



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**UJI MUTEGANASITAS EKSTRAK DIKLOROMETANA DAN
ETANOL BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L) Miers)
DENGAN *Salmonella typhimurium* TA 1535**

SKRIPSI



**PERNANDA SAPRYANOKI
06931060**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**UJI MUTAGENISITAS EKSTRAK DIKLOROMETANA DAN
ETANOL BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L) Miers)
DENGAN *Salmonella typhimurium* TA 1535**

SKRIPSI SARJANA FARMASI

Oleh :

PERNANDA SAPRYANOKI

06931060



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**



Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk menempuh ujian Sarjana

Farmasi pada Fakultas Farmasi

Universitas Andalas

Padang

Disetujui oleh

Pembimbing I



Prof. Dr. rer. nat. Adek Zamrud Adnan, M.S., Apt.

Pembimbing II



Dra. Rustini, M.Si., Apt.

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji syukur penulis ucapkan kepada Allah S.W.T atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan skripsi yang berjudul “UJI MUTAGENISITAS EKSTRAK DIKLOROMETANA DAN ETANOL BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* (L) Miers) DENGAN *Salmonella typhimurim* TA 1535”. Skripsi ini diajukan untuk menyelesaikan program pendidikan Strata Satu pada Fakultas Farmasi, Universitas Andalas, Padang.

Terima kasih yang tidak terhingga kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian sehingga selesai penulisan skripsi ini. Penulis secara khusus menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. rer. nat. Adek Zamrud Adnan, MS, Apt. dan Ibu Dra. Rustini, M.Si, Apt. sebagai pembimbing yang telah meluangkan waktu, pikiran, bimbingan, pengarahan, dan perbaikan-perbaikan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Akmal Djamaan, MS, Apt sebagai Kepala Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Andalas dan para analis yang telah memberikan bimbingan dan fasilitas untuk kelancaran penelitian ini.

3. Orang tua, adik, dan keluarga besar penulis yang telah memberikan dukungan moril dan materil yang tak terhingga dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini.
4. Para dosen Fakultas Farmasi Universitas Andalas yang selama ini telah memberikan bimbingan dan ilmu pengetahuan yang sangat berharga bagi penulis.
5. Rekan-rekan kerja di Labor Kimia Bahan Alam dan Labor Mikrobiologi atas kebersamaan, kerjasama dan dukungannya bagi penulis.
6. Keluarga besar mahasiswa farmasi, khususnya farmasi angkatan 2006 atas persaudaraan, persahabatan, dorongan, doa dan semangat selama kuliah di Farmasi Universitas Andalas.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan khususnya dan masyarakat pada umumnya. Penulis meyakini bahwa tidak ada yang sempurna di alam ini kecuali Allah SWT, maka dari itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca demi lebih sempurnanya skripsi ini.

Padang, Agustus 2011

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan uji mutagenisitas ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) dengan metode Ames yang menggunakan *Salmonella typhimurium* TA 1535. Ekstrak diperoleh dengan maserasi bertingkat, menggunakan pelarut heksan, diklorometana dan etanol. Ekstrak diklorometana dan etanol dibuat larutan uji dengan konsentrasi 312,5, 625, 1250, 2500, dan 5000 µg/plat. Jumlah koloni revertan ekstrak dibandingkan dengan nilai dua kali jumlah koloni revertan spontan untuk menentukan efek mutagenik. Hasil uji mutagenisitas menunjukkan bahwa ekstrak diklorometana tanpa homogenat hati tikus telah memberikan jumlah koloni revertan rata-rata lebih dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata pada konsentrasi 625, 2500, dan 5000 µg/plat; ekstrak etanol tanpa dan dengan penambahan homogenat hati tikus memberikan jumlah koloni revertan rata-rata kurang dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata pada semua konsentrasi uji. Jadi, ekstrak diklorometana bersifat mutagen sedangkan ekstrak etanol tidak bersifat mutagen dengan *Salmonella typhimurium* TA 1535.

ABSTRACT

The mutagenicity test of dichloromethane and ethanol extracts of brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) stem with Ames test using *Salmonella typhimurium* TA 1535 has been studied. Extracts were obtained by storey maceration using hexane, dichloromethane, and ethanol. Dichloromethane and ethanol extracts were made test solution with concentration 312,5, 625, 1250, 2500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$. The number of revertant colonies of extracts were compared by two-fold value of the number of spontaneous revertant colonies to determined mutagenic effect. The result of mutagenicity test showed that dichloromethane extract without rat liver homogenate had given the mean number of revertant colonies over than two fold of the mean number of spontaneous revertant colonies at concentration 625, 2500, and 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$; ethanol extract with and without rat liver homogenate gave the mean number of revertant colonies less than two fold of the mean number of spontaneous revertant colonies at all concentration. In conclusion, dichloromethane extract was mutagenic while ethanol extract was not mutagenic with *Salmonella typhimurium* TA 1535.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
ABSTRAK	iii
ABSTRACT	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tinjauan Botani <i>Tinospora crispa</i> (L) Miers	4
2.1.1. Klasifikasi	4
2.1.2. Nama Lain	4
2.1.3. Morfologi	5
2.1.4. Penyebaran	5
2.1.5. Kegunaan Tradisional	5
2.1.6. Kandungan Kimia	7
2.2. Ekstraksi	9
2.3. Mutasi	11
2.3.1. Defenisi Mutasi	11
2.3.2. Mekanisme Mutasi	11
2.3.3. Jenis Mutasi	17
2.3.4. Mutagen	20

2.3.5. Tipe Mutan Bakteri	22
2.4. Uji Ames	22
2.4.1. Metode Uji Ames	23
2.4.2. <i>Salmonella typhimurium</i>	24
2.4.3. Galur Bakteri Uji	25
2.4.4. Sistem Aktivasi Metabolik	27
2.4.5. Interpretasi Hasil	28
III. PELAKSANAAN PENELITIAN	30
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	30
3.2 Metode Penelitian	30
3.3 Alat dan Bahan	31
3.3.1 Alat.....	31
3.3.2 Bahan	31
3.4 Prosedur Penelitian	32
3.4.1 Pengambilan dan Identifikasi Tumbuhan	32
3.4.2 Penyiapan Ekstrak Diklorometana dan Etanol Batang <i>T. crisper</i> (L) Miers	32
3.4.3 Sterilisasi Alat	33
3.4.4 Penyiapan Media	33
3.4.5 Pembuatan Pelat Master	37
3.4.6 Pembuatan Biakan semalam	37
3.4.7 Konfirmasi Sifat Genotip Galur Bakteri Uji	37
3.4.8 Penyiapan Larutan Uji	38
3.4.9 pengujian Mutagenisitas	39

3.5. Analisa Data	40
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	41
4.1 Hasil	41
4.2 Pembahasan	42
V. KESIMPULAN DAN SARAN	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
I	Hasil identifikasi fitokimia batang <i>T. Crispa</i>	7
II	Persentase Rendemen, susut pengeringan, dan kadar abu ekstrak diklorometana dan etanol batang <i>T. Crispa</i>	59
III	Hasil Konfirmasi Sifat Genotip Galur Bakteri Uji <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	62
IV	Hasil Uji Kontrol Positif atau Mutagen Standar 4-Nitrokuinolin-N-Oksida (NQNO)	66
V	Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali terhadap <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	67
VI	Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali tanpa Penambahan Homogenat Hati Tikus terhadap <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	68
VII	Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak etanol Batang Brotowali dengan Penambahan Homogenat Hati Tikus (S-9) terhadap <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	69

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Struktur kimia beberapa senyawa yang terkandung dalam <i>T.crispa</i> (L) Miers	8
2	Bentuk normal (keto) pasangan purin-pirimidin	12
3	Tautomerisasi	13
4	Depurinasi satu basa purin (guanin) dari rantai DNA <i>single</i> heliks	14
5	Deaminasi	15
6	<i>Specific mispairing</i> akibat induksi zat mutagen etil metan sulfonat (EMS)	16
7	Tipe mutasi titik (<i>point mutation</i>)	18
8	Tipe mutasi <i>frameshift</i>	19
9	Skema pembentukan histidin dalam bakteri <i>Salmonella typhimurium</i>	27
10	Tumbuhan Brotowali (<i>Tinospora crispa</i> (L) Miers)	57
11	Skema Kerja Maserasi Bertingkat Batang Brotowali (<i>Tinospora crispa</i> (L) Miers)	58
12	Profil KLT Fasa Normal Eluen DCM : Etanol 7:3 dengan penampak noda	60
13	Profil KLT Fasa Terbalik Eluen Metanol : Asetonitril 7:3	60
14	Skema Uji Mutagenisitas Ekstrak Batang Brotowali	61
15	Foto Uji Butuh Histidin <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	63
16	Foto Uji <i>rfa</i> <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	63

17	Foto uji uvrB <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	64
18	Foto Uji Faktor R	64
19	Foto Revertan Spontan	65
20	Foto Revertan Spontan + S-9	65
21	Uji Mutagenisitas 4-Nitrokuinolin-N-Oksid 0,5 µg/plat	66
22	Grafik hubungan konsentrasi ekstrak diklorometana terhadap pertumbuhan <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	67
23	Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol tanpa penambahan homogenat hati tikus terhadap pertumbuhan <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	68
24	Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol dengan Penambahan homogenat hati tikus terhadap pertumbuhan <i>Salmonella typhimurium</i> TA 1535	69
25	Grafik perbandingan jumlah koloni revertan rata-rata zat uji setelah dikurangi revertan spontan rata-rata dari ekstrak etanol sebelum dan setelah penambahan homogenat hati tikus (S-9) pada rentang konsentrasi uji	70
26	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 5000 µg/plat	71
27	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 2500 µg/plat	71
28	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 1250 µg/plat	72
29	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 625 µg/plat	72
30	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 312,5 µg/plat	73

31	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$	73
32	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 2500 $\mu\text{g}/\text{plat}$	74
33	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$	74
34	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$	75
35	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 312,5 $\mu\text{g}/\text{plat}$	75
36	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$	76
37	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 2500 $\mu\text{g}/\text{plat}$	76
38	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$	77
39	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$	77
40	Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 312,5 $\mu\text{g}/\text{plat}$	78

I. PENDAHULUAN

Kanker merupakan salah satu jenis penyakit yang banyak menyebabkan kematian dan dapat terjadi pada manusia dari semua kelompok usia dan ras. Kejadian dan jenis kanker erat hubungannya dengan berbagai faktor antara lain jenis kelamin, usia, ras, dan paparan terhadap beberapa zat yang bersifat karsinogenik (Katzung, 1992). Zat yang bersifat karsinogen ada yang sintetik dan ada yang berasal dari alam (Winek, 1977).

Beberapa metode dapat digunakan untuk menentukan sifat karsinogen suatu senyawa kimia. Pengujian dapat dilakukan dengan menggunakan hewan percobaan yang memerlukan waktu lama dan biaya mahal. Untuk menentukan sifat karsinogen dari suatu zat kimia secara tidak langsung dapat dilakukan uji mutagenisitas. Sekarang banyak digunakan uji mutagenisitas dengan menggunakan serangga, sel mamalia, atau dengan bakteri. Pengujian ini memerlukan waktu yang lebih singkat dan biaya yang murah (Rustini *et al*, 2002).

Uji mutagenisitas dengan menggunakan bakteri dikenal sebagai uji Ames. Uji Ames pertama kali dilakukan oleh seorang ahli kimia asal Amerika yang bernama Bruce Nathan Ames pada awal tahun 1970-an. Berdasarkan hasil penelitiannya, Ames membuktikan bahwa 80-90% dari sejumlah besar zat kimia yang bersifat karsinogen yang diuji pada saat itu juga bersifat sebagai mutagen (Ames *et al*, 1975).

Uji Ames menggunakan bakteri mutan *Salmonella typhimurium* galur standar TA 1535, TA 1537, TA 97, TA 98, TA 100, dan TA 102. Galur uji ini mengandung mutasi histidin, mutasi rfa, mutasi uvrB dan faktor R untuk meningkatkan kepekaan

bakteri dalam mendeteksi senyawa mutagen. Selain itu, digunakan juga galur *Escherichia coli* WP2 yang mengandung gen mutasi *uvrA* (Lu, 1995).

Uji Ames mengamati mutasi balik mutan *S. typhimurium* yang tergantung pada histidin. Mutan diinkubasi dalam suatu perbenihan yang tidak cukup mengandung histidin sehingga pertumbuhannya tidak terlihat. Jika zat yang bersifat mutagen ditambahkan pada perbenihan maka zat tersebut akan menginduksi mutasi balik sehingga bakteri uji dapat menjadi bentuk yang tidak tergantung histidin dan dapat tumbuh dalam perbenihan yang kekurangan histidin (Rustini *et al*, 2002).

Brotowali telah lama digunakan dalam pengobatan. Brotowali digunakan masyarakat untuk mengobati demam, malaria, diabetes, hepatitis, antelmintik, dan antijamur (Depkes RI, 1978; Depkes RI, 1988; Afifah, 2003; Kresnadi, 2003). Batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) mempunyai kandungan biokimia antara lain alkaloid berberin, pati, glikosida, pikroretosid, dan zat pahit pikroretin (Aninymous, 1989; Wijayakusuma, 1992). Dari penelitian fitokimia dilaporkan batang brotowali mengandung senyawa furanoditerpenglikosida yaitu tinokrisposid yang berasa sangat pahit (Adnan, 1988; Adnan & Pachali, 1992). Senyawa tinokrisposid dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dengan EC_{50} sebesar $4,22 \times 10^{-5}$ M (Elnovara, 1996). Ekstrak diklorometana batang brotowali mengandung senyawa tinokrisposid dan ekstrak etanol mengandung senyawa protoberberin alkaloid (Adnan, 1988). Pada penelitian terdahulu, ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* yang resisten klorokuin dengan IC_{50} kurang dari 5 ppm (Mawaddah, 2010).

Dalam penggunaan obat tradisional, simplisia atau sediaan galeniknya untuk kesehatan perlu diperhatikan keamanannya. Untuk mengevaluasi keamanan suatu

senyawa obat guna mendeteksi adanya senyawa kimia yang berefek merugikan, maka perlu dilakukan serangkaian uji toksisitas termasuk diantaranya uji karsinogenik (Anonim, 1991). Oleh karena itu, pada penelitian kali ini dilakukan uji mutagenisitas ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali dengan menggunakan galur standar mutan *S. typhimurium* TA 1535.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya kemungkinan efek mutagenik dari ekstrak diklorometana dan etanol batang Brotowali (*T. crispa* (L) Miers) terhadap *S. thipymurium* TA 1535. Disamping itu, melalui penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat berupa informasi keamanan ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali khususnya dalam hal memicu efek karsinogenik secara tidak langsung sebelum dilakukan uji klinis pada manusia.

Adapun perumusan masalah pada penelitian ini adalah untuk menentukan apakah pemberian ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali *T. crispa* (L) Miers) menyebabkan mutasi balik galur mutan *S. typhimurium* TA 1535.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Botani *T. Crispa* (L) Miers.

2.1.1. Klasifikasi

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub Divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Sub Kelas	: Choripetalae
Ordo	: Polycarpicae
Famili	: Menispermae
Genus	: <i>Tinospora</i>
Spesies	: <i>Tinospora crispa</i> (L) Miers.

2.1.2. Nama Lain (Depkes, 1978; Adnan, 1988)

Latin : *Tinospora tuberculata* Beumee, *Tinospora rumphii* Boerl, *Tinospora cordifolia* F., *Cocculus crispum* DC, *Cocculus cordifolius* Walp., *Cocculus villosus* DC, *Menispermum crispum* Linn, *Menispermum verrucosum*, *Menispermum rimosum* Blanco, *Menispermum tuberculatum*. Sumatera: aka ali-ali (sumatera barat). Jawa: brotowali, antawali, daun gadel, bratawali, putrawali, andawali. Nusa tenggara: antawali. Cina: shen jin teng.

2.1.3. Morfologi (Depkes, 1978; Depkes, 1988; Kresnadi, 2003)

T. crispa merupakan tumbuhan perdu memanjat. Batang berdiameter sampai 2,5 cm, berkulit yang rapat, dan pepangannya mudah terkelupas. Daun bertangkai dengan panjang sampai 16 cm, bentuknya seperti jantung atau agak bulat telur tetapi berujung runcing, lebar antara 6-13 cm. Bunganya bersifat majemuk, berwarna hijau ketika masih kuncup kemudian berubah menjadi merah dan putih setelah mekar serta bentuk tandan terletak pada batang. Kelopak bunga berjumlah 3 buah, berbentuk bulat telur. Mahkota bunga berjumlah 6 buah, berwarna hijau. Benang sari berjumlah 6 buah yang mempunyai warna hijau muda dan kepala sari berwarna kuning atau hijau muda.

2.1.4. Penyebaran (Depkes, 1988; Kresnadi, 2003)

T. crispa berasal dari Asia Tenggara dan tersebar luas di daerah tropis terutama Asia, Indo cina, Semenanjung Melayu, Filipina, dan Indonesia. Keanekaragaman dari brotowali ini sangat kecil. Tanaman ini belum dibududayakan oleh masyarakat secara teratur. Tanaman ini mudah diperbanyak dengan stek batang yang biasanya memanjat melingkari tumbuhan lain. Tanaman ini memerlukan pohon sebagai tumpuan untuk memanjat ke atas.

2.1.5. Kegunaan Tradisional (Depkes, 1988; Afifah, 2003; Kresnadi, 2003; Basri, 2009)

Air seduhan brotowali umumnya diminum sebagai tonikum. Di Cina, semua bagian tumbuhan dipakai sebagai obat demam. Di Filipina brotowali dianggap sebagai obat serba bisa antara lain digunakan untuk mengobati penyakit jiwa. Di Bali, batangnya dipakai sebagai obat sakit perut, demam dan sakit kuning, bahkan

sebagai obat gosok untuk mengobati sakit punggung dan pinggang. Di Jawa, air rebusannya digunakan untuk mengobati demam dan sebagai obat luar untuk luka dan gatal-gatal.

Pada awal abad ke 21, batang brotowali yang ditumbuk, dipakai untuk mengobati sakit gula. Tumbuhan ini juga digunakan sebagai pengatur haid dan obat kencing manis. Air rebusan batang biasanya digunakan untuk obat sakit perut, demam, sakit pinggang, mencret dan cacing. Bila air rebusan ini dicampur dengan minyak dan belerang maka bisa digunakan sebagai obat luar untuk kudis dan borok sifilis. Pada umumnya, daunnya dipakai sebagai obat borok.

Pada beberapa penelitian dengan menggunakan kelinci, brotowali memiliki khasiat menurunkan demam. Air rebusan memberi ketenangan pada tikus sehingga dapat digunakan dalam menangani penyakit kesadaran (psychosis) dan mungkin pula penyakit jiwa.

