

EFEK MUTAGENIK EKSTRAK METANOL AMPAS BIJI JARAK (*Jatropha curcas* L.) SISA PENGOLAHAN BAHAN BAKAR NABATI (BIOFUEL)

MUTAGENIC EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *Jatropha curcas* L SEED SOLID WASTE OBTAINED FROM RESIDUAL FUEL VEGETABLE PROCESSING (BIOFUEL)

Retno Wahyuningrum^{1*)}, Komar Ruslan Wirasutisna²⁾, Elfahmi²⁾, dan Marlia Singgih Wibowo²⁾

¹⁾. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto

²⁾. Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung

ABSTRAK

Biji jarak (*Jatropha curcas* L) mengandung minyak yang dapat dimanfaatkan pada pembuatan sabun, kosmetik dan juga sebagai bahan bakar nabati (biofuel). Biji jarak mengandung senyawa ester phorbol yang bersifat toksik. Pengolahan minyak biji jarak menjadi bahan bakar nabati menyisakan hasil samping berupa ampas biji yang jumlahnya cukup melimpah. Untuk meyakinkan keamanan penggunaan ampas biji jarak, dilakukan uji mutagenik. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan pelarut metanol, uji mutagenik ekstrak dilakukan dengan metode Ames Test menggunakan bakteri *Salmonella typhimurium* TA 1535, baik dengan penambahan maupun tanpa penambahan homogenat hati (S9). Hasil uji menunjukkan bahwa ekstrak metanol ampas biji jarak tidak bersifat mutagenik terhadap bakteri *S. typhimurium* TA 1535.

Kata kunci : *Jatropha curcas*, biji, ampas, efek mutagenik

ABSTRACT

Jatropha curcas seed contains viscous oil that can be used for soap making, cosmetic and as biofuel. It contains phorbol ester that was toxic. Biofuel production of *Jatropha curcas* seed left seedcake from mechanical press process. For safety evaluation, mutagenicity test was carried out. The seedcake was extracted by maceration method at room temperature with methanol and the mutagenic effect was evaluated by Ames test against *Salmonella typhimurium* TA 1535 with or without S9 metabolic activator. Methanolic extract of *Jatropha curcas* seedcake had no mutagenicity effect against *S. typhimurium* TA 1535.

Keywords : *Jatropha curcas*, seedcake, mutagenicity effect

PENDAHULUAN

Jatropha curcas L. (suku Euphorbiaceae), atau jarak adalah tumbuhan yang sangat berguna, memiliki banyak manfaat, sekaligus sangat potensial. Biji jarak mengandung minyak yang dapat dimanfaatkan pada pembuatan sabun, kosmetik dan juga sebagai bahan bakar (*biofuel*). Pemanfaatan minyak biji jarak sebagai *biofuel* inilah yang membuat tumbuhan ini sangat potensial dikembangkan (Openshaw, 2000). Banyak penelitian yang dilakukan terhadap tumbuhan ini. Ekstrak metanol kulit batang *J. curcas* memiliki aktivitas antibakteri terhadap sejumlah bakteri Gram positif maupun negatif sekaligus memiliki aktivitas antifungi terhadap

beberapa spesies jamur (Igbinsosa dkk., 2009). Ekstrak metanol daun *J. curcas* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dengan MIC 125 µg/mL, tetapi negatif terhadap bakteri lain yaitu *E.coli*, *K pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S.typhi*, dan *S. mutans* (Muanza dkk., 1994). Getah dari *J. curcas* mampu menghambat *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus* serta menghambat larva nyamuk (Beyioku dkk., 1998). Ekstrak metanol daunnya juga mampu menghambat sel yang diinduksi HIV dengan IC₅₀ 9 µg/mL (Matsuse dkk., 1999). Ekstrak biji jarak memiliki aktivitas toksik terhadap siput yang menjadi inang *Schistosoma mansoni* dan *Schistosoma haematobium* sehingga ekstrak tersebut dapat dijadikan molusida yang mampu mengontrol schistosomiasis (Rug dan Ruppel, 2000). Biji jarak mengandung senyawa ester phorbol, suatu senyawa diterpen tetrasiklik yang bersifat toksik. Minyak jarak yang diambil dari varietas non toksik memiliki kandungan ester phorbol yang rendah yaitu 0,27 mg/ml sedangkan

