

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

Siti Rofida *

Abstrak

Obat tradisional digunakan oleh masyarakat dalam pengobatan, namun banyak yang belum mempunyai data klinis. Obat tersebut mungkin mempunyai efek toksik dalam takaran tertentu, sehingga perlu diperhatikan keamanannya. Efek toksik tersebut dapat bersifat akut, kronis atau kumulatif seperti mutasi gen pada sel. Mutasi gen dapat terjadi akibat interaksi antara zat mutagen dengan zat genetik organisme. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek mutagenik dari perasan buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) yang ditambahkan ke dalam media pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535. Hal ini ditujukan untuk melindungi masyarakat dalam hal penggunaan perasan buah mengkudu sebagai obat penurun kadar glukosa darah. Buah mengkudu dibuat dalam bentuk perasan dari buah yang sudah masak dengan dosis 5, 10, 20, 40, 80 mg untuk tiap lempeng. Uji mutagenisitas dilakukan dengan dan tanpa penambahan campuran S-9. Pada uji mutagenisitas diperlukan kontrol negatif dan kontrol positif. Hasil yang diperoleh dari uji mutagenisitas dengan metode Ames, bahwa perasan buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) tidak menyebabkan mutasi gen pada bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535.

Abstract. Traditional medicine applied by public in therapy, but a lot has not had clinical data. The drug possibly has toxic effect in certain measuring, causing need to be paid attention for safety. The toxic effect can have the character of acute, special or chronic like gene mutation at cell. Gene mutation can happened as result of interaction between mutagenic matters with genetic matter of organism. This research done to know effect mutagenic from fruit juice mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) added into growth media of bacterium *Salmonella typhimurium* TA 1535. This thing addressed to protect public in the case of usage of fruit juice mengkudu as hypoglycemic drug. Fruit of mengkudu is made in the form of juice from fruit which have been matured with dose 5, 10, 20, 40, 80 mg for every plate. Mutagenicity test is done with and without addition of mixture S-9. At mutagenicity test is required negative control and positive control. Results obtained from mutagenicity test with method Ames, that fruit juice mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) doesn't cause gene mutation at bacterium *Salmonella typhimurium* TA 1535.

Keyword : Fruit juice mengkudu (*Morinda citrifolia L.*), mutagenic effect, bacteria *Salmonella typhimurium* TA 1535

Pendahuluan

Penggunaan tanaman yang berkhasiat sebagai obat, telah dikenal dan diketahui sejak lama. Pengetahuan tentang penggunaan tanaman tersebut diwariskan secara turun temurun. Obat tradisional pada umumnya belum memiliki data klinis tentang keamanannya. Dalam takaran tertentu, obat tradisional dapat mempunyai efek toksik terhadap manusia. Efek toksik tersebut dapat bersifat akut, kronis atau khusus seperti menyebabkan mutasi gen pada sel, cacat pada bayi jika obat tersebut dikonsumsi oleh ibu hamil.

Diantara tanaman yang digunakan sebagai obat oleh masyarakat adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dari suku Rubiaceae.

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

(Sabarijah W, dkk, 2003). Agar upaya pengembangan penggunaan perasan buah mengkudu dapat dipertanggungjawabkan secara ilmiah mengenai keamanan dalam pemakaiannya, perlu dilakukan uji toksisitas.

Uji toksisitas dilakukan untuk mendeteksi 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 mengevaluasi keseluruhan efek umum suatu zat. Uji ini meliputi: toksisitas akut, toksisitas sub kronis, toksisitas kronis. Uji toksisitas khusus bertujuan untuk mengevaluasi dengan rinci tipe toksisitas spesifik. Uji ini meliputi: uji potensi, uji teratogenik, uji reproduksi, uji mutagenik, uji karsinogenisitas. (Loomis,1978)

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

* Staf Akademik Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Malang

menyebabkan perubahan genetik dari sel induk ke sel anak. Setiap perubahan dalam urutan basa nukleotida, menyebabkan perubahan pada komposisi molekul protein. Sehingga organisme akan menunjukkan perubahan karakteristik berupa perubahan sel dan sifat. Efek akhir penggunaan zat yang bersifat mutagen pada manusia belum dapat diramalkan. Namun beberapa penyakit telah terbukti berkaitan dengan perubahan molekul DNA seperti anemia sel sabit. (Pelczar dkk.,1986)

Uji mutagenisitas pada beberapa tahun ini lebih banyak digunakan karena sebagai penyaring cepat untuk karsinogenisitas. Data mengenai uji mutagenisitas 300 zat 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 dihubungkan 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 Pusat 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.

