

# DAFTAR ISI

## VOLUME 17

Nomor 2

Oktober 2019

<b>Efek Antidiare Infusa Daun Senggani (<i>Melastoma malabathricum</i> L.) Pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster Yang Di Induksi <i>Oleum ricini</i></b> Nova Suliska, Thito Dwi E., Herlinda .....	126-131
<b>Hubungan antara Karakteristik Pasien dan Terapi terhadap Nilai Retensi di RSJ Menur Surabaya</b> Arifani Siswidiasari, Antonius Adji Prayitno Setiadi, Lila Nurmayantim .....	132-138
<b>Hewan Model Kanker Ovarium untuk Studi Preklinik dan Pengembangan Obat Kanker Ovarium</b> Ni Made Dwi Sandhiutami, Puspita Eka Wuyung, Wawaimuli Arozal, Melva Louisa, Deni Rahmat.....	139-149
<b>Optimasi Nanoemulsi A/M/A Ekstrak Etanol Daun Binahong dan Konjugat AG-Kitosan Menggunakan Desain Box-Behnken</b> Tri Suciati, Irda Fidriyanny, Malinda Prihantini.....	150-159
<b>Efek Pemberian Eugenol Isolat Bunga Cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i>) terhadap Histologi Pankreas Tikus Diabetes</b> Sinta Wahyu Utami, Made Sudarma, Candra Dwipayana Hamdin .....	160-163
<b>Karakterisasi Nanopartikel dan Uji Antiagregasi Platelet secara In-Vitro terhadap Ekstrak Rumput Laut Coklat (<i>Sargassum polycystum</i>) Hasil Hidrolisis Enzim Sellulase</b> Kartiningih, Syamsudin Abdillah, Partomuan Simanjuntak, Cyntia, Haryo .....	164-168
<b>Efek Ekstrak Petroleum Eter Daun Ara (<i>Ficus racemosa</i> Linn.) pada Indeks Fagositosis Mencit (<i>Mus musculus</i>)</b> Andriliana Trihastuty, Siti Rahmatul Aini, Candra Dwipayana Hamdin.....	169-174
<b>Formulasi dan Uji Anti Inflamasi Masker Peel Off Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i> L.)</b> Miratun Syarifah, Nining Sugihartini, Laela Hayu Nurani.....	175-182
<b>Isolasi dan Identifikasi Senyawa Geraniol dari Minyak Atsiri Tanaman Sereh Wangi <i>Cymbopogon nardus</i> (L) Rendle</b> Yelfi Anwar, Elvina Dhiaul Iftitah, Partomuan Simanjuntak, Shirly Kumala.....	183-188
<b>Optimasi Formula Lipid Nanostruktur dengan Pentarget Manosa sebagai Sistem Penghantaran Rifampisin</b> Tri Suciati, Nurani Istiqomah, Benny Permana, Elin Julianti, Titah Yudistira, Marlia Singih Wibowo, Yani Triyani.....	189-198

# DAFTAR ISI

## VOLUME 17

Nomor 2

Oktober 2019

<b>Aktivitas Antibakteri Fraksi <i>Allium ascalonicum</i> Linn A562275sal Lembah Palu terhadap <i>Shigella dysenteriae</i></b> Akhmad Khumaidi, Kumalahayati Maulina, Arsa Wahyu Nugrahani .....	199-209
<b>Skrining Virtual dan Elusidasi Moda Ikatan Senyawa dalam Bawang Putih (<i>Allium sativum</i> L.) sebagai Penghambat Reseptor Advanced Glycation End Products</b> Esti Mulatsari, Esti Mumpuni, Ikhsan Ramadhan.....	210-217
<b>Uji In Vitro dan Studi In Silico Senyawa Turunan N'-Benzoylisonicotinohydrazide sebagai Kandidat Antituberkulosis</b> Ruswanto Ruswanto, Nur Rahayuningsih, Nur Laeli Dwi Hidayati, Ginna Sri Nuryani, Richa Mardianingrum.....	218-226
<b>Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Kandungan Senyawa Polifenol dan Aktivitas Antioksidan pada <i>Rubus fraxinifolius</i></b> Yesi Desmiaty, Berna Elya, Fadlina Chany Saputri, Iis Irawatty Dewi, Muhammad Hanafi.....	227-231
<b>Variasi Basis Salep Minyak Kemiri (<i>Aleurites moluccana</i>) dan Uji Daya Penyembuhannya pada Luka Kelinci</b> Paulina V. Y. Yamlean, Edwin de Queljoe, Widdhi Bodhi.....	232-237
<b>Selektivitas Pemisahan Isoniazid dan Asetilisoniazid dalam Plasma Manusia In-Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi</b> Novi Yantih, Yahdiana Harahap, Wahono Sumaryono, Rianto Setiabudy, Lestari Rahayu.....	238-245
<b>Potensi Biduri (<i>Calotropis gigantea</i> (L.) W.T. Aiton) sebagai Tanaman Obat</b> Meutia Faradilla, Hilda Maysarah.....	246-250
<b>Analisis In-Silico Senyawa Kimia dalam Teh Hijau yang Bekerja pada Aktivator (PPAR-<math>\gamma</math>) sebagai Antiobesitas</b> Faridah, Esti Mumpuni, Yudha Iswara Yunantoi.....	251-254
<b>Aktivitas Immunomodulator Ekstrak Etanol Kemukus (<i>Pipercubeba</i>), <i>Ki-seureuh</i> (<i>Piper aduncum</i>), dan Cabe Jawa (<i>Piperretrofractum</i>) pada Mencit Jantan Galur Balb/C</b> Mohammad Roseno, Yayat Sudaryat, Widyastiwi.....	255-261
<b>Formulasi Sediaan Krim Tabir Surya dari Ekstrak Etanol Buah Bisbul (<i>Diospyros blancoi</i>)</b> Harry Noviarda, Devi Ratnasari, Muhammad Fermadianto.....	262-271
<b>Ilustrasi pada sampul halaman depan: Gambar 1 (Syarifah <i>et al</i>) halaman 181</b>	

## **Efek Antidiare Infusa Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L.) pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster yang Di Induksi *Oleum ricini***

### **(Antidiarrheal Effect of Senggani Leaves Infusion (*Melastoma malabathricum* L.) in Swiss Webster Male Mice Induced by *Oleum ricini*)**

NOVA SULISKA<sup>1\*</sup>, THITO DWI E.<sup>2</sup>, HERLINDA<sup>2</sup>

1) Kelompok Keahlian Farmakologi-Farmasi Klinik, Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung

2) Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Al Ghifari

\*Penulis korespondensi, Hp : 082317651596

e-mail: novasuliska@fa.itb.ac.id

Diterima 11 Juni 2019, Disetujui 13 September 2019

**Abstrak:** Diare merupakan gangguan buang air besar (BAB) yang ditandai dengan BAB lebih dari 3 kali sehari dengan konsistensi tinja cair, dapat disertai dengan darah dan atau lendir. Salah satu tanaman yang berkhasiat dan digunakan masyarakat sebagai antidiare adalah senggani (*Melastoma malabathricum* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dan dosis efektif infusa daun senggani terhadap mencit yang diinduksi diare dengan *Oleum ricini*. Mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok: kelompok kontrol positif (induksi diare), kelompok pembanding (loperamid), dan kelompok uji infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB, 52 mg/kg BB, dan 104 mg/kg BB. Mencit diinduksi diare dengan *Oleum ricini*, 30 menit kemudian mencit diberikan sediaan uji kecuali kelompok kontrol positif. Frekuensi, bobot, dan konsistensi feses diukur setiap 30 menit selama 4 jam. Hasil penelitian menunjukkan kelompok infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan frekuensi dan bobot feses yang lebih rendah berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,5$ ) pada pengamatan menit ke-240. Konsistensi feses kelompok infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB cenderung normal pada pengamatan menit ke-240. Infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan efek antidiare yang paling baik dibandingkan dengan infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB dan 104 mg/kg BB pada mencit yang diinduksi *Oleum ricini*.

**Kata Kunci:** daun senggani, diare, *Oleum ricini*, *Melastoma malabathricum* L.

**Abstract:** Diarrhea is a disorder of defecation more than 3 times a day with the consistency of liquid stool, blood and/or mucus. The plants that is used by the community for diarrhea is senggani (*Melastoma malabathricum* L.). This study aims to determine the antidiarrheal effects and dose of senggani leaves infusion in mice induced by *Oleum ricini*. Mice were grouped into 5 groups: the positive control group (diarrhea induction), the comparison group (loperamide), and senggani leaves infusion test group with a dose of 26 mg/kg bw, 52 mg/kg bw, and 104 mg/kg bw. Mice induced diarrhea with *Oleum ricini*, 30 minutes later the mice were given the samples, except the positive control group. The faecal frequency, weight, and consistency were measured every 30 minutes for 4 hours. Senggani leaves infusion group 52 mg/kg bw showed the frequency and faecal weight were significantly different compared to the positive control group ( $P < 0.5$ ) at 240 minutes observation. The faecal consistency of senggani leaves infusion groups 52 mg/kg bw tends to be normal at 240 minutes observation. Senggani leaves infusion 52 mg/kg bw showed the best antidiarrheal effect compared to senggani leaf infusion 26 mg/kg bw and 104 mg/kg bw in *Oleum ricini*-induced mice.

**Keywords:** senggani leaves, diarrhea, *Oleum ricini*, *Melastoma malabathricum* L.

## PENDAHULUAN

DIARE merupakan gangguan buang air besar (BAB) yang ditandai dengan BAB lebih dari 3 kali sehari dengan konsistensi tinja cair, dapat disertai dengan darah dan atau lendir (Kemenkes, 2013). Insidensi diare pada balita semakin meningkat setiap tahun, berdasarkan data hasil riset kesehatan dasar tahun 2018, insidensi diare pada balita di Indonesia meningkat menjadi 15,2% sebelumnya 6,7% pada tahun 2013 dan insidensi tertinggi terjadi di provinsi Aceh (10,2%). Karakteristik diare balita tertinggi terjadi pada kelompok umur 12-23 bulan (7,6%), laki-laki (5,5%), tinggal di daerah pedesaan (5,3%), dan kelompok kuintil indeks kepemilikan terbawah (6,2%)<sup>(1,2)</sup>.

Berdasarkan penyebabnya diare diklasifikasikan menjadi diare spesifik dan non spesifik. Diare spesifik dapat disebabkan oleh infeksi patogen seperti virus, bakteri, dan parasit. Beberapa bakteri yang dapat menyebabkan diare yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perferingens*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sp*, *Salmonella sp*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio haemolyticus*<sup>(3)</sup>.

Sebagian besar obat antidiare sintetik dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, sehingga diharapkan dapat diperolehnya obat alternatif dari bahan alam yang lebih aman. Salah satu tanaman yang berkhasiat dan digunakan masyarakat sebagai antidiare adalah senggani (*Melastoma malabathricum* L.). Secara tradisional, daun senggani digunakan masyarakat Indonesia untuk mengobati demam (antipiretik), penghilang rasa nyeri (analgetik), peluruh kencing (diuretik), melancarkan aliran darah, menghilangkan bengkak (anti-inflamasi), bisul, diare, haid tidak lancar, hepatitis, sariawan, ASI tidak lancar, keracunan singkong dan radang pada dinding pembuluh darah<sup>(4)</sup>. Daun senggani digunakan oleh masyarakat suku Karen Thailand sebagai obat untuk diare, disentri, dan sariawan<sup>(5)</sup>. Daun senggani juga digunakan oleh masyarakat Batak Toba sebagai obat tradisional untuk mengobati luka dan nyeri pada perut<sup>(6)</sup>.

Secara umum, bagian tanaman senggani seperti daun, akar dan kulit digunakan oleh masyarakat Malaysia, India, dan Indonesia sebagai obat tradisional untuk penyakit diare, disentri, hemoroid, luka, sakit perut, kembung, dan sariawan<sup>(7)</sup>. Berdasarkan latar belakang diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui efek dan dosis yang paling efektif dari infusa daun senggani dalam mengatasi diare.

## BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.), loperamid HCl, aquadest, CMC Na, Oleum ricini, gelatin 1%, amil alkohol, asam klorida 2 N. Hewan uji (mencit jantan *Swiss webster* dengan berat badan 20-30 g sebanyak 25 ekor) diperoleh dari Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung.

### Alat

Gunting, beaker glass, batang pengaduk, sonde oral, kertas saring, gelas ukur, labu ukur, tabung reaksi, mortir dan stamper, penangas air, alat timbang analitik, toples, bejana kaca, spatel, *stopwatch*, termometer. .

### Metode

Sebanyak 25 ekor mencit jantan *Swiss webster* dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, diaklimatisasi selama 7 hari dan diberi makan pakan standar laboratorium serta minum *ad libitum*.

Kelompok uji terdiri dari :

1. Kelompok 1: Kelompok kontrol positif (suspensi CMC Na 1%)
2. Kelompok 2: Kelompok pembanding (suspensi loperamid dosis 2 mg / kg BB)
3. Kelompok 3: Kelompok Dosis 1 (infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB)
4. Kelompok 4: Kelompok Dosis 2 (infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB)
5. Kelompok 5: Kelompok Dosis 3 (infusa daun senggani dosis 104 mg/kg BB)

Mencit dipuaskan terlebih dahulu selama kurang lebih 2 jam sebelum percobaan, tetapi air minum tetap diberikan. Selanjutnya, mencit diinduksi diare dengan pemberian 0,5 ml *Oleum ricini* secara oral. 30 menit setelah induksi, masing-masing mencit diberikan sediaan uji sesuai kelompok yang sudah ditentukan. Setiap mencit di tempatkan terpisah dan tempat dari masing-masing mencit di lapiasi dengan kertas saring. Proses pengamatan dilakukan setiap 30 menit selama 4 jam, meliputi frekuensi diare, bobot feses dan konsistensi feses. Data dianalisis dengan metode statistik uji *t student*.



Gambar 1. Daun Senggani<sup>(8)</sup>



## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil determinasi yang dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Padjadjaran Bandung menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah benar tanaman senggani (*Melastoma malabathricum* L.). Hasil uji fitokimia menunjukkan daun segar dan infusa daun senggani mengandung saponin, tannin, dan flavonoid yang ditunjukkan pada Tabel 1. Hal ini sesuai dengan pengujian yang dilakukan oleh Zakaria dkk. yang melaporkan hasil skrining fitokimia daun senggani mengandung flavonoid, triterpen, tannin, saponin, dan steroid<sup>(9)</sup>.

Oleum ricini digunakan sebagai penginduksi diare. Oleum ricini di usus halus akan dihidrolisis oleh lipase menjadi gliserol dan zat aktifnya yakni asam risinoleat, yang terutama bekerja di usus halus untuk menstimulasi sekresi cairan dan elektrolit serta menstimulasi peristaltik usus<sup>(10)</sup>.

Sediaan infusa daun senggani dipilih karena cara pembuatannya sederhana yaitu mencampurkan simplisia dengan air secukupnya dan dipanaskan pada suhu 900. Metode ini lebih mudah diikuti masyarakat

**Tabel 1. Hasil skrining fitokimia daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.).**

Golongan senyawa	Daun segar	Infusa
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Flavonoid	+	+

Keterangan:

- + = terdapat senyawa yang di uji
- = tidak terdapat senyawa yang di uji

dan tidak membutuhkan peralatan khusus. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sediaan yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh mikroorganisme, sehingga sediaan tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam<sup>(11)</sup>.

Parameter pertama yang diamati pada pengujian ini adalah jumlah total diare sampai pengamatan menit ke 240 yang dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif mengalami frekuensi diare yang paling banyak pada setiap pengamatan 30 menit dan sampai akhir pengamatan. Hal ini menunjukkan bahwa induksi diare menggunakan *Oleum ricini* berhasil.

Kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan jumlah total diare yang paling sedikit dibandingkan dengan kelompok uji infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB dan dosis 104 mg/kg BB.

Parameter kedua yang diamati pada pengujian ini adalah frekuensi diare yang dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB terjadi penurunan frekuensi diare dan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan menit ke-240.

Kelompok uji infusa daun senggani pada dosis 26 mg/kg BB dan dosis 104 mg/kg BB menunjukkan penurunan frekuensi diare tetapi tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan hingga menit ke-240.

