyanto Tri Wahyudi, Parmita Aulia,
Nur Aisyah Nuzulia**
Dep. Fisika, Fakultas Matematika dan IPA, IPB.

ABSTRAK

Senyawa hidroksiapatit (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) merupakan senyawa keramik yang umum digunakan untuk material tulang karena memiliki sifat bioaktif yang baik, yakni mampu berinteraksi dengan jaringan tubuh, biokompatibel dan osteokonduktif. Dalam penggunaannya pada implantasi tulang, bentuk *scaffolds* dapat digunakan sebagai templet pertumbuhan tulang baru disekitar jaringan. Untuk meningkatkan kemampuan infiltrasi sel untuk berdiferensiasi dan proliferasi pada proses remodelling diperlukan pori-pori pada biomaterial tulang ini. Pada penelitian ini dilakukan sintesis *scaffold* hidroksiapatit berpori dengan menggunakan cangkang telur sebagai sumber kalsium pada sintesis hidroksiapatit dan kitosan kulit udang sebagai porogen. Distribusi pori yang dihasilkan cukup seragam. Semakin tinggi bobot kitosan yang ditambahkan ukuran partikel semakin tinggi dan ukuran pori semakin besar. Penambahan bobot kitosan mengurangi interkoneksi pori. Ukuran pori-pori yang dihasilkan bervariasi dari 0,2–0,4 mikron. Dengan waktu sintering 900°C dan densifikasi 900°C diperoleh struktur kristal hidroksiapatit dan trikalsium fosfat. Hasil ini memberikan informasi bahwa kitosan dapat digunakan sebagai porogen pada pembuatan *scaffold* hidroksiapatit berpori. Untuk meningkatkan ukuran pori dapat digunakan kitosan dengan ukuran partikel yang lebih besar.

Kata kunci: Scaffold, hidroksiapatit, berpori, kitosan, sol gel.

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) is commonly material used as bone's material because it is bioactive that has excellent chemical and biological affinity with bony tissues, biocompatible and osteoconductive. In bone application, a scaffolding form is used either to induce formation of bone from surrounding tissue. To improve the ability to differentiate cell infiltration and proliferation in the process of remodeling needed pores in the bone biomaterial. In this research, synthesis of scaffold hydroxyapatite porous used eggshells as a calcium source and chitosan shells as porosifier. The resulting pore distribution is quite uniform. The higher the weight of chitosan is added the higher particle size and pore size increases. The addition of chitosan weight was reducing pore interconnectivity. Pore size varied from 0.2 to 0.4 produced tang microns. With time sintering at 900°C and densification at 900°C obtained the crystal structure of hydroxyapatite and tricalcium phosphate. These results provide information that chitosan can be used as a porosifier in the synthesis of scaffolds porous hydroxyapatite. In order to increase the pore size can be used chitosan with larger particle sizes.

Keywords: Scaffold, hydroxyapatite, porous, chitosan, sol gel.

PENDAHULUAN

Penelitian biomaterial untuk keperluan medis terutama pada tulang merupakan salah satu topik penelitian yang banyak ditekuni akhir-akhir ini karena tingginya kebutuhan akan material biomedis ini. Di Indonesia, material biomedis untuk substitusi dan pengobatan tulang masih bergantung pada barang impor dari berbagai negara seperti Jerman, Korea, dan Jepang. Biomaterial tulang yang umum digunakan adalah kelompok senyawa biokeramik. Biokeramik yang digunakan pada bidang ortopedik haruslah bersifat bioaktif, biokompatibel, osteokonduktif, osteoinduktif, serta memiliki sifat mekanik yang kuat. Senyawa hidroksiapatit (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) merupakan senyawa keramik yang memiliki sifat bioaktif yang baik, yakni mampu berinteraksi dengan jaringan tubuh, biokompatibel dan osteokonduktif (Heise *et al.* 1990; De Groot, 1980). Dalam penggunaannya pada implantasi tulang, bentuk *scaffolds* dapat digunakan sebagai templet pertumbuhan tulang baru disekitar jaringan (Vacanti and Bonassar, 1999). Untuk meningkatkan kemampuan infiltrasi sel untuk berdiferensiasi dan proliferasi pada proses remodelling diperlukan pori-pori pada biomaterial tulang ini (Cerroni et al. 2002).

Hidroksiapatit berpori dapat dihasilkan dengan berbagai metode. Beberapa teknik yang dikembangkan adalah dengan mencampurkan polimer seperti Polymethylmethacrylate (PMMA) pada HA serbuk, *gel casting* pada *foam*, dan penggunaan *polymer sponge* (Sepulveda, 1997; Woyansky et al. 1992).

Pada penelitian ini dilakukan sintesis *scaffold* HA berpori dengan menggunakan cangkang telur sebagai sumber kalsium pada sintesis HA dan kitosan kulit udang sebagai porogen. Cangkang telur ini digunakan karena 90% kandungannya senyawa kalsium karbonat. Kitosan yang digunakan sebagai porogen karena merupakan polimer alami yang sudah banyak digunakan pada bidang medis dengan sifat biodegradasi dan biokompatibel yang baik. Metode yang digunakan adalah dengan menambahkan polimer kitosan pada prekursor HA dengan metode *sol gel*. Morfologi, ukuran, dan distribusi pori *scaffold* HA berpori dikarakterisasi menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM). Struktur kristal dan kandungan gugus fungsi kimia dikarakterisasi dengan difraktometer

sinar-X dan spektrometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR) secara berurutan. Penggunaan prekursor alami yaitu cangkang telur dan kitosan diharapkan mampu menambah sifat biokompatibilitas *scaffold* HA berpori.

METODE PENELITIAN

Sintesis *scaffold* HA berpori diawali dengan kalsinasi cangkang telur ayam pada suhu 1.000°C selama 5 jam. Hasil kalsinasi diperoleh serbuk kalsium dalam bentuk senyawa kalsium oksida yang digunakan sebagai prekursor kalsium dalam sintesis HA. Sintesis hidroksiapatit berpori dilakukan dengan metode *sol gel*.

Sintesis dilakukan dengan merekasikan larutan larutan kalsium 0,5 M dan larutan fosfat 0,3 M. Senyawa fosfat diperoleh dari diammonium hidrogen fosfat. Pelarutan kedua senyawa dilakukan dengan menggunakan etanol 96%. Kedua larutan tersebut direaksikan dengan metode titrasi pada temperatur ruang dan diaduk dengan *magnetic stirrer* selama 15 menit dengan kecepatan putar 500 rpm. Kemudian dipanaskan sampai suhu 60°C dan diaduk *magnetic stirrer* dengan kecepatan putar 500 rpm sampai membentuk sol gel. Hasil sol gel didiamkan pada suhu ruang selama 12 jam. Selanjutnya sejumlah serbuk kitosan mikrokristalin ditambahkan. Homogenisasi dilakukan dengan mengaduk selama 3 jam. Sol gel yang homogen selanjutnya dimoulding pada mould dengan diameter 1 cm dan dipanaskan dalam furnace pada suhu 900°C selama 5 jam untuk menghilangkan kitosan. Untuk densifikasi, dilakukan pemanasan lagi pada suhu 900°C selama 5 jam. Variasi yang dilakukan pada sintesis *scaffold* HA berpori yaitu bobot kitosan yang ditambahkan. Variasi dapat dilihat pada Tabel 1.