2.1.6. Kandungan Kimia

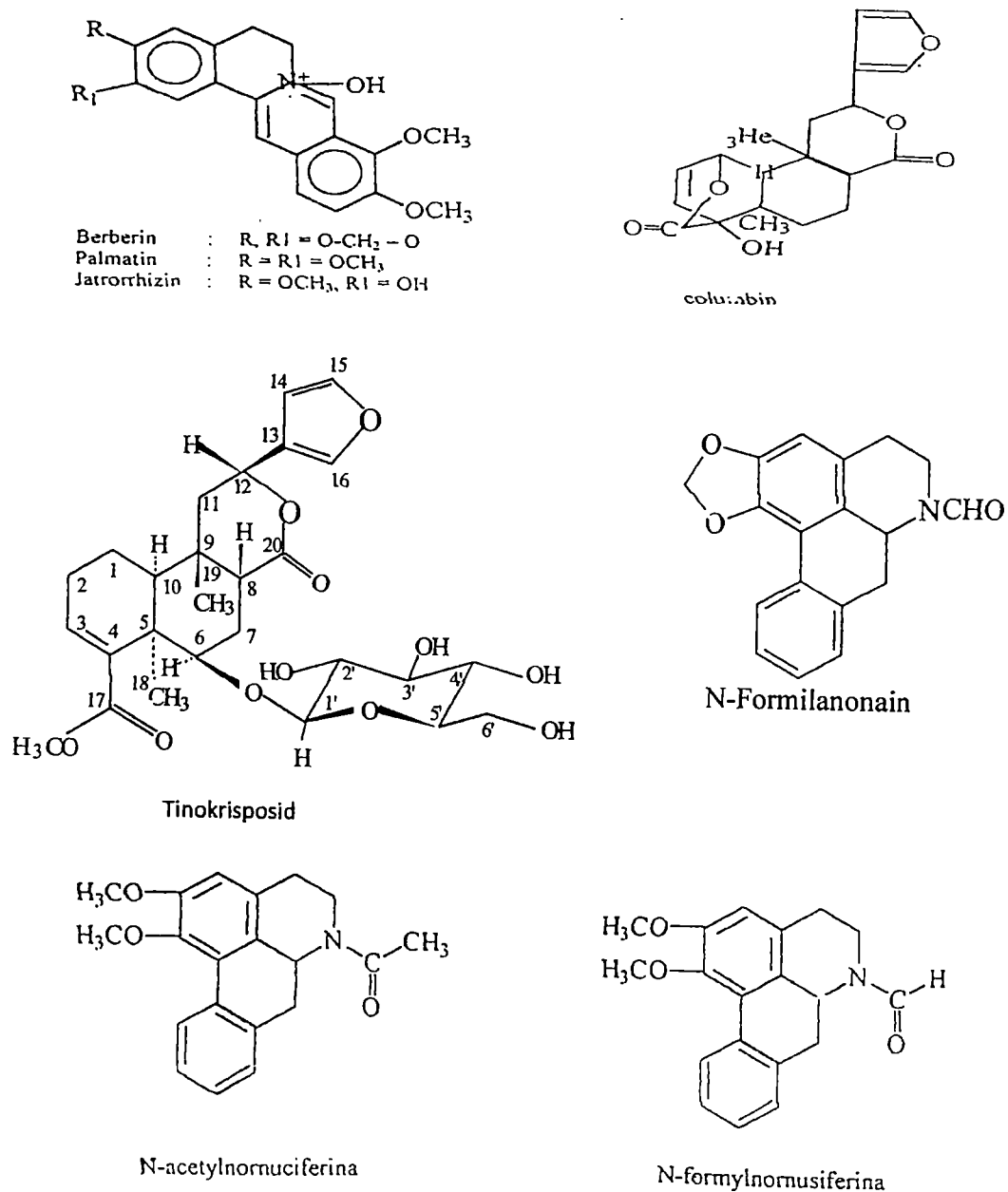
Dari hasil penelitian dilaporkan identifikasi fitokimia *T. crisper* (L) Miers., sebagai berikut :

Tabel I. Hasil identifikasi fitokimia batang *T. crisper* (L) Miers. (Kasmita, 2006)

Kandungan kimia	Pereaksi	Hasil
Alkaloid	Mayer	+
Flavonoid	Mg/HCl	-
Terpenoid	Anhidrida asetat / H ₂ SO ₄	+
Steroid	Anhidrida asetat / H ₂ SO ₄	+
Senyawa Fenolik	FeCl ₃	+
Saponin	Air / busa	-

Brotowali kaya akan kandungan kimia yang tersebar diseluruh bagian tanaman. Dari penelitian fitokimia, dilaporkan bahwa batang *T. crisper* mengandung zat pahit pikrorertin, alkaloid berberin, dan palmatin, sedangkan pada akarnya dijumpai kolumbin. Acevedo, Santos, dan Pabatao berhasil mengisolasi senyawa diterpen tinosporan dari batang, akar dan tuber *T. crisper*. Adnan dan Pachaly telah berhasil mengisolasi senyawa diterpen glikosida dari batang *T. crisper*, yaitu tinokrisposid yang berasa sangat pahit. Disamping itu juga berhasil diisolasi alkaloid aporfin, yaitu N-formilannonain, N-formilnornuciferin dan N-asetilnornuciferin dan

juga berhasil diisolasi glikosida (borapetol dan borapetol A) (Depkes RI, 1978; Depkes, 1988; Adnan, 1988; Adnan & Pachaly, 1992; Kresnadi, 2003).



Gambar 1. Struktur kimia beberapa senyawa yang terkandung dalam *T. crispera* (L) Miers (Adnan, 1988)

2.2. Ekstraksi (Depkes RI, 2000)

Ekstraksi merupakan suatu proses penyarian suatu senyawa dari bahan alam khususnya metabolit-metabolit sekunder dengan bantuan pelarut tertentu. Pemilihan metode ekstraksi dilakukan dengan mempertimbangkan sifat zat yang akan diekstraksi. Pada proses ini dapat digunakan sampel dalam keadaan segar atau yang telah dikeringkan, tergantung pada golongan dan stabilitas senyawa yang akan diisolasi.

Metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut terdiri dari 2 cara, yaitu :

1. Cara Dingin.

a. Maserasi.

Maserasi adalah proses penyarian senyawa kimia secara sederhana dengan cara merendam simplisia atau tumbuhan pada suhu kamar dengan menggunakan pelarut yang sesuai sehingga bahan menjadi lunak dan larut. Proses perendaman dilakukan selama 3-5 hari. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga sampel dapat terekstraksi secara sempurna yang ditandai dengan pelarut pada sampel telah berwarna bening.

b. Perkolasi.

Perkolasi merupakan ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna, yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses ini terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan atau penampungan ekstrak),

terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1-5 kali lebih banyak.

2. Cara Panas.

a. Refluks.

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga terjadi ekstraksi sempurna.

b. Sokletasi.

Sokletasi digunakan untuk simplisia yang relatif stabil dan tahan terhadap pemanasan. Prinsip sokletasi adalah penyarian secara terus menerus sehingga penyarian lebih sempurna dengan memakai pelarut yang relatif sedikit. Jika penyarian telah selesai maka pelarutnya diuapkan dan sisanya adalah zat yang tersari. Biasanya pelarut yang digunakan adalah pelarut yang mudah menguap atau mempunyai titik didih yang rendah seperti eter, aseton, metilen klorida dan petroleum eter. Jika digunakan pelarut dengan titik didih tinggi maka dikhawatirkan dapat merusak senyawa yang akan ditarik.

c. Digestasi.

Digestasi adalah maserasi kinetik (dengan menggunakan pengadukan kontiniu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.

d. Infus.

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama 15 menit.

e. Dekokta.

Dekokta adalah proses penyarian yang hampir sama dengan infus, tapi memerlukan waktu selama 30 menit.

2.3. Mutasi

2.3.1. Defenisi Mutasi (Brown, T.A., 1989; Paolella,1998)

Mutasi adalah perubahan urutan nukleotida dari materi genetik, baik DNA maupun RNA yang dapat diturunkan ke generasi berikutnya. Perubahan urutan nukleotida akan mengakibatkan perubahan urutan asam amino dalam rantai polipeptida sehingga protein yang dibentuk juga berubah dan tidak dapat berfungsi dengan baik dalam sel. Mutasi dapat mempengaruhi DNA maupun kromosom. Peristiwa terjadinya mutasi disebut mutagenesis. Makhluk hidup yang mengalami mutasi disebut mutan dan faktor penyebab mutasi disebut mutagen.

2.3.2. Mekanisme Mutasi

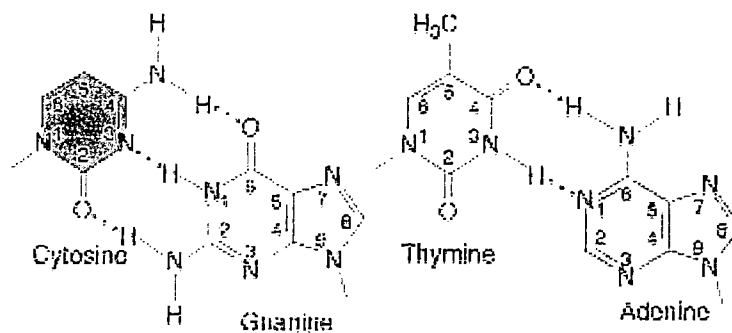
Mutasi dapat terjadi melalui salah satu mekanisme berikut (Farabaugh, *et al.*, 1978; Brown, T.A., 1989; Paolella,1998):

1. Mutasi spontan

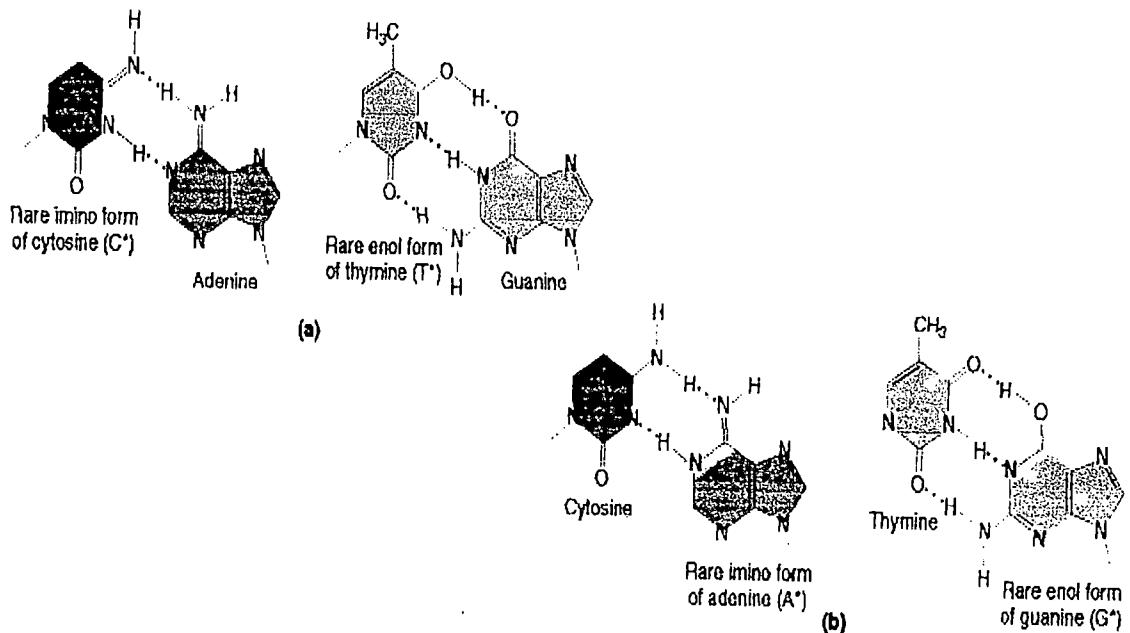
Mutasi spontan merupakan mutasi yang timbul secara tiba-tiba tanpa adanya kontak dengan senyawa mutagen. Mutasi spontan dapat disebabkan oleh berbagai faktor antara lain :

a. Tautomerisasi

Tautomerisasi merupakan kesalahan yang dapat terjadi dalam replikasi DNA. Tautomerisasi adalah perubahan posisi atom hidrogen pada basa purin atau pirimidin sehingga mengubah pola ikatan hidrogen. Hal ini mengakibatkan kesalahan pasangan basa nitrogen DNA akibat perubahan bentuk keto atau amino (normal) dari basa nitrogen menjadi bentuk enol atau imino (abnormal).



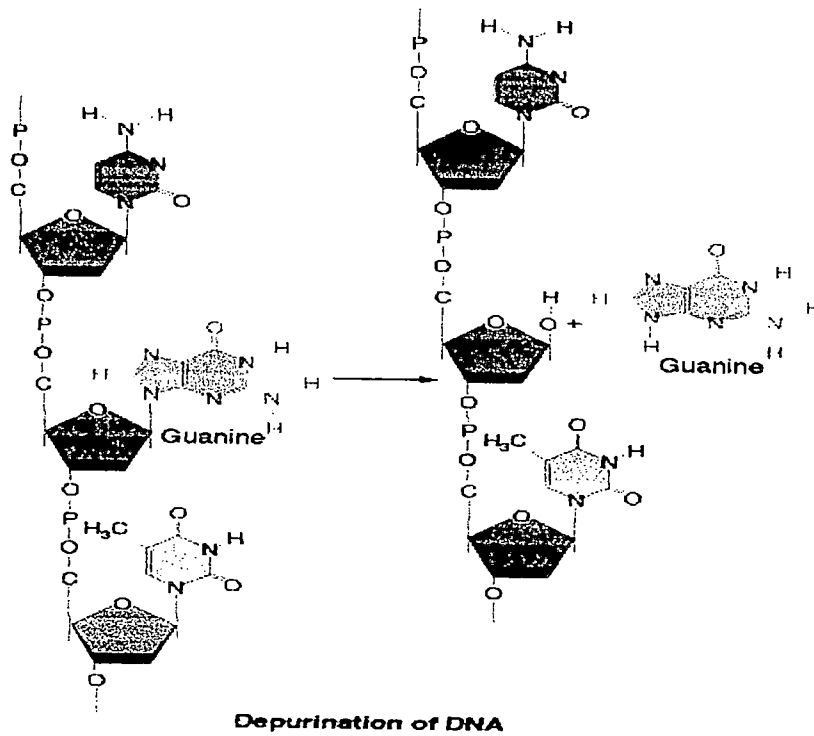
Gambar 2. Bentuk normal pasangan basa purin-pirimidin (Farabaugh, *et al.*, 1978)



Gambar 3. Tautomerisasi. (a) Kesalahan pasangan basa nitrogen akibat tautomerisasi bentuk imino dan enol dari basa pirimidin; (b) Kesalahan pasangan basa nitrogen akibat tautomerisasi bentuk imino dan enol dari basa purin (Farabaugh, *et al.*, 1978)

b. Depurinasi

Depurinasi adalah kehilangan satu basa purin (adenin atau guanin) dari DNA. Pada umumnya, sel mamalia secara normal kehilangan 10.000 purin dari rantai DNA selama 20 jam periode regenerasi sel. Akan tetapi jika hal ini terjadi dalam waktu yang lebih lama atau permanen dapat menyebabkan terjadinya kerusakan genetik karena dihasilkan bentuk apuridik yang tidak dapat membentuk pasangan basa dengan pirimidin sehingga terjadi kerusakan DNA.

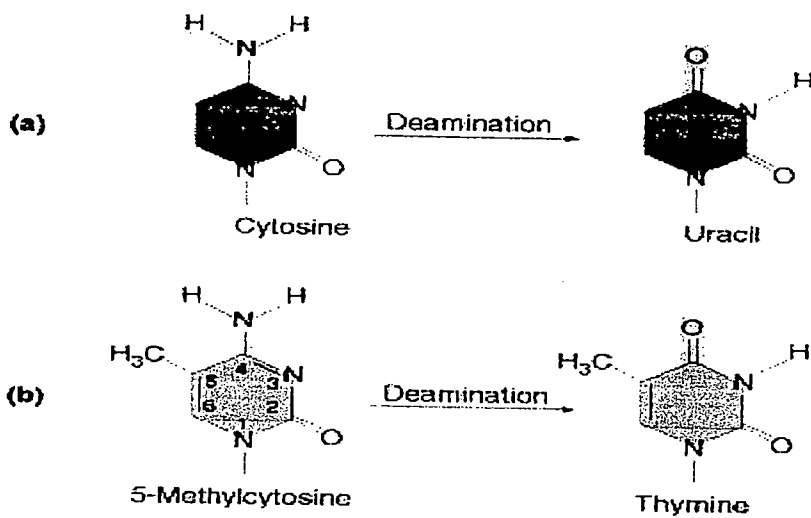


Gambar 4. Depurinasi satu basa purin (guanin) dari rantai DNA *single* heliks (Farabaugh, *et al.*, 1978)

c. Deaminasi

Deaminasi adalah hidrolisis gugus amin dari suatu basa nitrogen sehingga dihasilkan bentuk bentuk basa lain. Perubahan yang terjadi dapat meliputi, deaminasi sitosin menjadi urasil dan 5-metilsitosin menjadi timin. Urasil yang dihasilkan dari deaminasi sitosin akan berikatan dengan adenin sehingga akan mengubah pasangan basa yang awalnya guanin-sitosin (G-C) menjadi adenin-urasil (A-U) pada DNA. Dalam keadaan normal deaminasi sitosin menjadi urasil akan diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA melalui enzim urasil-DNA glikosilase. Akan tetapi deaminasi 5-metilsitosin menjadi timin tidak dapat diperbaiki oleh enzim

ini karena timin yang dihasilkan merupakan basa nitrogen normal pada DNA. Oleh karena itu, deaminasi 5-metilsitosin menjadi timin lebih sering menyebabkan mutasi DNA.



Gambar 5. Deaminasi (a) sitosin dan (b) 5-metilsitosin (Farabaugh, *et al.*, 1978)

2. Mutasi yang diinduksi

Mutasi ini diinduksi oleh zat mutagen. Zat mutagen menginduksi terjadinya mutasi melalui tiga mekanisme berikut :

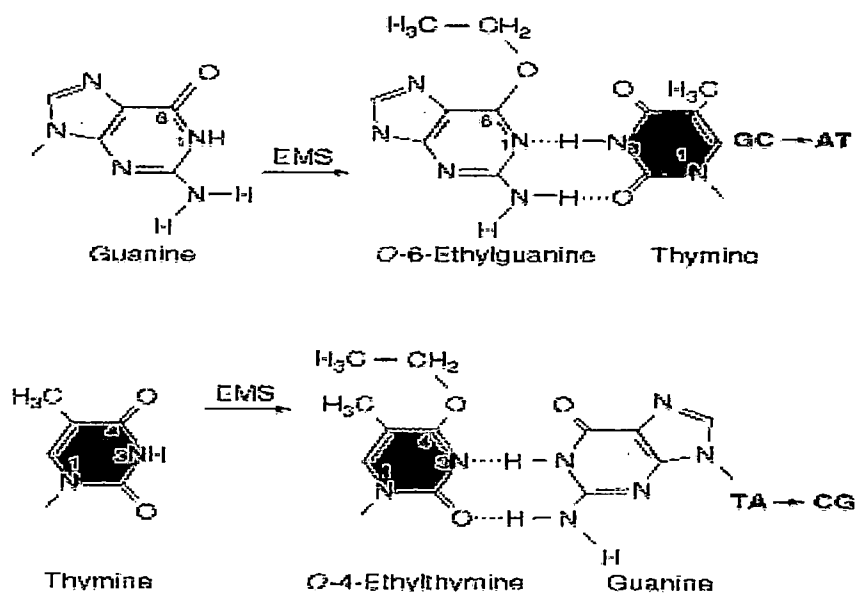
a. Substitusi Analog basa

Beberapa zat mutagen memiliki struktur yang mirip dengan dengan salah satu basa nitrogen DNA sehingga dapat masuk dalam rantai DNA dan mensubstitusi pasangan basa normal. Zat mutagen ini disebut analog basa. Analog basa akan membentuk pasangan basa yang tidak normal dan menghasilkan nukleotida yang salah sehingga dapat menimbulkan mutasi.

Contoh : 5-bromourasil yang merupakan analog timin dapat menyebabkan transisi pasangan basa timin-adenin (T-A) menjadi 5-bromourasil-guanin (5BU-G)

b. Kesalahan pasangan basa spesifik (*specific mispairing*)

Beberapa zat mutagen terutama golongan zat pengalkil seperti etil metan sulfonat (EMS) dan nitrosoguanidin (NG) dapat bereaksi dengan salah satu basa nitrogen DNA dan mengubah struktur basa tersebut. Basa yang dihasilkan akibat induksi dari zat mutagen ini dapat membentuk pasangan basa spesifik dengan basa nitrogen normal.



Gambar 6. *Specific mispairing* akibat induksi zat mutagen etil metan sulfonat (EMS) (Coulondre dan Miller, 1977)

c. Kerusakan basa nitrogen

Sebagian besar zat mutagen dapat merusak satu atau lebih basa nitrogen sehingga tidak terbentuk pasangan basa purin-pirimidin. Hal ini

mengakibatkan tidak terjadinya replikasi DNA karena tidak dapat membentuk basa komplementer.