Kelompok pembanding (Loperamid 2 mg/kg BB) menunjukkan penurunan frekuensi diare dan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan menit ke-240. Kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan penurunan frekuensi diare yang

**Tabel 2. Data jumlah total diare pada masing-masing kelompok uji**

Kelompok	Frekuensi diare pada menit ke-								Jumlah total diare
	30	60	90	120	150	180	210	240	
Kontrol positif	2,00	2,20	2,00	2,20	2,00	2,40	1,60	1,80	16,20
Pembanding (Loperamid 2 mg/kg BB)	1,20	1,20	0,80	0,80	1,00	0,60	0,80	0,40	6,80
Dosis 1 (Infusa daun senggani 26 mg/kg BB)	2,00	2,00	1,60	1,60	1,60	1,40	1,40	1,40	13,00
Dosis 2 (Infusa daun senggani 52 mg/kg BB)	1,60	1,80	1,20	1,20	1,40	1,00	0,80	0,60	9,60
Dosis 3 (Infusa daun senggani 104 mg/kg BB)	2,20	2,40	1,80	2,00	1,80	1,80	1,80	1,60	15,40

Tabel 3. Data analisis statistik frekuensi diare pada masing-masing kelompok uji

Kelompok	Frekuensi diare pada menit ke-							
	30	60	90	120	150	180	210	240
Kontrol positif	2,00 ±	2,20 ±	2,00 ±	2,20 ±	2,00 ±	2,4 ±	1,60 ±	1,80 ±
Pembanding (Loperamid 2 mg/kg BB)	1,22 ±	1,30 ±	1,58 ±	1,48 ±	1,87 ±	1,82 ±	0,89 ±	0,84 ±
Dosis 1 (Infusa daun senggani 26 mg/kg BB)	1,20 ±	1,20 ±	0,80 ±	0,80 ±	1,00 ±	0,60 ±	0,80 ±	0,40 ±
Dosis 2 (Infusa daun senggani 52 mg/kg BB)	0,45 ±	0,45 ±	0,84 ±	0,84 ±	1,00 ±	0,55 ±	0,84 ±	0,55* ±
Dosis 3 (Infusa daun senggani 104 mg/kg BB)	2,00 ±	2,00 ±	1,60 ±	1,60 ±	1,60 ±	1,40 ±	1,40 ±	1,40 ±
	0,71 ±	0,71 ±	0,55 ±	0,89 ±	0,55 ±	0,55 ±	0,55 ±	0,89 ±
	1,60 ±	1,80 ±	1,20 ±	1,20 ±	1,40 ±	1,00 ±	0,80 ±	0,60 ±
	0,55 ±	0,84 ±	0,84 ±	0,84 ±	0,55 ±	0,71 ±	0,84 ±	0,55* ±
	2,20 ±	2,40 ±	1,80 ±	2,00 ±	1,80 ±	1,80 ±	1,80 ±	1,60 ±
	0,84 ±	1,14 ±	0,45 ±	1,00 ±	0,45 ±	0,84 ±	0,84 ±	0,89 ±

Keterangan: \* berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ )

Tabel 4. Data analisis statistik bobot feses pada masing-masing kelompok uji

Kelompok	Bobot feses (g)							
	30	60	90	120	150	180	210	240
Kontrol positif	0,20 ±	0,20 ±	0,20 ±	0,22 ±	0,20 ±	0,24 ±	0,16 ±	0,18 ±
Pembanding (Loperamid 2 mg/kg BB)	0,12 ±	0,12 ±	0,16 ±	0,15 ±	0,19 ±	0,18 ±	0,09 ±	0,08 ±
Dosis 1 (Infusa daun senggani 26 mg/kg BB)	0,12 ±	0,12 ±	0,08 ±	0,08 ±	0,10 ±	0,06 ±	0,08 ±	0,04 ±
Dosis 2 (Infusa daun senggani 52 mg/kg BB)	0,04 ±	0,04 ±	0,08 ±	0,08 ±	0,10 ±	0,05 ±	0,08 ±	0,05* ±
Dosis 3 (Infusa daun senggani 104 mg/kg BB)	0,22 ±	0,24 ±	0,18 ±	0,20 ±	0,18 ±	0,18 ±	0,18 ±	0,16 ±
	0,08 ±	0,11 ±	0,04 ±	0,10 ±	0,04 ±	0,08 ±	0,08 ±	0,09 ±
	0,16 ±	0,18 ±	0,12 ±	0,12 ±	0,14 ±	0,10 ±	0,08 ±	0,06* ±
	0,05 ±	0,08 ±	0,08 ±	0,08 ±	0,05 ±	0,07 ±	0,08 ±	0,05 ±
	0,20 ±	0,20 ±	0,16 ±	0,16 ±	0,16 ±	0,14 ±	0,14 ±	0,14 ±
	0,07 ±	0,07 ±	0,05 ±	0,09 ±	0,05 ±	0,05 ±	0,05 ±	0,09 ±

Keterangan: \* berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ )

hampir sama dengan kelompok pembanding pada pengamatan menit ke-240.

Parameter ketiga yang diamati pada pengujian ini adalah bobot feses yang dapat dilihat pada Tabel 4. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg bb bobot feses lebih kecil dan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan menit ke-240.

Kelompok uji infusa daun senggani pada dosis 26 mg/kg BB dan dosis 104 mg/kg BB menunjukkan bobot feses lebih kecil tetapi tidak berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan hingga menit ke-240.

Hasil penelitian menunjukkan pada dosis 104 mg/kg BB terjadi penurunan aktivitas antidiare. Pada sediaan infusa daun senggani terdapat beberapa

senyawa yang memiliki aktivitas antidiare dan mungkin juga terdapat senyawa lain yang bersifat antagonisnya (menurunkan efek antidiare), semakin tinggi dosis maka senyawa yang bersifat antagonisnya juga semakin banyak hingga dapat menurunkan aktivitas antidiare.

Kelompok pembanding (Loperamid 2 mg/kg BB) menunjukkan penurunan frekuensi diare dan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan menit ke-240. Kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan penurunan frekuensi diare yang hampir sama dengan kelompok pembanding pada pengamatan menit ke-240.

Kelompok pembanding (loperamid 2 mg/kg BB) menunjukkan bobot feses yang lebih kecil dan berbeda bermakna jika dibandingkan dengan kelompok kontrol

positif ( $P < 0,05$ ) pada pengamatan menit ke-240.

Bobot feces kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB hampir sama dengan kelompok pembandingan loperamid. Hal ini menunjukkan bahwa efek antidiare infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB hampir sama dengan efek antidiare dari loperamid.

Loperamid merupakan obat golongan agonis reseptor opioid yang mekanisme kerjanya mengurangi aktivitas pleksus myenteric usus besar sehingga mengurangi ritme kontraksi usus, menghambat peristaltik dan memperpanjang waktu transit, mempengaruhi perpindahan air dan elektrolit melalui mukosa usus, meningkatkan viskositas dan mencegah kehilangan air dan elektrolit. (12)

*Oleum ricini* menimbulkan diare dengan cara menstimulasi usus halus, sehingga loperamid HCl merupakan obat pilihan antidiare untuk diare yang disebabkan oleh *Oleum ricini*.

Parameter keempat yang diamati pada pengujian ini adalah konsistensi feces yang dapat dilihat pada Tabel 5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada

kelompok kontrol positif terlihat konsistensi feces masih lembek pada pengamatan hingga menit ke-240. Hal ini menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif, diare masih terjadi sampai menit ke-240.

Pada kelompok uji infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB dan dosis 104 mg/kg BB, konsistensi feces masih lembek dan berair, sedangkan pada kelompok uji dosis 52 mg/kg BB konsistensi feces sudah cenderung normal. Hal ini menunjukkan bahwa infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan efek antidiare yang paling baik dibandingkan dengan infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB dan 104 mg/kg BB. Semakin besar dosis, efek antidiare tidak semakin baik, hal ini menunjukkan bahwa peningkatan dosis tidak sebanding dengan efek antidiare.

Dari semua parameter, kelompok uji infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan efek antidiare paling baik dan hampir mirip dengan efek antidiare kelompok pembandingan loperamid.

Hasil penapisan fitokimia dari daun segar dan infusa daun senggani menunjukkan adanya golongan

**Tabel 5. Data konsistensi feces pada masing-masing kelompok uji**

Kelompok	Konsistensi feces pada menit ke-							
	30	60	90	120	150	180	210	240
Kontrol positif	+	+	++	-	+++	+++	++	++
	+++	+++	-	++	++	+++	++	++
	+	+	+++	++	-	++	+	+
	+	++	++	++	+	-	+	+
	+	+	+	++	++	+	+	++
Pembandingan (Loperamid 2 mg/kg BB)	++	+	+	-	++	-	+	-
	+	+	++	+	-	+	-	-
	+	++	+	-	++	-	+	+
	+	+	-	+	-	+	-	+
	+	+	-	++	+	+	++	-
Dosis 1 (Infusa daun senggani 26 mg/kg BB)	++	+++	++	+	++	+	++	+
	+	+	++	++	+	+	++	++
	++	+	+	+	++	++	++	++
	++	++	++	++	++	+	++	+++
	+	++	+	+++	++	+	++	++
Dosis 2 (Infusa daun senggani 52 mg/kg BB)	++	+++	++	+	++	++	++	+
	+	+	++	+	+	+	-	-
	++	++	+	-	++	-	+	+
	++	-	-	++	+	+	-	+
	+	++	+	++	+	+	+	-
Dosis 3 (Infusa daun senggani 104 mg/kg BB)	++	+++	++	+	++	++	+++	++
	++	+++	++	++	++	+	+	++
	++	++	++	+++	++	++	+	+
	++	+	++	++	++	+	++	+++
	+	++	+	++	++	+++	++	+

Keterangan:

+ = feces normal

++ = feces lembek

+++ = feces berair/berlendir

senyawa saponin, tanin, dan flavonoid.

Tanaman senggani mengandung *kaempferol-3-O-β-D-xyloside*, *quercetin-1 3-O-α-L-rhamnosyl-(1,2)-β-D-galactoside*, *flavan-3-ol*, *4-methylpeonidin-7-O-β-D-glucoside*, antosianin dan tannin <sup>(7)</sup>.

Tanin merupakan adstringensia yang mekanismenya menciutkan pori-pori dan selaput lendir usus sehingga mengurangi absorpsi air ke dalam usus dan mengurangi peristaltik usus <sup>(13)</sup>. Golongan senyawa yang diprediksi berperan sebagai antidiare pada infusa daun senggani adalah tanin.

Ekstrak air daun senggani terbukti memiliki aktivitas antidiare dengan menurunkan frekuensi diare dan bobot feses pada hewan yang diinduksi *Oleum ricini*, efeknya seperti loperamid. Loperamid mempengaruhi motilitas, frekuensi, konsistensi dan sekresi <sup>(14)</sup>.

### SIMPULAN

Infusa daun senggani dosis 52 mg/kg BB menunjukkan efek antidiare yang paling efektif dibandingkan dengan infusa daun senggani dosis 26 mg/kg BB dan dosis 104 mg/kg BB pada mencit yang diinduksi *Oleum ricini*.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI. 2013.
2. Kemenkes RI. Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI. 2018.
3. Purwanto, S. Uji aktivitas antibakteri fraksi aktif ekstrak etanol daun senggani (*Melastoma malabathricum* L) terhadap *Escherichia Coli*. Jurnal Ilmu Keperawatan Sriwijaya. 2015.2.
4. Hariana, A. 262 tumbuhan obat dan khasiatnya. Bogor: Penebar Swadaya; 2013.
5. Tangjitman, K., Wongsawad, C., Kamwong, K., Sukkho, T, dan Trisonthi, C. Ethnomedicinal plants used for digestive system disorders by the Karen of northern Thailand. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. 2015. 11:27. DOI 10.1186/s13002-015-0011-9
6. Silalahi, M., Nisyawati, dan Pandiangan, D. Medicinal plants used by the Batak Toba Tribe in Peadundung Village, North Sumatra, Indonesia. Biodiversitas. 2019. 20(2): 510-525. DOI: 10.13057/biodiv/d200230
7. Joffry, M. D., N. J. Yob, M. S. Rofiee, M. M. R. Meor Mohd. Affandi, Z. Suhaili, F. Othman, Md. Akim, M. N. M. Desa, and Z. A. Zakaria. *Melastoma malabathricum* (L.) Smith Ethnomedicinal Uses, Chemical Constituents, and Pharmacological Properties: A review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2012. 2012:48. doi:10.1155/2012/258434.
8. <https://www.asiamedicinalplants.info/melastoma-malabathricum-l/>, diakses tanggal 10 September 2019.
9. M. Zakaria and M. A. Mohd, Traditional Malay Medicinal Plants, Fajar Bakti Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia. 1994.
10. Goodman & Gilman. Dasar Farmakologi Terapi. Editor Joel G Hardman, Lee E. Limbird, Konsultan Editor Alfred Goodman Gilman. Alih bahasa Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Edisi 10. Volume 1. Jakarta: EGC; 2007.
11. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Sediaan Galenik. Jakarta: Depkes RI; 1986.
12. Rahardja K dan Tjay, H T. Obat-Obat Penting. Jakarta: Elex Media Komputindo; 2007.
13. Nurhalimah, H., Wijayanti, N., Widyarningsih, T.D. Efek antidiare ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap mencit jantan yang diinduksi bakteri *Salmonella thypimurium*. Jurnal Pangan dan Agroindustri. 2015. 3(3): 1083-1094.
14. Sunilson J.A.J, Anandarajagopal K., Kumari, A, V, A, G, dan Mohan, S. Indian journal of pharmaceutical sciences. 2009. 7(16): 691-695.

## Hubungan antara Karakteristik Pasien dan Terapi terhadap Nilai Retensi di RSJ Menur Surabaya

### (Relationship between Patient Characteristics and Therapy to Retention Rate at Menur Psychiatric Hospital Surabaya)

ARIFANI SISWIDIASARI<sup>1\*</sup>, ANTONIUS ADJI PRAYITNO SETIADI<sup>1,2</sup>, LILA NURMAYANTI<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Farmasi Klinis dan Komunitas, Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Jalan Raya Kali Rungkut Surabaya, 60293, Indonesia

<sup>2</sup>Pusat Informasi Obat dan Layanan Kefarmasian (PIOLK), Gedung FF Lantai 5, Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya, 60293, Indonesia

<sup>3</sup>Rumah Sakit Jiwa Menur, Manyar Sabrangan, Mulyorejo, Jalan Raya Menur No. 120, Kertajaya, Gubeng, Surabaya, 60282, Indonesia

\*Penulis korespondensi, Hp : 087761118833  
e-mail: arifanisiswi@gmail.com

Diterima 2 Juli 2018, Disetujui 6 Maret 2019

**Abstrak:** Program terapi rumatan metadon (PTRM) merupakan salah satu upaya pemerintah untuk menangani penyalahgunaan narkotika, psikotropika, dan zat adiktif lainnya (NAPZA) di Indonesia. Parameter keberhasilan PTRM dapat dilihat dari nilai retensi yang merupakan lamanya pasien dalam menjalani terapi rumatan metadon setelah mendapatkan terapi stabilisasi (pemberian metadon selama 6 minggu atau 42 hari). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara karakteristik pasien dan terapi terhadap nilai retensi pada PTRM di RSJ Menur Surabaya. Penelitian dengan rancangan *cross-sectional* ini dilakukan secara retrospektif dengan melihat data rekam medis pasien pecandu NAPZA. Penelitian ini melibatkan 41 subyek yang telah dipilih secara *consecutive sampling*. Data karakteristik pasien dan terapi dianalisis secara deskriptif dan hubungan variabel dengan nilai retensi dianalisis menggunakan korelasi Spearman. Hasil penelitian menunjukkan nilai retensi pada 6 bulan (4,9%), 9 bulan (12,2%), 12 bulan (19,5%), 24 bulan (26,8%), 36 bulan (26,8%), 48 bulan (4,9%), dan 60 bulan (4,9%). Berdasarkan korelasi Spearman, dosis rumatan terkecil merupakan variabel yang menunjukkan korelasi yang signifikan terhadap nilai retensi ( $p = 0,036$  dengan korelasi cukup  $r = -0,328$ ). Oleh sebab itu, pemilihan dosis terkecil pada pasien yang menjalani terapi rumatan metadon perlu menjadi perhatian khusus untuk meningkatkan keberhasilan PTRM, yang dalam penelitian ini ditunjukkan dari nilai retensi.

**Kata kunci:** Metadon, dosis, nilai retensi, PTRM, NAPZA.

**Abstract:** Methadone maintenance therapy program (MMTP) is the government's efforts to reduce drug abuse in Indonesia. The MMTP success parameters can be seen from the retention rate which is the length of time patients undergo methadone maintenance therapy after receiving stabilization therapy (administration of methadone for 6 weeks or 42 days). This study aimed to determine the relationship of the patients characteristics and therapy to the retention rate in Menur Psychiatric Hospital Surabaya. This cross-sectional study was conducted retrospectively by reviewed the patient's medical record and involved 41 subjects who were selected by consecutive sampling. Patient characteristics and therapy was analyzed descriptively and the variables relationship with retention rate was analyzed by using Spearman's correlation test. The results showed the retention rate at 6 months (4.9%), 9 months (12.2%), 12 months (19.5%), 24 months (26.8%), 36 months (26.8%), 48 months (4.9%), and 60 months (4.9%). According to Spearman's correlation test, the smallest maintenance dose shows a significant correlation to the retention rate ( $p = 0.036$  with sufficient correlation  $r = -0.382$ ). Therefore, the selection of the smallest dose in patients undergoing MMTP needs a particular concern to increase the successfulness of this program, which is indicated by the retention rate in this study.

