

SAINS NATURAL

Jurnal Ilmiah Ilmu – ilmu Biologi dan Kimia
Volume 12 No. 3 Juli 2022

Pelindung :

Dr. Ir. Yunus Arifien, M.Si (Universitas Nusa Bangsa)

Penanggung Jawab (Advisory Editor)

Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Universitas Nusa Bangsa)

Ketua Dewan Redaksi (Editor in Chief)

Dra. Febi Nurilmala, M.Si (Bioteknologi, Universitas Nusa Bangsa)

Editor (Editors)

Dr. Agung Abadi Kiswandono, M.Sc (Kimia Analitik dan lingkungan, Universitas Lampung)

Mamay Maslahat, S.Si., M.Si (Kimia Analisis, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. Tri Retno Dyah Larasati, M.Si (Kimia Lingkungan, Pusat Aplikasi Isotop dan Radiasi-Badan Tenaga Nuklir Nasional)

Editor Bagian (Section Editors)

Devy Susanty, S.Pd., M.Si (Biokimia, Universitas Nusa Bangsa)

Mia Azizah, S.Si., M.Si (Ekologi, Universitas Nusa Bangsa)

Editor Bahasa (Copy Editors)

Srikandi, S.Si., M.Si (Mikrobiologi Tanah dan Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. Nia Yuliani, M.Pd (Fisiologi Tumbuhan, Universitas Nusa Bangsa)

Dra. I Gusti Ayu Manik Widayastini, M.Kes (Fisiologi Hewan, Universitas Nusa Bangsa)

Nina Ariesta, S.Pd., M.Si (Kimia Fisika, Universitas Nusa Bangsa)

Ade Ayu Oksari, S.Si., M.Si (Taksonomi, Universitas Nusa Bangsa)

Gladys Ayu Paramita Kusumah Wardhani, S.Si., M.Si (Kimia Anorganik, Universitas Nusa Bangsa)

Nurlela, S.Si., M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

Proofreaders

Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

Layout Editor

Dian Arrisujaya, S.Pd., M.Si (Analisis Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

Web Admin

Dian Arrisujaya, S.Pd., M.Si (Analisis Lingkungan, Universitas Nusa Bangsa)

Sekretariat Redaksi (Secretariat)

Nurlela, S.Si., M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)

Penerbit :

Fakultas MIPA Universitas Nusa Bangsa

Kantor :

Kampus Universitas Nusa Bangsa

Jl. Raya K. H. Sholeh Iskandar Km. 4, Cimanggu, Tanah Sareal Bogor 16166

Telp. (0251) 8340217, 7535605 Fax. (0251) 7535605

Website : <http://ejournalunb.ac.id/index.php/JSN/index>

e-mail : jsainsnatural.unb@gmail.com

Jurnal Sains Natural merupakan jurnal ilmiah yang memuat artikel hasil penelitian dan kupasan (*review*) dalam bidang Biologi dan Kimia yang orsinil dan belum serta tidak dipublikasikan dalam media lain. Naskah dikirim ke kantor editor. Naskah yang masuk akan melalui proses seleksi mitra bestari dan editor. Naskah yang dapat dimuat dengan perbaikan akan dikirimkan kembali ke penulis untuk disempurnakan, sedangkan naskah yang tidak dapat dimuat hanya akan dikembalikan jika disertai amplop balasan yang berperangko secukupnya. Informasi lengkap untuk pemuatan artikel dan petunjuk penulisan tersedia disetiap terbitan. Calon penulis artikel yang memerlukan petunjuk penulisan artikel, dapat menghubungi Redaksi Pelaksana Jurnal Sains Natural. Jurnal ini terbit secara berkala sebanyak dua kali dalam setahun (Januari dan Juli).

Journal of Natural Science is a scientific journal containing research articles and analysis (*review*) in the field of Biology and Chemistry of original and yet also not published in other media. The manuscript is sent to the office of the editor. Manuscript received will be through the selected partner process and editor. Scripts that can be loaded with the repair will be sent back to the author to be refined, while the script which can not be loaded will be returned only if accompanied by a stamped reply envelope. Complete information and instructions for loading article writing is available in every issue. Prospective authors of articles that need help writing the article, please contact the Managing Editor of Journal of Natural Science. The journal is published on a regular basis twice a year (January and July)

Mengutip ringkasan dan pernyataan atau mencetak ulang gambar atau tabel dari jurnal ini harus mendapat ijin dari penulis. Produksi ulang dalam bentuk kumpulan cetakan ulang untuk keperluan apapun harus seijin salah satu penulis dan mendapat lisensi dari penerbit. Jurnal ini diedarkan sebagai tukaran dan untuk perguruan tinggi, lembaga penelitian dan perpustakaan di dalam dan luar negeri.

Citing a summary and a statement or reprint pictures or tables from this journal should get permission from the author. Reproduced in the form of a collection of reprint for any purpose permission must be from one of the authors and get a license from the publisher. The journal is distributed as an exchange and for universities, research institutions and libraries at home and abroad.

KATA PENGANTAR

Penerbitan Jurnal Sains Natural Volume 12 No.3, Bulan Juli 2022 dapat terlaksana berkat kerja sama semua pihak. Kami berharap isi dalam Jurnal Sains Natural ini dapat menarik minat pembaca dan diambil manfaat serta kegunaan dari hasil – hasil penelitian di dalamnya.

Pada terbitan ini membahas aspek – aspek Biologi dan Kimia seperti: *Formulasi Susu Fermentasi dengan Prebiotik dari umbi Bit (Beta vulgaris L.) dan Ubi Jalar Kuning (Ipomoea batatas L.); Adsorpsi Phenol Biji Mangifera kemanga Blume; Penentuan Tetua Berbasis Analisis Molekuler Untuk Pembentukan Galur Kedelai; Masker Clay Ekstrak Etanol 96% Buah Pare (Momordica charantia L.); Fraksi Jamur Endofitik pada Bunga Sambiloto (Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees);*

Kami mengharapkan masukan – masukan berupa kritik maupun saran yang membangun yang ditujukan baik pada pengelola maupun para penulis jurnal ini. Kepada semua pihak yang telah terlibat dalam penerbitan ini, pengelola mohon maaf jika ada kesalahan – kesalahan yang tidak kami sengaja. Kami ucapkan terima kasih terutama pada mitra bestari atas segala bantuannya sehingga terbitnya Jurnal Ilmiah Sains Natural yang kami anggap kualitasnya sudah lebih baik.

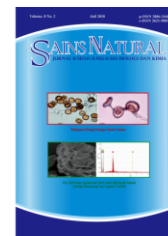
Bogor, Juli 2022

Ketua Dewan Redaksi

Sains Natural

Jurnal Ilmiah Ilmu – ilmu Biologi dan Kimia

Volume 12	Juli 2022	No. 3
<i>Research Articles</i>		
1. <i>Formulation Fermented Milk with Prebiotics from Beetroot (Beta vulgaris L.) and Yellow Sweet Potato (Ipomoea batatas L.) for Improvement Viability lactic acid bacteria</i> Cantika Zaddana, Fitria Dewi Sulistiyono, Novi Fajar Utami, Eka Novia Indriyani and Sara Nurmala.....		95-102
2. <i>Preparatoin, Characterization and Phenol Adsorption of Mangifera kemanga Blume Seed</i> Siti Hadiati Mardiah, Dian Arrisujaya, Devy Susanty and Nia Yuliani.....		103-111
3. <i>Determination of The Parents Based on Molecular Analysis for Soybean Lines Development</i> Slamet Slamet, Nonon Saribanon, Saptowo Jumali Pardal, Tatang Mitra Setia, Wening Enggarini and Reflinur Reflinur.....		112-123
4. <i>Inhibitory Capacity of Clay Mask 96% Ethanol Extract from Bitter Melon (Momordica charantia L.) Against Staphylococcus aureus</i> Siti Qur'aniati, I Gusti Ayu Manik Widhyastini and Devy Susanty.....		124-133
5. <i>Antibacterial Activity and Phytochemical Screening of The Fraction of Endophytic Fungus Derived from Sambiloto Flowers (Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees)</i> Firda Febria, Suryelita Suryelita and Riga Riga.....		134-142



FORMULATION FERMENTED MILK WITH PREBIOTICS FROM BEETROOT (*Beta vulgaris* L.) AND YELLOW SWEET POTATO (*Ipomoea batatas* L.) FOR IMPROVEMENT VIABILITY LACTIC ACID BACTERIA

Cantika Zaddana*, Fitria Dewi Sulistiyono, Novi Fajar Utami, Eka Novia Indriyani, dan Sara Nurmala
Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Pakuan
Jl. Pakuan, Tegallega, Kota Bogor, 16143, Indonesia.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 Apr 2022,

Revised 21 Jun 2022,

Accepted 24 Jun 2022,

Available online 30 Jul 2022

Keywords:

- ✓ Fermented milk
- ✓ Lactic Acid Bacteria
- ✓ Prebiotics
- ✓ Beetroot
- ✓ Yellow Sweet Potato

*corresponding author:

cantika.zaddana@unpak.ac.id

Phone: +6281212991600

[https://doi.org/10.31938/jsn.v](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.397)

[12i3.397](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.397)

ABSTRACT

Fermented milk is milk that is fermented by lactic acid bacteria (LAB). LAB can improve the immune system in the human body. The amount of LAB can be increased by the addition of prebiotics. Prebiotics can be found in various natural food sources, including beetroot and yellow sweet potato. This study aimed to determine the effect of adding beetroot and yellow sweet potato prebiotics to the amount of LAB in fermented milk. The research design was experimental using Completely Randomized Design (CRD). There were 6 Formulas which was F1 (0% beetroot: 0% yellow sweet potato); F2(10% beetroot:0% yellow sweet potato); F3(0% beetroot:10% yellow sweet potato); F4(5% beetroot: 5% yellow sweet potato); F5 (6% beetroot:4% yellow sweet potato); F6 (4% beetroot:6% yellow sweet potato). Analysis of the amount of LAB of fermented milk using the TPC method. Proximate analysis using SNI and AOAC methods. The analysis of fermented milk selected from the results of the number of LAB and the hedonic test was F6. The results of the study showed that number of LAB 8×10^8 CFU/mL; pH 3,984; water content 81,46%; 0,61% ash content; protein content 2,36%; fat content 3,48%; carbohydrate content 12,09%; Pb contamination 0,01 mg/kg; Hg contamination <0,005 mg/kg; negative Coliform and Salmonella bacteria contamination; and organoleptically preferred by the panelists. In conclusion, fermented milk F6 with the addition of 4% beetroot and 6% yellow sweet potato can increase the amount of LAB.

ABSTRAK

Formulasi Susu Fermentasi dengan Prebiotik dari umbi Bit (*Beta vulgaris* L.) dan Ubi Jalar Kuning (*Ipomoea batatas* L.) untuk Peningkatan Viabilitas Bakteri Asam Laktat

Susu fermentasi merupakan susu yang difermentasikan oleh bakteri asam laktat (BAL). Dalam jumlah yang cukup BAL dapat meningkatkan sistem kekebalan imun pada tubuh manusia. Jumlah BAL dapat meningkat dengan penambahan prebiotik. Prebiotik dapat ditemukan dalam berbagai sumber pangan di alam, salah satunya yaitu umbi bit dan ubi jalar kuning. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penambahan prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning terhadap jumlah BAL pada susu fermentasi. Desain penelitian, yaitu eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Terdapat 6 Formula yaitu F1 (0% umbi bit: 0% ubi jalar kuning); F2(10% umbi bit:0% ubi jalar kuning); F3(0% umbi bit:10% ubi jalar kuning); F4(5% umbi bit: 5% ubi jalar kuning); F5 (6% umbi bit:4% ubi jalar kuning); F6 (4% umbi bit:6% ubi jalar kuning). Analisis jumlah BAL susu fermentasi menggunakan metode TPC. Analisis proksimat menggunakan metode SNI dan AOAC. Analisis susu fermentasi terpilih dari hasil jumlah BAL dan hasil uji hedonik adalah F6 (umbi bit 4% dan ubi jalar kuning 6%). Hasil penelitian yaitu jumlah BAL 8×10^8 CFU/mL; nilai pH 3,984; kadar air 81,46%; kadar abu 0,61%; kadar protein 2,36%; kadar lemak 3,48%; kadar karbohidrat 12,09%; kadar cemaran Pb 0,01 mg/kg; kadar cemaran Hg <0,005 mg/kg; negatif cemaran bakteri Coliform dan Salmonella; dan secara organoleptik disukai oleh panelis. Kesimpulan, susu fermentasi dengan penambahan umbi bit 4% dan ubi jalar kuning 6% dapat meningkatkan jumlah BAL.

Kata kunci: Susu fermentasi, Bakteri Asam Laktat, Prebiotik, Umbi Bit, Ubi Jalar Kuning



PENDAHULUAN

Susu fermentasi merupakan produk olahan susu dengan bantuan bakteri melalui proses fermentasi (Syachroni *et al.*, 2020). Kandungan gizi pada susu fermentasi antara lain protein, lemak, karbohidrat, kalsium, fosfor, natrium, vitamin A, vitamin C (Kemenkes, 2018). Selain memiliki kandungan gizi yang tinggi, keuntungan dari penggunaan mikroba untuk fermentasi susu adalah sifat probiotiknya (Rahayu *et al.*, 2020). Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang jika diberikan dalam jumlah yang memadai dapat memberikan manfaat kesehatan pada tubuh inang, diantaranya dapat meningkatkan sistem kekebalan imun pada tubuh (Hill *et al.*, 2014). Untuk mendapatkan manfaat probiotik maka susu fermentasi harus mengandung bakteri probiotik minimal 1×10^6 (BSN, 2009). Selain keunggulan probiotik yang dimiliki oleh susu fermentasi, produk olahan susu ini juga dapat menjadi solusi bagi penderita intoleransi laktosa. Penderita intoleransi laktosa memiliki sindroma klinis seperti sakit perut, diare, mual, kembung, dan produksi gas di usus meningkat setelah konsumsi makanan yang mengandung laktosa khususnya susu sehingga susu fermentasi dapat menjadi alternatif bagi penderita intoleransi laktosa untuk memenuhi kebutuhan gizinya (Hardiansyah, 2020).

Pembuatan minuman susu fermentasi dapat dikembangkan dengan penambahan prebiotik untuk meningkatkan nilai fungsionalnya. Prebiotik merupakan karbohidrat makanan yang memiliki metabolisme selektif di usus besar dan berfungsi untuk meningkatkan jumlah probiotik seperti bakteri penghasil asam laktat, termasuk bifidobacteria (Kusmiyati, 2020). Umbi-umbian seperti umbi bit dan ubi jalar kuning adalah jenis tanaman yang berpotensi memiliki aktivitas prebiotik. Setiap 100 g umbi bit mengandung karbohidrat sebesar 9,6 g dan setiap 100 g ubi jalar kuning mengandung karbohidrat yang tinggi sebesar 25,1 g (Kemenkes, 2018). Umbi bit selain mengandung karbohidrat, juga mengandung senyawa aktif yaitu betalain yang mengandung pigmen berwarna merah sebagai pewarna alami (Skalicky *et al.*, 2020). Ubi jalar kuning mengandung oligosakarida yang dapat berfungsi sebagai prebiotik bagi bakteri probiotik melalui proses fermentasi, sehingga dihasilkan efek sinbiotik (Rahmawati, 2015). Penambahan kombinasi prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning dalam pembuatan susu fermentasi ini diharapkan dapat meningkatkan jumlah probiotik yaitu BAL

jika dibandingkan dengan tanpa penambahan prebiotik ataupun hanya penambahan salah satu tanaman prebiotik saja.

Penelitian ini bertujuan untuk membuat dan mengevaluasi formula susu fermentasi yang ditambahkan prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning yang sesuai dengan persyaratan mutu SNI dan disukai oleh panelis.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi bit, ubi jalar kuning, susu segar, susu skim, sukrosa, starter komersil (YOE), media *deMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), Bacto agar, media *Methylene Blue Agar* (EMBA), media *Bismuth Sulfit Agar* (BSA), aquadest steril, H₂SO₄, asam borat, HCl, NaOH, heksana, HNO₃.

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan, alat parut, corong, kain batis, botol kaca, kompor gas, panci, batang pengaduk, thermometer, gelas ukur (Pyrex), inkubator, pH meter, autoklaf, tabung reaksi (Pyrex), pemanas listrik, cawan petri, gelas, labu ekstraksi, labu Kjeldahl, tanur, erlenmeyer (Pyrex), pipet volumetrik (Pyrex), pipet tetes, *bulp pump*, *Spektrofotometri Serapan Atom* (SSA).

Metode

Pembuatan Starter

Starter menggunakan merek YOE yang proses pembuatannya sesuai petunjuk pada label, yaitu dengan cara susu segar 500 mL dipasteurisasi pada suhu 80-90°C. Susu yang telah dipasteurisasi kemudian didinginkan sampai suhu 30-45°C, lalu ditambahkan bibit starter kering YOE yang mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebanyak 14 gram. Campuran tersebut diaduk sampai homogen dan ditutup rapat lalu diinkubasi pada suhu 42-43°C selama 18 jam.

Pembuatan Sari Prebiotik

Umbi bit (*Beta vulgaris L.*) dan ubi jalar kuning (*Ipomoea batatas L.*) masing-masing 1 kg dikupas, dicuci bersih, dihaluskan dengan cara diparut sehingga dihasilkan bubur umbi bit dan ubi jalar kuning. Bubur umbi bit dan ubi jalar kuning kemudian diperas masing-masing menggunakan kain batis dan filtratnya dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 menit (Utami *et al.*, 2010)

Tabel 1. Formulasi Susu Fermentasi

Bahan	Formula (%)					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Sari Umbi bit merah	-	10	-	5	6	4
Sari Ubi jalar kuning	-	-	10	5	4	6
Susu Skim	5	5	5	5	5	5
Sukrosa	5	5	5	5	5	5
Starter	5	5	5	5	5	5
Susu Segar	ditambahkan sampai 100					

Pembuatan Susu Fermentasi

Susu segar, susu skim, dan sukrosa dicampurkan, dipasteurisasi pada suhu 80-90°C selama 15 menit, lalu didinginkan hingga mencapai suhu 40-45°C. Filtrat prebiotik dan starter siap pakai ditambahkan secara aseptik pada suhu 40-45°C. Campuran filtrat prebiotik dan starter diaduk hingga homogen, diinkubasi selama 18 jam pada suhu 40-45°C (Utami *et al.*, 2010).

Pengujian Mutu Susu Fermentasi

Pemeriksaan Organoleptik dan Hedonik

Pemeriksaan organoleptik dilakukan terhadap bentuk fisik dari sediaan susu fermentasi dengan penilaian parameter tekstur, aroma (bau), dan rasa. Pengujian dilakukan terhadap 30 panelis laki-laki dan perempuan yang berusia 18 – 30 tahun dan tidak memiliki alergi susu sapi dengan kriteria penilaian skor skala 1-5, yaitu 5 = sangat suka, 4 = suka, 3 = agak suka, 2 = tidak suka dan 1 = sangat tidak suka. Hasil penilaian dikumpulkan dan selanjutnya data tersebut diolah secara statistik menggunakan metode *one way ANOVA* (BSN, 2006)

Jumlah Bakteri Asam Laktat (BAL)

Jumlah bakteri asam laktat dihitung pada pengenceran sampel 10^7 - 10^8 menggunakan media campuran MRSB dan Bacto Agar sebagai pematid media. Sampel 0,1 mL hasil pengenceran dipipet ke dalam cawan petri steril yang berisi media yang sudah padat dengan metode cawan sebar (*spread plate*), cawan petri diinkubasikan pada suhu 37°C selama 48 jam. Hasil jumlah bakteri asam laktat terbanyak pada formula kombinasi prebiotik dilakukan pengujian zat gizi (Hidayat *et al.*, 2013)

Pemeriksaan pH

Pengujian pH menggunakan alat pH meter. Sebelum melakukan pengujian, pH meter harus dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH.

Pengujian dilakukan dengan mencelupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling ke dalam sampel yang akan di uji (BSN, 1992).

Identifikasi Cemaran Bakteri Coliform dan Salmonella

Identifikasi cemaran bakteri *Coliform* menggunakan media EMBA sedangkan identifikasi cemaran bakteri *Salmonella* menggunakan media BSA. Pengenceran sampel dilakukan dari 10^1 - 10^2 . Sampel 0,1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media yang sudah padat menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*), sampel disebar menggunakan alat L rod (batang L). Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Suardana *et al.*, 2014).

Identifikasi Cemaran Logam

Logam Timbal (Pb). Prinsip pengerjaan dengan melebur sampel dengan cara pengabuan kering pada suhu 500°C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut kemudian dihitung menggunakan alat *Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)* (BSN, 2009).

Logam Merkuri (Hg). Prinsip pengerjaan yaitu dengan mereaksikan senyawa raksa dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam sehingga akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan *Spektrofotometer Serapan Atom* tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm (BSN, 2009).

Uji Proksimat. Produk susu fermentasi terpilih berdasarkan jumlah bakteri asam laktat terbanyak dan uji hedonik selanjutnya dilakukan pengujian proksimat meliputi uji kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak dan kadar karbohidrat. Analisis kadar air (metode gravimetri) sesuai AOAC Internasional (AOAC, 2005), kadar abu

(metode gravimetri) dan kadar protein (metode *Kjedahl*) sesuai dengan SNI 7552:2009 (BSN, 2009), kadar lemak (metode *Soxhlet*) sesuai dengan SNI 01-2891-1992 (BSN, 1992) dan kadar karbohidrat (metode *by difference*) sesuai Pedoman Evaluasi Mutu Gizi dan Non Gizi Pangan (BPOM, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Susu fermentasi dengan penambahan umbi bit dan ubi jalar kuning merupakan produk sinbiotik. Sinbiotik ialah gabungan dari probiotik dan prebiotik yang memiliki potensi sinergi (Cahyadi, 2019). Produk sinbiotik memiliki keuntungan yaitu membantu bakteri probiotik untuk meningkatkan daya tahan hidupnya dengan memanfaatkan substrat yang ada pada prebiotik, sehingga dapat meningkatkan manfaat probiotik jika dikonsumsi (Ruslian & Arumsari, 2021). Susu fermentasi dengan penambahan umbi bit dan ubi jalar kuning yang dihasilkan pada penelitian ini memiliki jumlah BAL yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yaitu susu fermentasi dengan penambahan umbi bit 4% dihasilkan jumlah BAL sebesar $1,7 \times 10^8$ CFU/mL (Pramiarti *et al.*, 2016) sedangkan susu fermentasi dengan penambahan ubi jalar kuning 10% dihasilkan jumlah BAL $8,63 \times 10^7$ CFU/mL (Retnati *et al.*, 2009)

Hasil Pengujian Organoleptik dan Hedonik

Hasil pemeriksaan organoleptik dilakukan pada seluruh formula. Untuk parameter tekstur, seluruh formula memiliki tekstur yang kental. Tekstur kental yang dihasilkan karena aktivitas bakteri asam laktat (BAL) akan memecah molekul protein menjadi peptide sehingga butiran-butiran pada susu akan berubah menjadi molekul yang lebih kecil, protein tersebut terkoagulasi dalam proses fermentasi sehingga tekstur dari susu fermentasi akan menjadi kental (Khoiriyah & Fatchiyah, 2013). Aroma dari seluruh formula ialah asam/khas susu fermentasi, kecuali pada F3 dan F6 karena mengandung ubi jalar kuning yang lebih banyak. Bakteri *Lactobacillus bulgaricus* berperan dalam menghasilkan bau khas (asam) tersebut, dimana produk metabolit dari bakteri *Lactobacillus bulgaricus* selain asam laktat, terdapat juga komponen aroma seperti asetildehid dan diasetil (Hendarto *et al.*, 2019). Rasa dari seluruh formula ialah asam, dimana bakteri *Streptococcus thermophilus* lebih berperan dalam menghasilkan cita rasa dan tingkat keasaman pada

susu fermentasi karena peran bakteri tersebut dalam menurunkan pH (Syainah *et al.*, 2014).

Uji hedonik dilakukan pada ketiga formula kombinasi penambahan prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan analisis data hasil uji hedonik menggunakan metode *oneway* ANOVA, parameter kesukaan tekstur dan rasa tidak berbeda nyata karena pada ketiga formula memiliki tekstur dan rasa yang hampir sama. Pada parameter kesukaan bau (aroma) terdapat perbedaan nyata pada uji lanjutan Duncan (0,05). Dimana nilai terendah terdapat pada F6, karena bau yang lebih dominan ialah bau ubi jalar kuning sehingga nilai kesukaan panelis pada F6 lebih rendah daripada F4 dan F5 yang memiliki bau normal/khas susu fermentasi. Secara keseluruhan panelis menyukai ketiga formula.

Tabel 2. Hasil Uji Hedonik

Parameter Uji	F4	F5	F6
Tekstur	4,20 ^a	4,23 ^{ab}	4,57 ^{bc}
Bau	4,10 ^a	4,20 ^a	3,67 ^b
Rasa	4,10 ^a	4,03 ^a	4,14 ^a

Hasil Pengujian Jumlah BAL

Hasil pengujian jumlah BAL disajikan pada Tabel 3. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada penambahan prebiotik umbi bit 10% total bakteri asam laktat mengalami penurunan jika dibandingkan dengan susu fermentasi tanpa penambahan prebiotik.

Tabel 3. Hasil Uji Jumlah BAL

Sampel	Jumlah BAL (CFU/ml)	SNI
F1	$4,6 \times 10^8$	
F2	4×10^8	
F3	$6,7 \times 10^8$	Min. 10^6
F4	7×10^8	
F5	6×10^8	
F6	8×10^8	

Penurunan jumlah BAL ini sejalan dengan penelitian Ruhama (2016) dimana pada penambahan sari umbi bit hingga 6% cenderung dapat menurunkan total bakteri asam laktat. Umbi bit memiliki kandungan senyawa fenol dan flavonoid dimana kedua senyawa tersebut memiliki kemampuan sebagai antibakteri.

Kandungan fenol pada umbi bit ialah 376,4 mg/g dan flavonoid 253,5 mg/g (Ruhama, 2016). Mekanisme antibakteri dari fenol ialah dengan merusak dinding sel dan merusak enzim-enzim pada bakteri. mekanisme flavonoid sebagai antimikroba ialah dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi sitoplasma dan menghambat metabolisme energi (Manik *et al.*, 2014). Oleh sebab itu penambahan prebiotik umbi bit yang semakin banyak dapat menurunkan jumlah bakteri asam laktat pada susu fermentasi.

Kenaikan jumlah bakteri asam laktat tertinggi terdapat pada F6. Jumlah bakteri asam laktat dapat meningkat karena terdapat substrat berupa karbohidrat yang dimanfaatkan oleh BAL dalam jumlah yang cukup. Sumber karbohidrat pada pembuatan susu fermentasi dengan penambahan umbi bit dan ubi jalar kuning ialah dari susu yang memiliki karbohidrat utama yaitu laktosa, kemudian terdapat penambahan sukrosa, dan terdapat karbohidrat yang berasal dari umbi bit dan ubi jalar kuning. Umbi bit memiliki kandungan karbohidrat sebesar 9,6 gr/100 gr dan ubi jalar kuning memiliki kandungan karbohidrat sebesar 25,1 gr/100 gr (Kemenkes, 2018). Ubi jalar merupakan tanaman alternatif yang mengandung karbohidrat yang berpotensi sebagai sumber prebiotik (Barus *et al.*, 2021). Sehingga kombinasi dari prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning ini lebih baik dalam meningkatkan jumlah probiotik yaitu BAL daripada hanya penambahan salah satu prebiotik saja.