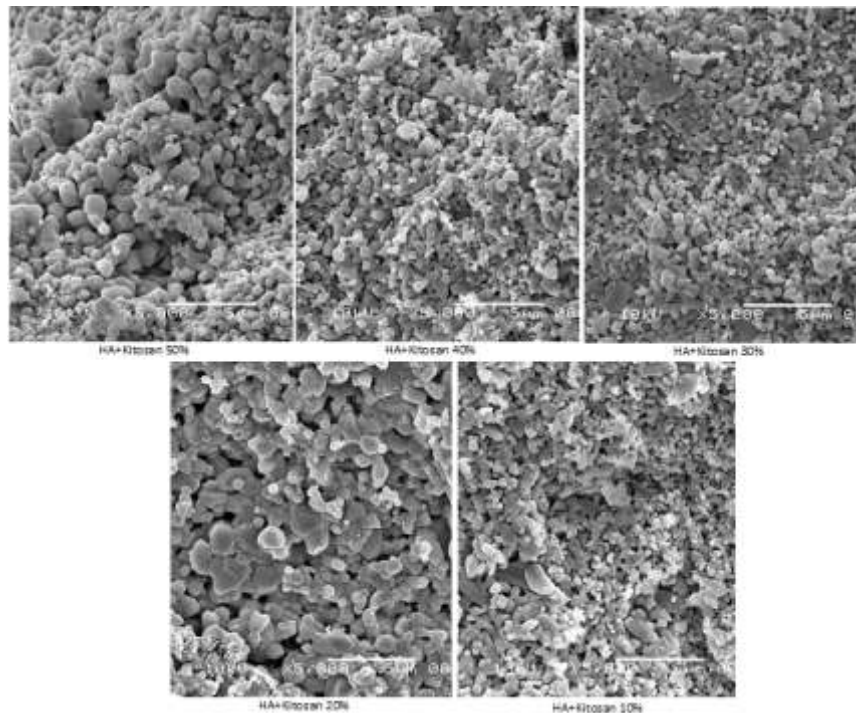
Tabel 1. Variasi komposisi HA dan kitosan pada sintesis *scaffold* HA berpori

No	Nama Sampel	Komposisi (% b/b)	
		HA	Kitosan
1	HA+Kitosan 50%	50	50
2	HA+Kitosan 40%	60	40
3	HA+Kitosan 30%	70	30
4	HA+Kitosan 20%	80	20
5	HA+Kitosan 10%	90	10

Sampel hidroksiapatit berpori yang diperoleh dikarakterisasi difraktometer sinar-X, spektrometer FTIR, dan *Scanning Electron Microscope*. Karakterisasi difraksi sinar-x ini dilakukan dengan menggunakan difraktometer SHIMADZU. SEM yang digunakan JEOL. spektrometer FTIR yang digunakan ABB MB 3200.

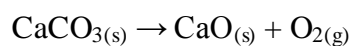
HASIL DAN PEMBAHASAN

Lebih dari satu dekade, pengembangan kalsium fosfat sebagai biomaterial tulang berfokus pada fabrikasi 3D HA berpori. Pembentukan interkoneksi yang baik antarpori dapat meningkatkan sifat mekanik *scaffold* dan kemampuan mineralisasi tulang.

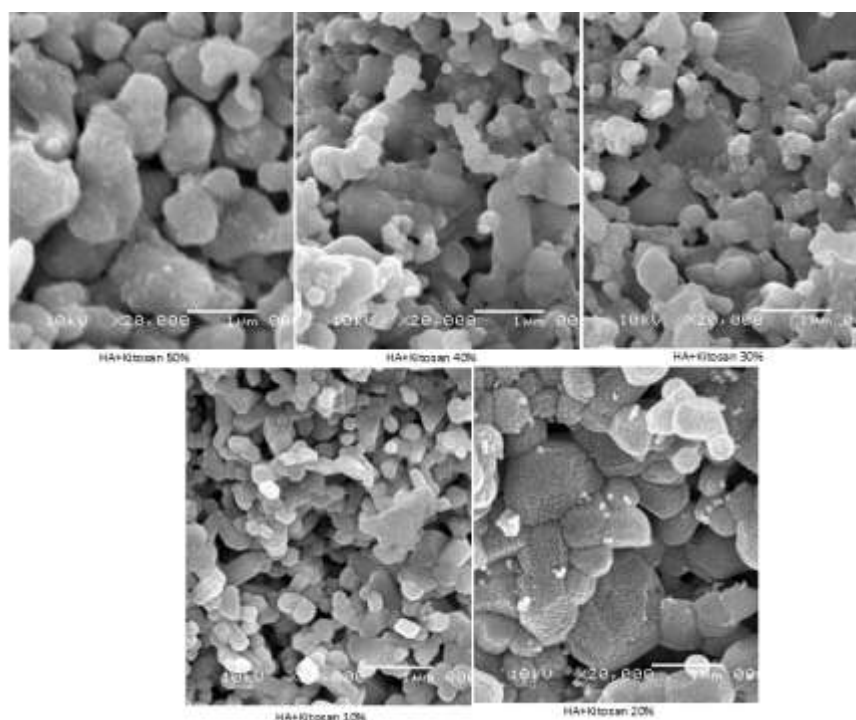


Gambar 1. Mikrograf untuk *scaffold* HA berpori dengan perbesaran 5000 kali.

Pada penelitian ini digunakan senyawa kalsium oksida yang diperoleh dari hasil kalsinasi cangkang telur ayam yang memiliki kandungan kalsium karbonat secara dominan. Perubahan fase dari kalsium karbonat menjadi kalsium oksida disebabkan karena adanya proses pemanasan. Persamaan reaksi kimia diperlihatkan sebagai berikut:



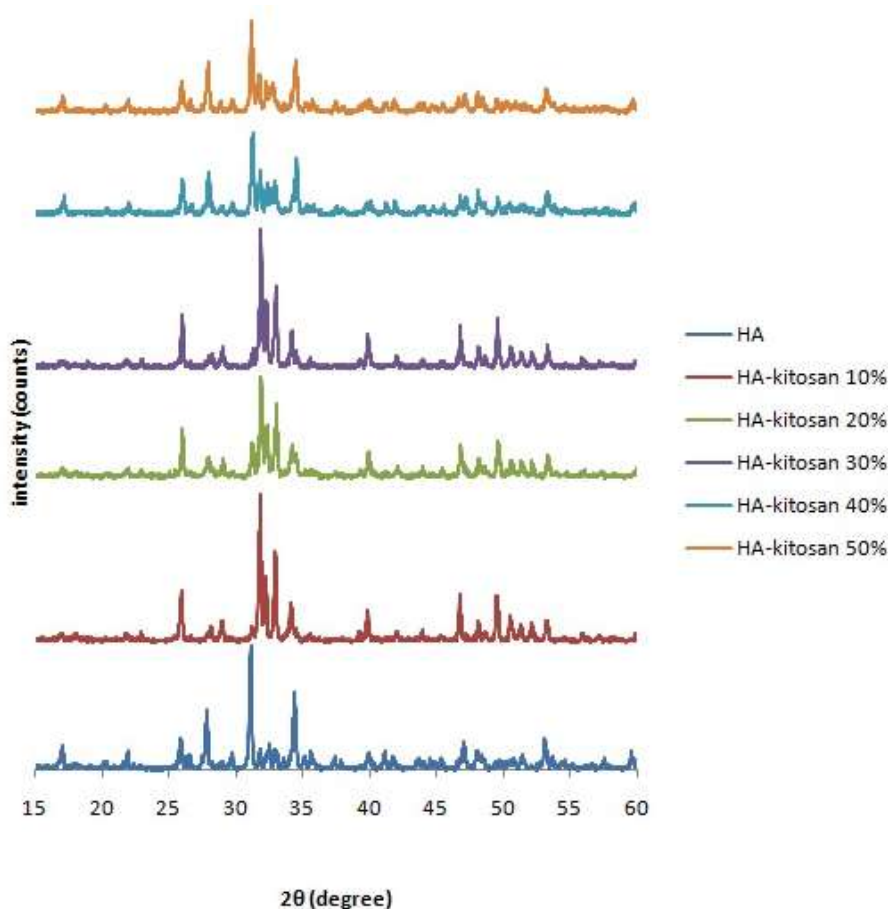
Efisiensi senyawa kalsium oksida yang dihasilkan adalah 53% dengan kandungan kalsium 70%. Senyawa inilah yang digunakan untuk sintesis *scaffold* HA berpori. Sintesis *scaffold* dilakukan dengan metode sol gel. Pada teknik ini digunakan pelarut etanol sebagai pelarut volatil untuk menghasilkan bentuk sol gel. *Scaffold* HA berpori diperoleh dari proses densifikasi dengan proses sintering. Pada proses sintering terjadi eliminasi kitosan sebagai porogen dan proses difusi atom sehingga proses kristalisasi semakin banyak. Morfologi *scaffold* yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 2. Mikrograf untuk *scaffold* HA berpori dengan perbesaran 20.000 kali.