**Keywords:** Methadone, dose, retention rate, MMTP, drugs.

## PENDAHULUAN

MASALAH penyalahgunaan narkotika, psikotropika dan zat adiktif lainnya (NAPZA) atau dikenal dengan istilah lain sebagai narkotika dan obat berbahaya (NARKOBA) merupakan salah satu masalah yang sangat serius karena dapat mengancam masa depan bangsa di seluruh negara maju maupun di negara berkembang<sup>(1)</sup>. Jumlah kasus narkoba di Indonesia dari tahun ke tahun mengalami peningkatan baik pada konteks pengguna, mata rantai yang berkaitan dengan barang haram tersebut (produsen, bandar, pemakai) maupun jumlah narkoba itu sendiri yang semakin beragam<sup>(2)</sup>.

Penggunaan narkoba disuntik atau *Injecting Drug User* (IDU) merupakan salah satu cara penggunaan narkoba yang paling berisiko yang dapat menimbulkan penularan infeksi HIV/AIDS, hepatitis B, hepatitis C dan penyakit infeksi lainnya yang ditularkan melalui darah atau cairan tubuh yang disebabkan penggunaan jarum suntik yang bergantian dan tidak steril<sup>(3)</sup>. Salah satu narkoba yang digunakan dengan cara disuntik adalah heroin. Oleh karena itu, program pengurangan dampak buruk dari penularan NAPZA suntik (*harm reduction*) mutlak diperlukan. Salah satu kegiatan pendekatan *harm reduction* adalah terapi substitusi dengan pemberian obat oral metadon sebagai salah satu cara untuk mencoba melepaskan pecandu dari ketergantungan NAPZA<sup>(4,5)</sup>.

Pada kurun waktu 2006-2010, data resmi dari Badan Narkotika Nasional juga mencatat prevalensi penyalahgunaan narkoba 1,99% dari jumlah penduduk Indonesia pada tahun 2008, yang artinya mencapai 3,6 juta orang. Selanjutnya, berdasarkan hasil penelitian BNN yang bekerjasama dengan Pusat Penelitian Kesehatan Universitas Indonesia (Puslitkes UI) tahun 2011, diketahui bahwa angka prevalensi penyalahgunaan narkoba telah mencapai 2,2% dari total populasi penduduk (berusia 10-60 tahun) atau sekitar 4 juta orang. Hal ini mengalami peningkatan 0,21% bila dibandingkan tahun 2008 (1,99%) atau sekitar 3,6 juta orang. Tahun 2015, angka prevalensi penyalahgunaan narkoba mencapai 2,8% dari total penduduk Indonesia atau sekitar 5,1 juta jiwa<sup>(2)</sup>.

Pemerintah menyelenggarakan program terapi rumatan metadon (PTRM), melalui Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 57 Tahun 2013 tentang penetapan rumah sakit pengampu dan satelit program terapi rumatan metadon serta pedoman program terapi rumatan metadon, telah menetapkan beberapa rumah sakit di Indonesia, terdapat 25 rumah sakit pengampu program terapi rumatan metadon dan terdapat 31 satelit pelayanan program terapi rumatan metadon yang terdiri dari beberapa puskesmas dan

lapas/rutan. Berdasarkan hasil uji coba program terapi rumatan metadon di RS Sanglah dan Rumah Sakit Ketergantungan Obat (RSKO), diperoleh hasil yang positif yaitu perbaikan kualitas hidup dari segi fisik, psikologi, hubungan sosial dan lingkungan, penurunan angka kriminalitas, penurunan depresi dan perbaikan kembali ke aktivitas sebagai anggota masyarakat<sup>(5)</sup>.

Terapi substitusi yang dilakukan dengan cara memberikan obat oral metadon ini terbukti cukup efektif dalam meningkatkan kesejahteraan pasien agar dapat kembali melakukan aktivitas pekerjaan dalam masyarakat. Salah satu program substitusi adalah PTRM. PTRM sendiri memiliki dua tujuan pilihan. Tujuan pertama yaitu untuk membantu pecandu agar berhenti menggunakan narkoba yang diganti dengan metadon yang dikurangi secara bertahap selama jangka waktu tertentu sedangkan tujuan kedua yaitu untuk mengurangi dampak buruk yang diakibatkan oleh penggunaan NAPZA suntikan<sup>(4)</sup>. PTRM dipercaya paling bermanfaat untuk menangani ketergantungan opioid serta mengurangi bahaya akibat penggunaannya.

Metadon merupakan obat sintesis yang termasuk golongan opiat yang diberikan dalam bentuk sediaan oral kepada pasien sebagai terapi pengganti adiksi opioid. Tujuan pemberian metadon adalah untuk memberikan kesempatan kepada penggunaannya untuk mengubah hidupnya menjadi lebih stabil, mengurangi risiko terkait penggunaan narkoba suntik dan juga mengurangi kejahatan yang sering terkait dengan kecanduan<sup>(6)</sup>. Metadon digunakan sebagai obat yang aman dan efektif untuk menarik diri pecandu dari heroin tetapi bukanlah untuk berhenti<sup>(7)</sup>. Dosis awal metadon berada di kisaran 20-40 mg dan berkisar  $\leq 40$  mg pada akhir minggu pertama<sup>(8)</sup>. Kontinuitas pengobatan sangat penting untuk menunjukkan sedikit atau tidak adanya perbaikan<sup>(9)</sup>. Pasien yang sudah mencapai stabilisasi yang cukup dengan dosis metadon yang tepat, maka pasien dapat bekerja secara normal, mengurangi tindakan kekerasan dan menurunkan penyebaran HIV dengan menurunkan penggunaan jarum suntik. Pasien dengan dosis stabilisasi dalam terapi ini juga dapat diikutsertakan dalam konseling dan intervensi perilaku lainnya untuk mempercepat perbaikan dan rehabilitasi<sup>(10)</sup>.

Nilai retensi adalah lamanya pasien didalam menjalani terapi rumatan metadon setelah mendapatkan terapi stabilisasi (pemberian metadon selama 6 minggu atau 42 hari) yang merupakan salah satu indikator dalam terapi rumatan metadon. Nilai retensi (*retention rate*) bisa digunakan untuk mengukur keberhasilan PTRM. Penelitian yang dilakukan Pahlemy, menemukan *retention rate* pasien terapi metadon di Rumah Sakit Umum Pusat Fatmawati

adalah 46,8% pada 1 tahun pengobatan terapi metadon<sup>(11)</sup>. Sedangkan penelitian dari Aprilia dkk., *retention rate* pasien terapi metadon di Puskesmas Kassi-Kassi adalah 93,3% selama 6 bulan pengobatan terapi metadon<sup>(12)</sup>. Sejalan dengan penelitian dari Rahayu dan Syarif, *retention rate* pasien terapi metadon di Puskesmas Kecamatan Tebet adalah 84,6% pada 1 tahun pengobatan terapi metadon<sup>(13)</sup>.

Jenis prediktor retensi antara lain sebagai berikut: karakteristik pasien yaitu usia, jenis kelamin, riwayat kriminal, riwayat penggunaan opioid, penyesuaian psikologikal, pekerjaan, tinggal dengan keluarga atau partner, penggunaan alkohol, penggunaan banyak obat-obatan lain serta motivasi dan ekspektasi terhadap terapi dan karakteristik terapi yaitu dosis metadon, filosofi terapi, pelayanan tambahan, aksesibilitas klinik, biaya terapi, dosis bawa pulang serta penilaian cepat<sup>(14)</sup>.

PTRM yang diberikan pada pasien pecandu NAPZA di Rumah Sakit Jiwa (RSJ) Menur Surabaya belum pernah dipublikasikan dalam bentuk hasil penelitian. Di mana Rumah Sakit Jiwa Menur Surabaya yang merupakan rumah sakit khusus dengan klasifikasi kelas A. Dengan mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi nilai retensi pada pasien pecandu NAPZA yang diperoleh diharapkan dapat menjadi *evidence based* pada terapi berikutnya. Berdasarkan uraian tersebut maka perlu dilakukan penelitian terkait dengan karakteristik pasien dan terapi terhadap nilai retensi dalam menjalankan PTRM. Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul “Hubungan antara Karakteristik Pasien dan Terapi terhadap Nilai Retensi pada Program Terapi Rumatan Metadon di RSJ Menur Surabaya”. Dalam penelitian ini, pengambilan data dilakukan di RSJ Menur Surabaya dari bulan Oktober-Desember 2017.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Data rekam medis pasien rawat jalan yang pertama kali mengikuti PTRM di RSJ Menur Surabaya dari bulan Januari 2012 - Desember 2016 yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak masuk kriteria eksklusi.

**METODE.** Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan rancangan *cross-sectional* yang dilakukan secara retrospektif pada pasien pecandu NAPZA di RSJ Menur Surabaya. Rancangan *cross-sectional* merupakan rancangan penelitian dengan melakukan pengukuran atau pengamatan pada saat yang bersamaan atau melakukan pemeriksaan status paparan dan status penyakit pada titik yang sama. Pengambilan data yang dilakukan secara retrospektif yaitu dari data sekunder dengan cara melihat rekam

medis pasien yang terdaftar dalam PTRM di RSJ Menur Surabaya.

Sampel penelitian ini adalah semua data rekam medis pasien rawat jalan yang pertama kali mengikuti PTRM di RSJ Menur Surabaya dari bulan Januari 2012 - Desember 2016 yang memenuhi kriteria inklusi dan tidak masuk kriteria eksklusi.

Kriteria inklusi yaitu pasien pecandu NAPZA yang menjalani program terapi rumatan metadon (PTRM) di RSJ Menur Surabaya pada bulan Januari 2012 - Desember 2016, pasien pecandu NAPZA yang menerima terapi rumatan metadon untuk pertama kalinya di RSJ Menur Surabaya pada bulan Januari 2012 - Desember 2016, pasien berada dalam terapi lebih dari 6 minggu (42 hari), berusia 18 tahun atau lebih dan sudah pernah mencoba berhenti menggunakan opioid minimal satu kali. Kriteria eksklusi yaitu pasien PTRM yang mendapatkan terapi obat anti retroviral (ARV) dan anti tuberkulosis (OAT), data rekam medis pasien yang tidak lengkap/pasien pindahan/pasien transit, pasien dengan penyakit fisik berat, wanita hamil dan menyusui.

Metode pengambilan sampel dilakukan secara *consecutive sampling* yaitu pengambilan semua data rekam medis pasien yang ada di instalasi rawat jalan poliklinik rumatan metadon di RSJ Menur Surabaya yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi dalam penelitian ini. Berdasarkan data yang diperoleh total rekam medis pasien yang mengikuti program terapi rumatan metadon PTRM di RSJ Menur Surabaya adalah 41 pasien.

**Teknik Pengumpulan Data.** Data pasien pada penelitian ini dikumpulkan dari rekam medis pasien pecandu NAPZA yang mengikuti PTRM di RSJ Menur Surabaya. Dimana data tersebut dimasukkan dalam lembar pengumpulan data yang meliputi antara lain: 1) Data demografi yaitu meliputi: nomor rekam medis pasien, nama pasien, jenis kelamin, usia, tingkat pendidikan, pekerjaan, status pernikahan, riwayat hukum, riwayat penggunaan zat aktif, lama penggunaan opioid dan riwayat dosis terlewat; 2) Data pengobatan yaitu meliputi: dosis awal, dosis rumatan terkecil, dosis rumatan terbesar, dosis rumatan rata-rata dan dosis bawa pulang (THD) rata-rata yang diberikan kepada pasien dalam mengikuti PTRM. Data hasil penelitian ditabulasi berdasarkan analisis deskriptif. Hubungan antara variabel dianalisis menggunakan korelasi Spearman. Hubungan signifikan antara variabel ditandai dengan nilai  $p < 0,05$ .

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Nilai Retensi Pasien pada Terapi Rumatan Metadon di RSJ Menur Surabaya.** Nilai retensi

adalah lamanya pasien didalam menjalani terapi rumatan metadon setelah mendapatkan terapi stabilisasi (pemberian metadon selama 6 minggu atau 42 hari) yang merupakan salah satu indikator dalam mengukur keberhasilan dari PTRM. Penghitungan nilai retensi dimulai pada hari ke-43 (hari pertama setelah fase stabilisasi). Nilai retensi dipantau pada bulan ke-6, 9, 12, 24, 36, 48, dan 60 setelah fase stabilisasi. Detail nilai retensi pasien dapat dilihat pada Tabel 1.

Nilai retensi rata-rata pasien terapi rumatan metadon adalah 604 hari dengan *range* 95-1529 hari. *Retention rate* pasien terbesar dalam penelitian ini adalah pada 24 bulan 26,8%; 36 bulan 26,8%; dan 12 bulan 19,5%. Penelitian serupa yang ditemukan yaitu dengan kisaran 40%<sup>(15)</sup>. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh dosis terbesar rata-rata pada penelitian tersebut lebih kecil yaitu 44 mg dibandingkan dosis terbesar rata-rata pada penelitian ini yaitu 78,17 mg. Penelitian yang dilakukan Pahlemy, menemukan *retention rate* pasien terapi rumatan metadon sebesar 46,8% selama 1 tahun atau lebih pengobatan<sup>(11)</sup>. Penelitian serupa juga dilakukan Rahayu dan Syarif, menemukan *retention rate* pasien terapi rumatan metadon sebesar 84,6% pada 1 tahun pengobatan<sup>(13)</sup>.

Kunci keberhasilan dari terapi rumatan metadon ini adalah nilai dari retensi pasiennya. Pada beberapa penelitian menunjukkan *outcome* yang baik dari terapi ketergantungan obat berhubungan dengan lama terapi pasien. Sebagian besar pasien yang keluar dari terapi metadon sebelum waktu 1 tahun akan kembali menggunakan heroin (*relapse opiate*)<sup>(16)</sup>. Retensi dalam terapi rumatan metadon memiliki hubungan dengan peningkatan produktifitas sosial, berkurangnya tingkat kriminal, dan tingkat mortalitas. Jumlah persentase pasien yang bekerja, melanjutkan sekolah, dan bekerja di rumah tangga meningkat<sup>(14)</sup>.

**Hubungan Dosis Metadon terhadap Nilai Retensi dengan Analisis Korelasi Spearman.** Pada dosis rumatan terkecil dengan retensi terdapat korelasi yang signifikan nilai  $p = 0,036$  dengan korelasi cukup  $r = -0,328$  sedangkan pada dosis awal, dosis rumatan terbesar, dosis rumatan rata-rata dan dosis bawa pulang (THD) rata-rata, tidak ada korelasi yang signifikan. Detail hubungan dosis pasien dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan antara dosis awal ( $p = 0,290$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,169$ ), dosis rumatan terbesar ( $p = 0,791$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = 0,043$ ), dosis rumatan rata-rata ( $p = 0,967$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,007$ ) dan dosis bawa pulang (THD) rata-rata

**Tabel 1. Nilai retensi pasien pada terapi rumatan metadon di RSJ Menur Surabaya.**

Retensi	Frekuensi	Persentase (%)	Jumlah
6 bulan	2	4,9	41
9 bulan	5	12,2	39
12 bulan	8	19,5	34
24 bulan	11	26,8	26
36 bulan	11	26,8	15
48 bulan	2	4,9	4
60 bulan	2	4,9	2

**Tabel 2. Hubungan dosis metadon terhadap nilai retensi dengan analisis korelasi Spearman.**

Deskripsi dosis	Nilai r	Signifikansi
Dosis awal	$r = -0,169$	$p = 0,290$
Dosis rumatan terkecil	$r = -0,328$	$p = 0,036$
Dosis rumatan terbesar	$r = 0,043$	$p = 0,791$
Dosis rumatan rata-rata	$r = -0,007$	$p = 0,967$
Dosis bawa pulang (THD) rata-rata	$r = 0,224$	$p = 0,158$

( $p = 0,158$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = 0,224$ ) terhadap nilai retensi.

Pada dosis rumatan terkecil, menunjukkan ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,036$  atau  $p < 0,05$ ) dengan korelasi cukup ( $r = -0,328$ ) antara dosis rumatan terkecil terhadap nilai retensi. Pada hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemakaian dosis besar pada dosis rumatan terkecil maka waktu retensinya semakin pendek dengan nilai ( $r = -0,328$ ) yang artinya bahwa pemakaian dosis tinggi pada dosis rumatan terkecil terdapat kemungkinan risiko pasien untuk putus obat (metadon) akan semakin besar. Penelitian lain yang sejalan dengan penelitian ini telah dilakukan oleh Liu *et al.*, yang menunjukkan adanya hubungan antara dosis dengan retensi pasien terapi metadon<sup>(17)</sup>. Penelitian Huissod *et al.*, juga menunjukkan adanya hubungan antara dosis dengan retensi pasien terapi metadon. Pasien yang menerima dosis harian 50 mg/hari atau lebih cenderung lebih lama berada dalam terapi metadon<sup>(18)</sup>.