Hasil Pengujian pH

Hasil pengujian nilai pH pada seluruh formula disajikan pada Tabel 4., didapatkan nilai pH terendah pada formula 6 (umbi bit 4% dan ubi jalar kuning 6%) dan untuk pH tertinggi terdapat pada formula 2 (umbi bit 10%). Penurunan pH yang terjadi berkaitan dengan jumlah bakteri asam laktat pada susu fermentasi. Selama proses fermentasi bakteri asam laktat akan merubah karbohidrat (gula) yang ada menjadi asam laktat, dimana asam laktat merupakan asam organik utama yang dihasilkan sehingga terjadi penurunan pH (Syachroni *et al.*, 2020). Semakin tinggi kandungan asam laktat maka nilai pH akan semakin rendah (Syachroni *et al.*, 2020). Berdasarkan *International Dairy Foods Association* (IDFA) syarat pH yaitu maksimal 4,6 sedangkan berdasarkan *Food Standards Australia New Zealand Act* (FSANZ) syarat pH maksimal 4,5. Jika dilihat dari kedua acuan tersebut, nilai pH untuk seluruh formula sudah memenuhi persyaratan.

Tabel 4. Hasil Uji pH

Sampel	pH	IDFA	FSANZ
F1	4,071		
F2	4,091		
F3	4,011		
F4	3,988	Maks. 4,6	Maks. 4,5
F5	4,046		
F6	3,984		

Hasil Uji Cemaran Bakteri

Hasil uji cemaran bakteri *coliform* dan *salmonella* dapat dilihat pada Tabel 5. Hasil uji cemaran bakteri *coliform* pada susu fermentasi ialah negatif dengan ditandai tidak ada terbentuknya pertumbuhan koloni yang berwarna hijau dengan kilap logam dan bintik biru kehijauan pada media, hal ini diduga karena pada pembuatan susu fermentasi terdapat proses pasteurisasi 80-90°C selama 15 menit. Menurut penelitian Kristianti menunjukkan bahwa pada susu pasteurisasi 95°C selama 21 detik tidak ditemukan bakteri *E. coli* dan *coliform* (Kristianti, 2017). Pada sediaan susu fermentasi dengan penambahan prebiotik umbi bit dan ubi jalar kuning tidak mengandung bakteri *salmonella* karena selama proses pembuatan susu fermentasi sudah melalui proses yang baik dan benar. Salah satu proses yang berperan yaitu pasteurisasi dimana bakteri *salmonella* tidak dapat bertahan atau mati karena pemanasan pada suhu 71,1°C (Desnilasari & Lestari, 2014). Bakteri asam laktat juga menghasilkan senyawa bakteriosin yaitu peptida yang disintesis dalam ribosoma yang merupakan senyawa antimikrobal sehingga dapat menekan pertumbuhan bakteri patogen (Surono, 2016).

Tabel 5. Hasil Uji Cemaran Bakteri

Sampel	<i>Coliform</i>	<i>Salmonella</i>
F4	Negatif	Negatif
F5	Negatif	Negatif
F6	Negatif	Negatif

Hasil Pengujian Cemaran Logam Pb dan Hg

Identifikasi cemaran logam merupakan parameter untuk menentukan mutu produk pangan. Keracunan logam timbal secara akut dapat menyebabkan tidak nafsu makan, sakit kepala, hipertensi, nyeri perut, gangguan fungsi ginjal, kelelahan, sulit tidur, arthritis, halusinasi dan vertigo (Adhani dan Husaini, 2017), sedangkan toksisitas logam Hg dapat menyebabkan *disfungsi blood brain barrier*,

merusak permeabilitas membran, menghambat beberapa enzim, menghambat sintesa protein, dan menghambat penggunaan substrat protein (Hananingtyas, 2017). Hasil analisis cemaran logam dapat dilihat pada Tabel 6, dimana terdeteksi cemaran logam Pb dan Hg walaupun nilainya dibawah batas maksimal cemaran logam Pb yaitu sebesar 0,02 mg/kg dan logam Hg sebesar 0,03 mg/kg berdasarkan ketentuan SNI (7552:2009).

Tabel 6. Hasil Uji Cemaran Logam

Sampel	Pb (mg/kg)	Hg (mg/kg)
F4	0,01	<0,005
F5	0,01	<0,005
F6	0,01	<0,005

Cemaran timbal yang terdeteksi diduga dapat berasal dari hasil pembuangan asap kendaraan bermotor di udara dan dapat meluruh ke tanah (Maghfirah, 2020). Komposisi dan pH tanah dangat mempengaruhi sirkulasi logam timbal dari tanah ke tanaman, sebagian besar logam timbal terakumulasi pada tanaman di bagian batang, daun, dan akar (Wiyantoko *et al.*, 2017). Cemaran merkuri dapat terjadi melalui tanah yang tercemar, kemudian logam merkuri akan terserap dan mengendap di akar tumbuhan (Ali Ifanayanti, Rondonuwu B Sendy, 2019).

Hasil Analisis Proksimat Formula Terpilih

Dilakukan analisis proksimat meliputi kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak dan kadar karbohidrat pada formula terpilih berdasarkan jumlah bakteri asam laktat terbanyak dan formula yang disukai oleh panelis yaitu F6 (umbi bit 4% dan ubi jalar kuning 6%).

Tabel 7. Hasil Analisis Proksimat F6

Parameter (%)	F6 (bit 4% : ubi jalar kuning 6%)
Kadar air	81,46%,
Kadar abu	0,61%
Kadar protein	2,36%
Kadar lemak	3,48%
Kadar karbohidrat	12,09%

Pada proses analisis didapatkan nilai kadar air yaitu 81,46%, naik atau turunnya kadar air pada susu fermentasi dapat diakibatkan karena

proses fermentasi oleh bakteri asam laktat (Nuraeni *et al.*, 2020). Pada pengujian kadar abu didapatkan hasil sebesar 0,61%, nilai tersebut dibawah batas maksimal kadar abu menurut SNI yaitu maks. 1%. Pengujian kadar abu bertujuan untuk mengetahui gambaran kandungan mineral serta untuk mengontrol cemaran dari benda-benda organik seperti debu ataupun zat lain yang ikut terbawa (Azizah & Salamah, 2013).

Hasil analisis kadar protein yaitu 2,36%, hasil kadar protein pada F6 sudah sesuai dengan persyaratan SNI yaitu min. 1,0%. Bakteri asam laktat memanfaatkan kandungan protein untuk menyusun pembentukan sel (Putri, 2017). Selain itu protein digunakan bakteri asam laktat untuk meningkatkan nilai gizi dan sebagai sumber nitrogen, dimana protein akan dirombak menjadi senyawa asam amino yang lebih sederhana (Fadro *et al.*, 2015).

Kadar lemak yang dihasilkan dari analisis pada F6 sebesar 3,48%, hasil tersebut sudah sesuai dengan persyaratan SNI yaitu min. 2,7%. Proses fermentasi dapat membentuk gliserol. Hal ini karena bakteri fermentasi merupakan pereduksi yang kuat dan pada saat terjadi proses fermentasi, karbohidrat akan mengalami reduksi aldehyd menjadi alkohol dimana salah satunya akan terbentuk gliserol (Wardhani *et al.*, 2015).

Hasil penentuan total kadar karbohidrat sebesar 12,09%. Pada penelitian Eveline dan Nawangsih (2019) mengenai pembuatan susu fermentasi (yoghurt) dengan penambahan sari bit kadar karbohidrat yang dihasilkan sebesar 8,66%. Jika dibandingkan kadar karbohidrat pada penelitian ini lebih tinggi, hal tersebut dapat dikarenakan konsentrasi sari bit yang ditambahkan lebih banyak dan terdapat penambahan sari ubi jalar kuning yang memiliki kandungan karbohidrat yang cukup tinggi, yaitu setiap 100 g ubi jalar kuning mengandung karbohidrat yang tinggi sebesar 25,1 g (Kemenkes, 2018).

KESIMPULAN

Susu fermentasi F6 dengan penambahan umbi bit 4% dan ubi jalar kuning 6% merupakan formula terbaik berdasarkan jumlah bakteri asam laktat terbanyak yaitu 8×10^8 CFU/ml dan disukai oleh panelis. Hasil pengujian nilai gizi protein, lemak dan karbohidrat pada formula 6 sudah memenuhi persyaratan mutu SNI.

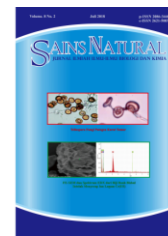
UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Pakuan yang telah mendanai penelitian ini hingga selesai

DAFTAR PUSTAKA

- Adhani, R., & Husaini. (2017). *Logam Berat Sekitar Manusia*. Banjarmasin: Lambung Mangkurat University Press.
- Ali Ifanayanti, Rondonuwu B Sendy, D. J. N. F. (2019). *Analisis Kandungan Merkuri Pada Tanah Dan Umbi Tanaman Ubi Kayu (Manihot Esculenta Crantz) Di Daerah*. 8(3), 227–230.
- Azizah, B., & Salamah, N. (2013). Standarisasi Parameter Non Spesifik Dan Rimpang Kunyit Standardization of Non Specific Parameter and Comparative Levels of Curcumin Extract Ethanol and Extract of Purified Turmeric Rhizome. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 3(1), 21–30.
- Badan Standarisasi Nasional. (1992). *Cara Uji Makanan dan Minuman SNI 01-2891-1992. BSN (Badan Standarisasi Nasional)*.
- Badan Standarisasi Nasional. (2006). *Petunjuk Pengujian Organoleptik dan atau Sensori. BSN (Badan Standarisasi Nasional)*.
- Badan Standarisasi Nasional. (2009). *Minuman susu fermentasi berperisa SNI 7552: 2009. BSN (Badan Standarisasi Nasional)*.
- Barus, W. L., Bachruddin, Z., Hanim, C., & Yusiati, L. M. (2021). Effect of yellow sweet potato extract (*Ipomoea batatas L.*) as a prebiotic source for the kinetics of fermentation and the production of lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 686(1).
- Cahyadi, W. (2019). Korelasi Campuran Starter *Lactobacillus Plantarum* Dengan *Streptococcus Thermophilus* Terhadap Karakteristik Minuman Sinbiotik Ubi Jalar (*Ipomoea Batatas L.*) Kuning. *Pasundan Food Technology Journal*, 6(1), 60.
- Desnilasari, D., & Lestari, N. P. A. (2014). Formulasi Minuman Sinbiotik Dengan Penambahan Puree Pisang Ambon (*Musa Paradisiaca Var Sapientum*) Dan Inulin Menggunakan Inokulum *Lactobacillus casei*. *Jurnal Agritech*, 34(03), 257.
- Suardana, I. W., Utama, I. H., & Wibowo, H. (2014). *Identification of Escherichia coli O157 : H7 from Chicken Feces and Test of Hemolytic Profile on Blood Agar Medium*. *Jurnal Kedokteran Hewan* Vol. 8 No. 1
- Fadro, Efendi, R., & Restuhadi, F. (2015). Pengaruh Penambahan Susu Skim dalam Pembuatan Minuman Probiotik Susu Jagung (*Zea mays L.*) Menggunakan Kultur *Lactobacillus acidophilus*. *Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Riau, Pekanbaru*, 14(2), 28–36.
- Hananingtyas, I. (2017). Bahaya Kontaminasi Logam Berat Merkuri (Hg) dalam Ikan Laut dan Upaya Pencegahan Kontaminasi pada Manusia. *Al-Ard: Jurnal Teknik Lingkungan*, 2(2), 38–45.
- Hardiansyah, A. (2020). Identifikasi Nilai Gizi Dan Potensi Manfaat Kefir Susu Kambing Kaligesing. *Journal of Nutrition College*, 9(3), 208–214.
- Hendarto, D. R., Handayani, A. P., Esterelita, E., & Handoko, Y. A. (2019). Mekanisme Biokimiawi dan Optimalisasi *Lactobacillus bulgaricus* Berkualitas. *Jurnal Sains Dasar*, 8 (1)(1), 13–19.
- Hidayat, I. R., Kusrahayu, & Mulyani, S. (2013). Total Bakteri Asam Laktat, Nilai pH dan Sifat Organoleptik Drink Yoghurt Dari Susu Sapi yang Diperkaya Dengan Ekstrak buah Mangga. *Animal Agriculture Journal*, 2(1), 160–167.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 11(8), 506–514.
- Kementrian Kesehatan. (2018). *Tabel Komposisi Pangan Indonesia 2017*. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI Direktorat Jenderal Kesehatan Masyarakat
- Khoiriyah, L. K., & Fatchiyah, F. (2013). Karakter Biokimia dan Profil Protein Yogurt Kambing PE Difermentasi Bakteri Asam Laktat (BAL). *The Journal of Experimental Life Sciences*, 3(1), 1–6.
- Kristanti, N. D. (2017). The effect of pasteurization milk storage to quality

- microbe thermotolerant and chemical properties. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Hasil Ternak*, 12(1), 1–7.
- Kusmiyati, N. (2020). Prebiotik: Nutrisi Sehat Saluran Pencernaan. CV. Pena Persada, 128.
- Maghfirah, N. (2020). *Analisis Kadar Timbal (Pb) Dalam Tanah Dan Tanaman Padi Di Jalan Medan Lubuk Pakam Deli Serdang Tahun 2019 Skripsi*.
- Manik, D. F., Hertiani, T., & Anshory, H. (2014). Analisis Korelasi Antara Kadar Flavonoid Dengan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Fraksi-Fraksi Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Terhadap *Staphylococcus Aureus*. *Khazanah*, 6(2), 1–11.
- Nuraeni, S., Purwasih, R., & Romalasari, A. (2020). Analisis Proksimat Yogurt Susu Kambing Dengan Penambahan Jeruk Bali (*Citrus Grandis L. Osbeck*). *Jurnal Ilmiah Ilmu Dan Teknologi Rekayasa*, 2(1), 20–24.
- Pramiarti Pasca, F., Nurwantoro, N., & Pramono, Y. B. (2016). Total Bakteri Asam Laktat, Kadar Asam Laktat, dan Warna Yogurt Drink dengan Penambahan Ekstrak Bit (*Beta Vulgaris L.*). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 5(4), 154–156.
- Putri, K. A. W. (2017). *Pengaruh Penambahan Madu Dan Lama Fermentasi Terhadap Karakteristik Fisika, Kimia Dan Biologi Yoghurt Susu Jagung (Zea Mays L. Saccharata)*.
- Rahayu, W. P., Suliantari, S., Safitri, U. K., & Adhi, W. (2020). Susu Fermentasi Dengan Biji Nangka Sebagai Prebiotik. In *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* (Vol. 31, Issue 2, pp. 138–146).
- Rahmawati, I. (2015). Evaluasi Pertumbuhan Isolat Probiotik (*L. Casei* Dan *L. Plantarum*) Dalam Medium Fermentasi Berbasis Ubi Jalar (*Ipomoea Batatas L.*) Selama Proses Fermentasi (Kajian Jenis Isolat Dan Jenis Tepung Ubi Jalar). *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*, 4(4).
- Retnati, R., Andriani, M. A. M., & Fauza, G. (2009). The influence of addition of various sweet potatoes (*Ipomea batatas*) extract to total count of cells and antioxidant activity in yogurt. *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry*, 7(2), 68–76.
- Ruhama, H. (2016). Pengaruh Tingkat Penggunaan Bit (*Beta vulgaris L.*) Terhadap Total Bakteri Asam Laktat, pH dan Nilai Kesukaan Set Yogurt. *Student E-Journal*, 5(1), 1–12.
- Ruslian, R. D., & Arumsari, A. (2021). Perbandingan Jumlah Bakteri Asam Laktat Yoghurt Sinbiotik dari Bakteri *Lactobacillus Bulgaricus* dan *Streptococcus Thermophilus* yang Diperkaya Fruktooligosakarida dan Inulin. *Prosiding Farmasi*, 7(1), 21–29.
- Skalicky, M., Kubes, J., Shokoofeh, H., Tahjib-Ul-Arif, M., Vachova, P., & Hejnak, V. (2020). Betacyanins and betaxanthins in cultivated varieties of *beta vulgaris L.* compared to weed beets. *Molecules*, 25(22), 1–15.
- Surono, I. S. (2016). *Probiotik, mikroorganisme dan pangan fungsional*. Depublish. Binus University.
- Syachroni, Maruddin, F., Yuliaty, F. N., & Mukhlisah, A. N. (2020). *Jurnal Sains dan Teknologi Peternakan Karakteristik Mikrobiologi dan Menggunakan Kultur Campuran Lactobacillus acidophilus Kimiawi Susu Fermentasi Lactobacillus plantarum dan*. 1(2), 2–7.
- Syainah, E., Novita, S., & Yanti, R. (2014). Kajian pembuatan yoghurt dari berbagai jenis susu dan inkubasi yang berbeda terhadap mutu dan daya terima. *Skala Kesehatan*, 5(1), 48–58.
- Utami, R., Andriani, M. A. M., & Putri, Z. A. (2010). (*Ipomea Batatas*) Kinetics Fermentation Of Yoghurt Enriched By Sweet Potato (*Ipomea Batatas*). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, XXV (1), 51–55.
- Wardhani, D. H., Maharani, D. C., & Prasetyo, E. A. (2015). Kajian Pengaruh Cara Pembuatan Susu Jagung, Rasio dan Waktu Fermentasi terhadap Karakteristik Yoghurt Jagung Manis. *Momentum*, 11(1), 7–12.
- Wiyantoko, B., Kurniawati, P., & Purbaningtyas, T. E. (2017). Pengujian Nitrogen Total, Kandungan Air Dan Cemar Logam Timbal Pada Pupuk Anorganik Npk Padat. *JST (Jurnal Sains Dan Teknologi)*, 6(1), 51–60.



PREPARATION, CHARACTERIZATION AND PHENOL ADSORPTION OF *Mangifera kemanga* Blume SEED

Siti Hadiati Mardiah¹⁾, Dian Arrisujaya^{1)*}, Devy Susanty¹⁾ and Nia Yuliani²⁾

¹⁾Department of Chemistry, Universitas Nusa Bangsa,

²⁾Department of Biology, Universitas Nusa Bangsa,

Jl. K.H. Sholeh Iskandar Km. 4 Cimanggu Tanah Sareal, Bogor 16166, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 Mei 2022,

Revised 02 Jul 2022,

Accepted 03 Jul 2022,

Available online 30 Jul 2022

Keywords:

- ✓ adsorption,
- ✓ Bogor,
- ✓ endemic,
- ✓ *Mangifera kemanga*,
- ✓ phenol

*corresponding author:

arrisujaya@unb.ac.id

<https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.410>

ABSTRACT

The potential of Mangifera kemanga Blume., an inexpensive biosorbent, for removing of hazardous substances such as phenols from its aqueous solution has been studied. The authors used Scanning Electron Microscope (SEM), Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectrometers, and quantification to study the morphology and characterization of Mangifera kemanga Blume. seeds (MKS) biomass, as well as batch experiments to determine the percentage of phenol removed when pH, contact period, biosorbent dosage, and phenol concentration were varied. The Langmuir, Freundlich, Temkin, and Dubinin–Radushkevich isotherm models had been used to interpret the experimental results. The optimal values found in our research correspond to a pH of 6 for an MKS dosage of 35 g/L and a contact time of 45 minutes for initial phenol concentrations ranging from 5 to 25 mg/L. The result indicated that MKS was a particularly successful adsorbent for phenol chemisorption from aqueous solution.

INTRODUCTION

Hazardous and toxic substances are materials that can pollute or damage the environment, human health, and the survival of other living creatures directly or indirectly, contained in Indonesia's Minister of Environment's Regulation No. 5 of 2014. Hazardous wastewater created as a result of rapid industrial growth contributes significantly to environmental pollution (Haddow et al., 2014; Sharma et al., 2019). For example, phenol was detected in the wastewater of many manufacturing industries and must be managed properly because it is recognized as a priority pollutant from the US Environmental Protection Agency (EPA) (Ramírez-García et al., 2019; Sadh et al., 2018). The World Health Organization (WHO) allows a standard level of 0.001 mg/L for potable water quality (Mandal et al., 2019).

Several technologies for removing phenol and its derivatives have been investigated such as flocculation, ion exchange, membrane separation, solvent extraction, photodegradation, oxidation,

precipitation and adsorption (Khraisheh et al., 2020; Ponnuchamy et al., 2020). However, in the wastewater treatment industry, the adsorption technique is very common. Adsorption with various natural adsorbents is likely to be the most efficient and cost-effective treatment option for phenol removal (Arrisujaya et al., 2019; Zein, Hidayat, et al., 2014). Some of the essential requirements for selecting the best adsorbents are structural characteristics, adsorption capacity, the surface area, pore sizes, simple regeneration and numerous uses (Hevira et al., 2020; Moyo et al., 2017).

Many researchers were on the lookout for natural adsorbents that were both inexpensive and readily accessible, i.e. sugar palm fruit shell (Zein, Arrisujaya, et al., 2014), sandbox tree seed (Adewuyi et al., 2015), mango seed (Moyo et al., 2017) and its leaf (Khan et al., 2019), natural guava leaf (Ponnuchamy et al., 2020), rice husk ash (Mandal et al., 2019), velvet apple seed (Arrisujaya et al., 2019), almond shell (Hevira et al., 2020), etc. Some natural adsorbents contained



hydroxyl, carboxyl, amino, phosphate, and other functional groups that could act as phenol binding sites (Arrisujaya et al., 2019; Khan et al., 2019).

Mangifera kemanga Blume., the Bogor regency's identification flora, is a plant in the Anacardiaceae family (Sancoyo, 2018). This fruit seed is an affordable agricultural waste source for adsorbent. Here to state of the art, no research on the comprehensive characterization of *Mangifera kemanga* Blume. seed (MKS) had been published in the literature up to this time. The average content of MKS was almost similar to that of mango seeds, with carbs (69.22-79.78 %), fat (8.35-16.13 %), protein (5.6-9.5 %), starch (92 %), fiber (0.14-2.95 %), and ash (0.35-3.66 %), and these seeds also contained high content in tannins (Legesse & Emire, 2012). Furthermore, there was no confirmation of an authenticated sorption phenomenon for phenol removal based on mechanistic explanation using MKS from its natural state.

According to the authors' exhaustive quest, MKS had never been established for use in the bioreduced and environmentally safe adsorption of phenol. The suitability of the MKS adsorbent for phenol adsorption was investigated in this study. The equilibrium data of the adsorption process was then examined in order to improve comprehension of the adsorption process.

MATERIALS AND METHODS

Materials and Apparatus

The materials and chemicals used were *Mangifera kemanga* Blume. seed, nitric acid (HNO₃), sulfuric acid (H₂SO₄), hydrochloric acid (HCl), sodium hydroxide (NaOH), benzene, ethanol and phenol. All chemicals were purchased from Merck and were of pro analytical grade.

The following apparatus was used: UV-Vis Spectrophotometer (Optizen POP, Mecasys, Korea), Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometer (Alpha II, Bruker, USA) Scanning Electron Microscope (SEM) (JEOL JSM-6360LA, JEOL Ltd., Japan), in combination with an Energy Dispersive Spectrometer (EDS) (JEOL JED-2300T, JEOL Ltd., Japan).

Methods

Preparation of Biomass and Constituent Analysis

Kemang (*Mangifera kemanga* Blume.) fruits were collected from Bogor Regency's traditional market in Indonesia. The seeds were properly

cleansed with water in order to exclude any dust or adhering particles, then it was kept in the sun to dry. The cleaned seeds were pulverized and sieved using a mesh sieve with a mesh size of 100.

The constituents of *Mangifera kemanga* Blume. seed (MKS) biomass were analyzed using the methodology (Khan et al., 2019) described below.

Ash Content

In a porcelain crucible, 0.3 g of MKS biomass was dried in a hot air oven before becoming incinerated for 8 hours in a furnace of 700 °C. The ash percentage was determined by calculating the weight of cooled ash and following equation (1).

$$\text{Ash}(\%) = \frac{\text{weight of ash}}{\text{weight of biomass}} \quad (1)$$

Analysis of Extractives

3.0 g of MKS biomass (G₀) was agitated at 120 rpm in a flask containing benzene and ethanol solution (2:1) for 3 h at 30°C. The precipitate was dried in an oven (105–110 °C) and chilled before being weighed at a constant total mass (G₁). The extractive percentage was determined using an equation (2).

$$W_1(\text{Wt. \%}) = \frac{G_0 - G_1}{G_0} \times 100 \quad (2)$$

Hemicellulose Determination

The G₁ residue was refluxed for 3.5 hours following the analysis of extractive with 150 mL of 20 g/L NaOH solution. After that, the processed residue was cleaned, dried, and reweighed (G₂, g). The equation (3) was used to calculate the hemicellulose content.

$$W_2(\text{Wt. \%}) = \frac{G_1 - G_2}{G_0} \times 100 \quad (3)$$

$$W_3(\text{Wt. \%}) = \frac{G_4 - (1 - W_1)}{G_3} \times 100 \quad (4)$$

Lignin Determination

In a flask, 1.0 g of G₁ residue was dried in an oven to a constant total mass (G₃, g). The flask was filled with 30 mL H₂SO₄ and maintained at 15 °C for 24 h. Before being refluxed for an hour, the samples were washed with 300 mL of double-distilled water. Then, the chilled mixture was

rinsed three times with the double distilled, dried with in oven, and weighed. (G_4 , g). The determination of lignin percentage was described in equation (4).

Cellulose Determination

The cellulose content was determined using equation (5).

$$W_4(\text{Wt. \%}) = 100 - (W_1 + W_2 + W_3 + \text{Ash}) \quad (5)$$

Preparation of Biosorbent

MKS biomass was activated in 0.1 M HNO_3 solution for 2 hours, stirring occasionally, before being filtered. The wet material was then rinsed with distilled water to achieve a pH of neutral, before being filtered and dried. The acid-activated MKS prepared in this manner was used as a biosorbent (Arrisujaya, 2014).

Biosorption experiments – batch studies

The studies were carried out to see how effective the acid-activated MKS was at removing phenol from its aqueous solution. The experiments were conducted with process variables such as initial phenol concentration, pH, contact time, etc. In 100 mL closed flasks containing, aqueous phenol solution (50 mL) was poured (Arrisujaya et al., 2019; Nazaruddin et al., 2014). Dilution was accomplished by adding distilled water to produce the required concentrations of 5, 10, 15, 20, and 25 mg/L. The pH was changed from 2, 4, 6 and 8 by using HCl and NaOH. The required amount of MKS biosorbent (30 to 50 g/L) was mixed, and the solution was shaken in the electrically thermostatic shaker for 15 to 240 minutes. Finally, the residue was filtered out, and the filtrate's residual phenol concentration was determined using spectrometry method. All samples had absorbance measurements taken at 238 nm.

The percentage of phenol removal was calculated using equation (6).

$$E(\%) = \frac{C_o - C_e}{C_o} \times 100\% \quad (6)$$

where C_o and C_e (mg/L) are initial and equilibrium phenol concentrations, respectively.