2.3.3. Jenis Mutasi (Gardner dan Snustad, 1984; Brown, T.A., 1989; Paoella, 1998)

Perubahan dalam urutan nukleotida DNA dapat terjadi melalui beberapa cara sehingga dapat menyebabkan terjadinya mutasi. Ada 2 jenis mutasi yang terjadi secara umum, yaitu :

1. Mutasi titik

Mutasi titik atau disebut juga mutasi substitusi merupakan mutasi yang disebabkan terjadinya substitusi suatu basa nitrogen dengan basa lain dalam rangkaian nukleotida suatu gen. Mutasi ini sering disebabkan oleh induksi zat mutagen atau kesalahan dalam replikasi DNA. Mutasi titik dikelompokkan lagi menjadi dua bentuk tipe mutasi, yaitu transisi dan transversi. Transisi merupakan substitusi suatu basa purin dengan basa purin lain atau basa pirimidin dengan basa pirimidin lain. Sementara, transversi merupakan substitusi suatu basa purin dengan basa pirimidin atau sebaliknya. Mutasi titik juga dapat dibagi lagi menjadi tiga jenis mutasi berdasarkan sifat kodon yang dihasilkan akibat mutasi, yaitu :

a. Mutasi diam (*Silent mutation*)

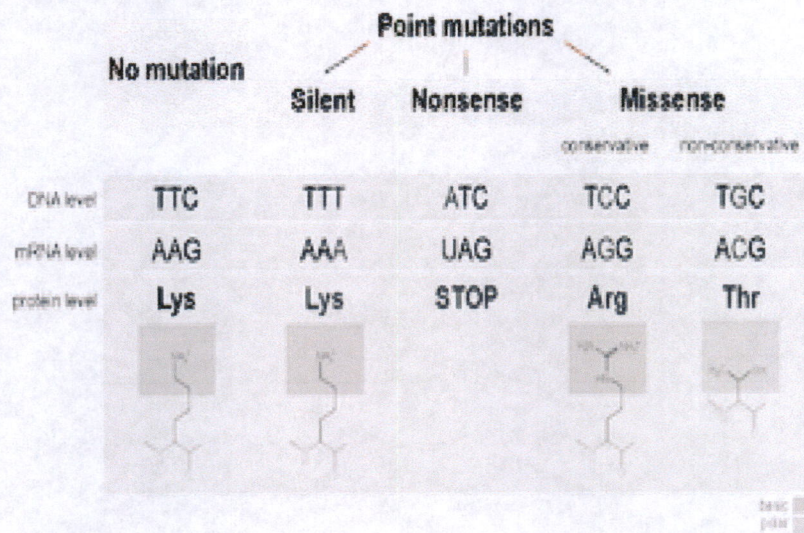
Mutasi menghasilkan suatu kodon pada mRNA yang menetapkan asam amino yang sama dengan kodon aslinya karena merupakan sinonim dari kodon asli. Contoh : AGG menjadi CGG yang keduanya merupakan kodon untuk asam amino arginin.

b. Mutasi salah arti (*Missense mutation*)

Mutasi menghasilkan kodon pada mRNA yang menetapkan asam amino yang berbeda dengan kodon aslinya. Contoh : GAG (kodon asam glutamat) menjadi GUG (kodon valin)

c. Mutasi tak berarti (*Nonsense mutation*)

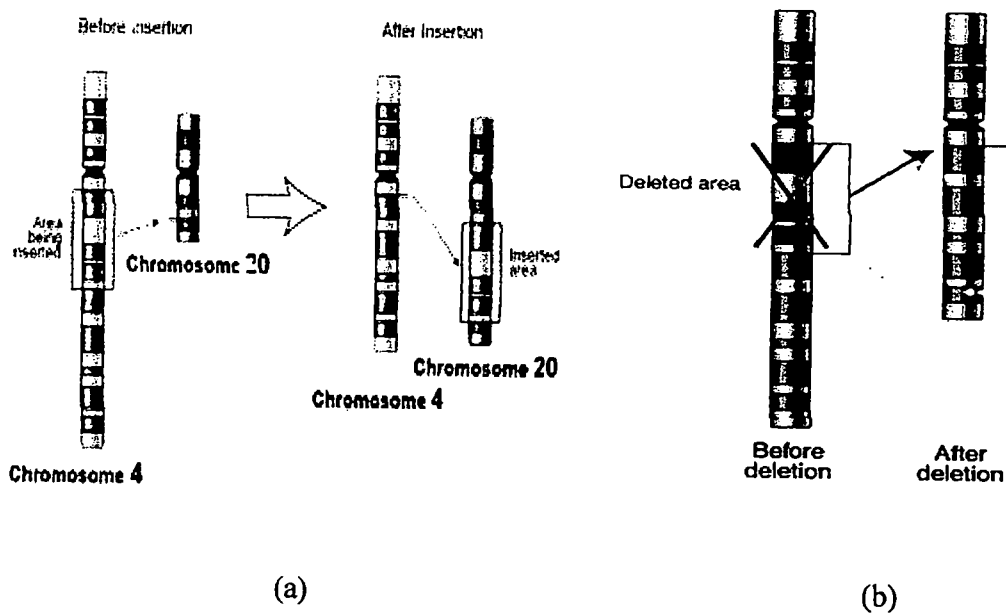
Mutasi menghasilkan salah satu kodon pada mRNA yang menghentikan sintesis asam amino sehingga mengakhiri rantai polipeptida dan mengakibatkan berakhirnya pembentukan protein sebelum waktunya. Kodon yang menghentikan sintesis rantai polipeptida pada keadaan normal adalah UAG, UAA, dan UGA. Mutasi ini menghasilkan suatu polipeptida yang tidak lengkap dan tidak berfungsi.



Gambar 7. Tipe mutasi titik (*point mutation*) (Gardner dan Snustad, 1984)

2. Mutasi pergeseran kerangka atau *frameshift*

Mutasi ini disebabkan oleh penambahan atau penghilangan satu atau lebih pasangan basa nukleotida dari rantai DNA. Mutasi ini menyebabkan pergeseran kerangka pembacaan sehingga terbentuk protein yang tidak berfungsi. Mutasi *frameshift* memiliki dua tipe mutasi yaitu, insersi dan delesi. Insersi adalah penambahan satu atau lebih pasangan basa nukleotida ke dalam rantai DNA sedangkan delesi adalah hilangnya satu atau lebih pasangan basa nukleotida dari rantai DNA.



Gambar 8. Tipe mutasi *frameshift* (a) insersi dan (b) delesi (Gardner dan Snustad, 1984)

2.3.4. Mutagen (Kimball, J.W.,1974; Paolella,1998)

Mutagen merupakan faktor yang dapat menginduksi terjadinya mutasi. Secara umum mutagen dapat dibagi menjadi tiga kelompok, yaitu :

1. Faktor kimia

Mutagen merupakan senyawa kimia yang dapat menginduksi mutagenesis. Senyawa kimia yang bersifat mutagen dapat dibedakan atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme kerjanya dalam menginduksi proses mutasi, yaitu :

a. Analog basa

mutagen ini memiliki struktur yang mirip dengan salah satu basa nitrogen sehingga dapat mensubstitusi basa nitrogen normal. Contoh : 5-bromourasil dan 2-aminopurin

b. Senyawa pendeaminasi

Mutagen ini dapat mendeaminasi basa nitrogen sehingga terjadi perubahan pasangan basa normal. Contoh : Asam nitrat

c. Senyawa pengalkil

Mutagen ini menyebabkan kesalahan pasangan basa nukleotida dan menginduksi kerusakan rantai DNA. Contoh : etil metan sulfonat dan nitrosoguanidin.

d. Senyawa interkalasi

Mutagen ini dapat menyebabkan insersi atau delesi satu atau lebih pasangan basa nukleotida DNA sehingga menghasilkan mutasi *frameshift* (pergeseran kerangka). Contoh : 9-aminoakridin dan proflavin.

2. Faktor fisika

a. Radiasi ultraviolet

Pada panjang gelombang 260 nm, sinar ultraviolet telah dapat merusak DNA. Sinar ultraviolet dapat mengakibatkan dimerisasi dua timin yang berdekatan sehingga terjadi pemutusan ikatan pasangan basa dengan adenin pada rantai DNA. Hal ini dapat menyebabkan replikasi DNA terhenti jika dimer timin tidak diperbaiki oleh sistem perbaikan DNA.

b. Sinar energi tinggi

Sinar berenergi tinggi seperti sinar x dan gamma dapat merusak basa purin dan pirimidin dan jauh lebih potensial sebagai mutagen dibandingkan sinar ultraviolet. Paparan sinar x atau gamma pada tubuh dapat memicu timbulnya radikal bebas yang dapat mengoksidasi basa nitrogen DNA sehingga terjadi perubahan struktur basa tersebut. Hal ini dapat menyebabkan terbentuknya pasangan basa yang abnormal.

3. Faktor biologi

Beberapa jenis virus dapat menyebabkan mutasi pada manusia seperti virus bakteriofage Mu. Bakteriofage Mu merupakan virus yang mampu menimbulkan mutagenesis dengan memasukkan diri pada urutan nukleotida dari rantai DNA inang sehingga gen menjadi tidak aktif.

2.3.5. Tipe Mutan Bakteri (Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S., 1981; Snyder, L. dan Champness, W., 2003)

Pada saat ini berbagai macam mutan bakteri telah berhasil diisolasi. Secara umum, mutan bakteri dapat dikelompokkan menjadi beberapa tipe, yaitu:

1. Mutan yang memperlihatkan toleransi terhadap antibiotika.
2. Mutan yang dapat meningkatkan atau menurunkan kemampuan fermentasi.
3. Mutan yang memiliki defisiensi nutrisi sehingga memerlukan media yang lebih kompleks untuk pertumbuhannya dibandingkan biakan normal.
4. Mutan yang menunjukkan perubahan pada struktur permukaan dan komposisi selnya.
5. Mutan yang menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan pigmen.
6. Mutan yang memperlihatkan beberapa perubahan pada cirri morfologis dibandingkan biakan normalnya.

2.4. Uji Ames (Maron dan Ames, 1983; Mortelmans dan Zeiger, 2000; Rustini *et al*, 2002)

Uji Ames merupakan uji mutagenisitas jangka pendek untuk menentukan senyawa yang bersifat mutagen dengan asumsi senyawa tersebut juga bersifat karsinogen. Uji Ames pada umumnya menggunakan galur *S. typhimurium* yang telah mengalami mutasi gen histidin sehingga tidak dapat mensintesis histidin sendiri.

Uji Ames pertama kali ditemukan oleh seorang ahli kimia asal Amerika, Bruce Nathan Ames, pada tahun 1970-an. Ames menemukan suatu metode uji dengan menggunakan bakteri khusus yang sangat sensitif terhadap senyawa mutagen. Sejak awal tahun 1970-an, Ames telah melakukan uji mutagenisitas terhadap 300

senyawa kimia yang diketahui bersifat karsinogen pada saat itu (Ames dan McCann, 1975). Hasil pengujiannya menunjukkan 80-90% dari senyawa uji yang bersifat karsinogen juga bersifat mutagen. Berdasarkan hasil penelitiannya, Ames berkesimpulan bahwa senyawa mutagen kemungkinan besar juga bersifat karsinogen. Oleh karena itu, Penggunaan uji Ames berdasarkan asumsi bahwa setiap senyawa yang bersifat mutagen dari hasil uji Ames juga bersifat karsinogen.

Uji Ames mengukur mutasi balik mutan *S. typhimurium* yang tergantung histidin menjadi jenis liar yang tidak tergantung histidin. Bakteri uji diinkubasi dalam suatu perbenihan yang tidak cukup mengandung histidin sehingga tidak terjadi pertumbuhan. Apabila senyawa mutagen ditambahkan pada perbenihan maka akan menginduksi mutasi balik sehingga bakteri dapat tumbuh dalam perbenihan yang kekurangan histidin.

2.4.1. Metode Uji Ames (Ames, *et al.*,1975; Maron dan Ames, 1983; Mortelmans dan Zeiger, 2000)

1. Metode standar

Pada metode standar, lapisan agar atas ditambahkan langsung dengan zat uji, biakan semalam bakteri, dan homogenat hati tikus. Lapisan agar atas kemudian dituang pada pelat agar glukosa minimal dan setelah memadat diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24-48 jam.

2. Metode pra-inkubasi

Metode ini merupakan modifikasi metode standar yang dilakukan untuk senyawa mutagen yang kurang baik terdeteksi seperti zat warna azo dan nitrosamin. Pada metode ini, zat uji, biakan semalam bakteri, dan S-9

diinkubasi terlebih dahulu pada suhu 37⁰ C selama 20-30 menit, kemudian ditambahkan pada lapisan agar atas. Lapisan agar atas dituang pada pelat agar glukosa minimal dan setelah memadat diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24-48 jam.

3. Uji bintik (Spot test)

Metode ini digunakan sebagai skrining cepat pada pemeriksaan banyak senyawa. Beberapa kristal mutagen padat atau mutagen cair tanpa dilarutkan sebelumnya diletakkan langsung pada kertas cakram steril pada permukaan agar yang telah dicampur biakan bakteri uji. Kemudian diamati pertumbuhan koloni revertan di sekeliling cakram.

2.4.2. *Salmonella typhimurium* (Siegrist, 2009)

Dunia	: Bakteri
Divisi	: Proteobakteri
Klas	: Gamma Proteobakteri
Ordo	: Eubacteriales
Genus	: Salmonella
Spesies	: <i>Salmonella typhimurium</i>

S. typhimurium merupakan bakteri penyebab infeksi usus pada manusia yang termasuk bakteri gram negatif, berbentuk batang dengan diameter 1-1,5 µm, tidak berspora, dan bergerak dengan flagel peritrik berukuran 2-4 µm x 0.5-0,8 µm. Pada biakan agar, koloninya bebrbentuk bulat agak cembung, jernih, dan berwarna putih susu. Secara biokimia, identifikasi bakteri ini dapat dilakukan dengan uji fermentasi karbohidrat dengan menggunakan indikator pH karena bakteri ini membentuk asam

dari hasil fermentasi manosa dan glukosa. Selain itu dapat dilakukan uji hidrogen sulfida (H₂S) karena bakteri ini juga memproduksi gas hidrogen sulfida.

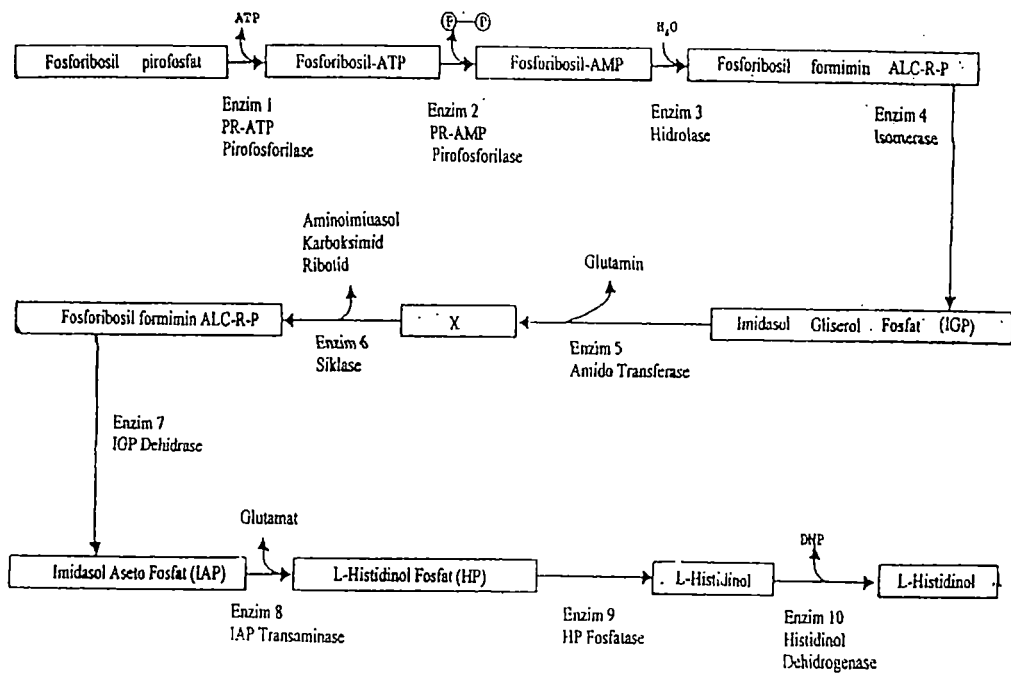
2.4.3. Galur Bakteri Uji (Maron dan Ames, 1983; Mortelmans dan Zeiger, 2000; Rustini *et al*, 2002)

Uji Ames menggunakan galur *S. typhimurium* yang telah mengalami mutasi yaitu TA 1535, TA 1537, TA 97, TA 98, TA 100, dan TA 102. Selain itu terdapat galur bakteri baru yang dapat digunakan untuk uji Ames yaitu *Euscheria coli* WP2. Berbeda dengan galur *S. typhimurium*, *E. coli* WP2 tidak mengalami mutasi pada gen histidin tapi mengalami mutasi pada gen triptofan sehingga tidak dapat mensintesis asam amino triptofan sendiri (Ohta, T, *et al.*, 2002).

Masing-masing galur bakteri uji memiliki tipe mutasi yang berbeda tergantung jenis gen histidin yang dimutasi. *S. typhimurium* TA 1535 dan TA 100 mengalami substitusi pasangan basa pada gen *his* G46 yang mengkode pembentukan enzim pirofosforilase. *S. typhimurium* TA 1537 mengalami mutasi pergeseran kerangka pada gen *his* C3076. *S. typhimurium* TA 97 dan 98 juga mengalami mutasi pergeseran kerangka masing-masing pada gen *his* D6610 dan *his* D3052 yang mengkode pembentukan enzim histidinol dehidrogenase. *S. typhimurium* TA 102 mengalami mutasi substitusi pasangan basa pada gen *his* G428. *E. coli* WP2 mengalami mutasi substitusi pasangan basa pada gen *trp* E65. *S. typhimurium* TA 1535, TA 100, TA 102, dan *E. coli* WP2 sangat sensitif terhadap mutagen yang menyebabkan mutasi substitusi. Sementara, *S. typhimurium* TA 1537, TA 97, dan TA 98 sangat sensitif terhadap mutagen yang menyebabkan mutasi *frameshift* atau

pergeseran kerangka. Selain itu, *S. typhimurium* TA 102 juga sangat sensitif terhadap mutagen oksidatif (David E. Levin, *et al.*, 1982).

Untuk meningkatkan kemampuan dalam mendeteksi senyawa mutagen, semua galur bakteri *S. typhimurium* juga mempunyai mutasi lain selain mutasi histidin yaitu mutasi *rfa* dan mutasi *uvrB*. Mutasi *rfa* menyebabkan hilangnya sebagian lapisan liposakarida yang menyelimuti permukaan bakteri sehingga meningkatkan permeabilitas sel terhadap senyawa bermolekul besar seperti kristal violet. Mutasi *uvrB* merupakan hilangnya gen yang mengkode sistem perbaikan kerusakan DNA bakteri sehingga meningkatkan kepekaan untuk deteksi senyawa mutagen. Selain itu, Mutasi *uvrB* juga menyebabkan hilangnya gen *bio* sehingga bakteri butuh biotin untuk pertumbuhannya. Mutasi *uvrB* menunjukkan sensitivitas bakteri terhadap sinar ultraviolet. Akan tetapi, khusus *S. typhimurium* TA 102 tidak memiliki mutasi *uvrB*. Untuk galur bakteri *E. coli* WP2, bakteri ini tidak memiliki mutasi *rfa* dan hanya memiliki mutasi *uvrA* yang mirip dengan mutasi *uvrB* tetapi berbeda mekanisme mutasinya. semua galur bakteri *S. typhimurium* dan *E. coli* WP2 memiliki plasmid pKM 101 yang mengandung faktor resistensi terhadap ampisilin. *S. typhimurium* TA 102 juga memiliki plasmid pAQ1 yang mengandung faktor resisten terhadap tetrasiklin.



Gambar 9. Skema pembentukan histidin dalam bakteri *Salmonella typhimurium* (Watson, J.D., et al., 1987)

2.4.4. Sistem Aktivasi Metabolik (Ames, et al., 1975; Mortelmans dan Zeiger, 2000)

Beberapa senyawa kimia seperti kelompok amin aromatik dan hidrokarbon aromatik polisikiik bersifat aktif mutagen dalam bentuk metabolitnya setelah mengalami metabolisme di dalam tubuh. Pada hati manusia terdapat sistem oksidasi metabolit enzim sitokrom P450 yang memetabolisme senyawa mutagen inaktif menjadi bentuk elektrofilik dan reaktif DNA.

Pada uji Ames, bakteri uji yang digunakan tidak memiliki kemampuan metabolisme sehingga perlu ditambahkan sistem aktivasi metabolik untuk mendeteksi

senyawa mutagen yang aktif dalam bentuk metabolitnya. Sistem aktivasi metabolik berupa homogenat hati tikus yang dikenal dengan nama lain S-9. Homogenat hati ini diperoleh dari organ hati tikus jantan yang telah diinduksi terlebih dahulu dengan fenobarbital selama beberapa hari sebelum dibunuh. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan jumlah produksi enzim mikrosom yang dihasilkan hati tikus. Homogenat hati tikus juga ditambahkan Nikotin adenin dinukleotida fosfat (NADP) dan kofaktor untuk meningkatkan aktivitas enzim mikrosom hati yang terdapat pada homogenat.

Selain tikus, homogenat hati dapat diperoleh dari hewan seperti mencit, hamster, babi, atau monyet. Berdasarkan hasil penelitian, homogenat hati tikus memiliki kemampuan induksi mutagenesis paling baik terhadap senyawa mutagen dibandingkan homogenat hati mencit dan hamster pada uji Ames (Dunkel, V.C., *et al.*, 1984).

2.4.5. Interpretasi Hasil Uji (Maron dan Ames, 1983; Cariello dan Piegorsch, 1996)

Suatu zat uji dinyatakan positif sebagai mutagen dengan uji Ames apabila memenuhi syarat berikut :

1. Zat uji minimal memiliki dua tingkat dosis yang memberikan hitungan revertan lebih besar dari hitungan revertan spontan dan minimal satu dosis memberikan respon dua kali revertan spontan bakteri uji (*two-fold rule*). Respon tersebut naik dengan kenaikan dosis.
2. Zat uji memberikan respon positif (*two-fold rule*) dengan atau tanpa aktivasi metabolik pada galur bakteri uji yang digunakan.

Zat uji dinyatakan negatif sebagai mutagen dengan uji Ames apabila tidak memenuhi *two-fold rule* dan telah dilakukan hal-hal sebagai berikut :

1. Uji sudah dilakukan tanpa dan dengan aktivasi metabolik.
2. Uji telah dilakukan minimal dengan tiga galur bakteri uji standar dengan tipe mutasi yang berbeda.
3. Telah dilakukan uji kontrol positif dan negatif.

III. PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan lebih kurang 5 bulan dari bulan Januari 2011 sampai bulan Mei 2011 di Laboratorium Kimia Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang.

3.2. Metode Penelitian

1. Persiapan alat dan bahan.
2. Pengambilan sampel dan identifikasi.
3. Pembuatan ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali (*T. crispa* (L) Miers) dengan maserasi bertingkat.
4. Sterilisasi alat dan bahan.
5. Penyiapan media.
6. Pembuatan pelat master.
7. Pembuatan biakan semalam.
8. Konfirmasi sifat genotip galur bakteri uji.
9. Penyiapan larutan uji.
10. Pengujian mutagenisitas.
11. Analisis data.

