Efek Mutagenik Perasan Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) Pada Bakteri Salmonella Typhimurium TA 1535 dengan Metode Mutasi Balik

Siti Rofida *

Abstrak


Abstract. Traditional medicine applied by public in therapy, but a lot has not had clinical data. The drug possibly has toxic effect in certain ectography, causing need to be paid attention for safety. The toxic effect can have the character of acute, chronic or chronic-like gene mutation on cell. Gene mutation can happened as result of interaction between mutagenic matters with genetic matter of organism. This research done to know mutagenic effect from fruit juice mengkudu (Morinda citrifolia L.) added into growth media of bacteria Salmonella typhimurium TA 1535. This thing addressed to protect public in the case of usage of fruit juice mengkudu as hypo-glycemic drug. Result of mengkudu is made in the form of juice from fruit which have been mature more with doses 5, 10, 20, 40, 80 mg for every plate. Mutagenicity test is done with an resident addition of mutis 5-9. As mutagenicity test is required negative control and positive control. Result obtained from mutagenicity test with method Ames, that fruit juice mengkudu (Morinda citrifolia L.) doesn’t cause gene mutation ad bacteria Salmonella typhimurium TA 1535.

Kata kunci: Frutus juice mengkudu (Morinda citrifolia L.), mutagenic effect, bacteria Salmonella typhimurium TA 1535

Pendahuluan


Uji toksisitas dilakukan untuk menentukan efek toksik suatu zat pada sistem biologi dan untuk menunjukkan hubungan dosis dengan respon yang khas dari zat uji. Ada 2 macam uji toksisitas, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus. Uji toksisitas umum bertujuan untuk mengetahui keseluruhan efek suatu zat. Uji ini meliputi: toksisitas akut, toksisitas sub kronis, toksisitas kronis. Uji toksisitas khusus bertujuan untuk mengetahui efek suatu zat dengan rinci tipe toksisitas spesifik. Uji ini meliputi: uji potensi, uji teratogenik, uji reproduksi, uji mutagenik, uji keratinogenisitas. (Loomis,1978)

Buah mengkudu dapat dipakai untuk menyembuhkan amandel, melancarkan air seni, limpa yang bengkak, kencing manis, sariawan, batuk dan pencetakan darah tinggi. (info-herbal). Penelitian terdahulu memberikan hasil bahwa sati buah mengkudu (Morinda citrifolia Linn) dapat menurunkan kadar glukosa darah tikus putih jantan

Pada penelitian ini, uji toksisitas yang dilakukan terhadap perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) yang digunakan sebagai penurun kadar glukosa darah adalah uji spesifik yaitu uji mutagenisitas. Uji mutagenisitas adalah uji untuk menentukan efek pada sistem kode genetika. Uji ini dapat digunakan untuk mendeteksi bahan yang bersifat mutagen. Mutagen adalah bahan yang menyebabkan mutasi gen pada sel. Mutasi gen mempunyai arti terjadi perubahan rangkaian nukleotida suatu gen sehingga...

Uji mutagenisitas pada beberapa tahun ini lebih banyak digunakan karena sebagai penyaring cepat untuk karsinogenisitas. Data mengenai uji mutagenisitas 300 sat kimia dengan uji Salmonella atau mikrosom, menunjukkan ada korelasi yang tinggi jika dibandingkan dengan data karsinogenisitas zat-zat tersebut. Dari 175 zat yang bersifat karsinogen, 156 diantaranya memiliki kemampuan mutagen dan hanya sedikit zat nonkarsinogen yang memiliki kemampuan mutagen. (McCann dkk.,1975). Uji karsinogenisitas pada hewan pengerat memberikan korelasi antara 55-93% jika dibubuhkan dengan uji mutagenisitas yang ditentukan dengan menggunakan bakteri Salmonella typhimurium. (Mason dkk.,1989)

**Metode Penelitian**

Pada penelitian ini digunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 sebagai bakteri uji. Bakteri uji diperoleh dari Pusrti Riset Obat dan Makanan Bagian Toksikologi di Jakarta. Sebelum uji mutagenisitas dengan menggunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 dilakukan, diperlukan uji pendahuluan dengan menggunakan bakteri yang paling sensitif yaitu bakteri Salmonella typhimurium TA 100 untuk menentukan dosis yang akan dipakai.


Diliapkan sejumlah biakan semalak bakteri Salmonella typhimurium TA 100, TA 102, TA 1535 pada media Oosid Nutrient Broth 2.5 % steril, diinkubasikan dalam penangan air pengocok pada suhu 37°C selama 16-18 jam sehingga diperoleh bakteri sebanyak 1-2x10⁶ sel/ml; campuran S-9 yang berisi glukosa 6-fosfat, NADPH, NADH, natrium fosfat, kalsium fosfat; diperlas fosfat; lempeng agar dalam cawan petri steril; serta sejumlah agar cair yang ditambah histidin, biotin dan triptofan sesuai sebelum pengujian dilakukan.