Dosis awal dalam penelitian ini tidak ada korelasi dosis awal terhadap nilai retensi. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang menyatakan tidak ada hubungan dosis awal metadon dengan retensi pasien PTRM ( $p = 0,895$ )<sup>(11)</sup>. Dosis rumatan terbesar dalam penelitian ini adalah 100 mg/hari. Pada penelitian ini tidak ada korelasi dosis rumatan terbesar terhadap nilai retensi. Terdapat perbedaan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yaitu menunjukkan hubungan yang bermakna antara dosis



rumatan terbesar dengan retensi ( $p = 0,000$ ). Dosis yang diberikan pada dosis rumatan terbesar adalah  $\geq 100$  mg dimana memiliki kemungkinan bertahan dalam terapi  $\geq 1$  tahun yaitu 3,5 kali lebih besar dibandingkan pasien dengan dosis terbesar  $< 100$  mg.

Peningkatan dosis sangat menguntungkan bagi pasien karena dapat meningkatkan retensi terapi<sup>(11)</sup>. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Rahayu dan Syarif, menunjukkan pasien dengan dosis  $\geq 60$  mg/hari memiliki kecenderungan untuk lebih lama menjalani terapi rumatan metadon<sup>(13)</sup>. Pada penelitian ini tidak ada pasien yang mendapatkan dosis  $\geq 100$  mg/hari sedangkan pasien yang mendapatkan dosis  $\geq 60$  mg/hari yaitu 9 pasien (65 mg; 67,5 mg; 70 mg; 80 mg; 90 mg; 95 mg; dan 100 mg).

Dosis rumatan rata-rata dalam penelitian ini tidak ada korelasi dosis rumatan rata-rata terhadap nilai retensi. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang menyatakan tidak ada hubungan dosis rumatan metadon dengan retensi pasien PTRM ( $p = 0,103$ )<sup>(11)</sup>. Berdasarkan hasil wawancara yang dilakukan, pasien yang mendapatkan dosis rendah dan memiliki retensi kurang disebabkan karena merasa dengan pemberian dosis yang rendah justru tidak mencegah gejala putus obat<sup>(12)</sup>. Pada dosis rumatan rata-rata dengan retensi menunjukkan pasien dengan dosis rumatan rata-rata  $\geq 60$  mg/hari mempunyai proporsi lebih besar (51%) berada dalam terapi  $\geq 1$  tahun dibandingkan dengan pasien yang menerima dosis rumatan rata-rata  $< 60$  mg/hari (39,5%)<sup>(11)</sup>. Pada penelitian ini pasien yang mendapatkan dosis rumatan rata-rata  $\geq 60$  mg/hari yaitu 5 pasien (12,19%) dan pasien yang mendapatkan dosis  $< 60$  mg/hari yaitu 36 pasien (87,81%).

Pada penelitian ini tidak ada korelasi dosis bawa pulang (THD) rata-rata terhadap nilai retensi. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Huissoud *et al.*, menunjukkan ada hubungan yang bermakna antara dosis bawa pulang dengan retensi ( $p = 0,009$ ). Pasien dengan dosis bawa pulang (THD) pada awal terapi juga cenderung lebih lama pasien tinggal dalam terapi rumatan metadon. Sehingga pemberian dosis bawa pulang (THD) perlu dipertimbangkan untuk meningkatkan retensi pasien dalam PTRM<sup>(18)</sup>.

**Hubungan Usia, Jenis Kelamin, Tingkat Pendidikan, Pekerjaan, Status Pernikahan, Riwayat Hukum, Riwayat Penggunaan Zat Aktif, Lama Penggunaan Opioid dan Riwayat Dosis Terlewat terhadap Nilai Retensi dengan Analisis Korelasi Spearman.** Tidak ada korelasi yang signifikan antara hubungan usia, jenis kelamin, tingkat pendidikan, pekerjaan, status pernikahan, riwayat hukum, riwayat penggunaan zat aktif, lama penggunaan opioid dan riwayat dosis terlewat

terhadap retensi pasien terapi rumatan metadon. Detail hubungan usia, jenis kelamin, tingkat pendidikan, pekerjaan, status pernikahan, riwayat hukum, riwayat penggunaan zat aktif, lama penggunaan opioid dan riwayat dosis terlewat dapat dilihat pada Tabel 3.

**Hubungan Usia terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,191$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = 0,208$ ) antara usia terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini usia pasien terbesar yang berada dalam terapi rumatan metadon  $\geq 1$  tahun adalah usia 26-35

**Tabel 3. Hubungan usia, jenis kelamin, tingkat pendidikan, pekerjaan, status pernikahan, riwayat hukum, riwayat penggunaan zat aktif, lama penggunaan opioid dan riwayat dosis terlewat terhadap nilai retensi dengan analisis korelasi Spearman.**

Deskripsi	Nilai r	Signifikansi
<b>Usia</b>		
17-25 tahun		
26-35 tahun	$r = 0,208$	$p = 0,191$
36-45 tahun		
<b>Jenis Kelamin</b>		
Laki-laki		
Perempuan	$r = -0,191$	$p = 0,231$
<b>Tingkat Pendidikan</b>		
Tamat SMP		
Tamat SMA	$r = -0,111$	$p = 0,490$
Tamat Sarjana		
<b>Status Pernikahan</b>		
Menikah		
Belum menikah	$r = -0,016$	$p = 0,921$
Cerai		
<b>Riwayat Penggunaan Zat Aktif</b>		
Penggunaan 1-3 zat aktif		
Penggunaan 4-6 zat aktif	$r = -0,090$	$p = 0,575$
Penggunaan 7-9 zat aktif		
<b>Lama Penggunaan Opioid</b>		
$\leq 5$ tahun		
5- 10 tahun	$r = 0,196$	$p = 0,218$
$\geq 10$ tahun		
<b>Riwayat Dosis Terlewat</b>		
Tidak ada dosis terlewat		
Dosis terlewat 1-2 hari berurutan		
Dosis terlewat 3-4 hari berurutan	$r = 0,241$	$p = 0,129$
Dosis terlewat $\geq 4$ hari berurutan		

tahun yaitu 60,98%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, menemukan sebagian besar pada usia 25-35 tahun adalah 68,4%<sup>(11)</sup> sedangkan penelitian yang dilakukan Rahayu dan Syarif, berusia >30 tahun adalah 72,3% dimana hasil analisis menunjukkan umur tidak berhubungan dengan retensi pasien terapi rumatan metadon  $p = 0,445^{(13)}$ .

**Hubungan Jenis Kelamin terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,231$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,191$ ) antara jenis kelamin terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini jenis kelamin terbesar adalah laki-laki yaitu sebesar 95,20%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, menemukan sebagian besar jenis kelamin pasien adalah laki-laki (86,6%)<sup>(11)</sup>, penelitian Aprilia dkk., adalah laki-laki (94,7%)<sup>(12)</sup>, dan penelitian Rahayu dan Syarif adalah laki-laki (84,5%)<sup>(13)</sup>.

**Hubungan Tingkat Pendidikan terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,490$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,111$ ) antara tingkat pendidikan terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini tingkat pendidikan terbesar adalah tamat SMA sebesar 82,92%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang menemukan sebagian besar pendidikan adalah SMA (70,6%)<sup>(11)</sup> sedangkan penelitian yang dilakukan Aprilia dkk., adalah SMA (69,3%)<sup>(12)</sup>.

**Hubungan Pekerjaan terhadap Nilai Retensi.** Pada penelitian ini semua pasien yang mengikuti program terapi rumatan metadon (PTRM) di RSJ Menur Surabaya adalah bekerja (100%). Pada saat pengambilan data diketahui bahwa pasien di RSJ Menur ini sudah dalam kondisi yang stabil. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yaitu pasien yang bekerja sebesar 71%<sup>(11)</sup>.

**Hubungan Status Pernikahan terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,921$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,016$ ) antara status pernikahan terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini status pernikahan terbesar adalah menikah sebesar 75,61%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Aprilia dkk., menemukan sebagian besar status pernikahan adalah menikah (91,9%)<sup>(12)</sup> sedangkan penelitian yang dilakukan Rahayu dan Syarif adalah menikah (58,7%)<sup>(13)</sup>. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yaitu dengan status tidak menikah 58,0%<sup>(11)</sup>.

**Hubungan Riwayat Hukum terhadap Nilai Retensi.** Pada penelitian ini semua pasien yang mengikuti PTRM di RSJ Menur Surabaya adalah tidak

ada riwayat hukum (100%). Pada saat pengambilan data diketahui bahwa pasien di RSJ Menur ini sudah dalam kondisi yang stabil. Berbeda dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang mengatakan ada riwayat masalah hukum yaitu 68,4%<sup>(11)</sup>.

**Hubungan Riwayat Penggunaan Zat Aktif terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,575$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = -0,090$ ) antara riwayat penggunaan zat aktif terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini riwayat penggunaan zat aktif terbesar adalah penggunaan 4-6 zat aktif sebesar 80,49%. Jenis zat aktif yang banyak digunakan oleh pasien dalam penelitian ini adalah opioid, alkohol, tembakau, ganja, amfetamin, benzodiazepin, kokain dan halusinogen. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Pahlemy, riwayat penggunaan zat aktif yang banyak digunakan adalah opiat (100%), nikotin (64,5%), alkohol (46,3%), amfetamin (35,5%) dan benzodiazepin (26%)<sup>(11)</sup>.

**Hubungan Lama Penggunaan Opioid terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,196$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = 0,218$ ) antara lama penggunaan opioid terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini lama penggunaan opioid terbesar yang berada dalam terapi rumatan metadon  $\geq 1$  tahun adalah pasien dengan lama penggunaan opioid  $\geq 10$  tahun yaitu 78,05%. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang dalam penelitiannya menemukan lamanya penggunaan opiat adalah 5-10 tahun yaitu 56,7%<sup>(11)</sup>.

**Hubungan Riwayat Dosis Terlewat terhadap Nilai Retensi.** Berdasarkan hasil analisis korelasi Spearman, menunjukkan tidak ada hubungan yang signifikan ( $p = 0,241$  atau  $p > 0,05$ ) dengan korelasi sangat lemah ( $r = 0,129$ ) antara riwayat dosis terlewat terhadap nilai retensi. Pada penelitian ini riwayat dosis terlewat terbesar yang berada dalam terapi rumatan metadon adalah pasien dengan riwayat dosis terlewat 1-2 hari berurutan yaitu 34,15% dibandingkan pasien yang mengalami dosis terlewat 3-4 hari berurutan yaitu 9,76%. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Pahlemy, yang menyatakan retensi tidak berhubungan secara bermakna dengan riwayat dosis terlewat ( $p = 0,845$ ) dengan riwayat dosis terlewat 1-2 hari berturut-turut yaitu 61,5%<sup>(11)</sup>.

Pada penelitian ini terdapat 7,32% pasien yang mengalami riwayat dosis terlewat  $\geq 4$  hari berurutan. Pasien dengan riwayat dosis terlewat  $\geq 4$  hari berurutan akan mendapatkan dosis metadon separuh dari dosis sebelum terjadi dosis terlewat, dosis dinaikkan secara

bertahap hingga mencapai dosis optimal. Pasien yang mengalami dosis terlewat  $\geq 4$  hari tetapi bertahan didalam terapi disebabkan karena proses kenaikan dosis terjadi memadai sehingga dosis optimal dengan waktu yang relatif cepat dicapai sehingga tidak menimbulkan putus obat yang terkait dengan *relaps* penggunaan heroin.

Terdapat bermacam-macam alasan pasien yang mengalami dosis terlewat dan hal tersebut tidak ditelaah pada penelitian ini. Dengan mengetahui riwayat dosis terlewat maka pemahaman terhadap pengaruh dosis terlewat terhadap retensi akan lebih terlihat. Alasan pasien mengalami riwayat dosis terlewat disebabkan juga oleh motivasi dari pasien tersebut dalam menjalani atau mempertahankan terapi rumatan metadon. Sehingga motivasi juga dipertimbangkan dalam dosis terlewat, dimana pasien yang diberikan motivasi yang tinggi akan lebih lama bertahan pada terapi rumatan metadon.

### SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan di RSJ Menur Surabaya pada program terapi rumatan metadon, dapat disimpulkan *retention rate* pasien terbesar adalah 26,8% (24 bulan); 26,8% (36 bulan); dan 19,5% (12 bulan). Pada dosis rumatan terkecil, menunjukkan ada hubungan yang signifikan dengan korelasi cukup  $r = -0,328$  antara dosis rumatan terkecil terhadap nilai retensi. Sedangkan untuk dosis awal, dosis rumatan terbesar, dosis rumatan rata-rata dan dosis bawa pulang (THD) rata-rata tidak ada hubungan yang signifikan dengan korelasi sangat lemah terhadap nilai retensi. Tidak ada hubungan yang signifikan antara usia, jenis kelamin, tingkat pendidikan, status pernikahan, riwayat penggunaan zat aktif, lama penggunaan opioid dan riwayat dosis terlewat dengan korelasi sangat lemah terhadap nilai retensi.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Ibu Dr. Rika Yulia Amelia, S.Si., Sp.FRS., Apt dan Ibu Dr. Yosi Irawati Wibowo, S.Si., M.Pharm., Apt yang telah banyak memberikan saran pada penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Indonesia KKR. Gambaran umum penyalahgunaan narkoba di Indonesia. Buletin jendela data dan informasi kesehatan. 2014.1–15.
2. Meliala A. Badan Narkotika Nasional dan jebakan kelembagaan. J Peradil Indones Teropong. 2017.5(Januari):1–8.

3. Nasional BN. Survei nasional perkembangan penyalahgunaan narkoba tahun anggaran 2014. 2014.
4. Indonesia MKR. Penetapan rumah sakit pengampu dan satelit program terapi rumatan metadon serta pedoman program terapi rumatan metadon. 2008.
5. Indonesia MKR. Pedoman penyelenggara program terapi rumatan metadon. 2013.
6. Nasional BN. Survei prevalensi penyalahgunaan narkoba pada kelompok rumah tangga di 20 provinsi tahun 2015. 2016.
7. Issues C. Methadone maintenance treatment. 2000.67(November):347–64.
8. Department of health N. Opioid treatment program: clinical guidelines for methadone and buprenorphine treatment. 2006.(5).
9. Treatment EM. NIH consensus statement. 1997.15(6).
10. Services H. Principles of drug addiction treatment principles of drug addiction treatment. 2012.3.
11. Pahlemy H. Hubungan dosis dan retensi pada terapi rumatan metadon multiepisodic di Rumah Sakit Ketergantungan Obat Jakarta dan Rumah Sakit Umum Pusat Fatmawati. Universitas Indonesia. 2010.
12. Aprilya D, Amiruddin, Ridwan A. Hubungan faktor perilaku dengan retensi pasien program terapi rumatan metadon di Puskesmas Kassi-Kassi. 2014.
13. Rahayu T, Syarif S. Gambaran dan faktor-faktor yang berhubungan dengan retensi pasien program terapi rumatan metadon ( PTRM ) di Puskesmas Kecamatan Tebet. 2013.1–10.
14. Ward J, Hall W, Mattick RP. Role of maintenance treatment in opioid dependence. 1999.353:221–6.
15. Ippoliti DD, Davoli M, Perucci CA, Pasqualini F, Bargagli AM. Retention in treatment of heroin users in Italy, the role of treatment type and of methadone maintenance dosage. 1998.52:167–71.
16. Jamieson, Beals, Lalonde and Associates I for the, Canada O of CDSH. Methadone maintenance treatment. 2002.
17. Enwu Liua, Tao Liangb, Limei Shenc, Huan Zhongc, Bing Wangc, Zunyou Wua and R, Detelsd. Correlates of methadone client retention : A prospective cohort study in Guizhou province, China. 2010.20(4):304–8.
18. Huissoud T, Rousson V, Dubois-arber F. Methadone treatments in a Swiss Region , 2001 – 2008 : a registry-based analysis. 2012.

## **Hewan Model Kanker Ovarium untuk Studi Preklinik dan Pengembangan Obat Kanker Ovarium**

### **(Ovarian Cancer Animal Models for Preclinical Studies and Development of Ovarian Cancer Drugs)**

NI MADE DWI SANDHIUTAMI<sup>1,2\*</sup>, PUSPITA EKA WUYUNG<sup>3</sup>, WAWAIMULI AROZAL<sup>4</sup>,  
MELVA LOUISA<sup>4</sup>, DENI RAHMAT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jalan Raya Lenteng Agung, Srengseng Sawah Jagakarsa, Jakarta Selatan.

<sup>2</sup>Program Doktor Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No.4, Jakarta.

<sup>3</sup>Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No.4.