Bahan uji menggunakan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang sudah masak. Bahan uji diperoleh dari pohon yang tumbuh di halaman rumah di Malang. Buah dipetik ketika sudah masak, yaitu berwarna putih keruh. Buah tersebut telah disterilisasi di Kebun Raya Purwodadi, Pasuruan. Buah mengkudu yang sudah masak, dipotong kecil-kecil. Potongan tersebut ditimbang sebanyak 100 g kemudian dimasukkan mortar dan dihaluskan. Buah yang sudah halus disaring dengan kain kasa dan diambil filtratnya. Ampas ditambah air sebanyak 10 ml kemudian disaring lagi dengan kain kasa. Filtrat yang diperoleh dicampur dengan filtrat pertama disaring dengan kertas whatman dan disterilkan dengan menggunakan sinar ultra violet selama 30 detik. Dari hasil uji pendahuluan yang dilakukan diperoleh dosis uji yaitu 5, 10, 20, 40, 80 mg untuk tiap lempeng.

Disiapkan sejumlah biakan semalam bakteri *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 102, TA 1535 pada media Oxoid

Nutrient Broth 2,5 % steril, diinkubasikan dalam penangas air pengocok pada suhu 37°C selama 16-18 jam sehingga diperoleh bakteri sebanyak $1-2 \times 10^9$ sel/ml; campuran S-9 yang berisi glukosa 6-fosfat, NADPH, NADH, natrium fosfat, kalium fosfat; dapar fosfat; lempeng agar dalam cawan petri steril; serta sejumlah agar cair yang ditambah histidin, biotin dan triptopan sesaat 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-Etil-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidina (ENNG). Pada *Salmonella typhimurium* TA 100 digunakan 2-(2-Furil)-3-(5-nitro-2-furil) akrilamida (AF-2). Kontrol positif uji mutagenisitas dengan penambahan campuran S-9 pada bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535 maupun TA 100, digunakan 2-Aminoantrasena (2AA).

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 semalam bakteri uji. Pada kelompok kontrol negatif berisi campuran larutan dapar fosfat pH 7,4; DMSO (dimetilsulfoksida) dan biakan semalam bakteri uji. Pada kelompok kontrol positif berisi campuran larutan dapar fosfat pH 7,4; larutan zat mutagen dan biakan semalam bakteri uji. Kemudian dipreinkubasi 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 dibiarkan memadat dan diinkubasikan 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 semalam bakteri uji. Pada kelompok kontrol negatif berisi DMSO (dimetilsulfoksida), campuran S-9 dan biakan semalam bakteri uji. Pada kelompok kontrol positif berisi larutan zat mutagen, campuran S-9 dan biakan semalam bakteri uji. Kemudian dipreinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit dengan pengocokan,

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.

Tabel II

Uji Pendahuluan pada *Salmonella typhimurium* TA 100

Konsentrasi zat uji (mg/lempeng)	Jumlah koloni revertan tiap lempeng					
	(-) S-9			(+) S-9		
	X1	X2	X rata	X1	X2	X rata
Kontrol negatif	127	139	133	149	123	136
0,2	128	151	140	148	125	137
0,4	150	134	142	121	132	127
1	135	127	131	146	123	125
2	147	135	141	142	127	135
4	111	148	130	174	141	158
10	138	127	133	174	168	170
20	141	165	153	181	180	181
40	154	116	135	193	213	203
Kontrol positif	Nama	AF2			2AA	
	Konsentrasi	0,02 µg			2 µg	
	Jumlah koloni	1060	692	876	916	864

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 respon 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.