Kelompok kontrol negatif menggunakan pelarut yang inert (DMSO). Kontrol positif untuk bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 pada uji mutagenisitas tanpa penambahan campuran S-9, digunakan N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (ENNG). Pada Salmonella typhimurium TA 100 digunakan 2-(2-Fluril)-3-(5-nitro-2-fluril) akrilamina (AF-2). Kontrol positif uji mutagenisitas dengan penambahan campuran S-9 pada bakteri Salmonella typhimurium TA 100 maupun TA 100, digunakan 2-Aminoantrasena (ZA'A).

**Prosedur Uji Mutagenisitas**

a. Uji tanpa penambahan campuran S-9

Disiapkan 14 tabung reaksi yang dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari kelompok uji terdiri dari 5 dosis, kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Pada kelompok uji secara berturut-turut dimasukkan larutan dapar fosfat pH 7,4, sejumlah tertentu bahan uji dan biakan semalak bakteri uji. Pada kelompok kontrol negatif berisi campuran larutan dapar fosfat pH 7,4; DMSO (dimeetilufoskida) dan biakan semalak bakteri uji. Pada kelompok kontrol positif berisi campuran larutan dapar fosfat pH 7,4; larutan zat mutagen dan biakan semalak bakteri uji. Kemudian diininkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dengan pengocokan, setelah itu ditambah dengan Top Agar cair. Campuran tersebut dihomogenkan lalu dituang dan didistribusikan secara merata pada permukaan lempeng glukosa minimal. Campuran tersebut diiarkan menjadi 2 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam.

b. Uji dengan penambahan campuran S-9

Disiapkan 14 tabung reaksi yang dibagi menjadi 3 kelompok yang terdiri dari kelompok uji terdiri dari 5 dosis, kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol positif. Pada kelompok uji secara berturut-turut dimasukkan sejumlah tertentu bahan uji, campuran S-9 dan biakan semalak bakteri uji. Pada kelompok kontrol negatif berisi DMSO (dimeetilufoskida), campuran S-9 dan biakan semalak bakteri uji. Pada kelompok kontrol positif berisi larutan zat mutagen, campuran S-9 dan biakan semalak bakteri uji. Kemudian diininkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dengan pengocokan,
setelah itu ditambah dengan Tmp/Agar cair. Campuran tersebut dihomogenkan lalu dituang dan didistribusikan secara merata pada permukaan lempeng glukosa minimal. Campuran tersebut dibiarkan membudak dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 72 jam.

Kolonii revertant yang tumbuh pada setiap lempeng ditunggu. Perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) dinyatakan mutagen pada bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 dengan menggunakan metode mutasi balik jika ada hubungan dosis dengan respon sekurang-kurangnya 3 dosis uji dan jumlah koloni revertan pada doses tertinggi harus sekurang-kurangnya 3 kali dari jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif.

Hasil dan Pembahasan

Uji mutagenisitas ini dilakukan dengan menggunakan perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) dengan doses 5, 10, 20, 40, 80 mg tiap lempeng. Dosis maksimal bahan uji untuk senyawa kimia direkomendasikan berdasarkan: 1) aktifitas antibakteri dan toksisitasnya, 2) kelarutannya dalam pelarut yang digunakan, 3) jika tidak toksis 10 mg tiap lempeng.


Kolonii yang tumbuh merupakan ukuran kecepatan bahan mutagen sehingga digunakan sebagai parameter uji. Kemudian diamati adanya hubungan dosis dengan respon sekurang-kurangnya 3 doses uji dan pada doses tertinggi terdapat perbedaan jumlah koloni revertant di lempeng uji dengan jumlah koloni revertant pada lempeng kontrol negatif. Pada uji mutagenisitas tanpa enzim aktiasi metabolik supun dengan enzim aktiasi metabolik harus ada kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif digunakan senyawa yang sudah dikenali bersifat mutagen terhadap bakteri uji. Pada kontrol negatif, bahan uji diganti dengan pelarut yang digunakan atau pelarut lain yang tidak berasal mutagen seperti air steril, DMSO, glicerol dll. Pertumbuhan bakteri tidak dapat dikendalikan sehingga perlu ada standar untuk mengetahui jumlah koloni yang tumbuh pada media dengan komposisi tertentu. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif.

Sebelum uji mutagenisitas dilakukan, diperlukan uji pendahuluan dengan menggunakan bakteri yang paling sensitif untuk memeriksa dosis. Pada uji pendahuluan, digunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 100, sebab memiliki faktor R pKM 101 yang menyebabkan resisten terhadap ampicillin sehingga lebih peka dalam mendeteksi senyawa mutagen.

