

Manfaat
Herbal
Indonesia

Manfaat Herbal Indonesia

Samsu Udayana Nurdin
Siti Nurdjanah, Ph.D.
Dr. Ir. Sussi Astuti, M.Si.
Dr. dr. Asep Sukohar, M.Kes.
Maria Erna Kustyswati, M.Sc.



MANFAAT HERBAL INDONESIA, oleh Samsu Udayana Nurdin; Siti Nurdjanah, Ph.D.; Dr. Ir. Sussi Astuti, M.Si.;
Dr. dr. Asep Sukohar, M.Kes.; Maria Erna Kustyswati, M.S.

Hak Cipta © 2015 pada penulis



Ruko Jambusari 7A Yogyakarta 55283

Telp: 0274-889398; 0274-882262; Fax: 0274-889057;

E-mail: info@plantaxia.com; Web: www.plataxia.com

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apa pun, secara elektronis maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan teknik perekaman lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

ISBN:

Cetakan Pertama, tahun 2015

Semua informasi tentang buku ini, silahkan scan QR Code di cover belakang buku ini

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam yang telah memberikan Rahmat dan Karunia-Nya sehingga penulisan dan penyusunan buku ini dapat terlaksana. Buku ini merupakan karya perdana dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Herbal Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung yang baru berdiri sekitar dua bulan. Penulisan buku ini merupakan upaya dari Puslitbang Herbal untuk memetakan penelitian tentang herbal yang sudah banyak dilakukan oleh Dosen-Dosen di Lingkungan Universitas Lampung. Melalui buku ini dapat diketahui sejauh mana penelitian herbal yang sudah dilakukan dan jenis-jenis herbal apa yang sudah menjadi topik kajian sehingga tidak terjadi tumpang tindih topik kajian diantara peneliti di Universitas Lampung. Melalui penerbitan buku ini diharapkan mulai terjadi interaksi internal diantara para Dosen peneliti di Universitas Lampung yang mengarah pada kerjasama penelitian yang berorientasi pasar. Ini adalah buku pertama dan akan diupayakan buku edisi berikutnya yang akan memuat hasil-hasil penelitian tentang Herbal para Dosen Universitas Lampung.

Buku dengan judul “Bukti Ilmiah Manfaat Herbal Indonesia” ini terdiri dari lima bab yang setiap bab berisi kajian yang telah dilakukan para Dosen di Universitas Lampung. Sebagian besar kajian yang ditulis merupakan kajian dasar baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Melihat data yang ditampilkan terlihat bahwa komoditi yang dikaji memiliki potensi yang baik untuk terus dikembangkan. Karena itu diharapkan para peneliti ini meneruskan kajian-kajiannya guna menghasilkan produk akhir yang berguna dan diterima pasar.

Pada kesempatan ini saya sebagai Kepala Pusat Penelitian dan Pengembangan Herbal Lembaga Penelitian dan Pengabdian masyarakat Universitas Lampung mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang telah berkontribusi dan membantu penyusunan buku ini terutama

kepada kontributor tulisan (Samsu Udayana Nurdin, PhD., DR. Maria Erna Kustyawati., DR Susi Astuti, Siti Nurdjanah Ph.D, dan DR. Asep Sukohar) sehingga rencana kerja yang dicanangkan bisa menjadi kenyataan. Selain itu terima kasih juga disampaikan kepada:

1. Rektor Universitas Lampung melalui Ketua, Sekretaris dan Staf Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat yang telah memfasilitasi penulisan dan penerbitan buku ini
2. Teman-teman sejawat yang telah terlibat pada diskusi awal terbatas mengenai rencana kerja Pusat Penelitian dan Pengembangan Herbal Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung khususnya Skretaris Puslitbang Herbal dr. Khairun Nisa, M.Kes., DR. Asep Sukohar, DR. Subeki, Ir. Baheramsyah

Demikian, semoga buku ini bermanfaat dan dapat menjadi salah satu referensi bagi berbagai pihak yang berminat dengan pengembangan dan penggunaan herbal. Kami mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak yang bersifat membangun terhadap upaya-upaya pemanfaatan herbal bagi kesehjatraan bangsa.

Bandar Lampung, Mei 2015

Kepala Pusat Penelitian dan
Pengembangan Herbal, LPPM
Universitas Lampung

Ir. Samsu Udayana Nurdin, M.Si. Ph.D.

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
BAB 1	
POTENSI CINCAU HIJAU PERDU (<i>PREMNA OBLONGIFOLIA</i>) SEBAGAI SERAT PANGAN YANG MENGANDUNG ANTIOKSIDAN	
<i>Oleh: Ir. Samsu Udayana Nurdin, M.Si. Ph.D.</i>	1
1.1 Komposisi dan karakteristik estrak cincau hijau perdu (<i>Premna oblongifolia</i> Merr)	3
1.2 Potensi cincau hijau perdu sebagai sumber serat pangan	6
1.3 Potensi cincau hijau perdu sebagai sumber antioksidan	11
1.4 Pemanfaatan estrak cincau hijau perdu sebagai sumber serat pangan yang mengandung antioksidan	12
1.5 Kesimpulan	13
Daftar Pustaka	14
BAB 2	
KEUTAMAAN KOMPONEN BIOAKTIF KOMBUCHA TEH ROSELLA (<i>HIBISCUS SABDARIVAVAR SABDARIFFA LINN</i>)	
<i>Oleh: Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc. dan Dr. Ir. Susi Astuti, M.Si</i>	17
2.1 Pendahuluan	18
2.2 Karakteristik komponen bioaktif dari Rosella	19
2.3 Kombucha Teh Rosella	26
2.4 Mikrobiologi Kombucha Teh Rosella	34
2.5 Manfaat	36

2.6	Aplikasi	36
2.7	Kesimpulan	38
	Daftar Pustaka	38
3.1	Pendahuluan	43
BAB 3	UBI JALAR UNGU: PENGEMBANGANNYA SEBAGAI PANGAN RENDAH KALORI YANG MENGANDUNG ANTIOKSIDAN	
	<i>Oleh: Siti Nurdjanah, Ph.D</i>	43
3.2	Karakteristik antosianin	45
3.3	Karakteristik serat pangan dan pati resisten	46
3.4	Manfaat antosianin	48
3.5	Manfaat pati resisten	48
3.6	Pemanfaatan antosianin dan pati resisten	49
3.7	Kesimpulan	54
	Daftar Pustaka	55
BAB 4	MANFAAT ASAM KLOROGENAT KOPI ROBUSTA LAMPUNG PADA PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN SEL KANKER HEPATOSELULER TIPE Hep-G2 1886 DENGAN BIOMARKER Gen miRNA 146 A	
	<i>Oleh: DR. dr. Asep Sukohar, M.Kes.</i>	59
4.1	Pendahuluan	60
4.2	Karakteristik Asam Klorogenat	61
4.3	Manfaat Asam Klorogenat	65
4.4	Kesimpulan	70
	Daftar Pustaka	70
BAB 5	PERAN TEPUNG KEDELAI KAYA ISOFLAVON PADA FERTILITAS TIKUS JANTAN	
	<i>Oleh: DR. Ir. Sussi Astuti, M.Si.</i>	73
5.1	Pendahuluan	73
5.2	Isoflavon Kedelai	75
5.3	Estrogen pada Hewan Jantan	77
5.4	Pengaruh Pemberian Tepung Kedelai Kaya Isoflavon pada Berbagai Tingkatan Dosis Isoflavon terhadap Fertilitas Tikus Jantan	78
5.5	Kesimpulan	95
	Daftar Pustaka	95

Bab 1

POTENSI CINCAU HIJAU PERDU (*PREMNA OBLONGIFOLIA*) SEBAGAI SERAT PANGAN YANG MENGANDUNG ANTIOKSIDAN

Ir. Samsu Udayana Nurdin, M.Si. Ph.D.

Cincau atau camcau hijau perdu (*Premna oblongifolia* Merr.) adalah minuman tradisional yang berbentuk gel yang sangat dikenal oleh masyarakat Indonesia. Cincau sering disajikan sebagai salah satu campuran pada es campur atau bahkan disajikan sebagai es cincau. Tulisan ini akan mencoba untuk merangkum bukti-bukti ilmiah yang menunjukkan potensi cincau hijau perdu sebagai sumber serat pangan yang mengandung antioksidan. Estrak cincau hijau perdumengandung pektin hingga 19,7% dan berbagai senyawa pitokimia sehingga serat pangan yang berasal dari cincau hijau diduga selain mempunyai khasiat sebagai serat juga memiliki khasiat sebagai sumber antioksidan. Ekstrak cincau ini memiliki karakteristik fungsional yang cocok untuk diterapkan sebagai bahan tambahan makanan serta untuk pembuatan makanan atau minuman yang memiliki nilai kalori rendah. Komponen pembentuk gel (KPG) yang terkandung pada estrak cincau memiliki fermentabilitas yang lebih baik dari selulosa dan menghasilkan asam lemak rantai pendek asetat, propionat dan butirir yang lebih tinggi dibandingkan dengan inulin dan selulosa. Selain itu efek laksatif KPG cincau hijau perdu lebih baik dari inulin sehingga ekstrak cincau hijau sangat berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber serat pangan yang mengandung antioksidan. Karena mengandung campuran serat pangan dan antioksidan maka estrak cincau hijau selain dapat dikembangkan sebagai produk pangan dapat juga dikembangkan sebagai produk herbal untuk pencegahan penyakit seperti hiperlipidemia dan darah tinggi.

Cincau atau camcau adalah minuman tradisional yang berbentuk gel yang sangat dikenal oleh masyarakat Indonesia. Cincau sering disajikan sebagai salah satu campuran pada es campur atau bahkan disajikan sebagai es cincau. Makanan ini menjadi semakin dicari orang saat bulan Ramadan karena kesegarannya sebagai menu berbuka puasa. Seiring dengan berkembangnya jaman, penyajian cincau semakin beragam misalnya kapucino cincau, cincau pukot, es krim cincau dan sebagainya. Bahkan cincau juga telah dikembangkan sebagai minuman kaleng.

Ada dua jenis cincau yang banyak dijual sebagai makanan di Indonesia yaitu cincau hijau dan cincau hitam. Cincau hijau berasal dari daun cincau rambat *Cylea berbata Myers* atau cincau perdu *Premna oblongifolia*, sedangkan cincau hitam berasal dari *Mesona palustris* yang juga dikenal dengan nama lokal Janggelen (Mimin, 2014). Pada proses pembuatannya, cincau hijau dapat dibuat dengan cara mengekstrak daun segar menggunakan air saja atau menggunakan air yang diberi kapur sebagai sumber kalsium agar gel yang terbentuk semakin kuat. Cincau hitam memerlukan tambahan pati (tepung tapioka) sebagai campuran agar dapat terbentuk gel. Karena itu cincau hitam selain mengandung polisakarida dari janggelen juga mengandung pati yang merupakan karbohidrat non serat. Dari segi kandungan energi cincau hijau diduga mengandung energi lebih rendah dibandingkan dengan cincau hitam. Karena merupakan ekstrak murni (tanpa campuran) maka diduga cincau hijau lebih banyak mengandung komponen aktif dibandingkan dengan cincau hitam.

Secara tradisional cincau hijau telah digunakan sebagai obat panas dalam. Daun cincau digunakan oleh sebagian masyarakat untuk obat penurun panas pada anak-anak dan juga untuk memperbaiki proses pencernaan. Publikasi khasiat cincau hijau sangat jarang ditemukan, baik pada tingkat nasional ataupun internasional. Pencarian melalui mesin pencari di internet hanya menampilkan artikel populer dengan bobot ilmiah yang rendah.

Artha (2001) telah melakukan analisis terhadap senyawa yang bertanggung jawab terhadap pembentukan gel cincau rambat. Peneliti tersebut mendapatkan bahwa komponen pembentuk gel dari cincau rambat merupakan polimer asam galakturonat yang kemungkinan besar adalah pektin. Pada gel cincau yang berasal dari cincau perdu, pektin ditemukan hingga mencapai 19.71 % (Nurdin *et al.*, 2005). Karena itu, cincau hijau diduga merupakan sumber serat pangan yang potensial untuk dikembangkan. Karena ekstrak cincau juga mengandung berbagai senyawa fitokimia (Aryudani, 2011) maka serat pangan yang berasal dari cincau hijau diduga selain mempunyai khasiat sebagai serat juga memiliki khasiat lain misalnya sebagai sumber antioksidan.

Serat pangan saat ini semakin terbukti manfaatnya bagi kesehatan manusia. Sebuah kajian yang dilakukan Otles dan Ozgoz (2014) menyimpulkan bahwa serat pangan dapat melindungi manusia dari penyakit saluran pencernaan, sembelit, pendarahan dan kanker kolon, kegemukan, diabetes, stroke, hipertensi dan penyakit kardiovaskuler. Jika dikombinasikan dengan antioksidan, serat pangan dapat meningkatkan khasiat dan keamanan obat farmasi pada pengobatan diabetes (Greenway *et al.*, 2014). Serat pangan juga dapat dijadikan bahan tambahan makanan yang dapat digunakan untuk pembuatan makanan yang mempunyai manfaat kesehatan (Otles dan Ozgoz, 2014).

Cincau hijau rambat memiliki produktivitas yang lebih rendah dibandingkan cincau hijau perdu. Untuk menghasilkan segelas gel cincau hijau diperlukan lebih banyak daun cincau hijau rambat untuk diestrak dibandingkan jika menggunakan cincau hijau perdu. Cincau hijau perdu juga lebih tahan kekeringan dibandingkan dengan cincau rambat, sehingga cincau perdu lebih

mudah ditemukan baik pada musim kemarau atau musim penghujan. Tulisan ini akan mencoba untuk merangkum bukti-bukti ilmiah yang menunjukkan potensi cincau perdu sebagai sumber serat pangan yang mengandung antioksidan.



Gambar 1.1 Tanaman cincau hijau perdu (*Premna oblongifolia* Merr).

1.1 KOMPOSISI DAN KARAKTERISTIK ESTRAK CINCAU HIJAU PERDU (*PREMNA OBLONGIFOLIA* MERR)

Gel cincau hijau yang dikonsumsi sebagai makanan penyegar merupakan ekstrak daun cincau. Proses ekstraksi dapat menggunakan air dingin atau air panas yang kadang kala diberi campuran abu dapur untuk meningkatkan kekerasan atau kekenyalan gel. Ekstraksi menggunakan air panas menghasilkan randemen hingga 15,4% dengan kandungan pektin mencapai 19,7% (Tabel 1.1).

Diduga komponen pembentuk gel cincau hijau merupakan senyawa polisakarida yang keberadaannya dalam dinding sel berinteraksi dengan pektin. Karena struktur dinding sel tanaman yang mengandung pektin kekuatannya tergantung pada interaksi pektin dengan ion kalsium (Ca^{2+}) (Philips dan Williams, 2000), maka jika ion kalsium dikelat dengan senyawa pengkelat logam kekuatan dinding sel akan menurun. Akibatnya dinding sel akan lebih mudah rusak dan komponen didalamnya termasuk pektin dan polisakarida lain akan lebih diestruk. Itulah mengapa ketika ditambahkan pengkelat logam (asam sitrat misalnya) sampai konsentrasi tertentu randemen ekstrak cincau hijau dan kandungan pektinnya akan meningkat (Tabel 1.1).

Asam sitrat adalah pengkelat logam yang bersifat asam yang menyebabkan penurunan pH larutan pengeksrak. Pektin yang merupakan polimer dari berbagai monomer sakarida dengan monomer utama asam galakturonat mudah terdepolimerisasi pada pH rendah (Nussinovitch, 1997). Akibatnya pada konsentrasi asam sitrat yang tinggi, pektin yang terekstrak mengalami depolimerisasi sehingga total pektin pada ekstrak menjadi menurun (Tabel 1.1).

Tabel 1.1 Pengaruh konsentrasi asam sitrat terhadap randemen, kadar pektin, KPG dan pH ekstrak cincau hijau perdu

Parameter	Konsentrasi asam sitrat (%)					
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Randemen (%) [*]	15,36 ^e	18,93	21,12	22,70	24,28	25,65
Kadar pektin (%) [*]	19,71 ^e	24,12 ^d	41,22 ^a	33,60 ^b	31,71	29,86
Kadar KPG (%) ^{**}	13,91	13,33	13,76	23,33	13,23	13,27
pH ^{***}	4,46	4,30	3,92	3,60	3,43	3,28

Sumber: ^{*}Nurdin, dkk., 2005; ^{**}Nurdin dkk., 2008; ^{***}Assadi, 2006.

Ekstrak cincau dapat difraksinasi lebih lanjut guna mendapatkan komponen pembentuk gel (KPG) yang terpisah dari komponen lain yang terdapat pada ekstrak cincau. Fraksinasi ini dilakukan dengan menambahkan etanol 95% kedalam ekstrak cincau, mengaduknya dan mendinginkannya selama 12 jam dalam suhu dingin (refrigerator) (Nurdin dkk., 2008). Setelah perlakuan tersebut, komponen pembentuk gel akan mengendap dan dapat dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kain saring (Gambar 1.2). Dengan cara ini diketahui bahwa walaupun peningkatan konsentrasi asam sitrat meningkatkan randemen ekstrak, tetapi ternyata konsentrasi KPG-nya tidak berubah (Tabel 1.1). KPG ini diduga merupakan polisakarida yang dapat berfungsi sebagai serat pangan.



Gambar 1.2 Komponen pembentuk gel (KPG) cincau hijau perdu yang dipisahkan dengan penyaringan yang diperoleh setelah pencampuran dengan etanol 95% dan dibiarkan selama 12 jam.

Penggunaan asam sitrat juga berpengaruh terhadap karakteristik pektin yang terkandung dalam ekstrak cincau hijau. Selain depolimerisasi yang mengakibatkan penurunan total pektin atau berat ekuivalen pektin, peningkatan kadar asam sitrat meningkatkan kadar metoksil dan asam galakturonat serta derajat esterifikasi pektin (Tabel 1.2). Tanpa penambahan asam sitrat, pektin cincau hijau perdu tergolong sebagai pektin yang memiliki kadar metoksil rendah dan derajat esterifikasi rendah.

Kemampuan pektin dalam membentuk gel ditentukan oleh ukuran molekul dan derajat esterifikasinya (Thakur *et al.*, 1997). Derajat esterifikasi (DE) juga digunakan untuk mengklasifikasi pektin secara komersial. Pektin digolongkan berderajat esterifikasi tinggi jika DE-nya 60-75% dan berderajat esterifikasi rendah jika DE-nya 20-40% (Sriamornsak, 2003). Jadi jika daun cincau perdu diekstraksi dengan air tanpa penambahan asam sitrat akan menghasilkan ekstrak yang mengandung pektin dengan DE rendah. Pektin jenis ini dapat membentuk gel dengan baik jika ditambahkan ion bivalen seperti kalsium (Philips dan Williams, 2000).

Tabel 1.2 Pengaruh konsentrasi asam sitrat terhadap karakteristik pektin dari cincau hijau perdu.

Karkteristik	Konsentrasi asam sitrat (%)					
	0%	0,1 %	0,2 %	0,3 %	0,4%	0,5%
Bobot ekivalen (mg/ ml NaOH)	2055,6	1527,8	904,8	575,9	433,0	331,8
Kadar metoksil (%)	0,62	1,14	2,48	5,06	7,23	9,92
Kadar asam galakturonat (%)	12,32	18,19	34,03	63,36	85,07	110,29
Derajat estrifikasi (%)	28,97	35,55	41,20	45,64	48,01	50,53

Sumber: Assadi, 2006.

Dari sisi hasil, penggunaan senyawa pengkelat logam dapat meningkat randemen ekstrak, tetapi ekstrak yang dihasilkan menghasilkan konsistensi gel yang berbeda dengan gel cincau yang diekstrak dengan air panas biasa. Pengkelatan ion logam menyebabkan gel yang terbentuk lemah/lunak dan konsistensinya tidak seperti cincau hijau yang dijual dipasaran. Jadi jika yang dikehendaki adalah ekstrak cincau hijau yang berbentuk gel yang kuat seperti halnya yang digunakan untuk campuran minuman es, maka pengkelat logam tidak bisa digunakan, justru sebaliknya perlu ditambahkan logam bivalen agar pembentukan gelnya sempurna. Sumber logam yang biasa digunakan secara tradisional adalah abu dapur atau kapur. Tetapi jika yang dikehendaki adalah ekstrak cincau dalam bentuk kering yang tidak tergantung pada konsistensinya maka penggunaan pengkelat logam dapat dipraktekkan sebagai cara untuk meningkatkan randemen.

Ekstrak cincau yang dikeringkan berpotensi untuk digunakan sebagai bahan tambahan sumber serat pangan dalam pembuatan makanan atau minuman. Penambahan ekstrak cincau kering yang diekstrak dengan air biasa menghasilkan campuran yang memiliki kekentalan atau viskositas yang rendah dibandingkan dengan campuran yang ditambah dengan ekstrak cincau yang diekstraksi dengan air yang mengandung asam sitrat (Tabel 3). Campuran dengan viskositas tinggi dapat dibuat dengan menambahkan ekstrak cincau yang diekstraksi menggunakan air yang mengandung asam sitrat 0,20%. Tetapi jika campuran yang kita kehendaki adalah yang dapat menahan air dalam jumlah besar ketika kita olah, maka ekstrak cincau hijau kering biasa dapat menjadi pilihan karena ekstrak ini memiliki kemampuan mengikat air yang relatif tinggi jika dibandingkan dengan ekstrak kering yang diekstrak dengan asam sitrat. Penambahan bahan yang memiliki daya serap air yang tinggi pada campuran atau adonan dapat meningkatkan kadar air

campuran atau adonan yang kita buat. Karakteristik penting lain adalah kemampuan estrak cincau hijau perdu dalam mengikat minyak atau lemak yang ada pada kisaran 0,86 hingga 1,12 g/g ekstrak. Nilai ini setara dengan daya serap minyak serat pangan yang mengandung pektin tinggi dari apel (Figuerola et al. (2005) atau jeruk (Griguelmo-Miguel and Martin-Belloso, 1999).

Tabel 1.3 Pengaruh konsentrasi asam sitrat terhadap karakteristik pektin dari cincau hijau perdu.

Karkteristik	Konsentrasi asam sitrat (%)					
	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Viskositas (cPs)	80,0	620,0	763,3	680,0	419,3	276,7
Daya serap air (g air/g ekstrak)	3,9	3,4	2,5	1,8	1,9	2,5
Daya serap minyak (g minyak/g ekstrak)	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0

Sumber: Nurdin dkk., 2005.

Estrak cincau perdu mengandung berbagai komponen bioaktif, seperti alkaloid, saponin, fenolik dan tanin (Aryudhani, 2011). Analisis terhadap air yang terpisah dari komponen pembentuk gel cincau perdu (diperoleh dari proses ekstraksi menggunakan air biasa) menunjukkan bahwa air cincau mengandung total senyawa penolik sebesar 0,93 mg/ml (TAE = *tanic acid equivalent*) (Herlinda, 2004). Namun demikian belum ada informasi mengenai jenis senyawa penolik yang dominan yang terdapat pada estrak ciancau hijau.

1.2 POTENSI CINCAU HIJAU PERDU SEBAGAI SUMBER SERAT PANGAN

Serat pangan adalah bagian yang dapat dimakan dari tanaman dengan komposisi utama berupa karbohidrat non pati dan lignin yang tidak dapat dicerna dan diserap di dalam usus kecil (Turner dan Lupton, 2011). Serat pangan dapat mencapai usus besar dan dapat memberikan manfaat kesehatan karena dapat memperlancar buang air besar (laksatif) atau meningkatnya status kesehatan karena pengaruh fisiologis lain yang menguntungkan dari metabolit yang dihasilkan dari fermentasi serat pangan (Louis *et al.*, 2007). Mikroba yang hidup dalam usus besar berpengaruh besar terhadap manfaat yang dapat diperoleh dari mengkonsumsi serat pangan melalui pembentukan berbagai produk metabolit yang dihasilkan dari fermentasi serat pangan tersebut. Sebaliknya, serat pangan yang merupakan makanan atau substrat bagi mikroba usus besar kualitasnya sangat menentukan komposisi mikroba yang tumbuh dominan pada organ tersebut. Semakin mudah serat pangan difermentasi maka asupan serat pangan tersebut akan semakin menyuburkan populasi mikroba yang tumbuh dalam usus besar dan meningkatkan jumlah metabolit yang dihasilkan. Dengan demikian, serat pangan yang mudah difermentasi di usus besar diharapkan akan memberi manfaat kesehatan yang lebih baik dibandingkan serat pangan yang sukar untuk difermentasi.

Metabolit hasil fermentasi serat pangan oleh mikroba usus besar yang diyakini memiliki manfaat besar bagi kesehatan adalah asam lemak rantai pendek (*short chain fatty acids* = SCFA)

yang terdiri atas asam asetat, propionat dan butirat. Keberadaan asam lemak ini dalam usus besar dapat menurunkan pH usus besar sehingga pertumbuhan mikroba patogen (misalnya *E. Coli*, *Salmonella* dan lain-lain) dalam usus besar terhambat dan sebaliknya pertumbuhan mikroba yang menguntungkan (misalnya bakteri asam laktat atau bakteri penghasil butirat) meningkat.

Selain menurunkan pH, asam lemak ini memiliki fungsi fisiologis masing-masing. Asam asetat akan diserap melalui dinding sel usus besar dan menjadi sumber energi bagi tubuh. Asam propionat juga diserap ke dalam tubuh tetapi tidak seperti asam asetat, asam ini memiliki kemampuan untuk menekan pembentukan kolesterol endogen. Asam butirat merupakan asam lemak yang dianggap paling berkhasiat dibandingkan kedua asam lemak yang lain karena kemampuan asam lemak ini dalam mencegah kanker kolon, memperbaiki profil lemak darah dan juga meningkatkan kekebalan tubuh.

Serat pangan di alam terdapat dalam bentuk campuran dan dapat dikelompokkan sebagai serat pangan larut (*soluble*) dan tidak larut (*insoluble*). Serat pangan larut dapat larut di dalam air dan dapat membentuk gel yang kental contohnya pektin, gum, inulin dan pati resisten. Sebaliknya serat pangan tidak larut tidak dapat larut dalam air contohnya selulosa, lignin dan hemiselulosa (Lattimer dan Haub, 2010). Serat pangan yang dapat larut umumnya lebih mudah difermentasi dibandingkan dengan serat pangan yang tidak larut.

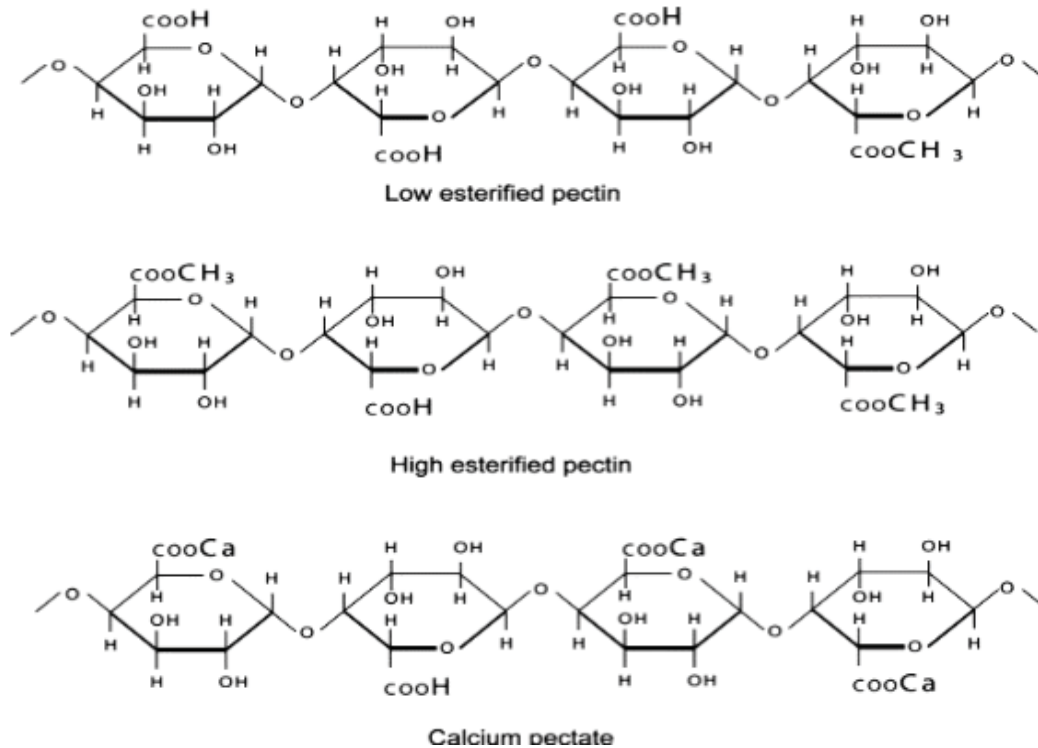
Ekstrak cincau hijau perdu diduga mengandung serat pangan campuran dengan kandungan pektin antara 20 hingga 30 persen tergantung teknik ekstraksinya (Tabel 1.1). Sebagai bahan yang diekstrak dari daun maka diduga ekstrak cincau perdu juga mengandung komponen dinding sel seperti selulosa, lignin dan hemiselulosa. Karena pektin merupakan jenis serat pangan larut yang terdapat pada ekstrak cincau maka diduga pektinlah yang akan banyak menentukan kemanfaatan ekstrak cincau hijau perdu sebagai sumber serat.

Pektin merupakan suatu polisakarida yang tersusun dari monomer asam D-galakturonat yang dihubungkan dengan ikatan 1-4 glikosidik (Gambar 1.3).

Pektin merupakan komponen penyusun sepertiga dinding sel tanaman tingkat tinggi yang umumnya ditemukan pada lamela tengah dinding sel tanaman (Sriamorsak, 2003). Pektin yang berasal dari tanaman yang berbeda memiliki karakteristik yang berbeda terutama disebabkan oleh perbedaan derajat esterifikasinya. Pada industri pangan pektin biasanya digunakan untuk pembuatan selai (*jam*), jeli dan makanan rendah kalori sebagai pengganti lemak atau gula. Pada industri farmasi, pektin digunakan untuk penurunan kadar kolesterol darah dan untuk mengatasi gangguan pencernaan (Thakur *et al.*, 1997).

Pektin dapat difermentasi oleh mikroba usus besar dengan produk metabolit utama berupa asam asetat baik secara *in vitro* (Titgemeyer *et al.*, 1991) ataupun *in vivo* (Rao *et al.*, 1998). Tetapi nampaknya proporsi asam asetat tidak selalu tetap, karena beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa pektin juga dapat menghasilkan asam lemak dengan proporsi asam butirat yang

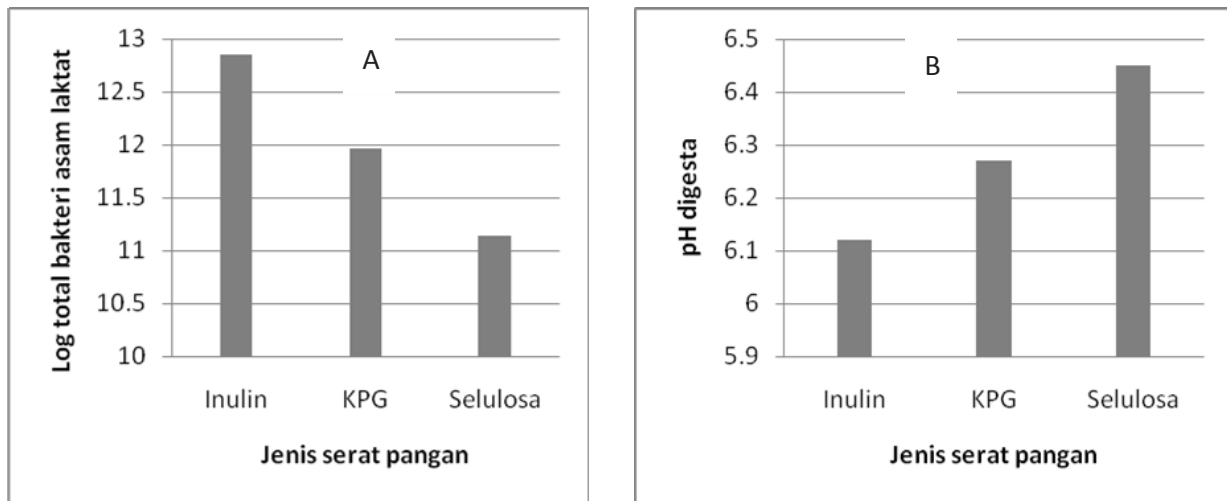
tinggi (Onumpai *et al.*, 2011) disebabkan oleh meningkatnya populasi mikroba usus besar yang dapat memproduksi asam butirat (Licht *et al.*, 2010).



Gambar 1.3 Struktur Kimia Pektin (Khotimchenko *et al.*, 2007).

KPG yang diperoleh dari ekstrak cincau hijau perdu memiliki fermentabilitas yang baik jika dibandingkan dengan selulosa. Tikus yang diberi pakan yang mengandung ekstrak cincau perdu memiliki total bakteri asam laktat dalam digesta yang lebih tinggi dibandingkan bila tikus diberi pakan yang mengandung selulosa (Gambar 1.3). Ini menunjukkan bahwa KPG cincau hijau perdu bersifat dapat difermentasi (*fermentable*) walaupun tidak sebaik inulin yang merupakan serat pangan yang telah diakui bersifat prebiotik.

Inulin merupakan suatu polisakarida yang memiliki rantai lurus atau bercabang dengan monomer utama berupa fruktosa. Inulin ditemukan beberapa jenis serealisa seperti gandum, dan juga pada buah-buahan dan sayur-sayuran seperti pisang, bawang merah dan bawang putih (Roberfroid dan Delzenne, 1998). Inulin merupakan serat pangan larut yang terbukti dapat meningkatkan pertumbuhan mikroba positif di usus besar seperti *bifidobacteria spp.* (Pompei *et al.*, 2008) dan *lactobacilli spp.* (Bertkova *et al.*, 2010). Inulin tergolong sebagai prebiotik karena serat pangan ini dapat difermentasi oleh mikroba usus besar dan terbukti memberikan manfaat kesehatan kepada manusia yang mengkonsumsinya (Pool-Zoobel, 2005).



Gambar 1.4 Pengaruh jenis serat pangan dalam pakan terhadap (A) log total bakteri asam laktat dan (B) pH digesta feses (Nurdin, 2007)

Fermentasi serat pangan di dalam usus besar menghasilkan berbagai asam organik yang menyebabkan penurunan pH digesta usus besar. Semakin mudah difermentasi maka semakin tinggi asam organik yang dihasilkan dan semakin rendah pH di dalam usus besar (Gambar 1.3). Tetapi pada kasus KPG peningkatan produksi asam organik tersebut tidak didominasi oleh asam asetat, propionat dan butirir, yang walaupun total asam lemak rantai pendeknya lebih tinggi dari inulin (Tabel 1.4) pH digestanya lebih rendah (Gambar 1.3).

Tabel 1.4. Pengaruh jenis serat pangan dalam pakan terhadap kandungan asam asetat, propionat dan butirir digesta tikus percobaan.

Jenis serat pangan	Asam organik ($\mu\text{g/g}$ digesta)			
	Asetat	Propionat	Butirat	Total
Inulin	191,17	3,78	5,38	200,33
KPG	207,87	11,50	14,90	234,27
Selulosa	144,10	2,96	4,99	152,05

Sumber: Priyantini, 2006

Pada tikus yang diberi pakan yang mengandung inulin, asam organik yang dihasilkan selain ketiga asam lemak rantai pendek di atas juga diduga berbagai jenis asam organik lain yang memiliki derajat ionisasi yang tinggi sehingga walaupun total asam lemak rantai pendek (gabungan antara asam asetat, propionat dan butirir) digestanya lebih rendah, karena asam organik yang lain konsentrasinya tinggi, maka pH digestanya rendah. Selain asam asetat, propionat dan

butirat, proses fermentasi serat pangan dalam usus besar juga menghasilkan asam laktat, isobutirat dan lain-lain. Pada penelitian Priyantini (2006), asam organik yang dianalisa hanya asam asetat, propionat dan butirat.

Apakah asam lemak yang dikandung digesta tikus yang diberi pakan yang mengandung KPG berasal dari hasil fermentasi pektin? Untuk menjawab pertanyaan tersebut perlu membandingkan proporsi masing-masing asam lemak rantai pendek yang dihasilkan dari fermentasi KPG dengan asam lemak rantai pendek yang dihasilkan pektin (Henningsson *et al.*, 2002). Berdasarkan Tabel 1.4, maka proporsi asam asetat, propionat dan butirat dalam digesta tikus yang diberi pakan mengandung KPG masing-masing adalah 88,73%, 11,50% dan 6,36% (Tabel 1.5). Pola ini terlihat berbeda dengan proporsi asam lemak rantai pendek yang dihasilkan pektin dan juga campuran pektin dan gum. Ini berarti bahwa serat pangan yang terdapat pada KPG bukan hanya pektin tetapi merupakan serat pangan campuran tetapi bukan merupakan campuran pektin dan gum.

Tabel 1.4. Pengaruh jenis serat pangan dalam pakan terhadap kandungan asamasetat, propionat dan butirat digesta tikus percobaan.

Jenis serat pangan	Proporsi Asam organik (%)			
	Asetat	Propionat	Butirat	Total
KPG ¹⁾	88,73	11,50	6,36	100
Pektin ²⁾	80,75	8,40	9,96	100
Pektin + gum ²⁾	71,13	11,00	17,36	100

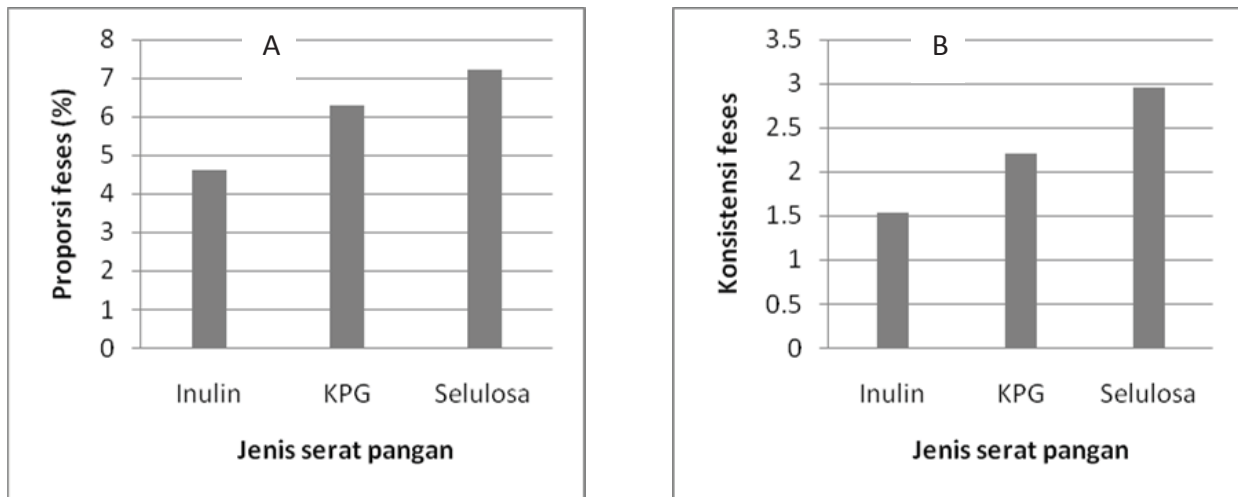
Sumber: ¹⁾ Priyantini, 2006; ²⁾ Henningsson *et al.*, 2002.

