



# Jurnal Teknologi Laboratorium

[www.teknolojijournal.com](http://www.teknolojijournal.com)

**Content**  
**Jurnal Teknologi Laboratorium**  
**Vol 7 No 1 (2018)**

Isolasi Candida albicans Dari Swab Mukosa Mulut Penderita Diabetes Melitus Tipe 2

Ni Kadek Sri Jayanti, I Nyoman Jirna

1-7

---

Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Mimba (Azadirachta indica) terhadap Jumlah Sel Makrofag Peritoneal pada Mencit yang Diinduksi Vaksin BCG

Yogi Khoirul Abror, Evy Diah Woelansari, Suhariyadi Suhariyadi

8-14

---

Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Rizosfer Tanaman Tin (Ficus carica)

Warsi Warsi, Nanik Sulistyani

15-24

---

Potensi Antibakteri Isolat Actinomycetes terhadap Aktivitas Proteolitik dan Amilolitik Escherichia Coli ATTC 25922

Meiskha Bahar, Fajriati Zulfa

25-30

---

The Variasi Konsentrasi Alfa Siklodekstrin dan Waktu Sentrifugasi Dalam Preparasi Serum Lipemik Pada Pemeriksaan Glukosa Metode GOD-PAP

Arfa Izzati, Ani Riyani

31-37

---



## Isolasi *Candida albicans* dari Swab Mukosa Mulut Penderita Diabetes Melitus Tipe 2

### Isolation of *Candida albicans* from Swab Mucosa Mouth Patient Diabetes Mellitus Type 2

Ni Kadek Sri Jayanti<sup>1a</sup>, I Nyoman Jirna<sup>2b\*</sup>

<sup>1,2</sup> Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Denpasar, Indonesia

<sup>a</sup> Email address: ni.kadek.sri.jayanti@gmail.com

<sup>b</sup> Email address: nyomanjirna@gmail.com

#### HIGHLIGHTS

- *Candida albicans* were found in patient diabetes mellitus type 2

#### ARTICLE INFO

##### Article history

Received date : November 21<sup>st</sup>, 2017

Revised date : January 09<sup>th</sup>, 2018

Accepted date : February 27<sup>th</sup>, 2018

##### Keywords:

*Candida albicans*  
Diabetes mellitus type 2  
Oral mucosal swab

##### Kata Kunci:

*Candida albicans*  
Diabetes mellitus tipe 2  
Usapan mukosa mulut

#### ABSTRACT / ABSTRAK

*Candida albicans* can be pathogen when immunity had decreased and physiological function is impaired, such as in diabetes mellitus type 2. This study aims to isolation *Candida albicans* that collected from oral cavity of diabetes mellitus type 2 patients. This research is conducted with descriptive study by observing the presence of *Candida albicans* in 30 samples of diabetes mellitus type 2 patients, which grows on Potato Dextrose Agar. The microscopic observation by LPCB staining of yeasts, blastospores, pseudohyphae, chlamydospores and germ tubes in human serum suspension that incubated at 37°C for 2-3 hours. Based on this research was found 14 (46,7%) patients from 30 patients were positive *Candida albicans*.

*Candida albicans* menjadi patogen saat kekebalan tubuh menurun dan fungsi fisiologis terganggu, seperti pada penderita diabetes mellitus. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *Candida albicans* yang dikumpulkan dari rongga mulut penderita diabetes melitus tipe 2. Penelitian ini dilakukan dengan metode deskriptif dengan mengamati keberadaan *Candida albicans* pada 30 sampel pasien diabetes melitus tipe 2 yang tumbuh pada Agar Dextrose Kentang. Pengamatan secara mikroskopis dengan pewarnaan LPCB ragi, blastospora, pseudohifa, klamidiospora dan tabung kuman dalam suspensi serum manusia yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam. Berdasarkan hasil penelitian, dari 30 pasien diabetes melitus tipe 2 yang diteliti didapatkan hasil positif *Candida albicans* sebanyak 14 orang (46,7%).

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.  
All rights reserved

#### Corresponding Author:

I Nyoman Jirna  
Poltekkes Denpasar Jurusan Analis kesehatan  
Jln. Sanitasi No 1. Denpasar Selatan, Telp. 0361710527  
Email: nyomanjirna@gmail.com

## 1. PENDAHULUAN

*Candida albicans* merupakan flora normal di permukaan membran mukosa, saluran pencernaan, dan saluran genitalia wanita. *Candida albicans* akan menjadi patogen apabila ada beberapa faktor risiko penyebab infeksi, seperti penurunan sistem imunitas dan terjadi perubahan fisiologis tubuh, salah satunya terjadi pada penderita diabetes melitus. Diabetes melitus (DM) merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh berbagai faktor yang ditandai dengan kadar gula darah yang tinggi sebagai akibat dari kegagalan fungsi kelenjar pankreas dalam menghasilkan insulin maupun kegagalan hati dalam menanggapi keberadaan insulin.<sup>1</sup> Diabetes telah menyebabkan kematian sebanyak 1,5 juta jiwa, sedangkan diabetes dengan komplikasi menyebabkan kematian hingga 2,2 juta penduduk dunia pada tahun 2012 dengan usia dibawah 70 tahun.<sup>2</sup> Berdasarkan data Rumah Sakit Umum Pusat (RSUP) Sanglah, total kunjungan pasien diabetes melitus hingga tahun 2016 mencapai 2.205 kasus yang didominasi oleh penderita diabetes melitus tipe 2.<sup>3</sup>

Hasil penelitian pada swab mukosa mulut didapatkan hubungan antara kadar glukosa darah dengan pertumbuhan *Candida albicans* pada penderita DM yang tidak terkontrol.<sup>4</sup> Penelitian lain menemukan peningkatan koloni *Candida sp.* pada pasien diabetes dibandingkan dengan orang normal.<sup>5</sup> Penelitian terbaru, terdapat hubungan antara peningkatan kadar glukosa terhadap terjadinya kandidiasis oral pada penderita DM.<sup>6</sup> Infeksi jamur *Candida* paling umum disebabkan oleh *Candida albicans*. Hasil penelitian pada 50 sampel pasien *immunocompromised*, didapatkan data jamur *Candida albicans* 86%, *Candida krusei* 2%, *Candida tropicalis* 4% dan *Candida parapsilosis* 2%.<sup>7</sup>

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *Candida albicans* yang ada pada rongga mulut penderita DM tipe 2 di RSUP Sanglah Denpasar, yang dapat bermanfaat sebagai bahan informasi mengenai risiko infeksi jamur *Candida albicans* pada penderita diabetes melitus tipe 2 dan sebagai bahan informasi bagi instansi kesehatan terhadap jamur *Candida albicans* yang teridentifikasi pada swab mukosa mulut penderita diabetes melitus tipe 2.

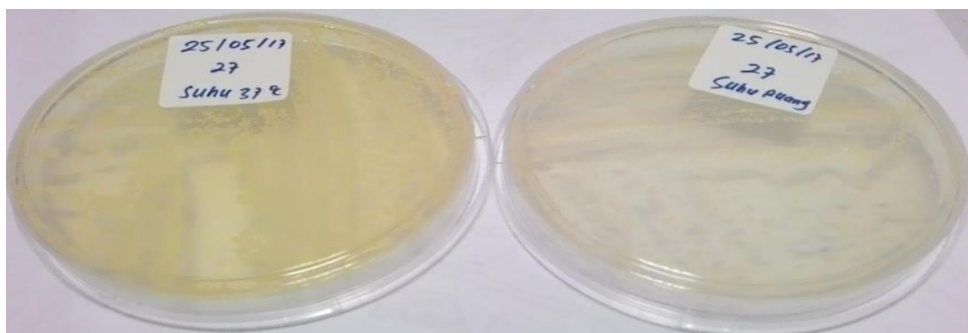
## 2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Jenis penelitian adalah penelitian deskriptif dengan desain *cross sectional*.<sup>8</sup> Sampel penelitian berasal dari Poliklinik *Diabetic Centre* RSUP Sanglah, Denpasar. Kriteria inklusi adalah didiagnosis menderita diabetes melitus tipe 2, menjalani rawat jalan, berumur 15 tahun ke atas dan bersedia menjadi sampel. Jumlah sampel diambil sebanyak 30 sampel dengan ketentuan rumus estimasi sampel dan diperiksa di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Denpasar. Pengumpulan data dengan metode pemeriksaan dan pengamatan, prosedur kerja meliputi pembuatan media *transport stuart* dan media PDA (*Potato Dextro Agar*), pengambilan dan kultur swab mukosa mulut dan pemeriksaan sampel. Pemeriksaan sampel jamur candida dilakukan secara mikroskopis, koloni *Candida* dengan pewarnaan larutan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) dan pemeriksaan *germ tubes* metode inkubasi serum manusia

Data penelitian ini kemudian dikelompokkan dalam bentuk tabel dan narasi. Analisis data dilakukan secara deskriptif untuk mengetahui karakteristik *Candida albicans* yang ada pada rongga mulut penderita DM tipe 2 di RSUP Sanglah, Denpasar.

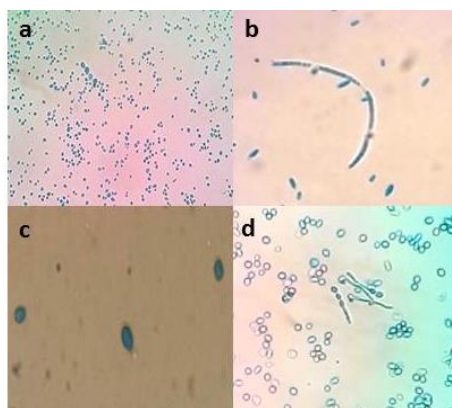
## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada media PDA suhu 37°C selama 36 jam yaitu koloni berbentuk bulat, ukuran koloni lebih besar dari koloni pada suhu ruang, konsistensi lembut, berwarna putih kekuningan atau *cream*, permukaan koloni halus dan berbau ragi yang khas (gambar 1).



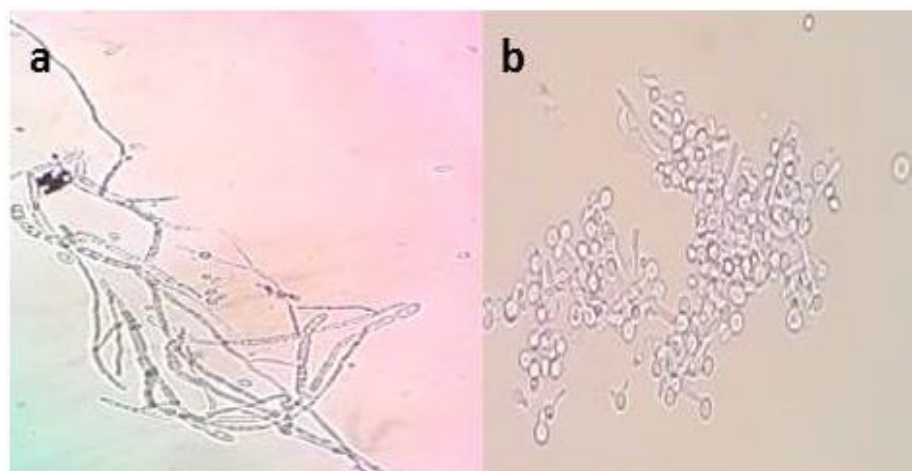
Gambar 1. Koloni *Candida* pada media PDA suhu 37 °C (kiri) dan suhu ruang (kanan)  
Sumber: Data Primer (2017)

Hasil mikroskopis pada pewarnaan LPCB ditemukan adanya ragi, blastospora, pseudohifa, klamidospora dan beberapa terbentuk tabung tunas atau *germ tubes* yang berukuran lebih kecil, koloni tampak jelas berwarna biru (gambar 2).



Gambar 2. Ragi dan blastospora (a), pseudohifa (b), klamidospora (c), dan *germ tubes* (d)  
Sumber: Data Primer (2017)

Pembentukan tabung tunas atau *germ tubes* pada serum manusia pada suhu 37 °C selama 2-3 jam, lebih terlihat jelas dengan ukuran yang lebih besar dan jumlah yang terbentuk lebih banyak dibandingkan pada pewarnaan LPCB. Hasil mikroskopis ditemukan pseudohifa yang tampak sangat jelas ada percabangan (gambar 3).



Gambar 3. Pseudohifa (a) dan *germ tubes* atau tabung tunas (b)  
Sumber: Data Primer (2017)

Berikut akan disajikan hasil pemeriksaan pada 30 sampel penderita diabetes mellitus tipe 2.

Tabel 1. Hasil Isolasi *Candida albicans* Berdasarkan Distribusi Frekuensi Penderita Candidiasis menurut Kelompok Umur di RSUP Sanglah, Denpasar

Usia (tahun)	<i>Candida albicans</i>				Total (Jiwa)	Persentase (%)
	Positif (Jiwa)	Persentase (%)	Negatif (Jiwa)	Persentase (%)		
31-40	0	0	1	6	1	3
41-50	1	8	4	26	5	17
51-60	3	21	5	31	8	27
61-70	10	71	5	31	15	50
71-80	0	0	1	6	1	3
Total	14	100	16	100	30	100

Sumber: Data Primer (2017).

Tabel 2. Hasil Isolasi *Candida albicans* Berdasarkan Distribusi Frekuensi Penderita Candidiasis menurut Jenis Kelamin di RSUP Sanglah, Denpasar

Jenis Kelamin	<i>Candida albicans</i>				Total (Jiwa)	Persentase (%)
	Positif (Jiwa)	Persentase (%)	Negatif (Jiwa)	Persentase (%)		
Laki-laki	7	50	10	62	17	57
Perempuan	7	50	6	38	13	43
Total	14	100	16	100	30	100

Sumber: Data Primer (2017).

Tabel 3. Hasil Isolasi *Candida albicans* Berdasarkan Lama Menderita DM di RSUP Sanglah, Denpasar

Lama Menderita DM (tahun)	<i>Candida albicans</i>				Total (Jiwa)	Persentase (%)
	Positif (Jiwa)	Persentase (%)	Negatif (Jiwa)	Persentase (%)		
<1	2	14	0	0	2	7
1-10	8	57	10	62	18	60
11-20	3	21	4	25	7	23
>20	1	8	2	13	3	10
Total	14	100	16	100	30	100

Sumber: Data primer (2017).

Hasil isolasi dan karakteristik jamur *Candida albicans* yang tumbuh pada media PDA yaitu koloni berbentuk bulat, konsistensi lembut, berwarna putih kekuningan atau *cream* dengan permukaan koloni halus serta berbau ragi yang khas. Hasil makroskopis ini sesuai dengan penelitian yang menemukan koloni muda berbentuk bulat, konsistensi lembut, berwarna *cream* dengan permukaan koloni yang halus.<sup>9</sup>

Hasil pewarnaan LPCB ditemukan adanya ragi, blastospora, pseudohifa, klamidospora, tampak berwarna biru jelas dan beberapa terbentuk tabung tunas atau *germ tubes* yang berukuran lebih kecil. Hal ini LPCB (*Lactophenol Cotton Blue*) yaitu *cotton blue* berfungsi memberi warna biru pada sel jamur, asam laktat yang berfungsi untuk memperjelas latar belakang dan mempertajam struktur jamur, gliserol berfungsi menjaga fisiologi sel dan menjaga sel terhadap kekeringan, serta kristal fenol untuk membunuh jamur.