Equation (7) was used to compute the amount of phenol adsorbed per unit biosorbent, q_e (mg/g) as follows:

$$q_e = \frac{C_o - C_e}{m} \times V \quad (7)$$

where V is the volume of the phenol solution in litres and m is the mass of MKS biosorbent in grams.

RESULTS AND DISCUSSION

MKS Biomass Analysis

The quantitative examination of MKS biomass components, as shown in Table 1, revealed that cellulose was the primary component of MKS, with lignin and hemicellulose serving as secondary and tertiary components, respectively.

Table 1. Components analysis of MKS biomass

Component	Wt(%)*
Ash	1.99 ± 0.20
Extractives	0.75 ± 0.01
Hemicellulose	18.68 ± 0.16
Lignin	24.95 ± 0.01
Cellulose	53.63 ± 0.01

* Dry weight percentage

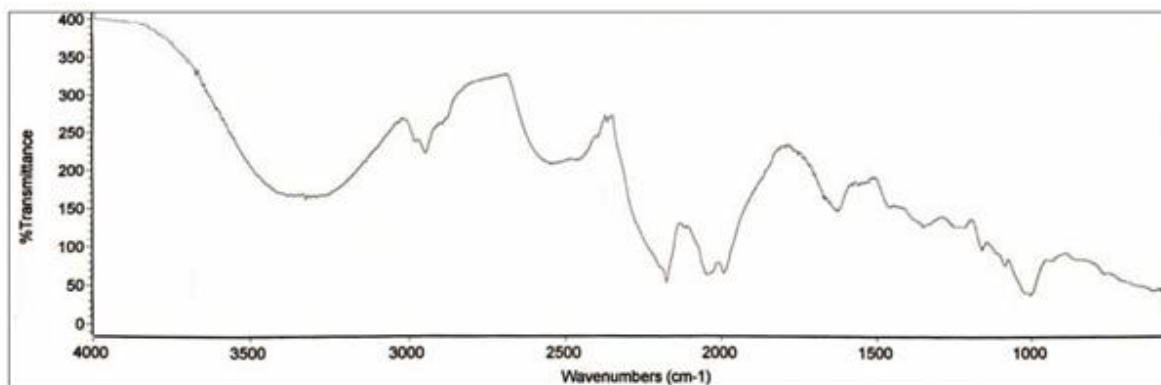


Figure 1. FTIR spectra of MKS biomass

Instrumental Characterization of MKS Biomass

Using potassium bromide (KBr) disks, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was utilized to assess the presence of surface functional groups on MKS biomass. The result of the functional groups determination of MKS biomass is shown in Figure 1. The FTIR spectrum of MKS biomass in Figure 1 revealed broadband near $3200 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ and revealed the stretching frequency of O-H, C-H stretching at $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$ (Hevira et al., 2020). The peaks at $1400 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ were caused by the stretching frequency of aromatic C=C (Moyo et al., 2017). The presence of C-H bending and C-O stretching was indicated by the peak around $1080 - 1300 \text{ cm}^{-1}$, whereas the peaks at $1050 - 1150 \text{ cm}^{-1}$ indicated strong presence of C-O and C-O-C stretching.

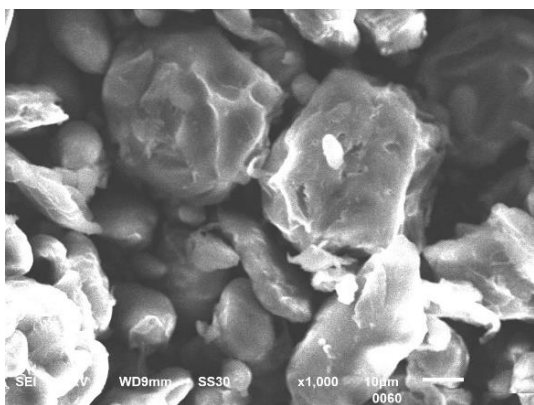


Figure 2. SEM topography of MKS biomass

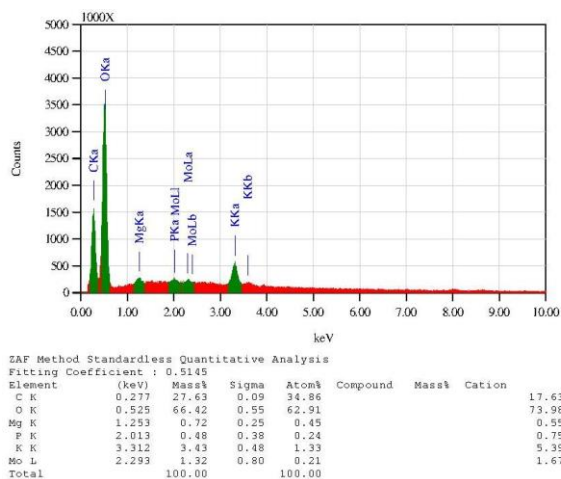


Figure 3. EDS spectra of MKS biomass

Scanning electron microscopy (SEM) in combination with an energy dispersive spectroscopy (EDS) analysis was carried out to analyze morphological traits and obtain elemental

characterization of biomass. Results of the MKS biomass SEM at 1000X magnification is shown in Figure 2. The result showed that MKS biomass has a rough, porous and variable surface over a vast region (Khan et al., 2019). The EDS spectra of MKS biomass revealed considerable indications of numerous elements (viz. C, O, Mg, P, K, and Mo) as a result of X-ray emissions of MKS powder surface macromolecules. (see Figure 3.).

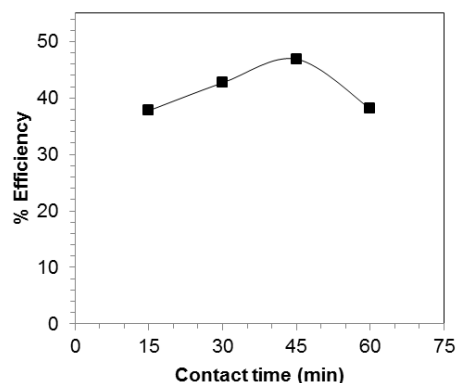


Figure 4. Efficiency percentage of phenol removal versus contact time

The Effect of Process Parameters on Phenol Removal by MKS

Effect of contact time

Therefore, the experiment was carried out throughout a range of contact times (15-240 minutes) with a constant initial phenol concentration of 10 mg/L, a fixed pH of 5.5, and a constant biosorbent dosage of 20 g/L. Figure 4 depicts a plot of percentage phenol removal with adsorption time that shows that the efficiency was initially moderate and then reached an equilibrium of 46.90 % at 45 minutes.

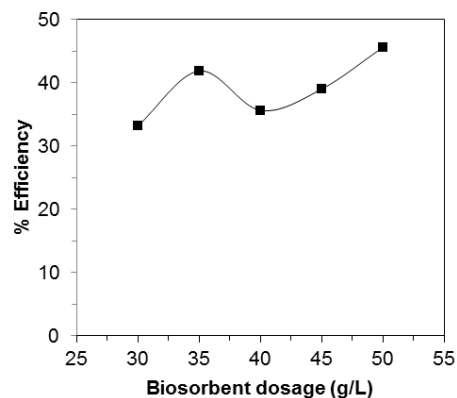


Figure 5. Efficiency percentage of phenol removal versus biosorbent dosage

The faster adsorption at first may be owing to a propensity to reach equilibrium after a specific period of time as a result of three mass transfer processes occurring in rapid succession (Hameed & Rahman, 2008). The first was film diffusion, in which the solute was dissolved as it passed through the solution. Pore diffusion was the second process, in which the solute migrated from the surface to the inside upon being adsorbed (Mandal et al., 2019).

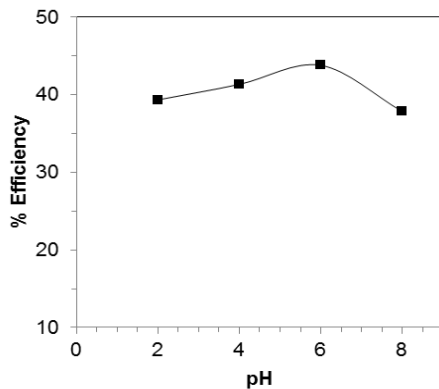


Figure 6. The percentage of phenol removal efficiency versus biosorbent pH

Effect of biosorbent dosage

The experiment was carried out with varying biosorbent dosage (30-50 g/L) with a constant initial phenol concentration of 10 mg/L, a fixed pH of 5.5, and at optimum contact time of 45 min. As the MKS dosage was increased, the efficiency percentage of phenol removal increased (Figure 5.), this could be explained by a rise in the amount of unoccupied sites on MKS, which could be used to occupy the readily accessible phenol (Khan et

al., 2019). Furthermore, the agglomeration of active sites might account for the differential adsorption behavior, resulting in a slight increase in adsorption percentage followed by a decrease (35 g/L) in phenol removal.

Effect of pH

The pH was thought to be an important factor because it affected the adsorption value (Zein, Arrisujaya, et al., 2014). The studies was carried out with different pH levels (2, 4, 6 and 8) with an initial phenol concentration of 10 mg/L as a fixed value, at optimum biosorbent dosage of 35 g/L, and at optimum contact time of 45 min. Figure 6 shows that the phenol removal effectiveness percentage was highest at pH 6. Other studies have found a similar optimal pH for phenol removal. The adsorbent surface is positively charged at pH levels less than 6, thus the sorbate and sorbent surface have minimal to no electrostatic repulsion, resulting in enhanced adsorption (Ponnuchamy et al., 2020).

Effect of initial phenol concentration

The experiment was carried out with varying initial phenol concentration (5-25 mg/L) at optimum pH of 6, at optimum biosorbent dosage of 35 g/L., and at optimum contact time of 45 min. The results show that as the phenol concentration increases, so does the adsorption capacity (Figure 7b.). However, increasing the phenol concentration decreased the efficiency percentage of phenol removal slightly (Figure 7a.). Correlating experimental data to various isotherm models will aid in understanding the interaction behavior of sorbate/sorbent.

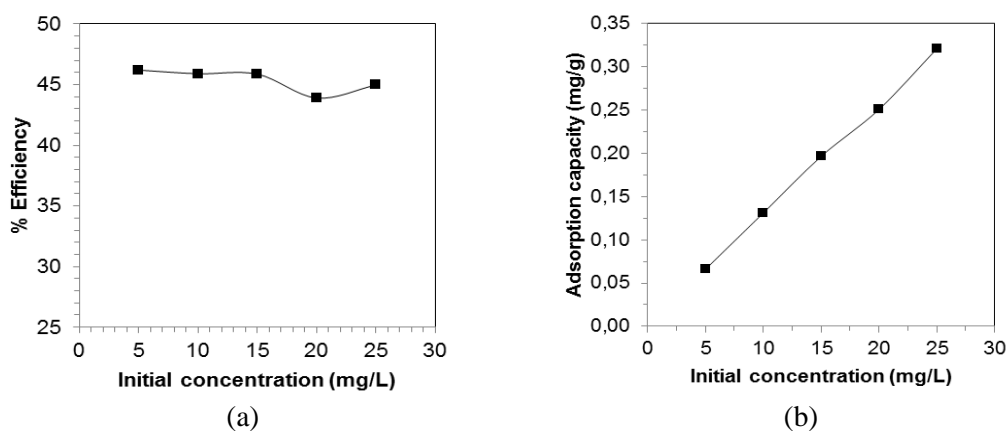


Figure 7. Efficiency percentage (a) and adsorption capacity (b) of phenol removal versus initial concentration

Study of the equilibrium isotherm

Adsorption isotherms are useful in the design of effective sorption systems in practical applications because they indicate the behavior of sorbent–sorbate interactions. In this study, several isotherm models were used to characterize the relationship between the number of phenol adsorbed and the equilibrium concentration of phenol aqueous solutions, including the Langmuir, Freundlich, Temkin, and Dubinin–Radushkevich models (Figure 8.).

The Langmuir isotherm emphasizes adsorbate monolayer chemisorption on adsorbents with identical sorption sites. Langmuir isotherm model (Langmuir, 1918) can be expressed by the equation (8) below:

$$q_e = \frac{q_m K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (8)$$

The linear version of the Langmuir isotherm is provided in equation. (9)

$$\frac{1}{q_e} = \left[\frac{1}{K_L \cdot q_m} \right] \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad (9)$$

where C_e (mg/L) is the equilibrium concentration of the adsorbate; The equilibrium adsorption capacity (mg/g) and the maximum adsorption capacity (mg/g) are represented by q_e and q_m respectively and K_L are Langmuir constants.

Figure 8a. shows a linear relationship of $1/q_e$ versus $1/C_e$ obtained from experimental results, indicating the applicability of the Langmuir model. The applicability of the model demands that the adsorbate is monolayer covered at the adsorbent's outer surface. Values of K_L and q_m calculated from the plot shown in Figure 8a are listed in Table 2.

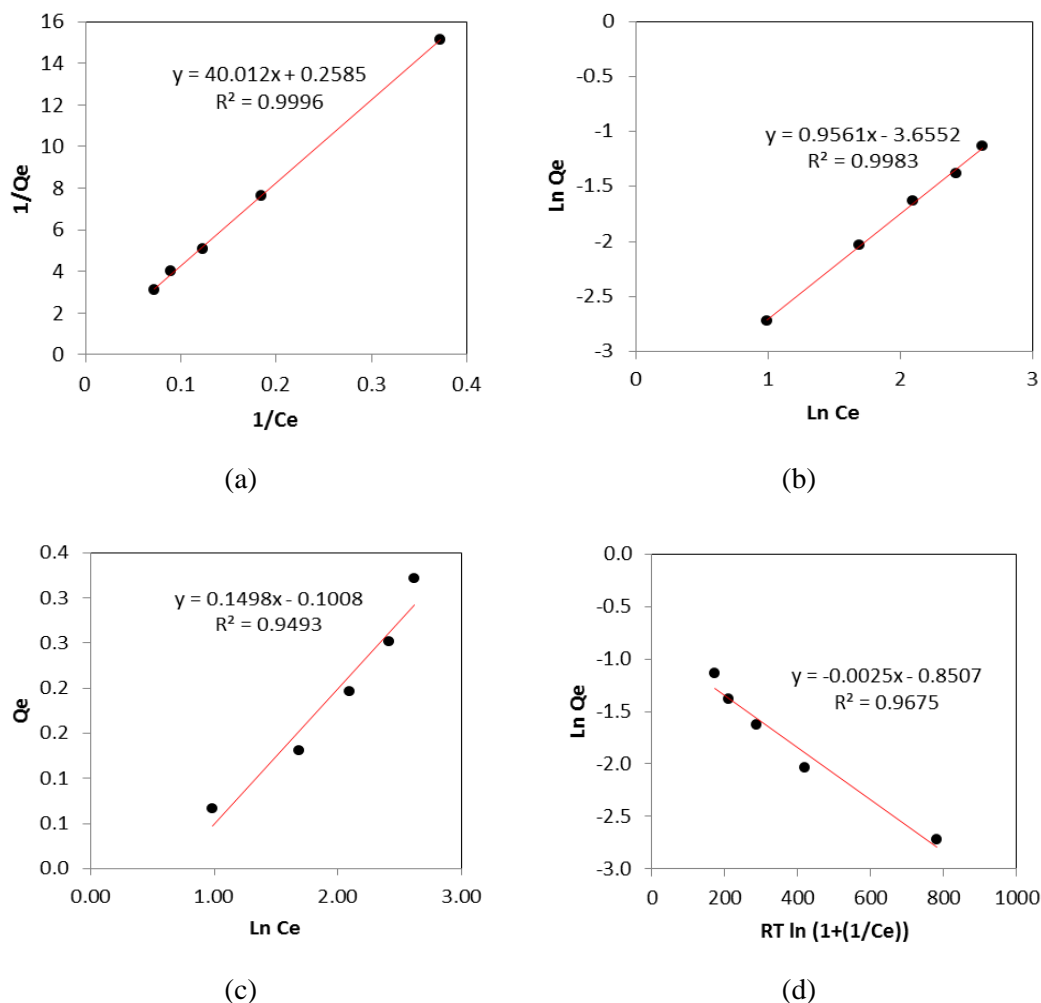


Figure 8. Adsorption isotherms applying the Langmuir model (a), the Freundlich model (b), the Temkin model (c), and the Dubinin–Radushkevich model (d)

Table 2. Calculated parameters of the adsorption isotherm models

Isotherms	Parameters
<i>Langmuir</i>	
K_L	6.436×10^{-3}
q_m (mg/g)	3.8684
R^2	0.9996
<i>Freundlich</i>	
K_F	2.585×10^{-2}
n	1.0459
R^2	0.9983
<i>Temkin</i>	
K_T	5.102×10^{-1}
B_1	0.1498
R^2	0.9675
<i>Dubinin–Radushkevich</i>	
q_d	0.4271
B_d	1.25×10^{-3}
R^2	0.9493

A non-dimensional separation factor (R_L) can be used to define the major properties of the Langmuir isotherm, which is given by:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L q_m} \quad (10)$$

The value of R_L specifies if the isotherm is unfavorable ($R_L > 1$), linear ($R_L = 1$), favorable ($0 < R_L < 1$), or irreversible ($R_L = 0$). The R_L value was 0.9757, indicating that, at the circumstances used in this study, the Langmuir isotherm was advantageous for phenol adsorption onto MKS.

The Freundlich model (Freundlich, 1907), which is commonly described by equation (11), describes the adsorption of adsorbates on heterogeneous surfaces.

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (11)$$

The Freundlich isotherm's linear form is provided in equation (12)

$$\ln q_e = \frac{1}{n} \ln C_e + \ln K_F \quad (12)$$

where K_F denotes the Freundlich equilibrium constant for adsorption capacity, and n refers for the adsorption intensity heterogeneity factor. Figure 8b. shows a linear relationship between $\ln q_e$ and $\ln C_e$. The value of n close to the limit ($0 < 1/n < 1$) indicating that the MKS surface was heterogeneous in nature.

Temkin isotherm model (Temkin & Pyzhev, 1940) is expressed in equation (13) and equation (14) represents the linear form of the Temkin isotherm.

$$q_e = \frac{RT}{b} \ln K_T C_e \quad (13)$$

$$q_e = B_1 \ln K_T + B_1 \ln C_e \quad (14)$$

where $B_1 = RT/b$. The graph (Figure 8c.) of q_e versus $\ln C_e$ calculated the Temkin constants B_1 and K_T . Values of K_T and B_1 calculated from the plot shown in Figure 8c. are listed in Table 2. To examine the impact of indirect adsorbate/adsorbate interactions on adsorption isotherms, the Temkin method was established. Because of adsorbate/adsorbate interactions, the heat of adsorption of all molecules in the layer will decrease linearly with coverage.

Another model for investigating isotherms with a good extent of rectangularity is the Dubinin–Radushkevich isotherm (Dubinin et al., 1947) analysis, that is given by equation (15) and its linear form can be represented by equation (16)

$$q_e = q_D \exp(-B_D \varepsilon^2) \quad (15)$$

$$\ln q_e = \ln q_D - 2B_D RT \ln \left(1 + \frac{1}{C_e} \right) \quad (16)$$

The $\ln q_e$ versus $RT \ln \left(1 + \frac{1}{C_e} \right)$ plot was used to get the Dubinin–Radushkevich constants, q_D and B_D values. (Figure 8d.) at 25°C are given in Table 2. Adsorption energy is then determined using ε^2 as shown in equation (17)

$$E = \frac{1}{\sqrt{2B_D}} \quad (17)$$

where E seems to be the amount of energy needed to adsorb 1 mol of phenol from its solution (kJ/mol). The process was chemical adsorption because the value of E computed here was 14.144 kJ/mol and was between 8 and 16 (Hu & Zhang, 2019).

CONCLUSIONS

The efficiency of MKS in removing phenol from its aqueous solution was investigated in this research work. It has a maximum phenol adsorption capacity of 3.86 mg/g MKS after 45

min of contact time indicating an adsorption efficiency of 46.2% for an initial concentration of 10 mg/L of phenol. The Langmuir adsorption model was also identified to be used in the adsorption process, which was verified by the Dubinin–Radushkevich isotherm equation that the process was chemically adsorbed. As a result of this study, MKS was found to be a low-cost and effective adsorbent in removing phenol from its aqueous solution. Overall, the study showed a considerable phenol removal effectiveness of MKS, which ensured its potential for further enhancement.

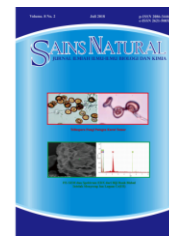
ACKNOWLEDGMENT

Financial support for this work from Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LP2M), Universitas Nusa Bangsa.

REFERENCES

- Adewuyi, A., Gennaro, A., & Durante, C. (2015). Bioadsorbent Hura Crepitans for the removal of phenol from solution. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 37(6), 277–282.
- Arrisujaya, D. (2014). Efisiensi Penyerapan Kulit Buah Atap (*Arenga pinnata*) Mengikat Ion-Ion Logam Kromium Dalam Larutan. *Jurnal Sains Natural*, 4(1), 58–67.
- Arrisujaya, D., Ariesta, N., & Maslahat, M. (2019). Removal of chromium (VI) from aqueous solutions using *Diospyros discolor* seed activated with nitric acid: Isotherm and kinetic studies. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 79(6), 1214–1221.
- Dubinin, M. M., Zaverina, E. D., & Radushkevich, L. V. (1947). Sorption and structure of active carbons I. Adsorption of organic vapors. *Zhurnal Fizicheskoi Khimii*, 21, 1351–1362.
- Freundlich, H. (1907). Über die Adsorption in Lösungen. *Zeitschrift Für Physikalische Chemie*, 57U(1), 385–470.
- Haddow, G. D., Bullock, J. A., & Coppola, D. P. (2014). Natural and Technological Hazards and Risk Assessment. In *Introduction to Emergency Management* (pp. 31–70). Elsevier.
- Hameed, B. H., & Rahman, A. A. (2008). Removal of phenol from aqueous solutions by adsorption onto activated carbon prepared from biomass material. *Journal of Hazardous Materials*, 160(2–3), 576–581.
- Hevira, L., Zilfa, Rahmayeni, Ighalo, J. O., & Zein, R. (2020). Biosorption of indigo carmine from aqueous solution by *Terminalia Catappa* shell. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104290.
- Hu, Q., & Zhang, Z. (2019). Application of Dubinin–Radushkevich isotherm model at the solid/solution interface: A theoretical analysis. *Journal of Molecular Liquids*, 277, 646–648.
- Khan, Md. M. R., Sahoo, B., Mukherjee, A. K., & Naskar, A. (2019). Biosorption of acid yellow-99 using mango (*Mangifera indica*) leaf powder, an economic agricultural waste. *SN Applied Sciences*, 1(11), 1–15.
- Khraisheh, M., Al-Ghouti, M. A., & AlMomani, F. (2020). P. putida as biosorbent for the remediation of cobalt and phenol from industrial waste wastewaters. *Environmental Technology and Innovation*, 20(2020), 101148.
- Langmuir, I. (1918). The adsorption of gaseous plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of The American Chemical Society*, 40(9), 1361–1403.
- Legesse, M. B., & Emire, S. A. (2012). Functional and physicochemical properties of mango seed kernels and wheat flour and their blends for biscuit production. *African Journal of Food Science and Technology*, 3(9), 193–203.
- Mandal, A., Mukhopadhyay, P., & Das, S. K. (2019). The study of adsorption efficiency of rice husk ash for removal of phenol from wastewater with low initial phenol concentration. *SN Applied Sciences*, 1(2), 192.
- Moyo, M., Pakade, V. E., & Modise, S. J. (2017). Biosorption of lead(II) by chemically modified *Mangifera indica* seed shells: Adsorbent preparation, characterization and performance assessment. *Process Safety and Environmental Protection*, 111, 40–51.
- Nazaruddin, N., Arrisujaya, D., Hidayat, Zein, R., Munaf, E., & Jin, J. (2014). Batch method

- for the removal of toxic metal from water using sugar palm fruit (*Arenga pinnata* Merr) shell. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5(2), 1619–1629.
- Ponnuchamy, M., Kapoor, A., Pakkirisamy, B., Sivaraman, P., & Ramasamy, K. (2020). Optimization, equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on adsorptive remediation of phenol onto natural guava leaf powder. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 20576–20597.
- Ramírez-García, R., Gohil, N., & Singh, V. (2019). Recent Advances, Challenges, and Opportunities in Bioremediation of Hazardous Materials. In *Phytomanagement of Polluted Sites* (pp. 517–568). Elsevier.
- Sadh, P. K., Duhan, S., & Duhan, J. S. (2018). Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1.
- Sancoyo. (2018). *Kemang, Identitas Flora Kabupaten Bogor*. Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya-LIPI. <http://krbogor.lipi.go.id/id/Kemang-Identitas-Flora-Kabupaten-Bogor>
- Sharma, B., Vaish, B., Monika, Singh, U. K., Singh, P., & Singh, R. P. (2019). Recycling of Organic Wastes in Agriculture: An Environmental Perspective. *International Journal of Environmental Research*, 13(2), 409–429.
- Temkin, M. J., & Pyzhev, V. (1940). Recent modifications to Langmuir Isotherms. *Acta Physico-Chimica Sinica*, 12, 217–222.
- Zein, R., Arrisujaya, D., Hidayat, H., Elfia, M., Nazarudin, N., & Munaf, E. (2014). Sugar palm *Arenga pinnata* Merr (Magnoliophyta) fruit shell as biomaterial to remove Cr(III), Cr(VI), Cd(II) and Zn(II) from aqueous solution. *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA*, 63(7), 553–559.



DETERMINATION OF THE PARENTS BASED ON MOLECULAR ANALYSIS FOR SOYBEAN LINES DEVELOPMENT

Slamet^{1)*}, Nonon Saribanon²⁾, Saptowo Jumali Pardal¹⁾, Tatang Mitra Setia²⁾, Reflinur³⁾
dan Wening Enggarini³⁾

¹⁾Pusat Riset Tanaman Pangan, Organisasi Riset Pangan dan Pertanian, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia

²⁾ Program Magister, Program Studi Biologi, Sekolah Pasca Sarjana, Universitas Nasional, Jl. Harsono RM No. 1, Ragunan, Pasar Minggu, Jakarta, 12550, Indonesia

³⁾Pusat Riset Rekayasa Genetika, Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan, Badan Riset dan Inovasi Nasional, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor, 16911, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 Mar 2022,

Revised 15 Jul 2022,

Accepted 25 Jul 2022,

Available online 30 Jul 2022

Keywords:

- ✓ *biosoy 1*,
- ✓ *biosoy 2*,
- ✓ *Demas*,
- ✓ *Tanggamus*,
- ✓ *Al tolerance*,
- ✓ *SSR markers*

*corresponding author:

slamet1969@gmail.com

[https://doi.org/10.31938/jsn.v](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.391)

[12i3.391](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.391)

ABSTRACT

Soybean is the third most important food commodity in Indonesia, which is a cheap source of protein and rich in different nutritional contents for humans. This study aimed to analyze the four genotypes of the crossing parents using SSR primers and select one SSR polymorphic primer to confirm the F1 generation alleles compared to their parents. The research was conducted in the laboratory and greenhouse of the Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development (ICABIOGRAD). The research activities included a polymorphic primers survey, population formation, and confirmation of crossing populations using one polymorphic primer. A total of 20 SSR primers were used to amplify the DNA of the four crossing parents (Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, and Tanggamus). The results of the polymorphic SSR survey showed that 6 SSR primers could distinguish the combination of Biosoy 2 vs Demas parents, then 7 SSR primers could distinguish the combination of Biosoy 1 vs Tanggamus and Biosoy 2 vs Tanggamus parents. Satt 406 polymorphic primer was chosen to analyze F1 hybrid lines of three crossings. Based on phenotypic observation, two individuals were suspected to be hybrid lines. Molecular analysis using Satt 406 showed that alleles from male parents were not found in 16 F1 individuals from the three crossings. Selection using molecular markers such as Satt 406 polymorphic SSR can help breeders screen heterozygous populations in F1 generations to check successful crossings.