*) Korespondensi : Retno Wahyuningrum
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah
Purwokerto

pada varietas toksik, kandungan ester phorbolnya mencapai 2,49 mg/mL (Goel dkk., 2007). Pengolahan minyak biji jarak menjadi bahan bakar nabati (*biofuel*) menyisakan hasil samping berupa ampas yang jumlahnya cukup melimpah. Ekstrak metanol ampas biji jarak sisa pengolahan bahan bakar nabati memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* dan *C. albicans* (Wahyuningrum dkk., 2010). Untuk mengevaluasi keamanan penggunaan ampas biji jarak, perlu dilakukan serangkaian uji toksisitas, diantaranya uji mutagenik. Uji mutagenik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemungkinan adanya senyawa mutagen.

METODOLOGI

Bakteri uji

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *Salmonella typhimurium* TA 1535 yang disediakan oleh Laboratorium Mikrobiologi Farmasi, Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung.

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah ampas biji jarak (*Jatropha curcas* L) yang merupakan sisa atau limbah pengolahan minyak biji jarak yang diperoleh pada bulan Mei 2009 dari Puspipstek (Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi) Serpong. Penanganan yang dilakukan terhadap bahan/ampas yaitu pengeringan dan pengecilan ukuran ampas menjadi serbuk.

Bahan lain yang digunakan adalah metanol, dimetilsulfoksida, natrium azida (NaN_3), air suling, media *nutrient broth* (oksid), glukosa, natrium klorida, histidin, biotin, magnesium sulfat, asam sitrat, kalium hidrogen sulfat, natrium amonium fosfat, homogenat hati S9, dan kristal violet.

Alat

Cawan Petri, inkubator, penghitung koloni, vortex, jarum ose, dan alat gelas lain yang lazim digunakan dalam laboratorium mikrobiologi.

Ekstraksi

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Sari yang diperoleh diuapkan dengan penguap putar vakum hingga diperoleh ekstrak kental.

Uji mutagenik

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode plat tersatukan (*plate incorporation*) yaitu mencampurkan senyawa yang akan diuji dengan strain bakteri uji ke dalam agar cair kemudian dituang ke dalam plat agar minimal sebagai pelat agar lapisan bawah.

Konfirmasi sifat genotip galur bakteri uji

Sebelum digunakan untuk uji, terlebih dahulu dilakukan konfirmasi sifat genotip bakteri *S. typhimurium* TA 1535 yang meliputi uji butuh histidin, mutasi rfa, mutasi uvrB, dan reversi spontan.

Uji butuh histidin

Pada pelat agar, dibuat goresan biakan semalam *S. typhimurium*, pelat uji mengandung histidin, sedangkan pelat kontrol tidak ditambahkan histidin. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni.

Uji mutasi rfa

Pada pelat agar dituangkan campuran 2 mL top agar dengan 0,1 ml biakan semalam bakteri uji. Setelah top agar memadat, cakram kertas steril diletakkan di tengah top agar, kemudian pada pusat cakram diteteskan larutan Kristal violet 1 mg/mL sebanyak 0,01 mL. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati diameter zona hambat di sekeliling cakram.

Uji mutasi uvrB

Biakan semalam bakteri uji digoreskan pada pelat agar. Setelah itu tutup cawan petri dibuka, setengah bagian ditutup dengan kertas karton, bagian yang tidak ditutup disinari lampu ultraviolet pada jarak 33 cm selama 8 detik. Cawan petri ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 12-24 jam. Setelah itu, diamati ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri pada bagian yang disinari.