Bakteri uji sebelum digunakan dalam uji mutagenisitas, harus dikonfirmasi ulang untuk memastikan bahwa sifat genotipnya tidak hilang selama penyimpanan. Sebagai bakteri pembanding pada konfirmasi genetik digunakan Salmonella typhimurium TA102 sebab memiliki R pKM 101 dan pAQ1 yang menyebabkan resisten terhadap ampilcillin dan tetrassin. Hasil konfirmasi genetik terhadap Salmonella typhimurium TA 1535, TA 100, TA 102 disajikan dalam tabel I.

Tabel I

<table>
<thead>
<tr>
<th>Konfirmasi Genetika Salmonella typhimurium TA 1535, TA 100, TA 102</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><strong>Kondisi</strong></td>
</tr>
<tr>
<td>---------------</td>
</tr>
<tr>
<td>Bahan baku/bahan</td>
</tr>
<tr>
<td>Histidin</td>
</tr>
<tr>
<td>L-tryptofan</td>
</tr>
<tr>
<td>Trypticase</td>
</tr>
<tr>
<td>Asam TNT</td>
</tr>
<tr>
<td>Metabolit</td>
</tr>
<tr>
<td>Aminobas</td>
</tr>
<tr>
<td>Aminobas</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Keterangan:
MGA : Minimal Glukosa Agar
LAN : Lempeng Agar Nutrisi
+ : ada pertumbuhan
- : tidak ada pertumbuhan

Konfirmasi genetik terhadap bakteri uji memberikan hasil sesuai dengan yang dipersyaratkan. Bakteri uji tidak mengalami perubahan sifat genotip selama penyimpanan sehingga dapat digunakan dalam uji mutagenisitas.

Hasil uji pendahuluan mutagenisitas perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) dengan menggunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 100 disajikan pada tabel II.

Peningkatan dosis yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan bakteri Salmonella typhimurium TA 100 pada uji dengan penambahan enzim aktivasi metabolik (campuran S-9) menyebabkan peningkatan jumlah koloni revertan. Terdapat hubungan dosis dengan respons pada 3 dosis uji. Pada dosis tertinggi, jumlah koloni revertan kurang dari 2 kali jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif. Hal tersebut tidak terjadi pada uji tanpa penambahan enzim aktivasi metabolik (campuran S-9). Oleh karena itu pada uji mutagenisitas perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) dengan menggunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535, dosis tertingginya ditingkatkan.

Hasil pengamatan terhadap jumlah koloni revertan pada uji mutagenisitas menggunakan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 disajikan pada tabel III.

Peningkatan dosis yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 tanpa dan dengan penambahan enzim aktivasi metabolik (campuran S-9) tidak menyebabkan peningkatan jumlah koloni revertan. Pada dosis tertinggi jumlah koloni revertan di lempeng uji kurang dari 2 kali dari jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif. Jumlah koloni revertan pada uji pendahuluan dan uji mutagenisitas disajikan dalam bentuk grafik yang ditampilkan pada gambar 1 dan gambar 2.

Gambar 1: Grafik jumlah koloni revertan pada uji pendahuluan

Gambar 2: Grafik jumlah koloni revertan pada uji mutagenisitas

Kesimpulan dan saran
Perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) pada dosis 5, 10, 20, 40, 80 mg tiap lempeng tidak menyebabkan bakteri Salmonella typhimurium TA 1535 mengalami mutasi menjadi bakteri yang tidak bergantung pada hisidin untuk pertumbuhannya. Hal ini didandai dengan jumlah koloni revertan pada dosis tertinggi di lempeng uji kurang dari 3 kali jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif. Sehingga berdasarkan hasil penelitian dengan metode Ames, perasan buah mengkudu tidak memperlihatkan efek mutagenik. Perlu diperhatikan bahwa dari data yang diperoleh, perasan buah mengkudu (Morinda citrifolia L.) belum dapat dikatakan aman untuk dikonsumsi oleh manusia sebab masih perlu dilakukan uji mutasi gen sel mamalia.
Daftar Pustaka

Ames B.N., J.M.C. Cann, E. Yamasaki, 1975, Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31


Bayu, 2001, Mengkudu: Dibalik Baunya Tersimpan Khasiatnya, Jurnal LPPOM-MUI, 4, 7-8


Farnsworth N.R., Prathunstra B.N., 1992, Thai Medicinal Plants, Medicinal Plant Information Center, Bangkok

Gupte S., 1990, Mikrobiologi Dasar, Edisi ke-3, Diterjemahkan oleh Julius E.S., Penerbit Binarupa Aksara, Jakarta


Sabarjiah W, dkk, 2003, Pengaruh sari buah mengkudu (Morinda citrifolia Linn) terhadap Kadar Glukosa darah tikus putih jantan yang Diinduksi dengan Aloksan, Buku Simposium Penelitian Bahan...