<sup>4</sup>Departemen Farmakologi dan Terapi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jalan Salemba Raya No.4.

\*Penulis korespondensi, Hp : 08123888252  
e-mail: dwisandhiutami@gmail.com

Diterima 13 Februari 2019, Disetujui 2 Oktober 2019

**Abstrak:** Pengobatan pada karsinoma ovarium masih jauh dari optimal, model hewan masih diperlukan untuk mempelajari kanker ovarium tipe epitelial manusia. Hewan model kanker ovarium sangat penting untuk memahami patogenesis penyakit dan untuk menguji strategi pengobatan baru. Model karsinogenesis ovarium pada tikus telah dimodifikasi dan diperbaiki untuk menghasilkan lesi preneoplastik dan neoplastik ovarium yang secara patogen menyerupai kanker ovarium manusia. Meskipun tumor ovarium spontan pada tikus telah dilaporkan, namun beberapa kekurangan dari penelitian yang telah ada menghalangi penggunaannya sebagai hewan coba model kanker ovarium. Karena itu, banyak upaya telah dilakukan untuk mengembangkan model hewan yang relevan untuk kanker ovarium. Model-model hewan coba dikembangkan secara akurat agar dapat mewakili perubahan seluler dan molekuler yang terkait dengan inisiasi dan perkembangan kanker ovarium manusia. Model hewan coba yang akurat memiliki potensi signifikan dalam memfasilitasi pengembangan metode yang lebih baik untuk deteksi dini dan pengobatan kanker ovarium. Beberapa model hewan coba kanker ovarium telah dilaporkan, termasuk manipulasi berbagai faktor reproduksi atau paparan karsinogen. Kemajuan terbaru dalam pemodelan kanker ovarium adalah menggunakan tikus yang direkayasa genetika.

**Kata kunci:** Hewan model, kanker ovarium, karsinogen

**Abstract:** Treatment for ovarian carcinoma is still far from optimal, animal models are still needed to study human epithelial ovarian cancer. Animal models of ovarian cancer are very important for understanding the pathogenesis of the disease and for testing new treatment strategies. Ovarian carcinogenesis models in mice have been modified and repaired to produce preneoplastic lesions and neoplastic ovaries that are pathogens resembling human ovarian cancer. Although spontaneous ovarian tumors in mice have been reported, some of the shortcomings of existing studies preclude their use as animal models of ovarian cancer. Because of this, many efforts have been made to develop animal models that are relevant for ovarian cancer. Experimental animal models are developed accurately to represent cellular and molecular changes associated with the initiation and development of human ovarian cancer. Accurate experimental models have significant potential in facilitating the development of better methods for early detection and treatment of ovarian cancer. Several animal models of ovarian cancer have been reported, including manipulation of various reproductive factors or exposure to carcinogens. The latest advance in ovarian cancer modeling is using genetically engineered mice..

**Keywords:** Animal models, ovarian cancer, carcinogen

## PENDAHULUAN

SEBAGIAN besar kanker ovarium didiagnosis pada stadium lanjut. Prognosis yang buruk pada wanita yang didiagnosis kanker ovarium sebagian besar terjadi karena adanya metastasis pada 81% pasien saat didiagnosis. Tingkat kelangsungan hidup penderita kanker ovarium dalam 5 tahun adalah sebesar 30%-69% dan jika terdeteksi pada stadium awal, dapat memiliki angka ketahanan hidup hingga 92%. Pengobatan yang ada sekarang memberikan manfaat yang tidak terlalu besar dan meningkatkan angka ketahanan hidup hanya 2-4%<sup>(1)</sup>.

Meskipun terdapat peningkatan pengetahuan tentang etiologi kanker ovarium, pembedahan sitoreduksi yang agresif, dan kombinasi kemoterapi yang modern, namun hanya terdapat sedikit perubahan statistik angka ketahanan hidup dalam 30 tahun terakhir, dan sekitar 60% dari wanita yang menderita kanker ovarium akan meninggal. Skrining yang kurang memadai untuk mendeteksi penyakit lebih dini, mendeteksi perubahan preneoplastik atau neoplastik awal pada sel epitel dan terjadinya kemoresisten menyebabkan peningkatan angka kematian penderita kanker ovarium. Kanker ovarium dapat muncul di ovarium dari sel germinal, sel stroma, atau sel epitel. Sebagian besar (90%) kanker ovarium muncul dari jaringan epitel, lapisan sel yang menutupi permukaan ovarium. Terdapat beberapa histologi kanker ovarium tipe epitel yang berbeda yaitu *high-grade serous* (HGS) dan *low-grade serous ovarian, mucinous, endometrioid, clear cell*, dan transisional atau tidak terdiferensiasi<sup>(2)</sup>.

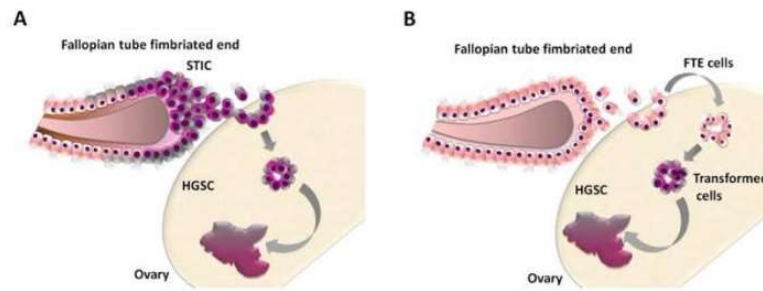
Epidemiologis, patologis, dan studi molekuler telah dikembangkan terus menerus oleh para ilmuwan dan hipotesis yang diperoleh adalah bahwa tumor ovarium terdiri dari berbagai jenis serta dapat timbul dari sel prekursor yang berbeda, termasuk yang berasal dari saluran tuba, endometrium, serviks, dan saluran gastrointestinal (GI)<sup>(3-4)</sup>. Kanker ovarium yang muncul dari prekursor yang berbeda memiliki subtipe kanker ovarium yang secara histologis dan genetik berbeda. Kanker ovarium telah dibagi menjadi dua kelas, yaitu : (1) Kanker tipe 1, berkembang dari tumor dengan keganasan yang lebih rendah, terjadi mutasi jalur Ras. *Low-grade serous ovarian, mucinous, endometrioid, clear cell* ini termasuk dalam kanker tipe 1; (2) Kanker tipe 2, berkembang dengan cepat dan terdapat mutasi TP53. Kanker ini termasuk *high-grade serous* (HGS), tidak terdiferensiasi, dan karsinosarkoma<sup>(5)</sup>. Studi terbaru menunjukkan bahwa beberapa tumor HGS dapat berawal dari fimbria tuba falopi<sup>(6)</sup>. Ketika kanker ovarium berkembang, sel-sel tumor berakumulasi membentuk agregat sel tunggal maupun multisel pada

cairan asites<sup>(7)</sup>. Akumulasi cairan asites pada kanker stadium akhir berkorelasi dengan prognosis yang buruk<sup>(8)</sup>. Sel-sel tumor ini dapat bermetastasis secara lokal. Lokasi metastasis yang sering terjadi termasuk di omentum, dinding peritoneum, diafragma, dan mesenterium usus kecil<sup>(9)</sup>.

Strategi terapi baru harus terus dikembangkan untuk meningkatkan hasil klinis pengobatan kanker ovarium. Model-model hewan coba dikembangkan secara akurat agar dapat mewakili perubahan seluler dan molekuler yang terkait dengan inisiasi dan perkembangan kanker ovarium manusia. Model hewan coba diharapkan dapat menggambarkan sifat biologis kanker ovarium manusia (mis., massa ovarium, asites, penyebaran intraperitoneal, dan metastasis). Model hewan coba memiliki potensi signifikan dalam memfasilitasi pengembangan metode yang lebih baik untuk deteksi dini dan pengobatan kanker ovarium. Beberapa model hewan coba kanker ovarium telah dilaporkan, termasuk yang melibatkan manipulasi berbagai faktor reproduksi atau paparan karsinogen. Kemajuan terbaru dalam pemodelan kanker ovarium adalah menggunakan tikus yang direkayasa genetika<sup>(10-12)</sup>. Berikut diuraikan beberapa model pada hewan coba yang telah dikembangkan untuk meneliti transformasi sel ovarium.

### Mencit yang Direkayasa secara Genetis.

Mencit yang direkayasa secara genetis untuk mendapatkan model kanker ovarium tipe *high grade serous carcinoma* (HGSC) sulit dihasilkan. Pada penelitian sebelumnya, telah dilakukan pemberian onkogen secara langsung pada mencit dan atau mengganggu gen penekan tumor pada ovarium. Hal tersebut memungkinkan pembentukan mencit model kanker ovarium dengan patogenetik HGCS yang ditandai dengan keberadaan lesi dan prekursor lain yang mirip dengan karsinoma ovarium tipe epithelial<sup>(13,14)</sup>. Kim et al. mengembangkan model mencit kanker ovarium tipe epithelial yang diperoleh Dicer-Pten double knockout. Secara klinis, model tersebut menyerupai HGSC manusia, kanker ovarium tipe epithelial ini muncul dari saluran telur, menyebar ke rongga perut dan ke ovarium, serta menyebabkan asites dan kematian 100% pada mencit. Secara fenotip dan morfologis, tumor yang dikembangkan tersebut menyerupai HGSC<sup>(15)</sup>. Peneliti lain juga telah menghasilkan model mencit kanker ovarium melalui inaktivasi Brca 1/2, Pten dan Tp53 dalam sel sekretori tuba falopi, meniru perubahan molekuler yang biasa diamati pada HGSC manusia<sup>(13)</sup>. Sherman-Baust et al., 2014 melaporkan model mencit transgenik yang dikembangkan untuk menjadi model HGSC dari karsinoma serosa tipe epithelial



**Gambar 1. Hipotesis tuba fallopi tentang asal-usul serous carcinoma (HGSC).** Sel Fallopian tube epithelium (FTE) mengalami transformasi neoplastik awal dan kemudian menjadi serous tubal intraepithelial carcinoma (STIC). Sel-sel STIC memiliki ketahanan dan invasi di permukaan ovarium. Lingkungan mikro ovarium, kaya akan faktor hormonal dan inflamasi, mendorong transformasi neoplastik penuh menjadi HGSC) invasif (A). Atau, sel-sel FTE normal terperangkap dalam ovarium dan ikut dalam proses ovulasi fisiologis. Sel FTE yang terperangkap mengalami transformasi neoplastik progresif di dalam ovarium melalui akumulasi perubahan molekuler (B)<sup>(16)</sup>.

di tuba dilakukan melalui inaktivasi jalur p53 dan Rb, sehingga menyerupai HGSC<sup>(14)</sup>. Kedua model mencit tersebut dapat menyerupai HGSC manusia dari sudut pandang klinis, histopatologis, dan genetik<sup>(13-14)</sup>. Secara keseluruhan, semua model mencit yang dimodifikasi secara genetik ini memberikan bukti baru yang mendukung “hipotesis tuba fallopi”, yaitu bahwa HGSC dapat berasal dari tuba fallopi (Gambar 1).

Hipotesis ini memberikan peluang untuk menjelaskan peristiwa awal HGSC dan karsinogenesis, serta dapat mengeksplorasi strategi baru dalam deteksi dini, pencegahan dan terapi pada kanker ovarium tipe epitelial. Selain itu, model mencit jenis syngeneic ini optimal untuk studi lingkungan mikro tumor, angiogenesis, interaksi epitelial-stromal dan mekanisme imun antitumor sebagai penjaga sistem kekebalan tubuh. Keterbatasan utama dari model ini adalah bahwa model ini sulit, mahal dan memakan waktu serta tidak sepenuhnya mereplikasi kompleksitas genetik dan epigenetik dari HGSC spontan.

**Transplantasi Sel Primer Kanker Ovarium Manusia pada Mencit Xenograft.** Transplantasi sel yang heterogen dimungkinkan dalam lingkungan *immunounresponsive* sehingga dapat mencegah penolakan transplantasi. Namun, tingkat pengikatan sel kanker manusia pada mencit dengan penekanan sistem imun adalah rendah karena kemungkinan adanya kemampuan adaptif dan/atau kekebalan bawaan, karakteristik intrinsik tumor dan pendekatan eksperimental yang digunakan. Saat ini, model xenografts dikembangkan dengan transplantasi tumor manusia dari tumor primer atau *cell line* kanker ke dalam mencit yang immunodeficient, seperti: i) *athymic nude mice* yang kekurangan limfosit T fungsional, ii) *severe combined immunodeficient mice*

(SCID) yang kekurangan limfosit B dan T, dan iii) nonobese diabetic (NOD) / SCID / IL2R $\gamma$ null, mencit yang cacat dalam kekebalan adaptif dan bawaan karena kurangnya pematangan limfosit dan sel T (NK sel). Tiga rute utama implantasi yang digunakan untuk menghasilkan model xenografts kanker ovarium tipe epitelial adalah subkutan (ektopik), intraperitoneal dan intrabursal (ortotopik)<sup>(17)</sup>. Implantasi subkutan memfasilitasi terjadinya kanker ovarium tipe epitelial, tetapi sulit mengetahui perkembangan tumor secara klinis, karena asites yang berat dan terbentuknya karsinoma peritoneum<sup>(18)</sup>. Implantasi intrabursal terdiri dari injeksi sel ke dalam membran bursal yang membungkus ovarium dan saluran telur mencit. Lokasi implantasi ini menghasilkan lingkungan fisiologis yang sesuai untuk pertumbuhan HGSC, sehingga tumor dan lingkungan mikro ovarium dapat saling berinteraksi dan dimodulasi<sup>(19-20)</sup>. Oleh karena itu, implantasi intrabursal dan intraperitoneal paling baik menghasilkan manifestasi klinis HGSC seperti pada manusia, dapat menggambarkan tahap awal dan akhir penyakit<sup>(17,20)</sup>. Selain itu, munculnya instrumen pencitraan non-invasif yang dirancang khusus untuk hewan kecil memungkinkan pemantauan pertumbuhan tumor di dalam peritoneal *in vivo* dari waktu ke waktu. Yang perlu diperhatikan untuk keberhasilan dalam membuat model hewan coba adalah bahwa implantasi intraperitoneal dan intrabursal membutuhkan lebih banyak waktu dan keterampilan teknis khusus jika dibandingkan dengan pemberian secara subkutan<sup>(18)</sup>.

**Transplantasi Cell Line Kanker Ovarium Manusia pada Mencit Xenograft.** Meskipun terdapat banyak kekurangan, model mencit xenografts yang diberikan *cell line* kanker adalah model hewan yang paling banyak digunakan dalam penelitian kanker ovarium tipe epitelial. Model ini memberikan banyak manfaat untuk mengeksplorasi biomolekular

dan pengembangan pengobatan pada kanker ovarium tipe epithelial<sup>(10,17,19,20)</sup>. Tidak semua *cell line* kanker ovarium dapat digunakan, hanya *cell line* tertentu yang dapat membentuk tumor ketika disuntikkan ke mencit yang immunocompromised, dan tumor yang diinjeksi akan menghasilkan morfologi yang tidak terdiferensiasi dengan jelas serta menampilkan susunan genetik yang kompleks jika *cell line* berasal dari pasien dengan stadium lanjut<sup>(19,21,22)</sup>. Model mencit xenograft yang diinjeksi *cell line* ovarium tipe epithelial umumnya diperoleh dengan injeksi intraperitoneal sel lestari A2780, OVCAR-3 dan SK-OV-3. Di antara *cell line* tersebut, OVCAR-3 secara genetik berkorelasi dengan HGSC primer, sedangkan A2780 dan SK-OV-3 tidak menunjukkan perubahan genetik khas seperti HGSC dan kemungkinan menjadi karsinoma endometrioid<sup>(23)</sup>. Sebagai akibatnya, model tersebut tidak secara akurat menampilkan respon klinis HGSC dan respon terhadap agen antikanker

baru, serta tidak dapat digunakan dalam studi resistensi obat dan reaksi yang merugikan<sup>(24)</sup>. Namun demikian, beberapa studi praklinis, menggunakan model mencit xenograft yang diinjeksi *cell line* kanker ovarium tipe epithelial, dapat digunakan untuk memprediksi respons obat antikanker dengan benar dan secara efektif berkontribusi untuk pengembangan terapi HGSC. Penelitian lain menyebutkan bahwa agen antiangiogenik secara efektif mengurangi pembentukan asites di mencit xenograft yang diinjeksi *cell line* kanker OVCAR-3 dan SK-OV-3 dan dalam kombinasi dengan paclitaxel secara sinergis dapat mengurangi pertumbuhan tumor<sup>(25)</sup>. Contoh lain dari keberhasilan penggunaan model mencit xenograft yang diinjeksi *cell line* kanker adalah keberhasilan uji praklinis dari PARP inhibitor dalam sel yang kekurangan BRCA secara in vitro dan in vivo<sup>(26)</sup>. Penelitian terakhir menunjukkan kemampuan model mencit xenograft yang diinjeksi *cell line*

**Tabel 1. Perbandingan antara model hewan yang paling umum digunakan dalam penelitian kanker ovarium.**  
Ringkasan keuntungan dan keterbatasan dari berbagai model hewan yang digunakan dalam penelitian kanker ovarium (modifikasi)<sup>(16)</sup>.