Uji reversi spontan

Sebanyak 0,2 mL biakan semalam bakteri uji ditambahkan pada 2 mL top agar yang telah ditambah dengan larutan histidin kemudian dicampur dan dituangkan pada pelat glukosa minimal. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam, kemudian dihitung jumlah koloni yang tumbuh.

Tabel I. Hasil konfirmasi sifat genotip *Salmonella typhimurium* TA 1535

Sifat genotip	Hasil konfirmasi
Uji butuh histidin	Tumbuh
Mutasi rfa	Diameter zona jernih : 20 mm
uvrB	Tidak tumbuh
Reversi spontan	150-200 koloni/lempeng

Tabel II. Hasil uji mutagenik ekstrak metanol ampas biji jarak

(±) S9	Konsentrasi uji (ppm)	Jumlah koloni/lempeng				Rasio uji/K-
		Lempeng I	Lempeng II	Lempeng III	Rata-rata	
(-) S9	Kontrol negatif (0)	212	161	TH	186,50	-
	Kontrol positif (100)	654	536	771	653,67	3,50
	10	264	276	163	234,33	1,26
	100	245	323	313	293,67	1,57
	1000	219	245	317	260,33	1,40
(+) S9	Kontrol negatif (0)	219	308	221	249,33	-
	Kontrol positif (100)	687	938	728	784,33	3,15
	10	432	446	470	449,33	1,80
	100	394	429	446	423,00	1,70
	1000	495	415	266	392,00	1,57

Ket : TH = tidak terhitung, sehingga rata-rata jumlah koloni dihitung dari lempeng I dan II

Kontrol negatif : dimetilsulfoksida
Kontrol positif : sodium azide (NaN₃)

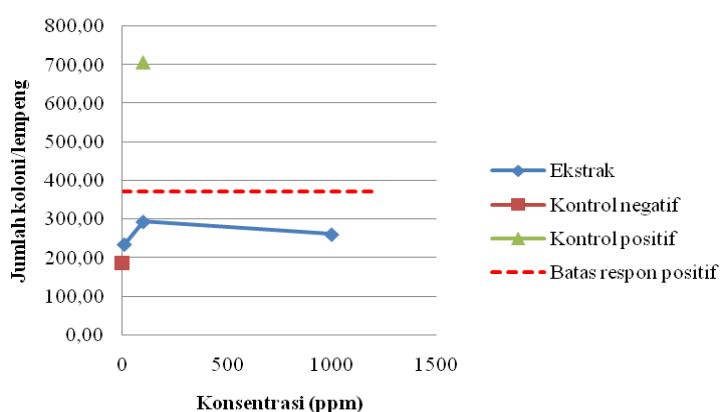
Pengujian mutagenik

Dalam pengujian digunakan dua lapis agar, yaitu lapisan dasar (*bottom agar*) yang merupakan pelat glukosa minimal dan lapisan atas (*top agar*) yaitu agar yang diperkaya dengan histidin dengan perbandingan (10:1). Sampel uji dibuat dalam bentuk larutan dengan tiga seri konsentrasi (10, 100, 1000 ppm). Sebanyak 0,1 mL larutan uji dicampur dengan 2 mL top agar dan 0,1 mL biakan bakteri *S. typhimurium* usia satu malam (*overnight*). Campuran dihomogenkan dan segera dituang di atas lapisan dasar (*bottom agar*). Pada pengujian dengan menggunakan homogenat hati (S9), ditambahkan 0,5 mL campuran homogenat hati pada top agar. Setelah pelat top agar