3.3. Alat dan Bahan

3.3.1. Alat

Alat-alat digunakan untuk pengerjaan ekstraksi antara lain : Botol maserasi, mesin penggiling (Brook Crompton[®]), alat destilasi, rotary evaporator (BUCHI[®]), pipet tetes, erlenmeyer, timbangan analitik, corong, kapas.

Alat-alat yang digunakan untuk pengujian Mutagenisitas antara lain : tabung reaksi (Pyrex[®]), cawan petri (Petrio[®]), beaker glass, gelas ukur, Erlenmeyer (Pyrex[®]), batang pengaduk, pipet mikro (Tranferpette[®]), jarum ose, kertas perkamen, kertas saring, kertas cakram (Whatman[®]), lampu spiritus, timbangan analitik, pinset, penggaris, vial, inkubator (Galenkamp plus[®]), autoklaf (All American[®]), Laminar Air Flow cabinet (ESCO[®]), lemari pendingin, hot plate, vorteks (Fisons Whirlimixer[™]), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu[®]).

3.3.2. Bahan

Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers), Heksan, Diklorometana, Etanol, Asam asetat, amoniak, biakan galur standar mutan *S. typhimurium* TA 1535 dan homogenat hati tikus yang diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB), air suling, media Nutrient Broth No.2 (Oxoid), media Nutrient Agar (Merck[®]), Bacto Agar (Merck[®]), Asam sitrat (p.a), kalium hidrogen fosfat anhidrat (p.a), natrium ammonium fosfat (p.a), magnesium sulfat (p.a), L-histidin (p.a), D-biotin (p.a), ampisilin (p.a), kristal violet (p.a), Kalium Klorida (p.a), magnesium klorida (p.a), dinatrium hidrogen fosfat (p.a), natrium dihidrogen fosfat (p.a), dapar fosfat (p.a), glukosa-6-fosfat (p.a), 4-Nitrokuinolin-N-Oksida, dimetil sulfoksida (DMSO).

3.4. Prosedur Penelitian

3.4.1. Pengambilan dan Identifikasi Tumbuhan

Sampel berupa batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) yang diambil di area Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Andalas Padang dan dilakukan identifikasi di Herbarium Andalas (ANDA), Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, UNAND Padang.

3.4.2. Penyiapan ekstrak diklorometana dan etanol batang *T. crispa* (L) Miers.

Sampel yang diambil adalah batang yang tua. Batang dibersihkan, lalu dirajang tipis, ditimbang beratnya kemudian dikeringkan dalam rumah kaca. Sampel kering dihaluskan dengan gerinder, lalu ditimbang kembali beratnya dan dimasukkan ke dalam botol maserasi. Maserasi dilakukan secara bertingkat, yaitu sebagai berikut :

1. Maserasi dengan pelarut non polar

Sampel kering sebanyak 1,1 kg dimasukkan ke dalam botol maserasi, lalu ditambahkan heksan sampai terendam (2-3 L). Botol maserasi dibiarkan ditempat gelap selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kapas. Maserasi diulangi sampai 3 kali sehingga didapatkan maserat yang kekuningan. Pelarut diuapkan *in vacuo* sehingga didapatkan ekstrak heksan kental.

2. Maserasi dengan pelarut semi-polar

Ampas sisa maserasi heksan dimaserasi kembali menggunakan pelarut semi polar, yaitu diklorometana (2-3 L). Maserasi dilakukan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kapas. Maserasi diulangi sampai 3 kali sehingga didapatkan hasil maserasi yang

kekuningan. Pelarut diuapkan *in vacuo* sehingga didapatkan fraksi diklorometana kental.

3. Maserasi dengan pelarut polar

Ampas sisa maserasi diklorometana dimaserasi kembali menggunakan pelarut polar, yaitu etanol (2-3 L) . Maserasi dilakukan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Maserat dipisahkan dengan penyaringan menggunakan kapas. Maserasi diulangi sampai 3 kali sehingga didapatkan hasil maserasi yang kekuningan. Pelarut diuapkan *in vacuo* sehingga didapatkan fraksi etanol kental.

3.4.3. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan disterilkan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan, cawan petri dibungkus dengan kertas perkamen, untuk alat-alat gelas (tabung reaksi, gelas ukur, Erlenmeyer) ditutup mulutnya dengan kapas steril yang dibalut dengan kain kasa steril lalu dibungkus dengan kertas perkamen, kemudian disterilkan semuanya dalam autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 15 lbs selama 15 menit. Pinset, jarum ose, dan kaca objek disterilkan dengan cara flambir. Laminar air flow disterilkan dengan menyalakan lampu UV selama 5 menit. Lemari aseptis dibersihkan dari debu lalu disemprot dengan alkohol 70%, dibiarkan selama 15 menit.

3.4.4. Penyiapan Media

1. Media Vogel-Bonner

100 g asam sitrat ditambahkan ke dalam 670 mL air suling hangat kemudian larutan tersebut dibagi dua bagian. Pada bagian pertama ditambahkan 500 g

kalium hidrogen fosfat anhidrat dan pada bagian kedua ditambahkan 175 g natrium ammonium fosfat. Kedua bagian larutan dicampur kembali dan ditambahkan 10 g magnesium sulfat dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit.

2. Larutan Histidin-Biotin

30,9 mg D-biotin dan 24 mg L-histidin ditambahkan ke dalam 250 mL air suling, kemudian dipanaskan. Larutan yang terbentuk kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit. Larutan histidin-biotin steril disimpan pada suhu 4°C .

3. Larutan Ampisilina

0,8 g ampisilina ditambah dengan larutan NaOH 0,2 N sampai 100 mL. larutan kemudian disterilkan dengan penyaring membran dengan diameter $0,22\ \mu\text{m}$. Larutan yang telah steril disimpan pada suhu 4°C .

4. Larutan Kristal Violet

0,1 g Kristal violet ditambahkan air suling sampai 100 mL. larutan yang terbentuk kemudian disimpan pada suhu 4°C dan terlindung cahaya.

5. Top Agar

6 g agar dan 5 g NaCl dilarutkan dalam 1000 mL air suling. Campuran ini dipanaskan dan diaduk sampai terbentuk larutan yang jernih. Larutan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit. Untuk uji mutagenisitas, 500 mL medium top agar ditambahkan 50 mL larutan Histidin-Biotin 0,5 mM yang telah steril.

6. Pelat Agar Glukosa Minimal

15 g agar dilarutkan dalam 910 mL air suling. Campuran ini dipanaskan dan diaduk sampai terbentuk larutan yang jernih. Larutan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit. Media yang telah steril ditambahkan 50 mL larutan glukosa 40% b/v dan 20 mL larutan Vogel-Bonner yang masing-masing telah disterilkan dengan autoklaf secara terpisah. Kemudian media tersebut dituang secara aseptik ke dalam masing-masing cawan petri steril sebanyak 20 mL dan dibiarkan membeku.

7. Pelat Histidin-Biotin dan Pelat Ampisilina

15 g agar ditambahkan ke dalam 910 mL air suling. Campuran dipanaskan dan diaduk sampai terbentuk larutan jernih. Larutan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit. Media yang telah steril ditambahkan 20 mL larutan Vogel-Bonner, 50 mL larutan glukosa 40 % b/v, dan 10 mL larutan histidin (2 g dalam 400 mL air) yang telah disterilkan dengan autoklaf pada 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit secara terpisah. Setelah larutan agar dingin (45°C) ditambahkan 6 mL biotin 0,5 mM steril. Campuran dihomogenkan dan dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama dituang secara aseptik ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan membeku (pelat histidin-biotin). Bagian kedua ditambahkan 1,6 mL larutan ampisilina (8 mg/mL NaOH 0,02 N). Larutan kemudian dituang secara aseptik ke dalam masing-masing cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan membeku (pelat ampisilina).

8. Media Nutrien Agar

20 g serbuk Nutrient Agar ditambahkan air suling sampai 1000 mL. Campuran dipanaskan dan diaduk hingga terbentuk larutan jernih. Larutan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit.

9. Media Nutrien Broth no. 2

25 g serbuk Nutrient Broth Oxoid No. 2 ditambahkan 1000 mL air suling. Campuran dipanaskan dan diaduk hingga terbentuk larutan jernih. Larutan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit.

10. Dapar Fosfat

60 mL natrium dihidrogen fosfat 0,2 M (13,8 g dalam 500 mL air suling) ditambahkan 440 mL dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M (14,2 g dalam 500 mL air suling). Kemudian pH campuran diperiksa. Jika pH campuran rendah ditambahkan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M sampai pH 7. Larutan kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C , tekanan 2 atm selama 20 menit.

11. Campuran Homogenat Hati Tikus (S-9)

Untuk 50 mL larutan ini diperlukan 2 mL homogenate hati tikus , 1 mL larutan garam KCl-MgCl_2 (61,5 g KCl dan 40,7 MgCl_2 dalam 500 mL air suling), 0,25 mL larutan glukosa-6-fosfat 1 M (2,82 g glukosa-6-fosfat dalam 10 mL air suling), 2 mL larutan NADP 0,1 M, 25 mL dapar fosfat 0,2 M pH 7,4, dan air suling 19,75 mL. Semua larutan dicampur dan selama penggunaan dijaga pada suhu 4°C .

3.4.5. Pembuatan Pelat Master

Biakan galur standar bakteri *S. typhimurium* TA 1535 yang diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB) dalam bentuk biakan bakteri dalam cawan petri diinokulasikan menggunakan jarum ose dengan cara digoreskan pada pelat ampisilina secara aseptik. Kemudian pelat diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 48 jam. Setelah itu pelat disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4⁰C.

3.4.6. Pembuatan Biakan Semalam

Bakteri dari pelat master diinokulasi ke dalam medium Nutrient Broth no.2 dalam labu erlenmeyer. Kemudian diinkubasi dalam inkubator kocok pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Diukur transmitannya pada panjang gelombang 650 nm pada T 25%. Biakan semalam dibuat setiap kali pengujian.

3.4.7. Konfirmasi Sifat Genotip Galur Bakteri Uji

1. Uji butuh histidin

Pada pelat agar tanpa histidin dibuat goresan biakan semalam bakteri uji (kontrol) dan pada pelat histidin-biotin juga digoreskan biakan semalam bakteri uji. Pelat agar ini diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 18-24 jam. Kemudian diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

2. Uji mutasi rfa

2 mL top agar ditambahkan dengan 0,1 mL biakan-semalam bakteri uji dalam tabung reaksi. Kemudian dicampur homogen dan dituang pada pelat Nutrient Agar dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Kertas cakram steril diletakkan pada bagian tengah top agar. Kemudian larutan kristal violet ditetaskan sebanyak 0,01 mL pada bagian pusat cakram. Kemudian diinkubasi

pada suhu 37⁰ C selama 12 jam dan diamati diameter zona hambat disekeliling cakram.

3. Uji mutasi *uvrB*

Pada pelat nutrien agar digoreskan biakan-semalam bakteri uji secara paralel. Kemudian tutup cawan petri dibuka, setengah bagian ditutup dengan kertas karton. Bagian yang tidak ditutupi disinari dengan lampu UV pada jarak 33 cm selama 8 detik. Selanjutnya cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 12-24 jam. Kemudian diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni pada bagian yang disinari.

4. Uji faktor R

Biakan-semalam bakteri uji digoreskan pada pelat ampisilin dalam cawan petri. Kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 12-24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri.

5. Uji reversi spontan

Sebanyak 0,1 mL biakan-semalam bakteri uji ditambahkan pada 2 mL top agar yang telah ditambahkan larutan histidin biotin dalam tabung reaksi. Kemudian dituang pada pelat agar glukosa minimal dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 12-24 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

3.4.8. Penyiapan Larutan Uji

0.5 g ekstrak etanol yang telah digerus halus disuspensikan dengan NaCMC 0,5% yang telah dikembangkan terlebih dahulu, kemudian diencerkan dengan air suling hingga volume 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 50.000

ppm. Larutan induk dibuat pengenceran bertingkat sehingga diperoleh larutan uji dengan konsentrasi 50.000, 25.000, 12.500, 6250, dan 3125 ppm. Untuk ekstrak diklorometana, 0.5 g ekstrak yang telah digerus halus disuspensikan dengan menggunakan tween 80 2%, kemudian diencerkan dengan air suling hingga volume 10 mL. Larutan uji kemudian dibuat pengenceran bertingkat seperti larutan ekstrak etanol. Dari tiap pengenceran larutan uji, diambil 0,1 mL sebagai volume larutan uji untuk uji mutagenisitas sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak pada masing-masing cawan petri sebesar 5000, 2500, 1250, 625, dan 312,5 µg/plat. Pengerjaan dilakukan dengan teknik aseptis.

3.4.9. Pengujian Mutagenisitas

a. Uji mutagenisitas mutagen standar (kontrol Positif)

0,1 mL biakan-semalam bakteri uji dan 0,1 mL 4-nitrokuinolin-N-oksida dengan konsentrasi 5 ppm dalam dimetilsulfoksida (0,5 µg/plat) ditambahkan ke dalam 2 mL top agar yang telah ditambahkan larutan histidin biotin dalam tabung reaksi. Campuran ini kemudian dihomogenkan dengan pengocok selama 3 detik. Kemudian dituang pada pelat agar glukosa minimal dalam cawan petri. Setelah memadat, petri diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 48 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni revertan bakteri yang tumbuh. Hasil uji positif jika jumlah koloni revertan yang dihasilkan lebih dari dua kali jumlah koloni revertan spontan.

b. Uji mutagenisitas larutan uji

0,1 mL biakan-semalam bakteri uji dan 0,1 mL larutan uji ditambahkan ke dalam 2 mL top agar yang telah ditambahkan larutan histidin biotin dalam tabung reaksi. Campuran ini kemudian dihomogenkan dengan pengocok selama 3 detik. Kemudian dituang pada pelat agar glukosa minimal dalam cawan petri dengan waktu kurang dari 20 detik. Setelah memadat, petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni revertan bakteri yang tumbuh. Pada pengujian yang menggunakan homogenat hati tikus, pada campuran lapisan top agar ditambahkan 0,5 mL campuran homogenat hati tikus. Kemudian dituang pada pelat agar glukosa minimal. Setelah memadat, petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam. Hasil uji positif jika jumlah koloni revertan yang dihasilkan lebih dari dua kali jumlah koloni revertan spontan.

3.5. Analisa Data

Data yang diperoleh disajikan secara deskriptif dengan membandingkan jumlah koloni revertan hasil penambahan zat uji dengan jumlah koloni revertan spontan.

VI. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil

1. Ekstraksi 1,1 kg sampel kering batang *T. crista* dengan metoda maserasi bertingkat, didapatkan ekstrak kental heksan, diklorometana, dan etanol secara berturut-turut sebanyak 20 gram (1,8%), 76 gram (6,9%), dan 60 gram (5,45%) (Lampiran 2, Gambar 11).
2. Susut pengeringan ekstrak kental diklorometana dan etanol berturut-turut sebesar 4,76% dan 24,16% (Lampiran 3, Tabel II).
3. Kadar abu ekstrak kental diklorometana dan etanol berturut-turut sebesar sebesar 0,83% dan 1,3% (Lampiran 3, Tabel II).
4. Hasil uji konfirmasi genotip galur bakteri uji mutan *S. typhimurium* TA 1535 meliputi, uji butuh histidin, uji rfa, uji uvr B, uji faktor R, dan uji reversi spontan memenuhi syarat untuk digunakan (Lampiran 6, Tabel III).
5. Hasil uji mutagenisitas mutagen standar 4-nitrokuinolin-N-oksida 0,5 µg/plat memberikan pertumbuhan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 579 koloni *S. typhimurium* TA 1535. Sedangkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata sebanyak 195 koloni (Lampiran 6, Tabel IV).
6. Hasil uji mutagenisitas ekstrak diklorometana dengan konsentrasi 312,5, 625, 1250, 2500, dan 5000 µg/plat memberikan pertumbuhan koloni revertan rata-rata berturut-turut pada konsentrasi yang sama sebanyak 336, 424, 107, 590, dan 497 koloni *S. typhimurium* TA 1535. Sedangkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata sebanyak 195 koloni (Lampiran 7, Tabel V).

7. Hasil uji mutagenisitas ekstrak etanol tanpa penambahan homogenat hati tikus S-9 dengan konsentrasi 312,5, 625, 1250, 2500, dan 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ memberikan pertumbuhan koloni revertan rata-rata berturut-turut pada konsentrasi yang sama sebanyak 294, 320, 325, 369, dan 326 koloni *S. typhimurium* TA 1535. Sedangkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata sebanyak 195 koloni (Lampiran 7, Tabel VI).
8. Hasil uji mutagenisitas ekstrak etanol dengan penambahan homogenat hati tikus S-9 dengan konsentrasi 312,5, 625, 1250, 2500, dan 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ memberikan pertumbuhan koloni revertan rata-rata berturut-turut pada konsentrasi yang sama sebanyak 142, 225, 193, 281, dan 290 koloni *S. typhimurium* TA 1535. Sedangkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata sebanyak 177 koloni (Lampiran 7, Tabel VII).

4.2. Pembahasan

Sampel yang digunakan adalah batang tanaman brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) yang telah dikeringkan dan dihaluskan dan kemudian disaring dengan menggunakan kapas. Penyarian sampel dilakukan dengan menggunakan cara maserasi bertingkat berdasarkan kepolaran pelarut yang digunakan sehingga didapatkan ekstrak brotowali yang mengkombinasikan kemampuan senyawa aktif yang potensial antimalaria, yaitu senyawa diterpen dan protoberberin alkaloid. Penelitian ini dimulai dengan pengumpulan batang brotowali yang berumur lebih dari satu tahun, yang memiliki diameter batang 1 – 2 cm sebanyak 10 kg. Batang ini kemudian dibersihkan dan dirajang kasar dengan ukuran yang disamakan (4 – 5 cm), supaya merata dalam pengeringan. Dengan panas yang cukup didalam rumah kaca,

batang brotowali ini dapat kering selama 4 – 5 hari, ditandai dengan menyusutnya ukuran dan berat batang, tidak terasa lembab bila batang dipatahkan dan berwarna coklat tua. Pengeringan sampel ini bertujuan agar senyawa kimia yang terkandung didalamnya tidak mengalami kerusakan, baik oleh mikroorganisme, ataupun mengalami hidrolisis, juga untuk mencegah pembusukan (Lampiran 2, Gambar 2).

Selanjutnya batang yang telah kering dihaluskan menggunakan gerinder. Penghalusan ini bertujuan untuk memudahkan penetrasi pelarut dalam membran sel pada sampel sehingga lebih banyak senyawa yang tertarik bersama pelarut (pada proses ekstraksi) (Harborne, 1987). Setelah dihaluskan, sampel ini kemudian ditimbang. Tujuan penimbangan ini agar diketahui dengan pasti jumlah sampel kering yang digunakan, sehingga bila ingin dilakukan pengulangan untuk penelitian selanjutnya, ini bisa menjadi pedoman. Dari 10 kg sampel basah batang brotowali, didapatkan sampel kering halus sebanyak 1,1 kg (11%) (Lampiran 2, Gambar 2).

Ekstraksi sampel dilakukan menggunakan metoda maserasi. Sampel direndam menggunakan pelarut tertentu didalam botol maserasi selama 3 hari, dengan sesekali dilakukan pengocokan untuk mempercepat penetrasi pelarut kedalam sampel. Kemudian hasil maserasi dipisahkan dengan penyaring menggunakan kapas, dan maserasi diulangi sampai dengan 3 kali pengulangan. Dipilih metoda ini, karena pengerjaannya lebih mudah, tidak memerlukan perlakuan khusus dan tidak menggunakan panas sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan zat termolabil akibat suhu tinggi (Djamal, 1990) (Lampiran 2, Gambar 11).

Maserasi dilakukan berulang menggunakan berbagai pelarut berdasarkan peningkatan kepolaran. Maserasi pertama menggunakan pelarut non polar yaitu heksan, bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa lipofil seperti lemak, lilin dan

minyak atsiri. Maserasi dilanjutkan dengan pelarut semi polar yaitu diklorometana, bertujuan untuk melarutkan senyawa-senyawa semi polar seperti tinokrisposid (furanoditerpen glikosida) yang diketahui terkandung didalam sampel ini. Selanjutnya dimaserasi kembali dengan pelarut polar yaitu etanol bertujuan untuk menarik senyawa-senyawa alkaloid kuarternar (protoberberin alkaloid) (Lampiran 2, Gambar 11).

Hasil ekstraksi yang diperoleh, masing-masingnya diuapkan secara *in vacuo* dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental. Alat ini akan menguapkan pelarut karena adanya pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu dan dibantu dengan adanya vakum, dimana tekanan uap pelarut menjadi turun dan pelarut akan mendidih pada temperatur lebih rendah dari titik didihnya. Hal ini dapat mengurangi resiko kerusakan senyawa yang tidak stabil yang ada didalam sampel (Djamal, 1990; Gritter, Robbits, & Schwarting, 1991). Selanjutnya ekstrak etanol dan diklorometan batang brotowali dilakukan uji mutagenisitas sedangkan ekstrak heksan tidak dilakukan uji mutagenisitas karena ekstrak ini belum diketahui memiliki aktivitas farmakologis tertentu dan belum ditemukan senyawa yang bersifat aktif farmakologis yang terkandung dalam ekstrak ini. (lampiran 2, Gambar 11).