No	Model Hewan	Keuntungan	Keterbatasan
1	Mencit yang direkayasa secara genetik	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Dapat digunakan dalam studi kemopreventif</li> <li>b. Dapat digunakan dalam mempelajari inisiasi dan progresi tumor</li> <li>c. Menampilkan lingkungan tumor seperti pada kondisi kanker ovarium di manusia</li> <li>d. Menampilkan perubahan molekular tumor</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Menampilkan genomik yang terlalu sederhana</li> <li>b. Waktu pembentukan tumor yang lambat dan bervariasi</li> <li>c. Kurang dapat menggambarkan kondisi seperti pada manusia</li> <li>d. Mahal dan membutuhkan waktu yang panjang</li> </ul>
2	Transplantasi sel primer kanker ovarium manusia pada mencit <i>xenograft</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Menampilkan heterogenitas sel tumor seperti yang terjadi pada manusia</li> <li>b. Menampilkan perubahan molekular tumor seperti yang terjadi pada manusia</li> <li>c. Menampilkan tumor progresi</li> <li>d. Baik digunakan dalam studi kanker ovarium pada manusia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Membutuhkan jaringan HGCS manusia yang segar</li> <li>b. Waktu implantasi yang menjadi bervariasi</li> <li>c. Membutuhkan hewan coba dengan defisiensi sistem imun</li> <li>d. Tidak dapat digunakan dalam studi kemopreventif</li> </ul>
3	Transplantasi <i>cell line</i> kanker ovarium manusia pada mencit <i>xenograft</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Mudah, cepat, dan <i>reproducible</i></li> <li>b. Menampilkan progresi tumor yang sesuai</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Populasi tumor yang homogen</li> <li>b. Tidak dapat menampilkan kondisi seperti pada manusia kanker ovarium</li> <li>c. Kurangnya interaksi tumor-stroma</li> <li>d. Tidak dapat digunakan dalam studi kemopreventif</li> </ul>
4	Model hewan kanker ovarium spontan dan penggunaan karsinogen	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Dapat digunakan dalam studi kemopreventif</li> <li>b. Pertumbuhan kanker yang progresif dan spontan</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>a. Kurang relevan untuk karsinogenesis HGCS</li> <li>b. Variasi waktu pertumbuhan tumor</li> <li>c. Variasi angka kejadian tumor</li> <li>d. Histopatologi yang kurang dapat diperkirakan</li> <li>e. Kurang dapat menggambarkan perubahan molekular</li> </ul>

kanker secara paralel adalah dengan studi in vitro dalam memprediksi efektifitas obat, mengantisipasi toksisitas obat, mengidentifikasi biomarker yang terkait dengan respons obat<sup>(27-28)</sup>. Oleh karena itu, keberhasilan pada uji praklinis untuk terapi HGSC sangat tergantung pada pemilihan cell line yang sesuai, memperhitungkan profil molekuler HGSC primer dan sensitivitas obat.

Keuntungan model mencit xenograft yang diinjeksi cell line kanker meliputi kecepatan pembentukan tumor, kemudahan prediksi, reproduksibilitas, kesesuaian profil HGSC, dan penggunaan mencit yang tidak banyak dalam studi respons obat. Di sisi lain, keterbatasan utama hasil dari penggunaan cell line tertentu (seperti yang telah disebutkan di atas) dan mencit yang *immunocompromised*, sehingga interaksi kompleks antara sel lestari dengan lingkungan mikro tidak terbentuk (sistem kekebalan, stroma, peradangan, pembuluh darah) (Tabel 1)<sup>(16)</sup>.

**Patient-Derived Murine Xenograft Models (Pdx).** Penggunaan Patient-derived murine xenograft models (PDX) telah dilakukan sejak tahun 1969, tetapi dalam beberapa dekade terakhir penggunaannya menjadi cukup sering dalam penelitian kanker. Berbeda dengan *xenografts cell line*, model ini dibuat dengan transfer langsung tumor/asites dari pasien ke tikus NOD / SCID. *Murine xenograft* yang mengalami tumor asites pasien biasanya tidak bertahan hidup setelah 8 minggu dan dari hasil nekropsis menunjukkan efusi peritoneum dan beberapa nodul tumor di dinding peritoneum dan mesenterium, yang merupakan ciri khas HGSC stadium lanjut pada pasien. Morfologis dan genetik molekuler (mutasi TP53 dan perubahan jumlah salinan DNA) dari tumor PDX hampir tidak dapat dibedakan dari tumor yang diperoleh dari pasien, hal ini menunjukkan bahwa model PDX dapat dengan mensimulasikan HGSC manusia<sup>(29-32)</sup>. Karakteristik penting dari model PDX yang membedakan dengan *xenografts cell line* adalah: i) tumor dalam PDX menunjukkan stroma intratumoral seperti pada manusia dan vaskularisasi yang sesuai dengan lingkungan mikro fisiologis; ii) *xenografts PDX* memungkinkan propagasi dan ekspansi tumor seperti pada manusia dan mempertahankan kesesuaian morfologis dan genetik yang signifikan dengan HGSC primer selama beberapa generasi dari murine tersebut. Berkat karakteristik tersebut, model PDX mampu mencerminkan/memprediksi respon terapeutik yang diamati di klinik, menunjukkan kesesuaian dengan respon pengobatan pasien asli<sup>(31,33)</sup>, sehingga memiliki peluang untuk pengembangan targeted terapi pada HGSC. Namun, beberapa keterbatasan juga ditemukan

pada model ini. Pertama, membutuhkan sejumlah besar tumor segar manusia dan periode waktu bervariasi untuk engraftment (2 hingga 4 bulan)<sup>(34)</sup>. Kedua, tingkat *engraftment* tumor bervariasi secara signifikan dalam studi yang berbeda tergantung pada karakteristik tumor, strain murine dan lokasi implantasi. Ketiga, PDX tidak memungkinkan untuk mempelajari peran sistem kekebalan tubuh dan, dalam jangka panjang, juga interaksi tumor-stroma<sup>(35)</sup>. Pengembangan, penyebaran, dan pemeliharaan PDX memakan waktu, rumit, dan mahal.

**Model Humanized-Xenograft.** Kelemahan utama *xenografts* adalah kurangnya respons yang dimediasi limfosit sebagai konsekuensi dari hewan coba yang mengalami imunodefisiensi yang digunakan sebagai penerima. Oleh karena itu, *xenografts* menghalangi interaksi patofisiologis antara sel kanker dan sistem kekebalan tubuh yang memainkan peran penting dalam inisiasi kanker ovarium tipe epitelial, perkembangan dan respon terapi<sup>(36)</sup>. Untuk mengatasi masalah ini, tikus yang *immunocompromised* dapat di *engrafted* dengan sel darah yang positif CD34, yang dapat diisolasi dari tali pusat manusia atau hati janin, yang kaya hematopoietic stem cells. Strategi ini mengembalikan hampir seluruh sistem kekebalan hewan coba seperti pada manusia, dan memungkinkan untuk mempelajari respon imunologis terhadap HGSC<sup>(37-38)</sup>.

**Model Hewan Kanker Ovarium Spontan dan Penggunaan Karsinogen.** Selain model hewan coba diatas, telah diketahui bahwa ayam, beberapa galur tikus (tikus galur Wistar dan Sprague-Dawley) dan kera (primata) digunakan dalam pengembangan hewan model tumor ovarium secara spontan<sup>(39)</sup>. Pada ayam petelur telah dikembangkan sebagai model kanker ovarium tipe epitelial, yang menghasilkan 4 histotipe utama kanker epitel ovarium (serous, endometrioid, mucinous dan clear cell).[40] Sementara itu tikus dan mencit dapat digunakan dalam pengembangan berbagai tumor seperti tubular adenoma, papillary cystadenoma, adenocarcinoma, mesothelioma, germ cell tumor, granulosa cell tumor dan sex-cord stromal tumor.[41-43] Pada kera, secara spontan dapat dikembangkan granulosa cell dan sex-cord stromal tumors, tetapi tidak dapat membentuk tumor epitel yang terdapat pada manusia, walaupun secara anatomi kera memiliki kemiripan dengan manusia.[39] Pada beberapa kasus dalam penelitian, pembentukan tumor yang relative cukup lama dan rendahnya angka kejadian tumor membuat model tumor atau kanker ovarium pada hewan tidak banyak dilakukan pengujian secara in vivo.

Sejak akhir tahun enam puluhan,



sitokeratin, penanda epitel permukaan ovarium<sup>(45,52)</sup>.

**Efek karsinogenik DMBA pada tikus sebelumnya telah diklasifikasikan sebagai adenokarsinoma.** Nishida dkk. mencatat neoplasma pada 19 dari 40 tikus (47,5%)<sup>(49)</sup>. Tujuh belas diklasifikasikan sebagai adenokarsinoma, dan dua sebagai fibrosarkoma. Pada tahun 2002 Tanaka et al., melaporkan tujuh dari 20 tikus (35%) dengan adenokarsinoma 51 minggu setelah injeksi ovarium dengan DMBA.<sup>[53]</sup> Pada tahun 2004 Tanaka et al., melaporkan 9/20 tikus (45%) yang diinduksi dengan DMBA mengembangkan adenokarsinoma<sup>(50)</sup>.

**Tikus model kanker ovarium dengan induksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) yang disalut pada benang.** Karakterisasi adenocarcinoma pada ovarium tikus yang diinduksi dengan DMBA yang disalut pada benang dan dijahit pada ovarium telah dilaporkan. DMBA dengan kemurnian 99% dilelehkan pada 124°C untuk pada benang steril dengan panjang 1 cm, kemudian diimplantasi langsung pada ovarium tikus Wistar Furth usia 7 minggu. Ovarium yang diimplantasi dengan DMBA menunjukkan hilangnya folikel primer yang hampir lengkap dan degenerasi sel granulosa pada 16 minggu, konsisten dengan respons toksik ovarium yang diketahui terhadap aplikasi DMBA langsung. Ovarium kanan yang tidak diinduksi menunjukkan kondisi normal. Tumor ovarium dapat diraba 175 hari setelah implantasi DMBA. Tumor ovarium pada tikus yang diinduksi dengan DMBA pertama kali dicatat pada 26 minggu pasca implantasi yang mencapai insidensi tumor kumulatif 77% (23/30) pada 52 minggu. Kontrol menunjukkan tidak ada bukti tumor pada 52 minggu (0/31). Histologi tumor didistribusikan sebagai adenokarsinoma yang berdiferensiasi baik (1/23), adenokarsinoma yang berdiferensiasi buruk (8/23), tumor sel sel granulosa (8/23), dan sarkoma yang tidak berdiferensiasi (23/5). Beberapa tumor muncul ke mesenterium peritoneal, limpa dan dinding perut. Adenokarsinoma tampaknya berasal dari epitel permukaan ovarium dengan focal papillary yang meluas ke ruang kistik. Sel-sel tumor yang dihasilkan dari epitel bereaksi positif dengan antibodi sitokeratin (8/8), epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM 5/5) dan prostaglandin synthetase-1 (COX-1 4/4). Sel-sel epitel positif terhadap Vimentin ketika terdapat adenokarsinoma (4/7), ditunjukkan dengan pewarnaan perinuklear, sangat berbeda dengan sel-sel stromal pada thecal/granulosa tumor (8/8). Tumor sel thecal/granulosa menunjukkan Ep-CAM negatif (0/5) dan COX-1 positif yang sangat lemah (4/4). Dengan demikian, model implantasi DMBA yang disalut pada benang di

ovarium tikus menghasilkan tumor epitel yang secara histologis mirip dengan manusia, sehingga model ini dapat digunakan untuk pengujian agen pencegahan atau terapi<sup>(52)</sup>.

Mayoritas tumor (74%) terdiri dari dua tipe histologis. Adenokarsinoma, sebagian besar (8/23) berdiferensiasi buruk, ditandai dengan nest pada struktur kelenjar, umumnya back to back, dibatasi oleh lapisan tunggal sel yang diketahui sebagai lumina dan memiliki rasio sitoplasma yang tinggi, terjadi pleomorfisme nukleolus dengan kelenjar kromatin dan nukleoli yang menonjol<sup>(52)</sup>. Berbeda dengan laporan penelitian lain yang menggunakan benang jahit yang dilapisi DMBA, hanya satu *cystadenocarcinoma* serosa papiler yang dicatat di antaranya<sup>[54]</sup>. Salah satu tumor diketahui berdiferensiasi dengan baik dan menunjukkan struktur ductal yang produktif. Sel tumor thecal/granulosa (8/23) mempertahankan beberapa struktur folikel normal dengan sel granulosa kuboid yang memiliki nukleolus sentral yang besar, tetapi sebagian besar ditandai oleh palisade yang terjalin dan lingkaran sel-sel skal berbentuk gelendong yang besar.

Adenokarsinoma ovarium pada tikus yang diinduksi oleh paparan DMBA yang tersalut pada benang telah dilaporkan pada beberapa penelitian. Jumlah epitel permukaan ovarium yang terbatas dan kesulitan dalam palpasi lesi awal telah menghambat deteksi arah perkembangan dan metaplasia awal epitel permukaan pada ovarium. Variasi histologi yang terlihat, termasuk sarkoma agresif yang tidak berdiferensiasi, menunjukkan bahwa DMBA menginduksi tumor pada berbagai tipe sel. Tiga puluh sembilan persen (9/23) dari tumor ditemukan sebagai adenokarsinoma dan mengekspresikan penanda epitel dan metabolisme yang mirip dengan tumor epitel ovarium manusia<sup>(52)</sup>.

**Tikus model kanker ovarium dengan induksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) yang disalut pada benang jahit dibandingkan dengan salut pada kain (0,5x0,5 cm).** Karsinogen 7, 12-dimetilbenz [a] antrasena (DMBA), merupakan hidrokarbon aromatik polisiklik yang menginduksi mutasi karsinogenik dengan membentuk adisi DNA. [45,52] Insiden induksi adenokarsinoma ovarium oleh DMBA bervariasi antara 10 hingga 45%<sup>[52,55]</sup>, yang mungkin disebabkan oleh perbedaan strain tikus yang digunakan, bentuk kimia dari DMBA yang digunakan dan rute obat yang diberikan dalam studi tersebut. Rute penggunaan dengan implantasi langsung karsinogen memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian intragastrik tunggal atau injeksi DMBA intravena pada tikus, meskipun

hampir sebagian besar tumor menunjukkan histologi tumor stroma<sup>(54)</sup>. Pada penelitian ini membandingkan cara menggunakan DMBA dalam menginduksi kanker ovarium. Kelompok S adalah kelompok yang diimplantasi dengan DMBA yang disalut pada benang sedangkan kelompok CS adalah kelompok yang diimplantasi dengan DMBA yang disalut pada kain (0,5x0,5 cm). Hasil dilaporkan bahwa 75% insiden tumor terjadi pada akhir 32 minggu dan 93,75% (90/96) dari semua tumor dan didiagnosis sebagai adenokarsinoma. Tumor pada kedua kelompok berbentuk padat dalam struktur, meskipun beberapa tumor memiliki lubang kistik yang mengandung abses. Terjadi penyebaran intraperitoneal, dengan atau tanpa asites.

Secara morfologis, tikus dengan tumor memiliki perut yang membesar. Tumor tampak sebagai massa besar dengan warna kemerahan dari ovarium, dan secara agresif menyerang organ-organ sekitarnya termasuk limpa, usus, ginjal, dan rahim, termasuk beberapa dengan asites. Dimensi terbesar rata-rata tumor pada kelompok CS (3,63±0,89 cm) dan kelompok S (2,44±1,89 cm). Mayoritas tumor pada kedua kelompok adalah adenokarsinoma. Adenokarsinoma dapat dikategorikan sebagai karsinoma campuran, di mana sel-sel epitel terdiri dari sel-sel pipih atau berbentuk kuboid menyerupai epitel permukaan ovarium, sel-sel hobnail, dan sel-sel kolumnar, dengan inti pseudostratifikasi. Secara histologis, 93,75% (90/96) dari tumor ovarium pada kelompok CS adalah adenokarsinoma; tumor yang tersisa (6/96) menampilkan fitur khas sarkoma ovarium. Sementara pada kelompok S, tipe histologis dari tumor yang diinduksi meliputi: adenokarsinoma (21/37), karsinoma skuamosa (3/37), tumor sel granulosa (3/37), sarkoma (4/37), karsinoma tidak berdiferensiasi tanpa karakter adeno (2/37), tumor ovarium jinak (2/37), dan teratoma ganas (1/37)<sup>(56)</sup>.