Serat pangan selain menjadi substrat bagi pertumbuhan mikroba usus besar juga dapat berfungsi mempermudah buang air besar (fungsi laksatif). Serat pangan yang sukar difermentasi mempunyai efek laksatif yang lebih baik dibandingkan dengan serat pangan yang mudah difermentasi. Serat pangan yang tidak terfermentasi akan memberi bentuk pada feses sehingga lebih mudah didorong oleh gerakan peristaltis usus besar. Sebaliknya, serat yang terfermentasi akan terurai menjadi metabolit turunannya dan tidak memberi bentuk pada feses sehingga feses yang dihasilkan cenderung lembek.

Data efek laksatif KPG memperkuat dugaan bahwa KPG lebih mudah difermentasi dibandingkan selulosa (Gambar 1.5).

Selulosa merupakan serat pangan tidak larut yang bila dikonsumsi tidak mengalami perubahan karena tidak terfermentasi atau terfermentasi secara parsial. Selulosa dapat memberi bentuk pada feses sedemikian rupa sehingga feses tersebut lebih mudah dikeluarkan. Akibatnya

jika tikus diberi pakan yang mengandung selulosa, jumlah feses yang dihasilkan akan lebih banyak dibandingkan dengan tikus yang diberi pakan yang mengandung inulin yang merupakan serat pangan larut dan mudah difermentasi (Gambar 4A). Karena fermentabilitas KPG ada diantara selulosa dan inulin maka efek laksatifnya pun berada diantara efek laksatif kedua serat pangan tersebut. Tikus yang diberi pakan mengandung selulosa konsistensi fesesnya lebih keras (Gambar 4B) sehingga lebih mudah didorong oleh gerakan peristaltis usus besar.



Gambar 1.5. Pengaruh jenis serat pangan dalam pakan terhadap (A) proporsi feses dan (B) konsistensi feses tikus percobaan (Nurdin, 2007)

1.3 POTENSI CINCAU HIJAU PERDU SEBAGAI SUMBER ANTIOKSIDAN

Seperti disebutkan pada subbab 2, cincau mengandung berbagai komponen bioaktif seperti alkaloid, saponin, fenolik dan tanin (Aryudhani, 2011). Herlinda (2004) juga menunjukkan bahwa fraksi cair dari ekstrak cincau mengandung senyawa fenolik sebesar 0,93 mg/ml (TAE). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa berbagai senyawa fenolik memiliki aktivitas antioksidan (Rojas et al., 2015).

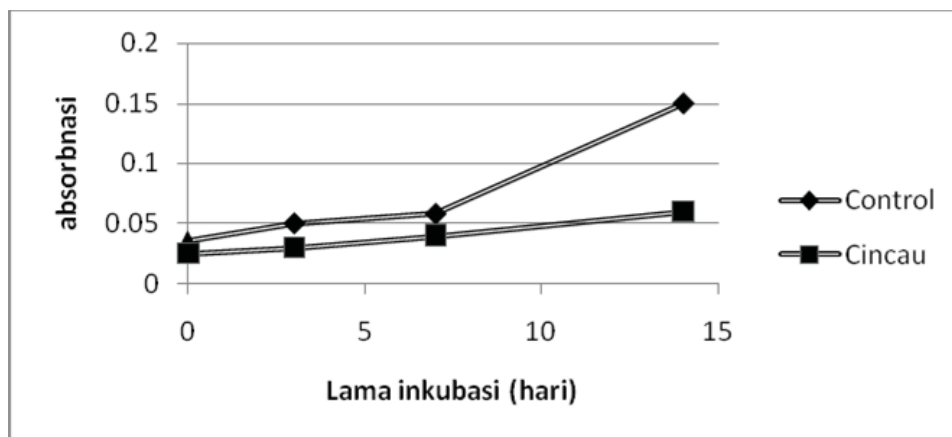
Estrak cincau hijau perdu memiliki kemampuan menetralkan radikal bebas sebagaimana ditunjukkan oleh kemampuannya menetralkan radikal DPPH. Kemampuan ini meningkat jika proses ekstraksinya menggunakan asam sitrat (Tabel 1.5). Asam sitrat dapat meningkatkan aktivitas antioksidan estrak cincau karena asam sitrat merupakan antioksidan sekunder (Belitz and Grosch, 1999) yang dapat melindungi kerusakan senyawa antioksidan pada cincau selama proses ekstraksi berlangsung.

Tabel 1.5 Pengaruh konsentrasi asam sitrat terhadap aktivitas antioksidan ekstrak cincau hijau perdu

Parameter	Konsentrasi asam sitrat (%)					
	0,00	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Aktivitas antioksidan (% RSA)	42,08	44,38	47,08	47,29	46,88	46,04

Sumber: Nurdin, dkk., 2005

Aktivitas antioksidan ekstrak cincau perdu juga teramati pada pengujian menggunakan metode sistem daging (*Meat system*). Metode ini menggunakan daging yang disimpan pada suhu dingin sebagai alat uji. Lemak pada daging akan mengalami kerusakan akibat oksidasi bila disimpan pada jangka waktu tertentu dan akan berubah menjadi berbagai senyawa turunan lemak, salah satunya adalah malondialdehid (MDA). MDA akan membentuk warna merah muda jika direaksikan dengan asam barbiturat (*barbituric acid*) yang intensitas warnanya dapat dideteksi dengan spektrofotometer (Ohkawa *et al.*, 1979). Semakin banyak lemak yang mengalami oksidasi semakin tinggi kadar MDA yang dihasilkan dan semakin tinggi nilai absorbansi yang terbaca. Pada Gambar 1.6 terlihat bahwa daging yang diberi ekstrak cincau hijau perdu dan disimpan pada suhu dingin selama 15 hari memiliki laju peningkatan absorbansi yang lebih rendah dibandingkan daging yang disimpan tanpa penambahan ekstrak cincau. Ini menunjukkan bahwa ekstrak cincau mampu menghambat oksidasi lemak pada daging selama penyimpanan dingin.



Gambar 1.6 Pengaruh ekstrak cincau terhadap pembentukan senyawa malondialdehid (MDA) pada daging yang disimpan pada suhu dingin (Herlinda, 2004).

1.4 PEMANFAATAN ESTRAK CINCAU HIJAU PERDU SEBAGAI SUMBER SERAT PANGAN YANG MENGANDUNG ANTIOKSIDAN

Berdasarkan uraian pada subbab 4 di atas, ekstrak cincau hijau perdu menunjukkan potensi yang baik sebagai serat pangan. Estrak cincau dapat dikonsumsi sebagai estrak segar sebagaimana biasa dikonsumsi masyarakat atau dijadikan sebagai estrak kering yang berfungsi sebagai ba-

han tambahan yang kaya serat. Berdasarkan karakteristik fungsionalnya, ekstrak seperti ini cocok untuk diterapkan sebagai bahan tambahan makanan yang digunakan untuk membuat minuman agar terlihat kental (*cloudifier*), bahan pengental (*thickener*) dan pembentuk gel (*gelling agent*), bahan pengikat (*binder*) dan pembentuk tekstur (*texturizer*) yang memiliki nilai kalori rendah (Grigelmo-Miguel dan Martin-Belloso, 1999).

Kelebihan ekstrak cincau sebagai serat pangan adalah karena kandungan KPG-nya yang dapat difermentasi oleh mikroba usus besar dan adanya senyawa yang mengandung antioksidan pada ekstrak tersebut. Kombinasi serat pangan dan antioksidan ini menjadikan ekstrak cincau berpotensi memberikan manfaat kesehatan yang lebih baik jika dibandingkan dengan serat pangan saja atau antioksidan saja karena serat pangan pada cincau dapat meningkatkan penyerapan senyawa antioksidannya (Sauro-Calixto, 2010; Palafox-Carlos et al., 2011).

Di usus halus serat pangan dapat menghambat penyerapan senyawa antioksidan karena serat pangan memerangkap antioksidan pada matrik pangan saat dicerna di usus halus. Bila senyawa antioksidan terikat pada suatu makromolekul dan membutuhkan enzim untuk menghidrolisisnya, serat akan menghalangi enzim untuk bisa mencapai makromolekul tersebut. Bila tidak terserap di usus halus, senyawa antioksidan akan sampai di usus besar. Ketika serat pangan difermentasi di usus besar, antioksidan akan terlepas dari matriknya dan dimetabolisme oleh mikroba usus besar juga. Gabungan metabolis serat pangan dan metabolit senyawa antioksidan akan dapat bekerja secara sinergis dalam memberikan manfaat kesehatan (Palafox-Carlos et al., 2011).

Manfaat campuran serat pangan dan antioksidan bagi kesehatan telah dilaporkan oleh beberapa peneliti. Sanches-Tena *et al.* (2013) melaporkan bahwa kulit anggur yang kaya serat pangan dan antioksidan secara signifikan menghambat pertumbuhan tumor pada tikus percobaan. Penelitian pada jenis makanan yang sama sebelumnya juga menunjukkan bahwa kulit anggur tersebut mampu memperbaiki profil lipid dan tekanan darah orang dewasa yang mengkonsumsi produk tersebut selama 16 minggu. Pengaruh campuran serat pangan dan antioksidan tersebut dalam memperbaiki profil lipid dan tekanan darah lebih baik dibandingkan jika orang dewasa hanya mengkonsumsi serat saja (Jimenez *et al.*, 2008). Karena ekstrak cincau hijau perdu mengandung serat pangan dan antioksidan sebagai mana halnya kulit anggur, maka produk ini juga berpotensi untuk diproduksi sebagai produk herbal yang bermanfaat untuk memperbaiki profil lipid pada penderita hiperkolesterol atau hipertrigliserida dan juga untuk menurunkan tekanan darah pada penderita hipertensi. Namun demikian masih diperlukan penelitian lanjutan untuk memastikan manfaat kesehatan ekstrak cincau hijau perdu tersebut dan juga mengkaji dosis amannya.

1.5 KESIMPULAN

Estrak cincau hijau perdu memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai bahan pangan atau bahan tambahan makanan yang kaya serat pangan dan antioksidan. Estrak cincau hijau

memiliki karakteristik fungsional yang cocok sebagai bahan tambahan untuk pembuatan berbagai bahan makanan dan minuman biasa atau kesehatan. KPG cincau hijau yang kaya akan pektin terbukti merupakan serat pangan campuran yang memiliki fermentabilitas dan efek laksatif yang baik. Sementara itu komponen non KPG-nya juga memiliki aktivitas antioksidan. Karena mengandung campuran serat pangan dan antioksidan maka ekstrak cincau hijau selain dapat dikembangkan sebagai produk pangan dapat juga dikembangkan sebagai produk herbal untuk pencegahan penyakit seperti hiperlipidemia dan darah tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Artha, N. 2001. Isolation and characterization of functional properties gel-forming compound of green cincau (*Cycle barbata L. miers*)". Dissertation. IPB Bogor.
- Aryudhani, N. 2011. Mechanism of antitumor activity of powdered leaf green grass jelly (*Premna blongifolia* Merr.) In mice transplanted c3h breast tumor cells. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/51752>. Downloaded 24 Mei 2014.
- Assadi. 2006. Pengaruh penambahan asam sitrat terhadap Karakteristik pektin ekstrak cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Belitz, H.D. and Grosch, W. 1999. Food Chemistry. Springer. New York
- Bertkova, I., Hijova, E., Chmelarova, A., Mojzisova, G., Petrasova, D., Strojny, L., Bomba, A. and Zitnan, R. 2010. The effect of probiotic microorganisms and bioactive compounds on chemically induced carcinogenesis in rats. *Neoplasma* 57: 422-8.
- Figuerola, F., Hurtado, ML., Estevez, AM., Chiffelle, I. & Asenjo, F. 2005. Fibre concentrates from Apple Pomace and Citrus Peel as Potential Fibre Sources for Food Enrichment. *Food Chem.* 91, 395-401.
- Grigelmo-Miguel N, Martin-Belloso O. 1998. Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International*. 31(5):355-361.
- Greenway F, Wang S, Heiman M. 2014. A novel cobiotic containing a prebiotic and an antioxidant augments the glucose control and gastrointestinal tolerability of metformin: a case report. *Benef Microbes*. 5(1):29-32.
- Henningsson, A.M., Bjorck, I.M. and Nyman, E.M. 2002. Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *Journal of Nutrition* 132: 3098-104.
- Herlinda. 2004. Pengaruh konsentrasi NaEDTA terhadap total penol dan aktivitas antioksidan minausman cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bandar Lampung.

- Jiménez JP, Serrano J, Tabernero M, Arranz S, Díaz-Rubio ME, García-Diz L, Goñi I, Saura-Calixto F. 2008. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*. 7-8: 646-653.
- Khotimchenko, M., Kovalev, V. and Khotimchenko, Y. 2007. Equilibrium studies of sorption of lead(II) ions by different pectin compounds. *Journal of Hazardous Materials* 149: 693-9.
- Lattimer, J.M. and Haub, M.D. 2010. Effects of dietary fiber and its components on metabolic health. *Nutrients* 2: 1266-89.
- Licht, T.R., Hansen, M., Bergstrom, A., Poulsen, M., Krath, B.N., Markowski, J., Dragsted, L.O. and Wilcks, A. 2010. Effects of apples and specific apple components on the cecal environment of conventional rats: role of apple pectin. *BMC Microbiology* 10: 13.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H. and Flint, H.J. 2007. Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1197-208.
- Mimin. 2014. Beda Cincau Hitam dengan Cincau Hijau. <http://jualcincau.com/beda-cincau-hitam-dengan-cincau-hijau/>. Di unduh 23 Mei 2014.
- Nurdin, S.U. 2007. (Evaluation of Laxative Effect and Fermentability of Gel Forming Component of Green Cincau Leaves (*Premna oblongifolia* Merr.)). *Teknologi dan Industri Pangan* 18: 10-16.
- Nurdin, S.U., Zuidar, S.A. and Suharyono. 2005. Dried extract from green cincau leaves as potential fibre sources for food enrichment. *African Crop Science Conference Proceedings* 7: 655-658.
- Nurdin SU., Suharyono, Rizal S. 2008. Karakteristik fungsional polisakarida komponen pembentuk gel cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.). *J. Teknologi dan Industri Pertanian*. 3(1):4-9.
- Nussinovitch, A. 1997. *Gum Technology in The Food and Other Industries*. Blackie Academic and Professional London, UK.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95:351-8.
- Onumpai, C., Kolida, S., Bonnin, E. and Rastall, R.A. 2011. Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5747-54.
- Otles S dan Ozgoz S. 2014. Health effects of dietary fiber. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 13(2):191-202
- Palafox-Carlos h, Ayala-Zavala JF, Gonzales-Aguilar GA. 2011. The Role of Dietary Fiber in the Bioaccessibility and Bioavailability of Fruit and Vegetable Antioxidants. *J. Food Sci*. 76(1): 1-10.

- Phillips GO dan Williams PA. 2000. Handbook of Hydrocolloids. CRC Press. Boca Raton Boston.
- Pompei, A., Cordisco, L., Raimondi, S., Amaretti, A., Pagnoni, U.M., Matteuzzi, D. and Rossi, M. (2008) In vitro comparison of the prebiotic effects of two inulin-type fructans. *Anaerobe* 14: 280-286.
- Pool-Zobel, B.L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *The British Journal of Nutrition*. 93: S73-S90.
- Priyantini M. 2006. Pengujian kadar asam organik (asam asetat, propionat dan butirat) digesta tikus percobaan secara *in vivo* sebagai kajian sifat prebiotik ekstrak cincau pohon (*Premna oblongifolia* Merr.). Skripsi. Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Rao, C.V., Chou, D., Simi, B., Ku, H. and Reddy, B.S. 1998. Prevention of colonic aberrant crypt foci and modulation of large bowel microbial activity by dietary coffee fiber, inulin and pectin. *Carcinogenesis* 19: 1815-9.
- Roberfroid, M.B. and Delzenne, N.M. 1998. Dietary fructans. *Annual Review of Nutrition* 18: 117-43.
- Roleira FM, Tavares-da-Silva EJ, Varela CL, Costa SC, Silva T, Garrido J, Borges F. 2015. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: Anticancer properties. *Food Chem*. 183:235-258
- Sánchez-Tena S, Lizárraga D, Miranda A, Vinardell MP, García-García F, Dopazo J, Torres JL, Saura-Calixto F, Capellà G, Cascante M. 2013. Grape antioxidant dietary fiber inhibits intestinal polyposis in ApcMin/+ mice: relation to cell cycle and immune response. *Carcinogenesis*.
- Saura-Calixto F, Perez-Jimenez J, Tourino S, Serrano J, Fuguet E, Torres JL, Goni I. 2010. Proanthocyanidin metabolites associated with dietary fibre from in vitro colonic fermentation and proanthocyanidin metabolites in human plasma. *Molecular Nutrition and Food Research*. 54: 939-946.
- Sriamornsak, P. 2003. Chemistry of Pectin and Its Pharmaceutical Uses : A Review. *Silpakorn University International Journal* 3: 206-228.
- Thakur, B.R., Singh, R.K. and Handa, A.K. 1997. Chemistry and uses of pectin--a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 37: 47-73.
- Titgemeyer, E.C., Bourquin, L.D., Fahey, G.C., Jr. and Garleb, K.A. 1991. Fermentability of various fiber sources by human fecal bacteria in vitro. *The American Journal of Clinical Nutrition* 53: 1418-24.
- Turner, N.D. and Lupton, J.R. 2011. Dietary fiber. *Advances in Nutrition* 2:151-2.

Bab 2

KEUTAMAAN KOMPONEN BIOAKTIF KOMBUCHA TEH ROSELLA (*HIBISCUS SABDARIVAVAR SABDARIFFA LINN*)

Dr. Dra. Maria Erna Kustyawati, M.Sc. dan Dr. Ir. Susi Astuti, M.Si

Kombucha teh Rosella adalah produk minuman hasil fermentasi seduhan kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdarifa var sabdarifa* Linn.) dan gula menggunakan starter Kombucha atau *Tea Fungus*. Selama fermentasi dalam larutan seduhan kelopak bunga Rosella dan gula, simbiosis bakteri dan khamir akan memproduksi berbagai enzim, asam asetat, asam karbonat, asam folat, asam glukonat, asam glukoronat, L(+) Laktat, berbagai asam amino, fruktosa, karbon dioksida, dan sejumlah kecil alkohol (0.5-1%), Vitamin B₁ (Thiamin), Vitamin B₂ (Riboflavin), Vitamin B₃ (Niacin, niacinamide), Vitamin B₆ (Pyridoxine), Vitamin B₁₂ (Cobalamin, cyanocobalamin), Vitamin C (dari asam laktat). Oleh karena itu, minuman Kumbucha sangat penting untuk diperkenalkan karena mempunyai fungsi sebagai minuman fungsional yang bermanfaat dalam kesehatan antara lain dapat menstimulasi system imun tubuh, meningkatkan system pencernaan dan memperbaiki fungsi hati. Disamping itu, minuman kombucha juga mempunyai sifat antibakteri terhadap bakteri penyebab penyakit. Sejalan dengan meningkatnya kemajuan teknologi di bidang pangan maupun farmasi berbasis herbal, ekstrak kelopak bunga Rosella telah banyak dimanfaatkan sebagai pewarna alami, sumber vitamin C, sumber antioksidan dalam pengolahan produk pangan. Di dalam bidang farmasi, ekstrak kelopak bunga Rosella baru dimanfaatkan sebagai obat kumur anti-plak, dan obat hisap effervescence. Kajian dan penelitian terutama mengenai pemanfaatan maupun diversifikasi olahan minuman Kombucha Rosella masih banyak yang perlu diungkapkan, misalnya sebagai sumber vitamin C dan obat gusi dalam bentuk produk permen, atau pasta gigi antibakteri. Ulasan yang diuraikan dalam bab ini merupakan kumpulan hasil penelitian penulis dan hasil analisis dari berbagai hasil penelitian.

2.1 PENDAHULUAN

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* var *sabdariffa* Linn.) adalah tanaman hias taman luar ruangan dari keluarga kembang sepatu. Rosella memiliki batang berwarna kemerah-merahan dengan tinggi mencapai 0,5 – 3 m dan akan mengeluarkan bunga berwarna merah jika sudah dewasa. Bunga Rosella memiliki kelopak yang sering disalahartikan sebagai bunga. Bagian kelopak ini yang sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman (Dahiru *et al.*, 2003). Tanaman ini hanya mengalami satu kali masa produktif, sehingga untuk mengoptimalkan hasil panendisa-rankan rosela ditanam secara khusus tanpa diselingi tanaman lain. Tanaman ini memiliki dua varietas dengan budidaya dan manfaat yang berbeda, yaitu : (i) *Hibiscus sabdariffa* var. *Altissima*, rosela berkelopak bunga kuning yang sudah lama dikembangkan untuk diambil serat batangnya sebagai bahan baku pulp dan karung goni; dan (ii) *Hibiscus sabdariffa* var. *Sabdariffa*, rosela berkelopak bunga merah yang kini mulai diminati petani dan dikembangkan untuk diambil kelopak bunga dan bijinya.

Hampir semua bagian tanaman Rosella memiliki kandungan bahan kimia komponen bio-aktif. Bunga dan biji ini dapat dimanfaatkan sebagai tanaman herbal dan bahan baku minuman kesehatan. Kandungan vitamin C yang tinggi ini dapat berfungsi sebagai bahan antioksidan dalam tubuh. Bunga rosella kaya akan serat yang bermanfaat untuk kesehatan saluran pencernaan. Bunga Rosella kering dapat diseduh menjadi minuman sejenis teh, yang sudah umum dimanfaatkan. Bunga rosella juga dapat dijadikan bahan baku selai, karena warnanya yang merah menyala dapat menghasilkan selai yang berwarna cantik dan menyehatkan (Kustyawati dan Ramli, 2008), berpotensi sebagai sumber pewarna alami (Mohd-Esa *et al.*, 2010). Pengolahan kelopak bunga Rosella menjadi minuman fungsional dapat dilakukan dengan menyeduh langsung atau difermentasikan terlebih dahulu menjadi kombucha. Kombucha merupakan minuman dari cairan teh dan gula yang difermentasi dengan bantuan simbiosis antara bakteri dan yeast sehingga membentuk suatu “teh jamur”. Minuman ini mengandung senyawa-senyawa organik yang berfungsi sebagai antibakteri, bermanfaat bagi tubuh dan memiliki berbagai efek kesehatan.

Keutamaan kelopak bunga Rosella ini sangat perlu untuk diketahui oleh masyarakat baik masyarakat umum, ilmuwan, maupun pelaku industry karena dapat membantu pemeliharaan kesehatan maupun kebugaran tubuh, mengupas kebermanfaatan melalui penelitian, dan mendorong pelaku usaha untuk membuat produk olahan sehingga pada akhirnya meningkatkan kesejahteraan masyarakat pada umumnya. Disamping itu, tulisan ini dapat digunakan sebagai buku pendukung untuk pengajaran pada mata ajaran ilmu kesehatan, farmasi, dan pengolahan produk pangan fungsional. Tulisan ini mengulas karakteristik kandungan komponen bioaktif di dalam kelopak bunga Rosella maupun di dalam olahan nya yaitu Kombucha teh Rosella, sifat antibakterinya, beberapa manfaat bagi kesehatan, dan aplikasinya sebagai produk olahan.

2.2 KARAKTERISTIK KOMPONEN BIOAKTIF DARI ROSELLA

Hampir semua bagian tanaman Rosella memiliki kandungan bahan kimia komponen bioaktif. Bahan kimia tersebut meliputi fenol, antosianin, flavonol, protocatechuic acid (PCA), sementara itu, ekstrak kelopak bunga Rosella diketahui mengandung flavonoid, polisakarida dan asam-asam organik yang berperan dalam memberikan efek farmakologis tertentu (Husaini *et al.*, 2004). Bahan aktif dari kelopak bunga rosella adalah gossypetin, antosianin, gluside hibiscin, dan flavonoid. Setiap 100 gram kelopak bunga Rosella mempunyai kandungan gizi sebagai berikut: protein 1,145 gr, lemak 2,61 gr, serat 12 gr, kalsium 1,263 gr, fosfor 273,2 mg, zat besi 8,98 mg, malic acid 3,31%, fruktosa 0,82%, sukrosa 0,24%, karoten 0,029%, tiamin 0,117mg, niasin 3,765 mg, dan vitamin C 244,4 mg (DepKes RI No SPP 1065/35.15/05, 2000). Disamping itu, kelopak bunga Rosella juga diketahui berpotensi sebagai sumber pewarna alami. Hal ini karena kandungan antosianin, Dp-3-sambubioside dan Cy-3-sambubioside yang dapat menimbulkan warna merah cerah kelopak bunga (Mohd-Esa *et al.*, 2010). Keunikan warna dan cita rasa kelopak bunga Rosella ini telah sejak lama dimanfaatkan terutama untuk pembuatan jeli, jam, saus, dan produk minuman (Cisse *et al.*, 2011). Walaupun demikian, penggunaan ekstrak kelopak bunga Rosella sebagai pewarna alami produk pangan mempunyai keterbatasan karena kandungan asam yang tinggi dapat menimbulkan *after taste* pahit (Durge *et al.*, 2013). Rosella segar mengandung sangat tinggi vitamin C, selain itu Rosella juga kaya akan mineral seperti kalsium, phosphor, potassium dan zat besi yang sangat penting untuk tubuh. Kelopak bunga Rosella sangat berkhasiat sebagai antiinflamasi, antiseptik, antibakteri, astringent, analgetik dan anti kanker, anti oksidan tinggi, menurunkan kolesterol dan asam urat. Kelopak bunga Rosella memiliki khasiat tersebut karena memiliki kandungan bahan aktif, antara lain flavonoid, fenol atau polifenol, asam sitrat, saponin, tannin, anti oksidan seperti gossypetin, anthocyanin, glucide hibiscin. Flavonoid berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme, karena mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Fenol atau polifenol berfungsi sebagai antibakteri dengan cara mengubah protein sel dan merusak membran plasma bakteri. Tanin bekerja dengan cara berikatan dengan adhesin mikroba, menghambat produksi enzim oleh mikroba, substrat deprivasi, berikatan dengan dinding sel, menghancurkan membran, kompleksasi ion logam. Saponin merupakan senyawa yang secara alami mengandung glikosida dan bersifat seperti sabun. Saponin menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroba dengan cara berinteraksi dengan membrane sterol.

Efek utama saponin adalah adanya pelepasan protein dan enzim dari dalam sel. Keutamaan kandungan komponen bioaktif tersebut maka ekstrak kelopak bunga Rosella dapat diaplikasikan untuk bahan obat kumur anti plak. Hal ini karena bahan aktif yang terdapat dalam obat kumur dapat berupa senyawa bisguanide, senyawa amoniak, senyawa fenol, antiseptik dan ekstrak herbal. Plak merupakan produksi biofilm oleh bakteri yang terbentuk pada jaringan keras dan lunak di dalam rongga mulut. Bakteri yang berperan dalam pembentukan plak antara lain *Actinomyces*, *Streptococcus sanguis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella leoscheii*, *spesies Capnocy-*

trophaga, *Fusobacterium nucleatum*, dan *Porphyromonas gingivalis* yang mengadakan pertumbuhan secara suksesi selama pembentukan plak.

Khasiat ekstrak kelopak bunga Rosella sebagai antioksidan, antikanker, antihipertensi dan dapat menurunkan kadar kolesterol. Sifat antioksidan tersebut dapat dijelaskan antara lain bahwa pemberian ekstrak kelopak bunga Rosella dapat mempengaruhi struktur histologist hepar tikus jantan karena hepar yang merupakan tempat utama detoksikasi sehingga sering mengalami kerusakan yang ditandai dengan perubahan struktur histologist apabila terdapat senyawa asing. Sementara itu Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) mengalami metabolisme di hepar setelah diabsorpsi oleh usus sehingga pemberian Rosella dapat mempengaruhi fungsi hepar. Penjelasan ini didukung oleh penelitian Widyarini dan Ismail (2010) bahwa terdapat perbedaan gambaran histologis hepar berupa degenerasi parenkimatos, degenerasi hidropik, sampai nekrosis antara kelompok tikus jantan yang diberi seduhan kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa*) per oral dengan kelompok kontrol, serta terdapat perbedaan gambaran histologis hepar antar kelompok perlakuan.

Antosianin

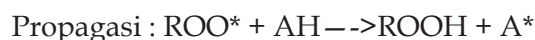
Rosella diketahui memiliki khasiat sebagai antioksidan. Aktivitas antioksidan tersebut disebabkan oleh adanya polifenol pada rosella (Anokwuru *et al.*, 2011). Aktivitas antioksidan teh kombucha lebih tinggi dibandingkan the seduh biasa, yang diakibatkan oleh hasil metabolisme mikroorganisme pada kombucha selama proses fermentasi (Goh *et al.*, 2012). Salah satu fungsi antosianin kelopak bunga Rosella adalah sebagai antioksidan di dalam tubuh yang dapat mencegah terjadinya aterosklerosis, penyakit penyumbatan pembuluh darah. Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menghambat terjadinya proses oksidasi (Inoue, 2001). Terdapat dua macam antioksidan yaitu antioksidan alami maupun sintesis. Antioksidan ada yang alami maupun sintetis. Antioksidan alami berfungsi sebagai penangkap, penstabil radikal dan peredam oksien singlet (Gordon, 1990). Penangkapan radikal terjadi melalui jalur interaksi antara spesies radikal. Aktivitas radikal bebas tergantung pada struktur kimia senyawa pendukung dan kemampuannya dalam menangkap dan menstabilkannya selama reaksi berlangsung (Koleva *et al.*, 2001).

Antosianin bekerja menghambat proses aterogenesis dengan mengoksidasi lemak jahat dalam tubuh, yaitu lipoprotein densitas rendah (LDL). Dibyarini dan Simorangkir mengemukakan mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal lipida. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan pengubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil. Penambahan antioksidan (AH) primer

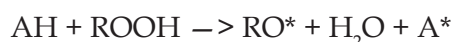
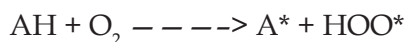
dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. Penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan (A^*) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru.



Radikal lipida



Besar konsentrasi antioksidan yang ditambahkan dapat berpengaruh pada laju oksidasi. Pada konsentrasi tinggi, aktivitas antioksidan grup fenolik sering lenyap bahkan antioksidan tersebut menjadi prooksidan. Pengaruh jumlah konsentrasi pada laju oksidasi tergantung pada struktur antioksidan, kondisi dan sampel yang akan diuji.



Proses penuaan dan penyakit degeneratif seperti kanker kardiovaskuler, penyumbatan pembuluh darah yang meliputi hiperlipidemik, aterosklerosis, stroke, dan tekanan darah tinggi serta terganggunya sistem imun tubuh dapat disebabkan oleh stress oksidatif. Stress oksidatif adalah keadaan tidak seimbangnya jumlah oksidan dan prooksidan dalam tubuh. Pada kondisi ini, aktivitas molekul radikal bebas atau reactive oxygen species (ROS) dapat menimbulkan kerusakan seluler dan genetika. Kekurangan zat gizi dan adanya senyawa xenobiotik dari makanan atau lingkungan yang terpolusi akan memperparah keadaan tersebut.

Antosianin juga dapat meningkatkan kadar HDL karena antosianin memiliki efek inhibisi terhadap enzim CETP. Kadar HDL yang meningkat akan meningkatkan clearance kolesterol di perifer untuk dibawa ke hepar dan selanjutnya akan dibuang lewat sekresi asam empedu sehingga kolesterol total akan menurun. Dari penelitian (Lukitaningsih, *et al.*, 2013) diperoleh hasil bahwa bunga rosella memiliki kemampuan menangkap radikal DPPH yang cukup baik dengan harga IC 50 sebesar 74,21 ppm. Namun demikian kemampuan antioksidannya masih jauh lebih rendah dari vitamin C yang memiliki harga IC 50 sebesar 3,93 ppm. Kandungan antosianin dalam ekstrak ditemukan sebesar $4,86 \pm 0,02$ mg/mL. Karena ekstrak metanolik bunga rosella tidak stabil, maka tidak dapat dibuat sediaan krim secara langsung. Oleh karena itu harus dibuat dalam bentuk sediaan liposom terlebih dahulu. Bentuk liposom yang diperoleh ternyata dapat memperbaiki stabilitas antioksidan hingga 10 kali lipat bila dibandingkan dengan stabilitas antioksidan dari ekstrak metanoliknya.

Ekstrak kelopak rosella mengandung polifenol seperti flavonoid, gosipitrin, antosianin, hibiscitrin, hibiscetin, kuersetin dan sabdaretin (Anokwuru *et al.*, 2011). Senyawa gossypetin, anto-

sianin, dan glucoside hibiscin yang tidak stabil terhadap adanya air / kelembaban dan pemanasan pada metode granulasi basah dan tekanan yang terlampau besar akibat pembentukan “ slug ” pada metode granulasi kering, oleh karena itu digunakan metode kempa langsung. (Sumartini, *et al.*, 2010).

Kombucha

Kombucha adalah minuman fungsional yang sudah dikenal sejak jaman dahulu di berbagai negara seperti China, Rusia, dan Jerman. Minuman fungsional adalah suatu minuman yang tidak hanya bernilai gizi dan kenampakan yang menarik, tetapi juga harus memiliki fungsi fisiologis tertentu bagi tubuh (Goldberg, 2002). Misalnya produk susu probiotik tradisional yogurt, kefir, coumiss dan produk-produk baru seperti BioSeven dan yakult. Minuman fermentasi tersebut telah banyak diteliti dan secara signifikan memberikan banyak manfaat kesehatan. Kombucha adalah produk minuman hasil fermentasi larutan teh dan gula menggunakan starter Kombucha atau Tea Fungus (Dufresne dan Farnword, 2000). Minuman Kombucha berasal dari China dan dikenalkan ke beberapa Negara seperti Rusia, Korea dan Jepang oleh Doctor Kumbu. Minuman ini sangat terkenal di Negaranegara tersebut karena mempunyai manfaat kesehatan dalam menstimulasi system imun tubuh, meningkatkan system pencernaan dan fungsi hati (Jayabalan *et al.*, 2007). Tea Fungus merupakan simbiosis antara bakteri dan yeast (khamir) dalam struktur selulosa. Selama fermentasi dalam larutan teh dan gula, simbiosis bakteri dan khamir ini akan memproduksi berbagai enzim, asam asetat, asam karbonat, asam folat, asam glukonat, asam glukoronat, L(+) Laktat, berbagai asam amino, fruktosa, karbon dioksida, dan sejumlah kecil alkohol (0.5-1%), Vitamin B₁ (Thiamin), Vitamin B₂ (Riboflavin), Vitamin B₃ (Niacin, niacinamide), Vitamin B₆ (Pyridoxine), Vitamin B₁₂ (Cobalamin, cyanocobalamin), Vitamin C (dari asam laktat).

Kombucha juga mengandung senyawa-senyawa organik yang bermanfaat bagi tubuh yaitu vitamin B kompleks, asam organik, dan senyawa lain yang berfungsi sebagai antibiotik. Kombucha memiliki berbagai efek kesehatan, antara lain sebagai antibiotik, melancarkan pencernaan, antioksidan, dan antibakteri. Senyawa yang terkandung didalam minuman kombucha dapat dimanfaatkan sebagai bahan antimikroba. Dari penelitian Afifah *et al.*, (2010) memberikan hasil bahwa selama proses fermentasi kombucha terjadi pembentukan zat asam oleh aktivitas mikroba yang ada didalamnya secara terus menerus sampai zat gula didalamnya habis. Kandungan asam asetat pada minuman ini mempunyai sifat mengikat toksin dan dapat menjadi bentuk ester yang mudah larut dalam air, selain itu kombucha juga bersifat constrictor (pengerut) lipofilik yang dapat bersifat toksik bagi mikroba patogen. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa interaksi perbedaan jenis medium dan lama fermentasi minuman kombucha (teh, kopi, rosela) mempunyai potensi daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio cholerae* dan *Bacillus cereus*. Berdasarkan hasil penelitian, diameter zona hambat terbesar pada bakteri *Vibrio cholerae* ditunjukkan oleh kombucha teh (8,67mm) dengan lama fermentasi 12 hari, sedangkan diameter zona hambat terbesar pada bakteri *Bacillus cereus* ditunjukkan oleh kombucha rosela (6,33mm) dengan

lama fermentasi 12 hari, penurunan nilai pH terbesar terjadi pada kombucha kopi (6,7 - 3,7), peningkatan ketebalan nata terbesar terjadi pada kombucha teh (1,80mm - 4,2mm), peningkatan total asam terbesar terjadi pada kombucha kopi (0,16% - 1,03%) dan penurunan total padatan terlarut terbesar terjadi pada kombucha kopi (13,52 °Brix - 13,48 °Brix).

Jenis tanaman lain yang bermanfaat bagi kesehatan selain kombucha adalah jenis dedaunan yang mengandung fenol sehingga dapat dimanfaatkan sebagai minuman fungsional (Suhardini dan Zubaidah, 2015). Dedaunan yang mengandung fenol sebagai antioksidan diantaranya daun teh, daun jambu biji, daun kopi, daun sirih, daun sirih, daun sirih. Daun teh mengandung antioksidan flavonoid yang merupakan bagian dari polifenol teh. Daun jambu biji mengandung antioksidan yaitu tanin, polifenolat, flavonoid, monoterpenoid, siskulterpen, alkaloid, kuinon, saponin, karoten, minyak atsiri (eugenol), dan minyak lemak. Daun kopi mengandung antioksidan alkaloida, saponin, flavonoida dan polifenol. Daun kopi merupakan limbah perkebunan yang biasanya digunakan untuk the daun kopi. Daun sirih mengandung antioksidan dan dipercaya masyarakat Indonesia sebagai obat herbal untuk mengobati penyakit kanker. Daun salam mengandung tanin, minyak atsiri, seskuioterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, dan karbohidrat yang berpotensi menghasilkan aktivitas antioksidan. Daun sirih merupakan tanaman obat yang dipercaya masyarakat untuk menghilangkan nyeri sehingga disebut sebagai obat analgetik.

Penelitian yang dilakukan oleh Suhardini dan Zubaidah (2015) memberikan hasil bahwa rerata aktivitas antioksidan produk kombucha berbagai jenis daun selama fermentasi pada pengamatan hari ke-0 berkisar antara 79,3% hingga 89,96%. Sedangkan pada hari ke-8 berkisar antara 88,24% hingga 92,97% dan 88,12% hingga 92,85% pada pengamatan hari ke-14. Kenaikan aktivitas antioksidan selama fermentasi terjadi hingga hari ke-8 dan penurunan hingga hari ke-14. Analisis ragam menunjukkan perbedaan sangat nyata ($\alpha=0.05$). Peningkatan aktivitas antioksidan pada teh kombucha diakibatkan oleh hasil metabolisme mikroorganisme pada kombucha selama proses fermentasi. Metabolisme mikroorganisme tersebut meningkatkan senyawa fenol diduga karena adanya proses biotransformasi yang memanfaatkan enzim suatu sel tanaman untuk meningkatkan aktivitas biologis tertentu. Kenaikan senyawa polifenol sebagai antioksidan ini disebabkan oleh proses biotransformasi yaitu proses yang menggunakan enzim pada suatu sel tanaman untuk mengubah kelompok fungsional suatu senyawa kimia yang terdapat didalamnya. Selain itu dedaunan yang digunakan sebagai bahan baku kombucha tersebut juga mengandung senyawa golongan fenol yang dapat meningkat seiring lamanya fermentasi. Meningkatnya aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya fenolik bebas yang dihasilkan selama proses fermentasi, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Dalam proses fermentasi khamir memiliki kemampuan menghasilkan enzim vinyl phenol reductase, dimana menurut Shahidi dan Nazck enzim tersebut dengan enzim ferulic acid reductase akan membentuk fenol akibat dekarboksilasi asam sinamat dan asam firulat. Asam sinamat merupakan senyawa fenol yang berperan sebagai antioksidan alami tumbuhan.

Asam ferulat adalah turunan dari golongan asam hidroksi sinamat, yang memiliki kelimpahan yang tinggi dalam dinding sel tanaman yang merupakan senyawa aktif bersifat antioksidan.