Pada semua sampel terlihat sudah terbentuk pori-pori dengan ukuran yang hampir sama, namun terdapat perbedaan distribusi partikel HA dan pori serta interkoneksi pori. Distribusi pori semakin tinggi komposisi kitosan maka pori yang dihasilkan lebih banyak dengan ukuran yang lebih besar. Pada sampel penambahan kitosan 10-40% interkoneksi antarpori sudah terlihat saling terhubung dengan seragam, namun pada sampel kitosan 50% interkoneksi pori sangat kecil sehingga yang terlihat adalah partikel-partikel. Jika interkoneksi kurang baik maka sifat mekanik yang dimiliki *scaffold* menjadi lemah (Hassna and Miqin, 2003).

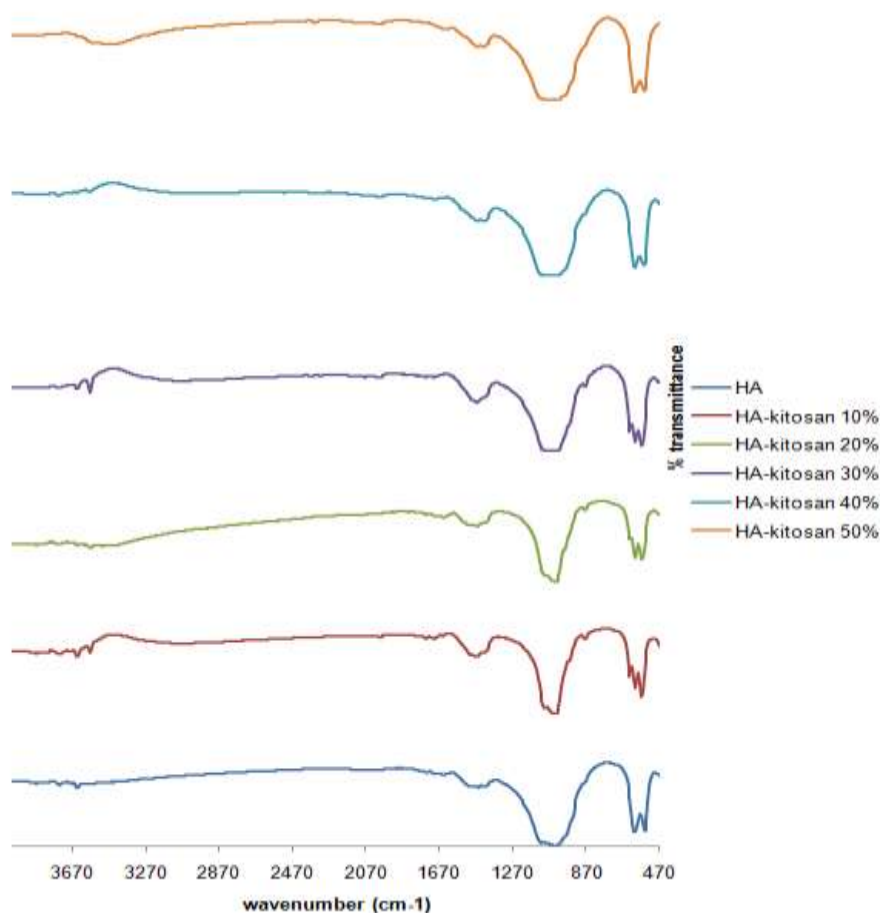
Ukuran pori dan partikel dapat dihitung dari mikrografi pada Gambar 2. Dengan perbesaran 20.000 kali. Semakin tinggi bobot kitosan yang ditambahkan menunjukkan ukuran partikel yang dihasilkan semakin besar. Pada penambahan 10% kitosan partikel yang dihasilkan partikel 0,2 mikron dengan distribusi seragam dan interkoneksi antarpori terlihat jelas. Ukuran pori 0,3-0,5 mikron. Pada penambahan kitosan partikel yang dihasilkan semakin besar dan jumlah pori juga bertambah. Untuk menambah ukuran pori harus diberikan porogen dengan ukuran pori yang lebih besar.



Gambar 3. Pola difraksi sinar-X untuk sampel scaffold HA berpori.

Berdasarkan hasil karakterisasi *difraksi sinar-X* atau XRD pada Gambar 3 terlihat bahwa pada pembuatan kontrol HA dengan metode sol gel terdapat fase trikalsium fosfat (TKF) yang ditunjukkan oleh tiga puncak tertinggi pada sudut $2\theta=31,08$; $34,32$; dan $27,74$. Pola XRD ini bersesuaian dengan database JCPDS 09-0169. Hal ini terjadi karena suhu *sintering* yang tinggi yaitu 900°C yang

bersesuaian dengan eksperimen Behnamghader yang menyatakan bahwa HA bertransformasi menjadi TKF pada suhu 800°C . Adapun penambahan kitosan pada bentuk sol pembuatan HA dengan variasi bobot 10%, 20%, dan 30% menunjukkan terbentuknya HA masing-masing pada sudut $2\theta=31,8$; $31,88$; dan $31,86$ dimana puncak ini bersesuaian dengan database JCPDS 09-0432. Penambahan kitosan pada variasi bobot tersebut tidak merubah karakteristik pola XRD sampel, hanya merubah intensitasnya saja. Namun, pada penambahan kitosan 40% dan 50% menunjukkan bahwa fase yang terbentuk pada sampel adalah fase TKF masing-masing pada sudut $2\theta=31,26$ dan $31,18$.



Gambar 4. Spektrum FTIR sampel *scaffold* HA berpori.

Spektroskopi FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi yang terkandung dalam sampel. Hasil dari spektroskopi FTIR ini mendukung hasil analisis XRD sampel. Pada Gambar 4 menunjukkan spektra FTIR dari *scaffold*

HA berpori. Hasil ini memperkuat hasil XRD dimana pada gambar tersebut menunjukkan bahwa pada pembuatan HA murni fase yang terbentuk bukan HA tetapi TKF. Hal ini ditunjukkan oleh pita serapan gugus fungsi PO^{4-} untuk TKF pada bilangan gelombang 540 cm^{-1} dan 563 cm^{-1} . Adapun spektra FTIR HA dengan penambahan kitosan sebesar 10%, 20%, dan 30% menunjukkan bahwa sampel yang terbentuk dalam fase HA ditunjukkan oleh pita serapan gugus fungsi PO^{4-} untuk HA pada rentang bilangan gelombang $550\text{-}580\text{ cm}^{-1}$ dengan karakter tiga split pita serapan sedangkan pada penambahan kitosan 40% dan 50% sampel berada pada fase TKF yang ditunjukkan dengan dua pita serapan gugus fungsi PO^{4-} untuk TKF. Pada spektrum hanya terdapat gugus fungsi senyawa HA dan TKF. Hal ini menunjukkan bahwa sudah tidak terdapat kitosan pada sampel.