Pada penelitian terdahulu penginduksi menggunakan DMBA tidak selalu berhasil menghasilkan karsinoma ovarium dengan tingkat kejadian sekitar 50%. Hingga saat ini, banyak laporan yang tersedia mengenai karsinoma yang diinduksi DMBA secara keseluruhan pada tikus telah menunjukkan neoplasma ovarium yang dapat direproduksi dengan rute pemberian yang berbeda, dosis, lama pajanan, dan lama waktu sebelum pengumpulan jaringan. Dalam satu penelitian, tikus C57BL6 menerima dosis DMBA harian secara peroral selama 3 minggu; 71% hewan menghasilkan tumor sel granulosa setelah satu tahun<sup>(57)</sup>. Dalam penelitian lain, tikus dari C57BL6; menerima dosis DMBA

mingguan secara peroral selama 6 minggu; 6 bulan setelah induksi, 27,3% (12/44) tikus mengalami neoplasma ovarium, 58% di antaranya adalah tumor sel granulosa<sup>(51)</sup>. Baru-baru ini, sebuah studi yang menilai kejadian kanker pada tikus dengan mutasi P53 (p53Ala135Val / wt) menemukan bahwa 80% tikus yang menerima implan dari DMBA ke dalam indung telur mampu menghasilkan tumor ovarium, di mana 50% adalah adenokarsinoma ketika dievaluasi 3 bulan setelah implantasi<sup>(58)</sup>. Dibandingkan dengan ovarium manusia, perkembangan neoplasma epitel jarang terjadi di ovarium hewan pengerat. Salah satu alasan yang menjelaskan rendahnya kejadian adalah bahwa ovarium tikus sepenuhnya diselubungi oleh kantong membran, yang melindungi epitel permukaan terhadap efek karsinogen lokal<sup>(59)</sup>.

Dalam penelitian Huang et al., 2014 ini, sebagian besar tumor ovarium yang diinduksi dengan DMBA yang disalut pada kain adalah adenokarsinoma, sementara kelompok yang diinduksi DMBA yang disalut pada benang menunjukkan cukup banyak jenis tumor non-epitel. Hasil yang sangat berbeda dari dua kelompok dapat disebabkan oleh prosedur selama operasi. Pada kelompok CS, peneliti secara maksimal menjaga bagian dalam ovarium tidak terluka dengan hanya membedah kantong membran dan membiarkan sel permukaan terpapar obat-obatan. Sementara dalam kelompok S, peneliti melukai jaringan dalam ovarium ketika memasukkan jahitan berlapis DMBA dengan jarum untuk memungkinkan obat menembus ke dalam jaringan di samping permukaan. Hasil penelitian ini juga memberikan bukti lebih lanjut bahwa asal usul kanker epitel ovarium berasal dari sel permukaan ovarium, dan jenis kanker lainnya mungkin berasal dari lapisan tengah ovarium. Dengan demikian, model strip kain menghasilkan model kanker epitel ovarium yang lebih homogen. Hal ini dapat menyediakan model hewan yang lebih cocok untuk penelitian kanker ovarium daripada model yang diinduksi bahan kimia yang dilaporkan sebelumnya. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa model strip kain DMBA pada tikus menghasilkan insiden dan spesifisitas yang tinggi dari tumor yang diturunkan epitel secara histologis serupa dengan EOC manusia sehingga dapat digunakan untuk menguji agen pencegahan atau terapi untuk EOC<sup>(56)</sup>.

**Tikus model kanker ovarium dengan induksi 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) dikombinasi dengan stimulasi hormon gonadotropin.** Induksi DMBA juga dikombinasikan dengan pemberian stimulasi hormon gonadotropin berulang untuk menginduksi beberapa siklus proliferasi aktif pada epitel permukaan ovarium.

berulang untuk menginduksi beberapa siklus proliferasi aktif pada epitel permukaan ovarium. Pada penelitian Stewart et al., 2004, hewan dibagi dalam tiga kelompok DMBA dengan dosis berbeda atau diikuti dengan pemberian hormon. Tampak pada ovarium yang diinduksi DMBA jika dibandingkan dengan control yaitu adanya lesi asal sel epitel pada tahapan preneoplasia dan neoplasia yang berbeda secara morfologis pada hewan yang diinduksi DMBA. Histologi dan jalur penyebarannya ke organ lain sangat mirip dengan kanker ovarium manusia. *Co-treatment* hormon menyebabkan peningkatan keparahan lesi, menunjukkan bahwa gonadotropin dapat meningkatkan progresi kanker ovarium. Mutasi pada gen Tp53 dan Ki-Ras terdeteksi, yang juga merupakan karakteristik karsinoma ovarium manusia. Selain itu, ekspresi berlebih dari reseptor estrogen dan progesteron diamati pada lesi preneoplastik dan neoplastik awal, menunjukkan peran reseptor ini dalam perkembangan kanker ovarium. Data ini menunjukkan bahwa model hewan DMBA ini menimbulkan lesi ovarium yang sangat mirip dengan kanker ovarium manusia dan cukup untuk studi tambahan tentang mekanisme penyakit dan manajemen klinisnya<sup>(45)</sup>.

Ovulasi yang terus-menerus, peningkatan kadar hormon gonadotropin pasca-menopause, peradangan kronis, dan karsinogen lingkungan diasumsikan memainkan peran kunci dalam onkogenesis ovarium<sup>(60)</sup>. Model-model hewan yang dapat menggambarkan kanker ovarium pada manusia sangat penting untuk memahami patogenesisnya dan untuk menguji strategi pengobatan baru. Sejumlah model telah dikembangkan hingga saat ini berdasarkan pengobatan karsinogen, stimulasi hormon gonadotropin / steroid, dan pemodelan genetik.

Untuk meningkatkan penggunaan dan relevansi fisiologisnya dengan penyakit manusia, model kanker ovarium DMBA telah dimodifikasi dengan (a) mengurangi dosis DMBA secara signifikan, dengan demikian menjaga integritas organ secara maksimal dan (b) dengan menggabungkan beberapa penggunaan hormon gonadotropin, dengan demikian akan meningkatkan faktor risiko tambahan yang terkait dengan kanker ovarium manusia, yang diketahui juga dapat menginduksi hiperovulasi dan meningkatkan mitogenesis epitel permukaan ovarium<sup>(45)</sup>. Karakterisasi model hewan yang dimodifikasi ini menunjukkan munculnya lesi awal dan lanjut dengan sifat progresif yang berkisar dari nonneoplastik ke preneoplastik ke ganas. Histopatologi dan jalur penyebarannya sangat menyerupai kanker ovarium manusia.

Pada penelitian ini implantasi DMBA

disertai dengan pemberian hormon gonadotropin. Untuk menentukan urutan perubahan histologis dan molekuler yang ditimbulkan oleh DMBA di ovarium, subkelompok hewan dikorbankan di berbagai titik waktu, hingga 12 bulan. Pada 5 sampai 6 bulan pasca induksi, sejumlah jenis lesi diamati: (a) lesi nonneoplastik (peradangan kronis, granuloma benda asing, corpora lutea yang menonjol, granuloma, dan salpingitis) ditemukan pada ovarium yang diimplan DMBA; dan (b) penampilan lesi yang bersifat preneoplastik putatif dan dengan karakter progresif diamati terutama pada ovarium yang diimplan DMBA. Ini mewakili lesi epitel proliferasif, tampak di sepanjang permukaan organ atau di korteks ovarium. Lesi preneoplastik lainnya merupakan kista inklusi atau mikrosisteri serosa sederhana; lesi kortikal lainnya dikelilingi oleh stroma ovarium dan ditandai dengan adanya beberapa struktur seperti kelenjar, biasanya ditutupi oleh epitel kuboid serosa, dan beberapa menyerupai diferensiasi epitel tuba fallopi (*endosalpingiosis*). Beberapa lesi preneoplastik menunjukkan atypia seluler dan diklasifikasikan sebagai lesi hiperplastik epitel dengan displasia. Ciri-ciri khas ini membedakannya dengan *borderline ovarian tumors* atau *adenokarsinoma invasive*.

Penelitian ini berusaha untuk meningkatkan onkogenesis pada model implantasi DMBA pada tikus dan mengkarakterisasi tahapan preneoplasia dan neoplasia. Kontribusi hormon gonadotropin untuk proses ini juga ditunjukkan. Implantasi DMBA pada ovarium menginduksi lesi preneoplastik putatif yang berasal dari sel epitel dan dengan histologi progresif yang dianggap mewakili prekursor perkembangan jenis kanker ovarium. Lesi yang diamati pada ovarium tikus menunjukkan lesi epitel proliferasif dengan derajat diferensiasi yang bervariasi, tanpa atau dengan displasia, dan terlokalisasi di sepanjang permukaan ovarium dan korteks. Beberapa lesi, terutama yang terlihat di permukaan, mirip dengan papilla atau papillomatosis difus terlihat pada ovarium manusia. Selain itu, kadang-kadang ditemukan struktur epitel permukaan ovarium lainnya yang sebelumnya dijelaskan pada manusia, yaitu kista inklusi atau *simple serous microcysts*. Perkembangan lesi prekursor diduga secara umum mendahului munculnya tumor *bonafide*, yang juga menampilkan derajat diferensiasi dan perkembangan, mulai dari tumor awal hingga kanker karsinoma invasif tingkat tinggi yang ganas. Selain tumor yang terdeteksi dalam penelitian ini, karsinoma invasif bilateral dengan histologi sel jernih terdeteksi dalam 12 bulan pada hewan yang diimplantasi dengan DMBA. Tumor lanjut ini menampilkan penyebaran luas ke peritoneum, **asites**,

preneoplastik yang diinduksi DMBA dan dalam karsinoma, telah dikaitkan dengan 20% dari tumor ovarium manusia: 60% ditemukan dalam mucinous dan 20% dalam serous karsinoma<sup>(62)</sup>. Frekuensi mutasi Ki-Ras yang relatif tinggi dalam lesi preneoplastik dan, terutama pada yang dengan displasia memberikan indikasi kuat sifat klonal mereka (yaitu, neoplastik). Juga ditambahkan bahwa aktivasi Ki-Ras, melalui mutase sangat penting selama perkembangan kanker ovarium. Akhirnya, ekspresi berlebih yang signifikan dari protein ER- dan PgR juga ditunjukkan pada lesi preneoplastik dan serous low malignant potential tumor yang signifikan. Namun, ekspresi kedua reseptor itu sangat menurun atau tidak ada pada karsinoma lanjut. Selanjutnya, polimorfisme Val660Leu yang sering terjadi pada ekson 4 PgR memiliki hubungan dengan karakteristik kanker ovarium manusia dan dengan risiko kanker ovarium secara keseluruhan.

DMBA adalah karsinogen pluripoten, melalui pembentukan adisi DNA, menginduksi mutasi awal yang mengubah ekspresi dan / atau aktivitas sejumlah onkogen dan gen penekan tumor. DMBA memiliki mekanisme mutagenik yang serupa dengan hidrokarbon aromatik polisiklik lainnya yang jumlahnya relatif tinggi dalam polutan udara dan asap tembakau dan yang telah terlibat dalam perkembangan kanker manusia. Kesamaan dalam histologi dan jalur penyebaran karsinoma ovarium tikus yang diinduksi DMBA dengan yang ada pada manusia, serta adanya mutasi gen yang umum pada kanker ovarium manusia, menunjukkan validitas model hewan ini<sup>(45)</sup>.

### SIMPULAN

Dua masalah yang paling mendesak dalam pengelolaan kanker ovarium adalah kurangnya strategi diagnostik atau skrining yang memadai, dan kambuhnya penyakit yang sering resisten terhadap kemoterapi. Kurangnya metode dalam diagnostik adalah karena kurangnya penanda untuk mendeteksi perubahan pra-neoplastik atau neoplastik awal dalam sel-sel kanker ovarium tipe epitelial. Model hewan coba yang mengalami transformasi neoplastik *in vivo* akan memberikan peluang yang sangat dibutuhkan untuk meneliti perubahan seluler dan molekuler yang terkait dengan inisiasi transformasi sel kanker ovarium tipe epitelial, serta untuk menyediakan model hewan coba untuk penelitian dalam pencegahan, diagnostik, seleksi dan strategi terapeutik dapat dikembangkan. Model xenograft cukup sulit untuk diterapkan. Karsinogen DMBA dapat mewakili efek yang dimiliki karsinogen tersebut pada ovarium wanita yang terpapar. Kesamaan dalam histologi dan jalur penyebaran karsinoma

ovarium tikus yang diinduksi DMBA dengan yang ada pada manusia, serta adanya mutasi gen yang umum pada kanker ovarium manusia, menunjukkan validitas model hewan ini. Onkogenesis ovarium yang diinduksi DMBA pada tikus dapat digunakan untuk menguji praklinis agen baru untuk pencegahan dan / atau terapi penyakit.

### DAFTAR PUSTAKA

1. American Cancer Society, 2018-cancer facts and figures 2018.pdf.
2. Rescigno P, Cerillo I, Ruocco R, Condello C, De Placido S, Pensabene M. New hypothesis on pathogenesis of ovarian cancer lead to future tailored approaches. *BioMed research international*. 2013;2013.
3. Piek JM, Van Diest PJ, Verheijen RH. Ovarian carcinogenesis: an alternative hypothesis. In: *Ovarian Cancer*. Springer; 2008:79-87.
4. Yang-Hartwich Y, Gurrea-Soteras M, Sumi N, et al. Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *Scientific reports*. 2014;4:6116.
5. Bowtell DD. The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(11):803.
6. Koshiyama M, Matsumura N, Konishi I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: type I and type II. *BioMed research international*. 2014;2014.
7. Ahmed N, Stenvers K. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Frontiers in oncology*. 2013;3:256.
8. Puls LE, Duniho T, Hunter IV JE, Kryscio R, Blackhurst D, Gallion H. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 1996;61(1):109-112.
9. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology*. 2010;177(3):1053-1064.
10. Connolly DC. Animal models of ovarian cancer. In: *Ovarian Cancer*. Springer; 2009:353-391.
11. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochemical pharmacology*. 2014;87(1):150-161.
12. Vanderhyden BC, Shaw TJ, Ethier J-F. Animal models of ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003;1(1):67.
13. Perets R, Wyant GA, Muto KW, et al. Transformation of the fallopian tube secretory epithelium leads to high-grade serous ovarian cancer in *Brca*; *Tp53*; *Pten* models. *Cancer cell*. 2013;24(6):751-765.
14. Sherman-Baust CA, Kuhn E, Valle BL, et al. A genetically engineered ovarian cancer mouse model based on fallopian tube transformation mimics human high-grade serous carcinoma development. *The Journal of pathology*. 2014;233(3):228-237.