ABSTRAK

Penentuan Tetua Berbasis Analisis Molekuler Untuk Pembentukan Galur Kedelai

Kedelai merupakan komoditas pangan penting ketiga di Indonesia yang dimanfaatkan sebagai sumber protein yang murah dan kaya berbagai kandungan gizi bagi manusia. Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis 4 genotip tetua persilangan menggunakan primer SSR dan memilih satu primer polimorfik SSR untuk mengonfirmasi alel-alel generasi F1 dibandingkan dengan para tetuanya. Penelitian dilakukan di laboratorium dan rumah kaca Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen). Kegiatan penelitian terdiri dari survei primer polimorfik, pembentukan populasi, dan konfirmasi populasi persilangan menggunakan satu primer polimorfik. Sebanyak 20 primer SSR digunakan untuk mengamplifikasi DNA dari empat tetua persilangan kedelai (Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, dan Tanggamus). Hasil survei polimorfisme SSR menunjukkan bahwa 6 primer SSR dapat membedakan kombinasi tetua Biosoy 2 vs Demas, serta 7 primer SSR dapat membedakan Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Primer polimorfik Satt 406 terpilih untuk menganalisis hibrida F1 dari tiga persilangan. Berdasarkan hasil pengamatan fenotipik, diperoleh 2 nomor individu F1 yang diduga sebagai generasi hibrida. Analisis molekuler menggunakan Satt 406 menunjukkan bahwa alel-alel dari tetua jantan tidak ditemukan pada 16 nomor tanaman dari 3 populasi persilangan. Seleksi menggunakan marka molekuler seperti SSR polimorfik Satt 406 membantu pemulia dalam menskrining populasi heterozigot pada generasi F1 untuk mengetahui keberhasilan persilangan.

Kata kunci: biosoy 1, biosoy 2, Demas, Tanggamus, toleransi Al, marka SSR



PENDAHULUAN

Kedelai merupakan komoditas pangan penting ketiga di Indonesia yang dimanfaatkan sebagai sumber protein yang murah, dan kaya berbagai kandungan gizi yang bermanfaat bagi manusia (Krisnawati, 2017; Risliawati *et al.*, 2015). Kebutuhan kedelai baru dapat dipenuhi sebesar 40% dari produksi nasional. Masalah utamanya adalah produktivitas kedelai nasional masih rendah (Ashari, 2003). Kekurangan suplai kedelai sebesar 60% dipenuhi dari impor (BPS, 2021).

Salah satu faktor yang mempengaruhi penurunan produktivitas kedelai adalah cekaman abiotik yang disebabkan oleh sifat kemasaman tanah dan kadar Aluminium (Al) tinggi yang bersifat racun bagi tanaman. Menurut Mulyani & Sarwani (2013) lahan masam kadar Al tinggi tersedia luas di pulau-pulau besar di luar Pulau Jawa, namun tingkat produktivitas lahan cukup rendah terutama pada tanaman pangan padi, jagung dan kedelai.

Pemanfaatan lahan marginal dengan karakteristik masam dengan kadar Al tinggi secara ekonomis dan mudah dalam pengaplikasiannya yaitu dengan penggunaan varietas toleran (Reflinur & Lestari, 2015; Tasma, 2015). Pembentukan varietas unggul kedelai toleran dapat diawali dengan pemilihan calon tetua persilangan dan penentuan teknik introgresi sifat yang diinginkan (Carsono *et al.*, 2016). Kesuksesan pembentukan varietas unggul tanaman sangat ditentukan oleh tingkat keragaman bahan genetik yang tersedia. Semakin banyak materi genetik yang memiliki sifat-sifat target yang dievaluasi, semakin besar peluang didapatkannya tanaman dengan kombinasi genetik sesuai dengan yang diinginkan (Sitepu, *et al.*, 2015).

Kedelai varietas Tanggamus dan Demas merupakan varietas unggul yang adaptif di lahan kering masam. Keunggulan Tanggamus adalah tahan rebah, memiliki ketahanan moderat terhadap penyakit karat daun, polong tidak mudah pecah, ukuran biji sedang, bobot 100 biji 11 gram dan hasil rata-rata 1,22 t/ha. Varietas Demas memiliki keunggulan yaitu hasil rata-rata 1,7 t/ha, bobot 13 g, tahan terhadap penyakit karat daun (*Phakopsora pachyrhizi* Syd), tahan terhadap penggerek polong (*Etiella zinckenella*), agak rentan terhadap hama pengisap polong (*Riptortus linearis*), dan rentan terhadap hama ulat grayak (*Spodoptera litura* F.) (Balitkabi, 2016).

Salah satu pendekatan pemuliaan berbasis bioteknologi adalah penggunaan marka molekuler sebagai perangkat bantu yang populer dengan istilah *marker assisted selection* (MAS) yang merupakan komponen dari disiplin ilmu baru yaitu pemuliaan berbasis molekuler. Di antara bermacam-macam tipe marka yang berbasis *polymerase chain reaction* (PCR), *Simple Sequence Repeats* (SSR) dipertimbangkan sebagai sistem marka yang lebih tepat untuk berbagai aplikasi pada analisis genetik tanaman maupun dalam program pemuliaan (Reflinur & Lestari, 2015). Penelitian berbasis marka molekuler pada tanaman kedelai telah dilakukan untuk berbagai tujuan antara lain studi keragaman genetik (Chaerani *et al.*, 2011; Terryana *et al.*, 2017), pengembangan set marka untuk identifikasi varietas (Risliawati *et al.*, 2015), pemetaan genetik sifat toleran Al (Tasma *et al.*, 2015); deteksi insersi gen *MaMt2* pada tanaman transgenik toleran Al (Pardal & Suharsono, 2016), dan konfirmasi penurunan alel tetua donor pada populasi persilangan pertama pada tanaman kedelai (Lestari *et al.*, 2017).

Penanda SSR, juga dikenal sebagai mikrosatelit, biasanya digunakan untuk menjelaskan karakteristik genetik tumbuhan (Nuraida, 2012). Teknik ini memungkinkan pembacaan fragmen DNA yang lebih akurat (akurasi hingga 1 bp). Penanda SSR yang merupakan penanda mikrosatelit dapat mudah diamplifikasi menggunakan reaksi berantai polimerase (PCR) karena tersebar luas di genom (Chaerani *et al.*, 2014). Selain itu, penanda SSR dapat digunakan dalam analisis genetik karena menunjukkan tingkat variasi alelik dan dapat direproduksi. Penanda SSR juga dilaporkan merupakan penanda kodominan yang dapat diterapkan praktis untuk mendukung program pemuliaan tanaman (Reflinur & Lestari, 2015), antara lain keberhasilan persilangan pada generasi F1 tanaman pisang (Rosalia *et al.*, 2020).

Keuntungan penggunaan marka molekuler sebagai agen seleksi adalah dapat mencapai sasaran target secara akurat, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, tidak merusak karena hanya perlu bagian kecil dari tanaman dan dapat dilakukan pada fase bibit (Santoso *et al.*, 2006; Reflinur & Lestari, 2015). Sedangkan kelemahan penggunaan penciri morfologi adalah bersifat terbatas, tidak tersedia pada setiap fase pertumbuhan dan sangat dipengaruhi lingkungan. Namun, penggunaan marka molekuler dan penciri morfologi dalam pelaksanaannya tidak saling

bertentangan, tetapi saling melengkapi (Santoso *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian kedelai terkait toleran Al telah dilakukan Giono *et al.* (2014) dan dilaporkan bahwa varietas Tanggamus memiliki nilai indeks bobot kering akar paling tinggi. Selain itu, perlakuan pada berbagai jenis media, varietas Tanggamus memiliki respon akar paling panjang dibanding dengan kedelai kuning varietas Anjasmoro (Eka *et al.*, 2015). Penelitian tersebut diperkuat Sudrajat (2010) dalam penelitiannya melaporkan bahwa Tanggamus memiliki sifat konsisten adaptasi yang kuat pada lahan masam berkadar Al tinggi yang ditunjukkan oleh pertumbuhan akar dan jumlah polong. Kedelai varietas Demas toleran terhadap hasil uji adaptasi di lahan kering masam Lampung dan Kalimantan Selatan dengan rata-rata hasil biji 2,66 t/ha. Keunggulan lain dari Demas adalah tahan terhadap pecah polong. Pada kondisi kering, Demas di lapang masih memungkinkan untuk

dilakukan penundaan panen hingga 10 hari (Kementan, 2020). Kedelai varietas Tanggamus dan Demas termasuk kategori kedelai dengan adaptasi yang luas (Balitkabi, 2016).

Tujuan penelitian ini adalah untuk menyeleksi dan memperoleh primer SSR polimorfik untuk menganalisis 4 genotip tetua persilangan secara jelas dan mengonfirmasi kebenaran populasi tanaman kedelai generasi F₁ dari 3 kombinasi persilangan.

BAHAN DAN METODE

Survei Primer Polimorfik

Bahan genetik digunakan 4 genotipe kedelai calon tetua persilangan yaitu varietas Biosoy 1, Biosoy 2, Demas, dan Tanggamus yang disurvei menggunakan marka molekuler SSR. Kedua puluh primer SSR yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Primer SSR pada Kegiatan Survei Primer Polimorfik

No.	Primer	Sekuens
1	Satt 070	F. 5-AAAAATTAATACTAGAAAGACAAC-3 R. 5'-TGGCATTAGAAAAATGATATG-3'
2	Satt 100	F. 5-ACCTCATTGTCATATA-3 R. 5-TTGGAAAACAAGTAATAATAACA-3
3	Satt 144	F. 5-CGTCGCCATCACTATGAGAA-3' R. 5-CCATCTTGAGCAGAGTTTGAAGTT-3'
4	Satt 182	F. 5-GGTCCACATGAAATGAAGGT-3' R. 5-TCTCAGCCTGCAAAGAAAA-3'
5	Satt 406	F. 5-GCGTGAGCATTTTTGTTT-3' R. 5-TGACGGGTTAATAGCAT-3'
6	Satt 125	F. 5-GGGACGAAACAAAGTCACAT-3 R. 5-GGGATGCTGTTATCAAAATCA-3
7	Satt 516	F. 5-GCGTTAGCACTATTTTTTACAAGA-3' R. 5-GCGCCGTTCTTACTTTTAT-3'
8	Satt 333	F. 5-GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA-3 R. 5-GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT-3
9	Satt 171	F. 5-TTGAGGGCTCCACACAGTT-3 R. 5-CAAAAGTTTATAACGTGTAGATTAA-3
10	Satt 551	F. 5-GAATATCACGCGAGAATTTTAC-3 R. 5-TATATGCGAACCCCTTACAAT-3
11	Satt 244	F. 5-GCGTCAACCGGTGAAAAAACCTA-3 R. 5-GCGTGCCTGGCAGTAGTCTATATC-3
12	Satt 249	F. 5-GCGGGTCAAATGCAAATTTTTT-3 R. 5-GGCCAGTGTGAGGGATTTAGAA-3
13	Satt 294	F. 5-GCGGGTCAAATGCAAATTTTTT-3 R. 5-GCGCTCAGTGTGAAAGTTGTTTCTAT-3
14	Satt 633	F. 5-GGGACACTATCGGCCTAGAAAGTT-3 R. 5-GGGTGATAAAGTTCCCCCTAAG-3
16	Satt 196	F. 5-TGAGCCCAACCTCCACATCTTT-3 R. 5-TGTGAATAAAAGAAATCCCCATTGA-3
15	Satt 143	F. 5-GCGAATGGTTTTGCTGGAAAGTA-3 R. 5-GCGCAACGACATTTTCACGAAGTT-3
17	Satt 520	F. 5-GCGGTGTGCAAGAGTGACA-3 R. 5-GCGCATTGGACTTTCTA-3
18	Satt 549	F. 5-GCGTGCTTCTTATATTAGGTGTTAGT-3 R. 5-GCGCGCAACAATCACTAGTACG-3
19	Satt 167	F. 5-GATTTACGGGTTACTTGGATTCAATA-3 R. 5-GCTACCCAATATGATACTCTACACAGT-3
20	Satt 449	F. 5-GCGTGCTTCTTATATTAGGTGTTAGT-3 R. 5-GCGCATTGGAGTTTTTGTCTTT-3

Isolasi DNA

DNA diisolasi dari daun muda trifoliet umur berkisar 15 sampai 21 hari setelah tanam menggunakan bufer ekstraksi CTAB (*hexadecyl trimethyl ammonium bromide*) sesuai prosedur (Doyle & Doyle, 1990). Pelet dicuci dengan 300 μL etanol 70% selanjutnya dikering-anginkan selama 30 menit, dilarutkan pada kisaran 50 sampai 100 μL larutan bufer TE (pH 8).

Uji kuantitatif dilakukan menggunakan Spektrofotometer Nanodrop, Thermo Scientific, AS, sedangkan uji kualitatif dilakukan menggunakan teknik elektroforesis pada gel agarosa 1%. Produk PCR divisualisasi di bawah sinar UV (alat GelDoc Bio-Rad). Larutan DNA stok kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 10 ng/ μL untuk digunakan dalam kegiatan *polymeration chain reaction* (PCR).

Amplifikasi DNA (PCR)

Penggandaan DNA dengan metode PCR (alat Thermocycler Bio-Rad). Komposisi reaksi PCR berdasarkan metode dari My Taq Red Mix (Bioline) terdiri dari 5 μL PCR mix, 1 μL primer SSR, 2 μL DNA sampel, lalu ditambahkan ddH₂O hingga volume total PCR 10 μL .

Program reaksi amplifikasi berdasarkan Lestari *et al.*, (2017) dimulai dengan tahapan pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 34 siklus yang terdiri atas tahapan denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, penempelan primer (*annealing*) pada suhu 55°C, pemanjangan basa (*elongation*) pada suhu 72°C selama 1 menit, dan proses akhir pemanjangan basa (*final extension*) pada suhu 72°C selama 5 menit. Hasil amplifikasi DNA dielektroforesis pada gel agarosa 2% pada tegangan listrik 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis diwarnai dengan larutan etidium bromida dan divisualisasi dengan alat GelDoc Bio-Rad.

Pembentukan Populasi dan Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

Pembentukan Populasi Persilangan

Biji ditanam di dalam ember berlubang yang berisi media tanah gembur dicampur dengan pupuk kandang dengan dosis 200 gram per pot di rumah kaca. Tanaman dipelihara sesuai standar budidaya hingga berbunga, bunga yang masih kuncup dikastrasi kemudian disilangkan dengan menempelkan bunga jantan mekar di atas bunga betina. Bunga yang telah disilangkan ditandai dengan benang berwarna dan tanaman diberi label tanggal dan nama persilangan. Tanaman yang telah disilangkan ditempatkan pada tempat teduh

yang tidak mendapatkan sinar matahari langsung selama 5 (lima) hari. Polong-polong generasi F₁ hasil persilangan setelah masak dipanen dan dikeringkan hingga kadar air 10 persen dan disimpan pada suhu 5°C.

Biji generasi F₁ hasil persilangan ditanam, dirawat hingga dewasa, dan dibiarkan menyerbuk sendiri (*selfing*) hingga polong masak menghasilkan biji-biji generasi F₂, atau disilang balik sesuai tujuan penelitian yang diinginkan.

Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

Bahan genetik yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 16 nomor tanaman generasi F₁ yang berasal dari 3 jenis persilangan yaitu 2 nomor dari Biosoy1/Tanggamas, 8 nomor dari Biosoy2/Tanggamas dan 6 nomor dari Biosoy2/Demas. Konfirmasi molekuler menggunakan primer SSR polimorfik terpilih yaitu Satt 406. Prosedur uji molekuler mengikuti prosedur pada survei primer SSR polimorfik. Hasil PCR selanjutnya disepariasi pada gel poliakrilamid 8% dengan komposisi 50 mL poliakrilamid 8%, amonium persulfat (APS) 500 μL , dan tetraetilmetilendiamin (TEMED) 50 μL . Hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan larutan etidium bromida dan divisualisasi di bawah sinar UV menggunakan alat GelDoc (Bio-Rad).

Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan pola pita polimorfik hasil visualisasi DNA antara populasi hasil persilangan dengan kedua tetua persilangannya. Skor 1 (satu) jika muncul alel atau pita dan skor 0 (nol) jika tidak muncul alel. Alel-alel (pola pita DNA) yang muncul sejajar dikategorikan sebagai monomorfik, dan jika alel-alel yang muncul berbeda ukuran atau tidak sejajar dikategorikan polimorfik. Tanaman-tanaman hasil persilangan yang terkonfirmasi positif F₁ mengandung alel dari kedua tetua donor berdasarkan marka molekuler, yaitu alel heterozigot yang serupa dengan kedua tetuanya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Survei Primer Polimorfik

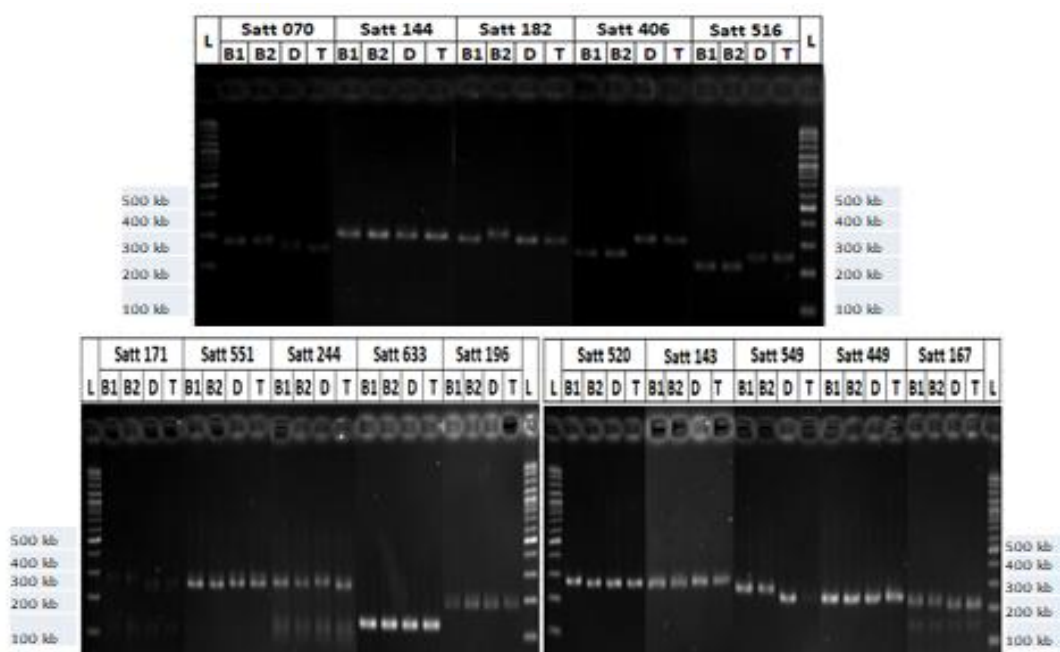
Hasil PCR dari 20 primer yang disurvei telah teramplifikasi sebanyak 15 primer, 8 primer menghasilkan pita polimorfik dan 7 primer pita monomorfik. Selebihnya, 5 primer tidak teramplifikasi dalam proses reaksi PCR walau telah dilakukan PCR ulang dengan optimasi

gradien suhu *annealing* (Gambar 1 dan Tabel 2). Primer-primer yang tidak teramplifikasi tersebut adalah Satt 100, Satt 125, Satt 333, Satt 294 dan Satt 224. Dari 15 primer teramplifikasi, terdapat primer Satt 070 yang hasil pitanya tipis (samar), namun masih dapat diskoring pita-pitanya. Hasil pita yang tipis disebabkan proses amplifikasi tidak maksimal sehingga konsentrasi hasil amplifikasinya rendah. Ukuran pita-pita DNA yang dihasilkan berkisar antara 200 – 400 kbp, kecuali primer Satt 633 berada diantara 100 – 200 kbp hal ini menunjukkan bahwa proses PCR berjalan benar (Gambar 1).

Hasil analisis polimorfik terhadap calon tetua persilangan Biosoy 1, Biosoy 2, Demas dan Tanggamus menggunakan 8 primer SSR polimorfik adalah sebagai berikut: 6 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 1 vs Demas yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549 dan Satt 171; 6 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 2 vs Demas yaitu Satt 070, Satt 182, Satt 406, Satt 516, Satt 549 dan Satt 171; 7 primer SSR dapat membedakan pasangan Biosoy 1 vs Tanggamus yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244; 7 primer SSR dapat membedakan

pasangan Biosoy 2 vs Tanggamus yaitu Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549, Satt 171, dan Satt 244 (Tabel 2).

Analisis penentuan pasangan tetua menggunakan 8 primer SSR polimorfik menunjukkan bahwa terdapat lima primer yang dapat membedakan 4 kombinasi pasangan. Lima primer SSR tersebut adalah Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 549 dan Satt 171, yang dapat membedakan Biosoy 1 vs Demas, Biosoy 2 vs Demas, Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Hal tersebut menunjukkan bahwa ke-5 primer SSR tersebut dapat digunakan sebagai marka atau penanda keberhasilan persilangan pada empat kombinasi pasangan calon tetua. Selain itu terdapat tiga primer yang menghasilkan pita spesifik masing-masing pada dua kombinasi pasangan. Tiga primer SSR tersebut adalah Satt 520 yang muncul pada Biosoy 1 vs Demas dan Biosoy 1 vs Tanggamus; Satt 182 pada pasangan Biosoy 2 vs Demas dan Biosoy 2 vs Tanggamus; serta Satt 244 pada pasangan Biosoy 1 vs Tanggamus dan Biosoy 2 vs Tanggamus. Hal tersebut menunjukkan bahwa primer tersebut dapat digunakan sebagai pembeda yang lebih spesifik dari primer lainnya (Tabel 2).



Gambar 1. Primer SSR monomorfik dan polimorfik (Satt 406) hasil amplifikasi PCR yang dipisahkan menggunakan gel Agarosa 2%.

Tabel 2. Tabel skoring tetua dan analisis kombinasi pasangan dengan primer SSR polimorfik yang teramplifikasi pada reaksi PCR.

No	Nama	Hasil Skoring Calon Tetua				Kombinasi Pasangan			
		Primer SSR	Bio 1	Bio 2	Dms	Tgm	Bio1 vs Dms	Bio2 vs Dms	Bio1 vs Tgm
1	Satt 070	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
2	Satt 144	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
3	Satt 182	0	1	0	0	Mono	Poli	Mono	Poli
		1	0	1	1				
4	Satt 406	0	0	1	1	Poli	Poli	Poli	Poli
		1	1	0	0				
5	Satt 516	0	0	1	1	Poli	Poli	Poli	Poli
		1	1	0	0				
6	Satt 171	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
7	Satt 551	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
8	Satt 244	1	1	1	0	Mono	Mono	Poli	Poli
		0	0	0	1				
9	Satt 633	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
10	Saatt 196	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
11	Satt 520	1	0	0	0	Poli	Mono	Poli	Mono
		0	1	1	1				
12	Satt 143	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
13	Satt 549	1	1	0	0	Poli	Poli	Poli	Poli
		0	0	1	1				
14	Satt 449	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				
15	Satt 167	1	1	1	1	Mono	Mono	Mono	Mono
		0	0	0	0				

Keterangan: Dms=Demas, Tgm=Tanggamus, Bio=Biosoy

Berdasarkan laju pita DNA pada proses separasi elektroforesis pada primer Satt 406 menunjukkan bahwa pola pita antara tetua jantan (Demas dan Tanggamus) dan tetua betina (Biosoy 1 dan Biosoy 2) berada pada jarak yang paling jauh (sangat polimorfik) sehingga primer tersebut dapat digunakan sebagai marka molekuler dalam persilangan kedelai tersebut.

Pada penelitian ini banyak diperoleh primer-primer SSR yang polimorfik yang menunjukkan bahwa pemilihan primer-primer tersebut sudah sesuai. Menurut Santana *et al.*, (2014) banyak ditemukannya primer SSR polimorfik disebabkan sifat dari primer SSR yang memiliki variabilitas yang tinggi pada genom di tiap lokus, multi alel dan kodominan sehingga cocok digunakan sebagai *marker-assisted selection* (MAS) pada pemuliaan kedelai. Peluang mendapatkan alel

unik dan spesifik dalam suatu koleksi aksesi juga besar (Chaerani *et al.*, 2014) sehingga pemilihan marka SSR ini sudah sesuai untuk studi ini (Lestari *et al.*, 2017).

Persilangan Kedelai

Hasil persilangan menunjukkan bahwa, kendala persilangan paling banyak ditentukan oleh gugur bunga yang disusul dengan patah bunga. Bunga yang gugur sangat tinggi mencapai rerata 86% sedangkan bunga patah mencapai lebih 19% (Tabel 3). Gugur bunga yang tinggi hal ini cenderung disebabkan oleh faktor stres ketika proses kastrasi berlangsung, selain itu tangkai bunga merupakan organ penyokong bunga yang masih rapuh, dan merupakan jaringan meristem area pemanjangan dengan ujung meristemnya adalah organ generatif area putik.

Tabel 3. Data persilangan pembentukan populasi 3 macam kombinasi

Nama Persilangan	Jumlah Bunga Kastrasi			Jumlah Polong	
	Disilangkan	Patah (%)	Gugur (%)	Terbentuk (%)	Hampa
Biosoy2/Demas	86	16 (18.6)	72 (83.7)	14 (16.3)	0
Biosoy1/Tanggamus	50	10 (20.0)	44 (88.0)	6 (12.0)	0
Biosoy2/Tanggamus	95	18 (19.0)	83 (87.0)	13 (13.7)	0
Rerata (%)		(19.2)	(86.2)	(14.0)	

Berdasarkan data jumlah polong yang terbentuk di bawah angka 20% dengan rerata 14% pada kisaran antara 12-16.3%. Nilai keberhasilan penyerbukan sangat rendah terhadap bunga yang disilangkan, namun semua polong yang dihasilkan semua bernas dengan nilai kehampaan (0) nol persen (Tabel 3).

Jumlah polong yang terbentuk sangat rendah hal ini diduga disebabkan oleh tingkat gugur bunga yang tinggi mencapai 86%. Gugur bunga yang tinggi tersebut cenderung disebabkan oleh faktor stres ketika proses kastrasi berlangsung, sedangkan patah bunga diduga kuat karena faktor kurangnya kehati-hatian, dan tangkai bunga yang masih rapuh karena merupakan jaringan yang masih muda.