KESIMPULAN

Sintesis *scaffold* HA berpori berbasis cangkang telur ayam sebagai sumber kalsium dan kitosan sebagai porogen dapat dilakukan dengan metode sol gel. Distribusi pori yang dihasilkan cukup seragam. Semakin tinggi bobot kitosan yang ditambahkan ukuran partikel semakin tinggi dan ukuran pori semakin besar. Penambahan bobot kitosan mengurangi interkoneksi pori. Ukuran pori-pori yang dihasilkan bervariasi dari 0,2-0,4 mikron. Pada penggunaannya sebagai biomaterial tulang ukuran pori ini harus diperbesar dengan menggunakan ukuran porogen yang lebih besar. Dengan waktu sintering 900°C dan densifikasi 900°C diperoleh struktur kristal HA dan TKF. Hasil ini memberikan informasi bahwa kitosan dapat digunakan sebagai porogen pada pembuatan *scaffold* HA berpori. Untuk meningkatkan ukuran pori dapat digunakan kitosan dengan ukuran partikel yang lebih besar.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih kami haturkan kepada DIPA IPB yang telah memberikan dana penelitian melalui program Hibah Penelitian Unggulan Fakultas IPB

DAFTAR PUSTAKA

- Cerroni L, Filocamo R, Fabbri M, Piconi C, Caropresso S, Condo SG. Growth of osteoblast like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study. *Biomol Eng* 2002;19:119–124.
- De Groot K. Bioceramics consisting calcium phosphate slats. *Biomaterials* 1980;1:47–50.
- Hassna Rehman Ramay, Miqin Zhang. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods. *Biomaterials* 24 (2003) 3293–3302.
- Heise, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int Orthop* 1990;14:329–338.
- Sepulveda P. Gelcasting foams for porous ceramics. *Am Ceram Soc Bull* 1997;76:61–65.
- Vacanti CA, Bonassar LJ. An overview of tissue engineered bone. *Clin Orthop* 1999;367(Suppl):S375–381.
- Woyansky JS, Scott CE, Minnear WP. Processing of porous ceramics. *Am Ceram Soc Bull* 1992;71:1674–1681.

**PRODUKSI REKOMBINAN PLANTARICIN YANG MENKODE
BAKTERIOSIN DARI *Lactobacillus plantarum* S34 ASAL ISOLAT
BEKASEM DAGING SAPI UNTUK MENANGGULANGI
DEMAM TYPHOID**

(Production of Recombinant Plantaricin Encoding Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* S34 Isolated from Bekasem Meat for Thypoid Fever Therapy)

**Suryani¹⁾, A. Zaenal Mustopa²⁾, Linda Sukmarini²⁾,
Rabiatul Adawiyah¹⁾, Hasim¹⁾**

¹⁾Dep. Biokimia, Fakultas Matematika dan IPA, IPB.

²⁾Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Bogor.

ABSTRAK

Peptida antimikroba dari bakteriosin yang dihasilkan dari bakteri asam laktat potensial untuk diterapkan pada industri pangan dan farmasi. Karakteristik bakteriosin kelas I dan II yang tahan panas sangat potensial untuk diaplikasikan pada industri. Bakteriosin dari *L. plantarum* S34 (plantaricin S34) yang di isolasi dari bekasam, fermentasi daging dari Lampung mempunyai potensi dalam menghambat bakteri patogen seperti *Salmonella typhy* dan *Listeria monocytogenes*. Bakteriosin tersebut stabil terhadap panas, berukuran 2,89 dan 8,99 kDa. Tujuan penelitian ini adalah melakukan isolasi dan karakterisasi gen *plantaricin* dari *L. plantarum* S34. Gen *plantaricin* diamplifikasi dari DNA genom *L. plantarum* S34 dengan primer spesifik menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hasil nya menunjukan 3 gen *plantaricin* EF, JK dan NC8 berhasil di isolasi dan dikarakterisasi. Analisis BLAST menunjukan gen *plantaricin* EF, JK, dan NC8 dari *L. plantarum* S34 masing-masing tersusun atas 285 bp, 267 bp dan 200 bp. Sedangkan analisis susunan asam amino *plantaricin* EF, JK dan NC8 masing-masing sebanyak 52, 57 dan 47 asam amino. Gen *plantaricin* EF sudah berhasil di kloning ke pGEMTeasy vector selanjutnya akan di subklon ke pET system untuk melihat ekspresi dari *plantaricin* tersebut. Untuk mengembangkan obat antimikroba yang aman bagi industri farmasi, maka pada penelitian ini akan dilakukan produksi rekombinan *plantaricin* pada bakteri *E.coli*.

Kata kunci: Bacteriocin, *plantaricin*, *Salmonella typhy*, *L. plantarum* S34.

ABSTRACT

Antimicrobial peptides of bacteriocins from lactic acid bacteria have received particular attention due to their potential application in the food industry and pharmaceutical. Among bacteriocins produced by lactic acid bacteria, the Class I and II have the best potential for industrial application with their small-heat stable cationic peptides. Bacteriocin from *L. plantarum* S34 (plantaricin S34) with high antimicrobial activity to pathogenic *Salmonella typhy* and *Listeria monocytogenes* has been isolated from bekasam, a traditional fermented meat from Lampung, Indonesia. The molecular weight of 2,89 kDa and 8,9 kDa heat stable-peptide *plantaricin* S34 has been identified as a Class I and II bacteriocin. In the present study, the isolation and characterization of *plantaricin* gene from *L. plantarum* S34 has been conducted. The *plantaricin* gene has been amplified from genom *L. plantarum* S34 with specific primer using *Polymerase Chain Reaction* (PCR). The results of BLAST analysis showed that *plantaricin* EF, JK and NC8 genes isolated from the *L. plantarum* S34 were 285 bp, 267 bp and 200 bp respectively. The amino acid also showed that *plantaricin* encoded by the *plantaricin* EF, JK and NC8 genes consisted of 52 amino acids, 57 amino acids and 47 amino acids, respectively.

A 365 bp of PCR product plnEF has been cloned into pGEM-T Easy vector and transformed into *Escherichia coli* DH5 α . Further, the gene fragment encoding mature plantaricin EF will be expressed in *Escherichia coli* BL21 using pET vector system.

Keywords: Bacteriocin, plantaricin, *Salmonella typhi*, *L. plantarum* S34 .

PENDAHULUAN

Penyakit tipus merupakan salah satu penyakit yang sering terjadi di masyarakat. Tipus atau demam tifoid merupakan penyakit menular dan akut. Masa inkubasi tipus pada umumnya 10-14 hari. Gejala dini mencakup demam, perut kembung, sukar buang air besar, pusing, lesu, ruam, tak bersemangat, tidak nafsu makan, mual dan muntah (Pelczar and Chan, 1988). Kondisi penderita penyakit ini biasanya parah, dan bila pengobatan tidak segera diberikan penyakit ini akan berlangsung selama beberapa minggu dan dapat menyebabkan kematian.