Metode inkubasi koloni pada serum manusia, pembentukan tabung tunas atau *germ tubes* lebih terlihat jelas dengan ukuran yang lebih besar dan jumlah yang terbentuk lebih banyak dibanding pewarnaan LPCB. Penelitian yang membandingkan beberapa suspensi cairan untuk mempercepat pertumbuhan *germ tubes* baik dari hewan, buatan maupun serum manusia,

didapatkan bahwa pembentukan *germ tubes Candida albicans* paling baik digunakan pada serum manusia yang telah diinkubasi selama 2 jam dengan hasil sensitivitas 98% dan spesifitas 100%.<sup>10</sup> Penelitian pemeriksaan cepat *Candida albicans* dengan metode pembentukan *germ tubes* mendapatkan hasil sensitivitas 87,1% dan spesifitas 100%. *Candida albicans* dapat ditentukan apabila ditemukan lebih dari 5 *germ tubes* pada satu koloni yang diamati.<sup>11</sup>

Hasil 14 sampel positif jamur *Candida albicans*, mengalami kondisi mulut kering yang ditandai dengan keinginan untuk banyak minum, hasil observasi kondisi rongga mulut dalam keadaan kering dan juga lembab serta beberapa ditemukan adanya bercak keputihan disekitar rongga mulut. Adanya bercak keputihan dan ditandai dengan rasa gatal pada rongga mulut merupakan gejala dari kandidiasis oral.<sup>12</sup> Hasil penelitian ditemukan bahwa terjadi peningkatan kasus hiposalivasi yaitu berkurangnya laju aliran saliva di rongga mulut pada pasien DM tipe 2, dibandingkan dengan kelompok kontrol bukan penderita DM.<sup>13</sup> Pasien dengan hiposalivasi memiliki tingkat risiko yang lebih tinggi terjadinya infeksi bakteri dan jamur *Candida* dalam air liur dibandingkan dengan mereka yang tidak hiposalivasi. Hiposalivasi merupakan suatu keadaan yang ditandai dengan kondisi mulut kering. Saliva atau air liur mengandung musin yaitu glikoprotein yang difungsikan sebagai perlindungan terhadap kekeringan, sebagai pelumas, dan anti mikroba jaringan mulut. Mucin juga berkontribusi sebagai kontrol kolonisasi bakteri dan jamur. Histatins dalam saliva merupakan protein kaya histidin yang menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.<sup>14</sup>

Penderita tidak mengonsumsi obat antifungi. Obat yang paling sering dikonsumsi yaitu antibiotik. Seperti yang diketahui, antibiotik dapat menekan pertumbuhan bakteri termasuk juga bakteri normal pada rongga mulut. Adapun bakteri normal yang menguntungkan bagi manusia yaitu *Lactobacillus acidophilus*. Bakteri ini berperan dalam menjaga pertumbuhan jamur *Candida* agar tetap seimbang. Bakteri *Lactobacillus* dapat mengurangi perlekatan jamur *Candida albicans* dengan cara: memproduksi bakteriosin dan juga melepaskan hidrogen peroksida dan asam laktat yang dapat menghambat proliferasi dan invasi jamur *Candida albicans*.<sup>15</sup>

Infeksi jamur *Candida* pada DM tipe 2 dikaitkan pada kadar gula darah serta gula kulit yang tinggi. Menurut Saskia dan Mutiara (2015), jamur merupakan mikroorganisme konsumen yang sangat bergantung pada medium yang menyediakan karbohidrat, protein, vitamin dan persenyawaan kimia lainnya, yang diperoleh dengan cara menyerap unsur yang dibutuhkan dari lingkungan hidupnya melalui sistem hifa.<sup>16</sup> Kadar gula kulit merupakan 55% kadar gula darah pada orang yang bukan diabetes, sedangkan pada penderita diabetes rasio meningkat hingga 69% - 71% dari glukosa darah yang sudah meningkat. Pada penderita yang sudah berobat, rasionya melebihi 55%.<sup>17</sup>

Kondisi hiperglikemia juga menyebabkan terjadinya gangguan mekanisme sistem imunoregulasi.<sup>16</sup> Hal ini menyebabkan menurunnya daya kemotaksis, fagositosis dan kemampuan bakterisidal sel leukosit sehingga kulit lebih rentan terinfeksi. Hasil penelitian yang membandingkan aktifitas fagosit pada penderita DM tipe 2 dan bukan penderita DM menemukan bahwa terjadi penurunan persentase aktifitas fagosit pada penderita DM tipe 2.<sup>18</sup> Aktifitas fagosit juga dihubungkan dengan penderita yang melakukan kontrol gula darah, terjadi peningkatan aktifitas fagosit pada penderita yang melakukan kontrol gula darah. Peningkatan aktifitas fagosit berperan dalam mencegah infeksi pada penderita diabetes melitus.

Terdapat hubungan antara kadar glukosa darah dengan pertumbuhan *Candida albicans* pada mukosa mulut penderita diabetes melitus yang tidak terkontrol.<sup>4</sup> *Candida albicans* masih ditemukan pada penderita DM yang telah diobati, tetapi penderita tersebut masih memiliki kadar gula darah diatas normal.<sup>17</sup>

Penelitian ini mendukung hasil penelitian, yang menemukan ada peningkatan kolonisasi *Candida* pada mukosa mulut pasien diabetes dibandingkan dengan orang normal.<sup>5</sup> Ada hubungan antara peningkatan kadar glukosa terhadap terjadinya Kandidiasis oral pada penderita diabetes mellitus.<sup>6</sup> Penyakit ini dapat menyebabkan infeksi secara lokal maupun sistemik yang sangat berbahaya.<sup>12</sup>

Hasil positif *Candida albicans* pada 7 laki-laki dan 7 orang perempuan penderita DM tipe 2, jika dihubungkan dengan teori, perempuan lebih rentan terhadap penyakit autoimun karena siklus hormonal. Berdasarkan hasil penelitian Farizal (2017), didapatkan prevalensi positif jamur *Candida albicans* pada saliva wanita penderita DM di RSUD dr. M. Yunus Bengkulu, sebanyak 52%.<sup>19</sup> Hormon merupakan komponen sistem neuroendokrin yang dapat mempengaruhi imunitas

seseorang. Apabila terjadi ketidakseimbangan sintesis dan pelepasan hormonal, maka hormon akan beraksi sebagai stimulator atau supresor aktifitas imun dan neuroendokrin itu sendiri dengan cara berikatan pada reseptor. Hormon estrogen dan prolaktin merupakan sitokin proinflamasi yang fluktuasinya dapat mengganggu toleransi terhadap sel sendiri, sehingga dapat menjadi faktor pemicu penyakit autoimun.<sup>20</sup> Berdasarkan tingkat usia ditemukan positif *Candida albicans* pada usia lanjut (61-70) tahun sebanyak 10 orang. Usia lanjut ditandai dengan proses penuaan. Penuaan adalah suatu proses menghilangnya secara perlahan kemampuan sel atau jaringan untuk memperbaiki diri atau mengganti diri dan mempertahankan struktur dan fungsi normalnya sehingga tidak dapat bertahan dari infeksi dan memperbaiki kerusakan yang diderita. Penurunan fungsi sel tersebut menyebabkan lebih mudah timbulnya masalah kesehatan pada usia lanjut. Berdasarkan lama menderita DM, *Candida albicans* ditemukan paling banyak pada rentang 1-10 tahun, yaitu sebanyak 8 orang. Komplikasi menyebabkan penurunan kualitas penderita DM. Hal lain juga disebabkan karena diabetes sering tidak terdeteksi atau mulai terjadinya diabetes adalah 7 tahun sebelum terdiagnosis, sehingga morbiditas dan mortalitas terjadi pada kasus yang tidak terdeteksi.<sup>21</sup> Dalam penelitian ini juga ditemukan pertumbuhan jamur *Candida albicans* pada penderita DM tipe 2 yang telah menderita lebih dari 15 tahun. Rata-rata gejala komplikasi terjadi 15 - 20 tahun setelah terjadi peningkatan kadar gula darah.<sup>22</sup>

#### 4. SIMPULAN dan SARAN

Karakteristik jamur *Candida albicans* pada media PDA yaitu koloni bulat, konsistensi lembut, berwarna putih kekuningan atau *cream* dengan permukaan yang halus serta berbau ragi yang khas, pengamatan mikroskopis dengan pewarnaan LPCB ditemukan adanya ragi, blastospora, pseudohifa, klamidospora, dan terbentuk tabung tunas atau *germ tubes* pada inkubasi serum manusia. Dari 30 penderita DM yang diteliti didapatkan hasil positif jamur *Candida albicans* pada swab mukosa mulut penderita DM tipe 2 yaitu sebanyak 14 orang penderita dengan persentase 46,7%. Berdasarkan jenis kelamin ditemukan 7 laki-laki dan 7 perempuan positif *Candida albicans*, sedangkan untuk kelompok umur 61-70 tahun ditemukan positif *Candida albicans* sebanyak 10 orang penderita, dan berdasarkan lama menderita DM pada rentang 1-10 tahun ditemukan positif *Candida albicans* sebanyak 8 orang penderita DM tipe 2. Diharapkan penderita DM tipe 2 selalu menjaga kebersihan dan kesehatan rongga mulut, serta rutin melakukan kontrol gula darah setiap satu bulan sekali sesuai dengan petunjuk dokter yang menangani.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Direktur Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Denpasar yang telah memberikan kesempatan melakukan pemeriksaan di laboratorium mikologi Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Denpasar.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Hasdianah H. *Mengenal Diabetes Mellitus Pada Orang Dewasa Dan Anak-Anak Dengan Solusi Herbal*. Yogyakarta: Nuha Medika; 2012.
2. *Global Report on Diabetes*; 2016. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf).
3. *Data Pasien Penderita Diabetes Melitus Tahun 2014-2016*. Denpasar; 2016.
4. Hernawati S. Hubungan Kadar Glukosa Darah Dengan Pertumbuhan *Candida Albicans* pada Penderita Diabetes Melitus. *J Dent Indones*. 2007;14. <http://www.jdentistry.ui.ac.id/index.php/JDI/article/view/821>.
5. Pallavan B, Ramesh V, Dhanasekaran BP, Oza N, Indu S, Govindarajan V. Comparison And Correlation Of Candidal Colonization In Diabetic Patients And Normal Individuals. *J Diabetes Metab Disord*. 2014. <http://link.springer.com/article/10.1186/2251-6581-13-66>.
6. Sumintarti, Rahman F. Korelasi Kadar Glukosa Saliva Dengan Kadar Glukosa Darah



- Terhadap Terjadinya Kandidiasis Oral Pada Penderita Diabetes Melitus (Correlation Of Salivary Glucose Level And Blood Glucose Level With Oral Candidiasis In Diabetes Melitus Patient). 2015;14. <http://jdmfs.org/index.php/jdmfs/article/viewFile/422/423>.
7. Magare JD, Awasthi RS. Evaluating the Prevalence of Candida Species in the Oral Cavity of Immunocompromised Patients. *Int J Sci Res.* 2014. <http://www.ijsr.net/archive/v3i3/MDIwMTMxMDUw.pdf>.
  8. Notoatmodjo S. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta; 2012.
  9. Haw BP, Asma I, Eugene O, Sasidharan S. . Phenotyping Identification of Candida albicans for the Production of In House Helicase for Nucleic Acid-Based Detections for Fast Diagnosis. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2013;4(2):576. [http://www.rjpbcs.com/pdf/2013\\_4\(2\)/\[64\].pdf](http://www.rjpbcs.com/pdf/2013_4(2)/[64].pdf).
  10. Hilmioglu I, Badak. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of Candida albicans and C. tropicalis. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17576320>. Published 2007.
  11. Sheppard DC, Locas MC, Restieri C, Laverdiere M. Utility of the Germ Tube Test for Direct Identification of Candida albicans from Positive Blood Culture Bottles. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3508–3509. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566088/>.
  12. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. *Mikrobiologi Kedokteran*. 25th ed. Jakarta: EGC; 2012.
  13. Khovidhunkit SO, Suwantuntula T, Thaweboon S, Mitirattanakul S, Chomkhakhai U, Khovidhunkit W. Serostomia, hyposalivation, and oral microbiota in type 2 diabetic patients:a preliminary study. *J Med Assoc Thai.* 2009. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19772183>.
  14. Hafid PS. Pengaruh Berkumur Larutan Ekstrak Bonggol Nanas (Ananas comosus (L .) Merr.) Terhadap Peningkatan pH Saliva Rongga Mulut. <http://repository.unhas.ac.id/handle/123456789/21302>. Published 2016.
  15. Andriyani S. *Kandidiasis Oral Pada Pasien Tuberkulosis Paru Akibat Pemakaian Obat Antibiotik Dan Steroid (Laporan Kasus)*.(2011). [http://repository.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/23362/Chapter II.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://repository.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/23362/Chapter%20II.pdf?sequence=3&isAllowed=y).
  16. Saskia TI, Mutiara H. Infeksi Jamur pada Penderita Diabetes Mellitus. <http://jukeunila.com/wp-content/uploads/2015/11/69-74-TRESA-IS.pdf>. Published 2015.
  17. Sularsito SA. *Ilmu Penyakit Kulit Dan Kelamin: Hubungan Kelainan Kulit Dan Penyakit Sistemik*. 7th ed. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2015.
  18. Lecube A, Pachon G, Petriz J, Hernandez C, Simo R. Phagocytic Activity is Impaired in Type 2 Diabetes Mellitus and Increases after Metabolic Improvement. 2011.
  19. Farizal J, Dewa EARS. Identifikasi Candida Albican pada Saliva Wanita Penderita Diabetes Melitus. *J Teknol Lab.* 2017;6(2):67-74. doi:<https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v6i2.44>
  20. Wahyuni IS, Dewi TS, Herawati E, Zakiawati D. Profil Lesi Oral Pada Penderita Penyakit Autoimun. *Maj Kedokt Gigi Indones.* 2016;2. <https://jurnal.ugm.ac.id/mkgi>.
  21. Ramadhan N, Marissa N. Karakteristik Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2 Berdasarkan Kadar Hba1c Di Puskesmas Jayabaru Kota Banda Aceh. 2015;2:49-56. [http://download.portalgaruda.org/article.php?article=434871&val=7741&title=KARAKTERIS TIK PENDERITA DIABETES MELLITUS TIPE 2 BERDASARKAN KADAR HBA1C DI PUSKESMAS JAYABARU KOTA BANDA ACEH](http://download.portalgaruda.org/article.php?article=434871&val=7741&title=KARAKTERIS%20PENDERITA%20DIABETES%20MELLITUS%20TIPE%20BERDASARKAN%20KADAR%20HBA1C%20DI%20PUSKESMAS%20JAYABARU%20KOTA%20BANDA%20ACEH).
  22. Isselbacher KJ, Braunwald C, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. *Harrison: Prinsip-Prinsip Ilmu Penyakit Dalam*. 13th ed. (Asdie AH, ed.). Jakarta: Buku Kedokteran EGC; 2000.



## Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica*) terhadap Jumlah Sel Makrofag Peritoneal pada Mencit yang Diinduksi Vaksin BCG

### *Immunomodulator of Ethanol Extracts of The Leaves Azadirachta indica Against Macrophage Peritoneal Cell in Mice Induced The Vaccine BCG*

Yogi Khoirul Abror<sup>1a</sup>, Evy Diah Woelansari<sup>2b\*</sup>, Suhariyadi<sup>3c</sup>

<sup>1,2,3</sup> Jurusan Analis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Surabaya, Indonesia

<sup>a</sup> Email address: yogiabrор@gmail.com

<sup>b</sup> Email address: evydiahw@yahoo.com

<sup>c</sup> Email address: yadi\_cmd@yahoo.co.id

#### HIGHLIGHTS

- Leaf Mimba (*Azadirachta indica*) as immunomodulatory material for Tuberculosis patients

#### ARTICLE INFO

##### Article history

Received date : December 18<sup>th</sup>, 2017

Revised date : January 08<sup>th</sup>, 2018

Accepted date : April 27<sup>th</sup>, 2018

##### Keywords:

BCG Vaccine

Neem Leaves Ethanol Extract

Peritoneal Macrophage

##### Kata Kunci:

Ekstrak Etanol Daun Mimba  
 Makrofag Peritoneal  
 Vaksin BCG

#### ABSTRACT / ABSTRAK

*This research was conducted to determine the immunomodulatory effect of ethanol extract of neem leaves (*Azadirachta indica*) to the number of peritoneal macrophages in mice wick induced by BCG vaccine. Bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine contained an attenuated Mycobacterium bovis. Mycobacterium bovis belongs to the Mycobacterium Tuberculosis Complex (MTC) group that has a similar phenotype characteristic with Mycobacterium tuberculosis and similar clinical manifestations of tuberculosis. The type of the research that used in this study is laboratory experimental research with Post Test Design Design Only Control Group Design. The research was conducted at the Faculty of Veterinary Medicine of Airlangga University in July 2017 using 25 male mice divided into five groups. The dosage of ethanol extract of the neem leaves given was 200 mg / Kg BW with variation for two days, four days, and six days are given. In the result of statistical data analysis using Kruskal-walis test, it is known that the significance value  $p = 0,03$  ( $p < 0,05$ ), that means immunomodulatory of ethanol extract of neem leaves (*Azadirachta indica*) give an effect to peritoneal macrophage cell number in mice wick induced by BCG vaccine, so that neem leaves ethanol extract can be applied to tuberculosis patients.*

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin *Bacillus Calmette-Guerin*(BCG). Vaksin BCG adalah *Mycobacterium bovis* yang dilemahkan, termasuk dalam kelompok *Mycobacterium Tuberculosis Complex* (MTC) yang memiliki kesamaan karakteristik fenotip dengan *Mycobacterium tuberculosis* dan kesamaan manifestasi klinis tuberkulosis. Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga pada bulan Juli 2017 dengan menggunakan 25 ekor mencit jantan yang dibagi menjadi 5 kelompok. Dosis ekstrak etanol daun mimba yang diberikan adalah 200 mg/Kg BB dengan variasi pemberian selama 2 hari, 4 hari, dan 6 hari. Berdasarkan uji *Kruskal-walis* nilai signifikansi  $p = 0,03$  ( $p < 0,05$ ), artinya ada efek imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah sel makrofag peritoneal pada mencit

---

yang diinduksi vaksin BCG, sehingga ekstrak etanol daun mimba dapat diaplikasikan pada penderita tuberkulosis.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.  
All rights reserved

---

**Corresponding Author:**

Evyy Diah Woelansari  
Jurusan Analisis kesehatan, Poltekkes Kemenkes Surabaya  
Jln. Karangmenjangan No. 18 A, Surabaya, Telp.+62 89611897612  
Email: evyydiahw@yahoo.com