Beberapa faktor yang mempengaruhi kesuksesan penyerbukan dalam pelaksanaan persilangan ditentukan oleh faktor manusia, faktor lingkungan, serta alat yang digunakan (Sitepu *et al.*, 2015). Peran serta manusia dalam mempertinggi kesuksesan persilangan terutama ditentukan oleh keterampilan dan pengetahuan, pengetahuan dalam menentukan kapan waktu yang tepat suatu bunga untuk disilangkan.

Keberhasilan penyerbukan tanaman kedelai dapat dikenali setelah 7 hari melalui inisiasi pembentukan polong. Inisiasi pembentukan polong ditandai dengan munculnya calon polong yang mulai membesar, dan kelopak bunga tetap berwarna hijau. Sebaliknya, jika kelopak bunga menguning dan coklat maka penyerbukan bunga tersebut gagal (Syukur *et al.*, 2015). Pada penelitian ini polong yang terbentuk semua bernas atau tidak ada polong hampa (Tabel 3). Hal ini terjadi karena terbebasnya dari gangguan hama/penyakit terutama hama perusak polong, selain itu, secara genetis bukan merupakan penyerbukan antar kerabat jauh atau persilangan interspesies.

Beberapa aspek yang mempengaruhi keberhasilan penyerbukan buatan dan terjadinya pembuahan ditentukan oleh tingkat kesesuaian genetik (kompatibilitas) tetua, ketepatan waktu reseptif betina dan antesis jantan, kesuburan tanaman serta faktor lingkungan. Faktor lingkungan abiotis yang mungkin sangat

berpengaruh adalah suhu udara dan intensitas cahaya, intensitas cahaya semakin rendah dan suhu udara yang rendah dapat menghambat pemasakan serbuk sari (anther). Sedangkan faktor lingkungan biotis adalah kerusakan bunga dan polong oleh serangan hama atau penyakit (Sitepu *et al.*, 2015).

Keberhasilan penyerbukan buatan dan terjadinya pembuahan ditentukan oleh: a) Kepiawaian menentukan kapan waktu reseptif betina dan antesis jantan, waktu yang baik adalah antara pukul 6 - 10 pagi (Sitepu *et al.*, 2015), b) Viabilitas dan ketersediaan polen (serbuk sari) yang melimpah (Kartono, 2005), c) Manusia terutama terkait dengan keterampilan tenaga penyilang dan ketepatan pemberian perlakuan bunga yang tidak sesuai dapat menyebabkan bunga gugur, d) Faktor lingkungan biotis yaitu adanya serangan hama dan penyakit, e) Kegagalan serbuk sari berkecambah di atas kepala putik meski berada pada kepala putik sendiri dan asing, karena perbedaan masa pemasakan gamet jantan dan betina (Gardner *et al.*, 1991).

Selain kendala-kendala di atas, secara morfologi ukuran bunga kedelai sangat kecil yang ditopang oleh tangkai bunga dengan jaringan yang masih rapuh, sehingga rawan terkena gangguan fisik yang dapat menyebabkan banyaknya bunga yang patah sebelum disilangkan dan menjadi gugur (Tabel 3). Pekerjaan penyerbukan perlu dilakukan dengan sangat hati-hati oleh tenaga teknisi terampil dan berpengalaman. Perlu dilakukan pendekatan metode persilangan yang berbeda untuk dapat mengurangi tingkat kerusakan bunga. Perbaikan metode kastrasi dengan membuka kelopak bunga yang selama ini menggunakan pinset dapat diganti dengan menggunting bagian kelopak bunga, sehingga kerusakan patah tangkai dapat dihindarkan.

Menurut Gardner *et al.* (1991) penyerbukan suatu bunga tidak selalu berhasil membentuk buah dan biji sesuai harapan karena serbuk sari dapat gagal berkecambah pada kepala putiknya sendiri maupun pada kepala putik asing (tidak cocok) walaupun kondisinya sangat menguntungkan dan ketidakcocokan dapat diakibatkan oleh adanya

perbedaan masa pemasakan gamet jantan dan betina.

Keberhasilan presentasi persilangan digolongkan menjadi tiga kriteria yaitu keberhasilan rendah < 20 %, sedang 20-60 % dan tinggi > 60 %. Pada umumnya persentase keberhasilan persilangan kedelai kurang dari 60% (Kartono, 2005). Faktor lingkungan abiotis yang mungkin sangat berpengaruh adalah suhu udara dan intensitas cahaya, intensitas cahaya semakin rendah dan suhu udara yang rendah dapat menghambat pemasakan serbuk sari (anther). Sedangkan faktor lingkungan biotis adalah kerusakan bunga dan polong oleh serangan hama atau penyakit (Sitepu *et al.*, 2015).

Penentuan keberhasilan persilangan dapat diketahui melalui gabungan beberapa karakter morfologi misal warna hipokotil, ukuran daun dan warna bunga yang muncul setelah fase generatif, dan berbagai konsekuensi kehilangan tenaga, waktu, biaya, dan tempat ekstra karena melimpahnya jumlah sampel yang belum pasti. Menurut Lestari *et al.* (2017) dikemukakan bahwa pola polimorfisme tiap primer menunjukkan validitas yang dapat digunakan sebagai dasar analisis konfirmasi penurunan alel progeni F1 dari tetua persilangannya. Hal tersebut mendorong bahwa, untuk merujuk kebenaran hasil persilangan secara singkat, cepat dan akurat dan dapat dilakukan pada fase bibit, maka perlu dilakukan konfirmasi hasil persilangan secara molekuler.

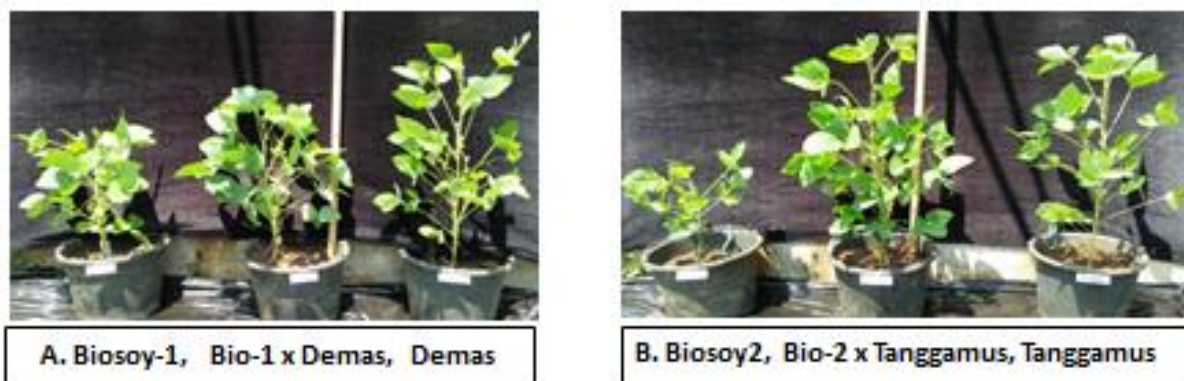
Konfirmasi Keberhasilan Persilangan

Kegiatan persilangan dari kombinasi empat tetua, diperoleh 18 nomor turunan terduga hasil persilangan F1 yaitu 8 nomor dari persilangan Biosoy 2 x Demas, 2 nomor dari persilangan Biosoy 1 x Tanggamus, dan 8 nomor dari persilangan Biosoy 2 x Tanggamus. Karakter morfologi yang diamati pada tanaman terduga hibrida F1 adalah tinggi tanaman, umur berbunga, warna hipokotil dan warna bunga. Dua karakter tinggi tanaman dan umur berbunga diketahui sebagai karakter kuantitatif yang ekspresinya dikontrol oleh banyak gen yang dipengaruhi oleh lingkungan, sehingga informasinya bersifat bias dan kurang akurat. Dilaporkan bahwa, karakter tinggi tanaman terkait kuat dengan beberapa karakter umur berbunga, jumlah bukapada batang utama, jumlah polong, umur masak, dan bobot biji per tanaman (Putri *et al.*, 2014).

Karakter tinggi tanaman terduga turunan persilangan F1 dari 3 populasi persilangan cenderung sedikit lebih tinggi dari tetua Biosoy 1 dan Biosoy 2, dan lebih pendek dari tetua Demas dan Tanggamus, namun karakter umur berbunga cenderung sama dengan tetua Biosoy 1 dan Biosoy 2, dan lebih pendek dari tetua Demas dan Tanggamus (Tabel 4). Berdasarkan morfologi tinggi tanaman dari 18 nomor tanaman terduga turunan persilangan asal 3 kombinasi persilangan, terdapat dua nomor yang diduga sebagai tanaman hibrida F1 yaitu nomor I.3 dari persilangan Biosoy 2 x Demas dan nomor III.5 asal persilangan Biosoy 2 x Tanggamus (Tabel 4).

Tabel 4. Konfirmasi fenotipik hasil persilangan berdasarkan morfologi tinggi tanaman, umur berbunga, warna hipokotil dan warna bunga.

	Nama Tetua Nomor Pogeni	Tinggi Tanaman	Umur Berbunga	Warna Hipokotil	Warna Bunga	Keterangan Status Hibrida
1	Biosoy2xDemas (No.1-6)	41.33	32	Ungu	Ungu	5 Tak terduga
	Biosoy2xDemas No.3	46	32	Ungu	Ungu	1Terduga hibrida
	Biosoy2	42	33	Ungu	Ungu	
	Demas	67	36	Ungu	Ungu	
2	Biosoy1xTanggamus (No.1-2)	42	32	Hijau	Putih	2 <i>Selfing</i>
	Biosoy1	41	33	Hijau	Putih	
	Tanggamus	65	37	Ungu	Ungu	
3	Biosoy2xTanggamus (No.1-8)	42.5	32.5	Ungu	Ungu	7 Takterduga
	Biosoy2xTanggamus No.5	51	33	Ungu	Ungu	1Terduga hibrida
	Biosoy2	42	33	Ungu	Ungu	
	Tanggamus	65	37	Ungu	Ungu	



Gambar 2. A-B. Figur tetua persilangan yang mengagip tanaman terduga F1 hasil persilangan.

Uji kebenaran hasil penyerbukan silang secara konvensional dilakukan dengan cara menanam biji-biji hasil *crossing* dengan kedua tetua dan membandingkannya karakter-karakter morfologi, sedangkan karakter morfologi sangat terbatas dan dipengaruhi oleh lingkungan. Karakter morfologi dengan tanda beda yang muncul setelah fase pertumbuhan generatif misal warna bunga, hal ini sangat merugikan dari pertimbangan waktu, tempat, tenaga dan biaya, selain itu juga tidak akurat. Penentuan kebenaran persilangan kedelai melalui warna bunga sangat terbatas, karena karakter warna bunga kedelai bersifat dominan ungu dan resesif putih. Sehingga persilangan antara 2 (dua) tetua yang memiliki karakter warna bunga yang sama sulit dijadikan sebagai parameter atau penanda morfologi.

Kedelai merupakan tanaman kleistogami yaitu tanaman yang menyerbuk sendiri sebelum mahkota bunga mekar. Hal ini merupakan kendala tersendiri bagi para pemulia kedelai untuk memastikan kebenaran polong dan biji-biji yang dihasilkan dalam kegiatan pembentukan populasi persilangan tersebut. Apakah polong dan biji-biji yang terbentuk sesuai target yang dikehendaki atau hasil penyerbukan sendiri. Kendala tersebut akan dijumpai baik dalam pembentukan populasi persilangan pada generasi awal (generasi pertama) maupun pada program silang balik (*backcrossing*) pada pemuliaan percepatan perbaikan varietas dengan penyisipan gen-gen unggul yang dikehendaki.

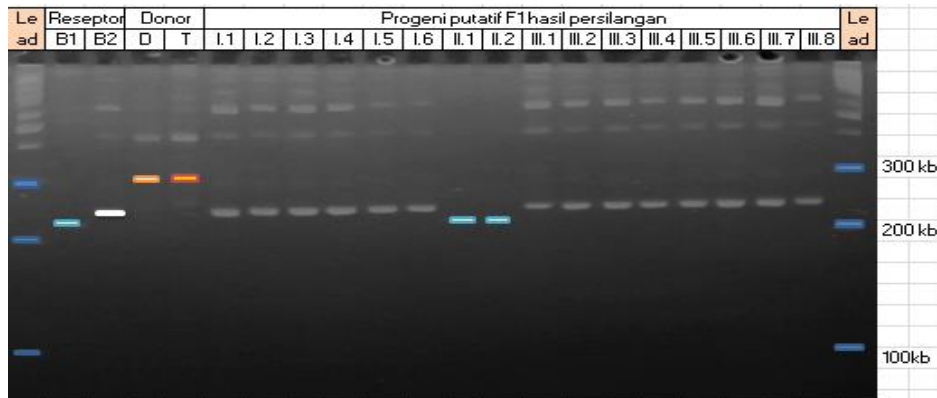
Konfirmasi secara fenotipik dengan tinggi tanaman dan umur berbunga belum memadai untuk menentukan individu F1 hasil persilangan, perlu didukung dengan karakter warna hipokotil dan warna bunga. Karakter warna hipokotil dan warna bunga diketahui bersifat dominan yaitu

warna ungu pada bunga dominan terhadap warna putih, demikian juga warna hipokotil ungu dominan terhadap warna hijau. Karena keterbatasan dua karakter ini sehingga sulit bagi pemulia untuk menggunakan sebagai penciri keberhasilan persilangan, terutama jika kedua tetua persilangan sama-sama memiliki penciri warna yang sama.

Konfirmasi Secara Molekuler

Sejak berkembangnya seleksi berbasis marka molekuler, seleksi molekuler memiliki keunggulan-keunggulan yaitu dapat mencapai sasaran target secara akurat, tidak dipengaruhi oleh lingkungan, tidak merusak karena hanya memerlukan bagian kecil dari tanaman dan dapat dilakukan pada fase bibit (Reflinur & Lestari, 2015; Santoso *et al.*, 2006). Kesuksesan hibridisasi dapat diketahui oleh munculnya alel-alel yang terbawa hasil introgresi dari kedua tetuanya sehingga generasi keturunannya tersebut terkonfirmasi sebagai tanaman hibrida (Rosalia *et al.*, 2020).

Berdasarkan pola pita DNA (alel) yang terbentuk pada gel poliakrilamid menggunakan marka polimorfik primer SSR Satt 406 diketahui bahwa calon-calon tetua betina antara varietas Biosoy 1 dengan Biosoy 2 memiliki pola pita DNA (alel) yang berbeda ukuran. Pola pita varietas Biosoy 1 diperkirakan memiliki ukuran 225 kb sedangkan varietas Biosoy 2 diperkirakan memiliki ukuran 250 kb sehingga laju pita DNA Biosoy 1 lebih cepat. Namun, pada tetua jantan varietas Demas dan Tanggamus memiliki pola pita yang sama diperkirakan berukuran 300 kb, dan tampak jauh berada di atas pola pita calon-calon tetua betina (Gambar 3).



Gambar 3. Konfirmasi molekuler pada tiga macam populasi persilangan menggunakan primer SSR polimorfik Satt 406 pada gel poliakrilamid 8%.
(Ket. B1: Biosoy1, B2: Biosoy2, D: Demas, T: Tanggamus, I.1-6 Biosoy2/Demas, II.1-2 Biosoy1/Tanggamus, III.1-8 Biosoy2/Tanggamus).

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa, posisi pola pita yang sama pada kedua calon tetua jantan, kedua tetua tersebut telah diketahui memiliki karakter toleran Al. Alel-alel tersebut dimungkinkan memiliki banyak kesamaan pada basa penyusunnya, namun hal tersebut perlu dibuktikan melalui sekuensing.

Berdasarkan konfirmasi marka molekuler polimorfik menggunakan Satt 406 pada tiga kombinasi persilangan menunjukkan bahwa alel tetua jantan dari varietas Demas dan Tanggamus tidak muncul pada turunan F1 putatif dari tiga kombinasi persilangan. Hal tersebut ditunjukkan (Gambar 3) bahwa pada persilangan Biosoy 1 x Tanggamus, alel tetua Biosoy 1 berada pada ukuran 225 kb muncul pada individu Biosoy 1 dan individu-individu turunan F1 putatif, namun alel tetua Tanggamus tidak muncul pada individu-individu turunan F1 putatif. Demikian juga pada kombinasi persilangan antara varietas Biosoy 2 x Demas dan Biosoy 2 x Tanggamus, alel tetua Biosoy 2 sebesar 250 kb muncul pada individu Biosoy 2 dan individu-individu turunan F1 putatif, namun alel tetua Demas dan Tanggamus tidak muncul pada individu-individu turunan F1 putatif. Hal tersebut menunjukkan bahwa posisi alel Demas dan Tanggamus sebesar 300 kb tidak terinsersikan pada kombinasi persilangan tersebut. Hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan konsep bahwa dalam penyerbukan silang merupakan hasil dari peleburan 2 sel gamet betina dan jantan yang masing-masing menyumbang 1 set kromosom, sehingga individu yang dihasilkan merupakan genotipe heterozigot dengan perbandingan genetik 1:1. Hal tersebut di atas menunjukkan bahwa populasi persilangan generasi F1 belum berhasil didapatkan.

Berdasarkan hasil penelitian ini diketahui bahwa penggunaan marka molekuler dapat berperan penting membantu pemulia dalam mengkonfirmasi kebenaran populasi persilangan, apakah populasi tersebut merupakan hasil dari penyerbukan silang (*crossing*) atau hasil penyerbukan sendiri (*selfing*). Hasil analisis SSR ini terbukti secara cepat dan efektif dapat menskrining generasi hibrida hasil *crossing* tanpa harus didahului seleksi morfologi di lapang yang memerlukan waktu lama, sesuai dengan laporan sebelumnya (Khan *et al.*, 2013; Lestari *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Sejumlah 8 primer SSR polimorfik dapat membedakan kombinasi 4 pasang tetua kedelai yaitu: 6 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549 dan Satt 171) untuk Biosoy 1 x Demas; 6 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549 dan Satt 171) untuk Biosoy 2 x Demas; 7 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 520, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244) untuk Biosoy 1 x Tanggamus; serta 7 primer (Satt 070, Satt 406, Satt 516, Satt 182, Satt 549, Satt 171 dan Satt 244) untuk Biosoy 2 x Tanggamus. Sebanyak 18 nomor individu F1 putatif dari 3 kombinasi persilangan yaitu 8 Biosoy 2 x Demas, 2 Biosoy 1 x Tanggamus dan 8 Biosoy 2 x Tanggamus telah dikonfirmasi secara molekuler menggunakan primer SSR polimorfik Satt 406 dengan hasil bahwa alel-alel tetua jantan tidak terkandung (terinsersikan) pada ke-18 individu F1 putatif tersebut, dengan demikian individu tersebut merupakan hasil penyerbukan sendiri (*selfing*). Penggunaan alat bantu seleksi molekuler dengan

primer SSR Satt 406 dapat membantu pemulia dalam menskrining populasi heterozigot pada generasi awal terhadap tanaman kedelai secara efektif dan akurat, skrining secara molekuler juga bersifat melengkapi dari kekurangan penggunaan penciri morfologi.

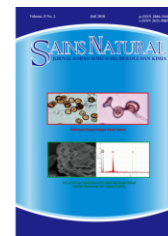
UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Bapak Kepala Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian dan Bapak Kepala Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian atas dukungan pendanaan pada penelitian ini, yang merupakan bagian dari penelitian ROPP TA. 2019-2021 berjudul Perbaikan Varietas Kedelai Biosoy untuk Karakter Toleransi Terhadap Cekaman Al.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashari. (2003). Tinjauan tentang alih fungsi lahan sawah ke non sawah dan dampaknya di Pulau Jawa. *Forum Penelitian Agro Ekonomi*, 21(2), 83–98.
- Balitkabi. (2016). *Deskripsi varietas unggul kedelai 1918-2016*.
- BPS. (2021). Impor kedelai menurut negara asal utama tahun 2010-2020.
- Carsono, N., Prayoga, G. I., Rostini, N., & Dono, D. (2016). Seleksi berbasis marka molekuler pada padi generasi F2 guna merakit galur padi harapan tahan wereng coklat. *Jurnal Agrikultura*, 27(1), 9–15.
- Chaerani, Hidayatun, N., & Utami, D. W. (2011). Keragaman genetik 50 aksesi plasma nutfah kedelai berdasarkan sepuluh penanda mikrosatelit. *Jurnal AgroBiogen*, 7(2), 96–105.
- Chaerani, Utami, D. W., Hidayatun, N., Abdullah, B., & Suprihatno, B. (2014). Asosiasi antara marka SSR dengan ketahanan terhadap wereng batang coklat pada varietas dan calon galur harapan padi. *Jurnal Entomologi Indonesia*, 11(1), 43–52.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13–15.
- Eka, A., Hanafiah, D. S., & Nuriadi, I. (2015). Respon morfologis dan fisiologis beberapa varietas kedelai (*Glycine max. L. Merrill*) di tanah masam. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(2), 507–514.
- Gardner, F. P., Pearce, R. B., & Michell, R. L. (1991). *Fisiologi tanaman budidaya*. Jakarta: Indonesia University Press.
- Giono, B. R. W., Muh. Farid, B. D. R., Nur, A., Solle, M. S., & Idrus, I. (2014). Ketahanan genotipe kedelai terhadap kekeringan dan kemasaman, hasil induksi mutasi dengan sinar gamma. *Jurnal Agroteknos*, 4(1), 44–52.
- Kartono. (2005). Persilangan buatan pada empat varietas kedelai. *Buletin Teknik Pertanian*, 10(2), 49–52.
- Kementan. (2020). *Info Teknologi: Demas 2 dan Demas 3, pilihan kedelai untuk lahan masam*.
- Khan, T. D., Anh, T. Q., Buu, B. C., & Xuan, T. D. (2013). Applying molecular breeding to improve soybean rust resistance in Vietnamese elite soybean. *American Journal Plant Science*, 4, 1–6.
- Krisnawati, A. (2017). Kedelai sebagai sumber pangan fungsional (Soybean as source of functional food). *Iptek Tanaman Pangan*, 12(1), 57–65.
- Lestari, P., Sustiprijatno, & Asadi. (2017). Konfirmasi penurunan alel tetua persilangan kedelai pada generasi F1 berdasarkan marka SSR. *Prosiding Seminar Nasional III Tahun 2017*, 1–6.
- Mulyani, A., & Sarwani, M. (2013). Karakteristik dan potensi lahan sub optimal untuk pengembangan pertanian di Indonesia. *Jurnal Sumberdaya Lahan*, 7(1), 47–55.
- Nuraida, D. (2012). Pemuliaan tanaman cepat dan tepat melalui pendekatan marka molekuler. *eJurnal El-Hidayah*, 2(2), 97–103.
- Pardal, S. J., & Suharsono. (2016). Evaluation of transgenic soybean lines tolerant to Aluminium in biosafety containment. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*, 35(2), 155–161.
- Putri, P. P., Adisyahputra, & Asadi. (2014). Keragaman karakter morfologi, komponen hasil, dan hasil plasma nutfah kedelai (*Glycine max L.*). *BIOMA*, X(2), 41–48.
- Reflinur, & Lestari, P. (2015). Penentuan gen dalam kromosom tanaman dengan bantuan marka DNA. *Jurnal Litbang Pertanian*, 34(4), 177–186.

- Risliawati, A., Riyanti, E. I., Lestari, P., Utami, D. W., & Silitonga, T. S. (2015). Development of SSR marker set to identify fourty two Indonesian soybean varieties. *Jurnal AgroBiogen*, 11(2), 49–58.
- Rosalia, D., Lestari, P., Soegianto, A., Saptadi, D., Sutanto, A., Nugroho, K., ... Roostika, I. (2020). Konfirmasi pewarisan alel pada generasi F1 hasil persilangan Calcutta-4 (*Musa acuminata* ssp. *burmannicoides*) dan *Musa acuminata* ssp. *microcarpa* berdasarkan marka. *Jurnal AgroBiogen*, 16(1), 17–24.
- Santana, F. A., da Silva, M. F., Guimares, J. K. F., Ferreira, M. F. S., Perreira, W. D., Piovesan, N. D., & de Barros, E. G. (2014). Marker-assisted selection strategies for developing resistant soybean plants to cyst nematode. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 14(13), 180–186.
- Santoso, T. J., Utami, D. W., & Septiningsih, E. M. (2006). Analisis sidik jari DNA plasma nutfah kedelai menggunakan markah SSR. *Jurnal AgroBiogen*, 2(1), 1–7.
- Sitepu, M. B., Rosmayati, & Bangun, M. K. (2015). Persilangan genotipe-genotipe kedelai (*Glycine max* L. Merrill.) hasil seleksi pada tanah salin dengan tetua betina varietas Anjasmoro. *Jurnal Online Agroekoteknologi*, 3(1), 257–263.
- Sudrajat, D. (2010). Identifikasi karakter morfofisiologi kedelai adaptif lahan masam. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 10(2), 103–110.
- Syukur, M., Sujiprihati, S., & Yuniati, R. (2015). *Teknik pemuliaan tanaman (edisi revisi)*. Jakarta.
- Tasma, I. M. (2015). Gen dan QTL pengendali toleransi tanaman terhadap keracunan Aluminium dan aplikasinya untuk pemuliaan tanaman di Indonesia. *Jurnal AgroBiogen*, 11(3), 111–124.
- Tasma, I. M., Warsun, A., & Asadi. (2015). Development and characterization of F2 population for molecular mapping of Aluminum-toxicity tolerant QTL in soybean. *Jurnal AgroBiogen*, 4(1), 1–8.
- Terryana, R. T., Nugroho, K., Reflinur, Mulya, K., Dewi, N., & Lestari, P. (2017). Keragaman genotipik dan fenotipik 48 aksesori kedelai introduksi asal Cina. *Jurnal AgroBiogen*, 13(1), 1–16.
- Wu, X., Vuong, T. D., Leroy, J. A., Shannon, J. G., Sleper, D. A., & Nguyen, H. T. (2011). Selection of a core set of RILs from Forrest X William 82 to develop a framework map in soybean. *Theory Applied Genetics*, 122(6), 1179–1187.



INHIBITORY CAPACITY OF CLAY MASK 96% ETHANOL EXTRACT FROM BITTER MELON (*Momordica charantia* L.) AGAINST *Staphylococcus aureus*

Siti Qur'aniati¹⁾, I.G.A. Manik Widhyastini^{2)*} Devy Susanty¹⁾

¹⁾ Program Studi Kimia, FMIPA, Universitas Nusa Bangsa

²⁾ Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Nusa Bangsa

Jl. K.H. Sholeh Iskandar Km. 4 Cimanggu, Tanah Sareal, Bogor 16166

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 May 2022,

Revised 08 Jul 2022,

Accepted 28 Jul 2022,

Available online 30 Jul 2022

Keywords:

- ✓ inhibition
- ✓ ethanol extract
- ✓ clay mask
- ✓ *Momordica charantia* L.
- ✓ *Staphylococcus aureus*

*corresponding author:

widhyastini2304@gmail.com

Phone: +6281286080523

[https://doi.org/10.31938/jsn.v](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.413)

[12i3.413](https://doi.org/10.31938/jsn.v12i3.413)

ABSTRACT

Momordica charantia L. commonly known as bitter melon plant, is widely used as a treatment for various diseases, including skin infections. The purpose of this study was to determine the highest concentration of bitter melon extract and infusion in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria. This research was conducted using the disc diffusion method and evaluation of the quality of the clay mask was carried out on the growth of *Staphylococcus aureus* bacteria. The results showed that 96 % ethanol extract of bitter melon at a concentration of 100% had an inhibitory effectiveness of 6.32 mm and was higher than that of 4.85 mm of bitter melon infusion. The clay mask formula of 96% ethanol extract of bitter melon with concentrations of 5 % (F1), 7.5 % (F2) and 10 % (F3) gave a fairly good evaluation of physical quality with an inhibition zone of 5.0 mm; 7.06 mm and 7.30 mm, respectively. The clay mask of 96% ethanol extract of bitter melon fruit F1, F2 and F3 belongs to the medium category in inhibiting bacteria.