Penyakit demam tifoid merupakan problem yang serius bagi kesehatan masyarakat, terutama di negara-negara yang sedang berkembang seperti Indonesia yang memiliki iklim tropis. Tifoid bersifat endemik dan selalu ditemukan sepanjang tahun di Indonesia, menyerang hampir semua kelompok usia masyarakat, mulai dari usia balita, anak-anak, dan dewasa. Prevalensi tifoid menunjukkan kecenderungan meningkat dari tahun ke tahun dengan rata-rata 500 kasus per 100.000 penduduk dengan angka kematian antara 0,6–5% sebagai akibat dari keterlambatan mendapat pengobatan serta tingginya biaya pengobatan (Depkes, 2006).

Penanganan demam tifoid yang masih sering digunakan adalah istirahat, perawatan, diet, terapi penunjang, serta pemberian antibiotik. Antibiotik adalah zat kimiawi yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang mempunyai kemampuan, untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme lain. Obat antimikroba yang sering diberikan adalah kloramfenikol, tiamfenikol, kotrimoksazol, sefalosporin generasi ketiga, ampicilin, dan amoksisilin. Kloramfenikol merupakan obat pilihan utama untuk mengobati demam tifoid.

Beberapa efek samping yang mungkin timbul pada pemberian kloramfenikol adalah mual, muntah, mencret, mulut kering, stomatitis, pruritus ani, penghambatan eritropoiesis, Gray-Syndrom pada bayi baru lahir, anemia

hemolitik, exanthema, urticaria, demam, gatal-gatal, anafilaksis, dan terkadang Syndrom Stevens-Johnson. Reaksi interaksi kloramfenikol dengan paracetamol akan memperpanjang waktu paruh plasma dari kloramfenikol. Interaksinya dengan obat sitostatika akan meningkatkan resiko suatu kerusakan sumsum tulang. Pemakaian antibiotik secara irasional dapat menimbulkan kekebalan atau resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut, meningkatkan toksisitas, dan efek samping obat sehingga perlu dilakukan upaya eksplorasi alternatif agen antimikroba yang bersifat aman dalam penanggulangan demam tifoid.

Beberapa penelitian sudah dilakukan untuk menemukan obat antimikroba. Penelitian yang sudah dilakukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhii* diantaranya penggunaan rimpang temu kunci (Lestari, 2005), patikan kebo (Ambarwati, 2005), dan cacing tanah (Winarsih, 2006; Nurwati, 2006). Penelitian-penelitian tersebut dilakukan untuk mengetahui efektivitas ekstrak tanaman dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhii*.

Bakteri asam laktat dapat memproduksi substansi berupa peptida yang disebut dengan bakteriosin. Bakteriosin telah terbukti memiliki efek antimikrobal dan dapat menghambat beberapa virus seperti virus influenza A dan virus herpes simplex (Serkedjieva *et al.* 2000, Wachsmann *et al.* 2003, Todorov *et al.* 2005).

Isolat *Lactobacillus plantarum* S34 yang diisolasi dari daging bekasam (produk pangan daging terfermentasi, makanan khas Indonesia dari daerah Wae Kanan, Lampung) memiliki potensi menghambat bakteri patogen diantaranya adalah *Escherichia coli* (NBRC 14237), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6539), *Staphylococcus typhosa* (P2KIM collection), *Bacillus subtilis* (BTCC 612), dan *Listeria monocytogenesis* (BTCC B693). Sementara, virus yang aktivitasnya dapat dihambat oleh bakteriosin, khususnya bakteriosin yang dihasilkan oleh *L. plantarum* S34 adalah virus hepatitis C (Mustopa *et al.* 2010; Solehudin 2010).

METODE PENELITIAN

***Kultivasi Lactobacillus plantarum* S34**

Lactobacillus plantarum S34 yang dibiakkan dalam penelitian ini berasal dari koleksi kultur Laboratorium Bakteriologi dan Virologi Molekular, Pusat

Penelitian Bioteknologi-LIPI, Cibinong yang diisolasi dari bekasam daging sapi. Tahapan awal yang dilakukan sebelum isolasi genom *L. plantarum* kultivasi adalah peremajaan bakteri pada media MRS *broth* yang mengandung natrium azida.

Isolasi DNA Genom dari *Lactobacillus plantarum* S34

Isolasi genom *Lactobacillus plantarum* menurut Sambrook & Russell (2001) diawali dengan pemanenan pelet dari kultur bakteri, dilanjutkan dengan pelisisan sel, dan diakhiri dengan pemisahan serta pemekatan DNA. Uji kualitatif DNA (visualisasi) dilakukan melalui teknik elektroforesis agarose 1%, adapun uji kuantitatif dilakukan dengan menentukan konsentrasi dan kemurnian DNA genom melalui spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) 260/280 nm.

Amplifikasi Gen Plantaricin melalui PCR

Campuran reaksi PCR yang dibuat sebanyak 50 μ L yang terdiri dari 36.75 μ L ddH₂O, 5 μ L *buffer*, 1.5 μ L MgCl₂ 50 mM, 1.25 μ L dNTP Mix 10 mM, 0.5 μ L untuk masing-masing primer *forward* dan *reverse*, 0.5 μ L *Taq* polimerase platinum, dan 4 μ L genom hasil isolasi. Primer yang digunakan terlampir pada Tabel 3.

Tabel 3. Primer yang digunakan untuk amplifikasi gen plantaricin

No	Primer	Suhu annealing	Ukuran amplikon (bp)	Sekuen primer	Reference
1	<i>plnJK</i>	56	306	F: ACG GGG TTG TTG GGG GAG GC R: TTA TAA TCC CTT GAA CCA CC	Cho <i>et al.</i> (2010)
2	<i>plnEF</i>	60	365	F: GGT GGT TTT AAT CGG GGC GG R: ACT TGA TGG CTT GAA CTA TCC	Cho <i>et al.</i> (2010)
3	<i>plnC8</i>	60	207	F: GGT CTG CGT ATA AGC ATC GC R: AAATTGAACATATGGGTGCTTTAA ATTCC	Maldonado <i>et al</i> (2003)
4	<i>plnI.25β</i>	50	249	F: TTA GCA TTGATT GAT GGA GGA R: GCA TCC TAT GTG AGG CTG CTG	Cho <i>et al.</i> (2010)
5	<i>plnS</i>	54	466	F: ACTAAATATCACTGTGGTAAAGTA AAG R: GACCGAAACAATCATGGGAAG	Sáenz <i>et al.</i> (2009)

Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk amplifikasi gen plantaricin dilakukan dengan kondisi denaturasi awal (*initial denaturation*) pada suhu 94°C

selama 1 menit, denaturasi (*denaturation*) pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 50-60°C selama 30 detik, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit. Jumlah siklus yang dilakukan dalam proses PCR ini adalah sebanyak 35 siklus.

Sequencing dan Analisis Gen *plantaricin*

Sequencing nukleotida dilakukan pada koloni yang membawa gen *plantaricin* dengan mengisolasi plasmidnya terlebih dahulu. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode *single pass DNA sequencing*. Urutan nukleotida yang diperoleh dari hasil *sequencing* digunakan untuk menentukan kehomologian nukleotida yang dimiliki oleh gen *plantaricin* dari *L. plantarum* S34 dengan gen *plantaricin* dari *L. plantarum* lain yang terdapat *gene bank*.