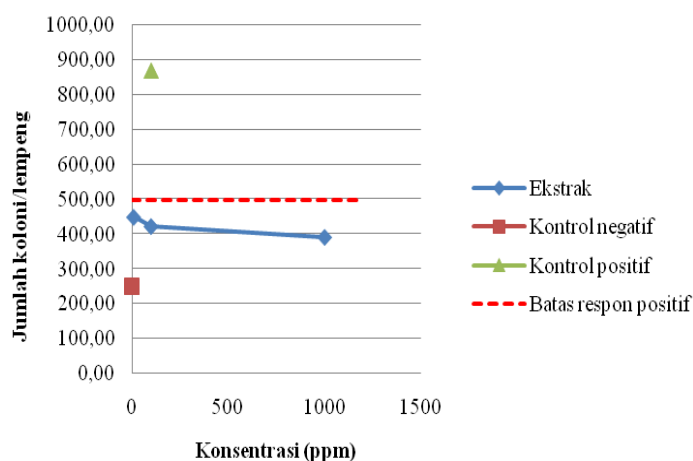
membeku kemudian diinkubasi dalam keadaan gelap pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Kelompok kontrol dibuat dengan cara yang sama. Pelarut sampel uji yaitu dimetil sulfoksida digunakan sebagai kontrol negatif. Natrium azida (NaN₃) digunakan sebagai kontrol positif. Setelah inkubasi 48 jam, jumlah koloni bakteri *S. typhimurium* dihitung dan dibandingkan dengan kontrol. Potensi mutagenik sampel uji ditetapkan dengan membandingkan jumlah koloni revertan pada lempeng kontrol negatif. Hasil uji dinyatakan positif jika jumlah koloni pada pelat uji minimal dua (2) kali jumlah koloni pada pelat kontrol negatif serta adanya hubungan dosis-respon.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Kurva hubungan konsentrasi dengan jumlah koloni revertan pada uji mutagenik ekstrak tanpa penambahan S9.



Gambar 2. Kurva hubungan konsentrasi dengan jumlah koloni revertan pada uji mutagenik ekstrak dengan penambahan S9.

Uji mutagenik dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak metanol ampas biji jarak bersifat mutagen atau tidak. Hal ini dilakukan untuk memastikan bahwa ampas biji jarak sisa pengolahan bahan bakar nabati aman dan dapat dikembangkan dalam pemanfaatan ampas ini sebagai obat bahan alam. Mutagen adalah zat atau senyawa yang dapat meningkatkan laju perubahan di dalam gen. Uji ini menggunakan bakteri *S. typhimurium* galur TA1535. Galur TA 1535 memiliki substitusi basa yang menyebabkan *missense mutation* di dalam gen yang mengkode enzim pertama dalam sintesis histidin. Enzim yang dimiliki mutan mengandung prolin, sementara biakan induk mengandung leusin. Hal ini menyebabkan *S. typhimurium* mutan tidak dapat memproduksi histidin sendiri, sehingga bakteri ini tidak dapat hidup pada media yang tidak mengandung histidin. Mutan ini disebut mutan

auxotroph atau mutan *histidin dependent*. Mutan *auxotroph* yang berinteraksi dengan senyawa mutagen akan berubah menjadi mutan prototroph yang dapat tumbuh pada media tanpa histidin. Terbentuknya koloni revertan menunjukkan bahwa bakteri *S. typhimurium* mutan telah termutasi balik oleh senyawa uji. Senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya mutasi balik tersebut dikatakan sebagai mutagen.

Bakteri *S. typhimurium* yang digunakan untuk uji mutagenik harus memiliki sifat genotip yang dipersyaratkan. Konfirmasi genotip yang dilakukan adalah uji butuh histidin, mutasi *rfa*, mutasi *uvrB*, dan reversi spontan. Bakteri uji yang digunakan adalah galur mutan yang tidak mampu mensintesis histidin sehingga bakteri memerlukan media yang mengandung histidin. Mutasi *rfa* menyebabkan hilangnya sebagian barrier lipopolisakarida yang melapisi permukaan sel

bakteri, sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas terhadap molekul besar seperti benzo[*a*]pyren yang tidak dapat berpenetrasi pada sel normal. Mutasi *uvrB* terjadi karena pengurangan kode genetik pada sistem perbaikan kembali jika ada penyimpangan DNA (*DNA excision repair system*). Hasil uji konfirmasi genotip (Tabel I) menunjukkan bahwa *S. typhimurium* TA 1535 dapat digunakan untuk uji mutagenik.