ABSTRAK

Daya Hambat Masker Clay Ekstrak Etanol 96% Buah Pare (*Momordica charantia* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Momordica charantia L. umumnya dikenal dengan tanaman pare, digunakan sebagai pengobatan terhadap berbagai penyakit, diantaranya infeksi pada kulit. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi tertinggi ekstrak dan infusa buah pare dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode difusi cakram dan evaluasi mutu masker clay dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96 % buah pare pada konsentrasi 100 % memiliki efektivitas daya hambat sebesar 6,32 mm dan lebih tinggi dibandingkan dengan infusa buah pare 4,85 mm. Formula masker clay ekstrak etanol 96 % buah pare konsentrasi 5 % (F1) ; 7,5 % ; (F2) dan 10 % (F3) memberikan hasil evaluasi mutu fisik yang cukup baik dengan zona hambat berturut-turut 5,0 mm ; 7,06 mm dan 7,30 mm. Masker clay ekstrak etanol 96% buah pare F1, F2 dan F3 termasuk ke dalam kategori sedang dalam menghambat bakteri.

Kata kunci: daya hambat; ekstrak etanol; masker clay; *Momordica charantia* L.; *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Tanaman pare (*Momordica charantia* L.) umumnya digunakan sebagai pengobatan beberapa penyakit, diantaranya infeksi pada kulit. Buah pare diketahui memiliki aktivitas antibakteri (Kasim dan Yusuf, 2020). Sampel infusa buah pare mengandung senyawa alkaloid, tanin, terpenoid, steroid, saponin (Ainia, 2017). Hasil

analisis fitokimia ekstrak etanol 70% buah pare memberikan hasil positif flavonoid, saponin, dan polifenol (Yuda *et al.*, 2013) sedangkan penelitian Suriyawati (2018) menunjukkan ekstrak buah mengandung alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid. Penelitian Febriani (2014) menyatakan bahwa, jus buah pare mempunyai daya antifungi yang mirip dengan nistain (kontrol positif) dengan zona hambat 6,33 mm terhadap



Candida albicans. Perasan buah pare hijau, konsentrasi 75% dan 100 % pada waktu kontak 90 menit memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (Zaini and Shufiyani, 2017).

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri penyebab munculnya jerawat pada kulit (Apriani *et al.*, 2014). Buah pare (*Momordica charantia* L.) menjadi salah satu solusi dalam mengurangi efek samping dari antibiotik, berdasarkan khasiat dan manfaat buah pare tersebut. Pemanfaatan sebagai antijerawat dalam bentuk sediaan masker *clay* dari ekstrak buah pare perlu dilakukan.

Masker *clay* merupakan masker jenis pasta, dapat digunakan untuk kulit rentan berjerawat. Kulit dapat dibersihkan secara mendalam dengan menggunakan masker *clay*. Cara kerja masker *clay* yaitu dengan menarik kelebihan minyak dan juga kotoran di wajah. Iritasi dan dehidrasi pada kulit saat pemakaian masker dapat dihindari, diusahakan tidak sampai mengeras dan kering total (Lubis, 2018). Pada penelitian Mirna dan Marini (2019) buah pare juga dapat dimanfaatkan dalam bentuk sediaan *peel off*, namun pada penelitian ini memiliki kekurangan karena belum diketahui aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah buah pare (*Momordica charantia* L.) yang diperoleh dari pasar tradisional di daerah Kemang Bogor, akuades, bentonit, kaolin, *xanthan gum*, gliserin, natrium lauril sulfat, nipagin, *fragrance* kopi, larutan etanol 96%, *Tryptic Soy Agar* (TSA), NaCl fisiologis, bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC®6538TM, metanol p.a, kloroform, H₂SO₄ pekat, amoniak pekat, pita Mg, larutan HCl 2 N, FeCl₃ 1% (b/v), kertas saring Whatman No. 41, pereaksi Liebermann-Buchard, pereaksi Mayer, pereaksi Wagner, pereaksi Dragendorf, asam asetat glasial, dan antibiotik *ciprofloxacin*.

Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik (merk Denver, Jerman), ayakan ukuran 60 mesh, peralatan gelas, *hot plate*, *Laminar Air Flow*, *vortex*, *blender* (merk Philips), pHmeter (merk Mettler Toledo, Amerika), *Moisture Balance-Kett 610*, viskometer (merk Brookfield, Singapura), evaporator, Spektrofotometer *UV - Visible* (Shimadzu, Jepang), inkubator (merk

Memmert, Jerman), oven (merk Memmert, Jerman), dan *autoclave* (merk Hirayama, Jepang).

Metode

Pembuatan Simplisia

Determinasi tumbuhan buah pare dilakukan di Pusat Konservasi Tumbuhan, Cibinong, Bogor, dengan nomor register: B-213/IV-DI-01/II/2021. Sampel daging buah pare sebanyak 7 kg dicuci menggunakan air sampai bersih. Buah pare dipisahkan dari bijinya dan diiris kurang lebih 1 cm, kemudian dipanaskan pada suhu 600 °C selama 24 jam. Simplisia pare dihaluskan dan diayak dengan ayakan 60 mesh.

Pengujian Kadar Air dan Susut Pengeringan Simplisia Kering Buah Pare

Penetapan susut pengeringan menggunakan metode gravimetri. Cawan porselen dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit. Serbuk simplisia pare sebanyak 2 gram dikeringkan pada suhu 105°C selama 15 menit, diulangi sampai didapatkan hasil yang konstan dan dihitung susut pengeringannya (Depkes RI, 2000).

Susut Pengeringan

$$= \frac{\text{Berat awal (gram)} - \text{Berat akhir (gram)}}{\text{Berat sampel (gram)}} \times 100\%$$

Penetapan kadar air dilakukan dengan menimbang 2 gram serbuk simplisia pare dan dikeringkan selama 15 menit pada suhu 105 °C. Pengukuran dilakukan dengan alat *moisture balance*. Kadar air simplisia serbuk buah pare kurang dari 10% (Depkes RI, 2000).

Pembuatan Ekstrak dan Infusa Buah Pare

Simplisia buah pare sebanyak 200 gram direndam dengan pelarut etanol 96 % (1:10). Perendaman (maserasi) dilakukan selama 3 x 24 jam pada suhu 50 °C. Untuk mendapatkan ekstrak kental, dilakukan penguapan pelarut dengan *rotary evaporator* (Farmakope, 2017).

Pembuatan infusa pare dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Oktama *et al.* (2018). Tiga ratus gram buah pare yang sudah dipotong kecil-kecil, dicuci bersih dengan air mengalir, dan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* yang berisi *aquadest* sebanyak 300 mL. Buah pare kemudian direbus sampai 100 °C selama 5 menit. Filtrat infusa diambil dan dimasukkan ke dalam *beaker glass* steril.

Uji Bebas Etanol Ekstrak Kental Buah Pare

Uji bebas etanol terhadap ekstrak pare dilakukan dengan dua cara yang dikembangkan oleh Mauti *et al.* (2018). Cara yang pertama yaitu dengan menguji ekstrak kental buah pare menggunakan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL asam sulfat pekat. Keberadaan etanol diketahui dengan bau ester. Cara yang kedua dengan meneteskan ekstrak kental, larutan ekstrak etanol dan air pada kertas saring. Jika ekstrak kental tidak menguap dan menyerap dikertas saring maka dikatakan bebas etanol.

Uji Fitokimia Kualitatif

Pemeriksaan Alkaloid (Damar, 2012).

Ekstrak kental dan infusa pare sebanyak 1 mg ditambahkan 1 mL HCl 2 N dan 9 mL *aquadest* kemudian dipanaskan selama 2 menit. Selanjutnya filtrat dibagi dalam tiga tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan 2 - 3 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambahkan 2 - 3 tetes pereaksi Dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 2 - 3 tetes pereaksi Wagner. Alkaloid dinyatakan positif apabila terjadi endapan putih pada tabung satu, endapan jingga pada tabung kedua dan endapan coklat pada tabung ketiga.

Pemeriksaan Flavonoid (Julianto, 2019).

Ekstrak kental dan infusa pare sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dipanaskan sekitar 5 menit. Selanjutnya, dilarutkan dalam 1 - 2 mL metanol 50 %. Setelah itu, ditambahkan serbuk Mg atau serbuk Zn dan ditambahkan 4 - 5 tetes HCl pekat, lalu dikocok perlahan. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga, atau merah bata hingga merah ungu.

Pemeriksaan Saponin (Nainggolan *et al.*, 2019).

Ekstrak kental dan infusa pare sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 10 mL *aquadest*. Selanjutnya dikocok kuat-kuat selama 10 menit, dilihat apakah terdapat busa. Kemudian filtrat ditambahkan 1 - 3 tetes HCl 1 N, jika busa bertahan selama 10 menit setinggi 1 - 3 cm, maka positif saponin.

Pemeriksaan Tanin (Nainggolan *et al.*, 2019).

Ekstrak kental dan infusa pare sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 - 3 tetes larutan FeCl₃ 1 %. Adanya warna hijau kehitaman atau biru tua, dinyatakan positif terdapat tanin.

Pemeriksaan Triterpenoid (Julianto, 2019)

Ekstrak kental dan infusa pare sebanyak 1 mg dilarutkan dalam 1 mL kloroform dan 1 mL asam

asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ditambahkan dengan 1 - 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung tersebut. Terbentuknya cincin kecoklatan menunjukkan positif triterpenoid.

Pembuatan Sediaan Masker Clay

Pembuatan sediaan masker *clay* dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Saragi (2019). Air suling sejumlah tertentu dimasukkan ke dalam lumpang, ditambahkan bentonit dan xanthan gum, kemudian digerus cepat sampai homogen. Kaolin ditambahkan ke dalam lumpang sedikit demi sedikit sambil digerus, kemudian ditambahkan gliserin (Fase 1). Na-metabisulfid dilarutkan dengan nipagin dalam air panas (Larutan A) dan natrium lauril sulfat dilarutkan ke dalam *aquadest* (Larutan B). Larutan A digerus perlahan di dalam lumpang dan ditambahkan larutan B secara perlahan hingga terbentuk pasta (Fase 2). Fase 1 dan Fase 2 digabungkan dan digerus kemudian ditambahkan *fragrance* kopi sampai homogen terbentuk pasta basis masker *clay*. Basis masker *clay* ditambahkan ekstrak kental pare 5 % (F1), ekstrak kental pare 7,5 % (F2), dan ekstrak kental pare 10 % (F3) kemudian diaduk hingga homogen. Sebagai kontrol menggunakan basis masker *clay* tanpa ditambahkan ekstrak kental pare (F0).

Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Pare, Infusa Pare dan Masker Clay Ekstrak Pare, serta Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Masker Clay

Pengujian daya hambat dilakukan terhadap larutan uji yang terdiri dari ekstrak kental buah pare, infusa buah pare (konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 %), masker *clay* (F0, F1, F3, dan F4), kontrol positif (*Ciprofloxacin*) dan kontrol negatif (*aquadest steril*). Metode yang digunakan untuk uji daya hambat yaitu metode difusi cakram kertas (Ulum dan Khanifah, 2017). Evaluasi mutu fisik masker *clay* dilakukan dengan metode yang dikembangkan oleh Santoso *et al.* (2018).

Penyiapan Media.

Medium *Tryptic Soy Agar* (TSA) dibuat dengan cara melarutkan *Tryptic Soy Agar* sebanyak 9,8 gram dalam air suling hingga 350 mL, kemudian disterilkan.

Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol dan Infusa Pare.

Larutan bakteri yang telah distandarisasi sebanyak 1 mL dituang ke dalam cawan petri yang berisi 20 mL media *Tryptic Soy Agar* (TSA) hangat, kemudian digoyangkan dan ditunggu

hingga padat. Kertas cakram ukuran 6 mm (diameter) direndam selama 15 menit ke dalam larutan uji masing-masing konsentrasi, kemudian kertas yang telah ditiriskan diletakkan di atas media agar selektif yang telah ditanami bakteri uji dengan pinset steril. Cawan ditutup rapat dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Pengamatan zona hambat yang terbentuk diukur diameternya menggunakan penggaris atau jangka sorong sebanyak tiga kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Pengujian Kadar Air dan Susut Pengerinan Simplisia Buah Pare

Pengujian kadar air simplisia buah pare menggunakan alat *moisture balance* dengan 3 kali pengulangan dan pengujian susut pengerinan menggunakan oven dengan 2 kali pengulangan, ditunjukkan pada Tabel 1. Hasil kadar air yang didapat sebesar 7,67 %. Hasil tersebut memenuhi standar kadar air yang ditentukan oleh Farmakope (2017). Hasil susut pengerinan sebesar 8,83 %. Hasil tersebut memenuhi syarat Farmakope (2017) yaitu susut pengerinan simplisia pare tidak lebih dari 10 %.

Tabel 1. Hasil Pemeriksaan Karakteristik Simplisia Buah Pare

No.	Parameter	Hasil (%)	Standar (%)
1.	Kadar air	7,67	≤ 9,2(Farmakope, 2017)
2.	Susut Pengerinan	8,83	≤ 10(Farmakope, 2017)

Fitokimia Ekstrak dan Infusa Buah Pare

Hasil rendemen ekstrak buah pare yang didapatkan sebesar 18,6 %. Hasil tersebut memenuhi syarat Farmakope (2017) yaitu rendemen ekstrak kental buah pare tidak kurang dari 17 %. Hasil skrining fitokimia ekstrak dan infusa buah pare disajikan pada Tabel 2.

Ekstrak buah pare positif mengandung metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid. Infusa buah pare positif mengandung alkaloid dan saponin. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak buah pare dan infusa buah pare terdapat perbedaan, hal ini karena terdapat perbedaan pelarut dan teknik ekstraksi yang digunakan. Berdasarkan hasil pengujian sebelumnya, perasan buah pare teridentifikasi mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin (Rosyad, 2012 ; Apriani *et al.*, 2014) dan juga triterpenoid (Parawansah *et al.*, 2016).

Tabel 2. Hasil Fitokimia Ekstra dan Infusa Buah Pare

No.	Senyawa	Pereaksi	Hasil positif berdasarkan referensi	Hasil pengujian		
				Ekstrak	Infusa	Blanko
1.	Alkaloid	Pereaksi Mayer	Endapan putih		+	-
		Pereaksi Dragendorff	Endapan jingga		-	-
		Pereaksi Wagner	Endapan coklat	+	-	-
2.	Flavonoid	Uji Wilstater	Merah bata hingga merah ungu	+	-	-
			Busa stabil selama 10 menit	+	-	-
3.	Saponin	Uji Forth	Warna hijau kehitaman atau biru tua	+	+	-
4.	Tanin	+FeCl ₃ 1 %	Warna cincin kecoklatan atau violet	+	-	-
5.	Triterpenoid	Uji Lieberman Burchard		+	-	-

Keterangan:

Tidak terdeteksi = (-)

Terdeteksi = (+)

Tabel 3. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak dan Infusa Buah Pare

Konsentrasi	Diameter	Diameter	Kontrol (-) (Etanol 96%)	Kontrol (-) <i>Aquadest</i>	Kontrol (+) <i>Ciprofloxacin</i>
	daya hambat ekstrak buah pare (mm)	daya hambat infusa buah pare (mm)			
20 %	-	-			
40 %	1,62	-			
60 %	4,26	2,33	-	-	17,24
80 %	5,14	3,48			
100 %	6,32	4,85			

Keterangan: (-) Tidak ada daya hambat

Bebas Etanol

Hasil uji bebas etanol ditandai dengan tidak terciumnya bau ester. Pengujian yang kedua menggunakan kertas saring yang ditetesi larutan ekstrak etanol, ekstrak kental, dan air. Hasilnya, larutan ekstrak etanol menguap beberapa detik sedangkan pada air dan ekstrak kental terlihat basah sampai menempel pada permukaan belakang. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Mauti *et al.*, (2018).

Daya Hambat Ekstrak dan Infusa Buah Pare

Jumlah bakteri dalam suspensi cair distandarisasi dengan membandingkan kekeruhan suspensi uji dengan *Standard McFarland* (Rosmania dan Yanti, 2020). Hasil nilai absorbansi pada larutan standar *McFarland* 0,5 sebesar 0,095 sedangkan suspensi bakteri uji sebesar 0,093. Uji daya hambat dengan variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 % pada sampel uji ekstrak dan infusa buah pare menggunakan teknik difusi cakram. Uji daya hambat dilakukan pada kedua sampel untuk mengetahui perbandingan zona hambat menggunakan pelarut yang berbeda antara air dan etanol 96%. Selain itu, untuk mengetahui pada konsentrasi berapa kedua sampel tersebut dapat menghambat bakteri.

Pengujian daya hambat pada ekstrak dan infusa buah pare terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC@6538TM didapatkan infusa buah pare mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi minimum 60 % dengan diameter zona hambat sebesar 2,33 mm dan pada konsentrasi maksimum 100 % sebesar 4,85 mm, sedangkan pada konsentrasi 20 dan 40 % infusa pare tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan hasil ekstrak kental buah pare

mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi minimum 40 % dengan diameter zona hambat sebesar 1,62 mm dan pada konsentrasi maksimum 100 % mampu menghambat sebesar 6,32 mm. Diameter zona hambat pada kontrol positif sebesar 17,24 mm sedangkan untuk kontrol negatif etanol 96 % dan *aquadest* steril tidak memberikan zona hambat. Pengujian terhadap kontrol negatif dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh zona hambat yang terbentuk terhadap pelarut yang digunakan. Pernyataan ini sejalan dengan penelitian Rastina *et al.*, (2006), pelarut etanol tidak menunjukkan zona hambat dan dapat memastikan bahwa pelarut etanol tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri yang terbentuk.

Nilai zona hambat infusa pare yang didapat termasuk ke dalam kategori lemah karena nilai zona hambat ≤ 5 mm sedangkan ekstrak kental pare termasuk ke dalam kategori sedang karena memberikan nilai zona hambat 5 - 10 mm. Hasil yang didapat masih jauh jika dibandingkan dengan hasil kontrol positif yang termasuk ke dalam kategori kuat karena memberikan nilai zona hambat ≥ 10 - 20 m berdasarkan penelitian Pan *et al.*, (2009) hasil yang didapat berbeda zona hambatnya, hal ini membuktikan bahwa ada 4 faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri yaitu, konsentrasi ekstrak yang digunakan, proses ekstraksi, pelarut yang digunakan, dan jenis bakteri yang dihambat (Jawetz *et al.*, 2004).

Tabel 3 sesuai dengan pernyataan Komala *et al.* (2018), semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar zona daya hambat yang dihasilkan karena banyaknya zat aktif yang terkandung didalamnya sehingga efektivitas daya hambatnya semakin meningkat. Hasil pengujian

infusa pare yang didapat sejalan dengan penelitian Oktema *et al.* (2018) rebusan buah pare mampu menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* pada konsentrasi 60 %. Namun hasil tersebut berbeda dengan penelitian Zaini and Shufiyani (2017), air perasan buah pare mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi minimum 25 % dengan waktu kontak 30 menit. Sedangkan hasil ekstrak kental yang didapat tidak sesuai dengan penelitian Rachmawati and Nursyamsi (2015) karena pada konsentrasi minimum yaitu 25 % ekstrak etanol 70 % buah pare dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan penelitian Lubis (2020), konsentrasi 15 % ekstrak etanol 70 % buah pare mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Menurut penelitian Laianto (2014) ekstrak etanol 96 % buah pare mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis* pada konsentrasi 7,5 %.

Kemampuan ekstrak dan infusa buah pare dalam menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan oleh senyawa yang berperan sebagai antibakteri dan antifungi, seperti alkaloid dan saponin yang terkandung di dalam kedua sampel. Penelitian Putri *et al.* (2019) menyatakan, ekstrak buah pare mampu menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium oxysporum* dengan konsentrasi 60 % dan penelitian yang dilakukan oleh Febriani (2014), menunjukkan jus buah pare mampu

menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan konsentrasi minimum yaitu 25 %.

Hasil Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Masker Clay Ekstrak Pare

Hasil Pemeriksaan Organoleptik

Hasil uji organoleptik sediaan masker clay ekstrak buah pare dengan variasi konsentrasi menunjukkan warna yang sedikit berbeda.

Hasil Pemeriksaan Homogenitas

Sediaan masker formula F0, F1, F2, dan F3 memiliki susunan yang homogen karena tidak terdapat butiran - butiran kasar saat diuji dengan menggunakan kaca transparan (Ditjen POM, 1979).

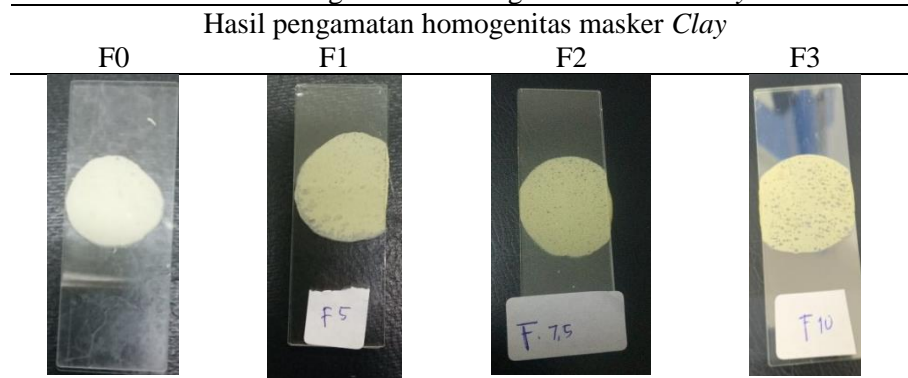
Hasil Pengukuran pH

Pengujian pH merupakan parameter yang dilakukan untuk mengetahui kestabilan masker dan penyesuaian dengan pH kulit wajah. Iritasi pada wajah dapat disebabkan oleh pH masker yang terlalu asam, sedangkan pH basa dapat menimbulkan sisik pada wajah (Syamsidinet *al.*, 2021). Masker clay dengan pH paling tinggi adalah F0 dengan nilai 6,40 dan paling rendah adalah F2 dengan nilai 6,00. Hasil tersebut memenuhi syarat SNI No.16-4399-1996 untuk pelembab kulit dengan range pH 4,5 - 8,00 (Badan Standardisasi Nasional, 1996) dan memenuhi syarat range pH 4,5 - 6,5 (Sopianti *and* Bulan, 2018).

Tabel 4. Hasil Pengamatan Organoleptik Masker Clay Ekstrak Buah Pare

Pengujian	Formula			
	F0	F1	F2	F3
Bentuk	Semi padat	Semi padat	Semi padat	Semi padat
Aroma	Aroma Coklat	Aroma Coklat	Aroma Coklat	Aroma Coklat
Warna	Putih kecoklatan	Hijau lebih muda	Hijau muda	Hijau tua

Tabel 5. Pengamatan Homogenitas Masker Clay

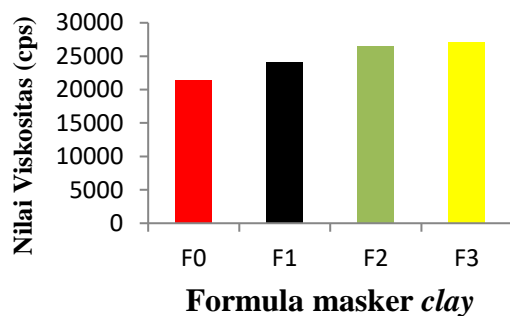


Tabel 6. Hasil Pengamatan Pengukuran pH Masker Clay

Sampel	Nilai pH			Rata-rata	Standar SNI No. 16-4399-1996
	Pengulangan 1	Pengulangan 2	Pengulangan 3		
F0	6,35	6,40	6,44	6,40	MS
F1	5,61	6,49	6,33	6,14	MS
F2	5,81	6,08	6,12	6,00	MS
F3	5,91	6,07	6,13	6,04	MS

Hasil Uji Viskositas

Pengujian viskositas menggunakan viskometer Brookfield spindle 64 dengan 20 rpm menunjukkan hasil yang berbeda-beda pada setiap variasi formula masker. Hasil yang didapatkan pada F0 sebesar 21325 cps, F1 24150 cps, F2 26520 cps dan F3 27090 cps. Nilai viskositas masker clay yang didapat memenuhi persyaratan dengan range viskositas 4000 - 40000 cps (Syamsidi *et al.*, 2021) dan 100000 - 296000 cps (Santoso *et al.*, 2018). Nilai viskositas dipengaruhi oleh jumlah kaolin karena jika jumlah kaolin lebih besar maka nilai viskositas yang dihasilkan lebih tinggi dan hasil dari viskositas ini juga mempengaruhi nilai daya sebar (Syamsidi *et al.*, 2021).

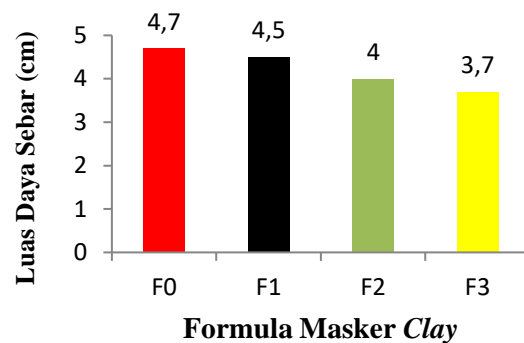


Gambar 1. Diagram Hasil Uji Viskositas Sediaan Masker Clay Ekstrak Etanol 96 % Buah Pare. F0 adalah basis masker clay tanpa ekstrak, F1 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 5 %, F2 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 7,5 %, dan F3 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 10 %

Hasil Uji Daya Sebar

Pengujian daya sebar menggunakan beban 5 gram dan didapatkan luas tertinggi pada masker F0 sebesar 4,7 cm dan luas terendah yaitu pada masker F3 sebesar 3,7 cm. Hasil yang didapat memenuhi persyaratan luas daya sebar masker clay yaitu 2 - 5 cm (Santoso *et al.*, 2018). Nilai luas daya sebar yang didapat berbeda-beda karena

penambahan formula ekstrak yang berbeda - beda. Kadar kaolin yang kecil dalam formula menghasilkan daya sebar yang besar. Hal ini karena sifat kaolin sebagai bahan pengental dan pelekat sehingga berpengaruh terhadap konsentrasi kaolin yang menyebabkan daya sebar menjadi luas (Fauziah, 2018).