Uji karakterisasi ekstrak diklorometana dan etanol yang dilakukan meliputi susut pengeringan untuk melihat kadar air masing-masing ekstrak dan uji kadar abu untuk menentukan jumlah logam mineral yang ikut terekstrak. Susut pengeringan yang diperoleh untuk ekstrak diklorometana dan etanol berturut-turut adalah 4,76% dan 24,16% dan kadar abu yang diperoleh untuk ekstrak diklorometana dan etanol berturut-turut adalah 0,83% dan 1,3% (Lampiran 3, Tabel II).

Berdasarkan uji KLT yang telah dilakukan peneliti terdahulu dengan sampel ekstrak yang sama, ekstrak diklorometana dan etanol mengandung senyawa terpen yang ditandai warna ungu kemerahan dengan penampak noda vanilin asam sulfat. Ekstrak etanol juga mengandung alkaloid yang ditandai warna orange dengan penampak noda Dragendorf (Lampiran 4, Gambar 12 dan 13).

Uji mutagenisitas yang dilakukan merupakan uji Ames dengan menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535. Uji Ames ini dapat dilakukan dalam waktu yang lebih singkat dengan sampel uji yang banyak dan biaya yang relatif lebih murah dibandingkan uji dengan menggunakan hewan percobaan. Akan tetapi, pada dasarnya uji Ames hanya menentukan senyawa yang bersifat mutagen sehingga tidak selalu senyawa yang menunjukkan sifat mutagen pada uji Ames juga menunjukkan sifat karsinogen setelah dilakukan uji dengan hewan percobaan.

Suatu zat dikatakan mutagen dengan uji Ames jika telah dilakukan uji dengan menggunakan minimal tiga galur bakteri uji dengan tipe mutasi yang berbeda dan minimal satu galur uji memberikan hasil positif (Maron dan Ames, 1983). Akan tetapi, pada penelitian kali ini hanya diperoleh satu galur bakteri uji yaitu *S. typhimurium* TA 1535 dengan tipe mutasi substitusi pasangan basa. Oleh karena itu, hasil uji yang didapatkan pada penelitian ini hanya untuk satu galur bakteri uji dan belum dapat dijadikan hasil akhir terutama untuk zat uji yang memberikan hasil negatif.

Batas dosis uji maksimal untuk zat yang tidak bersifat sitotoksik pada uji Ames adalah 5000 µg/plat tergantung kelarutan zat uji. Jumlah minimum dosis uji untuk pengujian mutagenisitas terdiri dari lima dosis uji yang merupakan interval log

setengah. Air suling merupakan pelarut paling baik yang digunakan untuk melarutkan zat uji karena tidak toksik dan efek mutagenik yang berasal dari pelarut tidak ada (Mortelmans dan Zeiger, 2000).

Ekstrak etanol yang bersifat polar dilarutkan dalam air suling dengan penambahan pensuspensi NaCMC 0,5% untuk meningkatkan kelarutan ekstrak tersebut. Sedangkan ekstrak diklorometana yang bersifat semi polar sukar larut dalam air suling sehingga digunakan pensuspensi tween 80 dengan konsentrasi 2%. Tween 80 akan menurunkan tegangan permukaan sehingga ekstrak diklorometana lebih mudah larut dalam air suling. Ekstrak diklorometana dan etanol dibuat larutan induk dengan konsentrasi awal 50.000 ppm. Kemudian larutan induk diencerkan secara bertingkat dengan interval log setengah sehingga diperoleh larutan uji untuk pengujian mutagenisitas dengan konsentrasi 50.000, 25.000, 12.500, 6250, dan 3125 ppm. Kemudian 0,1 mL diambil dari tiap konsentrasi larutan uji untuk pengujian mutagenisitas (Lampiran 5, Gambar 14).

Bakteri *S. typhimurium* TA 1535 yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Institut Teknologi Bandung (ITB). Secara mikroskopis, *S. typhimurium* berbentuk batang lurus, gram negatif, tidak berspora, bergerak dengan flagel peritrik, berukuran 2-4 μm x 0.5-0,8 μm . Uji biokimia terhadap bakteri ini meliputi uji fermentasi karbohidrat, uji aktivitas proteolitik, dan uji hidrogen sulfida (Siegrist, 2009). Akan tetapi, uji mikroskopis dan uji biokimia terhadap bakteri ini tidak dapat dilakukan pada penelitian kali ini karena keterbatasan alat dan bahan. Oleh karena itu, identifikasi bakteri *S. typhimurium* yang digunakan pada penelitian hanya dilihat secara makroskopis dari koloni bakteri yang terbentuk. Secara

makroskopis, koloni bakteri *S. typhimurium* berbentuk bulat, agak cembung, dan berwarna putih susu (Siegrist, 2009).

Bakteri uji yang digunakan untuk penentuan mutagen menurut uji Ames telah dimutasi terlebih dahulu sehingga tidak mampu mensintesis asam amino esensial histidin dan harus mempunyai sifat genotip yang telah disyaratkan. Konfirmasi sifat genotip ini harus dilakukan segera pada waktu menerima biakan, apabila revertan spontan terletak di luar rentang normal, atau kehilangan sensitivitas terhadap mutagen standar. Konfirmasi sifat genotip dilakukan terhadap galur bakteri uji yang digunakan meliputi uji butuh histidin, mutasi *rfa*, mutasi *uvrB*, faktor R, dan uji reversi spontan. (Maron dan Ames, 1983).

Uji butuh histidin dilakukan untuk melihat kemampuan bakteri untuk tumbuh pada media perbenihan yang mengandung histidin dan tidak mengandung histidin. Menurut Ames, bakteri uji memberikan hasil uji butuh histidin positif jika bakteri tersebut tumbuh pada media perbenihan yang mengandung histidin tetapi tidak tumbuh pada media perbenihan tanpa histidin (Maron dan Ames, 1983). Uji butuh histidin *S. typhimurium* TA 1535 menunjukkan bakteri tumbuh pada pelat agar yang mengandung histidin-biotin sedangkan pada pelat agar tanpa histidin-biotin, bakteri tidak tumbuh sehingga memenuhi syarat Ames (Lampiran 6, Tabel III, Gambar 15).

Mutasi *rfa* menyebabkan hilangnya sebagian lapisan lipopolisakarida yang menyelimuti permukaan bakteri sehingga meningkatkan permeabilitas sel terhadap molekul besar seperti kristal violet (Maron dan Ames, 1983). Uji Mutasi *rfa* *Salmonella typhimurium* TA 1535 menunjukkan bakteri sensitif terhadap kristal violet dimana terdapat daerah hambat disekitar cakram yang telah ditetesi kristal

violet dengan diameter hambatan 14,5 mm. Diameter hambatan ini tidak jauh berbeda dengan persyaratan Ames yaitu 14 mm (Lampiran 6, Tabel III, Gambar 16).

Mutasi *uvrB* menyebabkan bakteri kehilangan gen yang mengkode sistem perbaikan kerusakan DNA sehingga meningkatkan kepekaan untuk deteksi senyawa mutagen. Selain itu, mutasi ini menyebabkan hilangnya gen *bio* sehingga bakteri membutuhkan biotin untuk pertumbuhannya. Mutasi *uvrB* juga membuat bakteri lebih sensitif terhadap sinar UV sehingga bakteri tidak akan tumbuh pada media perbenihan jika disinari lampu UV dalam waktu singkat (Maron dan Ames, 1983). Mutasi *uvrB* *S. typhimurium* TA 1535 juga menunjukkan bakteri sensitif terhadap sinar UV dimana pada bagian petri yang disinari lampu UV tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri sedangkan pada bagian petri yang tidak disinari terdapat pertumbuhan koloni bakteri (Lampiran 6, Tabel III, Gambar 17).

Uji faktor R menunjukkan resistensi bakteri terhadap ampisilin karena memiliki gen resisten ampisilin. Menurut Ames, galur bakteri untuk uji mutagenisitas harus dapat tumbuh pada media perbenihan yang telah ditambahkan ampisilin (Maron dan Ames, 1983). Uji faktor R *S. typhimurium* TA 1535 menunjukkan bakteri dapat tumbuh pada media pelat ampisilin sehingga menunjukkan bakteri masih memiliki gen resisten ampisilin (Lampiran 6, Tabel III, Gambar 18)

Uji reversi spontan menunjukkan bakteri uji dalam bentuk mutan yang tergantung histidin dapat mengalami mutasi balik secara spontan menjadi bentuk liar yang tidak tergantung histidin tanpa adanya zat mutagen. Uji reversi spontan dilakukan untuk melihat jumlah koloni revertan bakteri yang dapat tumbuh pada media perbenihan yang kekurangan histidin tanpa adanya penambahan zat mutagen (Maron dan Ames, 1983). Pada uji reversi spontan *S. typhimurium* TA 1535, jumlah

koloni revertan spontan rata-rata yang diperoleh sebanyak 195 koloni dan pada penambahan campuran homogenat hati tikus (S-9) diperoleh jumlah koloni revertan spontan rata-rata sebanyak 177 koloni. Jumlah koloni revertan spontan bakteri *S. typhimurium* TA 1535 yang didapat masih berada pada rentang jumlah koloni revertan spontan standar untuk *S. typhimurium* TA 1535 yang disyaratkan Ames yaitu 120-200 koloni (Lampiran 6, Tabel III, Gambar 19 dan 20).

Disamping konfirmasi sifat genotip perlu dilakukan uji mutagen standar (kontrol positif). Pada penelitian ini digunakan 4-nitrokuinolin-N-oksida (NQNO) sebagai mutagen standar. Uji mutagen standar dapat memastikan kepekaan galur bakteri uji untuk mengalami mutasi balik jika kontak dengan senyawa mutagen. Konsentrasi standar 4-nitrokuinolin-N-oksida yang digunakan sebagai kontrol positif adalah 0,5 µg/plat (Mortelmans dan Zeiger, 2000). Uji mutagen standar 4-nitrokuinolin-N-oksida terhadap *S. typhimurium* TA 1535 memberikan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 579 koloni sedangkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata yang diperoleh sebanyak 195 koloni. Uji mutagen standar memberikan hasil positif karena jumlah koloni revertan rata-rata hasil penambahan 4-nitrokuinolin-N-oksida lebih dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata (Lampiran 6, Tabel IV, Gambar 21). Hasil tersebut menegaskan bahwa galur bakteri *S. typhimurium* TA 1535 peka terhadap senyawa mutagen.

Pada penelitian uji mutagenisitas, penambahan homogenat hati tikus hanya dilakukan pada senyawa yang tidak aktif secara langsung sebagai mutagen yang memberikan hasil negatif pada pengujian. Penambahan homogenat hati tikus menyebabkan aktivasi oleh enzim hati pada senyawa tersebut sehingga kemungkinan memberikan hasil positif setelah penambahan homogenat hati tikus. Akan tetapi pada

senyawa yang bersifat aktif sebagai mutagen secara langsung dan memberikan hasil positif tanpa adanya penambahan homogenat hati tikus tidak perlu dilakukan uji dengan penambahan homogenat hati tikus.

Pengujian mutagenisitas ekstrak diklorometana tanpa penambahan homogenat hati tikus memberikan hasil positif dengan *S. typhimurium* TA 1535 sehingga tidak perlu dilakukan uji mutagenisitas dengan penambahan homogenat hati tikus. Hasil uji memberikan respon positif jika ada dua tingkat dosis yang memberikan hitungan revertan lebih besar dari hitungan revertan spontan dimana respon tersebut naik dengan kenaikan dosis dan sekurang-kurangnya ada satu dosis yang memberikan respon dua kali revertan spontan (Ames *et al*, 1975). Jumlah koloni revertan spontan rata-rata pada uji ini sebanyak 195 koloni. Pada konsentrasi 625 µg/plat telah memberikan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 424 koloni yang lebih besar dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Jumlah koloni revertan rata-rata paling besar terdapat pada konsentrasi 2500 µg/plat, yaitu sebanyak 590 koloni. Pada konsentrasi 1250 µg/plat memberikan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 107 koloni yang jauh lebih kecil dibandingkan konsentrasi sebelumnya 625 µg/plat, bahkan lebih kecil dibandingkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1250 µg/plat terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri *S. typhimurium* TA 1535. Pada konsentrasi 5000 µg/plat memberikan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 497 koloni yang lebih kecil dibandingkan konsentrasi sebelumnya 2500 µg/plat tetapi masih lebih besar dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Hal ini menunjukkan bahwa lapisan top agar sudah mulai jenuh dengan ekstrak diklorometana pada konsentrasi 5000 µg/plat

sehingga pertumbuhan koloni revertan semakin tidak terlihat (Lampiran 7, Tabel V, Gambar 22).

Pada pengujian mutagenisitas ekstrak etanol tanpa penambahan homogenat hati tikus memberikan hasil negatif dengan *S. typhimurium* TA 1535. Jumlah koloni revertan spontan rata-rata pada uji ini sebanyak 195 koloni. Semua rentang konsentrasi uji menunjukkan jumlah koloni revertan rata-rata lebih besar dibandingkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata tetapi tidak satupun dari tiap konsentrasi uji yang memberikan jumlah koloni revertan rata-rata lebih dari dua kali jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Jumlah koloni revertan rata-rata terbesar terdapat pada konsentrasi uji 2500 µg/plat, yaitu sebanyak 326 koloni. Pada rentang konsentrasi 312,5-2500 µg/plat menunjukkan peningkatan jumlah koloni revertan rata-rata tetapi pada konsentrasi 5000 µg/plat terjadi penurunan jumlah koloni revertan rata-rata bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa lapisan top agar sudah mulai jenuh dengan ekstrak etanol pada konsentrasi 5000 µg/plat (Lampiran 7, Tabel VI, Gambar 23).

Pengujian mutagenisitas ekstrak etanol dengan penambahan homogenat hati tikus perlu dilakukan untuk melihat adanya pengaruh dari aktivasi enzim hati terhadap jumlah koloni revertan yang dihasilkan. Pada pengujian mutagenisitas ekstrak etanol dengan penambahan homogenat hati tikus juga menunjukkan hasil negatif dengan *S. typhimurium* TA 1535. Jumlah koloni revertan spontan rata-rata dengan penambahan homogenat hati tikus sebanyak 177 koloni. Semua rentang konsentrasi uji menunjukkan jumlah koloni revertan rata-rata lebih besar dibandingkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata kecuali pada konsentrasi terendah 312,5 µg/plat dimana jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 142 koloni

lebih kecil dibandingkan jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Akan tetapi semua rentang konsentrasi uji tidak ada yang memberikan jumlah koloni revertan lebih besar dari dua kali jumlah koloni revertan spontan. Jumlah koloni revertan rata-rata paling besar terdapat pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$, yaitu sebanyak 290 koloni. Pada konsentrasi uji 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$ memberikan jumlah koloni revertan rata-rata sebanyak 193 koloni yang lebih kecil dibandingkan konsentrasi sebelumnya 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$ tetapi masih sedikit lebih besar dari jumlah koloni revertan spontan rata-rata. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi ekstrak etanol 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$ terjadi penurunan kemampuan untuk memutasi balik *S. typhimurium* TA 1535 menjadi bentuk liar kembali. Pada dosis 2500 dan 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ kembali menunjukkan peningkatan jumlah koloni revertan rata-rata (Lampiran 7, Tabel VII, Gambar 24).

Jika diamati selisih jumlah koloni revertan rata-rata hasil penambahan ekstrak etanol dengan jumlah koloni revertan spontan rata-rata, maka selisih jumlah koloni revertan rata-rata ekstrak etanol tanpa penambahan homogenat hati tikus lebih besar dibandingkan selisih jumlah koloni revertan rata-rata ekstrak etanol dengan penambahan homogenat hati tikus pada rentang konsentrasi uji. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan homogenat hati tikus pada uji mutagenisitas ekstrak etanol tidak berpengaruh terhadap peningkatan jumlah koloni revertan ekstrak etanol sebelum ditambahkan homogenat hati tikus (Lampiran 7, Gambar 25).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Uji mutagenisitas ekstrak diklorometana batang brotowali memberikan hasil positif pada konsentrasi uji 625, 2500, dan 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$. Jadi, ekstrak diklorometana batang brotowali bersifat mutagen terhadap bakteri *S. typhimurium* TA 1535.
2. Uji mutagenisitas ekstrak etanol batang brotowali sebelum dan setelah penambahan homogenat hati tikus memberikan hasil negatif pada semua konsentrasi uji. Jadi, ekstrak etanol batang brotowali sebelum dan setelah penambahan homogenat hati tikus tidak bersifat mutagen terhadap bakteri *S. typhimurium* TA 1535

5.2. Saran

Disarankan kepada peneliti selanjutnya untuk melakukan uji mutagenisitas ekstrak diklorometana dan etanol batang brotowali (*Tinospora crista* (L) Miers) dengan menggunakan galur bakteri uji standar lainnya seperti *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, dan *E. coli* WP2.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, A.Z. 1988. *Pemeriksaan dan Isolasi Kandungan Kimia Tumbuhan Brotowali, dalam Tetumbuhan sebagai Bahan Obat*. Padang: Universitas Andalas.
- Adnan, A.Z. dan Pachaly, P. 1992. Tinocrisposid ein neus Furanoditerpenglykosid aus *Tinospora crispa* Miers. *Arch. Phar. (weinheim)*, 352.
- Afifah, E. 2003. *Tanaman Obat untuk Mengobati Hepatitis*. Jakarta: Agromedia pustaka.
- Ames, B.N., J.Mc Can and Yamasaki, E. 1975. Methods for Detection Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 31.
- Ames, B.N., and McCann, J. 1975. Detection of Carcinogens as Mutagens in The Salmonella/Microsome Test : Assay of 300 chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 72. 7445-7449.
- Anonim. 1991. *Prosedur Operasional Baku Uji Toksisitas*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Basri. 2009. *Formulasi tablet salut film ekstrak etanolik batang Brotowali (Tinospora crispa (L. miers) dengan bahan penyalut hidrokispropil metilselulosa dan polietilen glikol 400*. (Skripsi). Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Brown, T.A. 1989. *Genetic a Molecular Approach*. Van Nostrand Reinhold Co., Ltd. London. 171-189.
- Cariello, N.F. and W.W. Piegorsch. 1996. The Ames test: the two-fold rule revisited, *Mutat. Res.* 369. 23-31.
- Coulondre and Miller. 1977. *Journal of Molecular Biology* 117. 577.
- David, E. Levin *et al.* 1982. A New Salmonella Tester Strain (TA 102) with A-T Base Pairs at The Site of mutation Detects Oxidative Mutagens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Vol. 72. 5135-5139.
- Depkes RI. 1978. *Materia Medika Indonesia*. Jilid 2. Jakarta.
- Depkes RI. 1988. *Penelitian Tananman obat di Beberapa Perguruan Tinggi di Indonesia I-II*. Jakarta.

Depkes RI. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.* (Edisi 1). Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.

Djamal, R.. (1990). *Prinsip-Prinsip Dasar Bekerja dalam Kimia Bahan Alam.* FMIPA: Universitas Andalas.

Dunkel, V.C., *et al.* 1984. Reproducibility of Microbial Mutagenicity Assay: 1. Test with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* Using a Standardized Protocol, *Environ. Mutagen.* 6. 1-254.

Elnovara, M. 1996. *Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Tinokrisposid terhadap Plasmodium Falciparum secara in vitro.* (skripsi S1). Padang: Universitas Andalas.

Farabaugh, *et al.* 1978. *Journal of Molecular Biology* 126. 847.

Gardner and Snustad. 1984. *Principles of Genetics, 5th ed.* John Wiley & Sons. New York.

Gritter, R. J., Bobbitts, J. M., Schwarting, A. E. (1991). *Pengantar Kromatografi.* (Edisi 2). Penerjemah: K. Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB.

Harborne, J.B. 1897. *Metode Fitokimia.* (Edisi III). Penerjemah: K. Patmowinata dan I. Soediro. Bandung: ITB.

Kasmita, D. (2006). *Uji efek antiinflamasi ekstrak batang Brotowali (Tinospora crispa (L.) Miers) secara topikal dan pengaruhnya terhadap jumlah sel leukosit.* (Skripsi S1). Padang: Universitas Andalas.

Katzung, B.G. 1992. *Basic and Clinical Pharmacology, 5th Edition.* Prentice Hall International Inc. London.

Kimball, J.W. 1974. *Biology, 5th Edition.* Addison Wesley Publishing Company. New York.

Kresnadi, B. 2003. *Khasiat dan Manfaat Brotowali si Pahit yang Menyembuhkan.* Jakarta: Agromedia pustaka.

Lu, F.C. 1995. *Toksikologi Dasar : Asas, Organ Sasaran dan Penilaian Resiko.* Ed. 2. Jakarta : Universitas Indonesia Press.