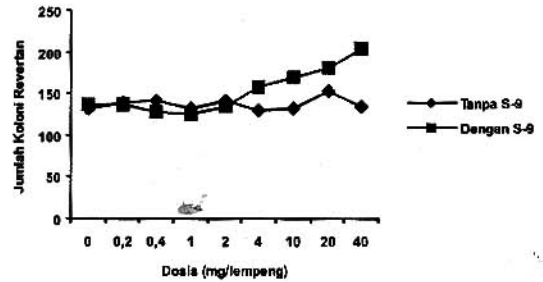
Hasil pengamatan terhadap jumlah koloni revertan pada uji mutagenisitas menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535 disajikan pada tabel III.

Tabel III

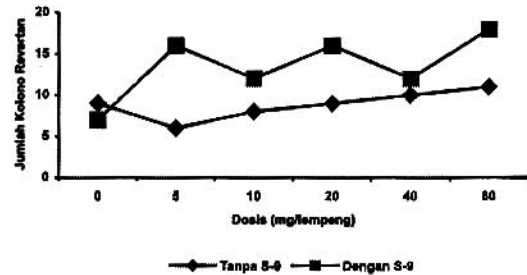
Uji Mutagenisitas pada *Salmonella typhimurium* TA 1535

Konsentrasi zat uji (mg/lempeng)	Jumlah koloni revertan tiap lempeng					
	(-) S-9			(+) S-9		
	X1	X2	X rata	X1	X2	X rata
Kontrol negatif	9	8	9	7	7	7
5	3	8	6	17	15	16
10	8	8	8	13	11	12
20	8	10	9	16	16	16
40	8	11	10	12	11	12
80	14	7	11	15	20	18
Kontrol positif	Nama	ENNG			2AA	
	Konsentrasi	3 µg			2 µg	
	Jumlah koloni	269	348	309	62	84

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 3 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 histidin untuk pertumbuhannya. Hal ini ditandai 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 Crsinogens and Mutagens with Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test**, *Mutation Res.*, 31
- Anonim, 1981, **OECD: Guideline for Testing of Chemicals**
- Anonim, *Morinda Citrifolia*, <http://www.info-herbal.com/in-to/mengkudu.htm>., diakses pada tanggal 7 Juli 2007
- Anonim, **The salmonella typhimurium reverse mutation assay**, http://www.setonresourcecenter.com/cfr/40CFR/P798_018.HTM., diakses pada tanggal 15 Juli 2007
- Bayu, 2001, **Mengkudu: Dibalik Baunya Tersimpan Khasiatnya**, *Jurnal LPPOM-MUI*, 4, 7-8
- Backer C.A., 1963, Bakhuizen Van Den Brink, R.C., **Flora of Java**, Volume II, N.V.P. Noordhoff Groningen, The Netherlands, p.349-351
- Farnsworth N.R., Praphatsara 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
- Loomis T.A., 1978, **Toksikologi Dasar**, edisi ke-3, Diterjemahkan oleh Imono Agus Donatus, Lea & Febiger, Philadelphia
- Lu F.C., 1995, **Toksikologi Dasar: Asas, Organ, Sasaran dan Penilaian Resiko**, Edisi ke-2, Diterjemahkan oleh Edi Nugroho, Zunilda S. Bustami, Iwan Darmansjah, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Kramer P.J., 1998, **Genetic Toxicology**, *Journal of Farmacy and Pharmacology*, 50, 4, 395-405
- Maron D.M., Ames B.N., 1983, **Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test**, *Mutation Res.*, 113, Elsevier Science Publisers, California
- Matsushima T., Sugimura T., Nagao M., Yahagi T., Shirai A., Sawamura M., 1980, **Short-Term Tes Systems for Detecting Carcinogens**, Norpoth K.H., Garner R.C.eds. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York
- Menon S.R., 1999, **Structure-Antimutagenic Activity Relationship Study of Plication B/**, *Journal of Natural Product*, 62, 1, 102-106
- Murugan S. S., Balakrishnamurthy P., Mathew Y. J., **Antimutagenic effect of broccoli flower head by the ames salmonella reverse mutation assay**, <http://www3.interscience.wiley.com/journal/114183131/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>., diakses pada tanggal 15 Juli 2007
- Nohmi T., 1989, **Standard Operating Procedure for Mutagenicity Test**, Japan International Cooperation Agency, Jakarta
- Pelczar M.J.Jr., Chann E.C.S., 1986, **Dasar-Dasar Mikrobiologi**, Diterjemahkan oleh Ratna Siri Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta
- Sabarijah 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*