---

## 1. PENDAHULUAN

Penyakit tuberkulosis merupakan salah satu permasalahan kesehatan di dunia. Berdasarkan data WHO dalam periode 2016-2020, Indonesia merupakan salah satu negara tertinggi kasus tuberkulosis, TB/HIV dan MDR-TB.<sup>1</sup> Notifikasi kasus tuberkulosis di Indonesia sampai bulan November 2016 sebanyak 360.565 kasus dengan angka kematian akibat tuberkulosis per tahun 2016 sebesar 110.000 dari 261 juta populasi di Indonesia. Pengobatan tuberkulosis di Indonesia telah mengikuti anjuran dari WHO, melalui program DOTS (*Directly Observed Treatment Short Course Chemotherapy*) yaitu penggunaan OAT (Obat Anti Tuberkulosis) minimal selama 6 bulan, namun, pengobatan tuberkulosis saat ini mendapat tantangan dengan adanya strain *Mycobacterium tuberculosis* yang resisten terhadap OAT.<sup>2</sup> Salah satu faktor penyebab resistensi OAT adalah pengobatan yang tidak lengkap atau terputus. Berdasarkan kondisi tersebut, pencegahan serta pengobatan secara komprehensif dan tuntas harus dilakukan, salah satu alternatif yang dapat dilakukan yaitu melalui peningkatan sistem imun menggunakan senyawa atau bahan tertentu sebagai imunomodulator. Tanaman Mimba (*Azadirachta indica*), secara empiris telah dikenal oleh masyarakat sebagai salah satu obat tradisional yang dapat mengatasi berbagai macam penyakit. Daun mimba memiliki kandungan senyawa *catechin* dan *epicatechin* yang bermanfaat sebagai imunomodulator. Pemberian ekstrak cair daun mimba dapat meningkatkan ekspresi sitokin TNF- $\alpha$  pada epitel rongga mulut tikus wistar dengan dosis efektif adalah 200 mg/hari/Kg berat badan, semakin tinggi dosis ekstrak cair daun mimba maka ekspresi TNF- $\alpha$  juga semakin meningkat.<sup>34</sup> Berdasarkan uraian di atas, sudah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG. Rongga peritoneum merupakan tempat yang paling mudah untuk memanen makrofag mencit. Selain itu eksperimen secara *in vivo* dan analisis fungsional *in vitro*, menunjukkan makrofag peritoneum merupakan pertahanan *host* terdepan<sup>56</sup>. Untuk meningkatkan jumlah makrofag diperlukan penginduksi bahan stimulasi inflamasi *Mycobacterium bovis* *Bacillus-Calmette-Guerin* (BCG) agar makrofag yang teraktivasi.<sup>57</sup> Menurut Prendergast *et al*, antigen protein BCG sebagai perlindungan terhadap infeksi tuberkulosis *Mycobacterium virulen* dan vaksin kandidat untuk uji klinis.<sup>8</sup> Vaksin BCG dipilih untuk menggantikan strain *Mycobacterium tuberculosis* murni, dikarenakan tingkat penyebaran *Mycobacterium tuberculosis* yang sangat mudah dan infektifitas yang tinggi. *Mycobacterium bovis* termasuk dalam kelompok *Mycobacterium Tuberculosis Complex* (MTC) yang memiliki kesamaan karakteristik fenotip dengan *Mycobacterium tuberculosis* dan kesamaan manifestasi klinis tuberkulosis.<sup>9</sup>

## 2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### 2.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*.

## 2.2 Lokasi Penelitian

Perlakuan hewan coba dan pengisolasian sel makrofag dari rongga peritoneal mencit dilakukan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Proses ekstraksi daun mimba dilakukan di Unit Layanan Pengujian Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya. Proses pemeriksaan jumlah makrofag peritoneal mencit dilakukan di Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Surabaya. Penelitian dilakukan pada bulan Juni-September tahun 2017.

## 2.3 Sampel Penelitian

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb/c yang memiliki berat badan  $\pm 25$  gram dan berusia  $\pm 2$  bulan. Berdasarkan jumlah kelompok, dengan rumus Federer didapatkan sampel penelitian sebanyak 5 ekor mencit tiap kelompok. Setiap kandang berisi lima ekor mencit, tiga kandang untuk mencit yang diberi perlakuan dengan diberi ekstrak etanol daun mimba, satu kandang untuk kelompok kontrol negatif, dan satu kandang lagi untuk kelompok kontrol positif.

## 2.4 Bahan Penelitian

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun mimba, daun mimba didapatkan dari Balai Penyuluh Pertanian Kecamatan Pangarengan Kabupaten Sampang dan vaksin BCG dari Puskesmas di Kabupaten Sampang. Bahan yang digunakan untuk pemeriksaan jumlah makrofag adalah suspensi makrofag, suspensi tersebut dibuat dengan campuran medium *Rosewell Park Memorial Institute* (RPMI) dan *Fetal Bovine Serum* (FBS), *Trypan Blue* 0,08%. Bahan RPMI, FBS, dan *Trypan Blue*. Instrumen yang digunakan pisau bedah, spuit 10 cc, dan tabung falcon, sentrifus, mikropipet, *yellow tip*, *haemocytometer* dan mikroskop.

## 2.5 Metode Penelitian

### 2.5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Mimba

Ekstrak etanol daun mimba adalah sediaan yang dibuat dari daun mimba yang berwarna hijau tua. Kemudian daun mimba tersebut dikeringkan pada suhu ruang lalu dibuat sediaan serbuk dengan menggunakan blender. Sediaan serbuk daun mimba kemudian dimaserasi dengan etanol 70% selama 3x24 jam. Ekstrak kemudian disaring dan dipisahkan menggunakan vacuum rotary evaporator pada suhu 50°C

### 2.5.2. Perlakuan Hewan Coba

Perlakuan hewan coba diadaptasi terlebih dahulu selama 7 hari kemudian dikelompokkan kedalam 5 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan 1 (P1), kelompok perlakuan 2 (P2), dan kelompok perlakuan 3 (P3). Kelompok kontrol negatif, masing-masing mencit tanpa diinduksi vaksin BCG dan tanpa pemberian ekstrak etanol daun mimba. Kelompok kontrol positif tiap mencit diinduksi vaksin BCG 0,175 mL secara subkutan. Kelompok P1, masing-masing mencit diinduksi vaksin BCG 0,175 mL secara subkutan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200mg/KgBB/hari sebanyak 0,5 mL selama 2 hari. Makrofag peritoneal mencit diisolasi dan dihitung jumlahnya pada hari ke-3. Kelompok P2, masing-masing mencit mencit dengan diinduksi vaksin BCG 0,175 mL secara subkutan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200mg/KgBB/hari sebanyak 0,5 mL selama 4 hari. Makrofag peritoneal mencit diisolasi dan dihitung jumlahnya pada hari ke-5. Kelompok P3, masing-masing mencit dengan diinduksi vaksin BCG 0,175 mL secara subkutan dan diberi ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200mg/KgBB/hari sebanyak 0,5 mL selama 6 hari. Makrofag peritoneal mencit diisolasi dan dihitung jumlahnya pada hari ke-7.

### 2.5.3. Pemeriksaan Jumlah Makrofag Peritoneal

Pemeriksaan jumlah makrofag peritoneal adalah pemeriksaan yang dilakukan dengan mengisolasi makrofag pada rongga peritoneal terlebih dahulu, yaitu memasukkan medium RPMI ke dalam rongga peritoneal mencit, kemudian digoyang-goyang selama  $\pm 3$  menit agar makrofag yang menempel pada dinding rongga peritoneum dapat tersuspensi kedalam medium. Suspensi kemudian diaspirasi menggunakan spuit dan diletakkan kedalam tabung falcon. Setelah itu,

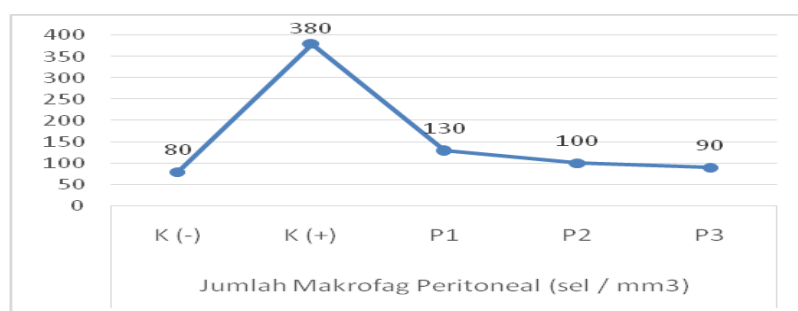
suspensi disentrifuse pada kecepatan 1200 rpm selama 10 menit, supernatan yang terbentuk dibuang dan ditambahkan 3 mL medium RPMI yang mengandung 10% FBS. Suspensi siap digunakan. Prosedur penghitungan makrofag memipet 100 $\mu$ L suspensi sel makrofag dan 100  $\mu$ L pewarna *trypan blue* 0.08% kedalam tabung reaksi. Setelah homogen, dimasukkan, beberapa tetes kedalam *haemocytometer*. Perhitungan jumlah makrofag pada lima kamar hitung pada kotak bagian tengah. Hasil jumlah sel dinyatakan dalam makrofag/mm<sup>3</sup>.

#### 2.5.4 Analisis Data

Analisis data secara statistik dilakukan menggunakan metode *Kruskal – Walis* untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah sel makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh data seperti gambar 1 berikut:



	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
Mean ± SD	80 ± 83,6	380 ± 27,38	130 ± 44,72	100 ± 35,35	90 ± 22,36

Gambar 1. Hasil Uji Hasil Uji imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah sel makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG

Sumber: Data Primer (2017)

Menurut penelitian Susanti dkk, tentang karakterisasi kultur makrofag dari *peritoneum macrophage* (PMs) menunjukkan makrofag lebih matur dibandingkan *Bone marrow macrophage* (BMs) dan *Spleenic macrophage* (SPMs).<sup>5</sup> Jumlah rata-rata makrofag peritoneal pada kelompok kontrol negatif (K(-)) adalah 80 makrofag/mm<sup>3</sup>. Jumlah makrofag pada kontrol negatif sesuai dengan nilai rujukan hitung sel monosit atau makrofag yaitu 2% dari sel leukosit yaitu 80 sel/mm<sup>3</sup>. Hasil tersebut lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif (K(+)) yaitu kelompok mencit yang diinduksi vaksin BCG tanpa perlakuan pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan rata-rata jumlah makrofag peritoneal sebesar 380 sel/mm<sup>3</sup>. Pada kelompok positif menunjukkan adanya aktivitas makrofag akibat imunogenik dari vaksin BCG. Adanya antigen vaksin BCG menyebabkan terjadinya makrofag melakukan proliferasi dan fagositosis.<sup>10</sup> Adanya mencit dengan jumlah makrofagnya 250 sel/mm<sup>3</sup>, lebih kecil dari mencit yang lain pada kelompok positif, kemungkinan disebabkan ekspresi sitokin oleh antigen *Mycobacterium bovis* tidak maksimal sehingga berpengaruh terhadap jumlah makrofag.<sup>11</sup> Jumlah makrofag peritoneal pada kelompok P1, P2 dan P3 yaitu kelompok mencit yang diinduksi vaksin BCG dan diberi perlakuan pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200 mg/Kg BB selama 2 hari, 4 hari, dan 6 hari cenderung menurun jumlahnya apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif.

Berdasarkan hasil penelitian dengan menggunakan ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan dosis 200 mg/kg/hari selama 2 hari, 4 hari, 6 hari, seperti pada gambar 1, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) selama 2 hari menunjukkan jumlah makrofag paling banyak yaitu 130 sel/mm<sup>3</sup>. Sedangkan penurunan jumlah makrofag peritoneal paling besar terjadi pada kelompok P3 dengan jumlah sebesar 90 sel/mm<sup>3</sup>, jumlah makrofag peritoneal pada kelompok tersebut hampir sama dengan jumlah makrofag peritoneal pada kelompok kontrol negatif. Pada hasil analisa data statistik menggunakan uji *Kruskal-walis* diketahui bahwa nilai signifikansi  $p = 0,03$  pada  $\alpha = 0,05$

yang artinya nilai signifikansi lebih kecil dari alfa ( $p < 0,05$ ), yang artinya ada efek imunomodulator ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap jumlah sel makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG. Hasil uji statistik tersebut dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200 mg/Kg BB selama 2 hari, 4 hari, dan 6 hari dapat memberikan efek imunomodulator yang ditinjau dari jumlah makrofag peritoneal pada masing - masing kelompok mencit.

Makrofag sendiri merupakan *innate immunity* yang berfungsi sebagai pertahanan awal untuk melawan adanya infeksi. Sel Makrofag berperan penting dalam proses fagositosis dan berperan penting sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) yang mengawali serta mengarahkan imunitas menuju sistem imunitas seluler yang diperantarai oleh sel T pada infeksi oleh bakteri intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>1213</sup> Pada kelompok kontrol positif jumlah makrofag meningkat untuk melawan adanya infeksi yang berasal dari penginduksian vaksin BCG pada mencit. Kandungan vaksin BCG berupa protein antigen *M. bovis attenuated*, menginduksi Th1 yang mengekspresikan IFN- $\gamma$ , sehingga mekanisme efektor bakterisidal pada makrofag menjadi aktif.<sup>14</sup> Hasil penelitian terdahulu, vaksinasi BCG pada kucing dapat meningkatkan aktivitas makrofag dalam sekresi *Reactive oxygen intermediate* (ROI) dalam mekanisme pemusnahan *M.tuberculosis*, yang aktivitasnya diinduksi oleh sitokin IFN-  $\gamma$  dan TNF $\alpha$ .<sup>315</sup> Kemampuan vaksin BCG dalam menstimulasi respon imun banyak dilaporkan. Penelitian terdahulu oleh Ida Tjahyati menunjukkan vaksinasi BCG pada kucing meningkatkan secara bermakna aktivitas makrofag dalam fagositosis maupun sekresi ROI.<sup>16</sup> Lau *et al* menyatakan bahwa peran sistein protease pada vaksin BCG pada mencit berpotensi makrofag melakukan pro-apoptosis.<sup>310</sup>

Pada kelompok perlakuan satu dengan pemberian ekstrak etanol daun mimba dengan dosis 200 mg/Kg BB selama dua hari, terdapat penurunan jumlah makrofag apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Adanya infeksi dengan penginduksian vaksin BCG akan membuat sel - sel imun terutama makrofag yang merupakan pertahanan pertama tubuh akan bekerja melawan infeksi tersebut. Hal tersebut disebabkan karena ekstrak etanol daun mimba salah satunya mengandung senyawa aktif flavonoid. Flavonoid menghambat enzim lipooksigenase yang berperan dalam biosintesis prostagaldin. Hal ini disebabkan karena flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik sehingga menghambat reaksi oksidasi karena bakteri.<sup>17</sup> IL-12 yang diaktifkan oleh senyawa flavonoid mampu meningkatkan proliferasi sel limfosit dan merangsang aktivasi sel Th1. Sel Th1 yang teraktivasi akan mengekspresikan sitokin IFN- $\gamma$  yang dapat mengaktifkan makrofag. Makrofag yang teraktivasi kemudian akan memperkuat proses fagositosis dengan menghasilkan senyawa yang salah satunya adalah nitrit oksida (NO) yang sangat efektif dalam melawan adanya infeksi bakteri.<sup>1218</sup> Flavonoid sebagai immunostimulan dapat memberikan rangsangan intraseluler seperti sel makrofag dan sel T agar bekerja lebih baik. aktivasi makrofag oleh senyawa flavonoid yang terkandung di dalam daun mimba akan membuat daya fagosit makrofag menjadi lebih baik dan mengeliminasi infeksi yang masuk.<sup>4</sup> Alkaloid pada ekstrak daun mimba bersifat antibakteri karena dapat merusak dinding sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk, pembelahan sel terhambat dan menyebabkan apoptosis sel.<sup>12</sup> Daun mimba mengandung senyawa bioaktif alkaloid, steroid, flavonoid saponin dan tanin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *salmonella* dan *E. coli*. Ekstrak etanol pada daun mimba secara fitokimia mengandung tanin, saponin, flavonoid dan terpenoid serta antioksidan. Jumlah makrofag akan menurun seiring dengan infeksi yang membaik.<sup>1719</sup>

Pada kelompok P2 dan P3 yang terjadi penurunan pada jumlah makrofag, Hal ini menunjukkan bahwa semakin lama hari pemberian ekstrak etanol daun mimba pada mencit yang diinduksi vaksin BCG maka jumlah makrofag peritoneum pada mencit juga semakin menurun. Penurunan jumlah makrofag pada kelompok dengan pemberian ekstrak etanol daun mimba selama 4 hari dan 6 hari juga dapat disebabkan karena makrofag berada pada rongga peritoneum hanya selama 4–12 hari sehingga jumlahnya akan berangsur menurun secara alami dan tergantikan oleh sel – sel imun yang lebih spesifik. Penelitian Da-Long Zhang *et al*, menunjukkan bahwa makrofag autopagi teraktivasi terhadap tikus yang sepsis dalam 4 sampai 6 jam.<sup>20</sup>

Penelitian ini memberikan informasi kepada penderita tuberculosis tentang khasiat daun mimba sebagai alternatif pengobatan dalam memodulasi sistem imun pada infeksi tuberculosis. Bentuk pengaplikasian yang mudah dan sederhana dan bisa dilakukan oleh penderita tuberculosis sebagai pengobatan alternatif yaitu dengan merebus daun mimba. Oleh karena itu agar bisa

diaplikasikan kepada penderita tuberkulosis perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai dosis dan bentuk sediaan daun mimba yang sesuai untuk bisa diberikan kepada penderita tuberkulosis. Selain itu diharapkan peneliti lanjutan dapat mengukur ekspresi interleukin 12 (IL-12) sebagai aktifitas fagositosis sel makrofag.

#### 4. SIMPULAN dan SARAN

Kesimpulan penelitian ini yakni ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica*) dapat sebagai imunomodulator terhadap sel makrofag peritoneal pada mencit yang diinduksi vaksin BCG dengan rata-rata 130 sel/mm<sup>3</sup>, 100 sel/mm<sup>3</sup> dan 90 sel/mm<sup>3</sup>. Saran bagi peneliti selanjutnya yakni mengukur senyawa nitrit oksida (NO) dan ekspresi interleukin 12 (IL-12).

#### DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. *Global Tuberculosis Report*; 2017.
2. Indonesia KKR. *Tuberkulosis Temukan Obat Sampai Sembuh*. Riset Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2016.
3. Tjahajati I. Vaksinasi BCG Meningkatkan Aktivitas Fagositosis dan Sekresi Reactive Oxygen Intermediate (ROI) Pada Makrofag Peritoneum Kucing yang Diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*. *J Kedokt Brawijaya*. 2005;XXI(2).
4. Chaudhary S, Kanwar RK, Sehgal A, et al. Progress on *Azadirachta indica* Based Biopesticides in Replacing Synthetic Toxic Pesticides. *J Front Plant Sci*. 2017;8.
5. Susanti E, Ratnawati R, Aulanni'am, Rudijanto A. Karakterisasi Kultur Makrofag Hasil Isolasi Mouse Peritoneum Makrofag (MPM). *El-Hayah*. 2015;5(3).
6. Liao C-T, Andrews R, Wallace LE, et al. Peritoneal Macrophage Heterogeneity is Associated With Different Peritoneal Dialysis Outcomes. *J Kidney Int* 91 Elsevier. 2017:1088-1103.
7. Gogacz M, Gałczyński K, Wojtaś M, et al. Fas-Related Apoptosis of Peritoneal Fluid Macrophages in Endometriosis Patients: Understanding the Disease. *J Immunol Res* v. 2017.
8. Prendergast KA, Counoupas C, Eto LLC, Bitter W, Winter N, A. Triccas J. The Ag85B protein of the BCG vaccine facilitates macrophage uptake but is dispensable for protection against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Vaccine*. 2016;34(23):2608-2615.
9. Mertaniasih NM, Koendhori EB, Kusumaningrum D. *Buku Ajar Tuberkulosis Diagnostik Mikrobiologis*. Surabaya: Universitas Airlangga; 2013.
10. Alice L, Singh V, Soualhine H, Hmama Z. Expression of Cathepsin S in BCG converts it into a pro-apoptotic and highly immunogenic strain. *J Vaccine*. 2017;35(16):2060-2068.
11. Taufiqurochman MA. Perubahan ekspresi heat shock protein 70 Akibat paparan medan elektromagnetik Extremely low frequency pada makrofag Peritoneum mencit yang diinfeksi *Toxoplasma gondii*. *Biomedika*. 2015;7(2).
12. Mustamu HL, Evacuasiyany E, Liana LK. The Ethanol Extract of Neem Leaf (*Azadirachta Indica* A. Juss) Effect towards Wound Healing in Male Swiss Webster Mice. *J Med Heal*. 2016;1(3).
13. Nazarudin M, Jusak Nugraha A. Nilai Diagnostik Rapid Test TbAg dan MPT64 Dengan Kultur Sebagai Gold Standar. *J Progr Stud Immunol Sekol Pasca Sarj Univ Airlangga*. 2016.

14. Agger E. Novel adjuvant formulations for delivery of anti-tuberculosis vaccine candidates. *HHS Public Access Adv Drug Deliv Rev.* 2016:73–82.
15. Nurkhasanah, Santoso RD, Fauziah R. The immunomodulatory effect of Zingiber cassumunar ethanolic extract on phagocytic activity, nitric oxide and reactive oxygen intermediate secretions of macrophage in mice. *IPCUAD.* 2017.
16. Nurwati I. Pengaruh Akupunktur Titik Feishu (BL-13) dan Zusanli (ST-36) pada inflamasi dan Airway remodeling mencit model asma kronik (kajian imunopatobiologi molekuler). 2015.
17. Supriyanto, Simon.BW, M R, Yunianta. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* Juss). *Pros SNATI F Ke-4.* 2017.
18. Figueroa LA, Abarca-Vargas R, Alanis CG, Petricev VL. Comparison between Peritoneal Macrophage Activation by *Bougainvillea xbuttiana* Extract and LPS and/or Interleukins. *Biomed Res Int.* 2017:11.
19. Susmitha S, Vidyamol K, Ranganayaki P, Vijayaragavan R. Phytochemical Extraction and Antimicrobial Properties of *Azadirachta indica* (Neem). *Glob J Pharmacol* 7. 2013:316-320.
20. Zhang D-L, Zhang S-W, Cheng QH, et al. Effects of peritoneal macrophage autophagy on the immune function of sepsis mice. *Am J Clin Exp Immunol.* 2017:52-59.





## Optimasi Waktu Produksi Metabolit Sekunder dan Skrining Aktivitas Antibakteri Isolat Actinomycetes Rizosfer Tanaman Tin (*Ficus carica*)

### *The Optimization of Secondary Metabolite Production Time and Screening Antibacterial Activity of Actinomycetes Isolate from Tin Plant Rizosfer (*Ficus carica*)*

Warsi<sup>1a\*</sup>, Nanik Sulistyani<sup>2b</sup>

<sup>1,2</sup> Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

<sup>a</sup> Email address: warsisuryatmoko@gmail.com

<sup>b</sup> Email address: do not have email

#### HIGHLIGHTS

- The second day was the best incubation time to harvest antibiotics

#### ARTICLE INFO

##### Article history

Received date : February 02<sup>nd</sup>, 2018

Revised date : February 28<sup>th</sup>, 2018

Accepted date : March, 27<sup>th</sup>, 2018

##### Keywords:

Actinomycetes  
*Ficus carica*  
 MRSA  
 Rhizosphere  
 Tin

##### Kata Kunci:

Actinomycetes  
*Ficus carica*  
 MRSA  
 Rhizosphere  
 Tin

#### ABSTRACT / ABSTRAK

Some Actinomycetes isolates of tin plant (*Ficus carica* L.) have been obtained, namely T24M, T18, T19, T24, T25, T34, T37, T41 and T43. The aim of this study were to optimize the production of secondary metabolites (antibiotics) and screening antibacterial activity against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from the Actinomycetes isolate of the tin rhizosphere. The study was performed with test an activity of the culture fluid from Actinomycetes isolate against MRSA by the well method. The result of optimization secondary metabolite production showed that the second day was the best incubation time to harvest antibiotics. The results showed that bacterial isolates of T24M produced antibiotics that could inhibit MRSA growth.

Telah dihasilkan beberapa isolat Actinomycetes rizosfer tanaman tin (*Ficus carica* L.) yaitu T24M, T18, T19, T24, T25, T34, T37, T41 dan T43. Tujuan penelitian ini adalah untuk optimasi produksi metabolit sekunder (antibiotik) dan skrining aktivitas antibakteri terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dari isolat Actinomycetes rizosfer tanaman tin. Penelitian dilakukan dengan menguji aktivitas cairan kultur isolat Actinomycetes terhadap MRSA dengan metode sumuran. Hasil optimasi produksi metabolit sekunder menunjukkan bahwa hari kedua merupakan waktu inkubasi terbaik untuk memanen antibiotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri T24M menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan MRSA.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.  
 All rights reserved

#### Corresponding Author:

Warsi  
 Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan  
 Jalan Prof. Dr. Soepomo, S.H., Janturan, Warungboto, Umbulharjo, Yogyakarta 55164  
 Email: warsisuryatmoko@gmail.com

## 1. PENDAHULUAN

Berbagai bakteri patogen yang multiresisten terhadap antibiotik menjadi problem utama dalam terapi klinis. Multiresistensi menyebabkan keparahan terhadap suatu penyakit dan dampak yang sering terjadi ialah pasien tidak terobati lagi. Berdasarkan angka kejadian tersebut sehingga perlu dilakukan eksplorasi supaya diperoleh antibiotik baru untuk mengatasi kondisi tersebut.<sup>1,2,3</sup> Produk alam dari mikroba telah menjadi salah satu sumber utama obat baru bagi industri farmasi dalam pengembangan antibiotik. Antibiotik yang telah ditemukan terdapat kurang lebih 70% berasal dari Actinomycetes.<sup>4</sup> Namun saat ini masih banyak senyawa-senyawa baru yang dapat dieksplorasi dari sumber alam, khususnya Actinomycetes.<sup>5</sup> Actinomycetes merupakan sumber utama senyawa antibiotik baru yang dapat dikembangkan menjadi obat.<sup>6</sup>

Actinomycetes adalah bakteri yang bersifat anaerobik atau fakultatif. Actinomycetes secara umum berbentuk batang dan merupakan bakteri gram positif. Morfologi Actinomycetes menunjukkan adanya *filament* yang lembut dan disebut hifa atau miselia. Actinomycetes berkembangbiak dengan cara pembelahan sel. Bakteri ini tahan terhadap zat antifungi namun resisten terhadap penisilin.<sup>7,8</sup>

Peneliti sebelumnya menyatakan bahwa problematika yang dihadapi dalam rangka skrining antibiotik selama ini ialah ditemukannya kembali senyawa yang sudah ada setelah melalui berbagai tahapan penelitian yang memerlukan waktu lama dan berkelanjutan.<sup>5,9</sup> Berdasarkan pengalaman peneliti sebelumnya, sehingga perlu penerapan kerangka berfikir analitis untuk mengidentifikasi dan menghilangkan molekul-molekul yang sudah dikenal dari proses penelitian sedini mungkin. Pendekatan analitis untuk mengatasi keterbatasan ini adalah melalui elusidasi struktur kimia senyawa aktifnya.

Salah satu strategi untuk mendapatkan antibiotik baru adalah dengan mengisolasi mikroba penghasil antibiotik dari tempat-tempat yang belum pernah dilakukan eksplorasi. Salah satu tempat yang belum pernah dieksplorasi adalah rizosfer tanaman tin (*Ficus carica* L.). Rizosfer tanaman tin merupakan tanah di sekitar perakaran tanaman tin. Peneliti sebelumnya telah melakukan isolasi actinomycetes dari rizosfer tanaman tin di daerah Klaten dan diperoleh beberapa isolat yang menghasilkan antibiotik penghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.<sup>10</sup> Dalam penelitian ini, dilakukan uji aktivitas isolat-isolat tersebut terhadap bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

## 2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### 2.1. Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan ialah: isolat Actinomycetes T24M, T18, T19, T24, T25, T34, T37, T41 dan T43 koleksi peneliti sebelumnya.<sup>10</sup> Bahan-bahan lain adalah: bakteri MRSA (Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM), media Starch Nitrat Broth (SNB), media Brain Heart Infusion (BHI) dan NaCl 0,9%. Peralatan yang digunakan yaitu: ose, *rotary shaker*, sentrifuge, tabung konikal, tabung Eppendorf.

### 2.2. Tahapan penelitian

#### 2.2.1. Preparasi metabolit sekunder

Sebanyak 50 mL media SNB yang sudah ditanami Actinomycetes 2 plug diinokulasi dalam Erlenmeyer 250 mL, diinkubasi dalam *rotary shaker* pada suhu kamar dengan kecepatan 200-250 rpm selama 5 hari. Kultur ini disebut kultur *starter*. Selanjutnya, dilakukan optimasi produksi metabolit sekunder dengan cara membuat kultur lanjutan dari kultur *starter* sebanyak 20 mL dalam 200 mL SNB. Campuran diinkubasi dalam *rotary shaker* selama 14 hari pada suhu kamar. Kultur kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh disebut sebagai sumber metabolit sekunder.

#### 2.2.2. Penyiapan suspensi bakteri MRSA

Satu ose bakteri disuspensikan dalam 1 mL media cair BHI, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Sebanyak 100 µL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam 1 mL BHI. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4-8 jam. Bakteri MRSA kemudian diencerkan dengan NaCl 0,9 % sampai kekeruhannya sebanding dengan standar Mc Farland ( $10^8$  CFU/mL). Cairan yang terbentuk disebut suspensi bakteri.

### 2.2.3. Uji aktivitas antibakteri dengan metode sumuran

Biakan bakteri MRSA dengan konsentrasi  $10^8$  CFU/mL ditanamkan ke Media Agar Mueller Hinton atau Agar Darah. Media dibuat sumuran diameter 6 mm. Sumuran yang telah dibuat dimasukkan supernatan cairan kultur sebanyak 50  $\mu$ L. Sumuran diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Diameter zona hambatnya kemudian diukur [11]. Isolat Actinomycetes dianalisis berdasarkan munculnya zone steril pada kultur bakteri uji di media padat. Zone steril tersebut menunjukkan adanya senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh isolat Actinomycetes.

### 2.2.4. Optimasi waktu produksi metabolit sekunder

Isolat Actinomycetes dimasukkan ke dalam media SNB dan diinkubasi pada suhu kamar 5 hari dengan penggojogan sebagai *starter*. Starter disubkultur dalam media SNB dan diinkubasi lagi selama 8 hari. Setiap hari diambil (dipanen) 1 ml dan dimasukkan ke tabung Eppendorf dan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 20 menit. Masing-masing supernatan kemudian diuji aktivitas antibakterinya dengan metode sumuran.

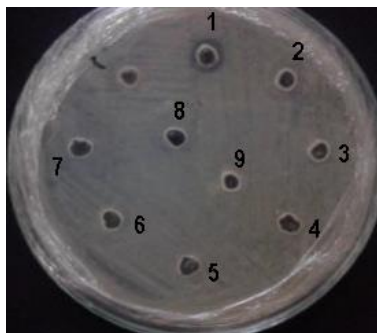
## 2.3. Analisis data

Data optimasi waktu produksi metabolit sekunder (antibiotik) yang berupa diameter zone hambatan tiap waktu pemanenan, diukur diameternya dan dibandingkan dengan masing-masing waktu pemanenan. Waktu optimal adalah waktu pemanenan yang menghasilkan diameter zone hambatan terbesar. Isolat Actinomycetes yang dinyatakan aktif ialah isolat yang menghasilkan antibiotik dan dapat menghambat pertumbuhan MRSA.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum dilakukan uji aktivitas terhadap mikroorganisme uji, terlebih dahulu isolat Actinomycetes dibuat kultur *starter*. Dalam penelitian ini SNB digunakan sebagai media dalam pembuatan kultur *starter*. Hal ini karena dalam media tersebut terkandung karbon dan mineral yang dibutuhkan untuk pertumbuhan maupun aktivitas bakteri.<sup>11</sup> Sumber karbon media SNB berasal dari *soluble starch* yang mengandung sejumlah C yang beragam dari pati dan gliserol.<sup>12</sup> Sumber nitrogen anorganik (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) berasal dari KNO<sub>3</sub>, mineral-mineral yang berasal dari magnesium, natrium, besi, kalium yang merupakan komposisi dari media SNB. Kultur starter pada penelitian ini diinkubasi pada suhu ruangan dengan pengadukan menggunakan termoline. Hal ini karena suhu optimum untuk pertumbuhan Actinomycetes ini adalah sekitar 25-37°C,<sup>13</sup> sedangkan fungsi dari pengadukan media selama inkubasi dengan termoline adalah agitasi dapat mempengaruhi aerasi dan pencampuran nutrient dalam media fermentasi, sehingga hasil metabolit dapat ditingkatkan melalui peningkatan agitasi tersebut.<sup>14</sup> Adapun untuk proses inkubasi dilakukan pada tempat yang tidak terkena cahaya matahari langsung. Hal ini dilakukan untuk mengantisipasi apabila senyawa yang terkandung dalam *starter* tersebut mudah terdegradasi. Semua alat yang digunakan sebelumnya telah disterilkan terlebih dahulu dan kondisi pada saat pembuatan *starter* ini diusahakan dalam keadaan steril. Hal ini untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

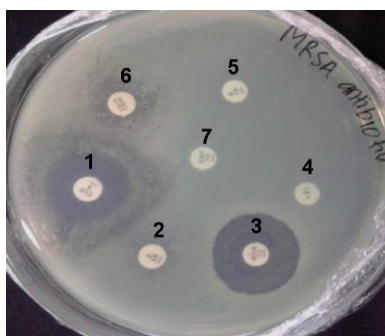
Skrining aktivitas antibakteri terhadap MRSA, pada penelitian ini, dilakukan terhadap 9 isolat Actinomycetes (T24M, T18, T34, T24, T25, T19, T37, T41 dan T43). Isolat-isolat tersebut merupakan koleksi peneliti sebelumnya [10]. Isolat-isolat tersebut terlebih dahulu dilakukan kultur *starter* 5 hari.<sup>15</sup> Dari 9 isolat yang uji, ternyata yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan MRSA hanya 1 yaitu isolat T24M sebagaimana tersaji pada Gambar 1. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka penelitian dilanjutkan hanya menggunakan isolat T24M.



Gambar 1. Hasil uji aktivitas isolat-isolat Actinomycetes terhadap MRSA: T24M (1), T18 (2), T34 (3), T24 (4), T25 (5), T19 (6), T37 (7), T41 (8), T43 (9)

Sumber: Data Primer (2017)

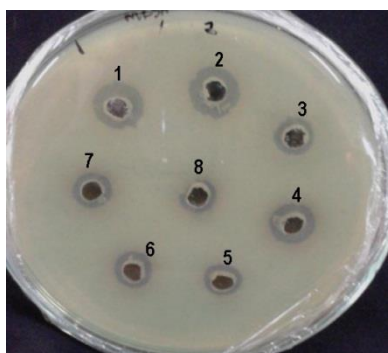
Adapun bakteri MRSA yang digunakan untuk skrining dalam penelitian ini bersifat resisten terhadap beberapa antibiotik. Hasil uji menunjukkan bahwa bakteri MRSA resisten terhadap kloramfenikol, penisilin, eritromisin dan ampisilin. Hasil uji resistensi dalam penelitian ini tersaji pada Gambar 2.