Sementara itu, setelah fermentasi hari ke 14 diketahui bahwa aktivitas antioksidan Kombucha cenderung mengalami penurunan. Hal ini dapat dijelaskan bahwa suasana asam menyebabkan senyawa fenolik menjadi semakin stabil dan sulit melepaskan proton yang dapat berikatan dengan DPPH sehingga aktivitas antioksidannya menurun. Mengonsumsi kombucha yang difermentasi terlalu lama dapat membahayakan bagi kesehatan karena kandungan asam asetat yang tinggi di dalam minuman kombucha dapat menyebabkan asidosis. Antioksidan pada kombucha berbagai jenis daun diduga termasuk metabolit sekunder karena dihasilkan senyawa fenol bebas selama fermentasi pada fase stasioner. Metabolit sekunder lain yang dihasilkan dalam proses fermentasi adalah polifenol yang dihasilkan pada fase stasioner ketika substrat mulai habis sehingga akan merangsang terbentuknya enzim-enzim yang berperan untuk pembentukan metabolit sekunder.

Meningkatnya fenol selama fermentasi kombucha.

Dalam penelitiannya Suhardini dan Zubaidah (2015) menghasilkan bahwa analisis ragam total fenol kombucha berpengaruh nyata selama fermentasi ($\alpha=0.05$). Hal ini diduga karena setiap daun sebagai bahan baku mempunyai kandungan senyawa fenol yang berbeda dimana ketersediaan senyawa flavonoid tersebut dipengaruhi oleh tempat tumbuh dan proses fotosintesis yang memerlukan cahaya matahari yang cukup. Peningkatan senyawa fenol selama fermentasi diduga karena melibatkan berbagai macam mikroba yaitu golongan bakteri dan khamir yang dapat bermetabolisme menghasilkan senyawa flavonoid melalui reaksi enzimatik, sehingga mempengaruhi jumlah total fenol pada produk kombucha berbagai jenis daun. Selama fermentasi teh kombucha terdapat empat isomer epikatekin diantaranya adalah epigallocatekin galat, epikatekin galat, epigallocatekin, dan epikatekin. Isomer tersebut dapat mengalami proses biotransformasi oleh enzim yang dihasilkan dari metabolisme mikroorganisme yaitu epigallocatekin galat menjadi epigallocatekin sedangkan epikatekin galat menjadi epikatekin, sehingga diduga dengan adanya proses tersebut maka polifenol dapat meningkat selama fermentasi.

Sementara itu, analisis ragam total asam kombucha tidak berpengaruh nyata, diduga penggunaan gula yang ditambahkan sama yaitu 30 g/ 400 ml sampel dimana selama proses fermentasi sukrosa akan dirombak menjadi glukosa dan fruktosa oleh bakteri dan khamir. Glukosa digunakan untuk membentuk alkohol dan asam-asam organik sehingga konsentrasi asam-asam organik meningkat dan total asam juga meningkat. Selama proses fermentasi kombucha khamir memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa akan digunakan untuk metabolisme sel menghasilkan etanol dan karbondioksida. Produk kombucha mengandung khamir dan bakteri yang melakukan metabolisme terhadap sukrosa sehingga menghasilkan asam-asam organik seperti asam asetat dan asam glukonat.

Rerata total gula kombucha pada semua sampel fermentasi hari ke-0 berkisar antara 3.00 % hingga 3.32%. Pada hari ke-8, berkisar antara 2.82% hingga 3.03%, sedangkan pada hari ke 14 sebesar 1.60% hingga 1.98%. Analisis ragam total gula kombucha berpengaruh nyata terhadap total gula kombucha ($\alpha=0.05$). Hal ini diduga karena kemampuan kultur SCOBY dalam merombak gula pada tiap sampel kombucha berbagai jenis daun berbeda-beda. Dalam proses fermentasi, khamir memecah sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Glukosa digunakan oleh khamir untuk menghasilkan etanol dan karbon dioksida. Fruktosa tetap menjadi bagian dari broth fermentasi dan digunakan oleh mikroorganisme dalam jumlah yang lebih sedikit. Mikroba memanfaatkan gula sebagai nutrisi untuk metabolisme menghasilkan asam-asam organik dan fenol sebagai antioksidan sehingga pada hari ke-14 suasana sampel produk kombucha tersebut semakin asam. Gula digunakan sebagai substrat oleh kultur kombucha sehingga pada akhir fermentasi dihasilkan alkohol, asam-asam organik serta metabolit lainnya. Penurunan gula selama fermentasi bukan hanya disebabkan oleh aktivitas khamir dalam metabolisme gula menjadi alkohol, namun juga adanya aktivitas *Acetobacter* yang memetabolisme glukosa menjadi asam glukonat. Proses fermentasi melalui jalur glikolisis memecah glukosa untuk menghasilkan asam piruvat.

Rerata ketebalan nata pada hari ke-14 yaitu nata yang paling tebal dihasilkan pada kombucha yang terbuat dari daun Jambu dengan ketebalan 0.50 mm. Sedangkan nata yang paling tipis dihasilkan pada kombucha yang terbuat dari daun Sirih dengan ketebalan 0.20mm. Hasil analisis ragam berbeda nyata ($\alpha=0.05$) diduga disebabkan karena adanya faktor seperti semakin lama waktu fermentasi maka nutrisi yang terdapat dalam larutan teh akan habis dimanfaatkan oleh bakteri dan khamir untuk bermetabolisme dan membentuk koloni baru yang menyebabkan ketebalan nata. Ketebalan jaringan nata kombucha yang dapat terbentuk, tergantung pada faktor – faktor yaitu jangka waktu fermentasi, volume bibit dan starter yang digunakan, kondisi pH yang sesuai. Pada produk kombucha daun sirih menghasilkan nata yang paling tipis dengan ketebalan 0.20 mm. Hal ini diduga ada kandungan antiseptik pada daun sirih yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba sehingga tidak dapat menghasilkan selulosa baru. Kandungan utama daun sirih yang berfungsi sebagai pembunuh kuman adalah minyak atsiri (betle phenol), seskuiterpen, pati, gula, zat samak, kavikol, antioksidasi dan fungisida sebagai anti jamur. Semakin banyak nutrient yang tersedia, maka semakin banyak pula jalinan-jalinan selulosa yang dihasilkan sebagai produk metabolit sekunder. Komponen gula dalam medium dipecah oleh *Acetobacter xylinum* sehingga terbentuk polisakarida yaitu selulosa. Selulosa tersebut membentuk benang-benang serat yang terus menebal membentuk jaringan kuat yang disebut pelikel nata. Tujuan terbentuknya jaringan selulosa adalah untuk mempermudah aerasi mikroba aerobik selama fermentasi. Parameter produk kombucha dapat terfermentasi atau tidak yaitu dengan terbentuknya koloni bakteri aerobik dan khamir yang mengapung di atas permukaan larutan teh. Dari berbagai daun percobaan diperoleh kesimpulan bahwa kombucha daun teh (0.23%) dengan total asam 0.09%, pH 2.84, aktivitas antioksidan 92.97%, total fenol sebesar 303.05 μ g/ml GAE, total gula 2.86%, ketebalan nata 0.45 mm adalah perlakuan terbaik yang didapatkan pada hari ke-8.

2.3 KOMBUCHA TEH ROSELLA

Konsumsi bahan makanan yang mengandung senyawa fungsional alami makin populer seiring dengan makin tingginya kepedulian masyarakat untuk menjaga kesehatan. Salah satunya adalah dengan mengonsumsi cairan hasil fermentasi atau hasil peragian larutan teh, gula, dan jamur kombu yang lazim disebut teh Kombucha (Naland, 2004). Teh Kombucha merupakan salah satu minuman fungsional yang cukup dikenal oleh masyarakat dan memberikan keuntungan terhadap kesehatan. Kombucha merupakan cairan teh dan gula yang difermentasi dengan bantuan simbiosis antara bakteri dan yeast sehingga membentuk suatu “teh jamur”. Beberapa jenis bakteri yang umumnya berperan dalam proses fermentasi kombucha yaitu *Acetobacter spp*, khususnya *Acetobacter* yang mampu menghasilkan selulosa seperti *Acetobacter xylinum* (Ross *et al.*, 1991). Sedangkan jenis yeast yang terdapat dalam kombucha lebih bervariasi seperti *Brettanomyces/Dekkera*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycoides*, *Shizosaccharomyces*, *Toruluspora* dan *Zygosaccharomyces* (Teoh *et al.*, 2004). Teh “Kombucha” berperan dalam mengurangi oksidasi LDL secara *in vitro* dan kadar kolesterol serum (Tzu *et al.*, 2007), mempunyai efek hipokolesterolemik (Chen *et al.*, 2003), mempunyai efek hepatoprotektif (Murugesan *et al.*, 2009), membantu proses pencernaan, menstabilkan kadar glukosa darah, membantu sistem imun, membuang racun dalam tubuh, dan bermanfaat sebagai antioksidan (Dufresne dan Farnworth, 2000).

Pada umumnya Kombucha dibuat dari larutan teh hitam atau teh hijau. Tetapi telah ditemukan jenis minuman teh yang terbuat dari kelopak bunga rosella. Menurut Morton (1999), kandungan gizi kelopak bunga rosella setiap 100 g sebagai berikut: protein 1,145 g, lemak 2,61 g, serat 12 g, kalsium 1.263 g, fosfor 273,2 mg, zat besi 8,98 mg, karoten 0,029 mg, tiamin 0,117 mg, riboflavin 0,227 mg, niasin 3,765 mg, dan vitamin C 244,4 mg. Bunga rosella juga kaya serat yang bermanfaat untuk kesehatan saluran pencernaan. kadar antosianin kelopak bunga rosella kering sebesar 1,50 g/100 g, sedangkan aktivitas antioksidan kelopak bunga rosella sebesar 63,93 % (Sundah, 2008). Morton (1999) melaporkan bahwa kandungan vitamin C kelopak bunga rosella sebesar 244,4 mg/100 g. Selain berfungsi sebagai antioksidan, vitamin C berfungsi menjaga dan memelihara kesehatan pembuluh-pembuluh kapiler, kesehatan gigi dan gusi, membantu penyerapan zat besi, dan membantu penyembuhan luka.

Kombucha teh rosella merupakan salah satu minuman fungsional yang bermanfaat bagi kesehatan, dibuat dari kelopak bunga rosella dan gula (sukrosa) menggunakan starter mikroba Kombucha (*Acetobacter xylinum* dan beberapa jenis khamir). Produk olahan Kombucha teh rosella mampu mempertahankan dan mengoptimalkan senyawa antosianin yang terkandung pada rosella karena Kombucha merupakan produk fermentasi yang menghasilkan asam. Kondisi asam bersifat menstabilkan antosianin karena antosianin lebih stabil pada lingkungan dengan pH rendah (Damodaran *et al.*, 2008). Sukrosa akan dihidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa, melalui glikolisis akan dihasilkan etanol dan gliserol. Sebagian glukosa akan digunakan oleh *Acetobacter xylinum* untuk memproduksi asam organik seperti asam glukonat melalui jalur pentosa fosfat

dan biosintesis selulosa. Asam glukoronat dalam Kombucha dilaporkan memiliki potensi sebagai agen detoksifikasi (Gharib, 2009), sementara asam asetat, etanol dan asam glukonat merupakan komponen utama dalam cairan Kombuchateh. Chen dan Liu (2000) menyatakan bahwa dalam Kombucha teh, asam asetat menghasilkan flavor asam dan *astringent*, sedangkan asam glukonat menghasilkan flavor *mild*. Dilaporkan lebih lanjut bahwa Kombucha teh dengan lama fermentasi 6 sampai 10 hari menghasilkan flavor menyerupai buah segar, sedangkan pada proses fermentasi yang lebih lama mengakibatkan flavor yang menyerupai cuka.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pemberian Kombucha teh rosella pada berbagai dosis berbeda nyata terhadap jumlah sel darah merah (eritrosit) mencit. Rata-rata jumlah sel darah merah mencit yang diberi Kombucha teh rosella dengan berbagai dosis disajikan pada Tabel 2.1.

Secara umum, terlihat bahwa jumlah eritrosit mencit yang mendapat perlakuan Kombucha teh rosella lebih tinggi dibanding perlakuan kontrol (K) yang tidak mendapat perlakuan kombucha. Namun, hasil uji lanjut dengan BNT menunjukkan bahwa perlakuan K tidak berbeda nyata dengan perlakuan P_1 dan P_2 , sedangkan perlakuan P_3 dengan dosis Kombucha teh rosella tertinggi berbeda dengan perlakuan K, P_1 , dan P_2 .

Tabel 2.1. Rata-rata jumlah sel darah merah (eritrosit) mencit yang diberi Kombuchateh rosella dengan berbagai dosis

Perlakuan	Jumlah Sel Darah Merah (juta/mm ³)
K	4,57 ± 0,16 ^b
P_1	4,78 ± 0,24 ^b
P_2	5,00 ± 0,56 ^b
P_3	5,77 ± 0,36 ^a

Keterangan: Angka ($\mu \pm sd$) yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata padataraf 5%. BNT (0,05) = 0,43

Pemberian Kombucha teh rosella pada dosis yang paling tinggi (0,73 ml/20gBB) secara signifikan berperan dalam meningkatkan jumlah sel darah merah mencit dibanding pemberian Kombucha teh rosella pada dosis yang lebih rendah (0,36 ml/20gBB dan 0,55 ml/20gBB), sementara jumlah rata-rata sel darah merah mencit normal berkisar antara 4-6 juta/mm³. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jumlah rata-rata sel darah merah mencit akibat pemberian Kombucha teh rosella berada pada kisaran normal.

Kecenderungan peningkatan jumlah sel darah merah mencit perlakuan akibat pemberian kombucha teh rosella diduga dipengaruhi oleh senyawa antosianin yang berperan sebagai antioksidan dalam Kombucha teh rosella. Adenipekun (1998) menyatakan bahwa kadar antosianin kelopak bunga rosella kering sebesar 1,50 g/100 g. Menurut Sundah (2008), aktivitas antioksi-

dan kelopak bunga rosella sebesar 63,93 %. Chu dan Chen (2006) melaporkan bahwa kombucha mengalami peningkatan aktivitas antioksidan sebesar 17% selama proses fermentasi melalui pengukuran menggunakan DPPH. Senyawa antosianin diduga dapat menstimulir produksi eritropoietin sehingga mempengaruhi pembentukan sel darah merah. Fungsi eritropoietin dalam pembentukan sel darah merah adalah merangsang produksi proeritoblast dari sel-sel stem hemopoietik dalam sumsum tulang. Eritropoietin juga berfungsi mempercepat tahapan eritroblastik dibanding keadaan normal, dan selanjutnya akan melampaui batas kecepatan pembentukan sel baru sampai jumlah sel darah merah yang terbentuk mencukupi untuk mengangkut oksigen ke jaringan. Eritrosit diproduksi di sumsum tulang belakang dan berfungsi membawa oksigen ke seluruh tubuh. Lama masa hidup eritrosit yang tetap menyebabkan jumlah eritrosit relatif tetap untuk dihancurkan setiap hari oleh *Reticulo Endoplasmic System* (RES).

Sumsum tulang belakang membutuhkan bahan baku yang cukup untuk memproduksi sel darah merah, antara lain zat besi (Fe), asam amino, vitamin B₁₂, asam folat, vitamin B₂, vitamin B₆, vitamin C, vitamin E, mineral (kobalt dan tembaga) serta hormon eritropoietin (Swenson, 1997). Menurut Morton (1999), setiap 100 g kelopak bunga rosella mengandung protein 1,145 g, zat besi 8,98 mg, dan vitamin C 244,4 mg. Zat besi dan vitamin C yang terkandung dalam rosella diduga berpengaruh terhadap produksi eritrosit dalam sumsum tulang belakang sehingga pembentukan eritrosit dapat terus berlangsung dan tidak mengalami hambatan. Kecepatan pembentukan eritrosit dikontrol oleh hormon eritropoietin. Peningkatan produksi eritropoietin akan merangsang eritropoiesis dengan jalan meningkatkan sintesis hemoglobin, mengurangi waktu pematangan eritrosit dan melepaskan retikulosit ke dalam sirkulasi pada stadium lebih awal (Hoffbrand *et al.*, 2005).

Jumlah Sel Darah Putih (Leukosit)

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pemberian Kombucha teh rosella pada berbagai dosis berbeda nyata terhadap jumlah sel darah putih (leukosit) mencit. Rata-rata jumlah sel darah putih (leukosit) mencit yang diberi perlakuan Kombucha teh rosella dengan berbagai dosis disajikan pada Tabel 2.2.

Sel darah putih merupakan sistem pertahanan terhadap benda-benda asing yang dapat menimbulkan peradangan dan infeksi dalam tubuh. Hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa perlakuan K tidak berbeda dengan perlakuan P₁ dan P₂. Namun, terlihat adanya perbedaan jumlah sel darah putih pada ketiga perlakuan P₁, P₂, dan P₃ yang diberi Kombucha teh rosella. Semakin tinggi dosis “Kombucha” teh rosella yang diberikan, jumlah sel darah putih (leukosit) mencit semakin menurun. Perlakuan P₁ memiliki jumlah rata-rata leukosit tertinggi, artinya perlindungan tubuh mencit terhadap virus ataupun bakteri juga tinggi. Perlakuan P₃ yang mendapat “Kombucha” teh rosella dengan dosis paling tinggi memiliki jumlah rata-rata leukosit paling rendah dibanding perlakuan P₁ dan P₂, artinya perlindungan tubuh mencit terhadap virus dan

penyakit pada perlakuan P_3 lebih rendah dibandingkan P_1 dan P_2 . Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah sel darah putih mencit perlakuan berada pada kisaran normal, kecuali perlakuan P_1 yang mendapat “Kombucha” teh rosella pada dosis paling rendah memiliki jumlah sel darah putih melebihi normal, yaitu 13,38 ribu/mm³, sementara itu jumlah sel darah putih normal pada mencit berkisar antara 6-12,6 ribu/mm³.

Tabel 2.2 Rata-rata jumlah sel darah putih (leukosit) mencit yang diberi Perlakuan Kombucha teh rosella dengan berbagai dosis

Perlakuan	Jumlah Sel Darah Putih (ribu /mm ³)
K	12,62 ± 0,81 ^{ab}
P_1	13,38 ± 1,40 ^a
P_2	11,75 ± 1,55 ^b
P_3	9,73 ± 1,25 ^c

Keterangan: Angka ($\mu \pm sd$) yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf 5%. BNT (0,05) = 0,434

Leukosit terdiri atas granulosit atau sel polimorfonuklear yang jumlahnya paling banyak yaitu sekitar 75 % dari seluruh sel darah putih, neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit yang mempunyai sifat fagosit. Penurunan jumlah leukosit akibat pemberian Kombucha teh rosella pada dosis yang lebih tinggi disebabkan leukosit tidak diproduksi dalam tubuh akibat adanya kandungan antosianin dan vitamin C yang berperan sebagai antioksidan pada “Kombucha” teh rosella. Hal ini mengakibatkan tingginya pertahanan tubuh mencit terhadap benda asing yang masuk ke dalam tubuh yang dapat merusak jaringan. Peran antosianin dan vitamin C sebagai antioksidan adalah dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang bersifat sangat reaktif. Tingginya konsumsi antioksidan dapat meningkatkan sistem imunitas tubuh terhadap benda asing atau antigen. Xu *et al.*, (2011) melaporkan bahwa kemampuan teh dalam menghambat produksi Nitrit Oxide (NO) dalam sel mengalami peningkatan ketika teh difermentasi. NO berperan dalam mediasi sitotoksitas makrofag dan mengatur tekanan darah. Keseimbangan NO menunjukkan pentingnya pengaturan proses fisiologis seperti vasodilatasi dan pertahanan inang. Dalam Kombucha teh rosella juga terkandung vitamin B_1 , B_2 , B_3 , dan vitamin C yang dibutuhkan tubuh dan berperan sebagai katalisator. Sementara itu, vitamin berfungsi sebagai prekursor untuk kofaktor enzim yang membantu peran enzim sebagai katalis dalam metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein.

Diferensiasi Sel Darah Putih (Leukosit)

Sel-sel darah putih normal dikelompokkan menjadi granulosit dan agranulosit. Granulosit terdiri dari neutrofil, eosinofil, dan basofil sedangkan agranulosit terdiri dari limfosit dan monosit. Masing-masing komponen atau jenis sel darah putih memiliki berbagai macam fungsi khusus,

namun secara garis besar bentuk-bentuk ini berfungsi sebagai sistem pertahanan tubuh terhadap benda asing. Rata-rata persentase neutrofil, limfosit, dan monosit disajikan pada Tabel 2.3.

Tabel 2.3. *Persentase rata-rata jumlah sel diferensiasi butir darah putih (monosit, limfosit, dan neutrofil) mencit yang diberi perlakuan Kombucha teh rosella pada berbagai dosis*

Perlakuan	Monosit (%)	Neutrofil (%)	Limfosit (%)
K	7,67 ± 2,58 ^a	32,33 ± 3,20 ^a	59,83 ± 3,19 ^a
P ₁	11,83 ± 3,49 ^a	29,33 ± 3,67 ^a	58,83 ± 5,81 ^a
P ₂	9,50 ± 5,82 ^a	31,33 ± 7,74 ^a	59,17 ± 11,32 ^a
P ₃	6,33 ± 2,25 ^a	32,00 ± 4,52 ^a	61,67 ± 3,83 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf 5% BNT (0,05)=0,43

Monosit

Perlakuan pemberian Kombucha teh rosella tidak berbeda nyata terhadap jumlah sel monosit mencit. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah monosit mencit akibat pemberian Kombucha teh rosella berada pada kisaran normal, sementara jumlah monosit pada mencit normal berkisar antara 1-12 %.

Monosit merupakan sel darah putih yang menyerupai heterofil, bersifat fagositik yaitu memiliki kemampuan untuk menelan benda asing seperti bakteri. Monosit merupakan fagosit aktif serta mengandung peroksidase dan enzim lisosom. Monosit dimobilisasi bersama dengan heterofil sebagai bagian respon peradangan dan membentuk garis pertahanan kedua terhadap bakteri. Monosit memasuki sirkulasi dari sumsum tulang belakang, tetapi setelah berkisar 24 jam akan memasuki jaringan untuk menjadi makrofag jaringan (Ganong, 2003). Sel ini memiliki granula lisosom yang lebih kecil dan lebih sedikit jumlahnya dibandingkan sel neutrofil, serta mampu menghancurkan bahan-bahan patogen yang tidak dapat dikontrol oleh neutrofil. Monosit dalam jaringan akan berubah menjadi makrofag yang dapat memfagositosis benda-benda asing yang masuk ke dalam tubuh. Terjadinya kecenderungan penurunan jumlah sel monosit pada kelompok yang diberi Kombucha teh rosella pada dosis yang semakin tinggi diduga karena pada kelompok tersebut tidak terjadi peningkatan aktivitas fagositosis terhadap benda asing atau kemampuan fagositosis berjalan lambat.

Neutrofil

Perlakuan secara oral Kombucha teh rosella tidak berbeda nyata terhadap jumlah sel neutrofil mencit. Namun terlihat adanya kecenderungan peningkatan jumlah sel neutrofil pada kelompok yang diberi Kombucha teh rosella dengan dosis yang semakin tinggi.

Sel neutrofil berdiameter 10-12 μm dan memiliki butir-butir halus (granula) dalam sitoplasma serta inti bergelambir. Banyaknya gelambir pada inti sel ini tergantung pada lamanya sel neutrofil beredar di dalam sirkulasi darah. Jumlah neutrofil pada mencit normal berkisar antara 12-30 %. Peningkatan jumlah rata-rata sel neutrofil mencit karena sel neutrofil merupakan garis pertahanan seluler pertama dalam proses peradangan dan perlukaan, serta berperan penting dalam proses fagositosis dan membunuh mikroorganisme. Sel neutrofil juga berperan dalam proses peradangan akut pada tubuh, disamping itu sebagai sel yang memiliki mobilitas tinggi, neutrofil merupakan sel leukosit pertama yang datang pada lokasi perlukaan. Kemampuan kemotaktik neutrofil dipengaruhi oleh faktor-faktor kemotaksis dalam jaringan yaitu substansi yang dilepaskan dari jaringan rusak akibat perlukaan.

Limfosit

Perlakuan secara oral Kombucha teh rosella tidak berbeda nyata terhadap jumlah sel limfosit mencit. Namun terlihat adanya kecenderungan peningkatan jumlah sel limfosit pada kelompok yang diberi Kombucha teh rosella dengan dosis yang semakin tinggi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa jumlah limfosit mencit akibat pemberian Kombucha teh rosella berada pada kisaran normal, sementara jumlah limfosit pada mencit normal berkisar antara 55-85%..

Limfosit adalah leukosit agranulosit yang mempunyai ukuran dan bentuk yang bervariasi. Limfosit diproduksi dalam tulang belakang, limfa, saluran limfa, dan timus. Setelah kelahiran, limfosit dibentuk di sumsum tulang belakang, namun sebagian besar dibentuk dari sel prekursor yang berasal dari sumsum tulang di dalam kelenjar limfa, saluran limfa, dan timus. Pada umumnya limfosit memasuki sistem peredaran darah melalui pembuluh limfa. Sel limfosit memiliki kemampuan untuk melakukan resirkulasi di dalam peredaran darah, sehingga jumlah sel limfosit yang masuk dan keluar atau meninggalkan sirkulasi darah relatif konstan. Sekitar 70 % limfosit darah perifer yang bermigrasi ke dalam jaringan akan kembali ke dalam sirkulasi darah melalui pembuluh limfa.

Kemampuan resirkulasi limfosit sangat penting terutama dalam proses mekanisme distribusi sel-sel limfoid. Hal ini berhubungan dengan respon sistem kekebalan yaitu dengan terakumulasinya sejumlah besar limfosit pada lokasi antigen di dalam jaringan dan dapat berelokasi ke tempat lain di dalam jaringan untuk melakukan respon kekebalan (Jain, 1993). Dalam proses tanggap kebal, limfosit terdiri dari sel-B dan sel-T yang merupakan pengontrol dalam sistem imun. Sel B yang berdiferensiasi menjadi sel plasma akan memproduksi antibodi, sedangkan sel-T dapat melepaskan berbagai bahan yang mempunyai efek biologis yang disebut limfokin. Limfosit T mula-mula bermigrasi ke dan diolah lebih dahulu dalam kelenjar timus sedangkan limfosit B mula-mula diolah lebih dahulu dalam hati selama masa pertengahan janin, dan dalam sumsum tulang pada masa akhir janin dan sesudah dilahirkan. Peranan limfosit sangat penting dalam aktivitas produksi antibodi humoral dan pembentukan pertahanan seluler, serta bertanggung jawab terhadap keragaman antibodi. Keberadaan jaringan rusak dan invasi mikroor-

ganisme di dalam tubuh akan merangsang aktivitas sel makrofag sehingga akan merangsang kerja sel-T dan sel-B. Di dalam tubuh sel-T akan bermigrasi ke dalam jaringan dan langsung menyerang sel-sel asing pada jaringan tersebut sedangkan sel-B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi dan akan menyerang sel-sel asing sampai pada bagian tubuh yang lokasinya jauh. Peningkatan sel limfosit biasanya dapat ditemukan pada kondisi stress, baik emosional maupun fisik, infeksi kronis, dan peradangan kronis. Sedangkan penurunan jumlah limfosit dapat ditemukan pada kejadian infeksi virus (penurunan bersifat sementara dan akan naik lagi jumlahnya).

Kadar Hemoglobin Darah

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan pemberian Kombucha teh rosella pada berbagai dosis berbeda nyata terhadap kadar hemoglobin darah mencit. Rata-rata kadar hemoglobin darah mencit yang diberi perlakuan Kombucha teh rosella dengan berbagai tingkatan dosis disajikan pada Tabel 2.4.

Tabel 2.4. Rata-rata kadar hemoglobin darah mencit yang diberi Kombucha teh rosella dengan berbagai dosis

Perlakuan	Kadar Hemoglobin (g/dL)
K	19,30 ± 0,38ab
P ₁	18,28 ± 0,68b
P ₂	15,32 ± 1,84c
P ₃	20,13 ± 1,13a

Keterangan: Angka ($\mu \pm sd$) yang diikuti huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf 5%. BNT (0,05) = 0,43

Hemoglobin merupakan senyawa organik kompleks yang utama dalam tubuh manusia berupa pigmen merah yang kaya zat besi. Sebanyak 90% eritrosit vertebrata terdiri atas pigmen merah Hb. Hasil uji lanjut BNT menunjukkan bahwa perlakuan K tidak berbeda dengan pemberian Kombucha teh rosella pada dosis tertinggi (P₃) dan terendah (P₁). Namun terlihat perbedaan yang nyata antara perlakuan P₂ dengan ketiga perlakuan yang lain. Walaupun perlakuan P₃ memperlihatkan kadar hemoglobin tertinggi, namun hasil uji BNT menunjukkan tidak terlihat perbedaan antara P₃ dengan kontrol, sementara kadar rata-rata hemoglobin darah mencit normal adalah 10-19 g/100ml.

Tingginya kadar Hb pada mencit yang diberi Kombucha teh rosella dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif Kombucha teh rosella yang berhubungan dengan pembentukan sel darah merah (eritrosit). Kepekatan warna merah teh kelopak rosella menunjukkan kadar antosianin yang terkandung di dalamnya. Semakin pekat warna merah, rasa teh rosella akan makin asam

dan kadar antosianin makin tinggi. Semakin tinggi kandungan antosianin suatu bahan, maka semakin tinggi intensitas warna merah yang dihasilkan. Kombucha teh rosella diduga memiliki kandungan antosianin tinggi karena berwarna merah pekat dan memiliki pH yang rendah (asam). Damodaran *et al.* (2008) menyatakan bahwa kondisi asam dapat menstabilkan antosianin karena antosianin lebih stabil pada lingkungan dengan pH rendah, sehingga aktivitas antosianin pada produk Kombucha akan lebih optimal. Hasil pengamatan terhadap Kombucha teh rosella menunjukkan bahwa nilai pH Kombucha teh rosella sebesar 2.81. Chen dan Liu (2000) melaporkan bahwa nilai pH kombucha teh setelah fermentasi 30 hari sekitar 2.5. Menurut Jayabalan *et al.* (2007), dalam proses pembuatan kombucha dihasilkan asam-asam organik seperti asam asetat yang berasal dari proses fermentasi *Acetobacterxylinum*. Selain asam asetat juga terdapat asam glukoronat dan asam glukonat (Chen dan Liu, 2000). Akumulasi asam-asam organik yang dihasilkan berakibat pada penurunan pH. Kandungan vitamin dalam Kombucha teh rosella seperti vitamin B₁, B₂, B₃, dan vitamin C diduga mempercepat proses pembentukan Hb karena vitamin bekerja sebagai katalisator di dalam tubuh.

Peningkatan atau kadar hemoglobin yang tinggi umumnya disebabkan oleh bertambahnya jumlah eritrosit yang diproduksi sumsum tulang. Sumsum tulang membutuhkan bahan baku yang cukup untuk memproduksi sel darah merah, yakni zat besi (Fe), asam amino, vitamin B₁₂, asam folat, B₂, B₆, vitamin C, vitamin E, mineral (kobalt dan tembaga) serta hormon eritropoietin (Swenson, 1997). Zat besi berperan penting dalam pembentukan hemoglobin, mioglobin, dan substansi lain seperti sitokrom, sitokrom oksidase, peroksidase, dan katalase. Zat besi juga merupakan komponen heme yang sangat penting. Morton (1999) menyatakan bahwa kandungan zat besi dalam kelopak rosella sebesar 8,98 mg/100g sehingga terjadinya peningkatan kadar hemoglobin mencit diduga karena zat besi yang terkandung dalam kelopak rosella berperan dalam memproduksi jumlah sel darah merah.

Zat besi diserap dari saluran pencernaan dalam bentuk garam ferro (Fe²⁺). Sebagian zat besi dilepaskan dalam sirkulasi dan dalam sirkulasi besi diikat oleh transferin yaitu suatu β -1-globulin yang berfungsi mengangkut zat besi dan mengantarkannya ke tempat pembentukan Hb yaitu eritroblast. Dari eritroblast, dilanjutkan sedikit ke dalam stadium retikulosit, jika retikulosit meninggalkan sumsum tulang belakang dan masuk ke dalam aliran darah, retikulosit tetap membentuk Hb sedikit selama beberapa hari. Bagian heme dari molekul Hb disintesis terutama dari asam asetat dan gliserin. Kebanyakan sintesis ini terjadi dalam mitokondria. Asam asetat akan mengalami perubahan dalam siklus Krebs menjadi suksinil KoA. Kedua molekul suksinil KoA akan bergabung dengan 2 mol glisin membentuk senyawa pirol, dan sebaliknya empat senyawa tersebut akan saling berkaitan membentuk senyawa protoporfirin. Salah satu protoporfirin yaitu protoporfirin IX akan berkaitan dengan besi pembentuk molekul heme. Akhirnya 4 molekul heme akan berkaitan dengan ikatan polipeptida yang panjang. Ikatan polipeptida di sintesis di ribosom. Ikatan antara 4 molekul heme dan polipeptida tersebut akan membentuk

suatu sub unit Hb yang disebut dengan rantai Hb. Ke empat rantai Hb akan bergabung satu sama lain secara longgar membentuk molekul Hb yang lengkap. Berdasarkan uraian tersebut, zat besi dapat meningkatkan sintesis Hb.

2.4 MIKROBIOLOGI KOMBUCHA TEH ROSELLA

Kombucha merupakan hasil fermentasi teh dan gula oleh starter kultur kombucha yang disebut SCOBY. Simbiosis kultur kombucha antara lain *Acetobacter* yaitu *Acetobacter xylinum*, dan beberapa jenis khamir yaitu *Brettanomyces*, *Zygosaccharomyces*, dan *Saccharomyces*. Bakteri dan khamir saling berkompetisi menghasilkan alkohol dan asam dengan merombak gula. Komponen mayor yang dihasilkan saat fermentasi adalah asam asetat, etanol, dan asam glukoronat, sedangkan komponen minor yang dihasilkan adalah asam laktat, asam fenolat, vitamin B, dan enzim. Meningkatnya aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya fenolik bebas yang dihasilkan selama proses fermentasi, sehingga semakin tinggi kadar fenolik yang dihasilkan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya.

Dari penelitian (Mira, 2012) memberikan hasil bahwa berdasarkan Bargey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt *et al.*, 1994), ciri-ciri yang ditemukan pada bakteri hasil isolasi dari teh rosella kombucha memiliki kesamaan dengan genus *Acetobacter*. Genus *Acetobacter* memiliki ciri-ciri berbentuk elips hingga batang, lurus, atau ramping dan beberapa strain dapat berbentuk bulat, memanjang, bengkok atau berfilamen. Sel *Acetobacter* memiliki susunan sel tunggal, berpasangan atau rantai, dapat motil atau nonmotil, tidak membentuk endospora, termasuk ke dalam bakteri Gram-negatif (-), bersifat aerob obligat dan tidak pernah memfermentasi. Bakteri *Acetobacter* memiliki sifat katalase positif dan oksidase negatif, dengan pH optimum untuk tumbuh yaitu 5,4-6,3.

Isolasi yeast pada teh rosella kombucha lokal Bali pada media padat MEA menghasilkan koloni yang memiliki tekstur yang lembut dengan permukaan koloni cembung dan halus, berwarna putih kecoklatan dan berada pada bagian permukaan dan tengah media. Koloni yeast yang tumbuh pada media cair GYP memiliki karakteristik terbentuknya endapan berwarna putih. Yeast memiliki bentuk bulat, silinder, bulat telur, elips, memanjang triangular, bentuk seperti lemon, dan bentuk botol. Bentuk-bentuk yeast yang ditemukan dari isolasi yeast pada the rosella kombucha lokal Bali memiliki bentuk bulat, bulat telur, memanjang, elips dan bentuk lemon. Sistem reproduksi yeast yang ditemukan pada yeast yang terdapat pada teh rosella kombucha lokal Bali yaitu dengan pertunasan, pembelahan dan reproduksi dengan spora. Sedangkan jenis pertunasan yeast pada the rosella kombucha lokal Bali berupa pertunasan monopolar dan multilateral. Sistem reproduksi yeast dibagi menjadi dua cara reproduksi yaitu dengan reproduksi secara vegetatif dan seksual. Reproduksi vegetatif yeast dapat berupa pertunasan dan pembelahan. Pertunasan pada yeast dapat berupa pertunasan monopolar, bipolar dan multilateral (Rij, 1984). Sedangkan reproduksi seksual yeast dengan pembentukan spora. Spora terbentuk di dalam

suatu askus dimana bentuk askus yeast dapat berupa askus terkonjugasi atau tidak terkonjugasi. Jumlah spora dalam askus bervariasi antara 1-4 spora per askus (Rij, 1984). Menurut The Yeast a Taxonomic Study (Rij, 1984), ciri-ciri yeast yang ditemukan dalam teh rosella kombucha memiliki kemiripan dengan dengan genus *Schizosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Toroluspora*, dan *Zygosaccharomyces*. Genus bakteri dan yeast pada teh rosella kombucha lokal Bali serupa dengan genus bakteri yang ditemukan pada teh hijau dan teh hitam kombucha lokal Bali.

Sifat Antibakteri Kombucha

Kelopak bunga rosella pun dilaporkan berkhasiat sebagai antelmintik dan antibakteri. Zat warna merah dalam kelopak bunga Rosella dapat membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* telah dibuktikan oleh Nugroho (2011) yang mengemukakan bahwa kombucha dapat bersifat antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Campylobacter jejuni*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *S. epidermis*, *Salmonella enteritidis*, dan *Salmonella typhimurium*. Selanjutnya dari penelitian Nogroho yang bertujuan untuk menganalisis adanya daya hambat air fermentasi kombucha air kelapa terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dan menentukan KHM air fermentasi kombucha air kelapa terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, menunjukkan bahwa air fermentasi kombucha air kelapa mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, yang ditandai dengan terbentuknya zona bening (zona hambat) di sekitar sumuran pada medium lempeng NA. Kombucha air kelapa mempunyai waktu fermentasi efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada waktu fermentasi 6 hari, dengan diameter zona hambat sebesar 1,2 cm dan mempunyai KHM terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada konsentrasi 30%, dengan rerata diameter zona hambat sebesar 0,13 cm dengan 3 kali pengulangan. Sementara itu, ekstrak air kelopak bunga Rosella dibuktikan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* 11748, *S.aureus* 1135, *S. epidermidis*, *S. warneri* dan *S. xylosus* (Zuhrotun *et al.*, 2009). Konsentrasi Hambat Minimum dari ekstrak air kolopak bunga rosella terhadap *S. aureus* 1135, *S.epidermidis*, *S. warneri* dan *S. xylosus* antara 0,41 - 0,81 % sedangkan terhadap *S aureus* 11748, nilai KHM terletak pada konsentrasi 0,81-1,62%. Nilai banding aktivitas antibakteri pembandingan tetrasiklin HCl dengan ekstrak air kelopak bunga rosella adalah sebagai berikut: terhadap *S aureus* 11748 (1 : 5,67), *S. aureus* 1135 (1 : 8,24), *S.epidermidis* (1 : 1,10), *S. warneri* (1 : 1,24) dan *S.xylosus* (1 : 5,04).

Disamping mempunyai fungsi sebagai antibakteri, kombucha yang dibuat dari seduhan the Rosella juga mempunyai pengaruh pada karakteristik sel darah. Hal ini telah diuji dalam penelitian yang dilakukan oleh (Mukhani *et al.*, 2014) yang memberikan hasil bahwa pemberian Kombucha teh rosella pada ketiga dosis menghasilkan jumlah eritrosit, leukosit dan kadar hemoglobin menciit pada kisaran normal, tidak terlihat perbedaan diferensiasi butir darah putih (monosit, limfosit, dan neutrofil) menciit akibat perlakuan Kombucha teh rosella pada ketiga dosis dengan kontrol, dan terlihat adanya kecenderungan peningkatan jumlah eritrosit dan he-

moglobin, serta penurunan jumlah leukosit mencit akibat perlakuan Kombucha teh rosella pada ketiga dosis dibanding kontrol.