Gambar 2. Diagram Hasil Uji Daya Sebar Sediaan Masker Clay Ekstrak Etanol 96 % Buah Pare. F0 adalah basis masker clay tanpa ekstrak, F1 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 5 %, F2 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 7,5 %, dan F3 adalah masker clay dengan ekstrak buah pare 10 %

Hasil Kecepatan Waktu Pengeringan Sediaan Masker

Pada pengujian kecepatan waktu mengering dilakukan 3 kali pengujian di hari yang berbeda. Hasil yang didapat pada masker clay dengan 4 variasi memberikan waktu kering yang baik. Spesifikasi waktu mengering yang baik untuk masker clay kisaran waktu 10 - 20 menit (Syamsidi *et al.*, 2021). Perbedaan waktu mengering dipengaruhi kedua faktor yaitu bentonit dan kaolin. Interaksi antara kaolin dan bentonit memberikan pengaruh terhadap viskositas, daya sebar, dan kecepatan waktu kering pada masker (Santoso *et al.*, 2018). Penambahan ekstrak yang berbeda juga mempengaruhi kecepatan waktu mengering (Yanti, 2019).

Tabel 7. Hasil Pengujian Kecepatan Waktu Meringing

Formula	Pengulangan Waktu Kering (Menit)		
	1	2	3
F0	15,39	15,49	16,08
F1	13,24	13,10	12,45
F2	11,50	13,05	13,20
F3	10,45	13,00	13,33

Hasil Uji Iritasi

Hasil uji iritasi yang didapat menunjukkan tidak terjadi reaksi kulit apapun baik panas, gatal, perih atau kemerahan pada kulit saat sediaan masker dioleskan pada kulit sampai sediaan mengering. Berdasarkan hasil tersebut, masker *clay* ekstrak buah pare memenuhi persyaratan dari SNI 16-6070-1999 karena sediaan masker tidak berbahaya atau tidak mengiritasi kulit.

Hasil Daya Hambat Masker Clay

Hasil pengujian daya hambat masker *clay* ekstrak etanol buah pare untuk F0 tidak menunjukkan adanya zona hambat. Hasil tersebut sama seperti kontrol negatif yang dijadikan sebagai pembanding. Nilai daya hambat terendah didapatkan pada formula sediaan masker F1 konsentrasi ekstrak 5 % dengan zona hambat 5,00 mm sedangkan untuk nilai daya hambat tertinggi didapatkan pada F3 konsentrasi ekstrak 10 % dengan zona hambat 7,30 mm. Hasil yang didapat masih lebih kecil jika dibandingkan dengan kontrol positif yang digunakan yaitu *Ciprofloxacin* 1 % sebesar 17,24.

Tabel 8. Hasil Uji Daya Hambat Sediaan Masker Clay

Formula Masker	Diameter Daya Hambat Masker Clay Ekstrak Buah Pare (mm)
F0	-
F1	5,0
F2	7,06
F3	7,3
Kontrol + (<i>Ciprofloxacin</i>)	17,24

Keterangan:

Kontrol positif : *Ciprofloxacin*

Kontrol negatif : Masker *clay* tanpa ekstrak buah pare (basis Masker *clay*)

Formula 1 : Masker *clay* dengan kandungan Ekstrak Buah Pare 5 %

Formula 2 : Masker *clay* dengan kandungan Ekstrak Buah Pare 7,5 %

Formula 3 : Masker *clay* dengan kandungan Ekstrak Buah Pare 10 %

Nilai zona hambat pada masker berbeda dengan nilai ekstrak kental buah pare dengan variasi konsentrasi. Hal ini terjadi karena terdapat kandungan kaolin dan bentonit bercampur dalam masker *clay* yang dapat membantu ekstrak buah pare bekerja lebih efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri jerawat. Menurut Rowe *et al.*, (2009) bentonit merupakan tanah liat alami memiliki sifat mengeras ketika dicampurkan dengan air akan menekan pertumbuhan dan perkembangan bakteri.

Berdasarkan penelitian Lafi dan Al-Dulaimy (2011) kaolin (*gray clay*) memiliki aktivitas bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Sifat bakterisidal pada kaolin karena adanya absorpsi permukaan antara partikel kaolin dan dinding sel bakteri yang menyebabkan adanya tarikan elektrostatis. Daya tarik tersebut menyebabkan terganggunya penyerapan nutrisi metabolis pada bakteri.

Nilai zona hambat variasi masker F1, F2 dan F3 termasuk ke dalam kategori sedang karena memberikan nilai zona hambat 5 - 10 mm sedangkan untuk kontrol positif termasuk ke dalam kategori kuat karena memberikan nilai zona hambat $\geq 10 - 20$ mm. Pada Tabel 8 dapat dilihat bahwa konsentrasi ekstrak yang lebih besar lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian Komala *et al.*, (2018) juga menunjukkan efektivitas penghambatan yang besar pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi. Sediaan F3 memberikan efektivitas paling baik dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan F1 dan F2 hal ini karena kandungan ekstrak buah pare lebih besar sehingga kandungan senyawa zat aktif yang berfungsi sebagai antibakteri lebih banyak meskipun hasil yang didapat tidak mendekati kontrol positif yang digunakan. Kemampuan infusa dan ekstrak kental buah pare menghambat pertumbuhan bakteri karena adanya senyawa yang berperan sebagai antibakteri dan antifungi seperti alkaloid dan saponin yang terkandung di dalam kedua sampel. Pada ekstrak kental buah pare selain adanya senyawa saponin dan alkaloid, terdapat senyawa sebagai antibakteri lainnya seperti tanin, flavonoid, dan triterpenoid.

Alkaloid menghambat pembentukan lapisan dinding sel bakteri. Zat aktif dari saponin merusak permeabilitas membran pada bakteri (Sudarmi *et al.*, 2017). Senyawa flavonoid memberikan penghambatan pada bakteri dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler mikroba, sedangkan senyawa tanin mengkoagulasi protoplasma mikroba dengan cara membentuk

ikatan dengan (Susanti *et al.*, 2016). Senyawa triterpenoid sebagai antibakteri, yaitu dengan merusak porin yang terdapat pada membran luar dinding sel bakteri (Rini *et al.*, 2017)

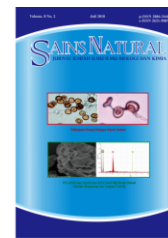
KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96 % buah pare dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 100 % sebesar 6,32 mm. Ekstrak buah pare sebagai zat aktif pada masker clay dengan konsentrasi 5 % (F1), 7,5 % (F2), dan 10 % (F3) dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan zona hambat berturut-turut sebesar 5,0 mm; 7,06 mm; dan 7,30 mm.

DAFTAR PUSTAKA

- Apriani, D., Amaliawati, N., & Kurniati, E. (2014). Efektivitas Berbagai Konsentrasi Infusa Daun Salam (*Eugenia polyantha Wight*) terhadap Daya Antibakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 3 (1) : 18 - 24.
- Badan Standardisasi Nasional Indonesia . 1999. *Sediaan masker (SNI 16-6070-1999)*. BSN.Jakarta
- Depkes RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. http://perpustakaan.litbang.depkes.go.id/ucs/index.php?p=show_detail&id=11557
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2017). *Farmakope Herbal Indonesia Edisi III*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta
- Ditjen POM. (1979). *Farmakope Indonesia*. Edisi Ketiga. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Hal. 32-33.
- Fauziah, D. W. (2018). Pengaruh Basis Kaolin dan Bentonit Terhadap Sifat Fisika Masker Lumpur Kombinasi Minyak Zaitun (*Olive Oil*) dan Teh Hijau (*Camelia Sinensis*). *Jurnal Farmasi, Sains Dan Kesehatan* 3 (2) : 9 – 13.
- Febriani, T. H. (2014). *Uji Daya Antifungi Jus Buah Pare (Momordica charantia L) Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Candida Albicans Secara in vitro*. (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta, 3 (2) :1 – 46).
- Jawetz, M. D., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (2004). *Mikrobiologi Kedokteran*, Diterjemahkan.. Jakarta : Buku kedokteran EGC.
- Kasim, V. N., and Yusuf, Z. K. (2020). *Pemanfaatan Tumbuhan Obat Berbasis Penyakit*. Bone Bolango – Gorontalo: CV Athra Samudra
- Komala, O., Noorlaela, E., & Dhiasmi, A. (2018). Uji Antibakteri dan Formulasi Sediaan Masker Anti Jerawat yang Mengandung Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni Nees & T. Nees*). *Ekologia*, 18 (1) : 31 - 39
- Laianto, S. (2014). Uji Efektivitas Sediaan Gel Anti Jerawat Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia*) Terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes* dengan Metode Difusi. *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 3 (2) : 1 – 46.
- Lafi, S. A., & Al-Dulaimy, M. R. (2011). Antibacterial effect of some mineral clays in vitro. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G. Microbiology*, 3 (1) : 75-81.
- Lubis, A. N. (2020). Potensi Antibakteri Ekstrak Daging Buah Pare (*Momordica charantia*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923TM.
- Lubis, B. K. (2018). *Formulasi Masker Clay Ekstrak Etanol Kentang (Solanum Tuberosum) Sebagai Anti Aging*. (Doctoral dissertation, INSTITUT KESEHATAN HELVETIA).
- Mirna, M., & Marini, M. (2019). Optimasi Basis dan Evaluasi Sediaan Masker Peel Off Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia*). *Jurnal FARMAKU (Farmasi Muhammadiyah Kuningan)*, 4(2) : 13 - 17.
- Oktema, L. P., Suptiyanto, & Sutriswanto. (2018). Perbedaan Perasan dan Rebusan Buah Pare (*Momordica charantia L.*) dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Candida Albicans*. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa*.
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., and Zhao, Z. 2009. The acid, Bile Tolerance and

- Antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *J. Food Control* 20 : 598-602
- Putri, D. R., Asri, M. T., & Ratnasari, E. (2019). Aktivitas Antifungi Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Fusarium Oxysporum*. *Lentera Bio : Berkala Ilmiah Biologi* 8 (2).
- Rachmawati, N., & Nursyamsi. (2015). Efek Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia* L.) Pada Media Pembenihan Difusi. *Medika Tadulako: Jurnal Ilmiah Kedokteran Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan*, 2 (1) : 1-9.
- Rini, A. A., Supriatno, & Rahmatan, H. (2017). Skrining Fitokimia Dan Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Kawista (*Limonia acidissima* L.) Dari Daerah Kabupaten Aceh Besar Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Keguruan Dan Ilmu Pendidikan Unsyiah* 2(1):1–12.
- Rosyad, F. (2012). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Pare (*Momordica charantia* L.) Terhadap Pertumbuhan *Escheria Coli* Secara In Vitro. Universitas Jember.
- Rosmania, and Yanti, F. (2020). Perhitungan Jumlah Bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Menggunakan Metode Spektrofotometri. *Jurnal Penelitian Sains* 22 (2) : 76 – 86.
- Rowe, *et al.*, (2009). Handbook of Pharmaceutical Excipients, sixth edition, *The Pharmaceutical Press*, London.
- Santoso, C. C., Darsono, F. L., Hermanu, L. S., (2018). Formulasi Sediaan Masker Wajah Ekstrak Labu Kuning (*Cucurbita moschata*) Bentuk Clay Menggunakan Bentonit dan Kaolin Sebagai Clay Mineral. *Jurnal Farmasi Sains dan Terapan*, 5(2) : 64 – 69.
- Sopianti, D. S., & Bulan, P. S. (2018). Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum* L) Sebagai Zat Aktif Pada Formulasi Sediaan Gel. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 3(1) : 106-114.
- Sudarmi, K., Darmayasa, I. B. G., & Muksin, I. K. (2017). Uji Fitokimia dan Daya Hambat Ekstrak Daun Juwet (*Syzygium cumini*) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. *Simbiosis Journal of Biological Sciences* 5(2) : 47-51.
- Susanti, N. (2016). Aktivitas antimikroba ekstrak rimpang jeringau (*Acorus calamus*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. *Jurnal Biodjati*, 1(1) : 55-58.
- Syamsidi, A., Alifah, M. S., & Sulastri, E. (2021). Formulation and Antioxidant Activity of Clay Mask of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Lycopene Extract with Variation of Concentrate Combination Kaoline and Bentonite Bases. *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy) (e-Journal)* 7 (1) : 77 – 90.
- Ulum, B., and Khanifah. (2017). Uji Daya Hambat Ekstrak Buah Pare (*Momordica charantia*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella typhi* dengan Metode Difusi. *Jurnal Insan Cendekia* 4(1):26–32.
- Yanti. (2019). *Formulasi Sediaan Masker Clay dari Ekstrak Etanol Daun Pepaya (Carica Papaya L.) dan Sari Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa Bilimbi L.)*. Institut Kesehatan Helvetia Medan.
- Yuda, I. K. A., Anthara, M. S., & Dharmayudha, A. A. G. O. (2013). Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Estrak Etanol Buah Pare (*Momordica charantia*) dan Pengaruhnya Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Tikus Putih Jantan (*Rattus novergicus*) yang Diinduksi Alokasan. *Buletin Veteriner Udayana* 5(2):87–95.
- Zaini, W. S., & Shufiyani, S. (2017). Uji Daya Hambat Air Perasan Buah Pare (*Momordica charantia* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia Coli* Secara in Vitro. *Jurnal Medikes (Media Informasi Kesehatan)* 4(2) : 147–56.



ANTIBACTERIAL ACTIVITY AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF THE FRACTION OF ENDOPHYTIC FUNGUS DERIVED FROM SAMBILOTO FLOWERS (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)

Firda Febria, Suryelita Suryelita dan Riga Riga*

Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang,
Jalan Prof. Dr. Hamka, Air Tawar Barat, Kota Padang, 25132, Indonesia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 07 Jul 2022,

Revised 18 Jul 2022,

Accepted 29 Jul 2022,

Available online 30 Jul 2022

Keywords:

- ✓ antibacterial
- ✓ *Andrographis paniculata*
- ✓ fractionation
- ✓ phytochemical
- ✓ endophytic fungus

*corresponding author:

rigakimia@fmipa.unp.ac.id

<https://doi.org/10.31938/jsn.v>

12i3.428

ABSTRACT

*Sambiloto is one of the plants in Acanthaceae family obtaining antibacterial compounds. Another source to identify the antibacterial compounds from sambiloto is endophytic fungus. The study aimed to observe the antibacterial activity and phytochemical constituents of the fractions of endophytic fungus isolated from sambiloto flowers (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees). Endophytic fungus was extracted using ethyl acetate to give the crude extract. The crude extract was fractioned by Vacuum Liquid Chromatography (VLC) using hexane-ethyl acetate as the solvents to give 17 fractions. In addition, 7 fractions were created by combining the identical stain patterns on the chromatograms. The phytochemical composition of the isolate fraction has been tested, and it was proven that it contained terpenoid and steroid components. The antibacterial activity of the 7 fractions was also examined using the disc diffusion method with a concentration of 5%. The semi-polar fraction actively inhibits bacterial growth.*

ABSTRAK

Aktivitas Antibakteri dan Kandungan Fitokimia dari Fraksi Jamur Endofitik pada Bunga Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)

Sambiloto adalah salah satu tanaman dalam famili Acanthaceae yang dilaporkan menghasilkan senyawa antibakteri. Sumber lain untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri dari tumbuhan sambiloto adalah jamur endofitik. Tujuan dari penelitian ini adalah mengamati aktivitas antibakteri serta kandungan fitokimia dari fraksi jamur endofitik pada bunga sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees). Jamur endofitik diekstraksi dengan etil asetat dan menghasilkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat difraksinasi menggunakan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) menghasilkan 17 fraksi. Berdasarkan analisis noda pada kromatogram, fraksi tersebut digabungkan sehingga diperoleh tujuh fraksi. Ketujuh fraksi tersebut diuji kandungan fitokimianya yang menunjukkan positif mengandung senyawa terpenoid dan steroid. Ketujuh fraksi juga diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dengan konsentrasi ekstrak 5% . Fraksi yang bersifat semipolar lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri.

Kata kunci: *Andrographis paniculata*, antibakteri, fitokimia, fraksinasi, jamur endofitik

PENDAHULUAN

Resistensi obat terhadap berbagai jenis mikroba menjadi salah satu permasalahan yang cukup mengkhawatirkan di dunia kesehatan. Kondisi ini disebabkan oleh penyalahgunaan antibiotik dalam spektrum yang cukup luas

(Pratiwi, 2017). Salah satu upaya dalam mengatasi resistensi antibiotik ini adalah dengan pencarian metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri. Salah satu sumber yang berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri tersebut adalah jamur endofitik (Chin, 2015).



Jamur endofitik merupakan salah satu mikroorganisme bersifat non patogenik yang hidup dalam berbagai jaringan tumbuhan dan pada umumnya membentuk simbiosis mutualisme dengan inangnya (Fitriana *et al.*, 2013; Pratiwi, 2017). Tanaman inang akan memberikan nutrisi kepada jamur endofitik dari hasil metabolisme dan metabolit sekunder yang dibutuhkan tanaman inang untuk menjaganya dari berbagai serangan penyakit akan dihasilkan oleh jamur endofitik (Sulistiyono & Mahyuni, 2019). Lebih lanjut, jamur endofitik dilaporkan dapat menghasilkan beragam metabolit sekunder dengan berbagai kerangka dan aktivitas biologis (Bakhtera *et al.*, 2020).

Pada umumnya, jamur endofitik dapat diidentifikasi pada hampir semua jenis tanaman (Manganyi & Ateba, 2020). Salah satu tumbuhan obat yang dilaporkan sebagai inang untuk jamur endofitik ialah *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees atau yang dikenal dengan sambiloto (Al Khairi *et al.*, 2021). Tumbuhan sambiloto memiliki peran sebagai obat berbagai jenis penyakit seperti diabetes, asam lambung, asma, kolesterol, dan diabetes (Yunita, 2021). Penelitian sebelumnya berhasil mengidentifikasi jamur endofitik yang diisolasi dari bunga sambiloto, yaitu jamur *Xylaria* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri (Suryelita *et al.*, 2021). Jamur endofitik juga berhasil diidentifikasi dari ranting sambiloto dan dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri (Riga *et al.*, 2022). Kajian fitokimia dari jamur endofitik yang hidup dalam bunga, ranting, batang dan daun tumbuhan sambiloto menunjukkan berbagai metabolit sekunder dengan beragam aktivitas farmakologis berupa antibakteri dan antimalaria (Al Khairi *et al.*, 2021; Suhanah *et al.*, 2021; Suryelita *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi dari ekstrak etil asetat jamur endofitik dari bunga sambiloto menggunakan Kromatografi Vakum Cair (KVC). Fraksinasi dilakukan untuk memisahkan senyawa hasil ekstraksi jamur endofitik berdasarkan tingkat kepolarannya (Mukhtarini, 2014). Selanjutnya, hasil fraksinasi diuji sifat antibakteri dan kandungan fitokimianya untuk mengetahui aktivitas daya hambat terhadap bakteri dan golongan senyawa dari fraksi jamur endofitik pada bunga sambiloto. Kajian tentang sifat antibakteri dan kandungan fitokimia dari hasil fraksinasi ekstrak jamur endofitik dari bunga sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.)

Nees) merupakan pertama kali dilakukan pada penelitian ini.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah bunga sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees), etanol teknis 96%, aquades, penisilin, natrium hipoklorit, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), DMSO, kloramfenikol, streptomisin sulfat, beras, *n*-heksana, kloroform, metanol, etil asetat, aseton, larutan H₂SO₄ p.a, reagen Wagner, reagen Mayer, reagen Dragendroff, FeCl₃ 1%, amoniak dan silika gel 60 (0,063-0,200 mm). Alat-alat yang digunakan yaitu *laminar air flow*, sarung tangan, pinset, cawan petri, bunsen, pisau bedah, inkubator, jarum ose, *autoclave*, erlenmeyer 250 mL, seperangkat alat kromatografi cair vakum, detektor, *chamber* (bejana kromatografi), pipa kapiler, lampu UV, seperangkat alat destilasi, dan *rotary evaporator*.

Metode

Persiapan Sampel Tumbuhan

Bunga sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees) diperoleh dari Kelurahan Dadok Tunggul Hitam, Kecamatan Koto Tangah, Kota Padang. Untuk menghilangkan kotoran di permukaan jaringan bunga, bunga sambiloto dicuci dengan air mengalir selama 1 menit. Kemudian, bunga disterilisasi menggunakan natrium hipoklorit 3,5% selama 15 detik dan dilanjutkan dengan pembilasan menggunakan aquades. Selanjutnya, bunga direndam kembali dengan alkohol 70% selama 20 detik dan dibilas dengan aquades.

Isolasi Jamur Endofitik

Bunga Sambiloto yang telah disterilisasi permukaannya ditempelkan di atas media padat PDA yang berfungsi sebagai kontrol negatif. Selanjutnya bunga dipotong menjadi berukuran 0,5 cm dan bagian dalamnya ditempelkan ke cawan petri yang berisi media padat PDA. Cawan petri disimpan dalam inkubator pada suhu 28°C. Setelah 5 hari diinkubasi, isolat jamur endofitik terbentuk dan di sub-kultur menggunakan jarum ose ke media padat PDA lain hingga diperoleh isolat murni jamur endofitik (Suhanah *et al.*, 2021).

Kultivasi

Isolat murni jamur endofitik dikultivasi skala kecil dengan memindahkan jamur (1×1 cm) dari media padat ke dalam Erlenmeyer 250 mL yang berisi media nasi. Empat erlenmeyer dipanen masing-masing pada minggu pertama, kedua, ketiga dan keempat untuk mengidentifikasi waktu optimumnya. Penentuan waktu optimasi kultivasi dianalisa berdasarkan massa ekstrak yang dihasilkan. Selanjutnya, jamur endofitik dikultivasi skala besar ke dalam 25 buah Erlenmeyer 250 mL selama waktu optimumnya (Suhanah *et al.*, 2021; Suryelita *et al.*, 2021).

Ekstraksi

Setelah dikultivasi, jamur endofitik dipanen dan diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Setiap erlenmeyer dimaserasi dengan menambahkan pelarut etil asetat teknis sebanyak 50 mL. Kemudian, diaduk secara perlahan sehingga jamur terendam oleh pelarut selanjutnya didiamkan selama 24 jam. Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan ekstrak menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dan dihasilkan ekstrak pekat etil asetat (Ningsih *et al.*, 2020; Suhanah *et al.*, 2021).

Fraksinasi

Ekstrak pekat kemudian difraksinasi dengan metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) menggunakan eluen dengan perbandingan bertingkat. Perbandingan yang digunakan disesuaikan dengan tingkat kepolaran senyawa, sehingga diperoleh hasil pemilihan eluen yang dapat digunakan untuk proses fraksinasi seperti pada Tabel 1.

Kromatografi Cair Vakum (KCV) digunakan untuk mengfraksinasi ekstrak pekat etil asetat. Sampel dimasukkan dalam bentuk telah terserap ke dalam silika gel 60. Untuk satu kali elusi membutuhkan 120 mL total pelarut yang kemudian hasil KCV ditampung dalam botol vial. Setelah didapatkan eluatnya dianalisis dengan KLT. Hasil uji KLT dapat diamati dan dilakukan pengelompokan fraksi menurut pola noda pada kromatogram.

Uji Fitokimia

Uji alkaloid dilakukan dengan menambahkan ekstrak dengan H₂SO₄ 2 N dan amoniak-kloroform yang akan membentuk dua lapisan sesudah dikocok dan didiamkan. Lapisan bagian atas dipindahkan ke 3 buah tabung reaksi kemudian masing-masing tabung ditambahkan reagen Wagner, reagen Mayer, dan reagen Dragendorf secara berurutan. Jika berturut-turut menghasilkan endapan jingga, endapan putih, dan endapan coklat, maka ekstrak mengandung senyawa alkaloid (Suhanah *et al.*, 2021).

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan menggunakan lapisan bawah pada uji alkaloid sebelumnya. Lapisan bawah dipindahkan ke plat tetes dan dibiarkan mengering, setelah itu asam asetat anhidrat dan H₂SO₄ p.a diteteskan pada plat. Hasil positif mengandung terpenoid, yaitu adanya perubahan warna merah-coklat dan perubahan warna hijau-biru menandakan positif mengandung steroid (Suhanah *et al.*, 2021).

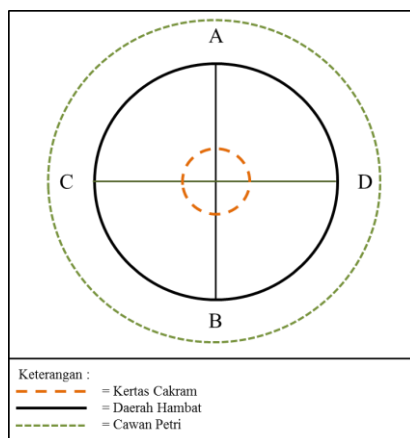
Uji fenolik dilakukan dengan menambahkan larutan FeCl₃ 1% pada ekstrak. Jika terdapat perubahan warna menjadi merah muda, maka ekstrak mengandung senyawa fenolik (Suhanah *et al.*, 2021).

Tabel 1. Hasil pemilihan eluen untuk proses fraksinasi

No	Pelarut	Perbandingan Pelarut	Banyaknya Elusi
1	Heksana	100%	2 kali
2	Heksana:Etil asetat	95%:5%	2 kali
3	Heksana:Etil asetat	90%:10%	2 kali
4	Heksana:Etil asetat	75%:25%	2 kali
5	Heksana:Etil asetat	50%:50%	2 kali
6	Heksana:Etil asetat	25%:75%	2 kali
7	Etil asetat	100%	2 kali
8	Aseton	100%	1 kali
9	Metanol	100%	2 kali

Uji Antibakteri

Metode difusi cakram Kirby-Bauer digunakan untuk uji aktivitas antibakteri pada fraksi jamur endofitik bunga sambiloto. Dalam metode ini, kertas cakram yang digunakan berfungsi untuk menentukan kemampuan fraksi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* merupakan bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri. Secara merata suspensi bakteri digoreskan ke permukaan media MHA menggunakan lidi kapas steril. Kontrol positif menggunakan Kloramfenikol dan kontrol negatif menggunakan DMSO. Kemudian, kertas cakram steril ditetesi larutan uji dengan konsentrasi 5% diletakkan diatas media MHA. Selama 1x24 jam cawan petri ditutup dan diinkubasi di suhu 37°C. Aktivitas antibakteri diamati dari ukuran diameter daerah hambat atau daerah bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram. Uji dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (triplo) (Riga *et al.*, 2021; Wijaya & Syahputra, 2020).