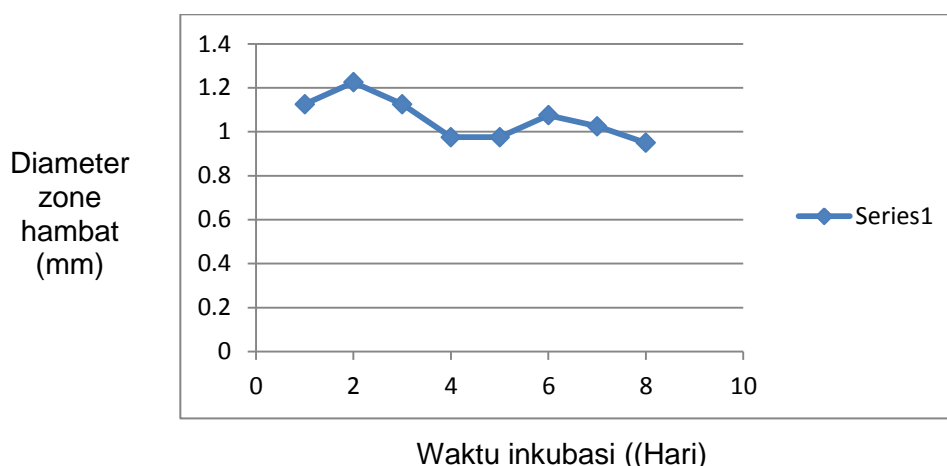
Gambar 2. Hasil uji resistensi MRSA terhadap antibiotik: Ciprofloxacin (1), Chloramphenicol (2), Meropenem (3), Penisilin (4), Eritromisin (5), Tetrasiklin (6), Ampisilin (7)

Sumber: Data Primer (2017)

Untuk persiapan kultur, dilakukan terlebih dahulu optimasi waktu produksi metabolit. Optimasi diperlukan untuk mengetahui lama waktu inkubasi yang diperlukan agar dapat dipanen antibiotik. Optimasi dilakukan dengan pengambilan kultur setiap hari, kemudian masing-masing diuji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Hasil uji aktivitas sebagaimana tercantum pada Gambar 3 dan Gambar 4, menunjukkan bahwa cairan kultur sudah mampu menghambat pertumbuhan MRSA sejak hari pertama inkubasi. Hasil optimasi menunjukkan bahwa hari kedua merupakan hari inkubasi terbaik untuk memanen antibiotik.



Gambar 3. Hasil optimasi waktu produksi metabolit sekunder: 1-8 (hari)  
Sumber: Data Primer (2017)



Gambar 4. Kurva hasil optimasi waktu produksi metabolit sekunder  
Sumber: Data Primer (2017)

Untuk preparasi kultur uji, kultur *starter* tersebut dimasukkan dalam media yang baru untuk peremajaan media. Hal ini karena media yang baru mengandung nutrisi yang banyak sehingga diharapkan bakteri dapat berkembang biak dengan baik. Selama inkubasi kultur uji, setiap hari dilakukan pengambilan 1 mL cairan kultur, kemudian disimpan di freezer. Tujuan dari penyimpanan cairan kultur dalam freezer untuk mengantisipasi agar senyawa yang terkandung di dalam kultur tidak terdegradasi, karena sebelumnya belum diketahui kestabilannya. Dalam melakukan preparasi kultur uji ini juga dilakukan di ruang *Laminar Air Flow* (LAF) untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi.

Dari Tabel 1 terlihat bahwa pada hari ke lima media SNB berwarna kecoklatan. Perubahan warna tersebut terjadi hingga inkubasi hari terakhir. Perubahan warna media terjadi karena *Actinomyces* mengeluarkan pigmen [16].

Tabel 1. Hasil pengamatan warna cairan kultur isolat T24M

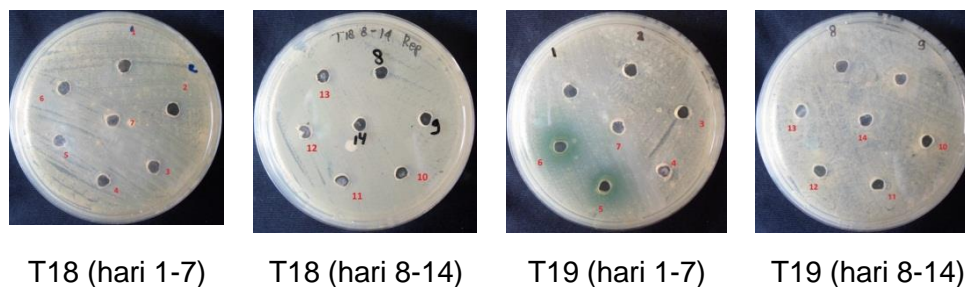
Hari ke-	Warna
1	Putih
2	Putih
3	Putih
4	Putih
5	Putih
6	Kecoklatan
7	Kecoklatan
8	Kecoklatan

Sumber: Data Primer (2017)

Hasil optimasi tersebut digunakan untuk proses pembuatan kultur produksi. Mengingat hasil uji aktivitas cairan kultur yang dilakukan sebelumnya hanya positif terhadap T24M, maka dilakukan uji aktivitas lagi terhadap isolat yang lain dengan melakukan uji aktivitas cairan kultur yang dipanen tiap hari selama 14 hari fermentasi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kemungkinan dihasilkannya antibiotik dalam cairan kultur *Actinomyces* selama rentang hari fermentasi.

### Isolat T18 dan T19

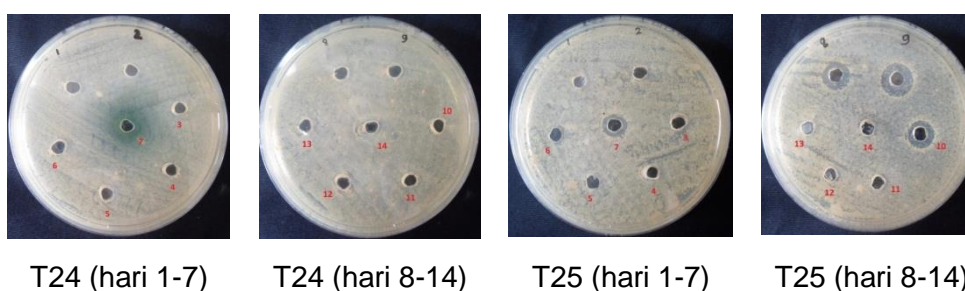
Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat *Actinomyces* T18 dan T19 tersaji pada Gambar 5. Hasil uji menunjukkan bahwa baik isolat T18 maupun T19 tidak menghasilkan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA, karena tidak ada zone jernih di sekitar sumuran. Pada isolat T19, hari ke-5 dan 6 ada zone berwarna, namun tidak ada pengurangan pertumbuhan MRSA di tempat tersebut. Zone berwarna tersebut kemungkinan disebabkan karena metabolit sekunder berupa pigmen yang dihasilkan oleh isolat T19 pada hari tersebut.



Gambar 5. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T18 dan T19  
Sumber: Data Primer (2017)

### Isolat T24 dan T25

Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat Actinomycetes T24 dan T25 tersaji pada Gambar 6. Hasil uji menunjukkan bahwa baik isolat T24 tidak menghasilkan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA karena tidak ada zone jernih di sekitar sumuran. Pada isolat T24 hari ke-7 ada zone berwarna, namun tidak ada pengurangan pertumbuhan MRSA di tempat tersebut. Zone berwarna tersebut kemungkinan disebabkan karena metabolit sekunder berupa pigmen yang dihasilkan oleh isolat T24 pada hari tersebut.

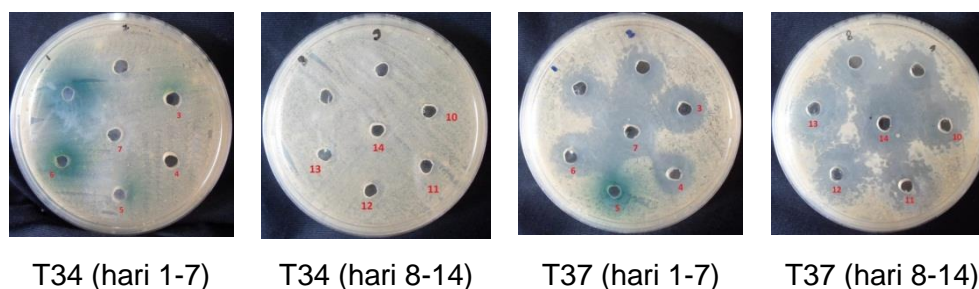


Gambar 6. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T24 dan T25  
Sumber: Data Primer (2017)

Adapun isolat T25, mulai hari ke-6 sampai 10 muncul zone hambat terhadap pertumbuhan MRSA. Mulai hari ke 6 hingga 9 diameter zone hambatnya semakin besar, kemudian hari ke 10 sudah menunjukkan penurunan. Hal ini berarti aktivitas penghambatan terhadap MRSA hanya terjadi selama 5 hari dan hari ke-10 aktivitasnya mengalami penurunan. Pada hari ke-11 sudah tidak ada aktivitas penghambatan pertumbuhan MRSA lagi. Tidak munculnya aktivitas cairan kultur setelah fermentasi hari ke-10 dapat disebabkan tidak stabilnya senyawa aktif yang menghambat pertumbuhan MRSA. Ketidakstabilan senyawa aktif dapat disebabkan antara lain karena proses oksidasi atau degradasi pada senyawa tersebut atau karena sifat zat yang termolabil sehingga tidak stabil pada penyimpanan suhu kamar.

### Isolat T34 dan T37

Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat Actinomycetes T34 dan T37 tersaji pada Gambar 7. Hasil uji menunjukkan bahwa baik isolat T34 tidak menghasilkan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA, karena tidak ada zone jernih di sekitar sumuran. Pada isolat T34, hari ke-5, 6 dan 7 ada zone berwarna sebagaimana isolat T24, juga tidak ada pengurangan pertumbuhan MRSA di tempat tersebut.

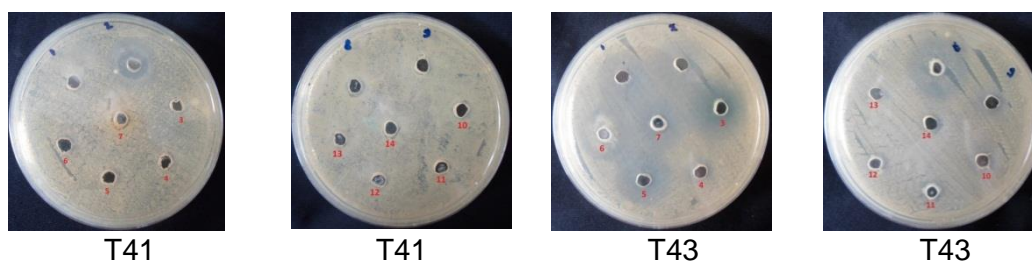


Gambar 7. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T34 dan T37  
Sumber: Data Primer (2017)

Adapun isolat T37, mulai hari ke-1 sampai 4 muncul zone hambat terhadap pertumbuhan MRSA, namun hari ke-5 tidak aktif dan hari ke-6 sudah aktif lagi. Mulai hari ke-6 hingga 14 diameter zone hambatnya muncul relatif besar hingga hari ke-14. Namun demikian, zone hambat yang muncul merupakan zone iradikal dan ada kecenderungan tepi zone hambat yang tidak rata.

### Isolat T41 dan T43

Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat Actinomycetes T41 dan T43 tersaji pada Gambar 8. Hasil uji menunjukkan bahwa baik isolat T41 maupun T43 tidak menghasilkan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri MRSA karena tidak ada zone jernih di sekitar sumuran. Pada isolat T43 nampak seperti muncul zone hambat diawal-awal fermentasi, namun sesungguhnya tidak ada pengurangan pertumbuhan MRSA di sekitar sumuran. Zone tersebut muncul karena ada difusi dari metabolit yang dihasilkan oleh isolat T43, namun metabolit tersebut tidak menghambat pertumbuhan MRSA, sehingga hanya nampak sebagai zone difusi saja. Metabolit tersebut bukan pigmen sebagaimana terjadi pada isolat T19 dan isolat T24, karena tidak ada difusi warna ke dalam media.



Gambar 8. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T41 dan T43  
Sumber: Data Primer (2017)

Diameter zone jernih di sekitar sumuran hasil uji aktivitas cairan kultur isolat Actinomycetes secara keseluruhan dirangkum pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas harian cairan kultur isolat Actinomycetes 14 hari fermentasi terhadap MRSA

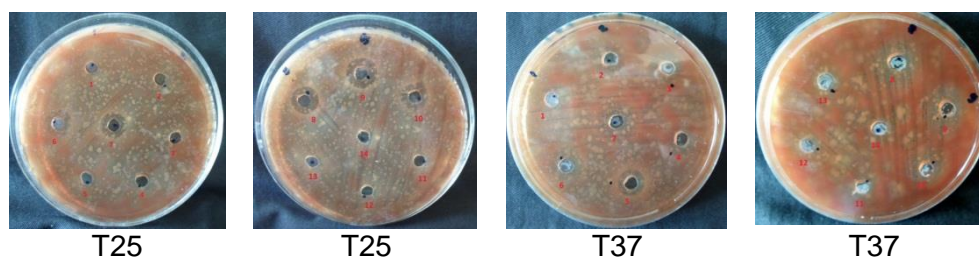
Hari ke	Diameter hambatan terhadap MRSA (mm)							
	T18	T19	T24	T25	T34	T37	T41	T43
1	-	-	-	-	-	22,2	-	-
2	-	-	-	-	-	23,2	13,2	-
3	-	-	-	-	-	23,4	-	-
4	-	-	-	-	-	10,5	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	7,0	-	22,1	-	-
7	-	-	-	10,5	-	25,6	8,0	-

Hari ke	Diameter hambatan terhadap MRSA (mm)							
	T18	T19	T24	T25	T34	T37	T41	T43
8	-	-	-	12,0	-	24,0	9,0	-
9	-	-	-	18,0	-	26,0	-	-
10	-	-	-	12,0	-	24,5	-	-
11	-	-	-	-	-	25,2	-	-
12	-	-	-	-	-	24,8	-	-
13	-	-	-	-	-	26,2	-	-
14	-	-	-	-	-	26,5	-	-

catatan : diameter terukur adalah termasuk diameter sumuran (5 mm)  
Sumber: Data Primer (2017)

Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa cairan kultur isolat Actinomycetes yang nampak menghasilkan aktivitas penghambatan pertumbuhan MRSA adalah isolat T25, T37 dan T41. Namun pada isolat T25 dan T41 aktivitasnya kecil dan berumur pendek (aktivitas hanya bertahan selama 2-4 hari, sehingga kurang menguntungkan apabila senyawa diisolasi lebih lanjut (kemungkinan senyawa aktif mudah teroksidasi).

Adapun pada isolat T37, zone yang terbentuk merupakan zone iradikal, namun hambatannya nampak relatif besar. Untuk memastikan aktivitas isolat T37, maka perlu diuji dengan media lain yaitu agar darah. Sebagai perbandingan, maka juga diuji terhadap T25. Hasil uji aktivitas terhadap MRSA pada media agar darah tersaji pada Gambar 9 dan Tabel 3.



Gambar 9. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T25 dan T37 pada media agar darah  
Sumber: Data Primer (2017)

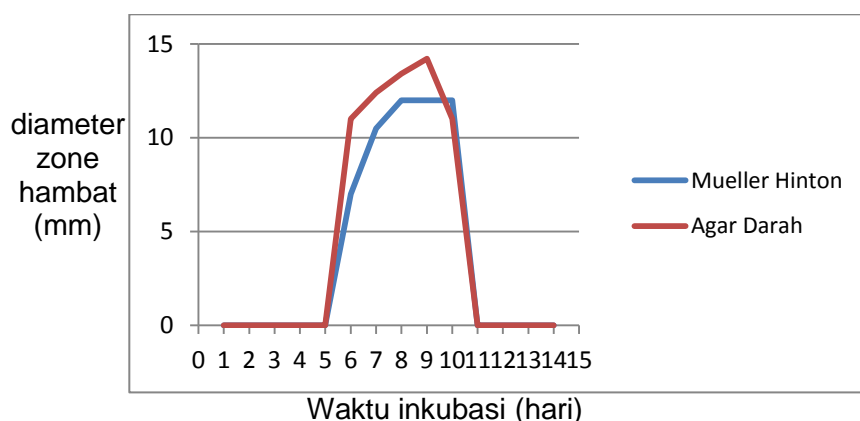
Tabel 3. Hasil uji aktivitas harian cairan kultur isolat T25 dan T37 pada media agar darah

Kode	Diameter zone hambat (mm) pada hari ke													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
T25	-	-	-	-	-	11	12,4	13,4	14,2	11	-	-	-	-
T37	8	-	-	11	11,8	-	-	13,6	17,4	16	-	-	-	12

Sumber: Data Primer (2017)

Berdasarkan tabel tersebut, nampak bahwa zone hambat secara konsisten muncul pada isolat T25 yaitu menunjukkan penghambatan MRSA pada hari ke-6 hingga 10. Hasil ini sama dengan hasil sebelumnya ketika menggunakan media Mueller Hinton. Perbandingan hasil tersebut sebagaimana tersaji pada Gambar 10.





Gambar 10. Hasil uji aktivitas harian isolat T25 terhadap MRSA pada media Agar Mueller Hinton dan Agar Darah

Sumber: Data Primer (2017)

Adapun pada isolat T37, hasil ujinya cenderung tidak konsisten dengan hasil uji menggunakan media Mueller Hinton (MH). Bahkan hari ke-5 yang sebelumnya (MH) tidak muncul zone hambat, menjadi muncul zone hambat ketika menggunakan media Agar Darah. Hal ini menimbulkan keraguan tentang aktivitas isolat T37. Oleh karena itu, dilakukan kultur ulang terhadap T37 dan uji terhadap MRSA kembali. Mengingat aktivitas terbesar diperoleh adalah pada hari ke-9, maka dilakukan fermentasi isolat T37 selama 9 hari. Namun demikian, setelah dilakukan fermentasi ulang terhadap isolat T37 tersebut, hasil uji aktivitas yang dihasilkan berbeda dengan uji sebelumnya. Cairan kultur hari 1-9 tidak menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap MRSA. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa isolat T37 tidak dapat menghambat MRSA. Hasil uji ditampilkan pada Gambar 11.