2.5 MANFAAT

Salah satu tumbuhan yang saat ini diketahui dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah adalah Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), yakni pada bagian bunga dan biji inilah bermanfaat baik untuk kesehatan. Salah satu kandungan di dalam kelopak rosella yang dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah adalah antosianin. Pratama (2010) menyebutkan bahwa seduhan kelopak kering bunga rosella dapat meningkatkan kadar HDL sebanyak 61,74% dengan dosis 500 mg/KgBB yang dicobakan terhadap hewan uji sprague dawley hiperkolesterolemia. Dengan dosis 500 mg/KgBB, dapat menurunkan kadar LDL 91,25% yang dicobakan terhadap hewan uji Sprague dawley hiperkolesterolemia (Novianto, 2010), sedangkan penurunan kolesterol total mencapai 46,58% dicobakan terhadap hewan uji sprague dawley sehat. Dari hasil analisis serum darah ayam broiler untuk tingkat perlakuan kontrol (0mg/ Kg BB/ Hari), pemberian ekstrak rosella 20 mg/ Kg BB/ Hari, 40 mg/ Kg BB/ Hari, 6 mg/ Kg BB/ Hari dan 80 mg/Kg BB/ Hari diperoleh rata-rata kadar kolesterol serum darah ayam broiler berturut-turut sebesar: 208 mg/dL, 182 mg/dL, 169 mg/dL, 131 mg/dL, 158 mg/dL. Hasil uji statistika menunjukkan bahwa ada pengaruh pemberian ekstrak rosella terhadap kadar kolesterol serum darah ayam broiler. Kadar kolesterol menurun terutama pada pemberian ekstrak rosella dengan dosis 60 mg/ Kg BB/ hari selama 3 minggu dengan rata-rata 131 mg/dL. Kemampuan *Hibiscus sabdariffa* dalam menurunkan kadar kolesterol total diduga diperantarai oleh flavonoid, niasin, vitamin C, dan antosianin. Tetapi dalam penelitian ini, niasin dan vitamin C, telah mengalami kerusakan pada saat penguapan pelarut. Adanya penurunan kadar kolesterol ayam broiler setelah diberi ekstrak rosella selama 3 minggu menunjukkan pengaruh yang positif bagi tubuh. Mengingat begitu bahayanya kolesterol yang berlebihan maka perlu adanya upaya untuk menurunkan kadar kolesterol, yaitu dengan mengkonsumsi rosella. Dapat dicoba untuk menggunakan ekstrak rosella karena mengandung flavonoid, niasin, vitamin C, dan antosianin yang dapat menurunkan kadar biosintesis kolesterol, mengurangi produksi kolesterol dalam hati, mampu menurunkan kadar trigliserida dan mampu memperantai penurunan kadar LDL dan lipoprotein.

2.6 APLIKASI

Ekstrak kelopak bunga Rosella juga banyak digunakan sebagai pewarna dan perasa dalam minuman anggur rosella, jeli, sirup, gelatin, pudding dan kue. Di India, tanaman ini banyak digunakan untuk mengobati hipertensi, pileksia dan kerusakan hati. Selain itu, secara empiris tanaman ini banyak digunakan untuk antidotum pada kasus keracunan zat kimia dan jamur beracun. Pemanfaatan ekstrak kelopak bunga Rosella sebagai pewarna alami dalam pengolahan produk makanan es krem telah dilakukan penelitian oleh Manuel *et al.* (2014). Dari eksperimen ini mem-

berikan hasil bahwa konsentrasi ekstrak kelopak bunga Rosella yang lebih tinggi secara signifikan meningkatkan kandungan antosianin dan penerimaan terhadap warna, namun mengurangi °Hue dan pH es krim. Konsentrasi asam sitrat yang digunakan untuk meningkatkan stabilitas warna merah alami Rosella menunjukkan bahwa semakin tinggi secara signifikan meningkatkan overrun dan penerimaan terhadap warna, namun mengurangi viskositas, °Hue, pH, tekstur, penerimaan terhadap rasa, dan penerimaan keseluruhan es krim. Skor optimum untuk penerimaan sensori ditetapkan pada konsentrasi ekstrak kelopak Rosella 11,5% dan asam sitrat penstabil warna sebesar 1,5%.

Kesadaran untuk tampil lebih sehat menuntut produsen sediaan kosmetika untuk menghasilkan kosmetika yang tidak sekedar mengubah penampilan (dekoratif) tetapi juga kosmetika perawatan, terutama perawatan kulit, salah satunya adalah kosmetika eksfolian dan antioksidan. Bunga *Hibiscus sabdariffa* L atau sering disebut bunga rosella diketahui memiliki kandungan antosianin sehingga sangat cocok dikembangkan sebagai bahan baku kosmetika antioksidan (Porkony, 2001). Senyawa antioksidan sangat penting artinya sebagai bahan baku kosmetika terutama untuk sediaan kosmetika pencegah penuaan dini. Dengan penambahan antioksidan, maka sediaan kosmetika ini mampu menangkap radikal bebas dalam tubuh. Seiring dengan pertambahan usia, proses metabolisme seseorang akan menurun termasuk detoksifikasi radikal bebas dalam tubuh. Bila radikal bebas ini tidak segera ditangkap oleh senyawa antioksidan, maka kerusakan material genetik akan terjadi dan akan berdampak lebih lanjut munculnya kanker.

Berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang farmasi mendorong para farmasis untuk membuat suatu formulasi yang tepat untuk mengolah bahan alam menjadi suatu bentuk sediaan yang *acceptable* atau mudah diterima oleh masyarakat. Bentuk sediaan antara lain adalah tablet *effervescent*. Priyanto (2011) mengemukakan bahwa tablet *effervescent* dimaksudkan untuk menghasilkan larutan secara cepat dengan menghasilkan CO₂ secara serentak, dibuat dengan cara mengempa bahan-bahan aktif dengan campuran asam-asam organik seperti asam tartrat dan natrium bikarbonat. Tablet menghasilkan larutan yang jernih dan rasa yang enak karena adanya karbonat yang membantu memperbaiki rasa beberapa obat tertentu (Lachman, 1994). Formulasi tablet *effervescent* ekstrak rosella ini menggunakan kombinasi bahan pengikat CMC dan gelatin. Lebih lanjut Priyanto mengatakan bahwa penambahan laktosa CMC dan gelatin diharapkan dapat menghasilkan tablet *effervescent* ekstrak kelopak rosella yang memenuhi persyaratan mutu fisik tablet dan uji tanggapan rasa. Keseragaman bobot merupakan parameter yang sangat penting bagi kualitas tablet, keseragaman bobot secara tidak langsung merupakan ukuran homogenitas baik kadar zat aktif maupun eksipien. Coefficient Variation (CV) pada uji keseragaman bobot digunakan untuk menentukan apakah berat tablet tersebut konstan atau tidak. Tablet yang baik mempunyai harga CV < 5 %. Data keseragaman bobot tablet dapat dilihat bahwa formula optimum tablet *effervescent* memenuhi persyaratan uji keseragaman bobot tablet. Faktor yang dapat mempengaruhi keseragaman bobot tablet antara lain yaitu sifat alir, dalam hal ini sifat alir yang baik menyebabkan granul yang masuk ke ruang pencetakan relatif konstan

sehingga didapat bobot tablet yang relatif seragam dan variasi bobot yang kecil. Disamping itu, kekerasan tablet yang memenuhi persyaratan yaitu 4-8 kg, sedangkan kerapuhan tablet merupakan salah satu hal yang harus dipertimbangkan dalam pembuatan tablet. Kehilangan berat atau kerapuhan kurang dari 0,5 % - 1 % masih dapat dibenarkan (Banker dan Anderson 1986). Dari penelitian Priyanto (2011) memberikan hasil bahwa kerapuhan tablet *effervescent* ekstrak kelopak bunga rosella adalah 0,07% yang berarti memenuhi syarat kerapuhan tablet. Sementara itu, hasil pengujian waktu larut tablet *effervescent* ekstrak kelopak bunga rosella formula optimum yaitu kurang dari 2 menit memenuhi persyaratan larut table. Waktu larut tablet adalah menggambarkan waktu yang diperlukan oleh tablet untuk larut dalam media air. Proses larutnya tablet didahului oleh adanya penyerapan air sehingga tablet dapat pecah dan larut menjadi bagian-bagiannya.

2.7 KESIMPULAN

Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) memiliki kemampuan menangkap radikal DPPH yang cukup baik dengan harga IC₅₀ sebesar 74,21 ppm. Namun demikian kemampuan antioksidannya masih jauh lebih rendah dari vitamin C yang memiliki harga IC₅₀ sebesar 3,93 ppm. Antosianin merupakan senyawa utama yang menentukan aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanolik bunga rosella. Sebagai senyawa antibakteri, ekstrak air kelopak bunga Rosella memiliki aktivasi antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi Hambat Minimum dari ekstrak air kolopak bunga rosella terhadap *S. aureus* 1135, *S. epidermidis*, *S. warneri* dan *S. xylosus* antara 0,41 – 1,62.

Meningkatnya konsentrasi ekstrak kelopak bunga Rosella secara signifikan meningkatkan kandungan antosianin dan penerimaan warna produk es krim, namun menurunkan nilai °Hue dan pH es krim. Untuk itu penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk mengetahui daya tahan warna selama penyimpanan es krim dan sifat antioksidan pada es krim.

Daun tanaman yang mengandung senyawa fenol pada dasarnya dapat digunakan untuk membuat minuman fungsional Kombucha. Mikroorganisme yang tumbuh pada Kombucha teh kelopak bunga Rosella adalah dari genus *Acetobacter*, *Schizosaccharomyces*, dan *Saccharomyces* seperti pada Kombucha dari daun teh pada umumnya. Pemberian ekstrak rosella dapat menurunkan kadar kolesterol serum darah ayam broiler dalam kisaran dosis 60 mg/ Kg BB/ hari dengan penurunan kadar kolesterol sebesar = 131 ± 6 (mg/dL). Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) mengalami metabolisme di hepar setelah diabsorpsi oleh usus.

DAFTAR PUSTAKA

Adenipekun, I.T. (1998). *Extraction and Colors of Roselle (Hibiscus sabdariffa L.) Juice*. University of Ibadan. Ibadan.

- Afifah, N., Naschiudin, A., Hariani, L. 2010. Analisis kondisi dan lama fermentasi medium kombucha the kopi rosella dalam menghambat pertumbuhan bakteri pathogen *V.cholerae* dan *B.cereus*. SKRIPSI Universita Islam Negeri maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Anokwuru, C. P., Ijoema E., Alusola A. and Ayobami O. A. 2011. Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx. *Res. J. Med. Plant.*, Vol. 5 (5), Hal. 557-566
- Banker GS, Anderson NR. 1986. Tablet in Lachman L. Lieberman HA., Kanig JL (Eds), *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. 3 rd. Philadelphia: Lea and Fabinger. Pp. 293-345.
- Chen, C. dan Liu, B.Y. (2000). Change in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of Applied Microbiology*89:834-839.
- Chen, C.C., Hsu, J.D., Wang, S.F., Ching, H.C., Yang, M.Y., dan Kao, E.S. (2003). *Hibiscus sabdariffa* extracts inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*51(18): 5472-5477.
- Chu, S.C. dan Chen, C. (2006). Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of Kombucha. *Food Chemistry*98:502-507.
- Cisse,M., Vaillant,F., Pallet, D., Dornier,R. 2011. Selecting ultra filtration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract. *Food Res Int.* 44:2607-2614. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.04.046.
- Dahiru, D., O.J. Obi and H. Umaru. 2003. Effect of *Hibiscus sabdariffa* Calyx Extract on Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage. *Nigerian Society for Experimental Biology.* 15 (1): 27-33.
- Damodaran, S., Parkin, K.L. dan Fennema, O.R. (2008). *Fennema's Food Chemistry*. 4rd Ed. CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton, London, New York.
- Departemen Kesehatan, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. 2000. Jakarta : Departemen Kesehatan.DepKes RI No SPP 1065/35.15/05.
- Dibyantini, R.E. dan Simorangkir, I. Uji efektivitas ekstrak kelopak bunga Rosella (*H. sabdariffa*. L) terhadap penurunan kadar kolesterol serum darah ayam broiler. Jurusan Kimia FMIPA UNIMED.
- Dufresne, C. and E.Farnword. 2000. Tea, Kombucha. And health: a Review. *Food Research International* 33:409-421.
- Durge, AV., Sarkar,S., Singhal, RS. 2013. Stability of anthocyanins as pre-extrusion coloring of rice extrudates. *Food Res Int.* 50:641-646. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.05.017.
- Gharib, O.A. (2009). Effects of kombucha on oxidative stress induced nephrotoxicity in rats. *Chinese Medicine*4:23-30

- Goh, W.N., A. Rosma, B. Kaur, A. Fazilah, A.A Karim, and R. Bhat. 2012. Fermentation of Black Tea Broth (Kombucha): I. Effects of Sucrose Concentration and Fermentation Time on Yield of Microbial Cellulose. *IFJR*, 19 (1):109-117.
- Goldberg, Israel, 2002. *Functional Foods, Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals*. Edited by Israel Goldberg, Chapman and Hall. New York.
- Ganong, W. F. (2003). *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Edisi Ke-21*. Penerjemah Widjajakusumah, M.D. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Gordon, M.F. 1990. The mechanism of antioxidant action in vitro, In: Hudson, B.J.F.(ed), *Food Antioxidants*, London:Elsevier Applied Science, 1990, 1-18
- Hoffbrand, A. V., Petit, J. E. dan Moss, P.A.H. (2005). *Hematologi. Edisi Ke-4*. Penerjemah Mahanani D.A. EGC Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9 th ed. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Husaini, D.C., Orisakwe, O.E., Akunyili, D.N., Njan, A.A., Akumka, D.D., Udemazue, O.O. 2004. Subchronic administration of Nigerian Species of Aqueous Extract On *Hibiscus sabdariffa* Calyx In Rats Did Not Produce cardiotoxicity. *European bulletin of drug research*. 12 : 15-20.
- Jain, N. C. (1993). *Essential of Veterinary Hematology*. Lea and Febiger. Philadelphia.
- Jayabalan, R., Marimuthu, S. dan Swaminathan, K. (2007). Changes in content of organic acids and tea polyphenols during kombucha tea fermentation. *Food Chemistry* 102:392-398.
- Inoue, M, 2001, Protective mechanisms against reactive oxygen species. In: Arias IM *The liver biology and pathobiology* Lippincott Williams and Wilkins 4th-ed, Philadelphia.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N., 2001. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods, *Phytochem. Anal.*, 13:8-17.
- Kustyawati M.E. dan Ramli S., 2008. Pemanfaatan Hasil Tanaman Hias Rosella Sebagai Bahan Minuman. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II 2008*. Universitas Lampung, 17-18 November 2008
- Lachman L. Lieberman HA, Kanig JI. 1994. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. Edisi III, Suyatmi S, Penerjemah. Jakarta: UI Pr. Terjemahan dari : *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. hlm. 643-663, 674-717, 625, 654, 686, 697, 701, 702, 703.
- Lukitaningsih, E., Juniarka, A., Noegrohati, S. 2013. Pengembangan sediaan Ekstrol dan uji antioksidan ekstrak kelopak bunga Rosella (*H. sabdariffa* L) dalam upaya melawan radikal bebas. *Prosiding Sem Nas Perkebangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III*. Hal: 337-344, ISSN:2339-2592.

- Manuel, J., Paramawati, R., Masli, M.D. 2014. Utilization of response surfac³ methodology in the optimization of Rosella ice cream making. *J. Teknol dan Industri Pangan* 25(2):125-133. DOI:10.6066/jtip.2014.25.2.125.
- Mira, S.W. 2012. Karakterisasi Mikroorganisme serta Optimalisasi Waktu Fermentasi dan Konsentrasi Gula untuk Peningkatan Aktivitas Antioksidan Teh Hijau Kombucha Lokal Bali. Skripsi. Jurusan Farmasi-Fakultas MIPA-Universitas Udayana, Jimbaran.
- Mohd-Esa, N., Hern, F.S., Ismail, A., Yee, C.L. 2010. Antioxidant activity in different parts of roselle extract and potential exploitation of the seeds. *Food Chem*, 122:1055-1060. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.03.074.
- Morton, J.F. (1999). *Roselle Hibiscus sabdariffa* L. <http://www.transgenica.com/database/h/hibiscus.htm>. [4 Januari 2011].
- Mukhani, Astuti, S., Kustyawati, M.E. 2014. Pengaruh pemberian Kombucha the Rosella terhadap profil darah mencit. *J. Agritech*,
- Murugesan, G.S., Sathishkumar, M., Jayabalan, R., Binupriya, A.R., Swaminathan, K. dan Yun, S.E. (2009). Hepatoprotective and curative properties of kombucha tea against carbon tetrachloride-induced toxicity. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 19(4):397-402.
- Naland, H. (2004). *Kombucha Teh Ajaib. Pencegah dan Penyembuh Aneka Penyakit*. Agromedia Pustaka. Jakarta.
- Nugroho, E.N., 2011. Pengaruh Ekstrak Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) terhadap Kadar Triglicerida Tikus Putih Diabetes. *Widya Warta* No. 02. ISSN 0854-1981.
- Novianto, R. 2010. Pengaruh Pemberian Seduhan Kelopak Kering Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) Terhadap Kadar Kolesterol LDL Serum Tikus Sprague-Dawley Hiperkolesterolemik http://eprints.undip.ac.id/23669/1/Rico_N.pdf, 12-Mei-2015
- Porkony, J., 2001, Introduction dalam Porkony, J., Yanshlieva, N., and Gordon, M. (Eds) *Antioxidant in food; Practical Applications*, 2, New York: CRC Press
- Pratama, M.F.R. (2010), Pengaruh Pemberian Seduhan Kelopak Kering Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa*) Terhadap Kadar Kolesterol HDL Serum Tikus Sprague Dawley Hiperkolesterolik http://eprints.undip.ac.id/23608/1/Muh_Fakhri.pdf, 10 Januari 2013.
- Priyanto, W. 2011. Optimasi formula tablet effervescent ekstrak kelopak bunga Rosella dengan kombinasi Avicel PH 101 dan gelatin. *J. Farmasi Indonesia*, 8(2):11-18. ISSN:1693-8615.
- Rij, N. J. W. K. 1984. *The Yeast A Taxonomic Study 3 rd Revised and Enlarged ed*. Amsterdam. Pp. 7-8, 45-46, 52-62, 68-69.
- Ross, P., Meyer, R. dan Benziman, M. (1991). Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiology Reviews* 55:35-58.

- Suhardini, PN, dan Zubaidah,E. 2015. Studi aktivitas antioksidan kombucha dari berbagai jenis daun selama fermentasi. *J.Pangan dan Agroindustri*, 4(1):221-229.
- Sumartini, N.W.E., Leliqia, N.P.E., Ramona Y. 2010. Karakteristik mikroorganisme pada the Rosella kombucha local Bali.
- Sundah, N.C. (2008). *Pembuatan Serbuk Effervescent Rosella (Hibiscus sabdariffa L) : Kajian Konsentrasi Maltodekstrin dan Suhu Pengeringan yang Berbeda terhadap Sifat Fisik, Kimia dan Organoleptik*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang.
- Swenson, M. J. (1997). *Duke's Physiology of Domestic Animal*. 10th Ed. Publishing Associates a Division of Cornell University. Ithaca and London.
- Teoh, L. A., Gillian H. and Julian C. 2004. Yeast Ecology of Kombucha Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.*,95:119-126.
- Tzu, L.L., Hui, H.L, Chang, C.C., Ming, C.L., Ming C.C., dan Chau, J.W. (2007). *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*27: 140-145.
- Velicanski, A. S., Dragoljub D. C., Siniša L.M., Vesna T. T and Sladana M. S. 2007. Antimicrobial And Antioxidant Activityof Lemon Balm Kombucha. *APTEF*,38:165-172.
- Widyarini, MK., Ismail, A. 2010. Pengaruh pemberian seduhan kelopak bunga Rosella (H. sabdariffa) dosis bertingkat selama 30 hari terhadap gambaran histology hepar tikus Wistar. Karya Ilmiah pada Fak Kedokteran Univ. Diponegoro.
- Xu, Y., Zhao, H., Zhang, M., Li, C.J., Lin, X.Z., Sheng J. dan Shi W. (2011). Variations of antioxidant properties and NO scavenging abilities during fermentation of tea. *International Journal of Molecular Sciences*12:4574-4590.
- Zuhrotun, A., Hendriani R., Kusuma, S.A.F. 2009. Pemanfaatan ekstrak air kelopak bunga Rosella (H.sabdariffa L) asal kab. Bandung Barat sebagai antiinfeksi terhadap beberapa genus *Staphylococcus*. Laporan Penelitian Hibat LITMUD Universitas Padjadjaran Bandung.

Bab 3

UBI JALAR UNGU: PENGEMBANGANNYA SEBAGAI PANGAN RENDAH KALORI YANG MENGANDUNG ANTIOKSIDAN

Siti Nurdjanah, Ph.D

Ubi jalar ungu (*Ipomea batatas* L. Poir) mengandung antosianin dan sejumlah pati resisten bermanfaat bagi kesehatan. Antosianin dibuktikan mempunyai berbagai manfaat fisiologis seperti antioksidan, antikanker, dan antidiabetes. Pati resisten karena kemiripannya dengan serat pangan dalam hal sifat fisiologis, maka digolongkan sebagai serat pangan. Pati resisten telah dibuktikan mempunyai berbagai manfaat fisiologis seperti anti kanker usus, prebiotik, hipoglikemik efek, dan pencegahan pembentukan batu empedu. Pengolahan ubi jalar ungu menjadi tepung merupakan salah satu cara memperpanjang masa simpan. akan tetapi antosianin rentan terhadap reaksi oksidasi terutama pada suhu pengeringan. Modifikasi secara fisik menggunakan pemanas berputar dengan tujuan menggelatinisasikan sebagian pati dapat mempertahankan antosianin pada ubi jalar ungu. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa proses gelatinisasi sebagian dilanjutkan penyimpanan pada suhu 5°C selama 48 jam dapat meningkatkan kandungan pati resisten tepung ubi jalar ungu. Kombinasi antara kandungan antosianin dan pati resisten tinggi dalam tepung ubi jalar ungu merupakan bahan tepat untuk dimanfaatkan sebagai bahan baku pangan berkalori rendah mengandung antosianin. Contoh produk yang dapat dikembangkan adalah beras instant tiruan dan produk makanan camilan. Hal ini merupakan terobosan baru untuk menyediakan menu alternative bagi penderita diabetes. Karakteristik, manfaat dan aplikasi antosianin, pati resisten dan tepung ubi jalar ungu mengandung antosianin dan kaya pati resisten akan dikupas dalam bab ini.

3.1 PENDAHULUAN

Ubi jalar (*Ipomoea batatas* Lam) merupakan tanaman umbi yang semakin penting keberadaannya karena beberapa kultivar terutama yang berdaging orange dan ungu mengandung karoten dan antosianin yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Ubi jalar dilaporkan mengandung pati dalam

jumlah yang tinggi yaitu sekitar 30-85 g/100 g berat kering (Bradbury dan Holloway, 1988; Liu et al., 2010). Kandungan pati yang tinggi menyebabkan karakterisasi pati pada ubi jalar mejadi pusat perhatian bagi para peneliti di bidang kesehatan, pangan dan gizi, terutama tentang daya cerna pati. Hal ini antara lain disebabkan oleh meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap nilai gizi dan pengaruh terhadap kesehatan (indek glikemik, obesitas dan diabetes) dari pangan berkarbohidrat tinggi.

Penelitian dengan tema penggunaan ubi jalar secara terintegrasi sebagai pangan fungsional dalam upaya untuk mendukung program ketahanan pangan juga telah banyak dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa selain sebagai sumber karbohidrat berupa pati, limbah padat hasil samping ekstraksi pati ubi jalar mengandung komponen serat pangan berupa pektin dan pati resisten dalam jumlah yang signifikan dengan kemampuan membentuk gel yang baik (Nurdjanah, 2008). Lebih lanjut limbah padat atau ampas ubi jalar juga mengandung serat pangan berupa selulosa, hemiselulosa dan pektin yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai sumber prebiotik (Nurdjanah, 2011). Selain itu hasil analisa menggunakan ^{13}C solid state NMR menunjukkan bahwa pektin dari ubi jalar merupakan pektin bermetoksil rendah (Nurdjanah et al., 2013) yang berpotensi untuk dikembangkan menjadi salah satu ingredien dalam pudding dan selai rendah kalori. Pati ubi jalar variates Shiroyuta mengandung pati resisten sebesar 42% (Nurdjanah dan Violita, belum dipublikasi). Liu dan Sapode (2011) juga melaporkan bahwa daya cerna dari 20 kultivar ubi jalar di Papua New Guinea berkisar antara 48 sampai 78 g/100 g pati kering, sedangkan sisanya merupakan pati tahan cerna (enzyme-resistant starch). Keberadaan pati resisten pada ubi jalar dapat menjadikan ubi jalar sebagai sumber pangan penting bagi kesehatan dan ingredien penting pangan fungsional.

Penelitian tentang produksi tepung ubi jalar secara fermentasi asam laktat juga telah dilakukan. Hasil menunjukkan bahwa tepung yang dihasilkan berwarna lebih putih dari pada tepung yang diproses secara pengeringan biasa. Analisa terhadap karakteristik pasta (pasting behavior) tepung menunjukkan bahwa tepung ubi jalar terfermentasi mempunyai tingkat retrogradasi yang lebih tinggi (Yuliana dan Nurdjanah, 2013). Semakin tinggi tingkat retrogradasi mengindikasikan bahwa struktur pati dalam tepung semakin kristalin atau semakin kokoh sehingga semakin sulit untuk dipecah oleh enzim amylase dalam pencernaan, pati ini kemudian digolongkan menjadi pati resisten. Oleh karena itu dapat diharapkan bahwa tepung ubi jalar terfermentasi mempunyai peran yang sangat potensial untuk digunakan sebagai bahan baku makanan lambat cerna atau bahkan tahan cerna. Makanan berbahan baku karbohidrat kaya pati resisten sangat cocok untuk dijadikan menu utama bagi penderita diabetes yang tidak menghendaki makanan yang dikonsumsi secara cepat menaikkan kadar gula darah.

Selain kandungan pati resisten, beberapa jenis ubi jalar juga mengandung pigmen yang sangat bermanfaat bagi kesehatan. Sebagai contoh ubi jalar ungu dikenal dengan kandungan antosianin yang berfungsi menyehatkan. Beberapa tahun terakhir ubi jalar ungu telah menjadi perha-

tian para peneliti di bidang pangan dan kesehatan. Hal ini antara lain karena kandungan warna ungu pigmen antosianin, nutrisi yang tidak dapat diabaikan serta potensinya sebagai sumber pangan yang menyehatkan. Penelitian tentang tepung ubi jalar ungu, menunjukkan bahwa tepung ubijalar ungu yang dimodifikasi secara fisik menggunakan rotary drum cooker mempunyai derajat gelatinisasi yang berbeda serta mampu mengurangi tingkat kerusakan antosianin, mempunyai kecenderungan retrogradasi pati yang lebih tinggi (Nurdjanah dan Yuliana, 2013).

Berdasar paparan beberapa hasil penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa ubi jalar tidak hanya dimanfaatkan sekedar sebagai makanan selingan yang mengenyangkan akan tetapi sumber pangan yang mempunyai fungsi lebih dari fungsi utamanya terutama yaitu berpotensi menyehatkan.

Tulisan pada bab ini akan membahas karakteristik, manfaat dan contoh aplikasi dari komponen dalam tanaman ubijalar yang bertanggung jawab terhadap efek menyehatkan. Selain umbinya, daun tanaman ubi jalar bahkan pucuk daun ubi jalar juga mempunyai berbagai manfaat, bahkan, daun ubi jalar mengandung lebih banyak nutrisi dan serat makanan daripada beberapa sayuran berdaun hijau. Akan tetapi pembahasan kali ini difokuskan pada kandungan pati resisten serta pigmen antosianin ubi jalar ungu berdasar hasil beberapa penelitian yang telah dilakukan baik secara individu maupun kelompok.

3.2 KARAKTERISTIK ANTOSIANIN

Antosianin termasuk komponen flavonoid yang banyak ditemukan pada pangan nabati berwarna merah, ungu, merah gelap seperti pada beberapa buah, sayur, maupun umbi (Schewartz *et al.*, 2007). Beberapa jenis ubi jalar ungu mengandung total antosianin sebesar 0,6 mg/g berat umbi basah, dengan komponen utamanya adalah peonidin 3-caffeoyl sophoroside-5-glucosida (Furuta *et al.*, 1998). Antosianin dalam ubi jalar ungu sebagian besar dalam bentuk terasetilasi (acylated anthocyanin) dengan asam aromatik (Truong *et al.*, 2010). Antosianin ini lebih stabil terhadap pH, panas dan cahaya (Giusti dan Wrolstad, 2003; Terahara and Matsui, 2008; Kano *et al.*, 2005). Antosianin dalam bentuk aglikon lebih aktif daripada bentuk glikosidanya (Wang dan Stoner, 2008). Antosianin mempunyai kapasitas sebagai antioksidan karena reaktivitasnya yang tinggi sebagai pendonor hidrogen atau elektron, dan kemampuan radikal turunan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron yang tidak berpasangan, serta kemampuannya mengkelat ion logam (terminasi reaksi Fenton) (Gan *et al.*, 2012).

Kesetabilan antosianin tergantung dari faktor intrinsik maupun faktor ekstrinsik. Contoh faktor intrinsik adalah struktur kimia antosianin, konsentrasi antosianin dalam bahan, sedangkan contoh faktor ekstrinsik adalah suhu, pH, cahaya, oksigen, protein dan ion logam. Faktor faktor tersebut menjadi pertimbangan penting agar proses pengolahan tidak menyebabkan degradasi antosianin.

3.3 KARAKTERISTIK SERAT PANGAN DAN PATI RESISTEN

Serat pangan atau dietary fiber adalah bagian dari tanaman yang dapat dimakan, akan tetapi resisten terhadap enzim enzimpencernaan dan absorpsi pada usus halus, dapat difermentasi lengkap atau sebagian dalam usus. Dietary fiber meliputi polisakarida, oligosakarida, lignin dan substansi tanaman lainnya. Dietary fiber mempunyai manfaat fisiologi yang menguntungkan seperti efek laxative, pengatutan kolesterol darah dan atau kadar gula darah (AACC, 2001).

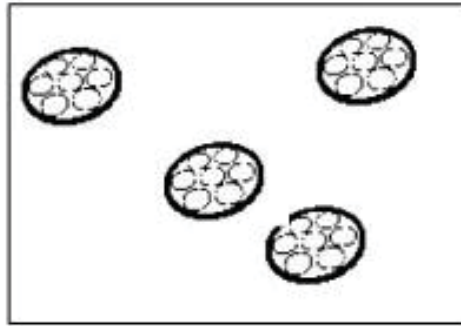
Karbohidrat berdasar pengaruhnya pada mekanisme fisiologi dan kesehatan digolongkan menjadi dua yaitu : (i) karbohidrat yang tersedia (available carbohydrate), yaitu yang dapat dicerna dan diserap dalam usus kecil untuk metabolisme, dan (ii) karbohidrat resisten (resistant carbohydrate), yaitu karbohidrat yang tidak dapat dicerna dalam usus kecil atau sedikit diserap / dimetabolisme. Secara gizi, karbohidrat resisten yang paling banyak terdapat didalam makanan adalah serat pangan (Englyst et al., 2007).

Menurut The Institut of Medicine (IOM, 2012) jumlah konsumsi serat pangan yang dianjurkan adalah 14 g per 1000 kcal. Hal ini didasarkan atas pengaruh konsumsi serat terhadap kesehatan manusia seperti efek terhadap resiko berkurangnya penyakit jantung koroner, dan diabetes. Anjuran konsumsi serat pangan untuk orang dewasa berumur 19-50 tahun adalah 38 g/hari untuk pria, dan 25 g/hari untuk wanita. Sedangkan untuk usia diatas 50 tahun dianjurkan konsumsi sebesar 30g/hari untuk pria dan 20 g/hari untuk wanita (Anonim, 2012).

Jenis karbohidrat resisten yang mencapai kolon atau usus besar tanpa mengalami hidrolisis meliputi polisakarida non-pati pati (non-starch polysaccharides), pati resisten dan karbohidrat rantai pendek rantai pendek yang tergolong kedalam serat larut (AACC, 2001). Pati resisten adalah bagian pati yang tidak dapat dapat dicerna oleh amilase pankreas manusia di usus kecil, tetapi lolos mencapai usus besar (Yao et al., 2009), sifat fisiologinya seperti serat larut, dapat difermentasi (Roberfroid, 2007) dan berfungsi sebagai probiotik. Manfaat yang dominan terhadap metabolisme tubuh antaralain adalah meningkatkan volume feses, menurunkan pH usus besar, mengontrol kadar gula darah, menurunkan resiko kardio vaskular (Slavin et al., 2009, Lunn dan Buttriss, 2007).

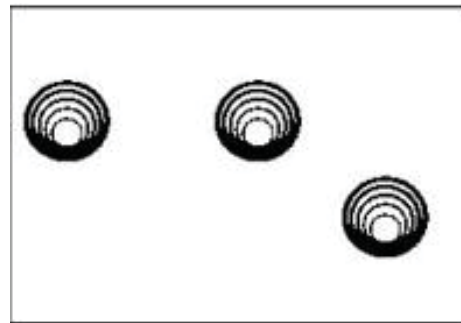
Secara umum pati resisten (RS) dapat ditemui secara alami maupun setelah dilakukan pengolahan terhadap bahan hasil pertanian. Besarnya kadar pati resisten dalam suatu bahan pangan dipengaruhi oleh berbagai factor, antara lain kandungan amilosa dan amilopektin, struktur fisik, dan derajat gelatinisasi (Goni et al., 1996) serta teknik pengolahan. Teknik pengolahan makanan seperti pemanggangan, pengeringan suhu tinggi juga dapat menaikkan proporsi pati resisten, sebaliknya pengolahan menggunakan sistem perebusan, dan pengecilan ukuran dapat menurunkan tingkat resistensi pati (Sajilata et al., 2006). Sajilata et al. (2006) menggolongkan pati resisten berdasar strukturnya menjadi 4 yaitu RS-1, RS-2, RS-3 dan RS-4. RS-1 merupakan pati yang secara fisik posisinya terperangkap oleh komponen lain seperti protein dan lemak didalam bahan pangan, sehingga sulit untuk diakses oleh enzim. sebagai contoh adalah pati resisten pada

jagung dan padi yang digiling kasar. RS-1 stabil terhadap panas pada pengolahan secara konvensional oleh karena itu sangat cocok untuk digunakan sebagai ingredient dalam makanan konvensional. Struktur dari RS-1 dapat dilihat pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Struktur RS-1(Sajilata et al., 2006)

RS-2 merupakan pati yang struktur granulanya, mempunyai pola radial atau melingkar dan relatif kering, membentuk granulanya sangat kompak sehingga membatasi aksesibilitas enzim pencernaan dan berbagai enzim amylase. Struktur inilah yang menyebabkan resistensi secara alami. Contoh dari RS-2 adalah pati yang terdapat pada pisang yang kita konsumsi mentah. Pati resisten RS-1 dan RS-2 dapat dicerna di dalam usus halus secara tidak sempurna dan sangat lambat (Sajilata et al., 2006). Struktur RS-2 dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3.2 Struktur RS-2(Sajilata et al., 2006)

RS-3 sebagian besar terbentuk melalui proses retrogradasi amilosa saat pati yang telah tergelatinisasi didinginkan. RS-2 sangat resisten terhadap serangan enzim pankreatik, tetapi dapat membentuk dispersi dengan larutan KOH atau larutan dimethyl sulphoxide (Asp dan Bjork, 1992). RS-2 juga dapat terbentuk melalui proses retrogradasi pati akibat pemanasan dan pendinginan berulang ulang (Leu et al., 2003). Retrogradasi dapat terjadi karena paralellisasi amilosa pada saat pasta pati didinginkan. Fenomena ini menyebabkan perluasan daerah kristal sehingga mengakibatkan penguatan struktur gel.

RS-4 terbentuk apabila di dalam granula pati terdapat ikatan lain selain α 1-4 dan α 1-6 dari glukosa. Contoh dari RS-4 adalah berbagai pati termodifikasi yang diproduksi melalui pereaksian dengan bahan kimia (Sajilata et al., 2006). RS 4 dapat dibentuk dengan memodifikasi pati secara crosslinking (Haynes et al., 2000). Crosslinking dicapai dengan cara mereaksikan pati dengan bi- atau polyfunctional reagen seperti sodium trimetafosfat, fosfor oxichlorida, atau campuran asetat anhidrat dengan asam dekarboksilat seperti asam adipat. Crosslinking antara sulfonat atau gugus fosfat dengan gugus hidroksil dari berbagai molekul pati menyebabkan granula pati menjadi resisten terhadap enzim amilolitik.

Selama proses pencernaan, pati resisten (RS) lolos dari usus halus, dan setelah mencapai usus besar, sekitar 30-70% RS difermentasi oleh mikroflora menghasilkan asam lemak rantai pendek dan sisanya dikeluarkan melalui feses (Behal dan Howe, 1996; Cumming et al., 1996).

3.4 MANFAAT ANTOSIANIN

Antosianin adalah golongan komponen polifenol alami yang terkandung dalam berbagai buah buahan, biji bijian, sereal dan sayuran. Komponen inilah yang bertanggung jawab terhadap warna merah, biru dan ungu dari komoditas tersebut. Beberapa peneliti menyatakan bahwa antosianin mempunyai fungsi biologi dan farmakologi, antara lain seperti anti-inflamatori (Karlsen et al., 2007), anti-oksidatif (Shih et al., 2007).

Antosianin ubi jalar ungu dilaporkan mempunyai sifat yang lebih stabil selama pengolahan dan penyimpanan apabila dibandingkan dengan antosianin yang bersumber dari tanaman lain. Keunggulan antosianin ubi jalar dalam hal kesetabilan ini dapat dimanfaatkan sebagai pewarna makanan alami yang sekaligus mempunyai fungsi fisiologis. Para peneliti telah membuktikan bahwa antosianin ubi jalar ungu mempunyai berbagai fungsi fisiologis seperti anti-mutagen (Yoshimoto et al., 2001), dan anti-hiperglisemik efek (Matsui et al., 2002). Ubi jalar ungu secara in vitro maupun in vivo mempunyai kemampuan sebagai antioksidan yang lebih kuat bila dibandingkan dengan kemampuan antioksidan yang berasal dari antosianin kubis ungu, kulit anggur, dan jagung ungu, serta asam askorbat atau vitamin C (Kano et al., 2005; Philpott et al., 2004).

Peneliti lain melaporkan bahwa minuman ringan yang diproduksi dari ubi jalar ungu dapat melindungi hepar dengan cara menurunkan jumlah serum gamma glutamil transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) dan alanin transferase (ALT) dari laki laki sehat yang terindikasi terserang hepatitis (Suda et al., 2008)

3.5 MANFAAT PATI RESISTEN

Pati resisten berupa partikel berukuran kecil, berwarna putih, dan tidak berasa tidak beraroma serta kapasitas penyerapan air yang rendah. Hal ini menyebabkan RS memungkinkan untuk digunakan untuk menggantikan tepung sampai 50% (1:1) tanpa mempengaruhi sifat sifat adonan

atau reologi. RS dapat digunakan untuk memperbaiki tekstur dari makanan tradisional berserat tinggi. RS juga meningkatkan kerenyahan pada produk sereal. Pati resisten juga dilaporkan mempunyai banyak manfaat secara fisiologi.