Kloning gen yang menyandikan *plantaricin*

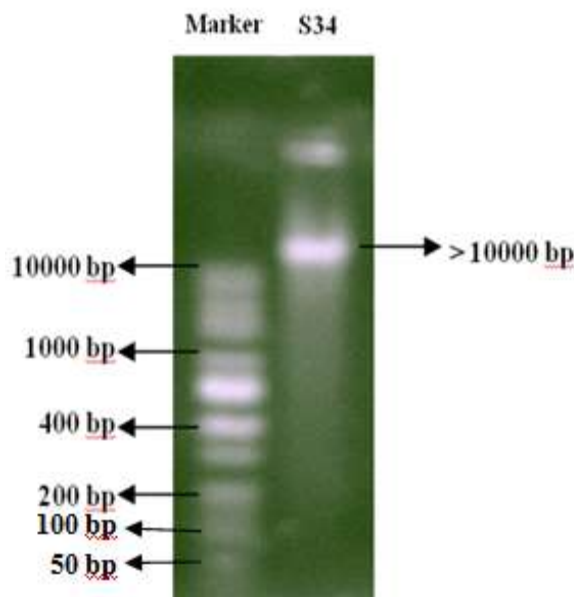
Gen *plantaricin* yang sudah dikonfirmasi dengan sekuensing selanjutnya dikloning ke dalam vektor pGEMT easy dan ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α . Hasil transformasi dengan seleksi biru putih menunjukkan adanya *E. coli* yang berwarna putih dan biru. Selanjutnya koloni yang berwarna putih yang diduga membawa gen-gen *plantaricin* diuji dengan PCR colony untuk memastikan hasil kloning disisipi oleh gen-gen *plantaricin*. Untuk mengkonfirmasi insert yang disisipkan tersebut adalah gen *plantaricin* maka dilakukan sekuensing pada plasmid rekombinan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA Genom dari *Lactobacillus plantarum* S34

Isolasi genom *Lactobacillus plantarum* menurut Sambrook & Rusell (2001) diawali dengan pemanenan pelet dari kultur bakteri, dilanjutkan dengan pelisisan sel, dan diakhiri dengan pemisahan serta pemekatan DNA. Uji kualitatif DNA (visualisasi) dilakukan melalui teknik elektroforesis agarose 1%, adapun uji kuantitatif dilakukan dengan menentukan konsentrasi dan kemurnian DNA genom melalui spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) 260/280 nm. Hasil uji kualitatif DNA genom yang diperoleh dari *L. plantarum* S34 memiliki ukuran

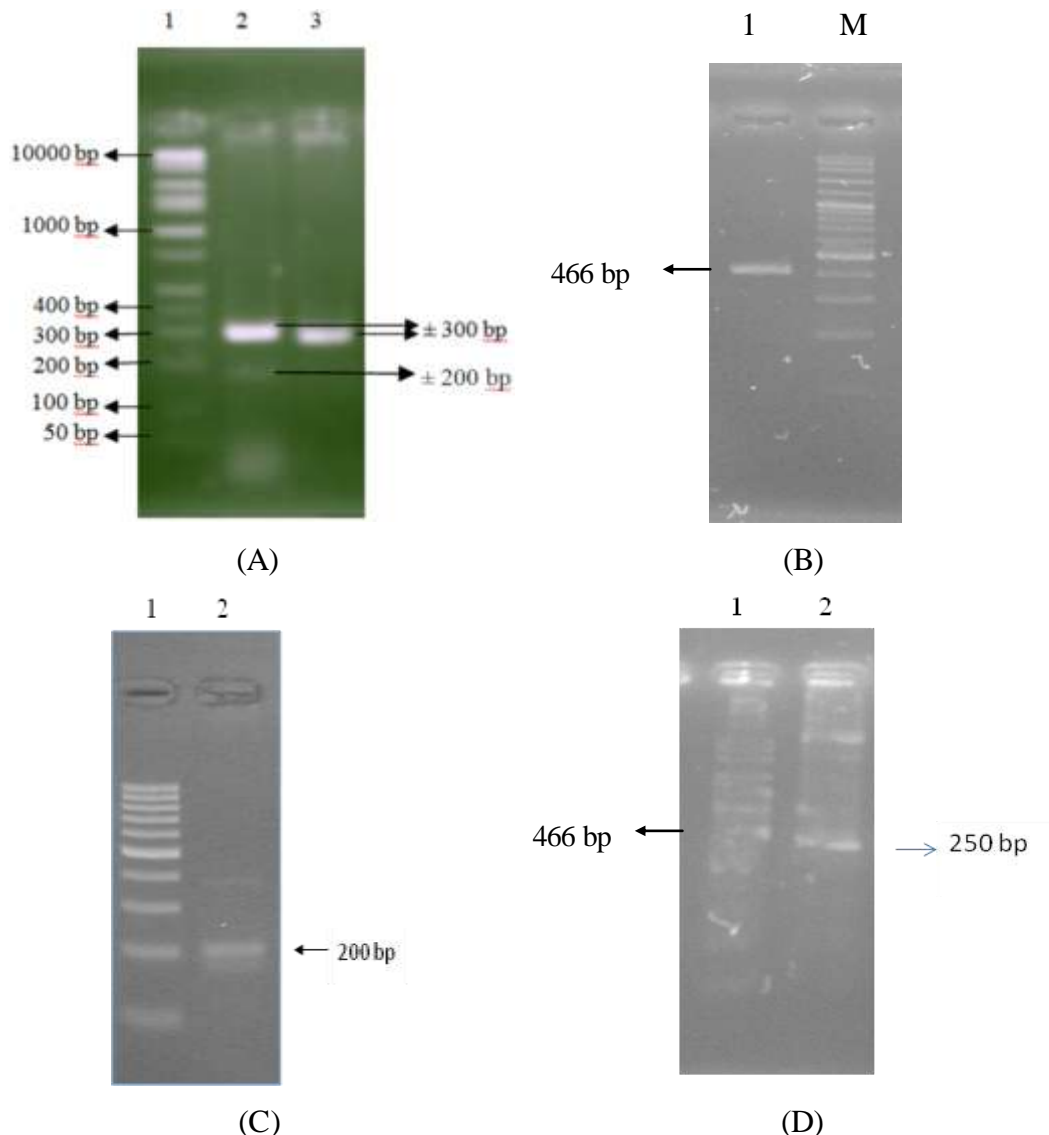
lebih dari 10 Kb (Gambar 1). Hasil uji kuantitatif menunjukkan bahwa DNA hasil isolasi memiliki konsentrasi sebesar 76.4 ng/ μ L dan kemurnian sebesar 0.195. DNA genom yang diperoleh dari *L. plantarum* S34 digunakan sebagai cetakan DNA untuk amplifikasi gen *plantaricin* melalui PCR.



Gambar 1. DNA genom *L. plantarum* S34.

Amplifikasi Gen Plantaricin melalui PCR

Polymerase Chain Reaction (PCR) untuk amplifikasi gen *plantaricin* dilakukan dengan kondisi denaturasi awal (*initial denaturation*) pada suhu 94°C selama 1 menit, denaturasi (*denaturation*) pada suhu 94°C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 50-60°C selama 30 detik, pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan pemanjangan akhir (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit. Jumlah siklus yang dilakukan dalam proses PCR ini adalah sebanyak 35 siklus. Hasil amplifikasi gen menunjukkan pita pada ukuran 365 bp (pInEF), 300 bp (pInJK), 460 bp (pInS), 200 bp (pIn NC8) dan 250 bp (pIn 1,25 β) (Gambar 2 A, B, C dan D). Hal ini sesuai dengan product PCR Cho dkk, 2010, pIn EF 365 bp, pIn JK (306 bp), pIn 1,25 β 249 bp; Suez dkk 2009 pInS 466 bp dan Maldonado dkk 2003 pIn NC8 2007 bp.