Gambar 11. Aktivitas harian cairan kultur ulang T37 terhadap MRSA hari ke 1-9  
Sumber: Data Primer (2017)

#### 4. SIMPULAN DAN SARAN

Hasil optimasi produksi metabolit sekunder menunjukkan bahwa hari kedua merupakan waktu inkubasi terbaik untuk memanen antibiotik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat T24M *Actinomyces rizosfer tanaman tin (Ficus carica L.)* menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan MRSA

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan Republik Indonesia yang telah membiayai penelitian ini atas hibah Riset Pembinaan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Kedokteran.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Oskay M, Tamer A, Azeri C. Antibacterial Activity of some Actinomycetes Isolated from Farming Soil of Turkey. *African J Biotechnol.* 2004;3(9):441-446.
2. Parungao M, Maceda E, Villano M. Screening of Antibiotic-Producing Actinomycetes from Marine, Brackish and Terrestrial Sediments of Samal Island, Philippines. *J Res Sci Comput Eng.* 2007;4(3):29-38.
3. Sulistyani N, Muhlis M, Kustanti N, Erinto E, Aquina H, Zainab. Studi Resistensi *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari Limbah Cair Beberapa Rumah Sakit terhadap Antibiotika. In: *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan Lingkungan Untuk Mewujudkan Sehat Jasmani Rohani Bagi Anak Bangsa.* ; 2009.
4. Ogunmwonyi I., Mazomba N, Mabinya L, et al. Studies on the culturable marine actinomycetes isolated from the Nahoon beach in the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr J Microbiol Res.* 2010;4(21):2223-2230.
5. Genilloud O, González I, Salazar O, Martín J, Tormo JR, Vicente F. Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2011;38(3):375-389. doi:10.1007/s10295-010-0882-7
6. Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *A Pers view J Antibiot.* 2005;58(1):1-26.
7. Rollins D, Joseph S. Actinomycetes. University of Maryland.
8. Ambarwati, Gama A. Isolasi Actinomycetes Dari Tanah Sawah Sebagai Penghasil Antibiotik. *J Penelit Sains Teknol.* 2009;10(2):101-111.
9. Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, et al. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology.* 2006;152:675-683.
10. Kurniasari R, Sulistyani N. Anactinomycetes (Isolate T34) as Antibiotic Producer Againsts, *Staphylococcus aureus* and Bioautography Analysis. In: *Proceeding of International Safety Management of Central Cytotoxic Reconstitution.* ; 2013:83-88.
11. Todar K. *Nutrition and Growth of Bacteria in Todar's Online Textbook of Bacteriology.*; 2007.
12. Ali A. Title Skrining dan karakterisasi parsial senyawa antifungi dari Actinomycetes asal limbah padat sagu terdekomposisi. *Berk Penel Hayati.* 2009;14:219-225.
13. Hamid A, Ariffin S, Mohamad S. Identification And Optimal Growth Conditions Of Actinomycetes Isolated From Mangrove Environment. *Malaysian J Anal Sci.* 2015;19(4):904-910.
14. Augustine S, Bhavsar S, Kapadis B. Production of growth dependent metabolite active againsts dermatophytes by *Streptomyces rochei* Ak 39. *Indian J Med.* 2005;121:164-170.
15. Oskay M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains. *African J Biotechnol.* 2009;8(13):3007-3017.



## Potensi Antibakteri Isolat *Actinomyces* terhadap Aktivitas Proteolitik dan Amilolitik *Escherichia Coli* ATCC 25922

### Potention of Antibacterial Isolat *Actinomyces* to Proteolytic and Amilolitic Activity *Escherichia Coli* ATCC 25922

Meiskha Bahar<sup>1a\*</sup>, Fajriati Zulfa<sup>2b</sup>

<sup>1,2</sup> Fakultas Kedokteran UPN "VETERAN" Jakarta, Indonesia

<sup>a</sup> Email address: meiskha27@gmail.com

<sup>b</sup> Email address: zulfafajriati@yahoo.com

#### HIGHLIGHTS

- Isolat *Actinomyces* mengandung senyawa yang berfungsi sebagai antiproteolitik dan antiamilolitik terhadap *E.coli* ATCC 25922

#### ARTICLE INFO

##### Article history

Received date : November 11<sup>st</sup>, 2017

Revised date : November 27<sup>th</sup>, 2017

Accepted date : February 28<sup>th</sup>, 2018

##### Keywords:

*Actinomyces*

Anti-proteolytic

Anti-amylolytic

##### Kata Kunci:

*Actinomyces*

Anti-proteolitik

Anti-amilolitik

#### ABSTRACT / ABSTRAK

Occurs *E. coli* resistance to class 3 cephalosporin class antibiotics and fluoroquinolone groups. The antibiotic resistance that occurs has narrowed the choice of therapy. This study aims to determine the effect of *Actinomyces* isolates on proteolytic and amylolytic enzymes *E. coli* ATCC 25922. This research is experimental research, qualitative tests of protease and amylase enzymes from *E. coli* ATCC 25922 shown by clear zones around the growth colonies. The result of *Anova One-Way* test showed a significant difference on the width of clear zone, colony zone and *PER* and *AER* score with p value < 0,05. This indicates that *Actinomyces* isolates contain compounds that can act as inhibitors of protease and amylase enzymes from *E.coli* ATCC 25922. It is hoped that there will be research about identification of *Actinomyces* species isolates in Bogor Botanical Garden, so that later can be cultivated and produced as an antibiotics alternative.

Terjadi resistensi *E. coli* terhadap antibiotik golongan sefalosporin generasi ke-3 dan golongan fluorokuinolon. Resistensi antibiotik yang terjadi telah mempersempit pilihan terapi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari isolat *Actinomyces* terhadap enzim proteolitik dan amilolitik *E. coli* ATCC 25922. Penelitian ini adalah penelitian eksperimen, dilakukan uji kualitatif terhadap enzim protease dan amilase dari *E. coli* ATCC 25922. Hasil uji *Anova One-Way* menunjukkan terdapat perbedaan luas zona bening, zona koloni, nilai *PER* dan *AER* antar kelompok perlakuan dengan nilai p < 0,05. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *Actinomyces* mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim protease dan amilase dari *E.coli* ATCC 25922. Diharapkan dapat dilakukan penelitian tentang identifikasi spesies dari isolat *Actinomyces* yang terdapat di Kebun Raya Bogor, sehingga nantinya dapat dikembangkan dan diproduksi sebagai alternatif pengganti antibiotik.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.  
 All rights reserved

#### Corresponding Author:

Meiskha Bahar  
 Jln.RS Fatmawati Pondok Labu Jakarta Selatan  
 Email: meiskha27@gmail.com

## 1. PENDAHULUAN

*Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri gram-negatif berbentuk batang dan memiliki sifat anaerob fakultatif. Bakteri yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* ini merupakan flora normal pada usus manusia yang juga berfungsi untuk membantu sintesis vitamin K. Selain itu, *E.coli* juga dapat berkembang biak di lingkungan sekitar manusia dan berfungsi sebagai pengurai.<sup>1,2</sup> *E. coli* dapat menjadi patogen terhadap manusia apabila jumlahnya meningkat di dalam tubuh. Keberadaan *E. coli* dalam air atau makanan dianggap berkaitan erat dengan ditemukannya bibit penyakit pada pangan. Bakteri ini memproduksi enterotoksin yang perannya terhadap penyakit diare telah diketahui secara luas.<sup>3</sup>

*Antimicrobial Resistance Global Report of Surveillance* tahun 2014 yang dilakukan oleh WHO menunjukkan bahwa terjadi resistensi *E. coli* terhadap antibiotik golongan sefalosporin generasi ke-3 dan golongan fluorokuinolon. Resistensi antibiotik yang terjadi telah mempersempit pilihan terapi.<sup>4</sup> Hal ini memunculkan kebutuhan mendesak untuk membuat agen anti infeksi yang baru. Penanggulangan infeksi bakteri *E. coli* perlu dilakukan agar tidak berdampak luas bagi kesehatan manusia. Upaya yang dapat dilakukan adalah dengan pemanfaatan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman atau pemanfaatan mikroba baik dari golongan jamur atau bakteri yang dapat menghasilkan senyawa antimikroba dan bertindak antagonis jika ditumbuhkan pada lingkungan yang sama.

Mikroorganisme yang terdapat di tanah antara lain dari jenis Actinomycetes terutama genus *Streptomyces*. Jamur golongan ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Ada beberapa penelitian yang telah membuktikan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa atau enzim yang berguna sebagai antimikroba.<sup>5</sup> Tahun 1999 Indriasari berhasil menemukan 186 isolat Actinomycetes dari 78 sampel sedimen ekosistem air hitam yang terletak di Kalimantan Tengah, dari 186 isolat diketahui 58 isolat dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, 38 isolat mampu menghambat *Escherichia coli* dan 17 isolat mampu menghambat keduanya. Penelitian Nedialkova & Naidenova (2005), juga berhasil menemukan 40 strain Actinomycetes yang diisolasi dari Antartica. Setelah diujikan pada 7 spesies bakteri didapatkan hasil 60% strain berpotensi sebagai antibiotik, dan 10 strain mempunyai daya hambat dengan spektrum yang luas.<sup>6,7</sup> Ambarwati pada tahun 2012 juga berhasil mengisolasi Actinomycetes dari rizosfer padi (*Oryza sativa*). Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel isolat dari kebun Raya Bogor karena tempat ini merupakan kebun botani terbesar dan memiliki beragam koleksi tanaman dan didukung dengan iklim yang mendukung pertumbuhan beberapa jenis mikroba tanah seperti Actinomycetes dan diharapkan dari penelitian ini dapat dilakukan pengembangan penelitian terhadap kandungan Actinomycetes di Kebun Raya Bogor sebagai pengembangan potensi dari senyawa metabolit yang berpotensi sebagai senyawa alternatif dalam uji resistensi bakteri.

## 2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### 2.1. Desain penelitian

Penelitian ini adalah penelitian True eksperimental. Perlakuan dengan menguji efektivitas dari isolat Actinomycetes terhadap aktivitas proteolitik dan amilolitik *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 2.2. Lokasi penelitian

Lokasi penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional Jakarta.

### 2.3. Sampel penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah *Actinomycetes* yang diambil dari tanah di Kebun Raya Bogor.

### 2.4. Bahan dan alat penelitian

- a. Isolat *Actinomycetes* yang digunakan dalam penelitian yang diisolasi dari tanah di perkebunan Bogor.
- b. Suspensi *E. coli* ATCC 25922 yang dibiakan di MHA selama 24 jam.

- c. Media selektif untuk isolasi *Actinomycetes* adalah *Strach Casein Agar* (SCA)
- d. Media *Skim Milk Agar* untuk uji Protease
- e. Antibiotik kloramfenikol (kontrol positif)
- f. Antibiotik untuk memastikan *Actinomycetes* kontrol antibiotik spesifik yaitu *Cyclohexamide*
- g. Antifungi *Nystatin*
- h. *Waterbath*
- i. *Incubator*
- j. *Autoclave*
- k. Mikropipet

## 2.5. Koleksi/tahapan penelitian

### a. Pengamatan Aktivitas Protease *E. coli* dengan Metode Difusi

Isolat *Actinomycetes* diencerkan dalam tiga jenis konsentrasi berbeda ( $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ) ditambahkan ke cawan petri masing-masing, kemudian dicampur dengan 10mL *Casein Agar*. Pada media *Skim Milk Agar* yang sudah mengeras, dibuat lubang ditengahnya dengan diameter 3 mm, kemudian sebanyak 1 mL bakteri *E. coli* yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam lubang tersebut dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}$  C. Ditambahkan indikator *Bromocresol Purple*. Aktivitas proteolitik *E. coli* yang ditumbuhkan pada media *Skim Milk Agar* ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening yang muncul disekitar koloni yang terbentuk. Indeks proteolitik dihitung dengan cara mengukur luas areal bening dan luas koloni bakteri. Perhitungan indeks proteolitik adalah perbandingan luas areal bening dengan luas koloni bakteri

### b. Pengamatan Aktivitas Amilolitik *E. coli* dengan Metode Difusi

Isolat *Actinomycetes* diencerkan dalam tiga jenis konsentrasi berbeda ( $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ) ditambahkan ke cawan petri masing-masing, kemudian dicampur dengan 10mL *Casein Agar*. Pada media *Starch Agar* yang sudah mengeras, dibuat lubang ditengahnya dengan diameter 3 mm, kemudian sebanyak 1 mL bakteri *E. coli* yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam lubang tersebut dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}$  C. Ditambahkan indikator JKJ 1%. Aktivitas amilolitik *E. coli* yang ditumbuhkan pada media *Starch Agar* ditunjukkan dengan terlihatnya zona bening yang muncul disekitar koloni yang terbentuk

## 2.6. Analisis data

Data yang telah terkumpul selanjutnya diolah dan dianalisis secara statistik. Data analisis yang digunakan adalah *Anova One Way*, untuk mengetahui perbedaan pengaruh isolate *Actinomycetes* terhadap aktivitas protease dan amilase terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* yang telah dilakukan tiap kelompoknya

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh data sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil Pengukuran Luas (mm) Zona Bening, Zona Koloni, dan *PER* Pada Seluruh Kelompok Perlakuan

Pengulangan	Perlakuan											
	Actinomycetes $10^{-4}$			Actinomycetes $10^{-5}$			Actinomycetes $10^{-6}$			Kontrol positif		
	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona bening	Zona koloni	<i>PER</i>	Zona benin	Zona koloni	<i>PER</i>
1	13,81	25,73	1,53	12,27	23,71	1,52	9,97	17,42	1,57	2,43	24,59	1,10
2	10,63	16,94	1,62	9,10	9,91	1,92	10,03	11,92	1,84	1,73	30,26	1,15
3	9,28	12,97	1,72	8,80	10,02	1,88	9,31	13,15	1,71	1,83	22,34	1,11
4	11,34	17,45	1,65	9,90	13,27	1,75	7,13	10,44	1,68	1,57	20,87	1,07
5	9,62	16,17	1,59	8,56	12,31	1,69	7,28	8,59	1,85	1,53	28,69	1,05

Sumber: Data primer 2017

Tabel 2. Hasil Pengukuran Luas (mm) Zona Bening, Zona Koloni, dan AER Pada Seluruh Kelompok Perlakuan

Pengulangan	Perlakuan											
	Actinomycetes 10 <sup>-4</sup>			Actinomycetes 10 <sup>-5</sup>			Actinomycetes 10 <sup>-6</sup>			kontrol positif		
	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER	Zona bening	Zona koloni	AER
1	10,20	14,49	1,70	9,99	12,31	1,81	9,18	13,44	1,68	2,43	24,59	1,10
2	9,19	15,34	1,59	7,66	12,40	1,61	7,32	9,91	1,74	1,73	30,26	1,15
3	7,52	12,25	1,61	7,93	12,79	1,62	8,07	9,80	1,82	1,83	22,34	1,11
4	8,87	14,40	1,62	8,81	12,60	1,69	8,08	9,98	1,81	1,57	20,87	1,07
5	9,54	15,85	1,60	8,58	11,31	1,76	8,53	9,88	1,86	1,53	28,69	1,05

Sumber: Data primer 2017

Tabel 3. Uji ANOVA *Proteolytic Enzymatic Rate* (PER)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.423	3	.474	41.440	.000
Within Groups	.183	16	.011		
Total	1.606	19			

Sumber: Data primer 2017

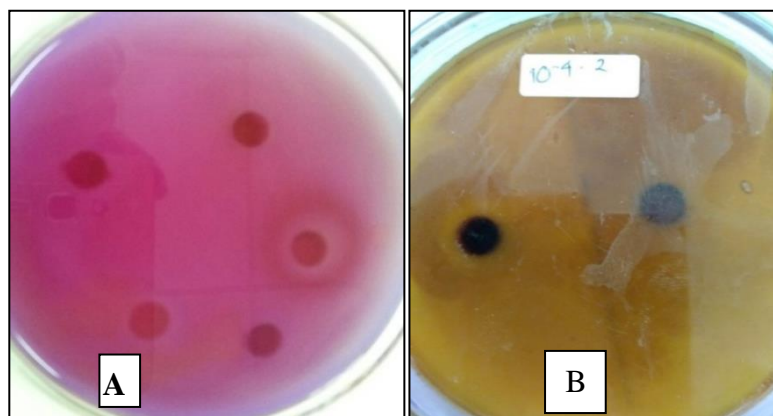
Pada uji *One Way Anova* diperoleh nilai p signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan PER yang bermakna pada dua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan peningkatan zona lisis Protein dari Actinomycetes per konsentrasi dan kontrol positif terhadap bakteri *E.coli*.

Tabel 4. Uji ANOVA *Amylolytic Enzymatic Rate* (AER)

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.437	3	.479	118.973	.000
Within Groups	.064	16	.004		
Total	1.501	19			

Sumber: Data primer 2017

Pada uji *One Way Anova* diperoleh nilai p signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa paling tidak terdapat perbedaan AER yang bermakna pada dua kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan peningkatan zona lisis Amilase dari Actinomycetes per konsentrasi dan kontrol positif terhadap bakteri *E.coli*.