Manfaat RS menurut Nugent (2005) antara lain sebagai serat pangan, mencegah kanker usus, efek hipoglikemik, prebiotik, pencegahan pembentukan batu empedu, efek hipokolesterol-aemik, penghambatan akumulasi lemak, dan absorpsi mineral.

RS digolongkan menjadi salah satu komponen serat pangan karena nilai gizi yang lebih mendekati nilai gizi serat pangan apabila dibandingkan dengan nilai gizi pati tercerna. Lebih lanjut sebagian kecil RS juga menunjukkan sifat lambat cerna oleh karena itu dapat dijadikan kendaraan untuk melepaskan glukosa dalam darah secara lambat .

RS bermanfaat mencegah kanker usus karena difermentasi oleh mikroflora di usus besar menghasilkan asam lemak rantai pendek, salah satunya adalah asam butirat. Asam lemak rantai pendek dapat menekan pertumbuhan sel sel ganas pada usus besar sehingga kanker usus dapat dicegah

RS mempunyai efek hipoglikemik karena metabolisme RS terjadi 5-7 jam setelah dikonsumsi. Hal ini jauh lebih lambat dari pati alami tergeletinisasi yang dimetabolisme secara langsung setelah dikonsumsi. Pencernaan setelah 5-7 jam menurunkan postprandial glycemia dan insulinemia serta mempunyai potensi untuk memperpanjang rasa kenyang (Reader et al., 1997). RS berfungsi sebagai prebiotik karena dapat digunakan substrat untuk meningkatkan pertumbuhan mikroorganisme probiotik seperti *Bifidobacterium*.

RS bermanfaat untuk menurunkan pembentukan batu empedu. Pati berdaya cerna tinggi mempunyai kontribusi dalam pembentukan batu empedu melalui sekresi insulin yang lebih banyak. Insulin ini selanjutnya akan menstimuli sintesa kolesterol, sedangkan RS hampir tidak tercerna atau tercerna secara lambat, oleh karena itu jumlah sekresi insulin juga jauh lebih sedikit sehingga sintesa kolesterol tidak berlebihan dan pembentukan batu empedu dapat dihindari.

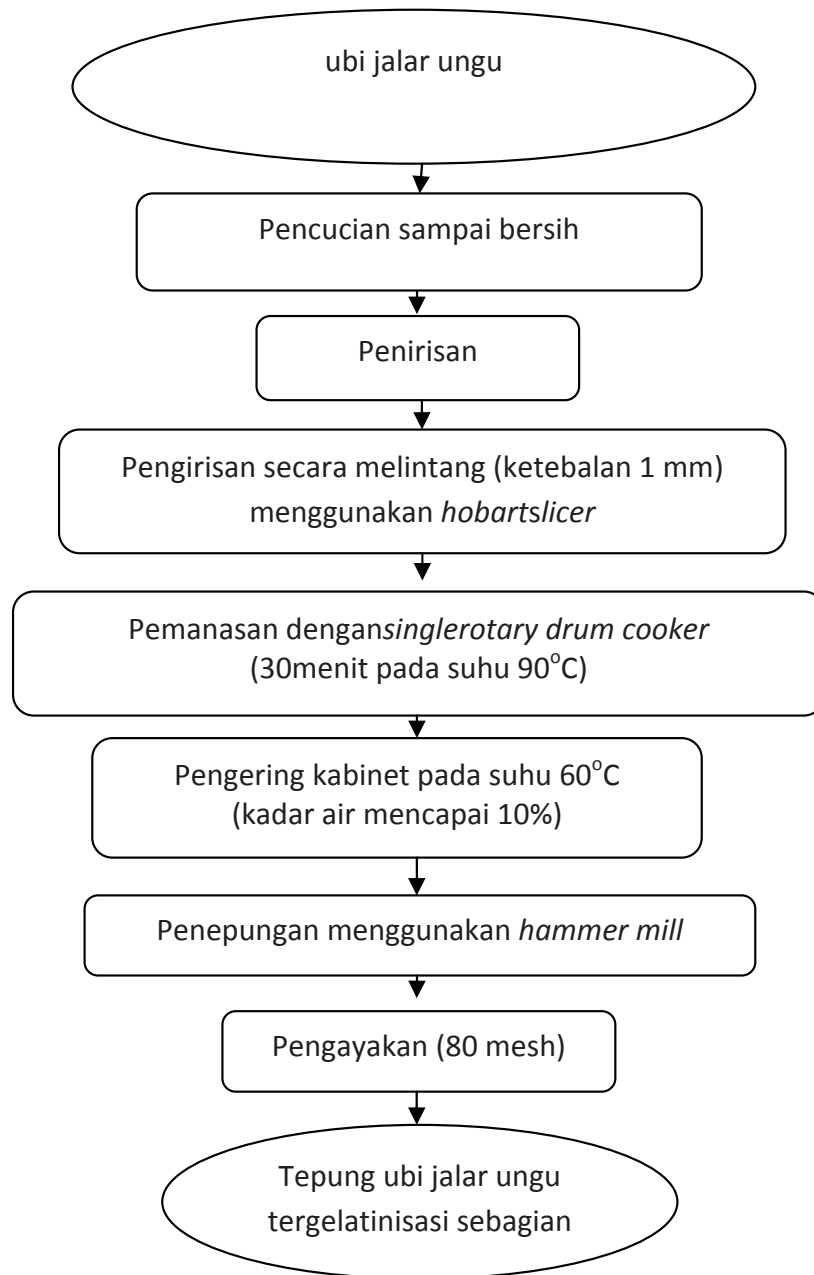
3.6 PEMANFAATAN ANTOSIANIN DAN PATI RESISTEN

Aplikasi tepung ubi jalar ungu sebagai bahan baku untuk pembuatan beras tiruan dan makanan camilan rendah kalori, rendah indeks glikemik serta mengandung antioksidan merupakan alternatif yang tepat usaha untuk meningkatkan status kesehatan masyarakat. Akan tetapi beberapa peneliti melaporkan bahwa struktur molekul dan sifat fisik pati ubi jalar alami kurang cocok digunakan sebagai bahan dasar pembuatan roti (Yadav et al., 2007). Pada umumnya perbaikan mouthfeel dari tekstur roti dapat dilakukan dengan penambahan bahan kimia yang berfungsi sebagai food aditif lain atau dengan cara modifikasi pati secara fisik maupun kimia seperti oksidasi dan crosslinking. Akan tetapi bahan-bahan kimia ini kurang menjadi pilihan

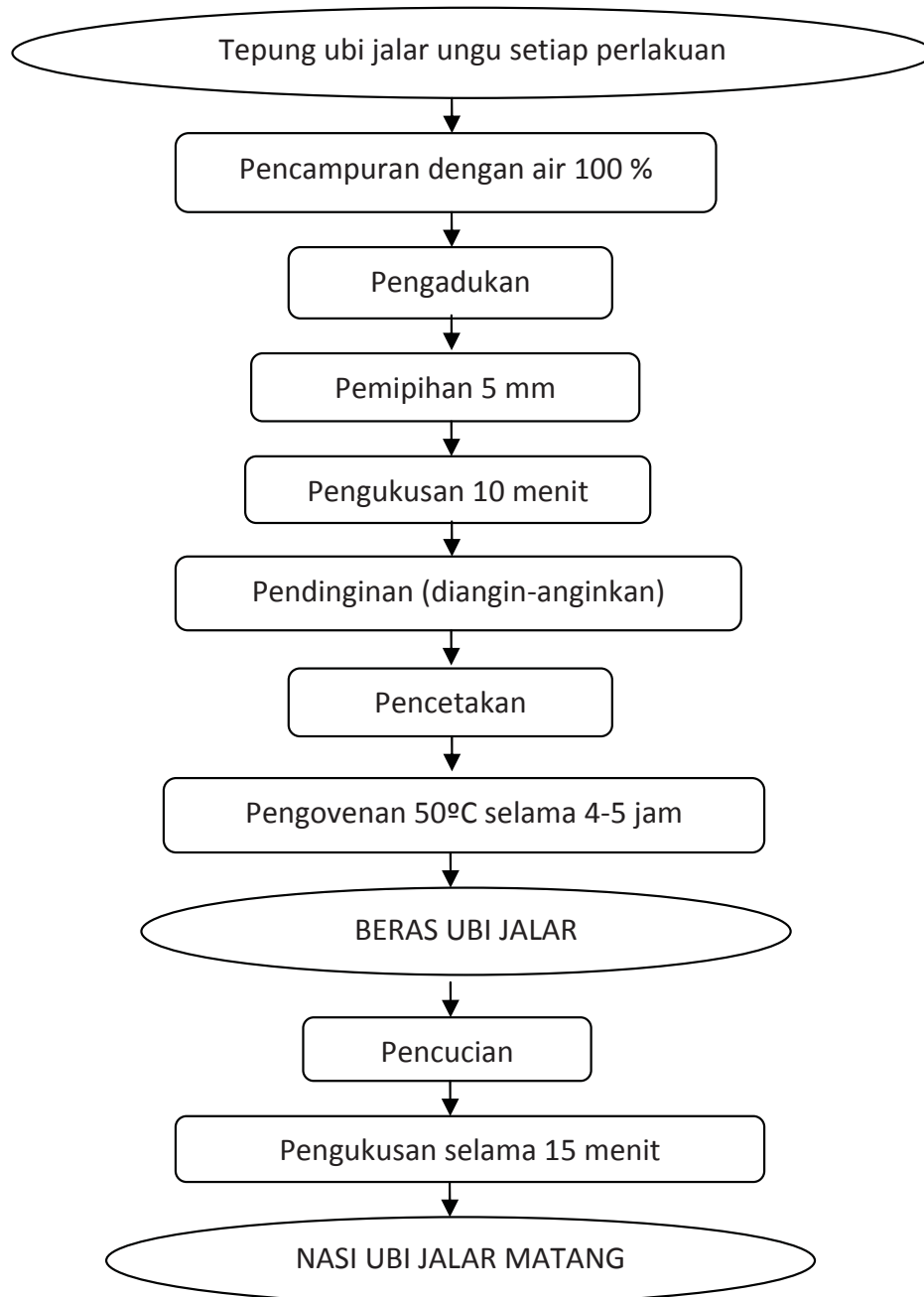
yang disukai konsumen karena potensi pengaruhnya dalam jangka panjang yang tidak baik terhadap kesehatan. Oleh karena itu perlu dicari alternatif lain yang lebih aman untuk memperbaiki kualitas tepung.

Penggunaan enzim untuk memodifikasi tepung ubi jalar juga mempunyai prospek yang baik (Yadav *et al.*, 2007) akan tetapi metode ini kurang cocok diterapkan untuk industri rumah tangga dan industri kecil karena harus dibeli dengan harga yang relatif mahal sehingga perlu dicari alternatif teknologi yang lebih sederhana. Penggunaan pengering rotary drum telah menghasilkan tepung ubi jalar ungu dengan suhu gelatinisasi, viskositas maksimum yang lebih rendah, kestabilan dan tingkat retrogradasi yang lebih tinggi, serta mampu digunakan untuk mempertahankan kandungan antosianin dan kapasitas antioksidan (Nurdjanah dan Yuliana, 2013). Tingkat retrogradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan tepung ubi jalar ungu alami mengindikasikan bahwa tepung ini mempunyai daya cerna yang lebih lambat karena pati teretrogradasi bersifat lebih kristalin sehingga lebih sulit untuk dipecah oleh enzim. Aplikasi yang dapat dikembangkan dari tepung kaya pati resisten dan mengandung antioksidan yang diproduksi dari ubi jalar ungu termodifikasi ini antara lain adalah beras tiruan instan dan makanan camilan.

Pengolahan ubi jalar ungu menjadi tepung merupakan usaha untuk memperpanjang masa simpan ubi, akan tetapi proses pembuatan tepung secara tradisional menyebabkan degradasi pigmen antosianin yang berimbas pada penampakan dan penurunan kapasitas antioksidan dari antosianin. Upaya untuk mempertahankan antosianin pada tepung ubi jalar ungu telah berhasil dilakukan dengan memodifikasi proses pengolahannya yaitu melalui proses pemanasan dalam drum berputar sebelum penepungan ubi. Pemanasan ini bertujuan untuk menggelatinisasikan sebagian pati sehingga antosianin akan terlindungi oleh granula pati yang strukturnya sudah tergelatinisasi sebagian. Hasil penelitian tentang produksi tepung ubi jalar ungu kaya antosianin, serta aplikasi tepung ubi ungu termodifikasi pada pembuatan beras instant tiruan menunjukkan bahwa beras ini setelah dimasak, memiliki skor penerimaan keseluruhan agak disukai, kadar air 9.93 %, kadar abu 0.26 %, kadar protein 2.65 %, kadar lemak 0.88 %, nilai kalori/energi 179.09 kal/g, kadar serat pangan 3.92 % dan kadar antosianin 32,81 mg/100 g (Zukryandry *et al.*, 2014). Nilai kalori ini lebih rendah apabila dibandingkan dengan kalori dari nasi putih. Diagram alir pembuatan tepung ubijalar ungu tergelatinisasi sebagian dan pembuatan beras instant tiruan dapat dilihat pada Gambar 3.3 dan 3.4, sedangkan penampakan tepung ubi jalar ungu termodifikasi sebagian dan beras instant tiruan dapat dilihat pada Gambar 3.5 dan 3.6. Beras tiruan beras rendah kalori serta mengandung antioksidan ini perlu diuji lebih lanjut secara in-vivo untuk membuktikan kemampuannya menjaga kenormalan gula darah. Kandungan kimia beras tiruan instan disajikan pada Tabel 3.1.



Gambar 3.3 Diagram alir proses pembuatan tepung ubi jalar ungu tergelatinisasi sebagian (Nurdjanah dan Yuliana,2013)



Gambar 3.4 Diagram alir proses pembuatan beras instan tiruan dari tepung ubi jalar ungu ergelatinisasi sebagian (Zukryandry et al., 2014)



Gambar 3.5 Tepung ubi jalar ungu tergelatinisasi sebagian



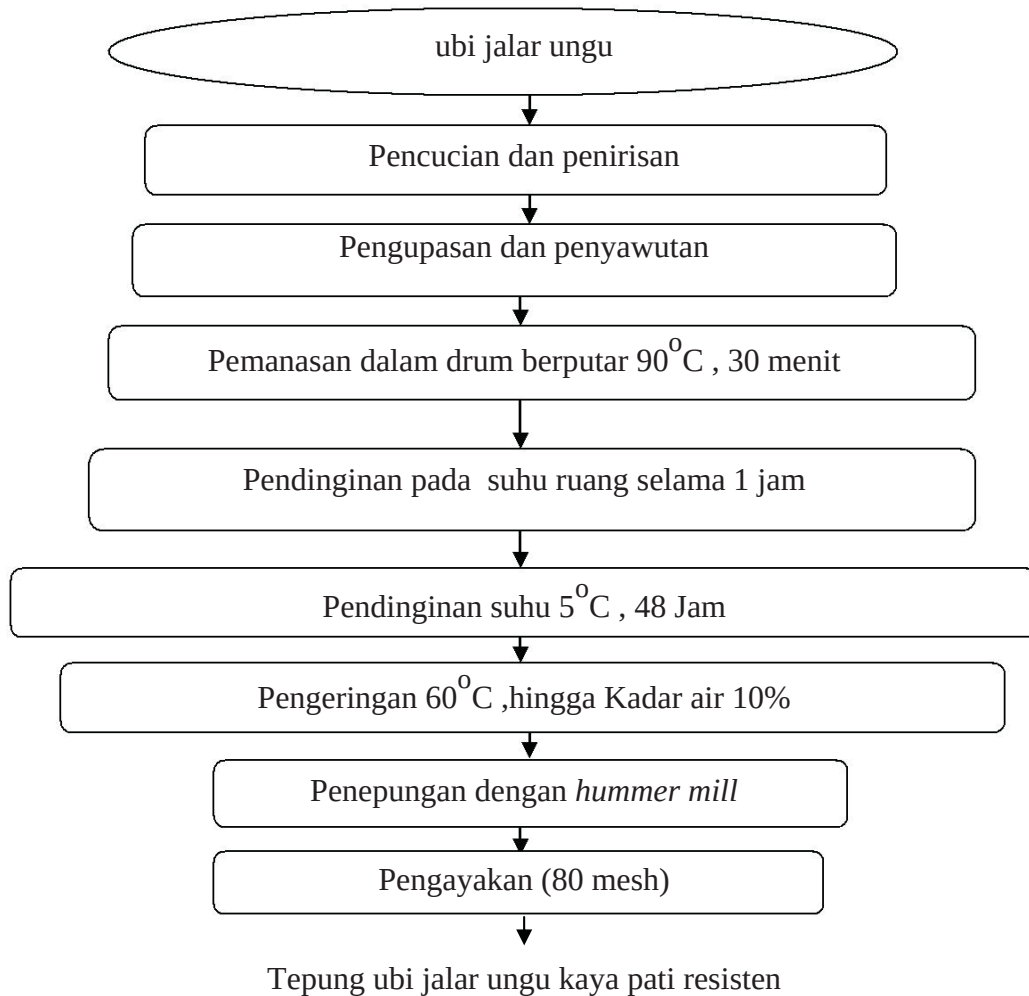
Gambar 3.6 Beras instant tiruan berbahan baku tepung ubi jalar ungu termodifikasi

Tabel 3.1. Kandungan kimia beras instant tiruan berbahan baku tepung ubi jalar ungu tergelatinisasi sebagai

Komponen	Beras Instant Tiruan*	Beras Padi **
Air (%)	9.93	13
Abu (%)	0.26	-
Protein (%)	2.65	6.8
Lemak (%)	0.88	0.7
Karbohidrat (%)	86.28	79.5

Keterangan: * Hasil penelitian; ** Kementerian Kesehatan (2008)

Penelitian lain yang tengah dikembangkan penulis beserta tim adalah produksi tepung kaya serat pangan dan mengandung antioksidan dari ubi jalar ungu. Teknik yang dilakukan untuk meningkatkan kadar serat pangan berupa pati resisten pada tepung ubi jalar ungu adalah pemanasan yang diikuti dengan pendinginan. Melalui teknik ini, amilosa pada pati yang tegelatinisasi pada saat proses pemanasan akan mengalami retrogradasi pada saat didinginkan pada suhu rendah. Pati teretrogradasi inilah yang kemudian bersifat mejadi resiten. Peningkatan pati resiten melalui teknik pemanasan dan pendinginan ini mencapai hampir 200% yaitu dari awal sekitar 18% menjadi 32%. Diagram alir pembuatan tepung kaya pati resisten dapat diliha pada Gambar 3.7.



Gambar 3.7 Diagram alir proses pembuatan tepung ubi jalar ungu kaya pati resisten (Nurdjanah dan Yuliana, 2014)

3.7 KESIMPULAN

Ubi jalar ungu dapat dijadikan sumber pangan rendah kalori yang mengandung antioksidan. Hal ini disebabkan oleh kandungan antosianin dan pati resisten yang tinggi. Antosianin, selain merupakan pigmen pewarna ungu alami, juga mempunyai berbagai manfaat fisiologis. Akan tetapi antosianin tidak stabil selama pengolahan. Ketidak stabilan antosianin tergantung dari faktor intrinsic seperti struktur kimia dan konsentrasi, dan factor ekstrinsic seperti pH, suhu, cahaya, oksigen, protein dan ion logam. Pati resisten mempunyai manfaat bagi kesehatan maupun sifat fungsional dalam ingredien suatu makanan. Sebagai serat pangan, ukuran partikel yang kecil, rasa dan aroma yang netral, telah memungkinkannya dimanfaatkan dalam berbagai bahan

pangan rendah kalori. Sebagai serat pangan, pati resisten mempunyai potensi untuk pencegahan berbagai penyakit. Makanan yang berbahan baku pati resisten mempunyai kalori dan beban kalori yang lebih rendah, Secara teknik kandungan pati resisten dapat ditingkatkan melalui berbagai cara, salah satunya yaitu melalui perlakuan pemanasan dan pendinginan berulang.

DAFTAR PUSTAKA

- AACC, The Association of Cereal Chemist. 2001. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*. 46(3):112-126
- Anonim. 2012. Dietary fiber: Essential for a healthy diet <http://www.mayoclinic.org/healthy-living/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/fiber/> Diunduh 14 April 2015
- Behall K.M., and J.C. Howe. 1996. Resistant starch as energy. *J Am Coll Nutr* 15(3):248-53.
- Bradbury, J.H., and W.D. Holloway. 1988. *Chemistry of Tropical Root Crops; Significance for Nutrition and Agriculture in the Pacific*. Australian Centre for International Agriculture Research, Canberra.
- Cummings, J.H, E.R. Beatty, S.M. Kingman, S.A. Bingham, H.N. Englyst. 1996. Digestion and physiological properties of resistant starch in human large bowel. *Br J Nutr*.75:733-47.
- Karlsen, A., L. Retterstøl, P. Laake, I. Paur, S. Kjølrsrud-Bøhn, L. Sandvik, and R. Blomhoff. 2007. Anthocyanins inhibit nuclear factor- κ B activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J.Nutr*. 137: 1951-1954.
- Englyst, K. N., S. Liu, H.N. Englyst. 2007. Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *Eur. J. Clin. Nutr*. 61:19-39
- Goni,I., L. García-Diz, E. Mañas, and F. Saura-Calixto. 1996. Analysis of resistant starch: A method for foods and food products, *Food Chem*.56: 445-449.
- Haynes L, Gimmler N, Locke JP, Mee-Ra-Kweon, Slade L, Levine H. 2000. Process for making enzyme-resistant starch for reduced-calorie flour replacer. U.S. patent 6,013,299. Jan 11, 2000. Wilmington, Del.: Nabisco Technology Co.
- Kano, M., T. Takayanagi, K. Harada, K. Makino, and F. Ishikawa. 2005. Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(5):979-988.
- Liu, Y., H. Sabboh, G. Kirchhof, and P.A. Sopade. 2010. In -vitro starch digestion and potassium release in sweet potato from Papua New Guinea. *International Journal of Food Science and Technology* 45:1925-1931.
- Liu, Y., and P.A. Sopade. 2011. Modelling starch digestion in sweet potato with biphasic digestograms. *Journal of Food Engineering* 104:307-315.

- Lunn, J., and J.L., Buttriss. 2007, Carbohydrates and dietary fibre. *Nutr. Bull.* 32, 21–64.
- Nugent AP. 2005. Health properties of resistant starch. *Br Nutr Foundation Nutr Bull*30:27–54
- Nurdjanah, S. 2011. Karakteristik serat pangan dari ampas ubi jalar, suweg dan uwi serta potensi pengembangannya dalam produk pangan. *Majalah Ilmiah Teknologi AgroIndustri.* 14(1): 12-22.
- Nurdjanah, S., J. Hook, J. Paton, and J. Paterson. 2013. Galacturonic acid content and degree of esterification of pectin from sweet potato starch residue detected using ^{13}C CP/MAS solid state NMR. *European Journal of Food Research & Review.* 3(1): 16-37.
- Nurdjanah, S., dan N. Yuliana. 2013. Produksi tepung ubi jalar ungu termodifikasi secara fisik menggunakan single drum dryer untuk produk rerotian. Laporan Penelitian Hibah Bersaing Tahun I. DIKTI
- Reader D, M.L. Johnson, P. Hollander, M. Franz. 1997. Response of resistant starch in a food bar vs. two commercially available bars in persons with type II diabetes mellitus. *Diabetes* 46(1):254A.
- Roberfroid, M., 2007. Prebiotics: the concept revisited. *J. Nutr.* 137 (3 Suppl 2): 830S–837S
- Sajilata, M. G., R. S. Singhal, and P. R. Khulkarni. 2006. Resistant starch-A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5:1-17.
- Schwartz, S.J., J. H. von Elbe, and M.M. Giusti. 2007. Colorants. In Fennema's Food Chemistry. Fourth Ed. Edited by Srinivasan Damodaran, K.L. Parkin, and O.R. Fennema. CRC Press. Boca Raton. FL. Pp. 571-638.
- Slavin, J., M. Stewart, D. Timm, and A. Hospattankar. 2009. International Association for Cereal Science and Technology (ICC), 1–3 July 2009, van der Kamp, J. W., Vienna, Austria 2009, p. 35.
- Suda, I., F. Ishikawa, F., M. Hatakeyama, M. Miyawaki, T. Kudo, K. Hirano, A. Ito, O. Yamakawa, S. Horiuchi. 2008. Intake of purple sweet potato beverage affects on serum hepatic biomarker, levels of healthy adult men with borderline hepatitis. *Euro. J. Clin. Nutr.* 62: 60-67.
- Shih, P.H., C.T. Yeh, and G.C. Yen. 2007 Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J. Agric. Food Chem.* 55:9427-9435.
- Yadav, A.R., S. Mahadevamma, R.N. Tharanatha, and R.S. Ramteke. 2007. Characteristics of acetylated and enzyme-modified potato and sweet potato flours. *Food Chemistry* 103:1119–1126
- Terahara, N., and T. Matsui. 2008. Structures and functionalities of acylated anthocyanins. *Functional Food and Health*, 9, 90–101.

- Truong, V.D., N.Deighton, R.T. Thompson, R.F. McFeeters, L.O. Dean, K.V. Pecota, G.C. Yenco. 2010. Characterization of anthocyanins and anthocyanidins in purple-flesh sweet potatoes byD/ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 58:404-410.
- Wang, L. S., and G.D. Stoner. 2008. Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269: 281–290
- Yuliana, N., dan S. Nurdjanah. 2014. Pengembangan piket ubijalar fermentasi sebagai bahan baku tepung termodifikasi : upaya mengimbangi ketergantungan terigu nasional. Laporan Penelitian Strategis Nasional. DIKTI.
- Zukryandry, S. Nurdjanah, dan N Yuliana. 2014. Sifat organoleptik beras tiruan instan berbahan baku tepung ubi jalar ungu termodifikasi secara fisik. Prosiding seminar Nasional Pengembangan Teknologi Pertanian. Politeknik Negeri Lampung. 20 Mei 2014. ISBN:978-602-70530-0-7. Halaman 561-570.

-oo0oo-

Bab 4

MANFAAT ASAM KLOGENAT KOPI ROBUSTA LAMPUNG PADA PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN SEL KANKER HEPATOSELULER TIPE Hep-G2 1886 DENGAN BIOMARKER Gen miRNA 146 A

DR. dr. Asep Sukohar, M.Kes.

Pemanfaatan obat herbal untuk mengatasi penyakit kanker memerlukan terobosan konkrit. Artinya, dibutuhkan pengembangan obat herbal yang mengacu kepada standar uji mutu, khasiat dan keamanan. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis terhadap mekanisme kerja obat herbal pada tingkat molekuler. Asam klorogenat merupakan senyawa aktif yang telah diisolasi dari tanaman kopi robusta yang didapat dari Kabupaten Pesawaran Lampung. Asam klorogenat secara invitro terbukti sebagai kemopreventif Kanker Hepatoseluler (KHS) sehingga menghambat pertumbuhan sel kanker melalui penghambatan radikal bebas dan berperan mencegah kerusakan sel. Manfaat asam klorogenat adalah sebagai antikanker adenokarsinoma kolon dan antikanker hepatoseluler. Manfaat lain asam klorogenat adalah sebagai antioksidan, antidiabetik tipe 2, membantu menurunkan berat badan dan propaoptosis. Untuk mendapatkan asam klorogenat dari kopi memerlukan teknik dan penyajian tersendiri dengan cara mengeringkan buah kopi segar, memblender dan menyeduhnya dengan menggunakan air mendidih 100°C. Metode penelitian asam klorogenat sebagai antikanker adalah dengan menggunakan metode eksperimental dengan model sel kanker hepatoseluler tipe 1886 dan sel adenokarsinoma kolon Caco2. Asam klorogenat memiliki aktifitas antikanker lebih kuat dibanding kafein, beta caroten dan quersetin. Gen miRNA 146 A digunakan sebagai biomarker keberhasilan daya hambat/bunuh asam klorogenat terhadap sel KHS. Asam klorogenat menghambat pertumbuhan sel adenokarsinoma kolon dan sel KHS secara invitro serta bermanfaat sebagai antioksidan, antidiabetik tipe 2, membantu menurunkan berat badan dan propaoptosis.

4.1 PENDAHULUAN

Kopi mengandung berbagai macam komponen senyawa aktif dengan karakteristik yang berbeda-beda dan masih banyak yang belum diketahui aktivitas biologi dan manfaatnya bagi manusia. Kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam kopi terdiri dari senyawa volatile dan non-volatile yang mempengaruhi aroma dan mutu kopi. Kandungan kopi diantaranya senyawa kafein yang merupakan alkaloid xanthin dan asam klorogenat yang termasuk golongan senyawa polifenol.

Asam klorogenat telah berhasil diisolasi dari kopi robusta Lampung dan telah dilakukan uji struktur NMR, uji Brine Shrimp Letality Test (BSLT) dan uji sitotoksitas terhadap Hep-G2. Berdasarkan uji BSLT aktifitas asam klorogenat lebih kuat dibanding dengan kafein dan uji sitotoksitas terhadap Hep-G2 lebih kuat 2 kali lipat dibanding vitamin C, karoten dan vitamin E (Sukohar *et al*, 2011).

Proses isolasi asam klorogenat dari kopi robusta berbeda dengan kopi yang biasa ditemukan sehari-hari. Asam klorogenat akan menghilang jika dipanaskan/roasting sampai dengan 200°C, sedangkan kopi yang biasa dikonsumsi setiap hari melalui proses roasting. Untuk mengisolasi asam klorogenat dari kopi secara *invitro* dilakukan melalui pengeringan alami kemudian diblender. Hasil blender kemudian dikeringkan dan dilanjutkan ke fase ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan purifikasi (Sukohar *et al*, 2011).

Jika menginginkan asam klorogenat dari kopi secara alami meskipun kadarnya rendah maka dilakukan melalui pengeringan alami, diblender dan dikeringkan kembali secara alami. Jika akan disajikan maka kopi hasil blender yang dikeringkan tadi disedup dengan air panas. Namun demikian tentu rasanya berbeda dari kopi konvensional.

Manfaat asam klorogenat antara lain menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah kerusakan DNA, protein, dan kerusakan dinding sel secara *in vitro*, menginduksi fungsi liver (enzim hidrosilase dan glukoronil transferase) pada mencit, meningkatkan fungsi liver yang lainnya (enzim katalase, glutathione peroksidase, glutathione reduktase, serum alanin aminotransferase, serum aspartat aminotransferase dan serum lipid peroksidase) khususnya pada tikus (EFSA, 2011). Selain itu asam klorogenat juga bermanfaat sebagai antioksidan, anti adenokarsinoma kolon, anti kanker hepatoseluler, membantu menurunkan berat badan, antidiabetik tipe 2, hepatoprotektif, antiobesitas dan proapoptosis (Meng *et al*, 2013).

Kanker hepatoseluler (KHS) merupakan kanker terbanyak di dunia dengan angka kematian yang tinggi (Nita *et al*. 2002). Penyebab KHS terbanyak adalah virus hepatitis B dan C. Pengembangan karakteristik KHS banyak dilakukan *invitro* seperti yang dilakukan oleh peneliti. Karakteristik pengembangan *invitro* memerlukan keahlian khusus dengan laboratorium biologi molekuler yang memadai, sterilitas ruangan yang ketat, media kultur yang sesuai, inkubator dengan suhu yang sesuai, *Laminar Air Flow* dan peralatan pendukung lainnya yang memadai.

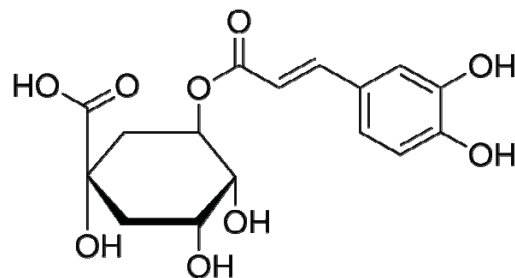
KHS bersifat ganas dan mematikan sehingga perlu metode yang dapat membantu untuk mendeteksi secara dini. Deteksi dini tersebut telah dilakukan melalui micro RNA (miRNA) 146 A sebagai biomarker. Deteksi dini dan pengembangan terapi kanker dari bahan alam asam klorogenat telah dilakukan dengan bukti bahwa asam klorogenat dapat menghambat/membunuh KHS tipe 1886 dan PLC5 dengan penurunan ekspresi miRNA 146 A (Sukohar *et al.* 2015).

MiRNA 146 A merupakan biomarker yang digunakan sebagai indikator untuk mengukur aktifitas asam klorogenat sebagai senyawa aktif KHS. Serangkaian penelitian yang telah dilakukan terbukti bahwa asam klorogenat menurunkan pertumbuhan sel KHS, menurunkan ekspresi miRNA 146 A, Cyclin D1 dan meningkatkan ekspresi caspase 3 (Sukohar dan Muhartono, 2015).

Aktifitas asam klorogenat lebih kuat dibanding dengan kafein dalam menghambat/membunuh sek KHS dan lebih lemah jika dibandingkan dengan doksorubisin (Sukohar A dan Muhartono 2015). Aktifitas antioksidan dan BSLT asam klorogenat lebih kuat jika dibandingkan dengan vitamin C, E dan beta karoten (Sukohar A *et al.*, 2011).

4.2 KARAKTERISTIK ASAM KLOROGENAT

Asam Klorogenat yang dipergunakan pada penelitian ini didapat dari Aldrich dengan nomor katalog: C₃₈₇₈. Rumus bangun asam klorogenat dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Rumus Bangun Asam Klorogenat (Anonim 2013)

Sinonim : 1,3,4,5-Tetrahydroxycyclohexanecarboxylic Acid 3-(3,4-dihydroxycinnamate)

Formula molekul : C₁₆H₁₈O₉

Sifat Kimia Asam Klorogenat

Secara struktural, asam klorogenat/CGA (chlorogenic acid) adalah ester yang terbentuk antara asam sinamat tertentu (trans) dan asam (L)-quinic (1L-1 (OH)), asam 3,4/5 tetrahydroxycyclohexanecarboxylic. Isomerisasi asam klorogenat, telah dilaporkan dengan 3 isomerisasi asam quinat di posisi 3, (3- Caffeoylquinic acid (CQA), 4 (4-Chlorogenic acid (CGA) dan 5 (5-CQA). Isomerisasi pada posisi 1 dan 6 belum dilaporkan (Stalmach *et al.* 2006).

Berat molekul asam klorogenat yakni 354 dengan purity $\geq 95\%$. Hal ini penting diketahui untuk perhitungan dosis terapi yang akan digunakan dalam perlakuan/intervensi.

Farmakokinetik dan Farmakodinamik Asam Klorogenat

Asam klorogenat diabsorpsi dalam usus diduga melalui 2 cara yaitu: 1) diabsorpsi langsung dalam bentuk asam klorogenat, 2) dihidrolisis terlebih dahulu menjadi asam kafeat dan asam quinat. Asam klorogenat dimetabolisme di dalam hati dengan metabolit asam kafeat dan asam klorogenat (Olthof *et al.* 2001). Kadar plasma maksimum asam klorogenat pada tikus ditemukan 0,55 jam setelah pemberian oral dan kadarnya menghilang setelah 8 jam (Qi *et al.* 2011). Pada percobaan yang dilakukan pada tikus, kadar asam klorogenat yang diekskresikan ke dalam urin dalam jumlah 0,9-33% setelah pemberian (Qi *et al.*, 2011).

Reseptor tirosin kinase merupakan target kerja asam klorogenat yang diperantarai oleh protein G yang dikenal dengan G-Protein Couple Receptor (GPCR) yang mempunyai 3 subunit reseptor yaitu α , β , dan γ . Reseptor β adalah reseptor yang berperan dalam mengaktifasi adenilat siklase, sehingga cAMP teraktifasi dan kemudian memfosforilasi protein serine (MAPKKK) menjadi treonin (MAPK) yang selanjutnya mengaktifkan c-Fos- c-Jun, mengaktifkan CDK4 dan 6 dan diakhiri dengan penghambatan fase G1 ke S (Boyle, 2008).

Isolasi dan Pemurnian Senyawa Asam Klorogenat

Asam klorogenat hasil analisis fraksi dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) hanya dapat dilihat pada biji kopi yang tidak disangrai (non-roasting) yang tampak pada gambar 2 (Sukohar *et al.*, 2011a). Senyawa asam klorogenat berada pada fraksi air karena sifatnya yang polar dan memiliki 3 isomer. Isomer ialah molekul-molekul dengan rumus kimia yang sama (sering dengan jenis ikatan yang sama), namun memiliki susunan atom yang berbeda. Kebanyakan isomer memiliki sifat kimia yang mirip satu sama lain. Pola noda hasil KLT ketiga isomer itu pun saling berdekatan, sehingga perlu dilakukan pemisahan berulang. Pemurnian senyawa asam klorogenat menggunakan metode kromatografi kolom dengan sistem pelarut isokratis dan KLT preparatif untuk memisahkan isomer-isomer dari senyawa asam klorogenat dan diperoleh 2 isomer asam klorogenat dengan massa masing-masing sebesar 4,5 dan 3,1 mg (Gambar 4.3) (Sukohar, 2011a).

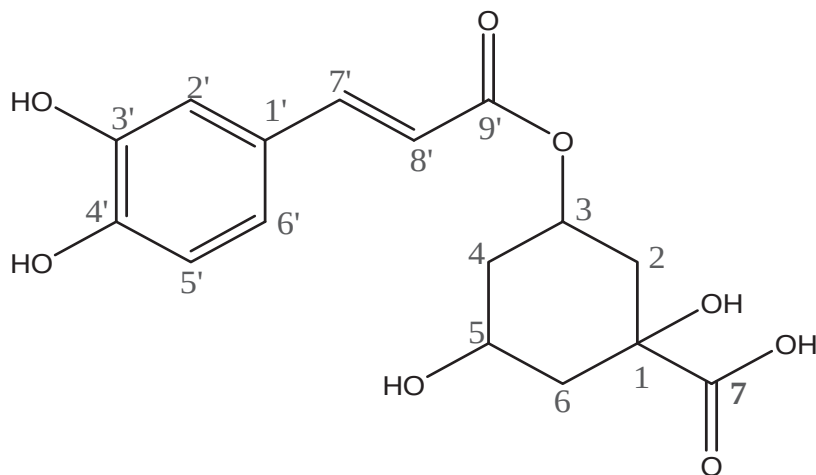
Pada Gambar 4.2, fraksi air (1,70 g) dipisahkan dan dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom terbuka fasa diam ODS dengan pelarut bergradien 10% (v/v) metanol-air dan diperoleh 11 fraksi. Fraksi H₂O-2 hasil kromatografi kolom dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi kolom isokratis dengan silika ODS (H₂O) dan diperoleh 60 fraksi. Pola noda dari fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis dengan menggunakan metode KLT (Sukohar, 2011a).