Penambahan enzim mikrosomal hati S-9 pada uji dimaksudkan untuk mengetahui apakah metabolit dari senyawa uji menyebabkan efek mutagenik atau tidak. Pelarut sampel uji yaitu dimetilsulfoksida digunakan sebagai kontrol negatif. Natrium azida (NaN_3) yang digunakan sebagai kontrol positif merupakan senyawa yang diketahui bersifat sangat mutagen terhadap organisme baik tanaman maupun hewan. Pada mamalia, natrium azida bersifat cukup mutagen. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa efek mutagen natrium azida disebabkan oleh metabolitnya yaitu azidolalanin, suatu analog asam amino (Sadiq dan Owais, 2000).

Hasil uji mutagenik dapat dilihat pada tabel II. Dari data tersebut dapat diketahui bahwa jumlah koloni bakteri pada semua lempeng uji kurang dari dua kali jumlah koloni pada lempeng kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol ampas biji jarak tidak bersifat mutagen baik dengan dan tanpa penambahan enzim mikrosomal hati S-9. Hasil uji dinyatakan positif jika jumlah koloni pada pelat uji minimal dua (2) kali jumlah koloni pada pelat kontrol negatif serta adanya hubungan dosis-respon. Tidak adanya efek mutagen ekstrak metanol ampas biji jarak juga ditegaskan oleh kurva dosis-respon (Gambar 1 dan 2).

KESIMPULAN

Ekstrak metanol ampas biji jarak tidak bersifat mutagenik terhadap *S. typhimurium* TA 1535.

DAFTAR PUSTAKA

- Beyioku, A.F., Oyibo, W.A., dan Anuforom, B.C., 1998, Disinfectant/Antiparasitik Activities of *J.curcas*, *East African Med Journal*, **75**, 508-511.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Francis, G., dan Becker, K., 2007, Phorbol Esters: Structure, Biological Activity, and Toxicity in Animals, *International Journal of Toxicology*, **26**, 279-288.
- Igbinosa, O.O., Igbinosa, E.O., dan Aiyegoro, O.A. (2009) : Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of Stembark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn), *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **3(2)**, 58-62.
- Matsuse, I.T., Lim, Y.A., Hattori, M., Correa, M., dan Gupta, M.P. (1999) : A Search for Antiviral Properties in Panamian Medicinal Plants. The effect on HIV and its Essential Enzymes, *Journal of Ethnopharmacology*, **64**, 15-22.
- Muanza, D.N., Kim, B.W., Euler, K.L., dan Williams, L. (1994) : Antibacterial and Antifungal Activities of Nine Medicinal Plants from Zaire, *International Journal Pharmacognosy*, **32 (4)**, 337-345.
- Openshaw, K. (2000) : A review of *Jatropha curcas*: An Oil Plant of Unfulfilled Promise, *Biomass and Bioenergy*, **19**, 1-15.
- Rug, M dan Ruppel, A. (2000) : Toxic Activities of the Plant *Jatropha curcas* Against Intermediate Snail Hosts and Larvae of Schistosomes, *Tropical Medicine and International Health*, **5(6)**, 423-430.
- Sadiq, M.F., dan Owais, W.M. (2000) : Mutagenicity of Natrium azida and Its Metabolite Azidoalanine in *Drosophila melanogaster*, *Mutation Research*, **469**, 253-257.
- Wahyuningrum, R. (2010) : Aktivitas Antimikroba Ampas Biji Jarak (*Jatropha curcas* L) Sisa Pengolahan Bahan Bakar Nabati (*Biofuel*), *Tesis*, Institut Teknologi Bandung, Bandung.