Maron, D.M. and Ames, B.N. 1983. Revised Methods for The Salmonella Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 113.

Mawaddah, I. 2010. *Uji Aktivitas Antimalaria Beberapa fraksi ekstrak batang Brotowali (Tinospora crispa (L.) Miers) terhadap Plasmodium falciparum (in vitro)*. (Skripsi S1). Padang: Universitas Andalas.

Mortelmans, K and Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutation Research* 455, 29-60.

Ohta, T, *et al.*, 2002. Characterization of Trp⁺ Reversions *Escherichia coli* Strain WP2uvrA. *Mutagenesis*. Vol. 17. 313-316.

Paolella, Peter. 1998. *Introduction to Molecular Biology*. McGraw-Hill International Book Co. Tokyo.

Pelczar, M.J. and Chan, E.C.S. 1981. *Element of Microbiology*. McGraw-Hill International Book Co. Tokyo.

Rustini, Sudana A., dan Kosasih S. 2002. Kajian Mutagenesis Ifosfamida dan Klorambusil. *J.Sains & Tehnol Far.* 7(1): 88-94.

Siegrist, J. 2009. Differentiation and Identification Media for Salmonella, *Microbiology Focus*. vol. 1.3.

Snyder, L. and Champness, W. 2003. *Molecular Genetics of Bacteria, 2nd edition*. ASM Press. Washington DC.

Watson, J.D., *et al.* 1987. *Molecular Biology of The Gen, 4th ed.* The Benjamin/Cimming Publishing, Co., Inc. California. 220-283.

Winek, C.L. 1977. *Toxicology Annual, Vol II*. Marcel Dekker Ind. New York.

Lampiran 1. Tumbuhan Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers)



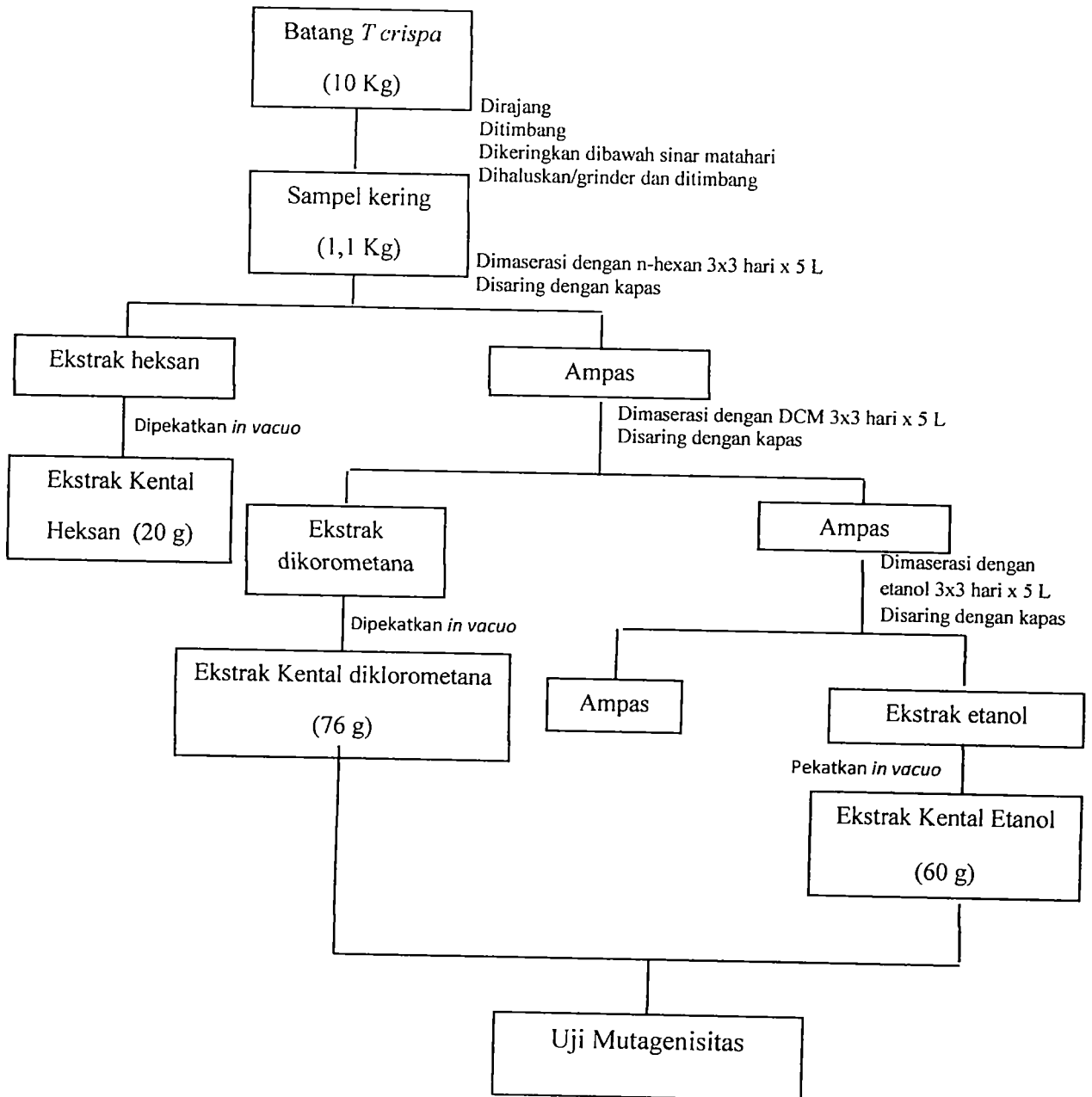
A



B

Gambar 10. Tumbuhan Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) (A. *T. crispa* di area Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Unand; B. Batang dan daun *T. crispa*)

Lampiran 2. Skema Maserasi Bertingkat Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers)



Gambar 11. Skema Kerja Maserasi Bertingkat Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers)

Lampiran 3. Perhitungan Rendemen, Susut Pengerinan, dan Kadar Abu

- Rendemen = $\frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel segar}} \times 100 \%$
- Susut Pengerinan = $\frac{(b-a) - (c-a)}{(b-a)} \times 100 \%$
- Kadar abu = $\frac{(c-a)}{(b-a)} \times 100 \%$

Keterangan:

a = Berat krus kosong

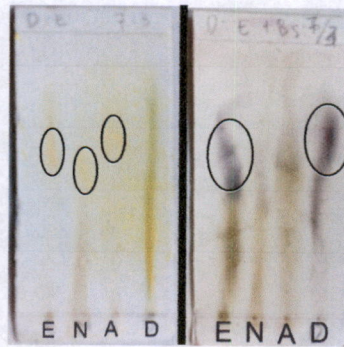
b = Berat krus + sampel sebelum pemanasan

c = Berat krus + sampel setelah pemanasan

Tabel II. Persentase Rendemen, susut pengerinan, dan kadar abu ekstrak diklorometana dan etanol batang *T. crista*

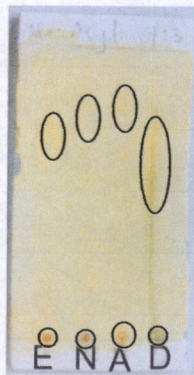
	DCM	Etanol
Rendemen (%)	6,9%	5,45 %
Susut pengerinan (%)	4,76%	24,16%
Kadar abu (%)	0,83%	1,3%

Lampiran 4. Gambar profil KLT Berbagai Ekstrak Batang *Tinospora crispa*



(a) (b)

Gambar 12. Profil KLT Fasa Normal Eluen DCM : Etanol 7:3 dengan penampak noda (a) dragendorf dan (b) vanilin asam sulfat (Fasa diam silika gel GF 254)



Gambar 13. Profil KLT Fasa Terbalik Eluen Metanol : Asetonitril 7:3 (Fasa diam silika gel RP 8)

Keterangan:

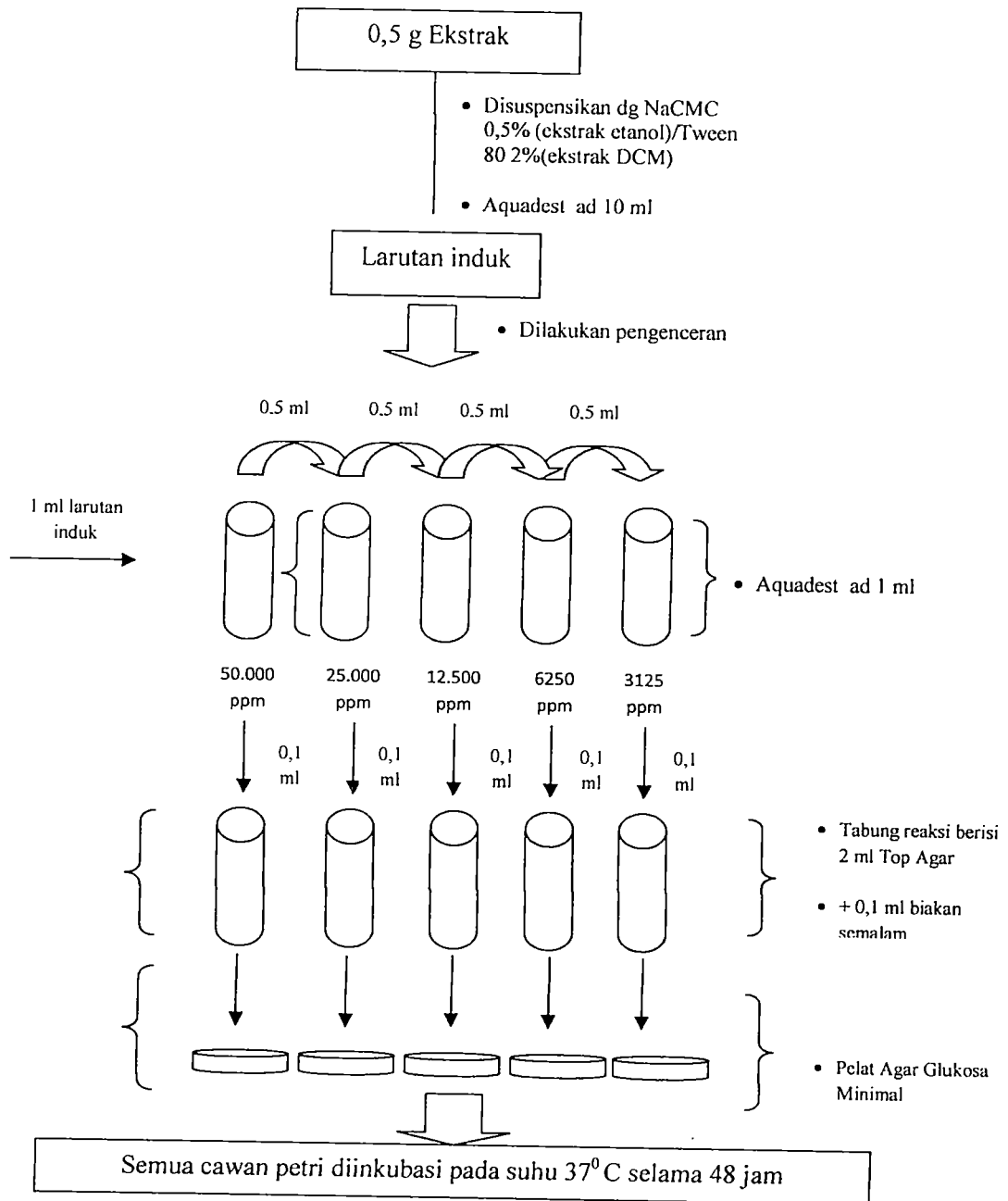
E = Ekstrak etanol

N = Ekstrak etanol asam yang dinetralkan

A = Ekstrak etanol asam

D = Ekstrak DCM

Lampiran 5. Skema Kerja Uji Mutagenisitas



Gambar 14. Skema Uji Mutagenisitas Ekstrak Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers)

Lampiran 6. Data Hasil Konfirmasi Sifat Genotip Bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535 dan Uji Kontrol Positif

Tabel III. Hasil Konfirmasi Sifat Genotip Galur Bakteri Uji *Salmonella typhimurium* TA 1535

No	Sifat Genotip	Hasil Uji	Ames	Kesimpulan
1	Uji butuh histidin	Tumbuh	Tumbuh	Memenuhi syarat
2	Mutasi rfa	Ada zona hambat 14,5 mm	Ada zona hambat 14 mm	Memenuhi syarat
3	Mutasi uvrB - Bagian yang disinari - Bagian yang tidak disinari	Tidak tumbuh Tumbuh	Tidak tumbuh Tumbuh	Memenuhi syarat
4	Faktor R	Tumbuh	Tumbuh	Memenuhi syarat
5	Revertan spontan	195 koloni	120-200 koloni	Memenuhi syarat
6	Revertan spontan + S-9	177 koloni	120-200 koloni	Memenuhi syarat

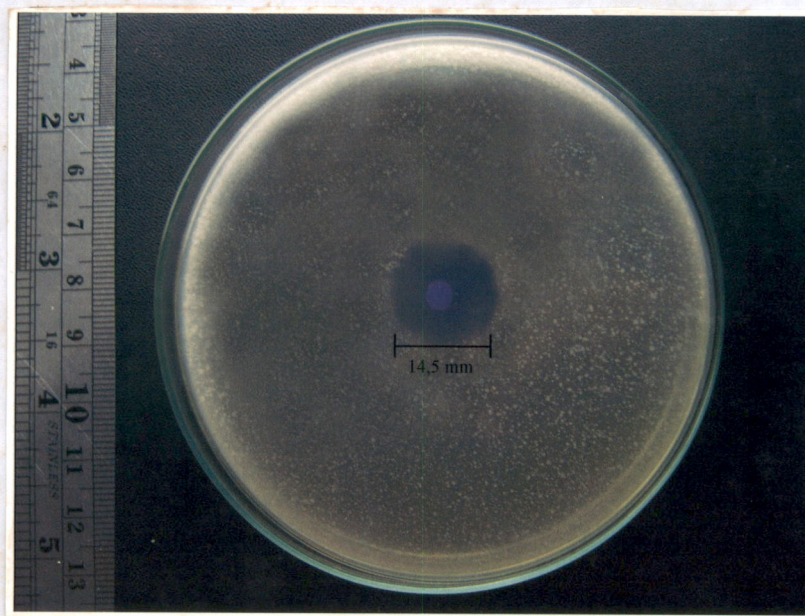
Lampiran 6. (lanjutan)



Gambar 15. Foto Uji Butuh Histidin *Salmonella typhimurium* TA 1535

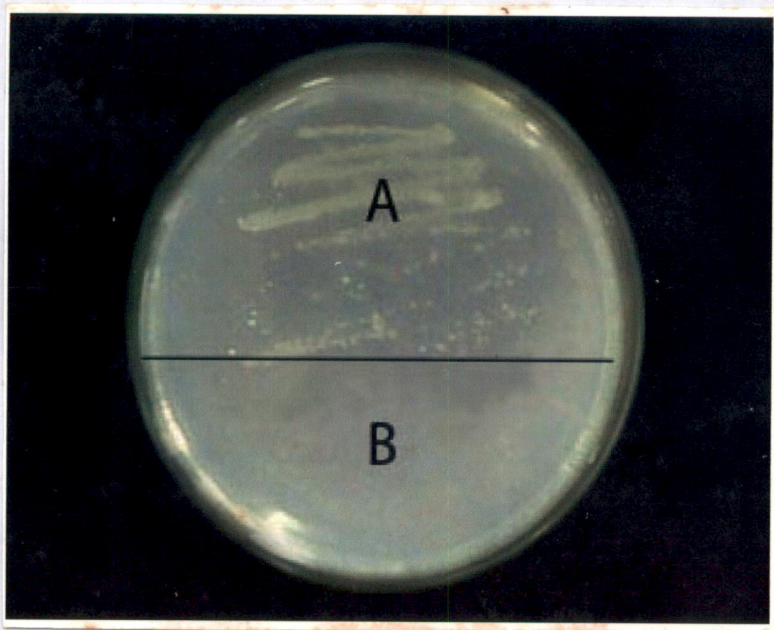
Keterangan : A = Hasil pengujian uji butuh histidin

B = Kontrol negatif



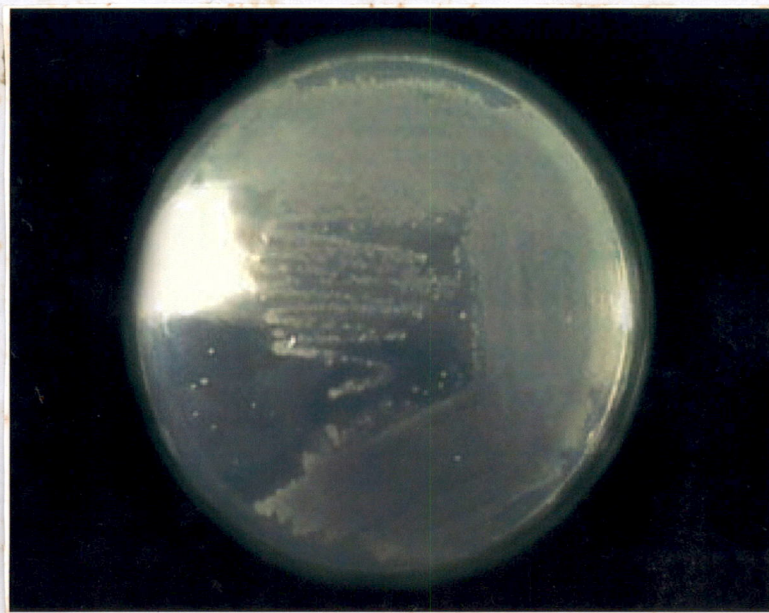
Gambar 16. Foto Uji *rfa* *Salmonella typhimurium* TA 1535 (diameter hambatan 14,5 mm)

Lampiran 6. (lanjutan)



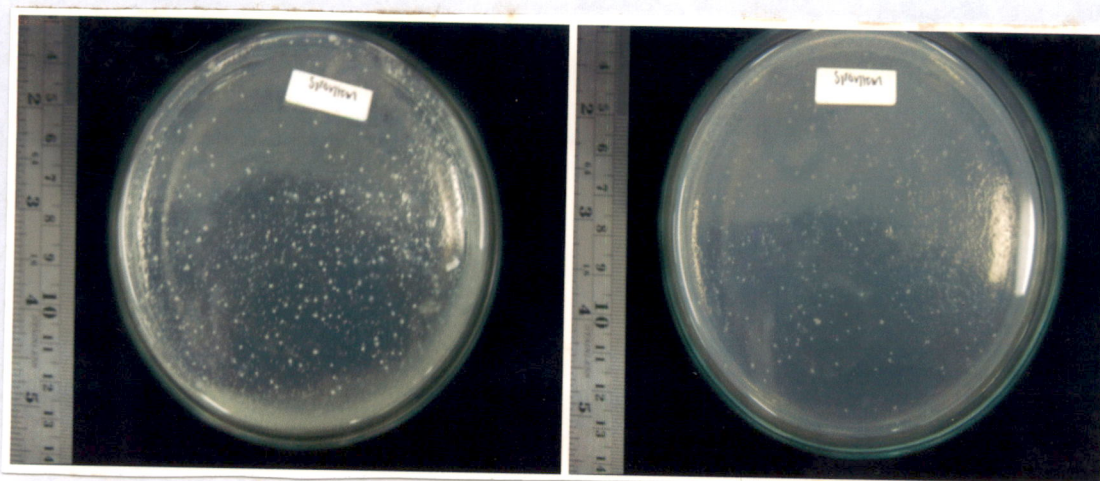
Gambar 17. Foto uji uvrB *Salmonella typhimurium* TA 1535

Keterangan : A = Bagian yang tidak disinari sinar uv
B = Bagian yang disinari sinar uv



Gambar 18. Foto Uji Faktor R

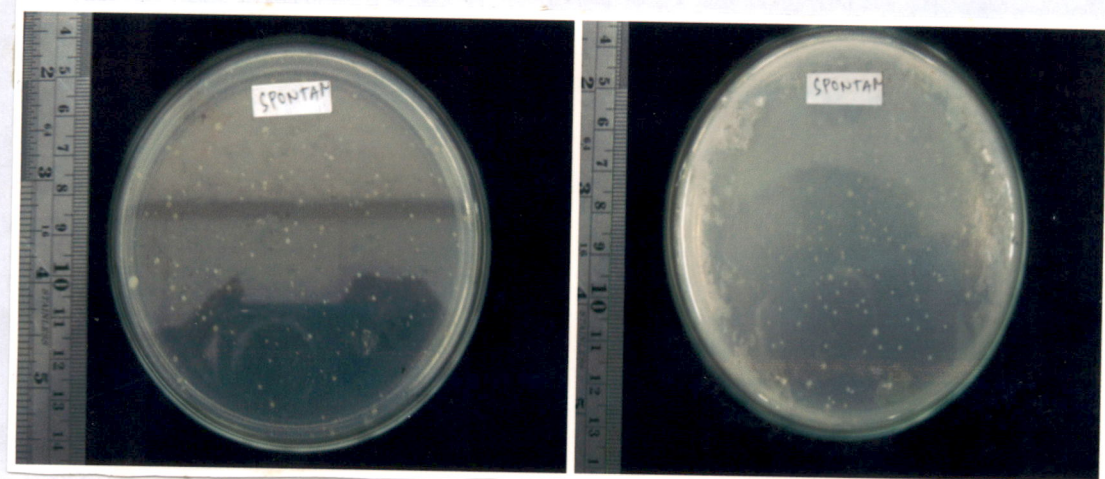
Lampiran 6. (lanjutan)