Gambar 4.2 Kromatogram KLT dengan pelarut *n*-heksana-aseton (3.2) (Sukohar et al. 2011)

Tabel 4.1 Perbandingan spektrum ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR asam klorogenat hasil isolasi dan asam klorogenat standar

No	Asam klorogenat hasil isolasi		Asam klorogenat standar	
	δ C-NMR	δ H-NMR	δ C-NMR	δ H-NMR
1	76,21	-	69,2	-
2	38,85	2,21 (m)	39,2	2,42 (m), 1,92 (m)
3	72,06	5,33 (m)	73,3	5,08 (m)
4	73,55	3,72 (dd, $J = 4,2$; 1,6 Hz)	74,0	3,68 (dd, $J = 9,6$; 3,2 Hz)
5	71,06	4,16 (d, $J = 8,0$ Hz)	71,9	4,11 (m)
6	38,29	2,05 (m)	38,3	2,02 (m), 1,98 (m)
7	177,12	-	176,8	-
1'	127,87	-	126,2	-
2'	115,33	7,04 (d, $J = 0,9$ Hz)	115,4	7,00 (d, $J = 2,0$ Hz)
3'	147,16	-	146,3	-
4'	149,66	-	149,1	-
5'	116,55	6,77 (d, $J = 3,8$ Hz)	116,5	6,70 (d, $J = 8,0$ Hz)
6'	123,07	6,94 (dd, $J = 3,8$ 0,8 Hz)	121,9	6,91 (dd, $J = 8,0$; 2,0 Hz)
7'	146,88	7,55 (d, $J = 7,7$ Hz)	145,3	7,38 (d, $J = 15,6$ Hz)
8'	115,26	6,25 (d, $J = 7,7$ Hz)	115,2	6,16 (d, $J = 15,6$ Hz)
9'	168,74	-	166,9	-



Gambar 4.3 Dugaan Struktur Isolat yaitu Asam Klorogenat (Sukohar *et al*, 2011)

Gambar 4.3 dan Tabel 4.1, menjelaskan bahwa isolat murni berwarna putih dengan IR v_{maks} . dengan lempeng KBr (cm^{-1}): 3359 (Lebar, regang OH), 1765 (regang C=O), 1591 | (Regang O-C-O ester), 1514 (Regang O-C-O karboksilat), 1460 (ikatan C-H) dan 1266 (Ikatan C-C). 1H -NMR (500 MHz, D_2O) : δ 7,55 (d, $J = 7,7$ Hz, H-7'); 7,55 (d, $J = 0,9$ Hz, H-2'); 6,94 (dd, $J = 3,88, 0,87$ Hz, H-6'); 6,77 (d, $J = 3,8$ Hz); 6,25 (d, $J = 7,7$ Hz H-8'); 5,33 (m, H-3); 4,16 (m, H-5); 3,72 (dd, $J = 4,22; 1,62$ Hz, H-4); 2,21 (m, H-2); dan 2,05 (m, H-6). ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) : δ 177,12 (C-7); 168,74 (C-9'); 149,66 (C-4'); 147,16 (C-3'); 146,88 (C-7'); 127,87 (C-1'); 123,07 (C-6'); 116,55 (C-5'), 115,33 (C-5'), 115,25 (C-8'), 76,21 (C-1), 73,55 (C-4), 72,06 (C-3), 71,37 (C-3), 38,85 (C-2) dan 38,29 (C-6). Serta dibuktikan dengan perbandingan terhadap asam klorogenat standar (Shoeb *et al*. 2007).

Uji Sitoksisitas

Uji sitotoksik asam klorogenat terhadap larva udang memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai mortalitas 100% pada konsentrasi 100, 300 dan 1000 ppm dan mortalitas terkecil 70% pada konsentrasi 10 ppm. Sebagai pembanding dilakukan uji sitotoksik kafein yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap larva udang dengan nilai mortalitas 100% pada 1000 ppm sedangkan mortalitas terkecil 60% pada konsentrasi 10 ppm (Sukohar A *et al*, 2011).

Uji Antioksidan

Metode uji antioksidan yang dilakukan dengan menggunakan (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH. Peneliti membandingkan uji DPPH asam klorogenat dengan kafein dengan perbandingan nilai inhibitory concentration (IC_{50}) berdasarkan uji DPPH asam klorogenat dengan kafein adalah 5,86: 21,41 ppm dengan persamaan linier untuk asam klorogenat: $y = 7.325x + 7.0991$ dengan $R^2 = 0.9919$ (Sukohar *et al*, 2011).

4.3 MANFAAT ASAM KLOROGENAT

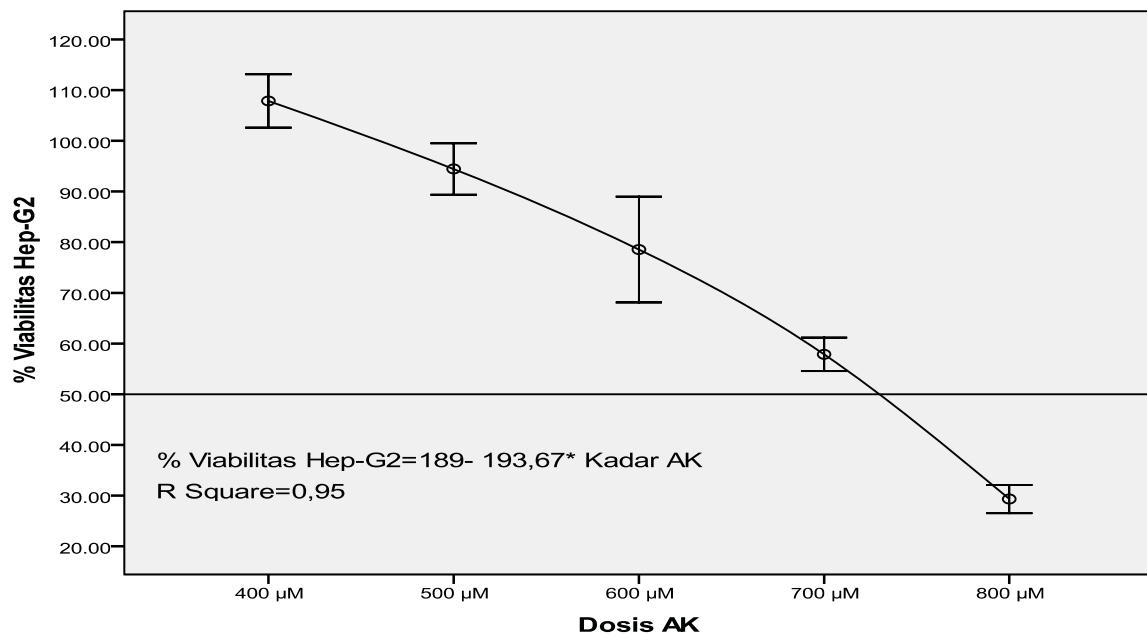
Senyawa aktif antikanker yang berasal dari bahan alam, telah banyak dibicarakan dalam publikasi, baik nasional maupun internasional. Senyawa tersebut antara lain adalah asam klorogenat. Asam klorogenat dapat diisolasi dari kopi robusta dengan kandungan sekitar 4%. Berbagai penelitian menunjukkan bahwa asam klorogenat mampu menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah kerusakan DNA, protein, dan kerusakan dinding sel secara *in vitro*, menginduksi fungsi liver (enzim hidroksilase dan glukoronil transferase) pada mencit, dan meningkatkan fungsi berbagai enzim liver (enzim katalase, glutathione peroksidase, glutathione reduktase, serum alanin aminotransferase, serum aspartat aminotransferase, dan serum lipid peroksidase), khususnya pada tikus (Meng *et al*, 2013). Selain 4 manfaat di atas asam klorogenat juga memiliki khasiat lainnya yaitu sebagai antioksidan, anti adenokarsinoma kolon dan kanker hepatoseluler *in vitro*, membantu menurunkan berat badan, antidiabetik tipe 2, antiobesitas dan sebagai proapoptosis (Sukohar, 2013).

Antioksidan dan antikanker

Antioksidan adalah molekul yang dapat memperlambat atau mencegah reaksi oksidasi zat kimia lainnya. Oksidasi adalah reaksi kimia redoks yang memindahkan elektron dari suatu zat kepada oxidizing agent. Reaksi oksidasi tersebut, dapat mengakibatkan timbulnya radikal bebas dan dapat menimbulkan reaksi berantai yang berbahaya. Antioksidan dapat menghentikan reaksi rantai tersebut, dengan menghilangkan zat radikal dan menghambat reaksi oksidasi lainnya dengan mengoksidasi sendiri zat-zat tersebut. Oleh karena itu, sebagian besar zat antioksidan disebut reducing agents seperti thiol atau Phenol. Antioksidan dapat diproduksi di dalam tubuh atau didapatkan dari makanan (Panel and Nda, 2011).

Antioksidan bersifat meredam atau menetralkan radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif, dengan demikian antioksidan bersifat menghambat apoptosis. Antioksidan seperti α -tokoferol yang terdapat di dalam kompartemen lipida sel, atau N-asetilsistein, suatu peredam radikal bebas yang berada di dalam fase air sitosol, dapat memperlambat atau menghambat apoptosis, akibatnya akan memicu pertumbuhan kanker.

Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pemberian asam klorogenat menghambat/membunuh sel KHS dengan biomarker miRNA 146 A, cyclin D1 dan caspase 3. Pengaruh asam klorogenat menurunkan ekspresi gen miRNA 146 A dan cyclin D1 serta meningkatkan ekspresi gen caspase 3. Dengan menggunakan model sel KHS secara *in vitro* maka kematian sel dihitung dengan menggunakan metode MTT dan didapat IC_{50} 727 μ M (Sukohar, 2015). Gambar 4, memberikan informasi data bahwa 5 titik konsentrasi/dosis asam klorogenat dan hasil analisis statistik, didapat nilai IC_{50} asam klorogenat pada konsentrasi 727 μ M.



Gambar 4.4. Presentase Hep-G2 yang hidup dan Persamaan Regresi Linear IC_{50} Asam Klorogenat (Sumber: Sukohar et al, 2013)

Adenokarsinoma kolon dan KHS

Asam klorogenat efektif menghambat/membunuh pertumbuhan adenokarsinoma kolon secara invitro pada sel Caco-2. Dosis efektif 150-500 µM pada 24, 48 dan 72 jam setelah terpapar asam klorogenat (Shoeb *et al.* 2007). Sukohar *et al.* telah membuktikan bahwa asam klorogenat menghambat/membunuh pertumbuhan sel KHS tipe 1886. Dosis efektif 727 µM kurang 24 jam setelah terpapar asam klorogenat (Sukohar, 2013). Masa kerja asam klorogenat berbeda pada ke-2 jenis sel kanker tersebut. Asam klorogenat lebih cepat membunuh sel KHS dibanding sel Caco-2. Masih perlu penelitian lebih lanjut untuk dapat menjelaskan fenomena tersebut, termasuk penelitian secara *invivo* baik pada hewan (uji praklinik) maupun uji klinik pada manusia.

Membantu Menurunkan Berat Badan

Asam klorogenat dapat menurunkan berat badan melalui mekanisme kerja menghambat kerja enzim glukosa 6 phosphatase sehingga proses glikogenesis terhambat dan pada akhirnya pembentukan jaringan adiposa (lemak) tidak terjadi. Meskipun dalam penelitian tersebut tidak disebutkan berapa dosis efektif untuk menurunkan berat badan dan berapa kilogram (kg) penurunan dalam satu bulan (Thom, 2007).

Antidiabetik

Konsumsi rutin 3-4 cangkir kopi per hari dengan atau tanpa kafein yang dicampur dengan asam klorogenat menurunkan risiko diabetes mellitus tipe 2 (NIDDM). Pemberian asam klorogenat dengan dosis 5mg/kg berat badan dapat mengatasi hiperglikemia pada tikus yang diinduksi diabetes. Asam klorogenat mampu memodulasi ambilan glukosa dan membantu sekresi hormon insulin pada manusia (Meng *et al*, 2013).

Hepatoprotektif

Efek hepatoprotektif asam klorogenat telah dibuktikan pada tahun 2014. Subjek penelitian menggunakan sel KHS tipe Hep-G2 1886 dengan membandingkan jumlah sel hidup dengan sel mati pada 0, 2, 4, 8, 16 dan 24 jam dengan dosis 727 μ M (Sukohar *et al*. 2014). Penelitian lain membuktikan tentang potensi perlindungan asam klorogenat pada tikus yang diinduksi lipopolysaccharide (LPS) dan diberikan asam klorogenat dengan dosis 30 mg/kg secara intraperitoneal selama 5 hari. Tidak terjadi peningkatan SGOT dan SGPT, menurunnya ekspresi gen toll-like receptor 4 (TLR4), TNF-alpha and NF-kappaB p6 pada tikus (Xu *et al*, 2010).

Anti Obesitas

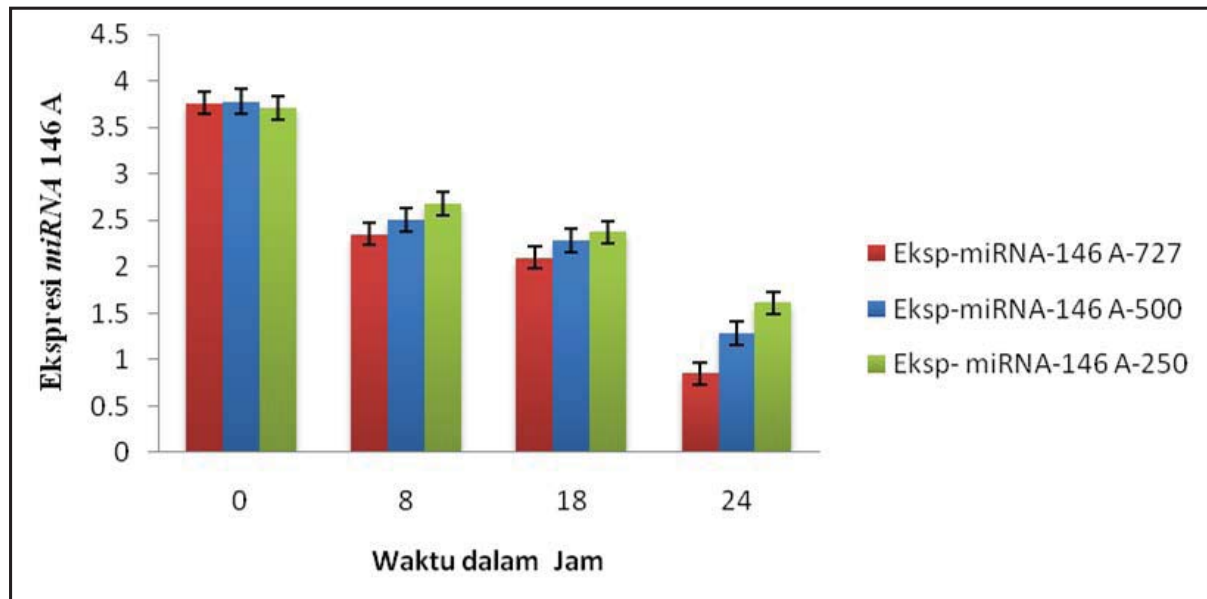
Asam klorogenat secara signifikan menghambat sintase asam lemak, asetil CoA reduktase dan Asil 3-hidroksi-3-methylglutaryl-CoA (Meng *et al*. 2013).

Proapoptosis

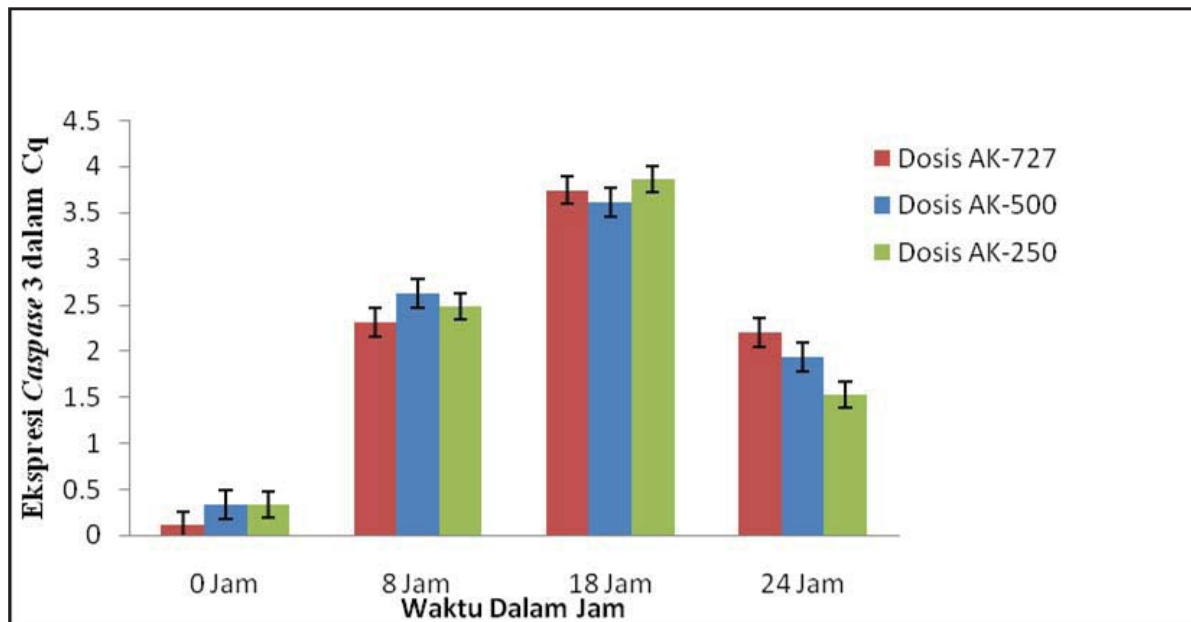
Asam klorogenat menginduksi apoptosis melalui gen caspase 3. Penelitian tersebut dilakukan oleh Sukohar *et al*. (2013) dengan membandingkan ekspresi gen miRNA 146 A, cyclin D1 dan caspase 3. Ekspresi gen miRNA 146 A dan cyclin D1 menurun, sedangkan ekspresi caspase 3 meningkat. Ketiga ekspresi gen tersebut membuktikan pengaruh asam klorogenat sebagai penginduksi apoptosis (Sukohar *et al*, 2013).

Gambar 4.5 menunjukkan ekspresi miRNA 146 A menurun dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Ekspresi miRNA 146 A terendah pada kelompok 24 jam setelah pemaparan asam klorogenat adalah pada dosis 727 μ M (0,85), kemudian ekspresi meningkat pada dosis 500 μ M (1,28) dan ekspresi tertinggi pada dosis 250 μ M (1,61).

Gambar 4.6 memperlihatkan ekspresi caspase 3 tertinggi pada kelompok 18 jam setelah pemaparan asam klorogenat pada dosis 250 μ M dengan nilai ekspresi 3,86. Setelah 18 jam ekspresi caspase 3 kembalimenurun. Jika dibandingkan dengan ekspresi caspase 3 pada jam ke-8, 18 dan 24 maka ekspresi caspase 3 terendah terdapat pada kelompok 24 jam, setelah pemaparan pada dosis 250 μ M (1,52).



Gambar 4.5 Ekspresi MiRNA 146 A Berdasarkan Dosis Asam Klorogenat 727, 500, 250 µM terhadap Waktu 0, 8, 18 dan 24 Jam (Sukohar et al, 2013)



Gambar 4.6 Ekspresi Caspase 3 Berdasarkan Dosis Asam Klorogenat 727, 500, 250 µM terhadap Waktu 0, 8, 18 dan 24 Jam (Sukohar et al, 2013)

Setelah pemaparan asam klorogenat 727 μM pada Tabel 4.2, memberikan gambaran bahwa terjadi peningkatan kematian jumlah Hep-G2 dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian 40,86% terjadi pada 0-8 jam, 59,37% terjadi pada 0-18 jam dan peningkatan kematian Hep-G2 72,16% terjadi pada 0-24 jam.

Tabel 4.2 Persentasi Kematian Sel Hep-G2 Sebelum dan Sesudah Pemaparan Asam Klorogenat 727, 500, dan 250 μM Berdasarkan PewarnaanMethylen Blue

Jumlah Hep-G2	0Jam	8 Jam Sebelum pemaparan	8 jam Sesudah pemaparan	18 Jam Sebelum pemaparan	18 jam Sesudah pemaparan	24 Jam Sebelum pemaparan	24 Jam Sesudah pemaparan
SD* 727 μM	2,52	11,53	5,03	11,53	9,07	6,08	2,08
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	54,14%	95%	35,53%	94%	21,84%
Jumlah Sel mati	0%		40,86%		59,37%		72,16%
SD* 500 μM	2,52	11,53	9,07	11,53	7	6,08	4,93
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	57,25%	95%	38,52%	94%	24,63%
Jumlah Sel mati	0%		37,75%		56,48%		69,37%
SD* 250 μM	2,52	11,53	7	11,53	3,21	6,08	2,52
Persentase Jumlah Sel	0%	95%	59,32%	95%	40,44%	94%	26,27%
Jumlah Sel mati	0%		35,68%		54,56%		67,73%

*SD=standar deviasi; Sumber: Sukohar, *et al.*, 2013)

Dosis AK 500 μM pada Tabel 2, memberikan gambaran bahwa terjadi peningkatan kematian jumlah Hep-G2 dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian sebesar 37,75% terjadi pada 0-8 jam, 56,48% terjadi pada 0-18 jam dan 69,37% terjadi pada 0-24 jam. Dosis AK 250 μM pada tabel 2, memberikan gambaran terjadi peningkatan kematian jumlah Hep-G2 dari 0 jam sampai dengan 24 jam. Peningkatan kematian sebesar 35,68% terjadi pada 0-8 jam, 54,56% terjadi pada 0-18 jam, dan peningkatan kematian Hep-G2 67,73% terjadi pada 0-24 jam.

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa asam klorogenat sangat kuat berperan terhadap kematian sel Hep-G2 dengan koefisien determinan $R^2 0,958$. Asam klorogenat juga sangat kuat berperan pada penurunan ekspresi gen miRNA 146 A dengan koefisien determinan $R^2 0,924$. Asam klorogenat sangat kuat berperan terhadap kenaikan ekspresi caspase 3 dengan koefisien determinan $R^2 0,946$ dan berdasarkan nilai adjusted r square 89,3%. Demikian juga asam klorogenat, sangat kuat berperan terhadap penurunan ekspresi cyclin D1 dengan koefisien determinan $R^2 0,934$. Berdasarkan nilai adjusted R square 74,6% penurunan ekspresi cyclin D1 disebabkan oleh asam klorogenat.

Tabel 4.3. Peran Asam Klorogenat terhadap MiRNA 146 A, Caspase 3, Cyclin D1 dan Kematian Sel Hep-G2

	R	R Square	Adjusted R Square	Durbin - Watson
Peran AK vs Kematian Hep-G2	0,958	0,918	0,837	2,13
Peran AK vs miRNA 146 A	0,924	0,853	0,707	1,566
Peran AK vs caspase 3	0,973	0,946	0,893	1,894
Peran AK vs cyclin D1	0,934	0,873	0,746	2,14

Keterangan: Nilai R² dihitung berdasarkan ujiregresi linier berganda (Sukohar, et al., 2013)

4.4 KESIMPULAN

Asam klorogenat bersifat toksik terhadap sel kanker KHS secara invitro dengan nilai IC₅₀=727 µM. Asam klorogenat berkhasiat sebagai antioksidan, hepatoprotektif, antidiabetik tipe 2, anti-obesitas, anti kanker hepatoseluler, anti adenokarsinoma kolon, membantu menurunkan berat badan dan pro apoptosis. Untuk mendapatkan manfaat asam klorogenat dari kopi dapat dilakukan dengan cara mengeringkan buah kopi, memblender dan menyeduhnya dengan menggunakan air panas 100°C.

DAFTAR PUSTAKA

- (EFSA), E.F.S.A., 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coffee, including chlorogenic acids from coffee, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1099, 3152, 4301), maintenance of normal blood glucose concen., 9(4), pp.1-23.
- Anon, 2013. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c3878?lang=en®ion=ID>. Available at: <https://www.mendeley.com/import/> [Accessed May 23, 2015].
- Asep Sukohar, Hening Herawati, Arief B Witarto, Setiawan, Firman F Wirakusumah, H.S.S., 2013. ROLE OF CHLOROGENIC ACID FROM LAMPUNG ROBUSTA COFFEE AGAINST GENE EXPRESSION OF MIRNA 146 A ON HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS., 2(6), pp.478-484.
- Asep Sukohar, Setiawan, Firman F Wirakusumah, H.S.S., 2011a. ISOLATION AND CHARACTERIZATION CYTOTOXIC COMPOUNDS CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID ISOLASI dan KARAKTERISASI., 1(4), pp.11-26.
- Asep Sukohar, Setiawan, Firman F Wirakusumah, H.S.S., 2011b. ISOLATION AND CHARACTERIZATION CYTOTOXIC COMPOUNDS CAFFEINE AND CHLOROGENIC ACID ISOLASI SEEDS OF LAMPUNG COFFEE ROBUSTA., 1(4), pp.11-26.

- Boyle, J., 2008. Molecular biology of the cell, 5th edition by B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200807000-00020> \n<http://doi.wiley.com/10.1002/bmb.20192>.
- Meng, S. *et al.*, 2013. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp.1-12.
- Nita, M.E. *et al.*, 2002. REVIEW: MOLECULAR ASPECT OF HEPATIC CARCINOGENESIS., 44(1), pp.39-48.
- Olthof, M.R., Hollman, P.C. & Katan, M.B., 2001. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. *The Journal of nutrition*, 131(1), pp.66-71.
- Panel, E. and Nda, A., 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to coffee, including chlorogenic acids from coffee, and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 1099, 3152, 4301), maintenance of normal blood glucose concen., 9(1924).
- Qi, W. *et al.*, 2011. Comparative pharmacokinetics of chlorogenic acid after oral administration in rats. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1(4), pp.270-274. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2011.09.006>.
- Shoeb, M. *et al.*, 2007. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). *Journal of Natural Medicines*, 61(2), pp.164-169.
- Stalmach, A. *et al.*, 2006. On-line HPLC analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in brewed, paper-filtered coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), pp.253-262.
- Sukohar, A. *et al.*, 2015. Comparison Of Genes Expression; MIRNA 146 A, MIR-103, MIR-423-3P, MIR-21, MIR-16 IN CELL LINES HEP-G2 SERIES 1886 AND PLC5., 7(2).
- Sukohar, A. *et al.*, 2014. MIR-423-3P Used As Reference Gene For Mirna 146 A In Cell Lines HEP-G2. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(8), pp.6-9.
- Sukohar, A. 2015. Comparative effects of chlorogenic acid and doxorubic in against expression of caspase3 in cell lines Hep-G2., 7(1), pp.187-192.
- Thom, E., 2007. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. *The Journal of international medical research*, 35(6), pp.900-908.
- Xu, Y. *et al.*, 2010. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflammation Research*, 59(10), pp.871-877.

Bab 5

PERAN TEPUNG KEDELAI KAYA ISOFLAVON PADA FERTILITAS TIKUS JANTAN

DR. Ir. Sussi Astuti, M.Si.

Konsumsi pangan alami yang mengandung antioksidan akan memberikan pengaruh positif bagi kesehatan apabila dikonsumsi secara teratur pada dosis yang efektif. Senyawa aktif yang terkandung dalam kedelai adalah isoflavon. Isoflavon kedelai dikenal sebagai fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Sebagai antioksidan, isoflavon memiliki kemampuan untuk melindungi sel karena perannya sebagai penangkap radikal bebas (*radical scavenger*). Sel epitel dari jaringan testis merupakan subyek dari aksi isoflavon. *Radical scavenger* membersihkan radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa dengan menekan proses oksidasi, peroksidasi lipid dan kerusakan sel spermatozoa, serta mencegah kondisi stres oksidatif sehingga mengurangi kasus infertilitas. Melalui pemberian isoflavon pada berbagai tingkatan dosis, dosis isoflavon optimum yang menghasilkan fertilitas tikus jantan terbaik adalah 1.5 mg/ekor/hari dan menyebabkan :meningkatkan berat testis, motilitas dan konsentrasi spermatozoa, serta jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis; terhambatnya pembentukan peroksidasi lipid yang diperlihatkan dengan menurunnya kadar MDA testis; aktivitas enzim SOD testis dipertahankan tetap tinggi; kandungan Cu,Zn-SOD tubuli seminiferi testis pada sel spermatosit dan spermatid awal menggunakan pengukuran teknik imunohistokimia dipertahankan tetap tinggi. Pemberian dosis isoflavon yang semakin tinggi menyebabkan peningkatan kadar hormon testosteron serum dan jumlah sel Leydig pada tikus jantan.

5.1 PENDAHULUAN

Spermatozoa membutuhkan senyawa spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species, ROS*) pada konsentrasi rendah untuk menginduksi proses kapasitasi dan reaksi akrosom (Sikka, 2004), serta berikatan dengan zona pelusida (Sanocka dan Kurpisz, 2004) sehingga proses fertilisasi dapat

berlangsung dengan baik. Pembentukan ROS secara berlebihan akan memicu stres oksidatif, berpotensi mengakibatkan toksik, dan merupakan mediator penting terhadap berkurangnya fungsi dan kualitas spermatozoa (Aitken dan Clarkson, 1987). Pembentukan ROS yang berlebih dapat dihubungkan dengan penurunan motilitas, morfologi abnormalitas, penurunan kapasitas penetrasi spermatozoa dengan oosit, serta penurunan fertilitas (Potts *et al.*, 1999).

Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kecepatan kerusakan sel akibat induksi oksigen dan turunannya (senyawa spesies oksigen reaktif/ROS). Kerusakan sel disebabkan oleh ketidakseimbangan antara pembentukan ROS dan aktivitas pertahanan antioksidan (*scavenger*). Kondisi yang berhubungan dengan stres meliputi status penyakit kronis, penuaan, terekspos toksin (Sikka *et al.*, 1995). Menurut Saleh dan Agarwal (2002), infeksi, inflamasi, serta kasus infertilitas dapat meningkatkan proses oksidasi dan menyebabkan kerusakan sel.

Spermatozoa memiliki sistem pertahanan enzimatis maupun non-enzimatis untuk menetralkan pengaruh toksik senyawa ROS pada spermatozoa, sehingga ROS hanya terdapat dalam jumlah kecil yang diperlukan untuk menjaga fungsi spermatozoa tetap normal. Antioksidan yang ditemukan dalam semen manusia meliputi antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis meliputi superoksida dismutase (SOD) untuk dismutasi radikal anion superoksida, serta katalase dan glutathione peroksidase untuk detoksifikasi H_2O_2 . Antioksidan non-enzimatis meliputi α -tokoferol, asam askorbat, asam urat, pengkelat metal transisi, transferrin, laktoferin dan seruloplasmin (Sanocka & Kurpisz 2004). Superoksida dismutase (SOD) dilaporkan merupakan garis pertahanan terdepan spermatozoa terhadap aktivasi dan toksisitas senyawa ROS (Alvarez *et al.*, 1987 diacu dalam Sikka *et al.*, 1995).

Peningkatan radikal bebas pada jaringan testis yang memproduksi spermatozoa dapat menyebabkan kerusakan membran spermatozoa, sehingga mengubah kestabilan dan fungsi membran. Integritas serta fluiditas membran yang baik diperlukan untuk berlangsungnya proses kapasitasi, reaksi akrosom serta terjadinya fusi antara membran spermatozoa dengan membran ovum sehingga fertilisasi berlangsung dengan sempurna. Kemampuan spermatozoa untuk mengadakan fertilisasi harus didukung oleh membran spermatozoa yang memiliki integritas (keutuhan) dan fluiditas (kelenturan) optimum. Penyebab utama kerusakan membran spermatozoa diduga akibat proses peroksidasi lipid pada membran yang terbentuk dari reaksi berantai antara radikal bebas dengan asam lemak tidak jenuh (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Sanocka dan Kurpisz, 2004). Di samping mengganggu stabilitas membran, peroksidasi lipid dilaporkan dapat mengacaukan aktivitas enzim membran seperti ATP-ase, sehingga mengakibatkan terganggunya regulasi kation intraseluler seperti Ca^{2+} yang memegang peranan sangat penting dalam motilitas spermatozoa (Sevanian *et al.*, 1988; Aitken *et al.*, 1993).

Menurut Sikka (2004), terdapatnya *radical scavenger* diduga akan membersihkan radikal bebas pada jaringan-jaringan yang memproduksi spermatozoa dan menstimulasi ekspresi Cu,Zn-

SOD yang dapat melindungi sel dari stres oksidatif. Bahan pangan yang mengandung antioksidan, yang berperan sebagai *scavenger* radikal bebas dilaporkan Sikka (2004) dapat menekan proses oksidasi, peroksidasi lipid dan kerusakan sel spermatozoa, serta mencegah kondisi stres oksidatif sehingga diduga dapat mengurangi kasus infertilitas. Di samping itu, konsumsi bahan pangan yang mengandung antioksidan dilaporkan juga dapat meningkatkan status antioksidan.

Kedelai merupakan sumber antioksidan alami, mengandung komponen bioaktif isoflavon, dan termasuk salah satu golongan flavonoid. Aktivitas antioksidan flavonoid ditentukan oleh jumlah dan posisi gugus hidroksil aromatik yang mampu mendonorkan ion hidrogen (Toda dan Shirataki, 1999) dan sebagai *scavenger* radikal bebas yang terbentuk selama terjadi peroksidasi lipid (Arora *et al.*, 1998; Amic *et al.*, 2002). Isoflavon kedelai dikenal sebagai fitoestrogen karena struktur molekul isoflavon kedelai mirip dengan struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan isoflavon kedelai dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen (Miksicek, 1994). Sel epitel dari jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovari dan testis merupakan subyek dari aksi isoflavon (Anderson dan Graner, 2000). Aksi biologis fitoestrogen adalah kemampuannya untuk bertindak sebagai estrogen agonis yang dapat berikatan dengan RE dan menstimulasi respon estrogen, atau bertindak sebagai estrogen antagonis yang dapat berikatan dengan RE namun menghambat respon estrogen (Helferich *et al.*, 2001; Ruggiero *et al.*, 2002). Wang dan Kurzer (1998) diacu dalam Robertson *et al.* (2002) menyatakan bahwa aksi spesifik fitoestrogen dengan keberadaan estrogen endogen tergantung pada konsentrasinya, di mana aksi agonis terlihat ketika estrogen terdapat pada konsentrasi rendah, sedangkan aksi antagonis terlihat ketika estrogen terdapat pada konsentrasi tinggi. Pendapat serupa juga dikemukakan Brzozowski *et al.* (1997), bahwa isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah.

Tepung kedelai kaya isoflavon mengandung kadar isoflavon sebesar 3%, dihasilkan dari biji kedelai tanpa proses kimia atau penambahan bahan tambahan pangan, serta mempunyai rasa dan aroma yang disukai. American Dietetic Association (ADA) menyatakan bahwa konsumsi pangan alami akan memberikan pengaruh positif bagi kesehatan apabila dikonsumsi secara teratur pada dosis yang efektif. Indiana Soybean Board (1998) menyarankan konsumsi isoflavon per hari sebesar 30-40 mg, sehingga 1-1.5 g tepung kedelai kaya isoflavon telah dapat memenuhi dosis yang direkomendasikan per hari. Sedangkan menurut Cassidy *et al.* (1994), konsentrasi isoflavon sebesar 50 mg per hari sudah cukup untuk memperoleh pengaruh klinis/biologis dalam tubuh. Tulisan ini akan menelaah peran tepung kedelai kaya isoflavon pada berbagai tingkatan dosis isoflavon terhadap fertilitas tikus jantan.

5.2 ISOFLAVON KEDELAI

Flavonoid adalah suatu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman. Isoflavon termasuk golongan flavonoid dan merupakan kelompok terbesar dalam golongan tersebut. Pada

umumnya, senyawa isoflavon terdapat dalam kacang-kacangan atau leguminosa (Harborne, 1992). Flavonoid dilaporkan Arora *et al.* (1998) dan Nijveldt *et al.* (2001) mempunyai kemampuan sebagai antioksidan dan mencegah terjadinya kerusakan akibat radikal bebas, melalui mekanisme flavonoid untuk bertindak sebagai penangkap radikal bebas secara langsung. Aktivitas antioksidan flavonoid ditentukan oleh jumlah dan posisi gugus hidroksil yang mampu mendonorkan ion hidrogen dan berperan untuk menetralkan radikal bebas (Toda dan Shirataki 1999), serta sebagai *scavenger* radikal bebas yang terbentuk selama terjadi peroksidasi lipid (Arora *et al.*, 1998; Amic *et al.*, 2002).

Kemampuan menangkap radikal bebas dari senyawa flavonoid disebabkan oleh adanya keterlibatan gugus hidroksil bebas pada cincin B untuk mendonorkan atom H dan berperan sebagai *scavenger* radikal bebas, konjugasi ikatan rangkap pada C₂-C₃ dengan gugus 4-okso pada cincin C yang berperan untuk delokalisasi elektron dan meningkatkan kapasitas *scavenging* radikal (Sugihara *et al.*, 2001; Amic *et al.*, 2002); gugus 3-hidroksil pada cincin C dan gugus 5-hidroksil pada cincin A yang terkonjugasi dengan gugus 4-okso pada cincin C (Pokorny *et al.*, 2001). Flavonoid efektif sebagai *scavenger* radikal hidroksil dan radikal peroksil (Lee *et al.*, 2004). Konfigurasi gugus hidroksil pada cincin B senyawa flavonoid dilaporkan berperan sebagai *scavenger* radikal bebas (Heim *et al.*, 2002; Sugihara *et al.*, 2001). Dikemukakan lebih lanjut bahwa gugus hidroksil pada cincin B dapat mendonorkan ion hidrogen dan mendonorkan sebuah elektron pada radikal hidroksil dan peroksil; menstabilkan radikal tersebut serta membentuk radikal flavonoid yang relatif lebih stabil. Tiga struktur penting senyawa isoflavon yang memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan sebagai penangkap radikal bebas adalah struktur o-dihidroksil pada cincin B; konjugasi ikatan rangkap C₂-C₃ dengan gugus 4-okso pada cincin C; serta meta 5,7-dihidroksil pada cincin A (Saija *et al.*, 1995; Oteiza *et al.*, 2005).

Sebagian besar isoflavon dalam kedelai atau produk olahan kedelai terdapat dalam bentuk glikosida seperti genistin, daidzin dan glisitin yang berkonjugasi dengan mengikat satu molekul gula. Ketika produk kedelai dikonsumsi, bentuk glikosida isoflavon didegradasi menjadi senyawa aglikon dalam bentuk bebas yang dihasilkan oleh pelepasan glukosa dari glikosida. Proses degradasi glikosida menjadi aglikon seperti genistein, daidzein dan glisitein dikatalis oleh enzim glukosidase dalam usus halus (Matsuura dan Obata, 1993). Isoflavon dalam bentuk aglikon lebih mudah diserap oleh usus halus sebagai bagian dari misel yang dibentuk oleh empedu. Sirkulasi isoflavon dalam darah bersifat kompleks, karena sebagian larut lemak dan sebagian berikatan dengan protein dengan kekuatan yang lemah. Isoflavon kemungkinan didistribusikan melalui darah ke hati, atau didaur ulang sebagai bagian dari cairan empedu dan sirkulasi enterohepatik. Ekskresi akhir isoflavon terjadi pada feses dan urin (Schmidl dan Labuza, 2000).

Isoflavon sering disebut sebagai fitoestrogen atau estrogen nabati karena mempunyai struktur hampir sama dengan estrogen, dan memiliki kemampuan untuk berikatan dengan reseptor estrogen. Reseptor estrogen berikatan secara tepat dengan estrogen untuk mengawali respon pada jaringan reproduksi dan jaringan lainnya (Schmidl dan Labuza, 2000). Sel epitel dari

jaringan reproduksi seperti kelenjar susu, ovarium dan testis merupakan subyek dari aksi isoflavon (Anderson dan Graner, 2000).

5.3 ESTROGEN PADA HEWAN JANTAN

Menurut Kuiper *et al.* (1997), estrogen dilaporkan mempengaruhi pertumbuhan, diferensiasi dan fungsi dari beberapa jaringan target seperti jaringan pada sistem reproduksi, kelenjar susu, uterus dan ovarium pada betina, serta testis dan prostat pada jantan. Sebagian besar estrogen diproduksi dalam ovarium dan testis. Estrogen bekerja dengan membentuk suatu kompleks dengan protein yang dinamakan sebagai reseptor estrogen (RE). Kompleks ini meletakkan diri pada suatu tempat, pada gen tertentu dalam inti sel, dan menyebabkan sel memperbanyak diri (proliferasi) atau menyebabkan proses diferensiasi dan membentuk sel khusus. Awalnya, hanya satu jenis RE yang dikenal yaitu RE α , namun akhirnya ditemukan jenis lain yaitu RE β (Kuiper *et al.*, 1996).