Gambar 2. (A) Amplikon gen *plantaricin* EF dan JK dari *L. plantarum* S34: 1) marker; 2) gen *plantaricin* EF; 3) gen; (B) Amplikon gen *plantaricin* S dari *L. plantarum* S34. M) marker; 1) gen *plantaricin*; (C) Amplikon gen *plantaricin* NC8 dari *L. plantarum* S34: 1) marker; 2) gen *plantaricin* NC8; dan (D) Amplikon gen *plantaricin* 1,25 β dari *L. plantarum* S34: 1) marker; 2) gen *plantaricin* 1,25 β .

Sequencing dan Analisis Gen *plantaricin*

Sequencing nukleotida dilakukan pada hasil PCR *product* untuk memastikan bahwa yang diisolasi tersebut adalah gen *plantaricin*. Sekuensing dilakukan dengan menggunakan metode *single pass DNA sequencing*. Urutan nukleotida yang diperoleh dari hasil *sequencing* digunakan untuk menentukan kehomologian nukleotida yang dimiliki oleh gen *plantaricin* dari *L. plantarum* S34 dengan gen *plantaricin* dari *L. plantarum* lain yang terdapat *gene bank*.

Hasil analisis BLAST hasil sequencing gen *plantaricin* EF dari *L. plantarum* S34 memiliki kehomologan sebesar 98% dengan nukleotida yang dimiliki oleh *L. plantarum* V90 (FJ809773.1), *L. plantarum* BFE5092 (GU584090.1), *L. plantarum* C11 (X94434.2), *L. plantarum* J23 (DQ323671.2), *L. plantarum* J51 (DQ340868.2), *L. plantarum* NC8 (AF522077.2), dan *L. plantarum* WCFS1 (AL935253.1).

Plantaricin EF dari *L. plantarum* S34 berdasarkan hasil analisis ExPASy dan SotfBerry disusun oleh 52 asam amino (Gambar 3). Analisis asam amino *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* WCSF1, C.1.1, TL1, RG14, RG11, R66, JDMI dengan clustal W menunjukkan tingkat homologi yang sangat tinggi (Gambar 4).

5'3' Frame 1

```

cattttttggttaagtgttcgacatgttggtgatgcaattggttcagttgcaggcattcgt
ggtattttgaaaagtatttcgttaattttcttgggggagatcaacaattatgaaaaaattt
                                     M K K F
ctagttttgctgaccgtgaattaaattctatttcaagtggcgttttccatgcctatagc
L V L R D R E L N S I S S G V F H A Y S
gcgcggtggcggttcggaataattataaaagtgtgttgggcctgccgattggatcattagc
A R G V R N N Y K S A V G P A D W I I S
gctgtccgaggattcatccacggatagttcaagccatcaagtaaa
A V R G F I H G -

```

Gambar 3. Sekuen nukleotida dan asam amino *plantaricin* EF *L. plantarum* S34.

Analisis BLAST terhadap hasil sequencing gen *plantaricin* JK dari *L. plantarum* S34 memiliki kehomologan sebesar 98% dengan nukleotida yang dimiliki oleh *L. plantarum* subsp *plantarum* ST-III (CP002222.1), *L. plantarum* BFE5092 (GU584090.1), *L. plantarum* C11 (X94434.2), *L. plantarum* V90 (FJ809773.1), *L. plantarum* NC8 (AF522077.2), dan *L. plantarum* WCFS1 (AL935253.1).

Plantaricin JK dari *L. plantarum* S34 berdasarkan hasil analisis ExPASy dan SotfBerry disusun oleh 56 asam amino (Gambar 5). Analisis asam amino *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* NC8, WCSF1, V90, C.1.1 dan BFE5092 dengan clustal W menunjukkan tingkat homologi yang sangat tinggi (Gambar 6).

Nukleotida gen *plantaricin* NC8 dari *L. plantarum* S34 tersebut berdasarkan hasil analisis menggunakan BLAST memiliki kehomologan sebesar 100% dengan nukleotida yang dimiliki oleh *L. plantarum* YM5-2 (JQ900767.1), *L. plantarum* 8PA3 (HQ651181.2), *L. plantarum* J51 (DQ340868.2), *L. plantarum* NC8 (AF522077.2)

Plantaricin NC8 dari *L. plantarum* S34 berdasarkan hasil analisis ExPASy dan SotfBerry disusun oleh 47 asam amino (Gambar 7). Analisis asam amino *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* NC8 α dengan clustal W menunjukkan tingkat homologi yang sangat tinggi (Gambar 8).

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

.... PlnLFplantarumWCSF1_NP_784216.      MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
PlnFLplantarumC11_X94434.2             MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarumTL1_GU138150.1           MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarumRG14_GU138151.1          MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarumRG11_GU138152.1          MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarumRI11_GU138153.1          MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarumRS5_GU138154.1           MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
PlnFLplantarumJDMI_YP_00306193         MKKFLVLRDRELNAISGGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
PlnEFLplantarumS34                     MKKFLVLRDRELNSISSGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
plnFLplantarum_AB552849.1              MKKFLVLRDRELNSISSGVFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVRGFI 50
***** **.:*****.:*****.:*****

PlnLFplantarumWCSF1_NP_784216.          HG----- 52
PlnFLplantarumC11_X94434.2              HG----- 52
plnFLplantarumTL1_GU138150.1            HGYSSSHQV 59
plnFLplantarumRG14_GU138151.1            HGYSSSHQV 59
plnFLplantarumRG11_GU138152.1            HGYSSSHQV 59
plnFLplantarumRI11_GU138153.1            HGYSSSHQV 59
plnFLplantarumRS5_GU138154.1            HGYSSSHQV 59
PlnFLplantarumJDMI_YP_00306193          HG----- 52
PlnEFLplantarumS34                      HG----- 52
plnFLplantarum_AB552849.1              HG----- 52
**

```

Gambar 4. Hasil analisis asam amino dengan Clustal W plnEF *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* WCSF1, C.1.1, TL1, RG14, RG11, R66, JDMI.

5'3' frame 2