A

B

Gambar 19. Foto Revertan Spontan (A = 202, B = 189)



A

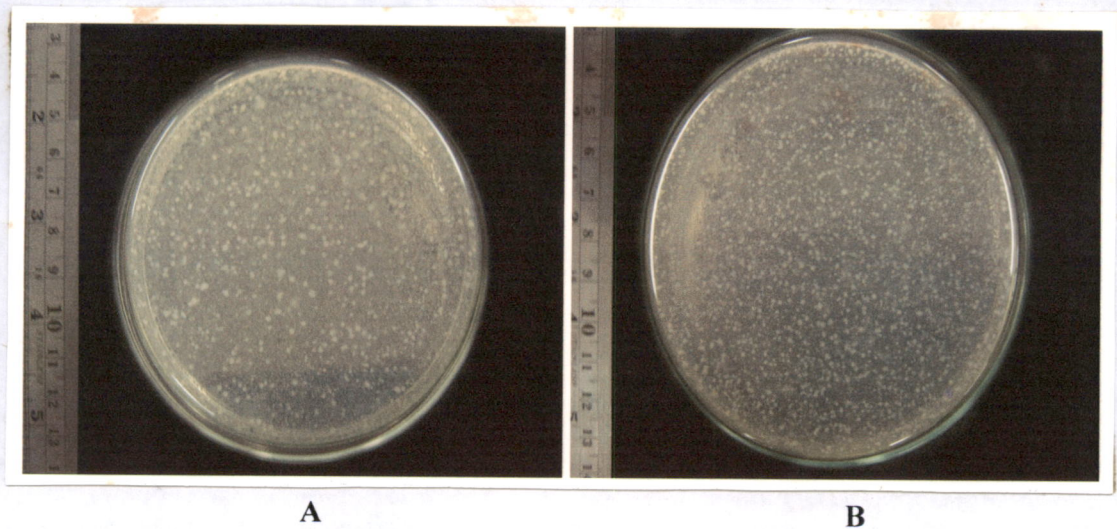
B

Gambar 20. Foto Revertan Spontan + S-9 (A = 167, B = 188)

Lampiran 6. (lanjutan)

Tabel IV. Hasil Uji Kontrol Positif atau Mutagen Standar 4-Nitrokuinolin-N-Oksida (NQNO)

Konsentrasi NQNO	Jumlah koloni revertan per cawan		Rata-rata	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi revertan spontan
	1	2		
0,5 µg/plat (5 ppm)	596	562	579	384
Revertan spontan	189	202	195	



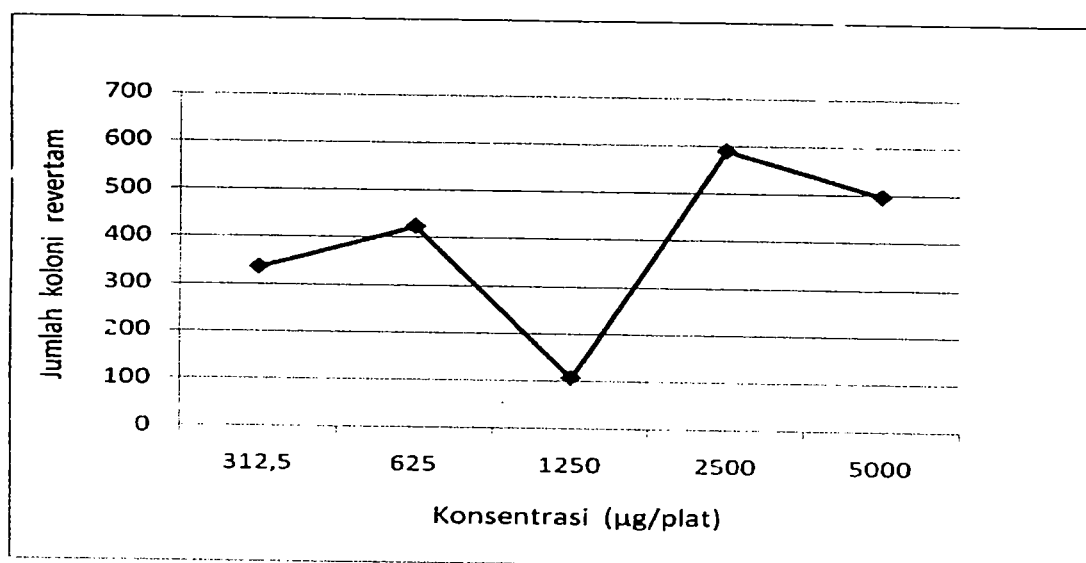
Gambar 21. Uji Mutagenisitas 4-Nitrokuinolin-N-Oksid 0,5 µg/plat (A = 562 koloni, B = 596 koloni)

Lampiran 7. Data Hasil Uji Mutagenistas

Tabel V. Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali terhadap *Salmonella typhimurium* TA 1535

Konsentrasi Ekstrak		Jumlah koloni revertan per cawan		Rata-rata	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi revertan spontan
$\mu\text{g}/\text{plat}$	ppm	1	2		
312,5	3125	328	344	336	141
625	6250	416	432	424	229
1250	12.500	97	117	107	-88
2500	25.000	564	616	590	395
5000	50.000	475	520	497	302
Revertan Spontan		189	202	195	

Keterangan: Hasil negatif = lebih kecil dari revertan spontan

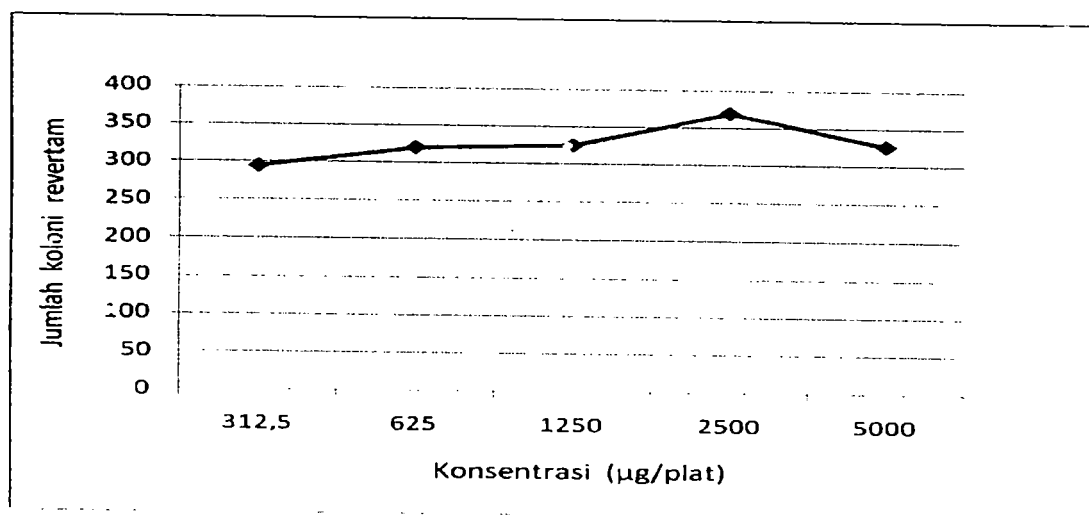


Gambar 22. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak diklorometana terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium* TA 1535

Lampiran 7. (lanjutan)

Tabel VI. Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali tanpa Penambahan Homogenat Hati Tikus terhadap *Salmonella typhimurium* TA 1535

Konsentrasi Ekstrak		Jumlah koloni revertan per cawan		Rata-rata	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi revertan spontan
$\mu\text{g}/\text{plat}$	ppm	1	2		
312,5	3125	282	307	294	99
625	6250	312	328	320	125
1250	12.500	339	312	325	130
2500	25.000	352	386	369	174
5000	50.000	320	332	326	131
Revertan Spontan		189	202	195	

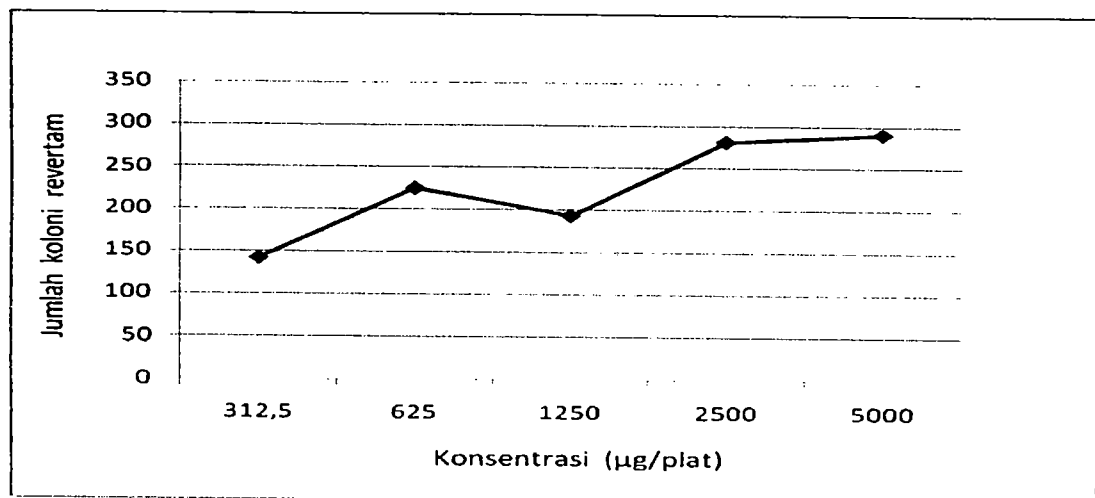


Gambar 23. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol tanpa penambahan homogenat hati tikus terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium* TA 1535

Lampiran 7. (lanjutan)

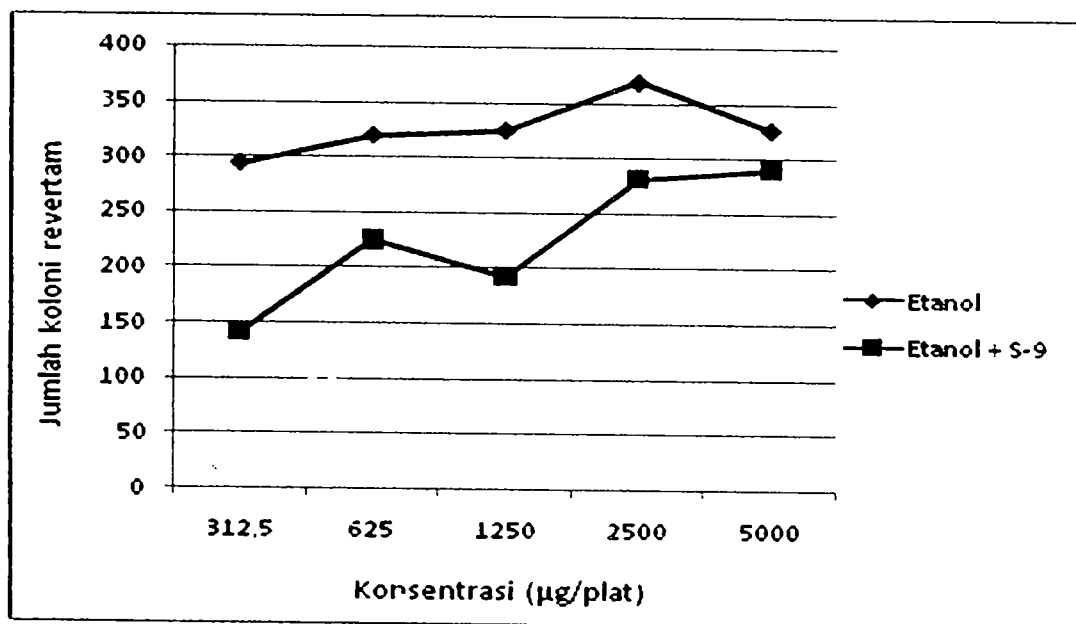
Tabel VII. Hasil Uji Mutagenisitas Ekstrak etanol Batang Brotowali dengan Penambahan Homogenat Hati Tikus (S-9) terhadap *Salmonella typhimurium* TA 1535

Konsentrasi Ekstrak		Jumlah koloni revertan per cawan		Rata-rata	Jumlah koloni revertan per cawan setelah dikurangi revertan spontan
$\mu\text{g}/\text{plat}$	Ppm	1	2		
312,5	3125	131	154	142	-35
625	6250	232	218	225	48
1250	12.500	186	201	193	16
2500	25.000	258	304	281	104
5000	50.000	269	312	290	113
Revertan Spontan + S-9		167	188	177	



Gambar 24. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak etanol dengan penambahan homogenat hati tikus terhadap pertumbuhan *Salmonella typhimurium* TA 1535

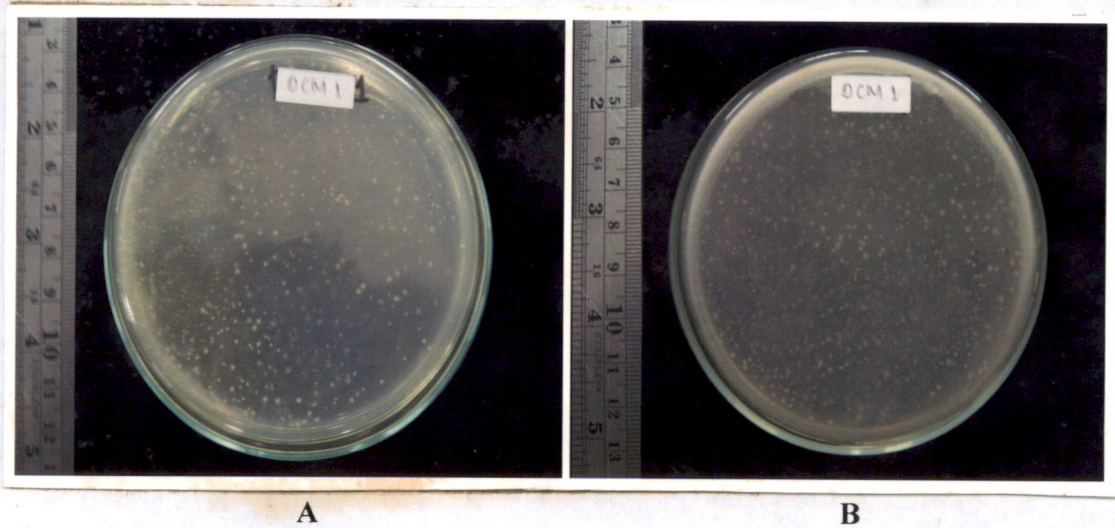
Lampiran 7. (lanjutan)



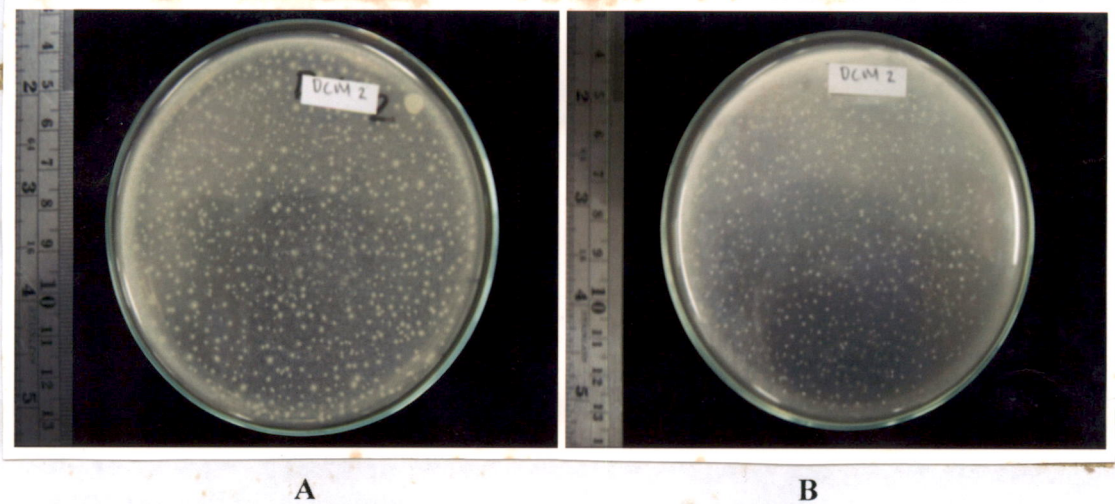
Gambar 25. Grafik perbandingan jumlah koloni revertan rata-rata zat uji setelah dikurangi revertan spontan rata-rata dari ekstrak etanol sebelum dan setelah penambahan homogenat hati tikus (S-9) pada rentang konsentrasi uji

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian

1. Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali

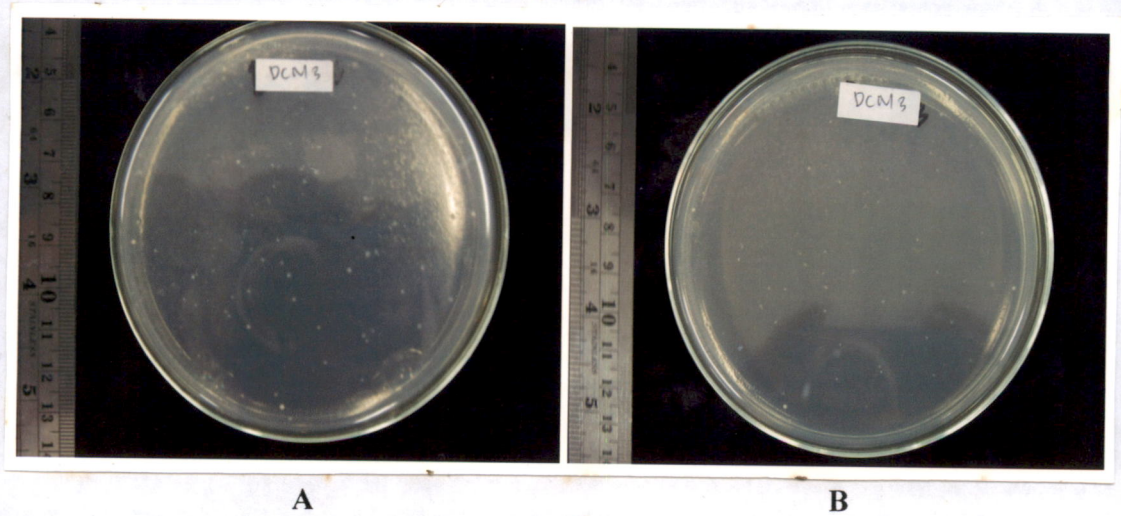


Gambar 26. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 520 koloni, B = 475 koloni)

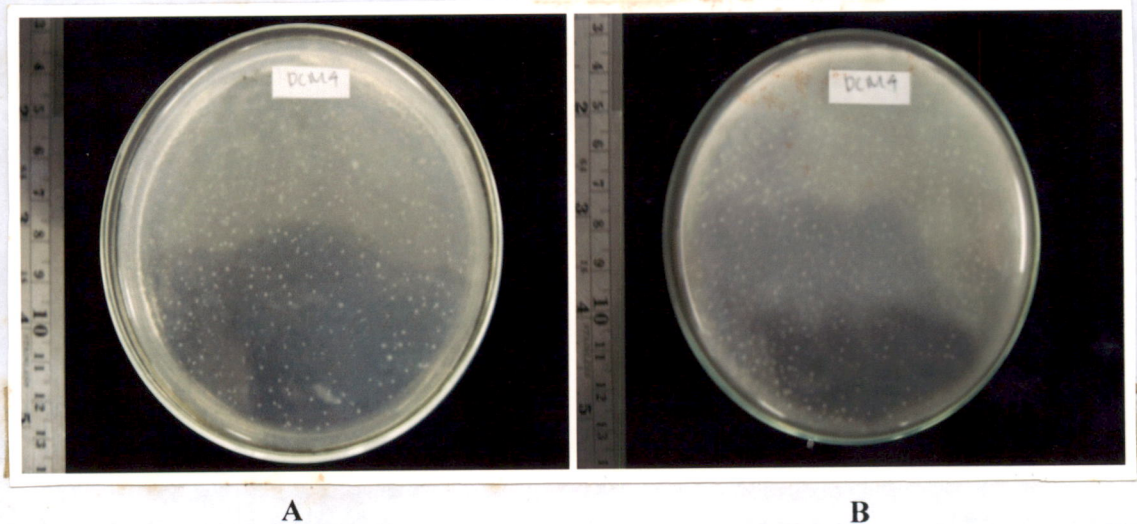


Gambar 27. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 2500 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 616 koloni, B = 564 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)