Terdapat perbedaan distribusi jaringan dan afinitas *ligand binding* dari RE α dan RE β , sehingga menjelaskan aksi selektif dari estrogen pada jaringan yang berbeda. Hasil pengamatan Kuiper *et al.* (1997) terhadap distribusi RE α dan RE β menunjukkan bahwa ekspresi RE β tertinggi ditemukan pada ovarium dan prostat, ekspresi RE β moderat pada testis, uterus, kandung kemih, dan paru-paru, sedangkan ekspresi RE β terendah pada kelenjar pituitari, epididimis, timus, dan otak. Hasil pengamatan terhadap ekspresi RE α tertinggi terlihat pada epididimis, testis, kelenjar pituitari, uterus, ginjal dan adrenal, dimana ekspresi RE β memperlihatkan ekspresi moderat atau tidak terlihat.

Dalam aliran darah sebagian estrogen berikatan dengan protein SHBG (*SexHormone Binding Globulin*), sedangkan estrogen dalam plasma yang bebas hanya 2%. Estrogen dalam bentuk bebas (tidak terikat) mampu menembus sel dan aktif secara biologis. Estrogen merupakan senyawa steroid yang mampu mengubah aktifitas biologis sel melalui pengikatannya dengan reseptor estrogen yang sebagian terdapat dalam membran plasma dan inti sel. Potensi estrogen sangat bergantung pada afinitasnya terhadap reseptor estrogen, lamanya berikatan dengan reseptor dan banyaknya hormon bebas yang dapat menembus membran sel. Estrogen sangat larut dalam lemak, oleh sebab itu mudah menembus membran sel, selanjutnya berikatan dengan RE yang sebagian terdapat dalam membran plasma membentuk kompleks ligand-reseptor. Kompleks ligand-reseptor kemudian berdifusi masuk ke dalam inti sel dan berikatan dengan DNA. Ikatan ligand-reseptor-DNA kemudian mengawali transkripsi gen mRNA, selanjutnya mensintesis protein spesifik yang mempunyai pengaruh fisiologis pada jaringan target (Ruggiero *et al.*, 2002).

Menurut Nagata *et al.* (1998), isoflavon mampu menginduksi RE meskipun tidak sekuat estrogen endogen. Senyawa tersebut menempati sisi aktif RE dan menguncinya, sehingga estrogen endogen tidak dapat berikatan dengan RE. Dalam hal ini, isoflavon menggantikan fungsi estrogen dan mengendalikan aktivitasnya. Pengaruh fitoestrogen tergantung pada respon yang ter-

jadi, yaitu bersifat agonis atau antagonis terhadap kerja reseptor estrogen dalam sel target (Helferich *et al.*, 2001). Dilaporkan bahwa aksi biologis fitoestrogen sebagai estrogen agonis adalah berikatan dengan RE dan menstimulasi (memacu) respon estrogen, sedangkan aksi sebagai estrogen antagonis adalah berikatan dengan RE, namun menghambat respon estrogen. Menurut Brzozowski *et al.* (1997); Wang dan Kurzer (1998) diacu dalam Robertson *et al.* (2002), isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah.

Biosintesis estrogen dikatalis oleh sitokrom P450 aromatase. Walaupun estrogen diproduksi dalam jumlah kecil pada testis, namun estrogen dilaporkan berperan penting pada sistem reproduksi jantan (Revelli *et al.*, 1998) dan spermatozoa (Luconi *et al.*, 2001). Konsentrasi estrogen dalam aliran darah pada jantan umumnya rendah dengan kisaran 2-180 pg/ml, tergantung masing-masing spesies. Estrogen juga ditemukan dalam semen dan tergantung spesies, dengan konsentrasi estrogen berkisar antara 14-900 pg/ml (Hess, 2003). Ekspresi RE- β ditemukan pada sel benih (Hess, 2003), serta sel Leydig dan sel Sertoli (Sharpe, 1998; Carreau *et al.*, 1999).

Aktivitas aromatase, yaitu enzim yang mengkonversi androgen menjadi estrogen pada rodensia ditemukan dalam sel Sertoli (O'Donnell *et al.*, 2001), serta sel Leydig dan sel germinal, yaitu di daerah badan Golgi pada spermatid awal dan pada flagella spermatid akhir (Nitta *et al.*, 1993). Lebih lanjut Nitta *et al.* (1993) melaporkan bahwa penghambatan aktivitas aromatase menurunkan pematangan spermatid pada tubuli seminiferi testis tikus, sehingga diduga bahwa estrogen berperan penting dalam mengontrol spermatogenesis. Robertson *et al.* (1999) diacu dalam Adeoya-Osiguwa *et al.* (2003) menyatakan bahwa defisiensi aromatase pada mencit menyebabkan tertahannya proses awal spermiogenesis.

5.4 PENGARUH PEMBERIAN TEPUNG KEDELAI KAYA ISOFLAVON PADA BERBAGAI TINGKATAN DOSIS ISOFLAVON TERHADAP FERTILITAS TIKUS JANTAN

Telah dilakukan pengamatan terhadap fertilitas tikus jantan akibat pemberian tepung kedelai kaya isoflavon pada berbagai tingkatan dosis isoflavon. Pengamatan terhadap fertilitas tikus jantan meliputi kualitas spermatozoa (Astuti, 2009); kadar hormon testosteron serum, jumlah sel Leydig dan jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis (Astuti dan Sutyarso, 2010); serta kadar peroksida lipid (Malonaldehid/MDA) testis, aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis, dan profil Cu, Zn-SOD tubuli seminiferi testis tikus (Astuti *et al.*, 2009). Sebelum perlakuan ke hewan model, tepung kedelai kaya isoflavon yang digunakan sebagai bahan utama perlakuan dihilangkan lemaknya melalui ekstraksi dengan menggunakan pelarut n-heksana, sehingga diperoleh tepung kedelai kaya isoflavon rendah lemak (TKI-RL) (Astuti, 2008). Tikus mendapat perlakuan cekok TKI-RL pada dosis isoflavon (IF) 1.5 mg/ekor/hari, 3 mg/ekor/hari, 4.5 mg/ekor/hari, dan 6 mg/ekor/hari selama 2 bulan, dan dibandingkan dengan kelompok tikus yang mendapat cekok aquadest (kontrol). Pengamatan terhadap kualitas spermatozoa tikus meliputi

motilitas spermatozoa, konsentrasi spermatozoa, abnormalitas spermatozoa dan butiran sitoplasma, serta berat relatif testis akibat pemberian TKI-RL. Kualitas spermatozoa akibat perlakuan variasi dosis isoflavon dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Rataan kualitas spermatozoa tikus setelah 2 bulan perlakuan

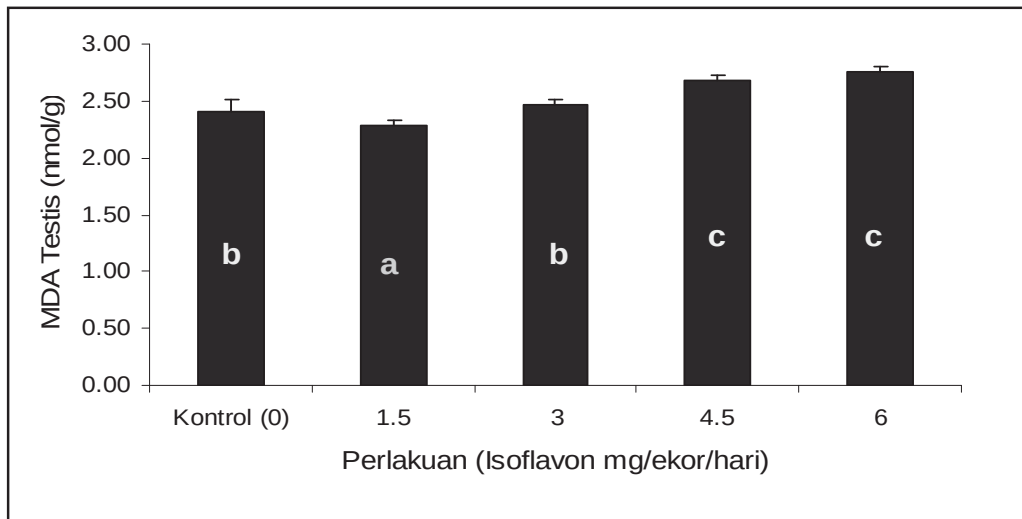
Perlakuan	Motilitas Spermatozoa (%)	Konsentrasi Spermatozoa (juta/ml)	Abnormalitas Spermatozoa (%)	Butiran Sitoplasma (%)	Berat Relatif Testis (%)
Kontrol, cekok aquades	72.5 ± 1.77 ^c	1256.90 ± 18.53 ^b	9.02 ± 2.01 ^a	10.00 ± 0.83 ^a	0.5513 ± 0.02 ^b
Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari	77.5 ± 2.50 ^d	1393.75 ± 30.62 ^c	8.99 ± 1.29 ^a	8.92 ± 1.08 ^a	0.5894 ± 0.03 ^c
Isoflavon 3 mg/ekor/hari	63.0 ± 4.11 ^b	1238.00 ± 19.72 ^b	9.07 ± 1.23 ^a	10.82 ± 0.64 ^a	0.5396 ± 0.02 ^b
Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari	55.0 ± 3.54 ^a	1113.75 ± 31.68 ^a	10.22 ± 0.94 ^a	29.20 ± 4.82 ^b	0.4925 ± 0.03 ^a
Isoflavon 6 mg/ekor/hari	52.0 ± 2.74 ^a	1078.88 ± 45.83 ^a	10.62 ± 0.99 ^a	63.52 ± 10.07 ^c	0.4697 ± 0.04 ^a

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0.05$). (Astuti, 2009)

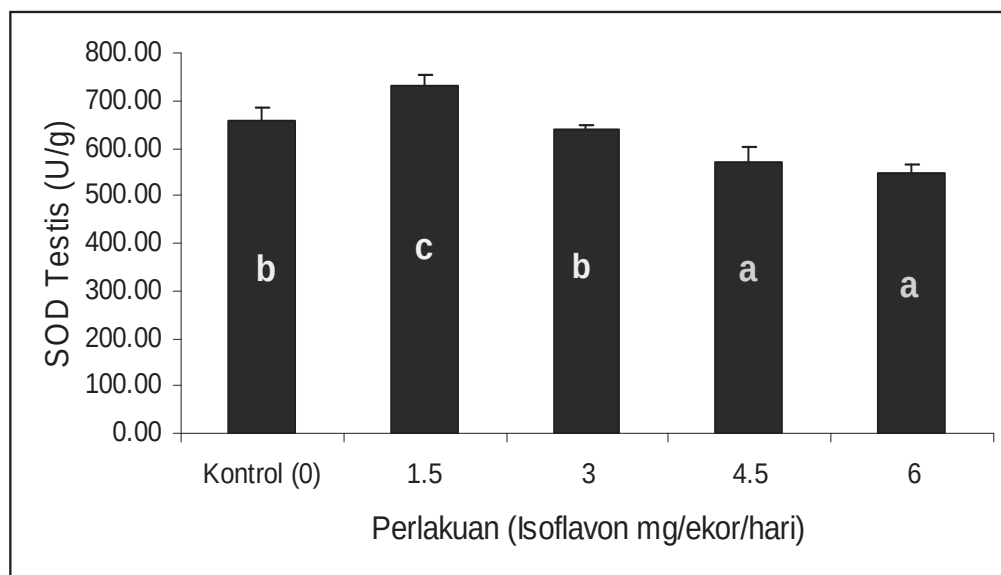
Hasil penelitian terhadap kualitas spermatozoa (Tabel 1) menunjukkan dua hal yang berlawanan akibat pemberian tepung kedelai kaya isoflavon rendah lemak (TKI-RL) dengan berbagai tingkatan dosis isoflavon pada tikus jantan. Pemberian TKI-RL dengan dosis isoflavon (IF) terendah yaitu 1.5 mg/ekor/hari, yang merupakan dosis IF optimum, menghasilkan kualitas spermatozoa terbaik. Sebaliknya, pemberian TKI-RL dengan dosis IF tertinggi yaitu 6 mg/ekor/hari menghasilkan kualitas spermatozoa yang paling rendah. Hasil pengamatan terhadap semua parameter pengujian memperlihatkan bahwa tikus yang dicekok TKI-RL pada dosis IF 4.5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari tidak berbeda nyata, namun terlihat perbedaan yang nyata pada kedua dosis tersebut dengan kelompok tikus yang dicekok TKI-RL pada dosis IF lebih rendah. Perbedaan nyata antara dosis IF 4.5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari terlihat pada pengamatan terhadap butiran sitoplasma.

Pemberian TKI-RL dengan dosis IF terendah (1.5 mg/ekor/hari) mengakibatkan : meningkatnya beberapa parameter seperti berat testis, motilitas dan konsentrasi spermatozoa (Tabel 5.1), serta jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis (Tabel 5.3, Gambar 5.4); menurunnya kadar MDA testis (Gambar 5.1); aktivitas enzim SOD testis dipertahankan tetap tinggi (Gambar 5.2); serta kandungan Cu,Zn-SOD pada sel spermatosit dan spermatid awal tubuli seminiferi testis dipertahankan tetap tinggi (Tabel 5.2, Gambar 5.3). Sebaliknya, pemberian TKI-RL pada dosis IF tertinggi (6 mg/ekor/hari) mengakibatkan: menurunnya berat testis, motilitas dan konsentrasi spermatozoa (Tabel 5.1), serta jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis

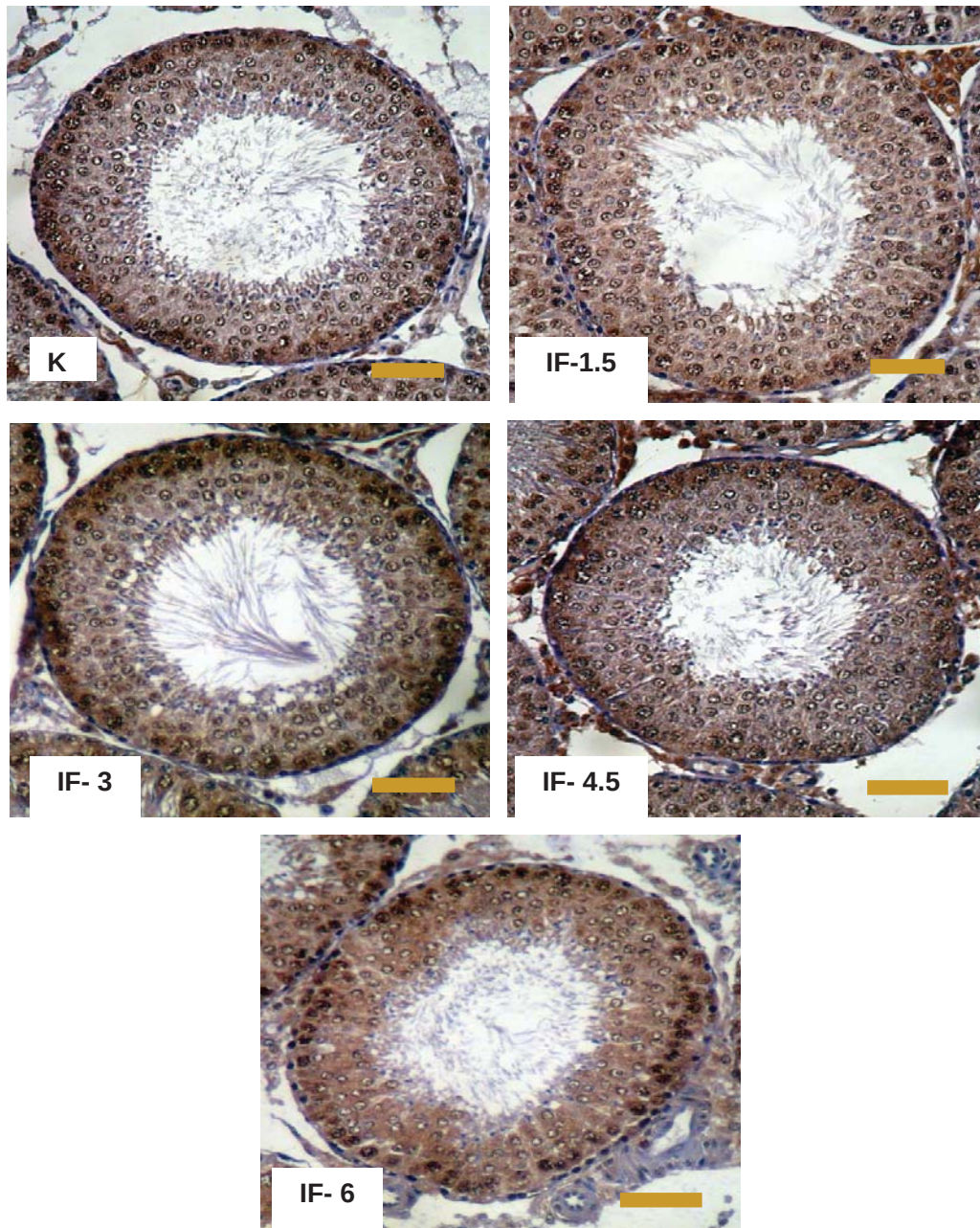
(Tabel 5.3, Gambar 5.4); meningkatnya butiran sitoplasma (Tabel 5.1), kadar hormon testosteron serum (Tabel 5.4), jumlah sel Leydig (Tabel 5.4), serta kadar MDA testis (Gambar 5.1); menurunnya aktivitas enzim SOD testis (Gambar 5.2); serta menurunnya kandungan Cu,Zn-SOD pada sel spermatosit dan spermatid awal tubuli seminiferi testis (Tabel 5.2, Gambar 5.3).



Gambar 5.1. Kadar MDA testis tikus pada berbagai variasi dosis isoflavon. Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kelima perlakuan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0.05$) (Astuti et al. 2009)



Gambar 5.2. Aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis tikus pada berbagai variasi dosis isoflavon. Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kelima perlakuan menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0.05$) (Astuti et al., 2009)



K= Kontrol, cekok aquades; I-1.5 = isoflavon 1.5 mg/ekor/hari; I-3= isoflavon 3 mg/ekor/hari; I-4.5 = isoflavon 4.5 mg/ekor/hari; I-6 = isoflavon 6 mg/ekor/hari

Gambar 5.3 Fotomikrograf jaringan testis tikus perlakuan yang diwarnai secaraImunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD. Sel-sel yang terdeteksi mengandung Cu,Zn-SOD adalah sel spermatosit dan spermatidawal (coklat), sedangkan sel spermatogonia dan spermatid akhir tidak mengandung Cu,Zn-SOD (biru).
Skala = 50 μ m (Astuti et al, 2009)

Fenomena keterkaitan antara berbagai parameter pengujian dengan hasil yang berlawanan akibat pemberian TKI-RL pada dosis IF paling rendah dan dosis IF paling tinggi dalam penelitian ini dapat dijelaskan dengan penjabaran sebagai berikut : Kedelai dikenal sebagai fitoestrogen dengan struktur molekul komponen bioaktif isoflavon kedelai yang mirip struktur molekul estrogen. Hal ini menyebabkan isoflavon kedelai dapat berikatan dengan reseptor estrogen (RE), namun afinitas RE ligan tersebut lebih rendah dibanding estrogen endogen (Miksicek, 1994). Menurut Kuiper *et al.* (1997), genistein merupakan senyawa utama isoflavon dengan pengaruh estrogenik terkuat dan mempunyai afinitas yang lebih tinggi terhadap RE β bila dibandingkan dengan RE α . Hal ini menunjukkan bahwa genistein membentuk ikatan lemah dengan RE α , namun dengan RE β dapat membentuk ikatan yang lebih kuat. Dengan struktur molekul mirip estrogen, isoflavon mampu menggantikan fungsi estrogen dan mengendalikan aktivitasnya. Mekanisme pengendalian aksi fitoestrogen dilaporkan Helferich *et al.* (2001) dan Ruggiero *et al.* (2002) tergantung pada respon yang terjadi, yaitu bersifat agonis atau antagonis terhadap kerja reseptor estrogen dalam sel target. Keduanya melaporkan bahwa aksi biologis estrogen sebagai estrogen agonis adalah berikatan dengan RE dan menstimulasi (memacu) respon estrogen, sedangkan aksi sebagai estrogen antagonis adalah berikatan dengan RE, namun menghambat respon estrogen. Wang dan Kurzer (1998) diacu dalam Robertson *et al.* (2002) menyatakan bahwa aksi spesifik fitoestrogen dengan keberadaan estrogen endogen tergantung pada konsentrasinya, di mana aksi agonis terlihat ketika estrogen terdapat pada konsentrasi rendah, sedangkan aksi antagonis terlihat ketika estrogen terdapat pada konsentrasi tinggi. Pendapat serupa juga dikemukakan Brzozowski *et al.* (1997), bahwa isoflavon bersifat antagonis ketika kadar estrogen tinggi, sebaliknya isoflavon bersifat agonis ketika kadar estrogen rendah.

Pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF paling rendah (1.5 mg/ekor/hari), diduga isoflavon bersifat antagonis dengan bertindak sebagai antioksidan. Hal ini didukung laporan Fritz *et al.* (2003), bahwa pemberian genistein (salah satu komponen senyawa isoflavon) dalam bentuk isolat isoflavon murni sebesar 250 mg genistein/kg diet ($\pm$ 5 mg genistein/ekor/hari) dan 1000 mg genistein/kg diet ($\pm$ 20 mg/ekor/hari) pada tikus jantan secara signifikan menyebabkan penurunan kadar estrogen dibanding kontrol. Mengacu pada hasil penelitian Fritz tersebut, diduga pemberian isoflavon pada kadar IF yang paling rendah (1.5 mg/ekor/hari) tidak menyebabkan penurunan kadar estrogen secara signifikan. Dalam hal ini, karena kadar estrogen cukup, maka isoflavon akan menghambat respon estrogen dan beraksi sebagai estrogen antagonis dengan bertindak sebagai antioksidan. Sebaliknya, pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF paling tinggi (6 mg/ekor/hari), isoflavon beraksi sebagai estrogen agonis. Dalam hal ini, karena kadar estrogen rendah, maka isoflavon akan menstimulasi/memacu respon estrogen.

Menurut Safe (2000), struktur genistein (salah satu komponen isoflavon) menyerupai estrogen dan dapat berikatan dengan reseptor estrogen. Pada tikus jantan di mana konsentrasi estradiol dalam darahnya lebih rendah dibandingkan tikus betina, paparan estrogen eksogen mungkin akan menyebabkan pengaruh yang mengganggu. Gangguan akibat senyawa estrogen pada

hewan jantan dilaporkan menyebabkan penurunan berat testis, mengganggu perkembangan saluran reproduksi, serta mempengaruhi spermatogenesis dan fertilitas (Safe, 2000). Atanassova *et al.* (2000) melaporkan perubahan berat testis, penyusutan dimensi tubuli seminiferi dan terganggunya spermatogenesis setelah tikus diberi genistein melalui injeksi pada dosis 4 mg/kg berat badan/hari. Sharpe dan Skakkebaek (1993) melaporkan penurunan jumlah sel Leydig dan penghambatan perkembangan sel Leydig sehingga menyebabkan gangguan reproduksi dan abnormalitas organ testis akibat paparan estrogen pada dosis tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan keeratan hubungan antara kadar MDA testis (Tabel 2) dengan motilitas spermatozoa akibat pemberian TKI-RL pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari. Pemberian TKI-RL pada dosis tersebut menghasilkan kadar MDA testis terendah dan motilitas tertinggi. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan pendapat Iwasaki dan Gagnon (1992) yang menyatakan bahwa peningkatan pembentukan radikal bebas berkorelasi dengan penurunan motilitas spermatozoa. Dilaporkan bahwa pembentukan radikal bebas akan meningkat apabila motilitas kurang dari 60%. Kelompok yang diberi TKI-RL dengan dosis IF 1.5 mg/ekor/hari menghasilkan motilitas spermatozoa tertinggi yaitu 77.5%.

Diduga pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari, isoflavon berperan sebagai antioksidan yaitu bersifat antagonis terhadap kerja reseptor estrogen dalam sel target dengan menghambat respon estrogen. Kerja isoflavon sebagai antioksidan berlangsung melalui dua mekanisme, yaitu : mendonorkan ion hidrogen dan bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas secara langsung (Arora *et al.*, 1998; Nijveldt *et al.*, 2001). Awalnya flavonoid teroksidasi oleh senyawa radikal, kemudian terbentuk senyawa yang lebih stabil dan radikal fenoksil yang kurang reaktif. Dengan demikian, maka reaktivitas radikal bebas dapat diredam. Menurut Pokorny *et al.* (2001), stabilitas radikal fenoksil akan mengurangi laju reaksi propagasi dari autooksidasi reaksi berantai karena propagasi radikal antioksidan sangat lambat dibandingkan dengan propagasi radikal lipid. Akibat teredamnya reaktivitas radikal peroksil dan radikal hidroksil, terjadinya proses peroksidasi lipid spermatozoa dapat dihambat. Terhambatnya peroksidasi lipid mengakibatkan peningkatan motilitas spermatozoa.

Motilitas (daya gerak) spermatozoa sangat tergantung pada suplai energi berupa ATP hasil metabolisme. Metabolisme akan berlangsung dengan baik apabila membran plasma sel berada dalam keadaan yang utuh, sehingga mampu mengatur lalu lintas masuk dan keluar substrat dan elektrolit yang dibutuhkan dalam proses metabolisme. Peran isoflavon pada dosis 1.5 mg/ekor/hari sebagai antioksidan diduga menyebabkan utuhnya membran plasma spermatozoa akibat terlindungi oleh antioksidan isoflavon, sehingga motilitas spermatozoa dapat dipertahankan tetap tinggi. Menurut Bourgeron (2000), untuk memperoleh kemampuan gerak, spermatozoa membutuhkan energi (ATP) yang diperoleh dari proses respirasi (glikolisis atau fruktolisis) dalam mitokondria pada bagian *midpiece* spermatozoa, sedangkan bagian *principal piece* dan *end piece* berfungsi dalam pergerakan spermatozoa. Setelah disintesis di dalam mitokondria, ATP ditransportasikan ke aksonem pada bagian ekor spermatozoa, selanjutnya dikonversikan

oleh dinein (enzim ATPase) pada aksonem yang akan menguraikan ATP menjadi energi untuk pergerakan spermatozoa. Terhambatnya pelepasan ATP ke bagian aksonem mengakibatkan tidak terpenuhinya atau berkurangnya kebutuhan energi untuk menggerakkan ekor, dan selanjutnya mengakibatkan spermatozoa tidak dapat bergerak cepat atau tidak bergerak sama sekali (Asmarinah, 2005). Dalam hal ini, pada kondisi tidak tercukupinya energi akibat terganggunya zat-zat yang berperan sebagai sumber energi, maka daya tahan spermatozoa akan menurun dan menyebabkan kematian.

Salah satu faktor untuk aktivasi pergerakan spermatozoa pada mamalia adalah peningkatan *cyclic Adenosin Monophosphat* (cAMP) intraseluler. Peningkatan cAMP terjadi melalui fosforilasi protein dalam flagellum untuk memodulasi pergerakan spermatozoa (Inaba, 2003 diacu dalam Asmarinah, 2005). Aktivasi motilitas spermatozoa melalui peningkatan cAMP diperantarai oleh ion Ca^{2+} . (Aitken, 2000). Peningkatan konsentrasi Ca^{2+} intraseluler dapat memodulasi gerakan flagellum yang menyebabkan gerakan kemotaksis spermatozoa menuju sel telur (Inaba, 2003 diacu dalam Asmarinah, 2005). Dengan demikian, ion Ca^{2+} dibutuhkan untuk hiperaktivasi spermatozoa pada saat terjadi proses kapasitasi. Durkee *et al.* (1998) diacu dalam Carreau *et al.* (2003) melaporkan keberadaan RE pada membran plasma spermatozoa manusia yang mempunyai kemampuan untuk berikatan dengan steroid. Reseptor membran dihubungkan dengan jalur transduksi sinyal secara cepat oleh ion Ca^{2+} , yang diperlukan untuk motilitas dan kapasitasi spermatozoa (Luconi *et al.*, 2002). Revelli *et al.* (1998) dan O'Donnell *et al.* (2001) menyatakan bahwa estrogen dapat menginduksi peningkatan konsentrasi Ca^{2+} atau cAMP dengan sangat cepat melalui mekanisme aksi pengikatan reseptor estrogen pada membran plasma.

Hasil penelitian menunjukkan keeratan hubungan antara kadar MDA testis (Gambar 5.1), aktivitas SOD testis (Gambar 5.2) dan profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada tubuli seminiferi testis (Tabel 5.2) akibat pemberian TKI-RL pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari. Fotomikrograf jaringan testis tikus perlakuan yang diwarnai secara imunohistokimia terhadap Cu,Zn-SOD pada Gambar 5.3.

Pemberian TKI-RL pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari menghasilkan kadar MDA testis terendah, serta aktivitas SOD testis dan profil antioksidan Cu,Zn-SOD tertinggi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isoflavon pada dosis 1.5 mg/ekor/hari bekerja paling efektif dan optimal dalam membantu kinerja sistem enzim SOD endogen untuk mengeliminir dan menetralkan radikal bebas yang terbentuk, sehingga memberikan pengaruh yang paling menguntungkan terhadap eliminasi radikal bebas. Dengan aksi isoflavon sebagai antioksidan, kandungan enzim SOD endogen testis jumlahnya dipertahankan tetap tinggi. Hal ini sejalan dengan pendapat Sikka (2004), bahwa antioksidan eksogen yang dapat bertindak sebagai *scavenger* radikal bebas akan meningkatkan sistem pertahanan antioksidan endogen dalam tubuh sehingga mampu mengurangi terbentuknya kondisi stres oksidatif akibat berlebihnya pembentukan radikal bebas.

Tabel 5.2. Profil kandungan Cu,Zn-SOD sel spermatosit dan spermatid awaltubuli seminiferi pada jaringan testis tikus pada berbagai variasi dosis isoflavon

Perlakuan	Jumlah Sel Spermatosit dan Spermatid Awal			Spermatogonia	Spermatid Akhir
	+++	++/+	-	-	-
Kontrol, cekok aquades	149.56±13.69 ^b	71.11± 9.61 ^c	40.22±6.69 ^b	40.33±4.82 ^b	130.22±18.17 ^b
Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari	166.78± 6.92 ^c	85.22± 9.24 ^d	32.33±5.27 ^a	48.44±4.82 ^c	164.33±17.94 ^c
Isoflavon 3 mg/ekor/hari	151.78± 8.89 ^b	49.22±14.46 ^b	40.78±6.40 ^b	38.78±2.77 ^b	148.67±16.11 ^c
Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari	131.56± 7.20 ^a	32.44± 8.37 ^a	53.56±5.83 ^c	32.00±2.45 ^a	109.67±19.91 ^a
Isoflavon 6 mg/ekor/hari	128.56± 7.09 ^a	31.22± 4.79 ^a	54.33±3.28 ^c	29.56±2.55 ^a	106.44±16.49 ^a

Angka yang diikuti oleh huruf berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($P<0.05$); +++ = positif kuat; ++/+ = positif sedang/lemah; - = negatif (Astuti *et al.*, 2009)

Keeratan hubungan antara berat relatif testis, konsentrasi spermatozoa dan jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis (Tabel 5.3) terlihat pada tikus jantan yang dicekok TKI-RL dosis IF 1.5 mg/ekor/hari. Pemberian TKI-RL pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari menghasilkan berat relatif testis, konsentrasi spermatozoa dan jumlah sel spermatogenik tertinggi. Gambaran histologis sel spermatogonia, spermatosit, spermatid awal dan spermatid akhir pada tubuli seminiferi setiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.4.

Tabel 5.3. Rataan jumlah sel-sel spermatogenik tubuli seminiferi pada jaringan testis tikus perlakuan dengan berbagai variasi dosis isoflavon

Perlakuan	Jumlah Sel Kelamin Jantan				
	Spermato-gonia	Spermatosit	Spermatid Awal	Spermatid Akhir	Total Sel Spermatogenik
Kontrol, cekok aquades	40.33 ± 4.82 ^b	49.67 ± 3.81 ^b	211.22 ± 16.02 ^c	130.22 ± 18.17 ^b	431.44 ± 21.19 ^b
Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari	48.44 ± 4.82 ^c	60.00 ± 3.43 ^c	221.56 ± 16.12 ^c	164.33 ± 17.94 ^c	494.33 ± 32.94 ^c
Isoflavon 3 mg/ekor/hari	38.78 ± 2.77 ^b	49.33 ± 5.27 ^b	192.44 ± 11.79 ^b	148.67 ± 16.11 ^c	429.22 ± 25.79 ^b
Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari	32.00 ± 2.45 ^a	44.67 ± 4.47 ^a	170.00 ± 21.04 ^a	109.67 ± 19.91 ^a	355.22 ± 30.41 ^a
Isoflavon 6 mg/ekor/hari	29.56 ± 2.55 ^a	44.33 ± 4.72 ^a	158.78 ± 10.26 ^a	106.44 ± 16.49 ^a	339.11 ± 16.16 ^a

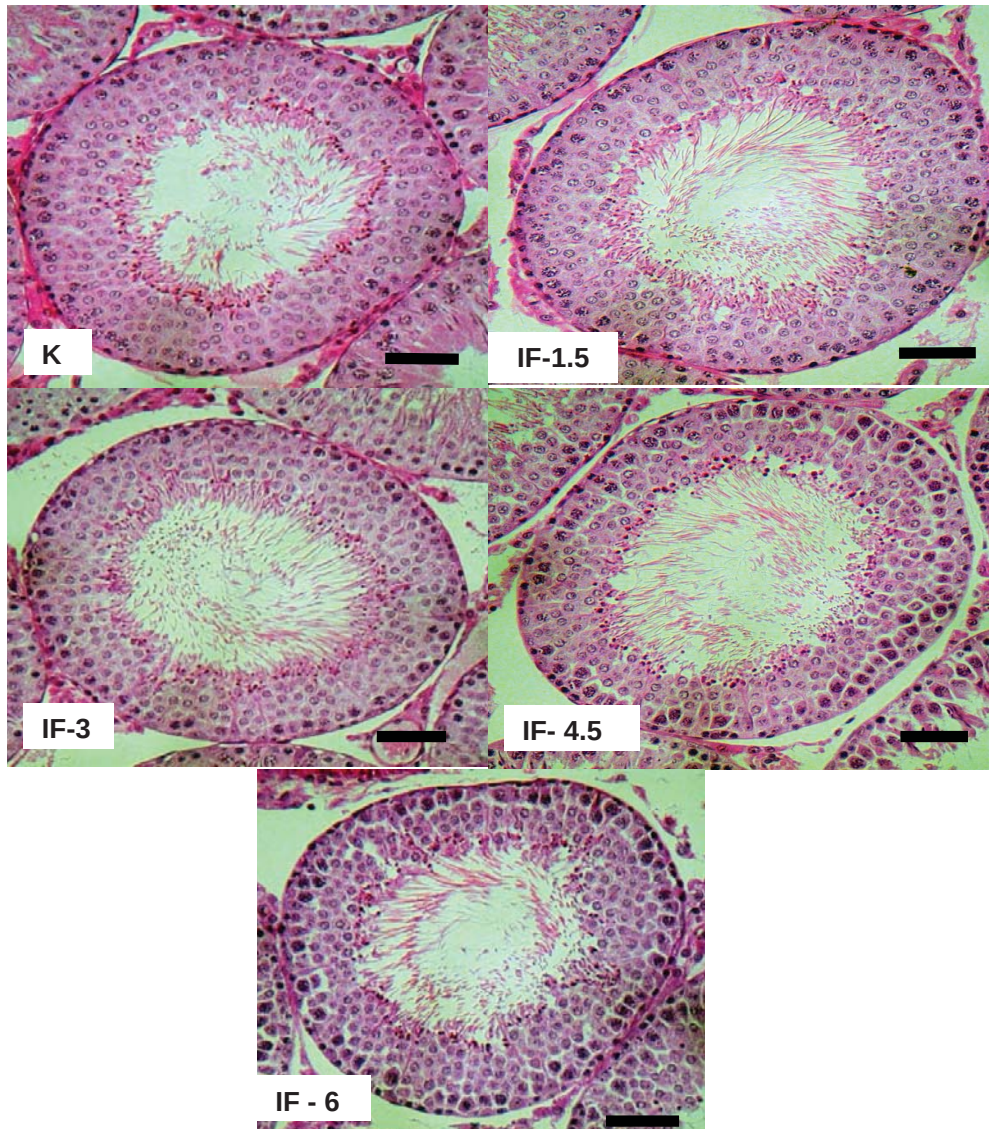
Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p<0.05$) (Astuti dan Sutyarso, 2010)

Diduga, eliminasi radikal bebas pada jaringan yang memproduksi spermatozoa oleh aksi isoflavon sebagai antioksidan pada dosis IF 1.5 mg/ekor/hari menyebabkan perkembangan testis sebagai tempat utama berlangsungnya proses spermatogenesis untuk memproduksi spermatozoa menjadi tidak terhambat. Di samping itu, sel yang tetap utuh dan tidak mengalami kerusakan akibat terlindung oleh antioksidan isoflavon juga mampu menghentikan reaksi berantai peroksidasi lipid asam lemak tidak jenuh pada fosfolipid membran sel sehingga secara keseluruhan akan melindungi fungsi spermatozoa. Dengan terlindungnya jaringan yang memproduksi spermatozoa dari proses oksidasi, proses spermatogenesis menjadi tidak terhambat atau terganggu. Akibat tidak adanya hambatan terhadap proses spermatogenesis, produksi spermatozoa menjadi tidak terganggu, sehingga akhirnya dihasilkan konsentrasi spermatozoa yang lebih tinggi. Hasil pengamatan morfologi testis terhadap jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi mendukung data yang diperoleh dalam penelitian ini, di mana tingginya berat relatif testis diikuti oleh peningkatan konsentrasi spermatozoa dan total sel spermatogenik melalui penghitungan terhadap jumlah sel spermatogonia, spermatosit, spermatid awal dan spermatid akhir.

Sebaliknya, pemberian TKI-RL pada dosis IF yang paling tinggi (6 mg/ekor/hari) menimbulkan akibat yang berlawanan dengan pemberian TKI-RL pada dosis IF yang paling rendah (1.5 mg/ekor/hari). Pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF paling tinggi (6 mg/ekor/hari), diduga isoflavon bersifat sebagai estrogen agonis dengan memacu/menstimulasi respon estrogen karena kadar estrogen rendah, sehingga pada dosis tersebut diduga isoflavon berpotensi menimbulkan gangguan. Gangguan akibat paparan estrogen eksogen pada jantan diduga karena kadar estradiol pada jantan yang lebih rendah dibandingkan betina. Robertson *et al.* (2002) menyatakan bahwa pada mencit yang tidak mendapat diet kedelai dan kondisinya dibuat kekurangan enzim aromatase (enzim yang mengkonversi androgen menjadi estrogen) memperlihatkan adanya gangguan spermatogenesis. Dilaporkan bahwa jumlah sel spermatid awal pada kelompok mencit tersebut mengalami penurunan secara signifikan sehingga diduga bahwa diet kedelai berkontribusi terhadap proses spermatogenesis ketika sintesis estrogen endogen dihambat. Hasil tersebut mendukung pendapat beberapa peneliti sebelumnya bahwa produksi estrogen pada jantan dibutuhkan untuk perkembangan sel benih dan fungsi sel Sertoli.