Gambar 1. Diagram pengukuran daerah hambat



Gambar 2. Morfologi Jamur BS

Daerah bening menunjukkan kepekaan bakteri pada bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan diameter daerah

hambat. Daerah hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter pada diameter vertikal (D_v) dan diameter horizontal (D_H) menggunakan jangka sorong yang diilustrasikan pada Gambar 1 (Pormes *et al.*, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Jamur Endofitik

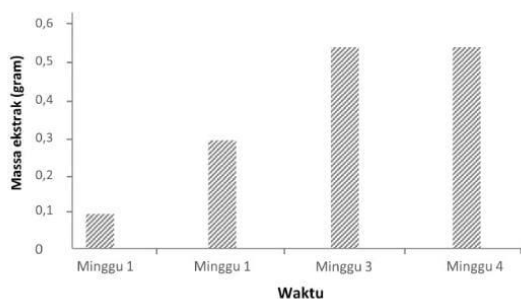
Isolasi jamur endofitik dimulai dengan proses sterilisasi pada permukaan bunga sambiloto menggunakan natrium hipoklorit dan alkohol karena memiliki efektivitas tinggi untuk desinfeksi berbagai mikroorganisme yang ada pada permukaan bunga sambiloto. Bunga yang telah steril di tempelkan pada media PDA yang telah ditambah antibiotik sebagai kontrol negatif untuk menjadi pembanding dalam pertumbuhan jamur endofitik (Lestari *et al.*, 2019). Media PDA pada isolasi jamur endofitik digunakan karena merupakan salah satu media yang baik untuk jamur. Adanya kandungan ekstrak umbi kentang dari media PDA, memicu jamur memecah pati yang terdapat pada kentang sehingga dapat berguna sebagai sumber energi bagi jamur endofitik (Yastanto, 2020). Hasil isolasi dari sub-kultur diberi kode isolat BS (Bunga Sambiloto). Pengamatan makroskopis isolat BS pada Gambar 2 memiliki koloni jamur berwarna putih, berbentuk melingkar dan warna permukaan sebaliknya berwarna putih.

Kultivasi dan Ekstraksi

Isolat BS dikultivasi dalam skala kecil agar mengetahui waktu optimum jamur tersebut dalam memperoleh metabolit sekunder (Wantini & Octavia, 2018). Massa ekstrak jamur BS yang diperoleh pada minggu pertama hingga minggu keempat dianalisis kandungan metabolit sekundernya. Massa ekstrak yang dihasilkan isolat BS pada minggu pertama, kedua, ketiga dan keempat secara berurutan yaitu 0,0948, 0,2929, 0,5419, 0,5413 g. Berdasarkan massa ekstraknya, minggu ketiga merupakan waktu optimum jamur BS dalam menghasilkan senyawa. Pertumbuhan jamur BS dimulai dari fase lag yang terjadi penyesuaian dengan lingkungan pada media baru yang terjadi pada minggu pertama. Selanjutnya, minggu kedua masuk ke fase eksponensial dengan bertambahnya massa ekstrak seperti yang terlihat pada Gambar 3. Fase eksponensial adalah fase

dimana sel mengalami peningkatan jumlah yang berbanding lurus dengan aktivitas sel yang meningkat. Minggu ketiga dan keempat merupakan fase stasioner pada grafik pertumbuhan jamur yang ditampilkan pada Gambar 3. Fase stasioner merupakan fase terjadinya penumpukan hasil metabolit sekunder karena jamur endofitik akan bertahan hidup dengan cara mengeluarkan metabolit sekundernya (Iqlima *et al.*, 2017; Rosalina *et al.*, 2018).

Kultivasi isolat BS dilakukan dalam skala besar selama 3 minggu pada media nasi sesuai waktu kultivasi optimumnya yang ditunjukkan dalam grafik pada Gambar 3. Kultivasi dilakukan agar memperbanyak jamur sehingga diperoleh massa ekstrak dan metabolit sekunder (Wantini & Octavia, 2018). Media nasi digunakan karena mengandung karbohidrat yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan jamur. Hasil panen isolat jamur BS di ekstraksi dengan metode remaserasi karena membutuhkan alat yang sederhana dan kandungan kimia yang terdapat dalam jamur endofitik akan tertarik dengan aman karena tidak menggunakan pemanasan (Ningsih *et al.*, 2020). Pelarut etil asetat digunakan karena tergolong dalam senyawa semipolar yang mampu menarik senyawa polar dan non polar (Sukmawaty *et al.*, 2021). Ekstrak etil asetat dari hasil remaserasi diuapkan sehingga menjadi ekstrak pekat etil asetat.

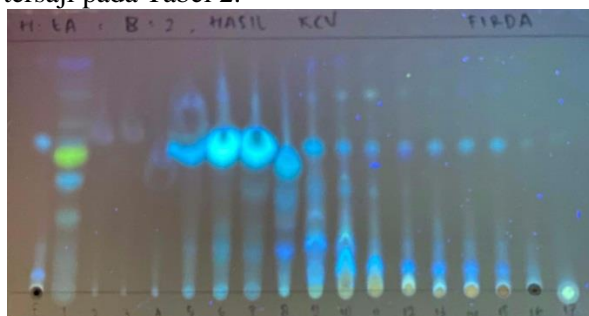


Gambar 3. Grafik Waktu Kultivasi Isolat BS

Fraksinasi

Metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) yang digunakan pada fraksinasi menggunakan silika gel 60 pada fase diam dan eluen heksana serta etil asetat dengan kepolaran yang meningkat pada fase gerak. Fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa yang telah di ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Fraksinasi ekstrak menggunakan KCV menghasilkan 17 fraksi (Gambar 4) yang

kemudian diuapkan. Fraksi yang telah pekat dianalisis dengan KLT yang bertujuan untuk mengetahui pola noda pada hasil KCV sehingga dapat digabungkan menjadi beberapa fraksi. Fraksi dikelompokkan berdasarkan kemiripan pola noda pada kromatogram sehingga diperoleh 7 fraksi yang tersaji pada Tabel 2.



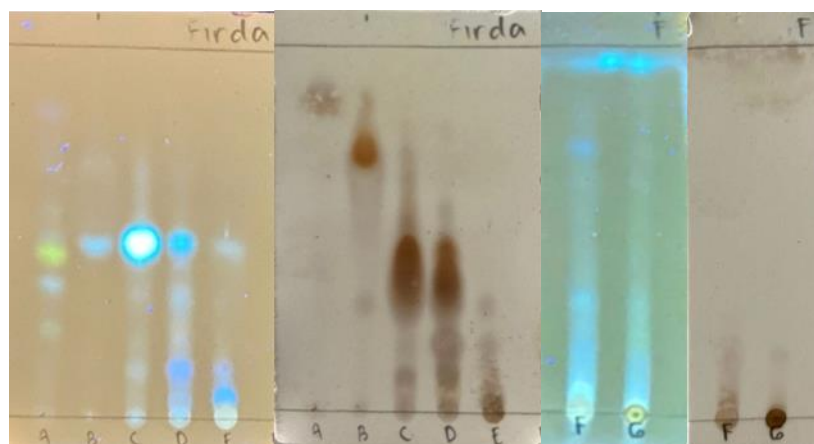
Gambar 4. Profil KLT Hasil KCV

Tabel 2. Penggabungan fraksi setelah dianalisis dengan KLT

No	Fraksi	Fraksi yang digabungkan
1	A	1
2	B	2-5
3	C	6-7
4	D	8-9
5	E	10-12
6	F	13-15
7	G	16-17

Berdasarkan tabel diatas terdapat tujuh fraksi yang telah digabungkan berdasarkan kemiripan pola. Pola noda yang mirip berarti memiliki sebaran komponen senyawa pada rentang daerah serapan yang sama, sehingga kemungkinan merupakan senyawa yang sama. Penggabungan ini bertujuan untuk memudahkan identifikasi senyawa.

Ketujuh fraksi tersebut kemudian dianalisis kembali dengan KLT menggunakan pelarut heksana:etil asetat (8:2) untuk fraksi A, B, C, D dan E, sedangkan pelarut kloroform:metanol (6:4) untuk fraksi F dan fraksi G. Perbedaan pelarut yang digunakan bertujuan untuk memisahkan senyawa secara optimal. Pelarut heksana-etil asetat yang memiliki polaritas lebih rendah jika dibandingkan dengan pelarut kloroform-metanol. Pemilihan pelarut ditinjau dari tingkat kepolaran fraksi, dimana fraksi F dan G memiliki tingkat kepolaran lebih tinggi sehingga senyawa akan terelus pada plat KLT dengan pelarut yang bersifat polar.



Gambar 5. Profil KLT Hasil Fraksi Penggabungan

Tabel 3. Hasil uji fitokimia dari penggabungan fraksi

No	Uji	Fraksi A	Fraksi B	Fraksi C	Fraksi D	Fraksi E	Fraksi F	Fraksi G
1	Alkaloid							
	a. Mayer	-	-	-	-	-	-	-
	b. Wagner	-	-	-	-	-	-	-
	c. Dragendorff	-	-	-	-	-	-	-
2	Terpenoid	+	+	+	+	+	-	-
3	Steroid	-	-	+	+	-	-	-
4	Fenolik	-	-	-	-	-	-	-

Hasil Uji Fitokimia

Uji Fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa dalam fraksi. Uji fitokimia dari fraksi A sampai fraksi G secara lengkap dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, terdapat golongan senyawa terpenoid pada fraksi A, B, C, D dan E, kemudian golongan senyawa steroid terdapat pada fraksi C dan fraksi D, dan tidak ditemukan golongan senyawa alkaloid dan fenolik pada seluruh fraksi. Keberadaan senyawa tersebut dikonfirmasi dengan adanya perubahan warna. Terdapat perubahan warna dimana warna merah-coklat pada uji terpenoid, sedangkan warna hijau-biru pada uji steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan (Bhernama, 2020), dimana uji terpenoid yang menghasilkan warna merah-coklat dengan digunakannya pereaksi asam asetat anhidrat- H_2SO_4 p.a, sedangkan warna hijau-biru dihasilkan oleh uji steroid. Hal tersebut menunjukkan bahwa hasil uji pada penelitian ini mengandung senyawa terpenoid dan steroid. Pada uji fenolik dan alkaloid tidak didapatkan perubahan

warna, maka dapat disimpulkan bahwa seluruh fraksi tidak mengandung senyawa fenolik dan alkaloid.

Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri tujuh fraksi dari jamur endofitik BS dilakukan terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang menggunakan metode difusi cakram. Pemilihan metode tersebut bertujuan klinis dengan mempertimbangkan teknis yang sederhana dan ketelitiannya. Pengujian aktivitas antibakteri fraksi ekstrak jamur BS diperoleh dari pengamatan inkubasi selama 1x24 jam serta dilakukannya triplo atau tiga kali pengulangan kepada masing-masing bakteri (Pelealu *et al.*, 2021).

Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan munculnya daerah hambat (daerah bening) di sekeliling kertas cakram terhadap kontrol positif, yaitu bahan antibakteri atau antibiotik. Hasil uji antibakteri fraksi jamur endofitik BS terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan konsentrasi 5% terdapat pada Tabel 4. Berdasarkan hasil tersebut diketahui bahwa fraksi B hingga fraksi F efektif

menghambat pertumbuhan dari bakteri *E. coli* (Gram negatif). Sementara itu, ketujuh fraksi efektif menghambat pertumbuhan dari bakteri *S. aureus* (Gram positif). Aktivitas daya hambat dikelompokkan berdasarkan daerah bening pada kertas cakram. Menurut Muharni *et al.*, (2017) aktivitas daya hambat pada kategori lemah berukuran 6 hingga 10 mm, kategori aktif pada ukuran 11 hingga 20 mm, dan kategori aktif pada ukuran 1 hingga 30 mm atau lebih.

Berdasarkan Tabel 4 diketahui bahwa aktivitas daya hambat untuk ketujuh fraksi tergolong lemah. Akan tetapi, pada fraksi C, D dan E yang merupakan fraksi semipolar lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Kemampuan senyawa semipolar yang telah dilaksanakan oleh Jayanti *et al.*, (2018) bahwa fraksi semipolar dari daun sirsak (*Annona muricata* L.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia* dan *Staphylococcus epidermidis*. Penelitian lain yang dilakukan oleh Tumiar Pakpahan, (2020) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat yang bersifat semipolar paling aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*.

Fraksi C, D dan E terdapat senyawa terpenoid dan steroid yang memberikan daerah hambat untuk

semua bakteri dengan diameter daerah hambat yang berbeda-beda. Terpenoid berkerja sebagai antibakteri melalui interaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri. Selanjutnya, terbentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang berakibat pada terhambatnya pertumbuhan bakteri (Wulansari *et al.*, 2020). Berbeda dengan terpenoid, steroid mampu bereaksi dengan membran fosfolipid sel yang sifatnya permeabel terhadap senyawa lipofilik. Sehingga mengakibatkan integritas membran sel menjadi lisis dan rapuh (Madduluri *et al.*, 2013).

KESIMPULAN

Fraksi dari ekstrak etil asetat jamur endofitik BS dari bunga sambiloto efektif menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* juga diduga mengandung senyawa terpenoid dan steroid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan dan dukungannya kepada Departemen Kimia, FMIPA Universitas Negeri Padang.

Tabel 4. Daerah hambat fraksi jamur endofitik BS

Bakteri Uji	Fraksi	Diameter Daerah Hambat*	
		Konsentrasi 5% (mm)	Kontrol (+)
<i>E. coli</i>	A	0	
	B	6,67±0,42	
	C	9,17±0,32	
	D	5,17±0,15	13,87±0,21
	E	6,17±0,15	
	F	4,37±0,06	
	G	0	
<i>S. aureus</i>	A	3,03±0,31	
	B	7,13±0,21	
	C	9,93±0,15	
	D	4,2±0,27	16,03±0,21
	E	7,9±0,27	
	F	5,1±0,17	
	G	2,4±0,27	

*Daerah hambat±standar deviasi

DAFTAR PUSTAKA

- Al Khairi, V. A., Etika, S. B., Ulfah, M., Riga, R., Info, A., Sciences, N., & Padang, U. N. (2021). Study of The Antibacterial Activity of Endophytic Fungus That Colonize With The Twig of *Andrographis paniculata*. *Eksakta*, 21(02), 137–144
- Bakhtra, D., Eriadi, A., & Putri, S. R. (2020). Skrining Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Jurna Farmasi Higea*, 12(1)
- Bhernama, B. G. (2020). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Rumput Laut (*Gracilaria* sp.) Asal Desa Neusu Kabupaten Aceh Besar. *Jurnal Amina*, 2(1), 1–5
- Chin, T. (2015). *Antibiotic resistance. Because of overuse and misuse, some antibiotics are losing effectiveness against highly resistant bacteria.* (Cdc), 1–7. Retrieved from https://www.healthaffairs.org/doi/10.1377/hp.b20150521.42596/full/healthpolicybrief_138.pdf
- Fitriana, Maryam, S., Naid, T., & Maryana. (2013). Penelusuran fungsi endfit sebagai penghasil senyawa antibiotika dari daun anans (*Ananas cosmosus* L meer). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699
- Iqlima, D., Ardiningsih, P., & Wibowo, M. A. (2017). Aktivitas Antibakteri Isolat Bakteri Endofit B2D Dari Batang Tanaman Yakon (*Smallanthus Sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Rob.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Salmonella Thypimurium*. *Jkk*, 7(1), 36–43
- Jayanti, Y. D., Prasetyo, H., Saputro, W., & Kartasura, P. (2018). AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI NON POLAR, SEMIPOLAR SERTA POLAR DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) TERHADAP *Klebsiella pneumoniae* DAN *Staphylococcus epidermidis*. *Jurnal Sains Dan Kesehatan*, 1(9), 497–504. <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i9.60>
- Lestari, K., Agustien, A., & Djamaan, A. (2019). The Potential of Endophytic Fungi Isolated from Leaves, Stems, Mangrove Roots *Avicennia marina* as a Producer of Antibiotics. *Metamorfoza: Journal of Biological Sciences*, 6(1), 83. <https://doi.org/10.24843/metamorfoza.2019.v06.i01.p13>
- Madduluri, S., Babu Rao, K., & Sitaram, B. (2013). In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(SUPPL.4), 679–684
- Manganyi, M. C., & Ateba, C. N. (2020). Untapped potentials of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological applications. *Microorganisms*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121934>
- Muharni, Fitriya, & Farida, S. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin , Sumatera Selatan Antibacterial Assay of Ethanolic Extract Musi Tribe Medicinal Plant. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 7(2), 127–135
- Mukhtarini. (2014). Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*, VII(2), 361–367
- Ningsih, A. W., Nurrosyidah, I. H., & Hisbiyah, A. (2020). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Terhadap Rendemen dan Skrining Fitokimia. *Journal of Pharmaceutical-Care Anwar Medika*, 2(2), 49–57. <https://doi.org/10.36932/jpcam.v2i2.27>
- Pealeu, E., Wewengkang, D., & Sumantri, S. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Dan Fraksi Spons *Leucetta Chagosensis* dari Perairan Pulau Mantehage Sulawesi Utara Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* DAN *Escherichia coli*. *PHARMACON*, 10(2), 834–840
- Pormes, O., Pangemanan, D. H. C., & Leman, M. A. (2016). Uji daya hambat ekstrak daun bayam petik (*Amaranthus hybridus* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. *E-GIGI*, 4(2). <https://doi.org/10.35790/eg.4.2.2016.14452>
- Pratiwi, R. H. (2017). Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal*

- Pro-Life*, 4(3), 418–429
- Riga, R., Happyana, N., Quentmeier, A., Zammarelli, C., Kayser, O., & Hakim, E. H. (2021). Secondary metabolites from *Diaporthe lithocarpus* isolated from *Artocarpus heterophyllus*. *Natural Product Research*, 35(14), 2324–2328. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1672685>
- Riga, R., Suryelita, S., Etika, S. B., Suhanah, R. A., Anshar, V., & Khairi, A. (2022). Aktivitas Antibakteri Jamur Endofitik RS-2 Yang Diisolasi Dari Tumbuhan Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Jurnal Zarah*, 10(1), 1–5
- Rosalina, R., Ningrum, R. S., & Lukis, P. A. (2018). Aktifitas Antibakteri Ekstrak Jamur Endofit Mangga Podang (*Mangifera indica* L .) Asal Kabupaten Kediri Jawa Timur. *Majalah Ilmiah Biologi Biosfera: A Scientific Journal*, 35(3), 139–144. <https://doi.org/10.20884/1.mib.2018.35.3.757>
- Suhanah, R. A., Suryelita, S., Etika, S. B., Ulfah, M., & Riga, R. (2021). Jamur Endofitik Yang Diisolasi Dari Bunga *Andrographis paniculata* (Sambiloto) Sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(1), 139–148. <https://doi.org/10.36387/jifi.v4i1.664>
- Sukmawaty, E., Hafsan, H., Masri, M., Shintia, I., Wahyuni, S., & Amir, U. N. A. (2021). Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Cendawan Endofit *Aspergillus* sp. *BIOTIK: Jurnal Ilmiah Biologi Teknologi Dan Kependidikan*, 8(2), 218. <https://doi.org/10.22373/biotik.v8i2.8194>
- Sulistiyono, F. D., & Mahyuni, S. (2019). Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit Pada Umbi Talas (*Colocasia esculenta* (L.) Schoot). *Jurnal Sains Natural*, 9(2), 66. <https://doi.org/10.31938/jsn.v9i2.235>
- Suryelita, S., Riga, R., Etika, S. B., Ulfah, M., & Artasasta, M. A. (2021). Antibacterial screening of endophytic fungus *xylaria* sp. Derived from *andrographis paniculata* (sambiloto). *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9, 971–975. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2021.7475>
- Tumiari Pakpahan, D. (2020). Antibacterial Activity of N-Hexane, Ethyl Acetate, and Butanol Fraction of Lead Tree (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit) Leaves Against *Propionibacterium acnes* AND *Staphylococcus epidermidis*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 5(2), 12–19
- Wantini, S., & Octavia, A. (2018). Perbandingan Pertumbuhan Jamur *Aspergillus flavus* Pada Media PDA (Potato Dextrose Agar) dan Media Alternatif dari Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). *Jurnal Analisis Kesehatan*, 6(2), 625. <https://doi.org/10.26630/jak.v6i2.788>
- Wijaya, O. N., & Syahputra, G. S. (2020). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Butanol , Etil Asetat Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat Secara In-Vitro Antibacterial Activity Test Fraction N-Hexane , Ethyl Acetate And Butanol Leaf Papaya (*Carica papaya* L .) on The Causes Of Acne By atau industry baha. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*, 5(2), 31–45
- Wulansari, E. D., Lestari, D., & Khoirunissa, M. A. (2020). Kandungan Terpenoid Dalam Daun Ara (*Ficus carica* L.) Sebagai Agen Antibakteri Terhadap Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmakon*, 9(2), 219. <https://doi.org/10.35799/pha.9.2020.29274>
- Yastanto, A. J. (2020). Karakteristik Pertumbuhan Jamur pada Media PDA dengan Metode Pour Plate. *Indonesian Journal of Laboratory*, 2(1), 33. <https://doi.org/10.22146/ijl.v2i1.54491>
- Yunita, E. (2021). Mekanisme Kerja *Andrographis paniculata* Dari Sambiloto Sebagai Senyawa Antioksidan. *Herb-Medicine Journal*, 4(1), 43. <https://doi.org/10.30595/hmj.v4i1.8825>

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih dan penghargaan diberikan kepada para pakar/mitra bestari/rekan setara yang telah diundang sebagai penelaah oleh *Jurnal Sains Natural* dalam Volume 12 No. 3, Tahun 2022. Berikut ini adalah daftar nama pakar/mitra bestari/rekan setara yang berpartisipasi :

1. Prof. Dr. Mustanir, M.Sc (Kimia Organik, Universitas Syiah Kuala)
2. Dr. Agung Abadi Kiswandono, (Kimia Analitik dan Lingkungan, Universitas Lampung)
3. Dr. Lany Nurhayati, M.Si (Kimia Organik, Universitas Nusa Bangsa)
4. Dr. R. Haryo Bimo Setiarto (Mikrobiologi Pangan, Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, BRIN)
5. Dr. Ida Ayu Raka Astiti Asih, Dra., M.Si (Kimia Organik Bahan Alam, Universitas Udayana)
6. Rijal Satria, Ph.D (Entomologi, Taksonomi Hewan, dan Sistematika Hewan, Universitas Negeri Padang)
7. Dr. Ida Bagus Gede Darmayasa, M.Si (Microbiology, Universitas Udayana)
8. Dr. Rohimatun, S.P., M.P (Entomologi, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, BRIN)
9. Drs. Agus Taufiq, M.Si, (Kimia Anorganik, Akademi Kimia Analisis Caraka Nusantara)
10. Dra. Febi Nurilmala, M.Si (Bioteknologi, Universitas Nusa Bangsa)
11. Mamay Maslahat, M.Si (Kimia Analitik, Universitas Nusa Bangsa)
12. Ade Ayu Oksari, M.Si (Taksonomi, Universitas Nusa Bangsa)
13. Idah Rosidah, M.Farm., Apt (Farmasi Bahan Alam, Pusat Riset Bahan Baku Obat dan Obat Traditional, Organisasi Riset Kesehatan, BRIN)

PEDOMAN PENULISAN

A. Pedoman Umum

1. Naskah merupakan hasil penelitian otentik yang belum dipublikasikan di media publikasi atau penerbitan lainnya.
2. Naskah tidak mengandung unsur plagiarisme. Dewan redaksi akan langsung menolak teks yang terindikasi plagiarisme.
3. Naskah yang telah ditulis berdasarkan pedoman Sains Natural (dalam format MS Word, sesuai template), harus dikirim melalui Sistem Submission Online dengan menggunakan Open Journal System (OJS) di portal e-jurnal Sains Natural (<http://ejournalunb.ac.id/index.php/JSN>). Kemudian, daftarkan diri sebagai salah satu penulis atau reviewer.
4. Naskah yang tidak sesuai dengan pedoman penulisan Sains Natural akan dikembalikan kepada penulis sebelum proses *review*.
5. Naskah bisa ditulis baik dalam bahasa Indonesia atau bahasa Inggris dengan bahasa standar. Naskah harus terdiri dari sepuluh (10) sampai tiga belas (13) halaman termasuk gambar dan tabel. Naskah ditulis di atas kertas ukuran A4 (210x297 mm), dengan margin 3 cm (kiri, kanan, bawah dan atas).
6. Teks naskah harus menggunakan huruf Times New Roman, ukuran huruf 11pt, 1 spasi baris, dalam satu kolom.
7. Kata-kata yang tidak umum atau dari bahasa asing dituliskan dengan format *Italic*. Untuk naskah dalam Bahasa Indonesia, sebaiknya hindari istilah asing. Setiap paragraf dimulai 10 mm dari sisi kiri perbatasan sementara tidak ada spasi di antara paragraf.
8. Tabel dan gambar ditempatkan di grup teks setelah teks. Setiap gambar harus diberi judul (Gambar) di bawah gambar dan diberi nomor dalam format penomoran Arab yang diikuti oleh judul gambar. Setiap tabel harus diberi judul tabel dan diberi nomor dalam format penomoran arab di atas tabel diikuti dengan judul tabel. Gambar lampiran jelas (ukuran font, resolusi dan ruang garis terlihat jelas). Gambar, tabel, dan bagan harus ditempatkan di tengah antara kelompok teks. Jika memiliki ukuran lebih besar, bisa diletakkan di tengah halaman. Tabel tidak boleh berisi garis vertikal, sedangkan garis horisontal hanya diijinkan untuk hal penting.

B. Teks Naskah

1. Judul

Judul harus ringkas dan informatif. Judul naskah harus ditulis dengan maksimal 12 (dua belas) kata (dalam Bahasa Indonesia) dan 10 (sepuluh) kata dalam bahasa Inggris, font berukuran 12pt, UPPERCASE, BOLD, dan dalam format teks rata tengah.

2. Nama penulis dan afiliasinya

Nama dari masing-masing penulis dicantumkan dengan jelas dan harus menunjukkan penulis yang berperan sebagai koresponden. Alamat afiliasi penulis (tempat kerja sebenarnya dilakukan) dicantumkan di bawah nama. Tanggung jawab koresponden ini mencakup menjawab pertanyaan tentang Metodologi dan Bahan. Penulis juga mencantumkan alamat e-mail dan rincian kontak.

3. Abstrak

Abstrak ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris. Teks ditulis dalam format Times New Roman, ukuran huruf 9pt, 1 spasi baris, sebanyak 75-250 kata dan diikuti oleh lima kata kunci. Abstrak harus menyatakan secara singkat tujuan penelitian, hasil utama, dan kesimpulan utama.

4. Pendahuluan

Pada pendahuluan, sebutkan tujuan dan latar belakang yang memadai. Hindari survei literatur terperinci atau ringkasan hasilnya.

5. Bahan dan Metode

Metode ini diimplementasikan untuk memecahkan masalah, termasuk metode analisis. Metode yang digunakan dalam pemecahan masalah penelitian dijelaskan pada bagian ini.

6. Hasil dan Pembahasan

Hasil harus jelas dan ringkas. Pembahasan harus mengeksplorasi signifikansi hasil kerja, bukan mengulanginya. Hindari kutipan yang luas dan diskusi literatur yang dipublikasikan.

7. Kesimpulan

Kesimpulan utama penelitian ini dapat disajikan dalam bagian Kesimpulan singkat.

8. Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih dicantumkan pada bagian terpisah di bagian akhir artikel sebelum referensi. Pada ucapan terima kasih dicantumkan nama/organisasi/institusi yang memberikan bantuan selama penelitian (misal, Memberikan bantuan bahasa, menulis bantuan atau bukti membaca artikel, dll.).

9. Referensi dan kutipan

Semua referensi yang digunakan harus diambil dari sumber utama (jurnal ilmiah dan yang paling sedikit adalah 80% dari semua referensi) yang diterbitkan dalam sepuluh tahun terakhir. Setiap naskah harus memiliki setidaknya sepuluh referensi. Referensi harus menggunakan "Mendeley" sebuah aplikasi manajemen referensi. Format penulisan yang digunakan dalam Sains Natural mengikuti format yang diterapkan oleh APA 6th Edition (American Psychological Association).