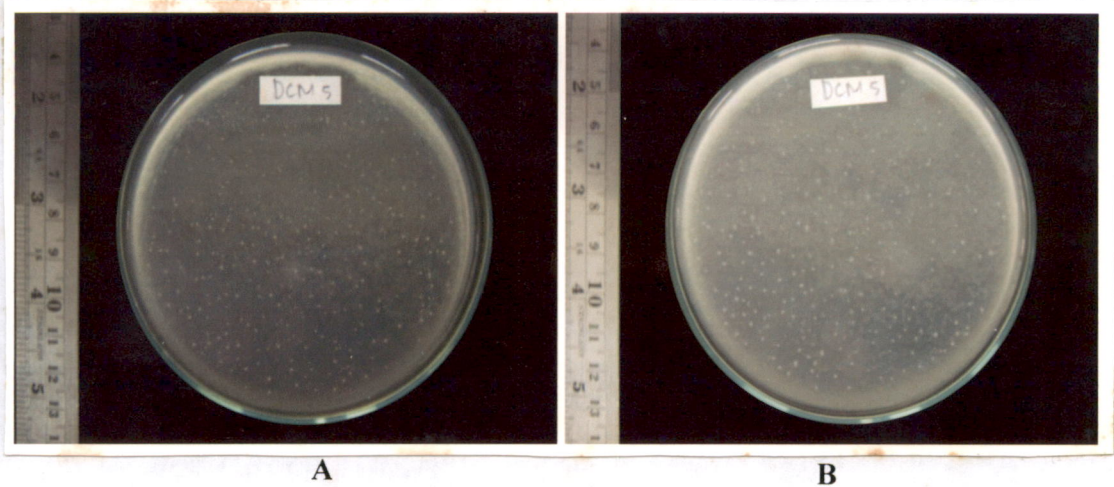


Gambar 28. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 97 koloni, B = 117 koloni)



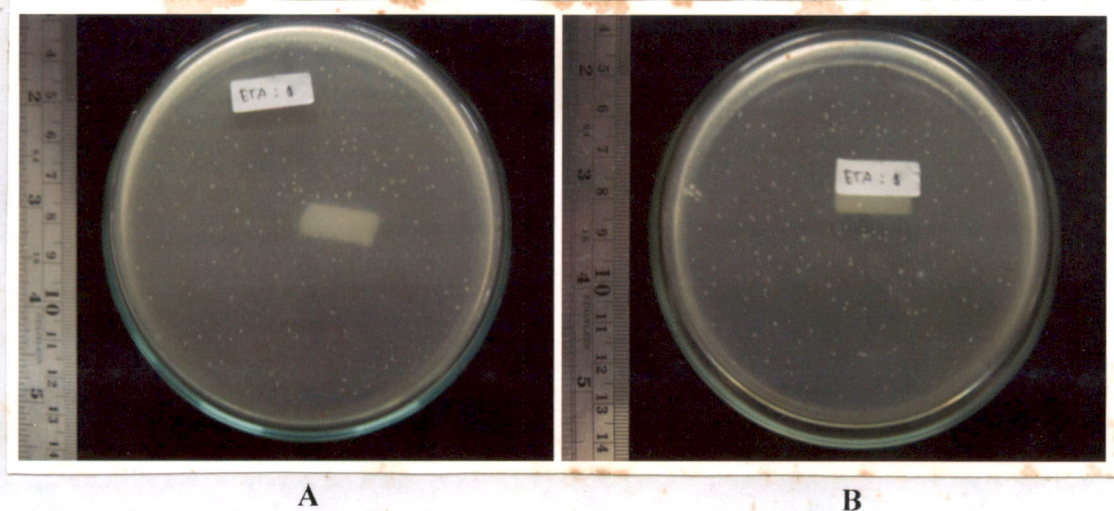
Gambar 29. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 416 koloni, B = 432 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)



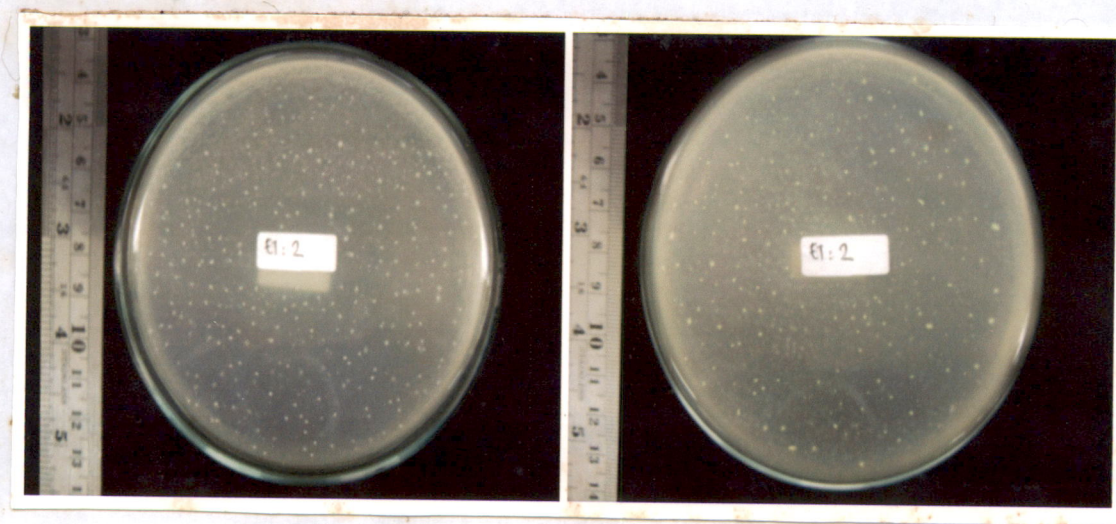
Gambar 30. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Diklorometana Batang Brotowali pada konsentrasi uji 312,5 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 328 koloni, B = 344 koloni)

2. Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali tanpa Penambahan Homogenat Hati Tikus



Gambar 31. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 332 koloni, B = 320 koloni)

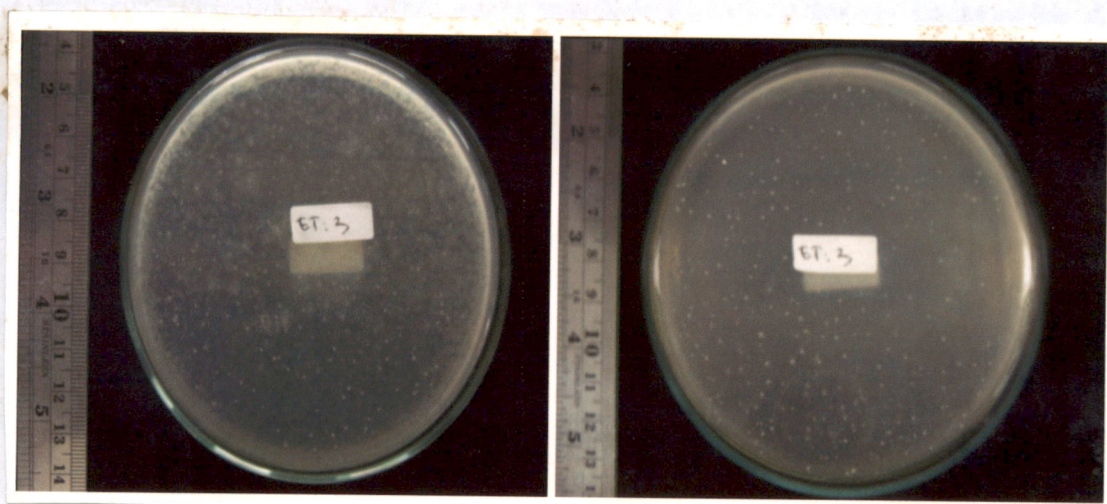
Lampiran 8. (lanjutan)



A

B

Gambar 32. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 2500 µg/plat (A = 352 koloni, B = 386 koloni)

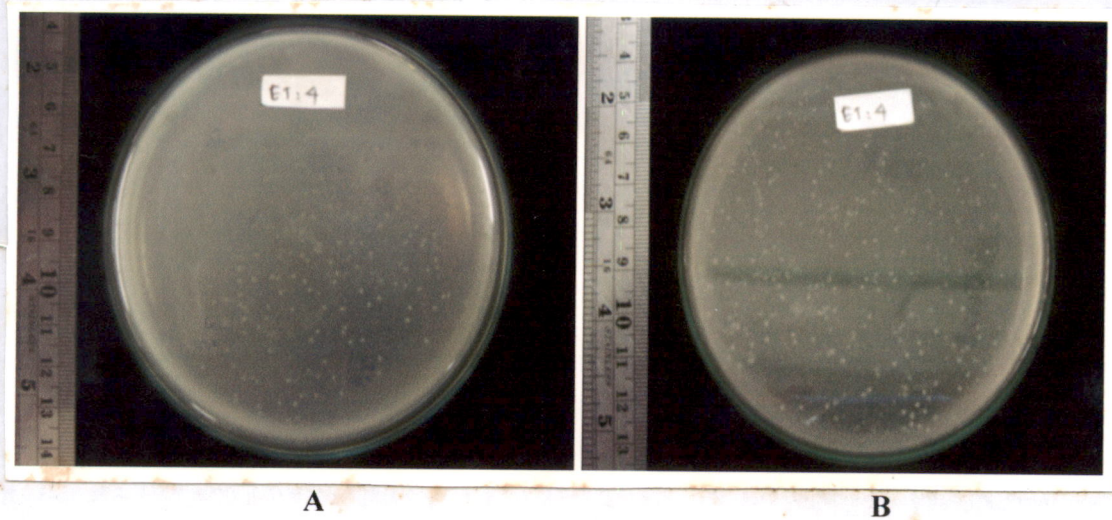


A

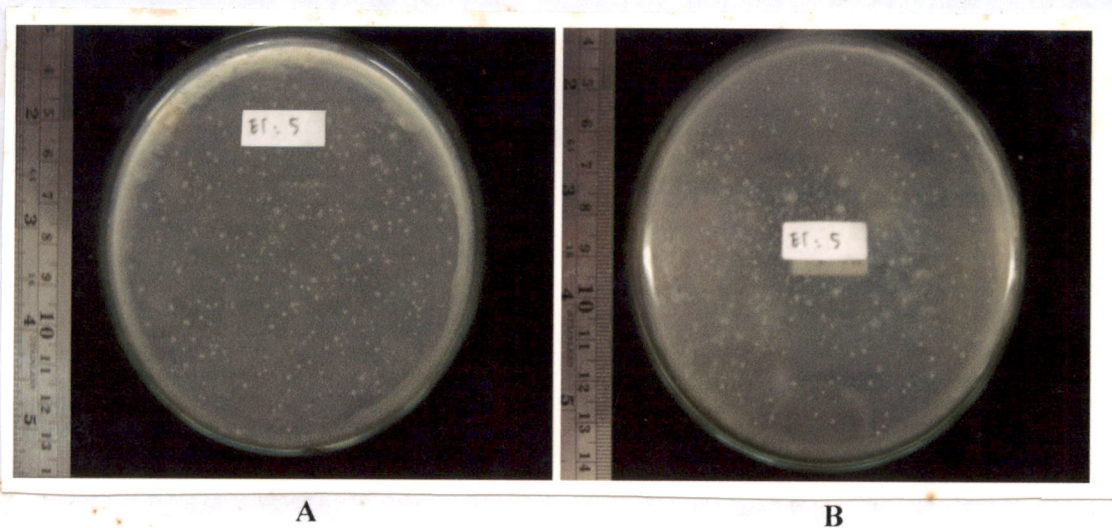
B

Gambar 33. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 1250 µg/plat (A = koloni 312, B = 339 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)



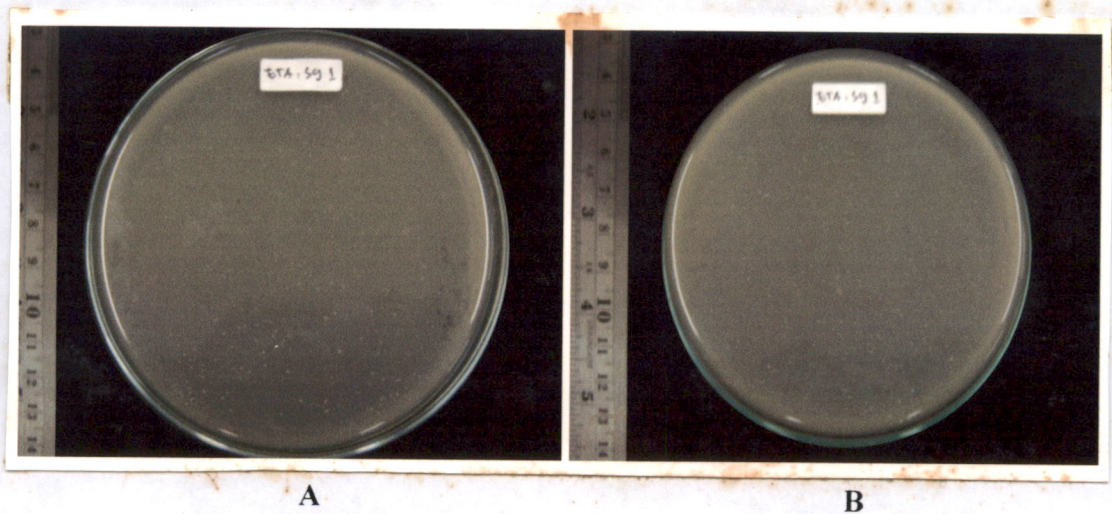
Gambar 34. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 312 koloni, B = 328 koloni)



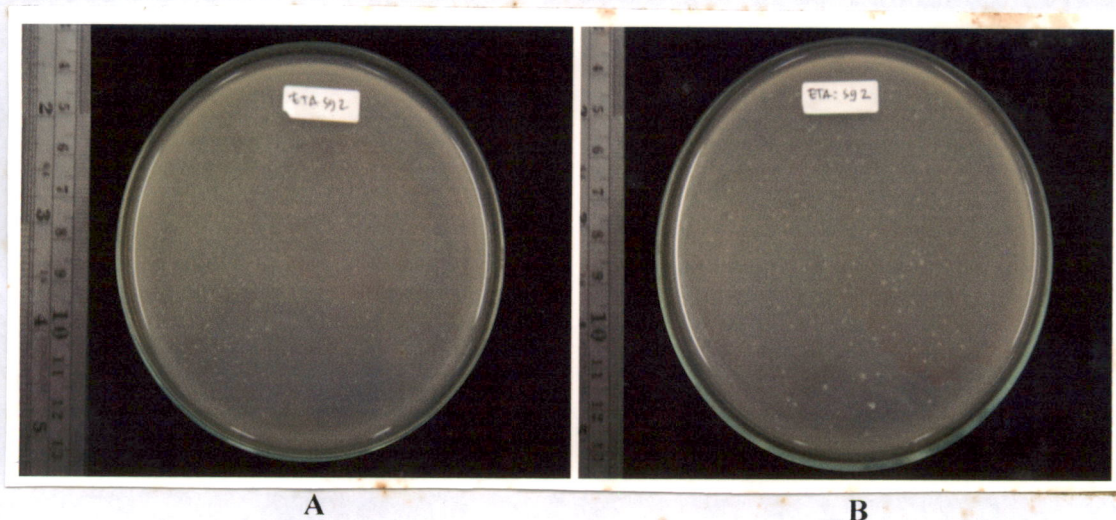
Gambar 35. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali pada konsentrasi uji 312,5 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 307 koloni, B = 282 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)

3. Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan Penambahan Homogenat Hati Tikus (S-9)

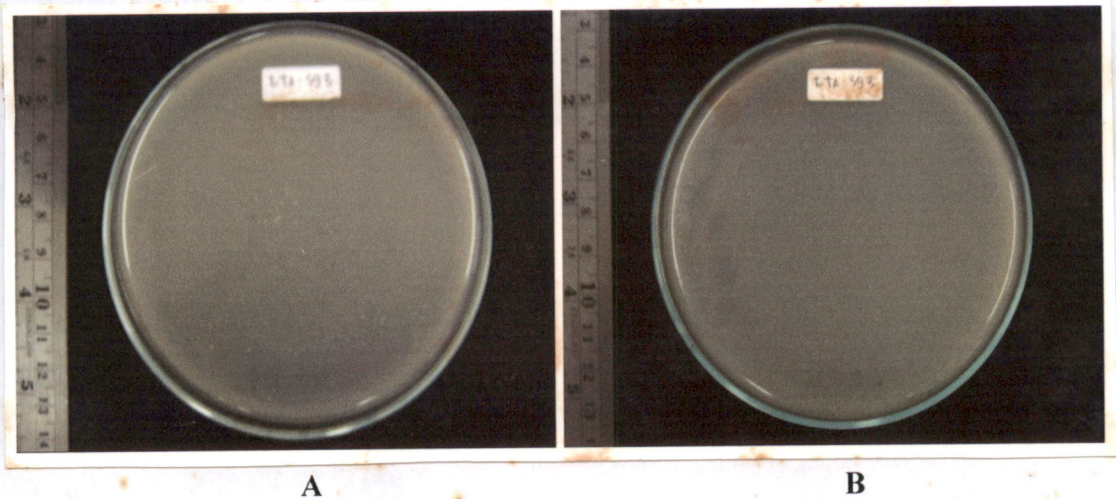


Gambar 36. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 5000 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 269 koloni, B = 312 koloni)

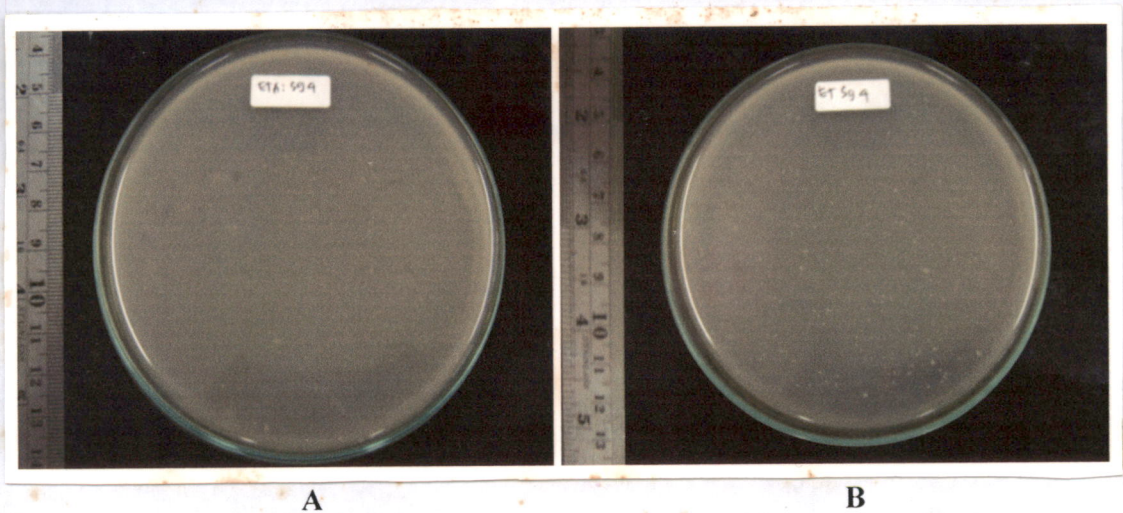


Gambar 37. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 2500 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 258 koloni, B = 304 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)

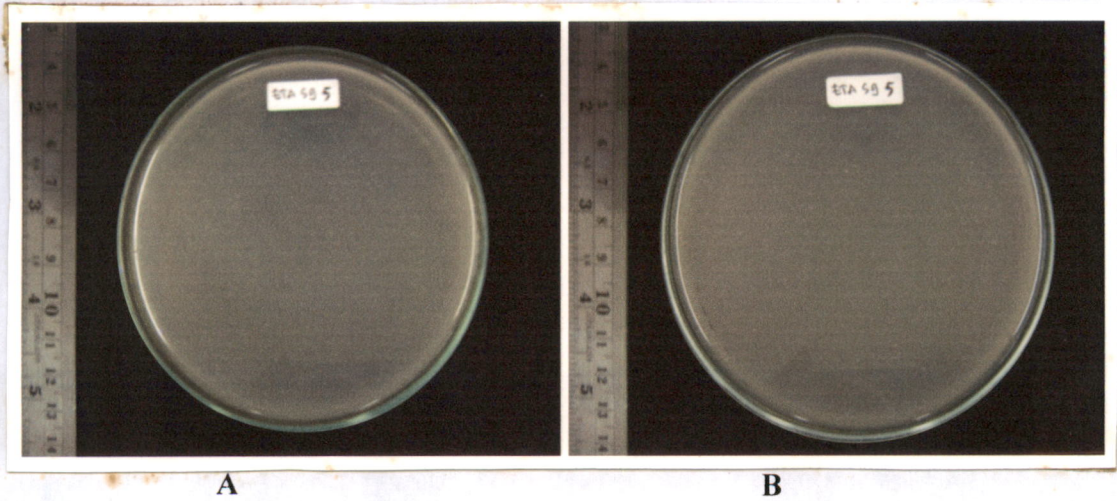


Gambar 38. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 1250 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 186 koloni, B = 201 koloni)



Gambar 39. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 625 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 232 koloni, B = 218 koloni)

Lampiran 8. (lanjutan)



Gambar 40. Foto Uji Mutagenisitas Ekstrak Etanol Batang Brotowali dengan penambahan homogenat hati tikus pada konsentrasi uji 312,5 $\mu\text{g}/\text{plat}$ (A = 131 koloni, B = 154 koloni)