Gambar 1. Zona Bening dan zona koloni pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922

- A. Aktivitas Proteolitik isolat Actinomycetes (konsentrasi  $10^{-4}$ )
  - B. Aktivitas Amilolitik isolate Actinomycetes (konsentrasi  $10^{-4}$ )
- Sumber: Bahar, 2017

Untuk mengetahui aktivitas proteolitik *Escherichia coli* pada berbagai kelompok perlakuan, telah dilakukan pengukuran diameter zona koloni dan zona bening yang terbentuk dalam masing-masing cawan. Dari hasil pengukuran tersebut, didapatkan *Proteolytic Enzymatic Rate (PER)* dengan cara membagi antara jumlah diameter zona koloni ditambah dengan diameter zona bening terhadap diameter zona koloni. Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji Protease, pada Tabel 1 menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan per konsentrasi. Hal ini juga sejalan dengan dengan nilai  $p < 0,05$  untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Protease dari *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa mekanisme penghambatan terhadap enzim protease yang diproduksi oleh *E.coli* dilakukan oleh senyawa bioaktif dari hasil metabolit sekunder yang dihasilkan dari isolat Actinomycetes. Dari hasil pengukuran zona koloni Uji Protease *E.coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna luas zona koloni antar kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim protease dari *E.coli* ATCC 25922. Semakin besar penghambatan terhadap enzim protease *E.coli* maka semakin luas zona koloni yang terbentuk. Actinomycetes khususnya dari jenis Streptomyces mengandung inhibitor protease alkalin,  $\alpha$ -amilase dan inhibitor peptide dan protease protein.<sup>8</sup> Senyawa ini menghambat enzim protease yang dihasilkan oleh bakteri *E.coli* dengan cara menghambat reseptor bakteri sehingga bakteri tidak dapat memproduksi atau proses produksi enzim protease dari bakteri akan terganggu atau malah tidak akan bekerja.<sup>9</sup> Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji Amilase, menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan dengan nilai  $p < 0,05$  untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Amilase dari *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa bioaktif dari hasil metabolit sekunder yang dihasilkan dari isolat Actinomycetes dapat menghambat enzim Amilase yang diproduksi oleh *E.coli*. Dari hasil pengukuran zona koloni Uji Amilase *E.coli* ATCC 25922 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna luas zona koloni antar kelompok perlakuan dengan nilai  $p < 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa Actinomycetes mengandung senyawa yang dapat berfungsi sebagai inhibitor terhadap enzim amilase dari *E.coli* ATCC 25922.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Raja tahun 2010 yang mengisolasi 17 strain Actinomycetes dari sedimen mangrove menunjukkan hasil bahwa mikroorganisme tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat kerja enzim amylase.<sup>10</sup> Hal ini juga sejalan dengan penelitian Meng et.al tahun 2013 yang berhasil mengisolasi 21 jenis Streptomyces dari beberapa tempat di Cina, menyimpulkan bahwa bakteri-bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghambat enzim  $\alpha$ -amilase.<sup>11</sup> *E.coli* memproduksi  $\alpha$ -amilase sitoplasma, mekanisme kerja penghambat enzim  $\alpha$ -amilase yang dimiliki oleh Actinomycetes adalah disebabkan oleh struktur sikliknya analog dengan substrat amilase, sehingga dapat menghambat produksi enzim amylase oleh *E.coli*. Menurut Meliawati dalam Sutiamihardja 2008, menjelaskan bahwa kemampuan atau daya amilolitik suatu mikroba ditandai dengan terbentuknya zona bening dalam medium yang mengandung pati. Zona bening yang terbentuk menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu glukosa.<sup>12</sup>

Hasil dari penelitian ini jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu menunjukkan bahwa isolat Actinomycetes dari tanah di kebun Raya Bogor ternyata dapat menghambat aktivitas enzim Protease dan Amilase dari bakteri *E.coli* sedangkan pada penelitian sebelumnya, tidak dinilai dari aktivitas enzim yang spesifik dari bakterinya. Dikarenakan keterbatasan waktu dan sumber daya, penilaian efek isolat Actinomycetes terhadap aktivitas proteolitik dan amilolitik *E.coli* hanya dapat dilakukan secara kualitatif saja dan tidak dilanjutkan ke penilaian secara kuantitatif. Hasil penilaian aktivitas proteolitik dan amilolitik *E.coli* hanya dapat dinilai melalui perubahan nilai *PER* dan *AER* tanpa dilakukan penilaian lebih lanjut terhadap perubahan nilai *PU (Protease Unit)* dan *AU (Amylase Unit)* per konsentrasi.

#### 4. SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil pengukuran zona bening untuk Uji protease dan amilase menunjukkan adanya perbedaan luas zona bening yang signifikan dengan nilai  $p < 0,05$  untuk masing-masing kelompok perlakuan yang berbeda. Dari hasil tersebut terlihat bahwa semakin besar daya hambat terhadap enzim Protease dan amilase bakteri *E.coli* ATCC 25922 maka semakin sempit luas zona bening yang terbentuk.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Rektor UPN Veteran Jakarta melalui LPPM yang telah memberikan kesempatan dan bantuan dana penelitian, pihak Kebun Raya Bogor yang telah memberikan keluasaan kepada kami untuk mengambil sampel, mahasiswa yang telah membantu dalam pengambilan sampel dan Bu Titik yang telah membantu pengerjaan di Laboratorium.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Arisman. *Buku Ajar Ilmu Gizi Keracunan Makanan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2009.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Jawetz, Melnick, Adelberg. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2008.
3. Lavor AKLS, Et.al. Association between drugs and herbal products: in vitro enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). *Eur J Integr Med*. 2014;6.
4. Martha D, Achmad S, Tejasari M. *Escherichia coli* resisten terhadap seftriakson dan siprofloksasin. In: *Pendidikan Dokter Universitas Islam Bandung*. Bandung; 2015.
5. Adriani Y, Febriwanti T. Isolasi dan Karakterisasi Actinomycetes Sebagai Penghasil Antibiotik Dari Sampel Peternakan Sapi di Kecamatan Galesong Kabupaten Takala. *Biogenesis*. 2013;1(2):97-100.
6. Nediakolva D, Naidenova M. Screening The Antimicrobial Activity of Actinomycetes Strains Isolated from Antarctica. *J Cult Collect*. 2005;4:29-35.
7. Pandhare J. studies of an alkaline protease inhibitor from a *Streptomyces* sp. *Div Biochem Sci Natl Chem Lab*. 2002.
8. Karthik L, Et.al. Protease Inhibitors From Marine Actinobacteria as a Potential Source for Antimalarial Compound. *PLoS One*. 2014;9(3). doi:10.1371/journal.pone.0090972.
9. Raja S, Ganesan S, Sivakumar K, Thangaradjou T. Screening of marine actinobacteria for amylase enzymes inhibitors. *Indian J Microbiol*. 2010;50:233.
10. Meng P, Xie C, Geng P, Et.al. Inhibitory effect of components from *Streptomyces* species on  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase of different origin. *Appl Biochem Microbiol*. 2003;49(8):160.
11. Zhibin S, Et.al. Isolation and characterization of a Proteinaceous  $\alpha$ -amylase inhibitor AAI-CC5 from *Streptomyces* sp. CC5 and It's Gene Cloning and Expression. *PubMed*. 2014. doi:10.1007/s10482-014-0333-y.
12. Nurhalijah S. *Isolasi Bakteri Dan Uji Aktivitas Amilase Kasar*. Medan; 2008.





## Variasi Konsentrasi Alfa Siklodekstrin dan Waktu Sentrifugasi Dalam Preparasi Serum Lipemik Pada Pemeriksaan Glukosa Metode GOD-PAP

### *The Variation of Alpha Cyclodextrin and Centrifugation Time in Lipemic Serum Preparation for Glucose Examination With GOD-PAP Method*

Arfa Izzati<sup>1a\*</sup>, Ani Riyani<sup>2b</sup>

<sup>1,2</sup> Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung, Indonesia

<sup>a</sup> Email address: arfaarfa91@gmail.com

<sup>b</sup> Email address: ani\_riyanianalis@yahoo.com

#### HIGHLIGHTS

- Konsentrasi alfa-siklodekstrin dan waktu sentrifugasi optimal.

#### ARTICLE INFO

##### **Article history**

Received date : February 09<sup>th</sup>, 2018

Revised date : March 13<sup>rd</sup>, 2018

Accepted date : March 23<sup>rd</sup>, 2018

##### **Keywords:**

Alpha Cyclodextrin  
Glucose GOD-PAP  
Lipemic Serum  
Centrifugation Time

##### **Kata Kunci:**

Alfa Siklodekstrin  
Glukosa GOD-PAP  
Serum Lipemik  
Waktu Sentrifugasi

#### ABSTRACT / ABSTRAK

Examination of glucose levels of the GOD-PAP method in serum may be disrupted by the presence of turbidity caused by lipemic serum, thus causing high false serum glucose levels to result. The addition of alpha-cyclodextrin ( $\alpha$ -CD) may bind the lipid in serum. This study aims to find out how the concentration and time of optimal centrifugation with the addition of alpha-cyclodextrin. Added variation alpha-cyclodextrin concentration 0,5%, 1%, and 1,5% in serum collection (pooled serum) with variation concentration of triglycerides  $\pm$  1000 mg/dL,  $\pm$  1500 mg/dL and  $\pm$  2000 mg/dL with centrifugation time for 5 minutes, 10 minutes and 15 minutes at 4°C to form precipitate and supernatant. The supernatant measured the glucose GOD-PAP and triglycerides GPO-PAP using a photometer. The result were no significant differences in variations centrifugation time and variations alpha-cyclodextrin concentrations after comparison with serum glucose combination levels (base line) in the ANOVA test ( $P=0,05$ ) and Kruskal Wallis Test ( $P=0,05$ ). There was no significant difference with pooled serum (base line) of triglyceride concentration  $\pm$  1000 mg/dL with alpha-cyclodextrin concentration 0,5% and centrifugation time at 10 minute, triglyceride concentration  $\pm$  1500 mg/dL and  $\pm$  2000 mg/dL with alpha-cyclodextrin concentration 1%, centrifugation time at 5 minute.

Pemeriksaan kadar glukosa metode GOD-PAP di dalam serum dapat terganggu dengan adanya kekeruhan disebabkan oleh serum lipemik yang menyebabkan hasil kadar glukosa dalam serum tinggi palsu. Penambahan alfa-siklodekstrin ( $\alpha$ -CD) dapat mengikat lipemik di dalam serum. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi dari alfa-siklodekstrin dan waktu sentrifugasi yang optimal dengan penambahan alfa-siklodekstrin. Menambahkan variasi konsentrasi alfa-siklodekstrin 0,5%, 1%, dan 1,5% pada gabungan serum (*pooled serum*) dengan variasi kadar trigliserida  $\pm$ 1000 mg/dL,  $\pm$ 1500 mg/dL dan  $\pm$ 2000 mg/dL pada variasi waktu sentrifugasi selama 5 menit, 10 menit dan 15 menit. Supernatan yang terbentuk diukur kadar glukosa metode GOD-PAP dan trigliserida metode GPO-PAP menggunakan alat fotometer. Hasil yang didapatkan, tidak terdapat perbedaan pada suatu nilai secara signifikan dari variasi waktu sentrifugasi dan variasi konsentrasi alfa-siklodekstrin setelah dibandingkan dengan kadar glukosa gabungan serum awal (*base line*) pada uji ANOVA ( $P=0,05$ ). dan uji Kruskal Wallis ( $P=0,05$ ). Kesimpulan yang didapatkan, tidak terdapat perbedaan signifikan

---

terhadap gabungan serum awal (*base line*) dengan kadar trigliserida  $\pm$  1000 mg/dL dengan kadar alfa-siklodekstrin 0,5% pada waktu sentrifugasi selama 10 menit, kadar trigliserida  $\pm$  1500 mg/dL dan  $\pm$  2000 mg/dL dengan kadar alfa-siklodekstrin 1%, dengan waktu sentrifugasi selama 5 menit.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.  
All rights reserved

---

**Corresponding Author:**

Arfa Izzati  
Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung,  
Jln. Babakan Loa No. 10 A, Bandung, Indonesia.  
Email: arfaarfa91@gmail.com

---

## 1. PENDAHULUAN

Sekitar 70% dari semua keputusan medis didasarkan pada hasil laboratorium sehingga laboratorium memiliki peran penting dalam perawatan kesehatan. Tahap pra-analitik merupakan bagian utama yang menyumbang kesalahan di laboratorium.<sup>1</sup> Hemolisis, ikterik, dan lipemik merupakan salah satu gangguan pra-analitik dan dapat mempengaruhi hasil dengan berbagai metode laboratorium.<sup>2,3</sup> Lipemik merupakan akumulasi dari partikel lipoprotein yang berlebih di dalam darah sehingga darah menjadi keruh berwarna putih susu. Partikel terbesar dari lipoprotein yaitu kilomikron, dengan ukuran 70-1000 nm, memiliki potensi terbesar dalam menyebabkan kekeruhan sampel.<sup>3</sup> Keberadaan sampel lipemik menyebabkan meningkatnya absorpsi cahaya sehingga mempengaruhi pemeriksaan yang menggunakan metode spektrofotometri.<sup>4</sup> Terdapat metode dalam menilai lipemik di sampel laboratorium. Trigliserida dalam serum dapat memberikan penilaian terhadap kadar lipemik.<sup>5</sup> Sampel lipemik dapat dimodifikasi menggunakan kuning telur ayam sehingga kuning telur ayam menjadi salah satu alternatif untuk membuat sampel lipemik buatan.<sup>4</sup> Pemeriksaan glukosa menggunakan metode Glukosa Oksidase Para-Amino Phenazone (GOD-PAP) merupakan salah satu pemeriksaan yang dapat terganggu apabila sampel lipemik di atas 626 mg/dL.<sup>6</sup> Alternatif untuk menangani sampel lipemik dapat menggunakan beberapa metode yaitu; ultrasentrifugasi, pengenceran sampel, dan flokulasi lipoprotein salah satunya dengan alfa-siklodekstrin.<sup>3,7</sup> Menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) pada pedoman interferensi uji telah merekomendasikan klasifikasi penanganan sampel lipemik yaitu metode ultrasentrifugasi yang merupakan standar prosedur baku.<sup>8</sup> Namun kelemahan dari ultrasentrifugasi adalah alat yang mahal dan tidak semua laboratorium memiliki ultrasentrifuge. Metode pengenceran sampel hanya cukup untuk menghapus gangguan kekeruhan saja tanpa memastikan bahwa konsentrasi analit tetap dalam batas-batas analitis.<sup>3</sup> Siklodekstrin wujudnya berupa serbuk. merupakan kelompok oligosakarida nonpereduksi produk modifikasi pati dengan struktur kimia berbentuk cincin.<sup>9,10</sup> Siklodekstrin memiliki permukaan luar yang bersifat hidrofilik sedangkan bagian dalam rongganya bersifat hidrofobik, dengan sifatnya tersebut, maka siklodekstrin dapat mengikat lemak di dalam serum. Toksisitas dari zat siklodekstrin alami maupun turunannya telah banyak diteliti dan terbukti atoksik.<sup>11</sup>

Penelitian yang telah dilakukan sebelumnya oleh Evan Fletcher pada tahun 2013 yaitu penambahan 2 gram alfa-siklodekstrin secara oral setelah makan dapat menurunkan kadar trigliserida tanpa mempengaruhi kadar glukosa darah setelah dibandingkan dengan *placebo*.<sup>12</sup> Penelitian yang dilakukan oleh Alde Fajar Prambudi, Subrata Tri Widada dan Budi Setiawan pada tahun 2017, serum lipemik dengan flokulan gamma-siklodekstrin dengan perbandingan serum dan gamma-siklodekstrin 20% (2:1) dengan inkubasi suhu 23°C menggunakan kadar trigliserida > 300 mg/dL di sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 3000 rpm, didapatkan hasil glukosa tanpa penambahan flokulan gamma-siklodekstrin adalah 267.19 mg/dL dengan hasil glukosa penambahan flokulan gamma-siklodekstrin adalah 169.23 mg/dL.<sup>13</sup> Pemeriksaan glukosa menggunakan beta-siklodekstrin tidak dilakukan karena kelarutan beta-siklodekstrin dalam air tidak baik. Pemilihan flokulasi lipoprotein dengan alfa-siklodekstrin dapat menjadi salah satu alternatif untuk mengendapkan sampel lipemik. Optimalisasi waktu sentrifugasi terhadap penggunaan alfa-siklodekstrin pada sampel lipemik buatan merupakan salah satu penelitian yang belum dilakukan untuk saat ini.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi alfa-siklodekstrin optimal yang digunakan untuk preparasi sampel lipemik dalam pemeriksaan kadar glukosa metode GOD-PAP dan menentukan waktu sentrifugasi optimal yang digunakan untuk preparasi sampel lipemik dalam pemeriksaan kadar glukosa metode GOD-PAP.

## 2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### 2.1. Desain penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental.

### 2.2. Lokasi penelitian

Laboratorium Kimia Klinik, Jurusan Analis Kesehatan. Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan Bandung.