Fritz *et al.* (2003) juga melaporkan terjadinya penurunan aktivitas aromatase testis tikus akibat pemberian genistein pada dosis tinggi sehingga menurunkan kadar estrogen. Dalam penelitian ini, diduga pemberian TKI-RL pada dosis yang semakin tinggi juga menimbulkan respon yang sama. Defisiensi aromatase dilaporkan berhubungan dengan problem infertilitas (Carreau *et al.*, 2003), sehingga secara keseluruhan pemberian TKI-RL pada dosis yang semakin tinggi menyebabkan penurunan fungsi dan kualitas spermatozoa. Hal ini didukung laporan peneliti terdahulu bahwa penghambatan aktivitas aromatase menyebabkan penurunan pematangan spermatid tikus (Nitta *et al.*, 1993), sedangkan defisiensi aromatase pada mencit menyebabkan tertahannya proses awal spermiogenesis (Robertson *et al.*, 1999 diacu dalam Adeoya-Osiguwa

et al.,2003). Hal ini memperkuat dugaan bahwa estrogen berperan penting dalam mengontrol spermatogenesis dan fertilitas hewan jantan.



K= Kontrol, cekok aquades ; I-1.5 = Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari ;I-3 = Isoflavon 3 mg/ekor/hari; I-4.5 = Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari ; I-6 = Isoflavon 6 mg/ekor/hari

Gambar 5.4. Fotomikrograf tubuli seminiferi pada testis tikus perlakuan Kelompok yang mendapat isoflavon pada dosis 4.5 dan 6 mg/ekor/hari menghasilkan jumlah sel-sel spermatogenik paling rendah secara nyatadibandingkan dengan kelompok lainnya. Pemberian isoflavon pada dosis 1.5 mg/ekor/hari menghasilkan jumlah sel spermatogenik paling tinggi secara nyatadibandingkan kelompok yang mendapat isoflavon pada dosis 3, 4.5 dan 6 mg/ekor/hari (Astuti dan Sutyarso, 2010)

Keeratan hubungan antara motilitas dengan kadar MDA testis juga terlihat pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF 6 mg/ekor/hari, namun tidak terlihat adanya perbedaan nyata dengan pemberian TKI-RL dengan dosis IF 4.5 mg/ekor/hari. Motilitas spermatozoa sebesar 52% dihasilkan oleh dosis IF 6 mg/ekor/hari, sedangkan dosis IF 4.5 mg/ekor/hari menghasilkan motilitas sebesar 55%. Menurut Iwasaki dan Gagnon (1992), spermatozoa normal memiliki motilitas lebih dari 60%. Rendahnya motilitas spermatozoa kelompok tikus yang dicekok isoflavon dengan kedua dosis tersebut diduga karena sintesis ATP yang berlangsung dalam mitokondria spermatozoa pada proses respirasi mengalami gangguan. Pada dosis tersebut, diduga terjadi kerusakan struktur membran plasma mitokondria spermatozoa akibat proses oksidasi oleh radikal bebas sehingga menyebabkan peningkatan peroksidasi lipid. Menurut Colenbrander *et al.* (1992), kerusakan membran plasma spermatozoa pada bagian *midpiece* menyebabkan berkurangnya enzim aspartat aminotransferase (AspAT), yaitu enzim utama untuk pembentukan ATP oleh mitokondria spermatozoa. Kondisi tersebut dilaporkan menghambat pembentukan ATP dan mengganggu motilitas spermatozoa.

Rendahnya motilitas spermatozoa didukung data kadar MDA testis yang tertinggi pada kelompok yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 4.5 dan 6 mg/ekor/hari, yang menunjukkan tingginya keberadaan radikal bebas dan terjadinya proses oksidasi membran sel. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini didukung pendapat Iwasaki dan Gagnon (1992) yang menyatakan bahwa peningkatan pembentukan radikal bebas berkorelasi dengan penurunan motilitas spermatozoa. Dilaporkan bahwa apabila motilitas kurang dari 60%, pembentukan senyawa spesies oksigen reaktif (ROS) akan meningkat, sehingga diduga bahwa spermatozoa immotil mempunyai peluang yang lebih besar untuk memproduksi ROS daripada spermatozoa yang lebih motil.

Peroksidasi asam lemak tidak jenuh pada membran sel spermatozoa bersifat autokatalitik yang mengakibatkan gangguan fungsi membran, menurunkan integritas dan fluiditas membran, serta inaktivasi enzim yang terlibat pada membran (Sanocka dan Kurpisz, 2004). Berlebihnya pembentukan senyawa ROS dapat menginisiasi perubahan lapisan lemak dan protein pada membran plasma spermatozoa sehingga menimbulkan gangguan fungsional spermatozoa, serta meningkatkan peroksidasi lipid (Griveau *et al.*, 1995). Peroksidasi lipid merupakan suatu proses yang sangat reaktif dan menyebabkan kerusakan membran sel sehingga metabolisme sel tidak dapat berlangsung dengan sempurna. Sekali radikal bebas terbentuk, akan mengakibatkan pembentukan radikal bebas baru melalui reaksi berantai antar radikal lipid peroksil. Terbentuknya radikal bebas hidroksil yang sangat reaktif dapat menggoyahkan membran dan menyebabkan kematian spermatozoa karena asam lemak tidak jenuh, protein, dan DNA bersifat sangat rentan terhadap radikal hidroksil ini. Ketiga senyawa tersebut merupakan sel target yang paling potensial (Saleh dan Agarwal, 2002).

Berlangsungnya reaksi berantai peroksidasi lipid juga menyebabkan terganggunya integritas membran karena radikal bebas dapat bereaksi dengan komponen-komponen membran, sehingga terjadinya kerusakan tidak hanya berlangsung pada membran plasma tetapi juga pada

bagian internal sel. Menurut Comporti (1989) diacu dalam de Lamirande dan Gagnon (1992), senyawa hasil degradasi peroksidasi lipid bersifat sangat reaktif terhadap reaksi biokimia sel seperti respirasi mitokondria dan sintesis DNA. Kerusakan oksidatif mitokondria DNA (mtDNA) terjadi pada semua sel yang kaya mitokondria, termasuk spermatozoa (Sikka *et al.*, 1995). Tidak sempurnanya respirasi enzim yang terlibat dalam respirasi mitokondria spermatozoa menyebabkan hilangnya mitokondria DNA sehingga meningkatkan produksi radikal bebas dan menyebabkan lebih banyak terjadi kerusakan oksidatif (Kao *et al.*, 1998; O'Connell *et al.*, 2002).

Sikka *et al.* (1995) melaporkan bahwa peroksidasi lipid merusak DNA dan protein melalui oksidasi basa DNA (terutama guanin), atau melalui binding kovalen dengan MDA, sehingga mengakibatkan DNA *strand-breaks* dan *cross-linking*. ROS juga dapat menginduksi oksidasi grup -SH pada protein dan DNA sehingga akhirnya akan mengubah struktur dan fungsi spermatozoa. Fraga (1996) diacu dalam Kao *et al.* (1998) melaporkan bahwa pada perokok yang aktivitas antioksidan endogen lebih rendah dan pembentukan radikal bebas lebih tinggi, terlihat adanya peningkatan 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) pada DNA spermatozoanya. Pembentukan 8-OHdG dilaporkan Halliwell dan Gutteridge (1999) merupakan kunci biomarker terhadap kerusakan oksidatif DNA.

Hasil penelitian Aitken *et al.* (1993) terhadap pembentukan metabolit oksigen yang bersifat toksik dalam suatu sistem xantin-xantin oksidase memperlihatkan bahwa senyawa ROS yang menyebabkan kerusakan spermatozoa adalah hidrogen peroksida (H_2O_2). H_2O_2 yang diproduksi oleh dismutasi anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dilaporkan de Lamirande dan Gagnon (1992) bersifat paling toksik pada spermatozoa manusia karena kemampuannya untuk dapat melewati membran sel secara bebas sehingga menghambat aktivitas enzim antioksidan intrasel dan fungsi sel. H_2O_2 dapat melewati membran sel dengan mudah karena mempunyai kemampuan berdifusi yang sangat tinggi (Lee *et al.*, 2004)

Aitken *et al.* (1997) menduga bahwa difusi H_2O_2 sebagai salah satu senyawa ROS ke dalam membran sel akan menghambat aktivitas enzim glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G_6PD), suatu enzim kunci pada jalur glikolisis untuk mengontrol kecepatan glukosa dan mengontrol ketersediaan NADPH intrasel. Jalur metabolik utama yang menyebabkan produksi NADPH dalam sel adalah jalur pentosa fosfat, yang akan mentransformasi glucose-6-phosphat menjadi 6-fosfo-glukonolakton dengan dikatalis oleh enzim glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G_6PD). G_6PD dilaporkan bersifat sangat rentan terhadap stres oksidatif (Oliver *et al.*, 1987 diacu dalam Griveau *et al.*, 1995). Inaktivasi / penghambatan aktivitas enzim G_6PD mengakibatkan blokade jalur pentosa fosfat sehingga menyebabkan penurunan ketersediaan NADPH dalam sel sehingga menyebabkan berkurangnya ATP. Penurunan ATP berpotensi untuk meningkatkan proses peroksidasi lipid membran sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan intrasel spermatozoa. Sebagai konsekuensinya, terjadi perubahan fluiditas dan integritas membran akibat akumulasi peroksidasi lipid, sehingga menghambat pergerakan spermatozoa dan menyebabkan gangguan terhadap berlangsungnya reaksi akrosom (Griveau *et al.*, 1995; Tremellen, 2008).

Pada pemberian TKI-RL dengan dosis IF 4.5 dan 6 mg/ekor/hari, hubungan antara kadar MDA testis, aktivitas SOD testis, dan profil Cu,Zn-SOD testis dapat dijelaskan sebagai berikut : peningkatan kadar MDA testis pada kedua kelompok tersebut menunjukkan bahwa status pertahanan antioksidan intrasel kedua kelompok tersebut tidak mampu menangkal reaktivitas radikal bebas sehingga mengakibatkan rendahnya aktivitas enzim SOD testis, baik melalui pengukuran menggunakan spektrofotometer maupun pengamatan terhadap profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada tubuli seminiferi testis melalui pewarnaan secara imunohistokimia. Penurunan sistem pertahanan enzim SOD intrasel pada kelompok yang dicekok isoflavon pada dosis tinggi diduga menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan antara antioksidan dan oksidan dalam tubuh. Hal ini sejalan dengan pendapat Sikka *et al.* (1995) dan Halliwell dan Gutteridge (1999), bahwa enzim-enzim yang berfungsi sebagai antioksidan endogen dapat menurun aktivitasnya apabila terbentuk radikal bebas dalam jumlah berlebihan. Tingginya reaktivitas radikal bebas telah dilaporkan Griveau *et al.* (1995) menyebabkan pengaruh toksik pada membran plasma spermatozoa.

Penurunan kemampuan antioksidan intrasel menyebabkan berkurangnya eliminasi senyawa ROS yang bertanggung jawab terhadap kerusakan sel DNA dan protein spermatozoa, serta terbentuknya proses peroksidasi lipid. Hal ini sejalan dengan pendapat Rajasekaran *et al.* (1995), bahwa penurunan aktivitas SOD akan mempengaruhi kemampuan pertahanan terhadap senyawa ROS sehingga menyebabkan kerusakan spermatozoa. Kerusakan oksidatif dapat terus terjadi apabila ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan terus berlanjut. Menurut Sikka (2004), ketidakseimbangan terjadi apabila pembentukan radikal bebas lebih tinggi dibandingkan sistem pertahanan antioksidan, sistem pertahanan antioksidan tidak mampu mendetoksifikasi terjadinya perubahan oleh radikal bebas secara terus menerus, atau ketika proses detoksifikasi menurun. Kekacauan sistem pertahanan antioksidan tersebut selanjutnya menyebabkan peroksidasi membran fosfolipid oleh radikal bebas. Sebagai konsekuensinya, terjadi perubahan fluiditas dan integritas membran akibat akumulasi peroksidasi lipid.

Retensi residu sitoplasma pada spermatozoa dilaporkan berkorelasi positif dengan pembentukan ROS melalui suatu mekanisme yang diperantarai oleh enzim glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G_6PD). Apabila aktivitas enzim G_6PD terhambat, ketersediaan NADPH dalam sel akan berkurang, sehingga meningkatkan proses peroksidasi lipid membran spermatozoa. Di samping itu, pada kondisi berlebihnya residu sitoplasma, spermatozoa yang dilepaskan selama spermiasi menjadi tidak matang (*immature*) sehingga memicu pembentukan radikal bebas (Aitken 1997). Hal ini terbukti pada hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, di mana pemberian TKI-RL dengan dosis IF tertinggi yaitu 6 mg/ekor/hari mengakibatkan peningkatan butiran sitoplasma yang signifikan dibanding kelompok yang diberi TKI-RL pada dosis IF lebih rendah. Dosis IF 6 mg/ekor/hari menghasilkan butiran sitoplasma tertinggi sebesar 63.52%, sedangkan dosis IF 4.5 mg/ekor/hari menghasilkan butiran sitoplasma sebesar 29.20%. Peningkatan butiran sitoplasma spermatozoa pada kelompok tersebut terbukti mengakibatkan peningkatan kadar MDA testis dan menurunnya aktivitas antioksidan intrasel. Namun hasil pengamatan menun-

jukkan bahwa morfologi spermatozoa kedua kelompok tersebut tergolong pada kategori normal, dengan abnormalitas spermatozoa kurang dari 20%.

Butiran sitoplasma terbentuk dari sisa-sisa badan golgi pada waktu proses spermatogenesis. Posisi *proximal droplet* lebih banyak terdapat pada spermatozoa yang berasal dari bagian caput, sedangkan posisi *distal droplet* lebih banyak ditemukan pada spermatozoa yang berasal dari bagian corpus dan cauda epididimis (Senger 1999). Hal ini menunjukkan bahwa spermatozoa mengalami proses maturasi selama perjalanannya melewati saluran epididimis. Secara normal butiran sitoplasma tersebut akan hilang atau terlepas dan bergabung dengan seminal plasma ketika spermatozoa tersebut diejakulasikan. Apabila ditemukan butiran sitoplasma dalam jumlah banyak pada semen hasil ejakulat, hal ini menunjukkan proses pematangan spermatozoa yang tidak sempurna.

Produksi ROS pada spermatozoa bervariasi dan tergantung pada tingkat pematangan spermatozoa. Produksi ROS ditemukan lebih tinggi pada spermatozoa *immature* dengan morfologi kepala yang abnormal atau terdapat retensi residu sitoplasma, sedangkan produksi ROS lebih rendah ditemukan pada spermatozoa yang matang. Produksi ROS pada spermatozoa yang *immature* berkorelasi langsung dengan kerusakan inti DNA spermatozoa (Gomez *et al.*, 1996; Sharma dan Agarwal, 1996; Saleh dan Agarwal, 2002). Sharma dan Agarwal (1996) menyatakan bahwa senyawa ROS akan diproduksi spermatozoa apabila : spermatozoa terdapat pada kondisi immotil, morfologi abnormalitas spermatozoa tinggi, atau morfologi spermatozoa normal tetapi fungsi spermatozoa abnormal.

Sejalan dengan pendapat tersebut, diduga kelompok yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 6 mg/ekor/hari menghasilkan morfologi spermatozoa normal, namun memiliki fungsi spermatozoa yang abnormal. Dugaan fungsi spermatozoa menjadi abnormal didukung oleh data tingginya persentase butiran sitoplasma, serta motilitas spermatozoa yang rendah / spermatozoa immotil tinggi yang merupakan pemicu terbentuknya radikal bebas, sehingga menyebabkan peningkatan kadar MDA testis. Peningkatan kadar MDA testis diikuti dengan menurunnya aktivitas SOD testis dan profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada tubuli seminiferi testis. Hasil yang diperoleh dalam penelitian ini sejalan dengan pendapat Saleh dan Agarwal (2002), bahwa ROS pada level yang tinggi dilaporkan berpotensi toksik terhadap kualitas dan fungsi spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan keeratan hubungan antara berat relatif testis, konsentrasi spermatozoa dan jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis. Pemberian TKI-RL pada dosis IF 4.5 dan 6 mg/ekor/hari menyebabkan penurunan berat relatif testis, konsentrasi spermatozoa dan jumlah sel spermatogenik secara signifikan. Diduga, pemberian TKI-RL pada kedua dosis IF tersebut terdapat pada konsentrasi tinggi dan berpotensi menimbulkan gangguan sehingga mengakibatkan terhambatnya perkembangan berat testis. Dalam hal ini, pengaruh estrogen eksogen akibat pemberian TKI-RL dengan dosis tinggi adalah bersifat agonis terhadap kerja reseptor estrogen dalam sel target, yaitu dengan memacu respon estrogen sehingga ber-

potensi untuk menimbulkan gangguan spermatozoa. Diduga, terjadi kerusakan pada membran plasma spermatozoa sehingga membran tidak utuh dan terbentuk proses peroksidasi lipid yang berkepanjangan.

Menurut Sanocka dan Kurpisz (2004), tingginya hasil peroksidasi lipid dapat mengganggu proses spermatogenesis, bahkan pada kondisi yang ekstrim mengakibatkan kasus infertilitas. Proses oksidasi pada membran sel spermatozoa yang tidak dapat dicegah pada kelompok yang mendapat perlakuan cekok TKI-RL dengan dosis IF 4.5 dan 6 mg/ekor/hari diduga mengakibatkan terhambatnya proses spermatogenesis dan terganggunya produksi spermatozoa, sehingga menyebabkan berkurangnya konsentrasi spermatozoa. Hasil pengamatan morfologi testis terhadap jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi mendukung data yang diperoleh dalam penelitian ini, di mana rendahnya berat relatif testis diikuti oleh penurunan konsentrasi spermatozoa, dan mengakibatkan penurunan total sel spermatogenik melalui penghitungan terhadap jumlah sel spermatogonia, spermatosit, spermatid awal dan spermatid akhir. Rendahnya jumlah sel spermatogenik menunjukkan bahwa proses spermatogenesis terganggu. Hal ini mengakibatkan mekanisme pelepasan butiran sitoplasma juga mengalami gangguan, sehingga spermatozoa akan dilepaskan dari epitel sel benih dengan membawa kelebihan residu sitoplasma.

Penurunan kualitas dan fungsi spermatozoa akibat pemberian TKI-RL pada dosis isoflavon tertinggi sebesar 6 mg/ekor/hari juga diperlihatkan dengan tingginya peroksidasi lipid testis. Peroksidasi lipid akan mengurangi kapasitas spermatozoa untuk mengalami reaksi akrosom dan fertilisasi, diduga karena hilangnya fluiditas membran, dan menurunnya permeabilitas membran, atau inaktivasi enzim yang terlibat dalam reaksi akrosom. Akrosin dan hialuronidase adalah enzim yang terutama terlibat dalam reaksi akrosom (Valcarcel *et al.*, 1997). Hialuronidase berfungsi untuk membuka dinding luar sel telur yang diselimuti oleh selapis sel kumulus ooforus, sedangkan akrosin berfungsi untuk menembus membran luar sel telur / zona pelusida dan menunjang penetrasi spermatozoa pada lendir serviks/ mulut rahim (Soeharso, 1985). Kerusakan membran plasma spermatozoa akibat tingginya pembentukan ROS dilaporkan menyebabkan peroksidasi pada membran akrosom spermatozoa dan mengurangi aktivitas akrosin (Zalata *et al.*, 2004), serta menurunkan kemampuan spermatozoa untuk melakukan fusi dengan oosit (Saleh *et al.*, 2003; Tremellen, 2008). ROS juga dapat mempengaruhi axonem spermatozoa akibat berkurangnya ATP, menghambat fungsi mitokondria, serta sintesis DNA, RNA dan protein pada spermatozoa (Griveau *et al.*, 1995). Spermatozoa dengan DNA yang rusak tidak dapat berperan pada proses fertilisasi karena diiringi dengan kerusakan peroksidatif pada membran plasma (Kodama *et al.*, 1996). Sharma dan Agarwal (1996) menyatakan bahwa mekanisme yang bertanggung jawab terhadap gangguan fusi spermatozoa dengan oosit meliputi berkurangnya fluiditas membran plasma sehingga mengubah aktivitas enzim-membran dan kanal ion. Keadaan tersebut secara keseluruhan memberikan pengaruh negatif dan mengganggu fertilitas tikus jantan yang dicekok TKI-RL pada dosis IF 6 mg/ekor/hari. Menurut Evenson *et al.* (2002) diacu dalam Agarwal dan Said (2003), ketika $\geq 30\%$ DNA spermatozoa mengalami kerusakan karena struktur kromatin yang abnormal, tidak mungkin terjadi kehamilan pada betina.

Kelompok yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 1.5 mg/ekor/hari dan 3 mg/ekor/hari mengalami peningkatan kadar hormon testosteron yang lebih tinggi dibanding kontrol (Tabel 4). Hal ini memberikan pengaruh yang lebih baik terhadap proses spermatogenesis mengingat kelompok yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 1.5 mg/ekor/hari menghasilkan jumlah sel spermatogenik tertinggi (Tabel 3). Tingginya jumlah sel spermatogenik tersebut menunjukkan bahwa dosis IF 1.5 mg/ekor/hari merupakan dosis optimum isoflavon yang terbaik. Hasil pengukuran terhadap kadar hormon testosteron sejalan dengan hasil perhitungan jumlah sel Leydig pada tubuli seminiferi testis tikus (Tabel 5.4). Fotomikrograf sel Leydig testis tikus perlakuan disajikan pada Gambar 5.5.

Tabel 5.4 Rataan kadar hormon testosteron serum dan jumlah sel Leydig tikus perlakuan

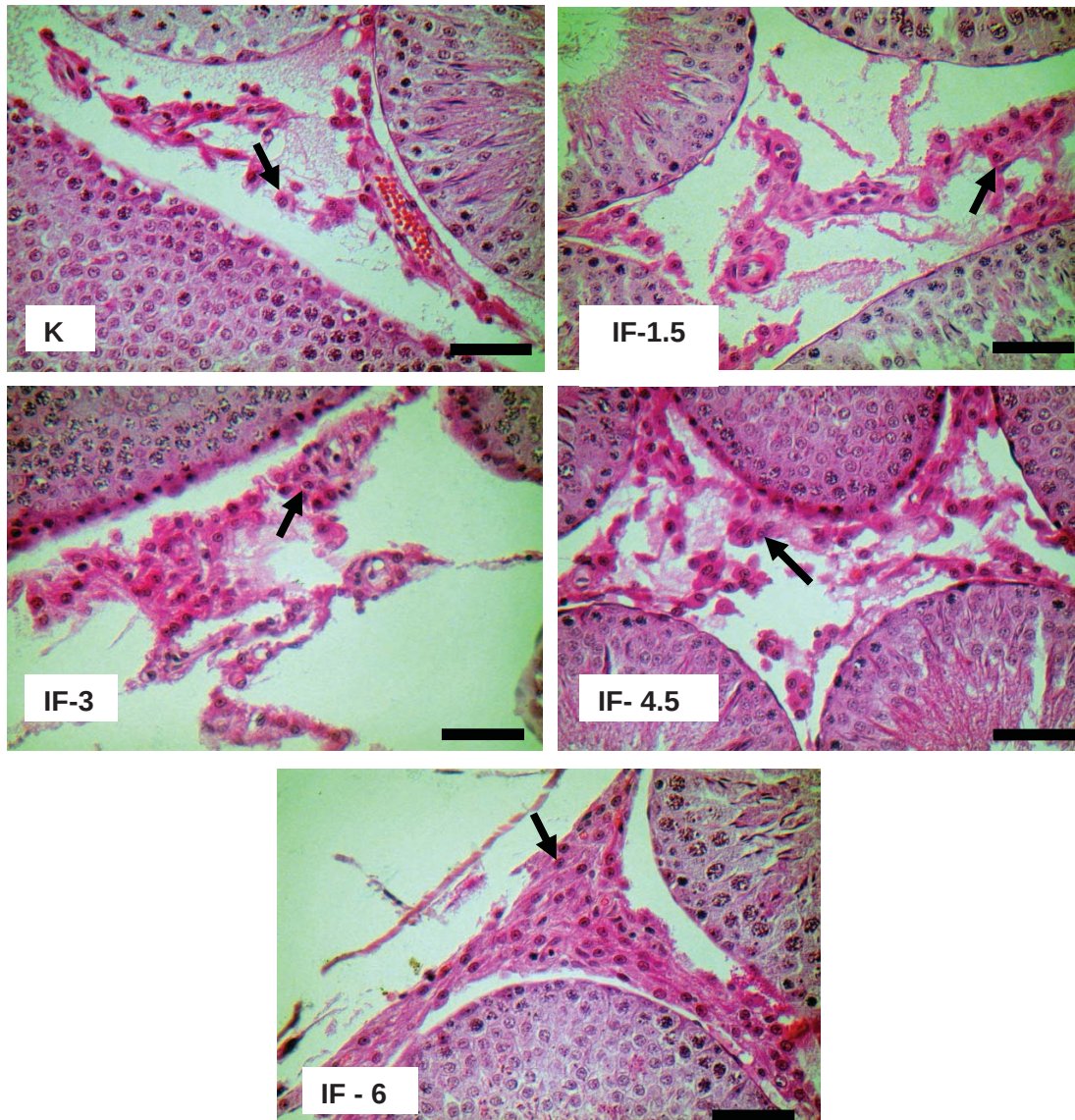
Perlakuan	Kadar Hormon Testosteron (ng/ml)	Jumlah Sel Leydig
Kontrol, cekok aquades	1.75 ± 0.13 ^a	58.44 ± 6.98 ^a
Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari	2.96 ± 0.45 ^b	70.22 ± 9.34 ^b
Isoflavon 3 mg/ekor/hari	3.35 ± 0.68 ^b	79.11 ± 8.75 ^b
Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari	7.03 ± 1.34 ^c	94.56 ± 14.09 ^c
Isoflavon 6 mg/ekor/hari	7.69 ± 1.22 ^c	100.11 ± 13.52 ^c

Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan adanya perbedaan nyata ($p < 0.05$) (Astuti dan Sutyarso, 2010)

Tingginya kadar hormon testosteron pada kelompok yang dicekok TKI-RL dengan dosis IF 4.5 mg/ekor/hari dan 6 mg/ekor/hari sejalan dengan peningkatan jumlah sel Leydig pada kedua kelompok tersebut (Tabel 4). Sel Leydig merupakan tempat utama untuk berlangsungnya sintesis hormon testosteron. Mengacu pada hasil penelitian Fritz *et al.* (2003), diduga pemberian TKI-RL dengan dosis isoflavon yang semakin tinggi mengakibatkan rendahnya kadar estrogen akibat terhambatnya aktivitas aromatase. Dalam hal ini, peran isoflavon sebagai estrogen agonis pada dosis tinggi akan menstimulasi respon estrogen sehingga berpotensi menimbulkan gangguan. Aktivitas aromatase yang terhambat diduga menurunkan konsentrasi estrogen dan mengakibatkan peningkatan kadar hormon testosteron. Akibatnya, setelah kedua kelompok tikus tersebut ter-ekspos senyawa isoflavon pada dosis tinggi, testis tikus berpotensi mengalami perubahan dalam perkembangan, morfologi maupun proses spermatogenesis. Hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi perubahan steroidogenesis pada testis kedua kelompok tersebut (Astuti, 2010).

Pemberian TKI-RL pada dosis 6 mg/ekor/hari menghasilkan kadar hormon testosteron dan jumlah sel Leydig tertinggi. Salah satu fungsi hormon testosteron yang disintesis oleh sel Leydig adalah mempengaruhi tingkat libido dan perkembangan kelenjar-kelenjar pelengkap organ reproduksi hewan jantan. Robbins (1996) menyatakan bahwa tingkat libido yang rendah pada jantan berhubungan dengan rendahnya konsentrasi hormon testosteron, sehingga semakin tinggi kadar hormon testosteron, libido juga semakin tinggi. Namun peningkatan kadar hormon testosteron dalam darah akan menyebabkan mekanisme umpan balik negatif (*negative feedback*

mechanism) terhadap hipofisis sehingga produksi LH dan FSH menurun, sehingga mengakibatkan terhambatnya proses spermatogenesis (Hafez & Hafez 2000).



K = Kontrol, cekok aquades ; I-1.5 = Isoflavon 1.5 mg/ekor/hari ; I-3 = Isoflavon 3 mg/ekor/hari ; I-4.5 = Isoflavon 4.5 mg/ekor/hari ; I-6 = Isoflavon 6 mg/ekor/hari ; = sel Leydig

Gambar 5.5. Fotomikrograf sel Leydig pada testis tikus perlakuan. Jumlah sel. Leydig tertinggi secara nyata terlihat pada kelompok tikus yang mendapat isoflavon dengan dosis 4.5 dan 6 mg/ekor/hari, dibandingkan kelompok tikus yang mendapat isoflavon dengan dosis 1.5 dan 3 mg/ekor/hari. Jumlah sel Leydig terendah secara nyata terlihat pada kelompok kontrol. (Pewarnaan HE, skala = 20 μ m) (Astuti dan Sutjarso, 2010)

5.5 KESIMPULAN

Dosis isoflavon optimum yang menghasilkan fertilitas tikus jantan terbaik adalah 1.5 mg/ekor/hari dan menyebabkan meningkatnya berat testis, motilitas dan konsentrasi spermatozoa, serta jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis, terhambatnya pembentukan peroksidasi lipid yang diperlihatkan dengan menurunnya kadar MDA testis, aktivitas enzim SOD testis dipertahankan tetap tinggi, kandungan Cu,Zn-SOD tubuli seminiferi testis pada sel spermatosit dan spermatid awal dipertahankan tetap tinggi. Pemberian tepung kedelai kaya isoflavon pada berbagai tingkatan dosis terhadap tikus jantan tidak berpengaruh terhadap abnormalitas spermatozoa. Pemberian tepung kedelai kaya isoflavon dengan dosis isoflavon yang semakin tinggi menyebabkan peningkatan kadar hormon testosteron serum dan jumlah sel Leydig pada tikus jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adeoya-Osiguwa S.S., S. Markoulaki, V. Pocock, S.R. Milligan, and L.R. Fraser. 2003. 17 β -estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function. *Hum Reprod* 18(1):100-107
- Agarwal, A. and T.M. Said. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 9(4):331-345
- Aitken, R.J. and J.S. Clarkson. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81:459-469
- Aitken, R.J., D. Harkiss, and D. Buckingham. 1993. Relationship between iron-catalyzed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 98:257-265
- Aitken, R.J. 1997. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 3(3):169-173.
- Aitken, R.J. 2000. Possible redox regulation of sperm motility activation. *J Androl* 21(4):491-496
- Amic, D., D. Beslo, and N. Trinajstić. 2002. Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croat Chem Acta* 76(1):56-61
- Anderson, J.J.B. and S.C. Garner. 2000. The Soybean as a Source of Bioactive Molecules. Di dalam Schmidl MK, Labuza TP, editor. *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. p. 239-269.
- Arora, A., M.G. Nair, and G.M. Strasburg. 1998. Structure – activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol & Med* 24(9):1355-1363

- Asmarinah. 2005. Mutasi gen pada pria infertil dengan astenozoospermia. Di dalam Buku Kumpulan Makalah/ Abstrak. Andrologi : Sesuatu yang Hilang dalam Kesehatan Reproduksi untuk Meningkatkan Kualitas Hidup Manusia. Kongres Pandi IX dan Kongres Persandi I. 19-23 April. Jakarta.
- Astuti, S., D. Muchtadi, M. Astawan, B. Purwantara, dan T. Wresdiyati. 2008. Kadar peroksida lipid dan aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis tikus yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon, seng (Zn) dan vitamin E. *Majalah Kedokteran Bandung* XL(2):59-66.
- Astuti, S., D. Muchtadi, M. Astawan, B. Purwantara, dan T. Wresdiyati. 2009. Pengaruh pemberian tepung kedelai kaya isoflavon terhadap kadar malonaldehid (MDA), aktivitas superoksida dismutase (SOD) testis dan profil Cu,Zn-SOD tubuli seminiferi testis tikus jantan. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* XX(2) : 129-134.
- Astuti, S. 2009. Kualitas spermatozoa tikus jantan yang diberi tepung kedelai kaya isoflavon. *Majalah Kedokteran Bandung* 41(4):180-186.
- Astuti, S. dan Sutyarso. 2010. Pengaruh tepung kedelai kaya isoflavon terhadap testosteron serum, jumlah sel Leydig dan jumlah sel spermatogenik pada tubuli seminiferi testis tikus (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Biota*15(1):31-40.
- Atanassova, N. et al. 2000. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship of adult testis size and fertility : evidence for stimulatory effect of lowestrogen levels. *Endocrinol* 141:3898-3907
- Bourgeron, T. 2000. Mitochondrial function and male fertility. *Results Probl. Cell Differ.* 28: 187-210
- Brzozowski, A.M. et al. 1997. Molecular basic of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389:753-758
- Carreau, S., C. Genissel, B. Bilinska, and J. Levallet. 1999. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Inter J Androl* 22:211-223
- Carreau, S. et al. 2003. Aromatase expression and role of estrogen in male gonad :a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:35
- Cassidy, A., S. Bingham, and K.R.D. Setchell. 1994. Biological effects of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal woman. *Am J Clin Nutr* 60:333-340
- Colenbrander, B., A.R. Fazeli, A. Van Buiten, J. Parlevliet, and B.M. Gadella. 1992. Assesment of sperm cell membran integrity in the horse. *Acta Vet Scand Suppl.* 88:49-58
- de Lamirande, E. and C. Gagnon. 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa : Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 13(5):368-378

- Fritz, W.A., I.E. Eltoum, M.S. Cotroneo, and C.A. Lamartiniere. 2003. Genistein alters growth but is not toxic to the rat prostate. *J Nutr* 132:3007-3011.
- Gomez, E. et al. 1996. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa : correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl* 17:276-287.
- Griveau, J.F., E. Dumont, P. Renard, J.P. Callegari, and D. Le Lannou. 1995. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 103:17-26
- Hafez, B. and E.S.E. Hafez. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press, Inc., New York.
- Harborne, J.B. 1992. *The Flavonoids*. Chapman and Hall. London and New York.
- Heim, K.E., A.R. Tagliaferro, and D.J. Bobilya. 2002. Flavonoid : chemistry, metabolism and structure-activity relationship. *J Nutr Biochem* 13:572-584
- Helferich, W.G., C.D. Allred, and Ju Young-Hwa. 2001. Dietary Estrogens and Antiestrogens. Di dalam : Helferich W & Winter CK, editor. *Food Toxicology*. CRC Press, Boca Raton. hlm. 37-55
- Hess, R.A. 2003. Estrogen in the adult male reproductive tract : a review. *Reprod Biol Endocrinol* 1:52
- Indiana Soybean Board. 1998. Isoflavone Concentration in Soy Foods. <http://www.soyfood.com/nutrition/isoflavoneconcentration.html>.
- Iwasaki, A. and C. Gagnon. 1992. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 57(2):409-416.
- Kao-Shu Huei, Chao Hsiang-Tai, and Wei Yau-Huei. 1998. Multiple deletions of mitochondrial DNA are associated with the decline of motility and fertility of human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 4(7):657-666
- Kodama, H., Y. Kuribayashi, and C. Gagnon. 1996. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl* 17(2):151-157
- Kuiper, G.G.J.M., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, and J.A. Gustafsson. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930
- Kuiper, G.G.J.M. et al. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinol* 138:863-870

- Lee, J., N. Koo, and D.B. Min. 2004. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compre Rev in Food Sci and Food Safety* 3:21-33
- Luconi, M., L. Bonaccorsi, G. Forti, and E. Baldi. 2001. Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa : evidence for interaction with anongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Molec Cell Endocrinol* 178:39-45
- Matsuura, M. and A. Obata. 1993. β -Glucosidases from soybeans hydrolyzed daidzin and genistin. *J Food Sci* 58(1):144-147.
- Miksicek, R.J. 1994. Interaction of naturally occurring nosteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Molec Biol* 49:153-160.
- Nagata, C., N. Takatsuka, S. Inaba, N. Kawakami, and H. Shimizu. 1998. Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst* 90:1830-1835
- Nijveldt, R.J. et al. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74:418-425
- Nitta, H. et al. 1993. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinol* 132:1396-1401
- O'Connell, M., N. McClure, and S.E. Lewis. 2002. Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Hum Reprod* 17:1565-1570
- O'Donnell, L., K.M. Robertson, M.E. Jones, and E.R. Simpson. 2001. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Rev* 22(3) :289-318
- Oteiza, P.I., A.G. Erlejman, S.V. Verstraeten, C.L. Keen, and C.G. Fraga. 2005. Flavonoid-membrane interactions : A protective role of flavonoids at the membrane surface?. *Clin & Dev Immunol* 12(1):19-25
- Pokorny, J., N. Yanishlieva, and M. Gordon. 2001. *Antioxidant in Food*. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Potts, R.J., T.M. Jefferies, and L.J. Notarianni. 1999. Antioxidant capacity of the epididymis. *Hum Reprod* 14(10):2513-2516
- Rajasekaran, M., W.J. Hellstrom, R.K. Naz, and S.C. Sikka. 1995. Oxidative stress and interleukins in seminal plasma during leukocytospermia. *Fertil Steril* 64:166-171
- Revelli, A., M. Massobrio, and J. Tesarik. 1998. Nongenomic action of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Rev* 19(1):3-17

- Robertson, K.M., L. O'Donnell, E.R. Simpson, and M.E.E. Jones. 2002. The phenotype of the aromatase knockout mouse reveals dietary phytoestrogens impact significantly on testis function. *Endocrinol* 143(8):2913-2921
- Robbins, A. 1996. Androgens and male sexual behavior. *Trends Endocrinol Metab* 7:345-350
- Ruggiero, R.J., D. Pharm, F.E. Likis. 2002. Estrogen : physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery & Women's Health* 47(3):130-138
- Safe, S. 2000. Endocrine disruptors and human health – is there a problem? An update. *Environ Health Perspect* 108:487-493.
- Saija, A. et al. 1995. Flavonoids as antioxidant agents : importance of their interaction with bio-membranes. *Free Radic Biol & Med* 19(4):481-486
- Saleh, R.A. and A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 23(6):737-752
- Saleh, R.A. et al. 2003. Evaluatin of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 80:1431-1436
- Sanocka, D. and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2:12.
- Senger, P.L. 1999. *Pathway to Pregnancy and Parturition Current Conception*. Washington State University, Inc.
- Sevanian, A., M.L. Wratten, L.L. MacLeod, and E. Kim. 1988. Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids : a structural basis for enzyme activation. *Biochem Biophys Acta* 961:316-327
- Sikka, S.C., M. Rajasekaran, and W.J.G. Hellstrom. 1995. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* 16(6):464-468
- Sikka, S.C. 2004. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assister reproductive technology. *J Androl* 25(1):5-18
- Soeharso, P. 1985. Beberapa Aspek Biokimia Plasma Semen dan Spermatozoa. Di dalam: *Peranan Kesuburan dan Potensi Seks Pria dalam Kebahagiaan Perkawinan*. Simposium untuk Orang Awam. Jakarta. hlm 109-114.
- Sugihara, N., M. Ohnishi, K. Imamura, and K. Furuno. 2001. Differences in antioxidative efficiency of catechins in various metal-induced lipid peroxidation in cultured hepatocytes. *J of Health Sci* 47(2):99-106
- Schmild, M.K., and T.P. Labuza. 2001. *Essentials of Functional Foods*. Aspen Publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.

- Sharma, R.K. and A. Agarwal. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48(6):835-850
- Sharpe, R.M. 1998. The roles of oestrogen in the male. *TEM* 9(9):371-377
- Sharpe, R.M. and N.E. Skakkebaek. 1993. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of reproductive tract ? *Lancet* 341:1392-1395
- Toda, S. and Y. Shirataki. 1999. Inhibitory effect of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species. *Phytother Res* 13:163-165
- Tremellen, K. 2008. Oxidative stress and male infertility – a clinical perspective. *Hum Reprod Update* 14(3):243-258
- Valcarcel, A., M.A. de las Heras, L. Peres, D.F. Moses, and H. Baldassarre. 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Anim Reprod Sci* 45:299-309
- Zalata, A.A., A.H. Ahmed, S.S. Allamaneni, F.H. Comhaire, and A. Agarwal. 2004. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl* 6:313-318

-oo0oo-