```

ccgggggaatctggtctagtttagaaagggttttatgatggcgaagctggcagagcaatccgt
cgtaataaatggacttaaattaaggagcgtatattatgaaaaattaaattaactgtttta
aatgaatttgaagaattaaactgctgacgctgaaaaagaatatttctggtggccgctcgga
N E F E E L T A D A E K N I S G G R R S
cgtaaaaaatggaattggatacgcgtattggttatgcgtttggcgcggttgaacgggacgtg
R K N G I G Y A I G Y A F G A V E R A V
cttggttggttcaagggaattataaaaaa
L G G S R D Y K

```

Gambar 5. Sekuen nukleotida dan asam amino plantaricin JK *L. plantarum* S34.

PlnKLplantarumNC8_AF522077.2_	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
PlnKLplantarumWCSF1_AL935253.1	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGNRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
PlnKLplantarumV90_FJ809773.1_	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
PlnKLplantarumC11_X94434.2_	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
PlnKLplantarumBFE5092_GU584090	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
PlnJKLplantarumS34	MKIKLTVLNEFEELTADAEKNISGRRSRKNGIGYAIGYAFGAVERAVLG 50
	*****.*****
PlnKLplantarumNC8_AF522077.2_	GSRDYNK 57
PlnKLplantarumWCSF1_AL935253.1	GSRDYNK 57
PlnKLplantarumV90_FJ809773.1_	GSRDYNK 57
PlnKLplantarumC11_X94434.2_	GSRDYNK 57
PlnKLplantarumBFE5092_GU584090	GSRDYNK 57
PlnJKLplantarumS34	GSRDYK- 56
	****;

Gambar 6. Hasil analisis asam amino dengan Clustal W pln JK *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* NC8, WCSF1, V90, C.1.1 dan BFE5092.

5'3' Frame 2
ctgcgtataagcatcgcaaacgattgaaaaaagttttaataaaggctttatcattaagg
agttggagatacatggataaatttgaaaaaattagtaacatctaaccctagaaaaagatctct
M D K F E K I S T S N L E K I S
ggcggatgatttaacaaccaagttatggagctcttggggatattatctggcaagaaagca
G G D L T T K L W S S W G Y Y L G K K A
cgttgaatttaagcaccatattgttcaattt
R W N L K H P Y V Q F |

Gambar 7. Sekuen nukleotida dan asam amino plantaricin NC8 *L. plantarum* S34.

plnNC8L.plantarumS34	MDKFEKISTSNLEKISGGDLTTKLWSSWGYYLGKKARONLKHPPYVQF 47
plnNCBalfaL.plantarumNC8	MDKFEKISTSNLEKISGGDLTTKLWSSWGYYLGKKARONLKHPPYVQF 47

Gambar 8. Hasil analisis asam amino dengan Clustal W pln NC8 *L. plantarum* S34 dengan *L. plantarum* NC8.

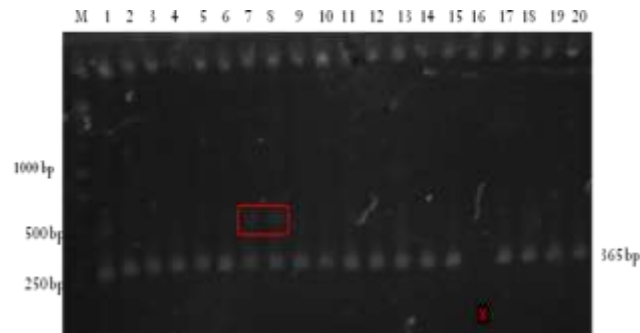
Kloning gen yang mengkode bakte riosin

Gen plantaricin yang sudah dikonfirmasi dengan sekuensing dikloning ke dalam vektor pGEMT easy. Selanjutnya ditransformasikan ke dalam *E. coli* DH5 α . Hasil transformasi dengan seleksi biru putih menunjukkan adanya *E. coli* yang berwarna putih dan biru (Gambar 9).



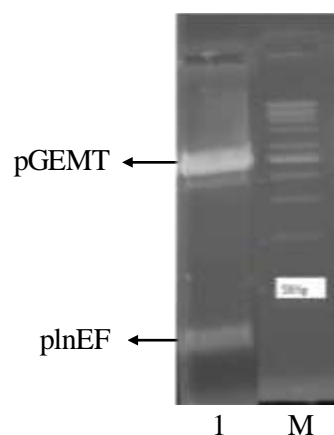
Gambar 9. Hasil transformasi plasmid pGEMT-EF.

Koloni yang berwarna putih yang diduga membawa gen plantaricin EF diuji dengan PCR colony untuk memastikan hasil kloning disisipi oleh gen-gen plantaricin (Gambar 10). Hingga saat ini sudah dilakukan kloning terhadap gen plantaricin EF



Gambar 10. Hasil PCR Coloy pln EF.

Koloni yang menunjukkan hasil positif dari PCR colony, selanjutnya diisolasi plasmidnya (plasmid rekombinan). Plasmid rekombinan tersebut selanjutnya dipotong dengan enzim restriksi *Nco*1 dan *Sal*1. Hasilnya menunjukan terdapat 2 pita berukuran ± 2.700 bp (pGEMT easy vector) dan 360 bp (plantaricin EF) (Gambar 11). Plasmid rekombinan tersebut selanjutnya di sekuensing lagi untuk memastikan bahwa insert yang disisipkan tersebut adalah plantaricin EF. Hasil konfirmasi sekuensing menunjukan bahwa gen *plantaricin* EF dari *L. plantarum* S34 memiliki kehomologan sebesar 99% dengan nukleotida yang dimiliki oleh *L. plantarum* V90 (FJ809773.1) dan *L. plantarum* WCFS1 (AL935253.1).



Gambar 11. Plasmid rekombinan (plnEF) M (1 kb DNA ladder); 1 (plasmid rekombinan di digesti dengan *Sal* I & *Nco* I.

KESIMPULAN

Gen *plantaricin* EF, JK dan NC8 berhasil diisolasi dari genom *L. plantarum* S34 melalui proses amplifikasi PCR. Jumlah asam amino *plantaricin* EF, JK dan NC8 tersebut masing-masing sebanyak 52 aa, 57 aa dan 47 aa. Gen *plantaricin* EF sudah berhasil di kloning ke pGEMTeasy vector.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Institut Pertanian Bogor yang telah mendanai penelitian ini melalui hibah program Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi Tahun 2012 Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati, Y. 2005. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kloroform dan Ekstrak Metanol Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L) terhadap *Salmonella thypsa* [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Cho GS, Huch M, Hanak A, Holzapfel WH, Franz CMAP. 2010. Genetic analysis of plantaricin EFI locus of *Lactobacillus plantarum* PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence a result of mutation. *Int J Food Microbiol* 141: 117–124.
- Departemen Kesehatan (Depkes). 2006. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 364/Menkes/SK/V/2006 tentang Pedoman Pengendalian Demam Tifoid, hal. 1–39.
- Lestari, S. 2005. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata* (Roxb) Schlecht) terhadap *Staphylococcus hemolitik non pneumoniae* dan *Salmonella thypi* serta Uji Bioautografinya [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Maldonado, A., J. L. Ruiz-Barba, and R. Jime´nez-Díaz. 2003. Purification and genetic characterization of plantaricin NC8, a novel coculture-inducible two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* NC8. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:383–389.
- Mustopa, A.Z., R. Balia, W.S. Putranto, M. Ridwan, & M. Solehudin. 2010. Penapisan bakteri asam laktat yang diisolasi dari bekasam daging sapi dalam menghasilkan bakteriosin untuk menghambat bakteri patogen.

Prosiding Seminar Nasional Fakultas Peternakan Universitas Padjadjaran ke-2: 679–685.

- Nurwati, R. 2006. Pengaruh Serbuk Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella thypi* dengan Metode Sumuran [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Pelczar, M. and Chan. 1988, Dasar-Dasar Mikrobiologi 2. Alih Bahasa Hadioetomo, R.S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Sambrook J dan Russel DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual vol 2 third edition*. Cold Spring Harbour: Cold Spring Laboratory Pr.
- Serkedjieva J, Da nova S, Ivanova I. 2000. Antiinfluenza virus activity of a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 88: 285–298.
- Saenz Y, Rojo-Bezares B, Novaro L, Diez L, Somalo S, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. 2009. Genetic diversity of the *pln* locus among oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *International Journal of Food Microbiology* 134 (2009) 176–183.
- Solehudin M. 2010. Penapisan komponen bioaktif bakteri asam laktat yang diisolasi dari bekasam terhadap pertumbuhan *Eschericia coli*, *Staphylococcus aureus* dan RNA helikase virus hepatitis C [skripsi]. Sumedang: Fakultas Peternakan, Universitas Padjadjaran Sumedang.
- Todorov, S. D., Wachsmann, M. B., Knoetze, H., Meincken, M., & Dicks, L. M. T. (2005). An antibacterial and antiviral peptide produced by *Enterococcus mundtii* ST4V isolated from soy beans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 508e513
- Wachsmann MB *et al.* 2003. Enterococin CRL35 inhibits the last stage of HSV-1 and HSV-2 replication in vitro. *Antiviral Research* 58: 17–24.
- Winarsih. 2006. Pengaruh Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella thypi* dengan Metode Paper Disk [Skripsi]. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.