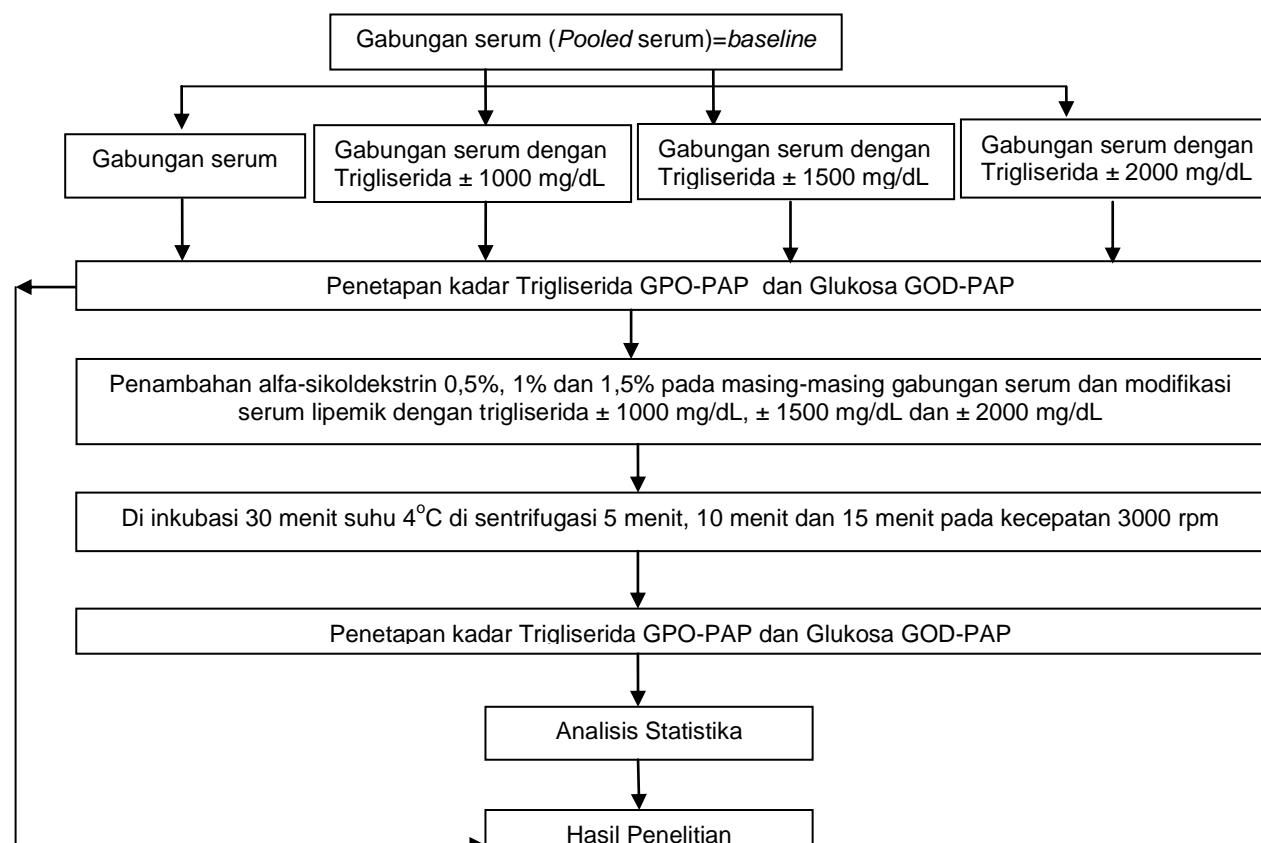
### 2.3. Populasi dan sampel penelitian

Objek penelitian yang digunakan adalah alfa-siklodekstrin ( $\alpha$ -CD)  $\geq 98\%$  Sigma Aldrich.

### 2.4. Bahan dan alat penelitian

Alfa-siklodekstrin  $\geq 98\%$  Sigma Aldrich, gabungan serum (*pooled serum*), NaCL (0,9%, Otsu NS), reagen glukosa GOD-PAP BIOLABO, reagen trigliserida GPO-PAP BIOLABO, fotometer Microlab 300, fotometer Kenzamax Biochemistry.

### 2.5. Koleksi/tahapan penelitian



Gambar 1. Alur Penelitian

Alur Penelitian:

1. Sampel darah sebanyak  $\pm 50$  mL dikumpulkan dalam tabung yang bersih dan kering.
2. Sampel darah yang didapatkan, dilakukan preparasi untuk membuat serum.
3. Serum yang didapatkan, dilakukan penggabungan sehingga didapatkan gabungan serum (*pooled serum*).
4. Gabungan serum dibuat modifikasi serum lipemik buatan menggunakan kuning telur ayam dengan trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL.<sup>4</sup>
5. Gabungan serum dan hasil modifikasi serum lipemik buatan dilakukan pemeriksaan kadar Trigliserida GPO-PAP dan Glukosa GOD-PAP.

6. Gabungan serum dan modifikasi serum lipemik dengan trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL masing-masing dilakukan penambahan variasi alfa-siklodekstrin 0,5%, 1% dan 1,5%.
7. Gabungan serum dan modifikasi serum lipemik dengan trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL yang masing-masing telah di preparasi, inkubasi selama 30 menit pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  dan dilakukan variasi sentrifugasi selama 5 menit, 10 menit dan 15 menit pada kecepatan 3000 rpm.
8. Gabungan serum dan hasil modifikasi serum lipemik buatan dilakukan kembali pemeriksaan kadar Trigliserida GPO-PAP dan Glukosa GOD-PAP (n=3 kali).
9. Analisis statistika dilakukan dari perbandingan data penetapan pemeriksaan sebelum dan setelah dipreparasi dengan variasi alfa-siklodekstrin dan variasi waktu sentrifugasi.
10. Hasil penelitian didapatkan.

#### 2.5.1. Cara kerja modifikasi serum lipemik buatan menggunakan kuning telur ayam.

1. Kadar trigliserida yang berada di dalam kuning telur dan di dalam gabungan serum (*pooled* serum) diukur terlebih dahulu.
2. Nilai trigliserida diketahui, ditambahkan kuning telur dan NaCl 0,9% dengan perbandingan 1:1 pada serum untuk mendapatkan serum lipemik buatan dengan kadar trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL digunakan rumus pengenceran.
3. Dilakukan pemeriksaan ulang kadar trigliserida untuk memastikan konsentrasi trigliserida di dalam modifikasi serum lipemik buatan.

#### 2.5.2. Cara Kerja Pembuatan Stok Alfa-Siklodekstrin 5%.

1. Larutan stok 5% dibuat dengan cara ditimbang terlebih dahulu serbuk alfa-siklodekstrin sebanyak 0,5 gram lalu dilarutkan pada labu ukur 10 mL menggunakan aquades hingga tanda batas.
2. Menggunakan rumus pengenceran, ditambahkan alfa-siklodekstrin dari larutan stok 5% sehingga didapatkan kadar sebesar 0,5%, 1% dan 1,5%.

#### 2.5.3. Cara Kerja Serum Lipemik dengan Penambahan Alfa-Siklodekstrin Perbandingan 2:1.[7]

1. Gabungan serum dan modifikasi serum lipemik buatan yang telah diketahui konsentrasi trigliserida ( $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL,  $\pm 2000$  mg/dL) dipipet 200  $\mu\text{L}$  ke dalam vial, dan ditambahkan 100  $\mu\text{L}$   $\alpha$ -siklodekstrin 0,5%, 1% dan 1,5% pada masing-masing vial. Inkubasi pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.
2. Sentrifugasi dilakukan dengan variasi waktu sentrifugasi selama 5 menit, 10 menit, dan 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada  $4^{\circ}\text{C}$  hingga didapatkan endapan dan supernatan. Supernatan yang didapat, dipisahkan untuk pemeriksaan glukosa GOD-PAP (n=3 kali) dan trigliserida GPO-PAP lalu dikalikan dengan faktor pengenceran.

#### 2.6. Analisis data

Two Way ANOVA, Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan Uji Mann Whitney U menggunakan aplikasi statistika.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

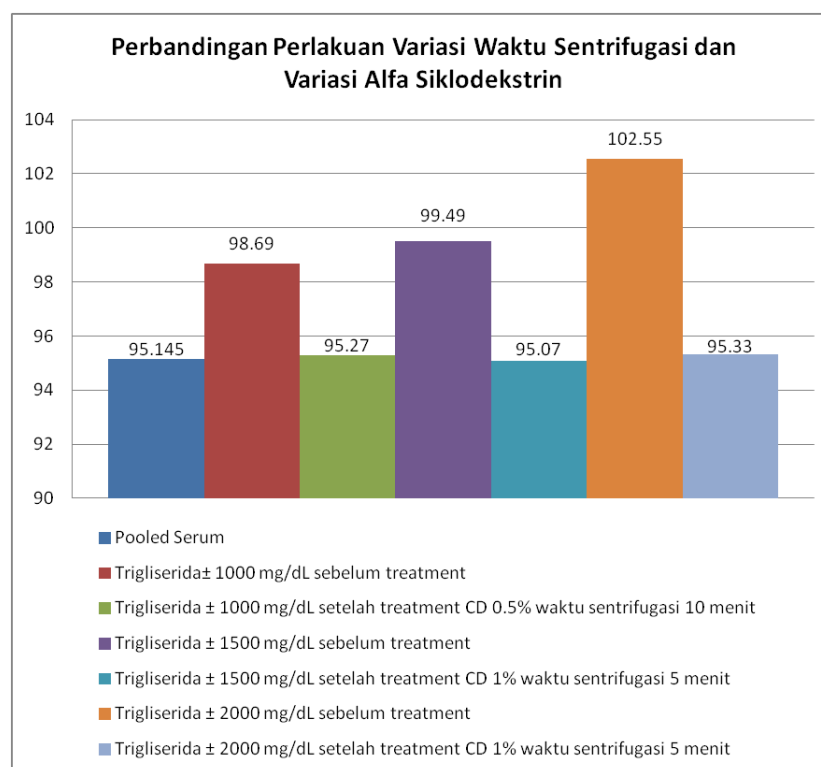
Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 1. Grafik Hasil Pemeriksaan Kadar Glukosa Pada Pooled Serum (Gabungan Serum) dan Lipemik Terbagi dalam Konsentrasi Trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL Sebelum Penambahan Alfa-Siklodekstrin

Sumber: Data Primer (2017)

Kadar glukosa menjadi meningkat seiring ditambahkan modifikasi serum lipemik buatan dengan kadar trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL,  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL. Hal ini disebabkan karena kekeruhan dalam sampel lipemik menyebabkan meningkatnya cahaya yang diabsorpsi dalam fotometer oleh partikel kekeruhan lipemik menjadikan kadar glukosa meningkat palsu (Gambar 1).<sup>14</sup>



Gambar 2. Grafik Kadar Glukosa Hasil Preparasi dengan Alfa-Siklodekstrin dan Waktu Sentrifugasi

Sumber: Data Primer (2017)

Kadar glukosa setelah dilakukan preparasi penambahan alfa-siklodekstrin pada modifikasi serum lipemik buatan dapat kembali pada keadaan awal yaitu pooled serum (*base line*). Konsentrasi trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL optimal menggunakan alfa-siklodekstrin 0,5% dan waktu sentrifugasi 10 menit setelah dilakukan uji Kruskal Wallis ( $P=0.05$ ). Konsentrasi trigliserida  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL optimal menggunakan alfa-siklodekstrin 1% dan waktu sentrifugasi 5 menit setelah dilakukan uji ANOVA ( $P=0.05$ ) (Gambar 2).

Kembalinya kadar glukosa modifikasi serum lipemik buatan setelah dilakukan *treatment* dengan alfa-siklodekstrin disebabkan oleh lipid dalam sampel lipemik dan molekul siklodekstrin yang saling mendekat lalu terjadi interaksi hidrofobik antara gugus fungsi molekul lipid dengan gugus yang terletak dalam rongga tengah siklodekstrin sehingga dapat terjadi pembentukan ikatan antara molekul lipid dan siklodekstrin.<sup>15</sup> Setelah terjadi pengikatan, diperlukan proses sentrifugasi untuk mengendapkan lipemik yang telah berikatan dengan molekul siklodekstrin.

Hasil yang sama telah dilakukan oleh Alde Fajar Prambudi, Subrata Tri Widada dan Budi Setiawan pada tahun 2017 bahwa penggunaan gamma-siklodekstrin sebagai *treatment* lipemik pada pemeriksaan glukosa menunjukkan rerata selisih penurunan glukosa sebesar 97,97 mg/dL, dengan nilai glukosa sebelum *treatment* 267,19 mg/dL dengan nilai glukosa setelah *treatment* 169,23 mg/dL.<sup>13</sup> Penggunaan alfa-siklodekstrin telah dilakukan uji coba pada pemeriksaan glukosa, asam urat, aspartat aminotransferase, kalsium, urea nitrogen, bilirubin total dan alkali fosfatase. Hasil yang didapat spesimen kontrol berkorelasi baik dengan analit yang diuji. Penelitian yang dilakukan oleh Ajit Sharma pada penelitian sebelumnya bahwa analisis statistika (*paired t-test*) menunjukkan bahwa tidak ada perubahan yang signifikan serta menunjukkan korelasi yang baik antara metode flokulasi alfa-siklodekstrin dan ultrasentrifugasi. Sehingga penggunaan alfa-siklodekstrin dapat menjadi salah satu alternatif dari ultrasentrifugasi yang merupakan standar baku untuk *treatment* lipemik.<sup>7</sup>

Kelemahan dari penelitian ini adalah belum dilakukan modifikasi serum lipemik buatan dengan parameter pemeriksaan yang berbeda menggunakan konsentrasi alfa-siklodekstrin dan waktu sentrifugasi yang sama dan belum dilakukan penelitian modifikasi serum lipemik buatan dengan trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL pada konsentrasi alfa-siklodekstrin dibawah 0,5% untuk penggunaan alfa-siklodekstrin yang lebih efisien.

Penelitian ini menunjukkan bahwa modifikasi serum lipemik buatan menyebabkan hasil pemeriksaan kadar glukosa tinggi palsu sehingga penggunaan metode flokulasi dengan penambahan alfa-siklodekstrin dengan variasi waktu sentrifugasi terbukti dapat digunakan untuk mengendapkan lipemik. Metode ini tidak memerlukan alat yang mahal, mudah diterapkan dan tidak berbahaya sehingga menggunakan alfa-siklodekstrin dan variasi waktu sentrifugasi dapat diaplikasikan oleh laboratorium klinis untuk menangani serum lipemik, dan hasil pemeriksaan kadar glukosa GOD-PAP menjadi akurat.

#### 4. SIMPULAN DAN SARAN

Konsentrasi alfa-siklodekstrin yang optimal parameter glukosa dengan kadar trigliserida  $\pm 1000$  mg/dL pada alfa-siklodekstrin 0,5% dengan waktu sentrifugasi 10 menit dan kadar trigliserida  $\pm 1500$  mg/dL dan  $\pm 2000$  mg/dL pada konsentrasi alfa-siklodekstrin 1% dengan waktu sentrifugasi 5 menit.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Politeknik Kesehatan Kementerian Kesehatan RI Bandung atas pembiayaan penelitian ini melalui Riset Fundamental.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Sanford Kimberly W., A. MR. "Pre-Analysis," HENRY ' S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. *Elsevier Saunders*. 2011;22:24–35.
2. Hoon SD, Juwon K, Young U, et al. No Title Development of an Integrated Reporting System for Verifying Hemolysis , Icterus , and Lipemia in Clinical Chemistry Results

- e. *Ann Lab Med J.* 2014;34(4):307.
3. Nora N. Lipemia : causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochem Medica J.* 2014;24(1):57-67.
  4. Goce D. Interference Testing. *Clin Biochem Rev J.* 2008;29(8):43-48.
  5. Sandhya M, R DS, D KM. Frequency and causes of lipemia interference of clinical chemistry laboratory tests. *Elsevier.* 2017;8(2):1-9.
  6. S YD. Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests , 1995 dalam Biolabo., "Glucose GOD-PAP," Maizy, 2011. *AACC Press.* 1995;4:274-294.
  7. Ajit S, Karen A, W BJ. Flocculation of serum lipoproteins with cyclodextrins: Application to assay of hyperlipidemic serum. *Clin Chem J.* 1990;36(3):529-532.
  8. Radišić BV, Sandra B, Maja K, Andrea R, M LV. Serum delipidation but not high-speed centrifugation is effective in clearing lipemia interference in serum lipase activity measurement. *Clin Chem Lab Med J.* 2016;54:247–249.
  9. Jianxiang Z, X MP. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective,". *Adv Drug Deliv Rev J.* 2014;65(9):1–39.
  10. Amran L. Produksi Siklodekstrin dari Substrat Tapioka dengan Menggunakan Pullulanase dan CGTase secara Simultan. *J Tek Ind Pert.* 2011;18(2):99-105.
  11. Crestani de MJ, Azevedo MTE, Francisco V, Gomes FH. Cyclodextrins and ternary complexes: Technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Brazilian J Pharm Sci.* 2011;47(4):665-681.
  12. Neil FE. The Effect Of Alpha-Cyclodextrin On Acute Blood Lipid And Glycemic Responses To A Fat Containing Meal. *Wayne State Univ.* 2013.
  13. Fajar PA, Tri WS, Budi S. Serum Lipemik Dengan Flokulan Gamma-Siklodekstrin Pada Pemeriksaan Glukosa. *Med Lab Technol J.* 2017;3(2):68-72.
  14. Sunheimer RL, Threatte GA, Pincus MR, Lifshitz MS. Analysis: Principle of Instrumentation. In: McPherson RA, Pincus MR, eds. *HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* 22nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011:47.
  15. Nadya BA. Penggunaan Siklodekstrin Dalam Bidang Farmasi. *Maj Farm.* 2014;10(1):197-201.