15. Kim J, Coffey DM, Creighton CJ, Yu Z, Hawkins SM, Matzuk MM. High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(10):3921-3926.
16. Kuhn E, Tisato V, Rimondi E, Secchiero P. Current preclinical models of ovarian cancer. *J Carcinog Mutagen*. 2015;6(2):220.
17. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Molecular therapy*. 2004;10(6):1032-1042.
18. Connolly DC, Hensley HH. Xenograft and Transgenic Mouse Models of Epithelial Ovarian Cancer and Non-Invasive Imaging Modalities to Monitor Ovarian Tumor Growth In Situ: Applications in Evaluating Novel Therapeutic Agents. *Current protocols in pharmacology*. 2009;45(1):14.12. 11-14.12. 26.
19. Kiguchi K, Kubota T, Aoki D, et al. A patient-like orthotopic implantation nude mouse model of highly metastatic human ovarian cancer. *Clinical & experimental metastasis*. 1998;16(8):751-756.
20. XINYU F, Robert M. Human ovarian carcinoma metastatic models constructed in nude mice by orthotopic transplantation of histologically-intact patient specimens. *Anticancer research*. 1993;3:283-286.
21. Verschraegen CF, Hu W, Du Y, et al. Establishment and characterization of cancer cell cultures and xenografts derived from primary or metastatic Mullerian cancers. *Clinical cancer research*. 2003;9(2):845-852.
22. Schumacher U, Adam E, Horny HP, Dietl J. Transplantation of a human ovarian cystadenocarcinoma into severe combined immunodeficient (SCID) mice—formation of metastases without significant alteration of the tumour cell phenotype. *International journal of experimental pathology*. 1996;77(5):219-227.
23. Domecke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications*. 2013;4:2126.
24. Sabbatini P, Harter P, Scambia G, et al. Abagovomab as maintenance therapy in patients with epithelial ovarian cancer: a phase III trial of the AGO OVAR, COGI, GINECO, and GEICO—the MIMOSA study. *Journal of clinical oncology*. 2013;31(12):1554.
25. Hu L, Hofmann J, Holash J, Yancopoulos GD, Sood AK, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor trap combined with paclitaxel strikingly inhibits tumor and ascites, prolonging survival in a human ovarian cancer model. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(19):6966-6971.
26. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035):917.
27. Cannistra SA, Matulonis UA, Penson RT, et al. Phase II study of bevacizumab in patients with platinum-resistant ovarian cancer or peritoneal serous cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5180-5186.
28. Hu L, Hofmann J, Zaloudek C, Ferrara N, Hamilton T, Jaffe RB. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization plus Paclitaxel markedly reduces tumor burden and ascites in athymic mouse model of ovarian cancer. *The American journal of pathology*. 2002;161(5):1917-1924.
29. Werooha SJ, Becker MA, Enderica-Gonzalez S, et al. Tumorgrafts as in vivo surrogates for women with ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2014;20(5):1288-1297.
30. Dobbin ZC, Katre AA, Steg AD, et al. Using heterogeneity of the patient-derived xenograft model to identify the chemoresistant population in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014;5(18):8750.
31. Ricci F, Bizzaro F, Cesca M, et al. Patient-derived ovarian tumor xenografts recapitulate human clinicopathology and genetic alterations. *Cancer research*. 2014;74(23):6980-6990.
32. Elkas JC, Baldwin RL, Pegram M, Tseng Y, Slamon D, Karlan BY. A human ovarian carcinoma murine xenograft model useful for preclinical trials. *Gynecologic oncology*. 2002;87(2):200-206.
33. Khabele D, Fadare O, Liu AY, et al. An orthotopic model of platinum-sensitive high grade serous fallopian tube carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2012;5(1):37.
34. Hidalgo M, Bruckheimer E, Rajeshkumar N, et al. A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(8):1311-1316.
35. Scott CL, Mackay HJ, Haluska Jr P. Patient-derived xenograft models in gynecological malignancies. Paper presented at: American Society of Clinical Oncology educational book/ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting2014.
36. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*. 2004;10(9):942.
37. Ito R, Takahashi T, Katano I, Ito M. Current advances in humanized mouse models. *Cellular & molecular immunology*. 2012;9(3):208.
38. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570.
39. Cooper TK, Gabrielson KL. Spontaneous lesions in the reproductive tract and mammary gland of female non-human primates. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*. 2007;80(2):149-170.
40. Barua A, Bitterman P, Abramowicz JS, et al. Histopathology of ovarian tumors in laying hens: a preclinical model of human ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2009;19(4):531-539-531-539.
41. Tillmann T, Kamino K, Mohr U. Incidence and spectrum of spontaneous neoplasms in male and

- female CBA/J mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2000;52(3):221-225.
42. Walsh KM, Poteracki J. Spontaneous neoplasms in control Wistar rats. *Fundamental and applied toxicology*. 1994;22(1):65-72.
  43. Gregson R, Lewis D, Abbott D. Spontaneous ovarian neoplasms of the laboratory rat. *Veterinary pathology*. 1984;21(3):292-299.
  44. Krarup T. Oocyte destruction and ovarian tumorigenesis after direct application of a chemical carcinogen (9:10-dimethyl-1:2-benzanthrene) to the mouse ovary. *International journal of cancer*. 1969;4(1):61-75.
  45. Stewart SL, Querec TD, Ochman AR, et al. Characterization of a carcinogenesis rat model of ovarian preneoplasia and neoplasia. *Cancer research*. 2004;64(22):8177-8183.
  46. Gertig DM, Hunter DJ, Cramer DW, et al. Prospective study of talc use and ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000;92(3):249-252.
  47. Sims DE, Singh A, Donald A, Jarrell J, Villeneuve DC. Alteration of primate ovary surface epithelium by exposure to hexachlorobenzene: a quantitative study. *Histology and histopathology*. 1991;6(4):525-529.
  48. Maronpot RR. Ovarian toxicity and carcinogenicity in eight recent National Toxicology Program studies. *Environmental health perspectives*. 1987;73:125-130.
  49. Nishida T, Sugiyama T, Kataoka A, Ushijima K, Yakushiji M. Histologic characterization of rat ovarian carcinoma induced by intraovarian insertion of a 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-coated suture: Common epithelial tumors of the ovary in rats? *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*. 1998;83(5):965-970.
  50. Tanaka T, Kohno H, Suzuki R, Sugie S. Lack of modifying effects of an estrogenic compound atrazine on 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Cancer letters*. 2004;210(2):129-137.
  51. Hoyer PB, Davis J, Bedrnicek J, et al. Ovarian neoplasm development by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure. *Gynecologic oncology*. 2009;112(3):610-615.
  52. Crist KA, Zhang Z, You M, et al. Characterization of rat ovarian adenocarcinomas developed in response to direct instillation of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA) coated suture. *Carcinogenesis*. 2005;26(5):951-957.
  53. Tanaka T, Kohno H, Tanino M, Yanaida Y. Inhibitory effects of estrogenic compounds, 4-nonylphenol and genistein, on 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene-induced ovarian carcinogenesis in rats. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2002;52(1):38-45.
  54. Tunca JC, Ertürk E, Ertürk E, Bryan GT. Chemical induction of ovarian tumors in rats. *Gynecologic oncology*. 1985;21(1):54-64.
  55. Hilfrich J. Comparative morphological studies on the carcinogenic effect of 7, 12-dimethylbenz (A) anthracene (DMBA) in normal or intrasplenic ovarian tissue of C3H mice. *British journal of cancer*. 1975;32(5):588.
  56. Huang Y, Jiang W, Wang Y, Zheng Y, Cong Q, Xu C. Enhanced efficacy and specificity of epithelial ovarian carcinogenesis by embedding a DMBA-coated cloth strip in the ovary of rat. *Journal of ovarian research*. 2012;5(1):21.
  57. McDermott S, Ranheim E, Leatherberry V, Khwaja S, Klos K, Alexander C. Juvenile syndecan-1 null mice are protected from carcinogen-induced tumor development. *Oncogene*. 2007;26(10):1407.
  58. Wang Y, Zhang Z, Lu Y, et al. Enhanced susceptibility to chemical induction of ovarian tumors in mice with a germ line p53 mutation. *Molecular Cancer Research*. 2008;6(1):99-109.
  59. Chien JR, Aletti G, Bell DA, Keeney GL, Shridhar V, Hartmann LC. Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer. *Journal of cellular biochemistry*. 2007;102(5):1117-1129.
  60. Ness RB, Cottreau C. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(17):1459-1467.
  61. Tsuta K, Shikata N, Kominami S, Tsubura A. Mechanisms of Adrenal Damage Induced by 7, 12-Dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene in Female Sprague-Dawley Rats. *Experimental and molecular pathology*. 2001;70(2):162-172.
  62. Enomoto T, Weghorst C, Inoue M, Tanizawa O, Rice J. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *The American journal of pathology*. 1991;139(4):777.155, 283, 290-91, 378-9, 441-2, 445-6, 549-52, 592, 596, 766.

## Optimasi Nanoemulsi A/M/A Ekstrak Etanol Daun Binahong dan Konjugat AG-Kitosan Menggunakan Desain *Box-Behnken*

### (Optimization of W/O/W Multiple Nanoemulsion of Madeira Vein Leaves Extract and Glycolic Acid-Chitosan Conjugate Using *Box-Behnken* Design)

MALINDA PRIHANTINI<sup>1,2</sup>, IRDA FIDRIANNY<sup>1</sup>, TRI SUCIATI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Indonesia

<sup>2</sup>Universitas Wahid Hasyim, Semarang Indonesia

Diterima 20 Agustus 2018, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Penuaan dini pada kulit yang ditandai dengan kerutan-kerutan halus dapat diatasi dengan merangsang produksi kolagen dan menghambat degradasinya, dan juga mengurangi penumpukan korneosit. Daun Binahong telah terbukti menginduksi produksi kolagen dan menghambat degradasinya, sementara asam glikolat meningkatkan deskuamasi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengoptimalkan formula nanoemulsi ganda A/M/A dari ekstrak daun Binahong dalam fase A1 dan asam glikolat dalam fase A2. Asam glikolat ditambahkan setelah terkonjugasi dengan kitosan untuk mengurangi efek menyengat pada kulit. Nanoemulsi ganda A/M/A dibuat melalui dua langkah emulsifikasi: A1/M emulsi primer menggunakan penghomogen kecepatan tinggi, dan emulsi sekunder menggunakan pengaduk magnetik. A1/M dioptimalkan termasuk pemilihan kosurfaktan dan konsentrasi ekstrak, diikuti oleh optimasi emulsi sekunder menggunakan metodologi permukaan respon yang terdiri dari 2-level faktorial dan desain *Box-Behnken*. A1/M terdiri dari ekstrak, polisorbate 80 sebagai surfaktan, PEG 400 sebagai kosurfaktan dan isopropil miristat sebagai fase minyak. Faktorial 2 tingkat memberikan tiga faktor penting: waktu sonikasi A1/M, konsentrasi A1/M, dan waktu pengadukan emulsifikasi sekunder. Optimalisasi *Box-Behnken* untuk ukuran bola di bawah 400 nm diperoleh waktu sonikasi A1/M 6-10 menit, konsentrasi A1/M 12-16%, dan waktu pengadukan emulsifikasi sekunder 32-42 menit.

**Kata kunci:** Daun Binahong, asam glikolat, kitosan, nanoemulsi, A/M/A, *Box-Behnken*, desain faktorial.

**Abstract:** Skin premature aging which is characterized by fine wrinkles can be overcome by stimulating collagen production and inhibiting its degradation, and also reducing corneocyte buildup. Madeira vein has been shown to induce collagen production and inhibit its degradation, while glycolic acid increase desquamation. The aim of this research was to optimize W/O/W multiple nanoemulsion formula of Madeira vein-leaves extract in W1 phase and glycolic acid in W2 phase. Glycolic acid was added after conjugated with chitosan to reduce its stinging effect on skin. The W/O/W multiple nanoemulsion was prepared through two emulsification steps: W1/O primary emulsion using high speed homogenizer, and the secondary emulsion using magnetic stirrer. W1/O was optimized including the selection of co surfactant and extract concentration, followed by secondary emulsion optimization using response surface methodology consisted of 2-level factorial and *Box-Behnken* design. The W1/O consisted of extract, polysorbate 80 as surfactant, PEG 400 as co surfactant and isopropyl myristate as oil phase. The 2-level factorial gave the three significant factors: W1/O sonication time, W1/O concentration, and secondary emulsification stirring time. *Box-Behnken* optimization for globule size below 400 nm was obtained by 6-10 minutes W1/O sonication time, 12-16% W1/O concentration, and 32-42 minutes stirring time of secondary emulsification.

**Keywords:** Madeira vein, glycolic acid, chitosan, nanoemulsion, W/O/W, *Box-Behnken*, factorial design.

\*Penulis korespondensi: Hp. 081395075530  
email: tri.suciati@fa.itb.ac.id

## PENDAHULUAN

PENUAAN kulit adalah terjadinya perubahan struktur dan penurunan fungsi kulit disebabkan oleh faktor endogen dan eksogen<sup>(1)</sup>. Penuaan kulit ditandai dengan munculnya kerutan halus dan menurunnya elastisitas kulit akibat penumpukan stratum korneum dan penurunan produksi kolagen serta peningkatan degradasi kolagen pada lapisan dermis<sup>(2,3)</sup>. Ekstrak etanol daun binahong (EEDB) mampu meningkatkan produksi kolagen<sup>(4)</sup> serta memiliki aktivitas antioksidan<sup>(5)</sup> untuk menghambat degradasi kolagen melalui penghambatan pembentukan ROS (*reactive oxygen species*) dalam menginduksi matriks metaloproteinase (MMP). Bahan lain yang mampu mengatasi gejala penuaan kulit adalah asam glikolat (AG) dengan cara menurunkan kohesi interselular antar korneosit sehingga memicu deskuamasi<sup>(6)</sup>. Namun, AG memiliki efek menyengat di kulit sehingga dilakukan konjugasi dengan kitosan (KS) sebagai golongan aminosakarida untuk mengurangi efek menyengat tersebut<sup>(7)</sup>.

Sistem nanoemulsi ganda air dalam minyak dalam air (A/M/A) merupakan sistem penghantaran yang dapat memformulasi dua bahan aktif berbeda dalam satu formula<sup>(8)</sup>. Ukuran dibawah 400 nm dari globul emulsi dapat memfasilitasi bahan aktif berefek pada sintesis kolagen di dermis<sup>(9)</sup>. Teknik statistika multifaktor, *response surface methodology* (RSM) merupakan teknik optimasi yang lebih komprehensif dibandingkan teknik ovat (*one-variable-at-a-time*) karena menggambarkan efek keseluruhan dari setiap faktor, termasuk interaksi antarfaktor terhadap respon serta lebih efektif dan efisien<sup>(10)</sup>.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Simplisia daun binahong (Lembang Kabupaten Bandung), Asam Glikolat (hibah PT. Paragon Technology & Innovation), Kitosan bobot molekul rendah (17 kDa) (preparasi di Laboratorium Farmasetika ITB), etanol 96% (Brataco), isopropil miristat (IPM) (BASF), polisorbate 80 (Brataco), PEG 400 (Laboratorim Farmasi ITB), sorbitan monolaurat (Laboratorim Farmasi ITB), *Cremophor* RH-40 (BASF), dan *aquideion* (Laboratorim Kimia ITB).

**METODE. Karakterisasi Simplisia.** Karakterisasi simplisia dalam rangka standardisasi mutu simplisia meliputi penentuan kadar air simplisia, penentuan kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol menurut pedoman Farmakope Herbal Indonesia<sup>(11)</sup>.

**Ekstraksi.** Simplisia daun binahong diekstraksi menggunakan refluks dengan pelarut etanol 96%

selama 2 jam sejak pelarut mendidih. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental.

**Karakterisasi Ekstrak.** Karakterisasi EEDB meliputi penentuan bobot jenis, penapisan fitokimia, pengamatan pola kromatogram dan penetapan flavonoid total. Bobot jenis ekstrak 1% ditentukan menggunakan piknometer. Penapisan fitokimia untuk mengecek keberadaan flavonoid, kuinon, saponin, tanin, alkaloid, dan steroid/ triterpenoid. Pengamatan pola kromatogram menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel GF254, fase gerak kloroform-asam asetat-metanol (9:0.5:0.5), dan pengamatan di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Penetapan flavonoid total menggunakan Metode 2 Farmakope Herbal Indonesia<sup>(11)</sup>.

**Pembuatan Konjugat AG-KS.** Larutan konjugat dibuat dengan melarutkan AG-KS 1:1, diikuti sonikasi selama 10 menit.

**Optimasi Formula Nanoemulsi Primer A1/M.** Formula A1/M dioptimasi dari penelitian Dwiani (2012) meliputi pemilihan kosurfaktan dan optimasi dosis ekstrak menggunakan metode ovat<sup>(12)</sup>. Pembentukan nanoemulsi primer dengan mencampur fase air dan fase minyak pada suhu 60-70°C menggunakan *magnetic stirrer* kecepatan 550 rpm selama 1 menit, dilanjutkan Ultraturax pada 10.000 rpm selama 5 menit.

**Optimasi Formula Nanoemulsi Ganda A/M/A Menggunakan Desain Eksperimen.** Tahap awal dilakukan percobaan pendahuluan menggunakan metode fraksional faktorial 2-level untuk menentukan faktor bebas yang paling signifikan sebagai dasar menentukan faktor pada RSM desain *Box-Behnken*. Pembuatan nanoemulsi ganda A/M/A dilakukan dengan mencampurkan emulsi primer A1/M, surfaktan (*Cremophor* RH 40 – Span 20 4:1), dan propilen glikol ke dalam larutan konjugat AG-KS sebagai fase A2, diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada kecepatan 550 rpm selama 30-50 menit.

**Evaluasi Organoleptik, pH, Ukuran Globul, dan Potensial Zeta.** Uji organoleptik dilakukan melalui pengamatan secara visual sedangkan pengukuran pH dilakukan menggunakan pH meter yang telah terkalibrasi. Pengukuran ukuran globul dan potensial zeta diukur menggunakan Delsa TM Nano C, Beckman Coulter.

**Penentuan Tipe Emulsi.** Uji tipe emulsi dilakukan dengan metode pewarnaan menggunakan pewarna larut air metilen biru dan diamati menggunakan mikroskop polarisasi (Olympus BX50) perbesaran 20x10.

**Uji Stabilitas Fisik Sentrifuga.** Uji stabilitas fisik



menggunakan metode sentrifuga selama 30 menit pada kecepatan 13000 rpm. Sediaan dikatakan stabil jika tidak terjadi pemisahan fasa setelah sentrifugasi<sup>(13)</sup>.

**Uji Penetrasi Menggunakan Sel Difusi.** Uji difusi dilakukan terhadap sediaan nanoemulsi ganda A/M/A hasil optimasi dan emulsi primer A1/M, menggunakan sel difusi model aliran dengan membran kertas Whatmann no 1 (diameter membran 9 cm, diameter pori 11  $\mu$ m) yang telah direndam dalam cairan Spangler selama 15 menit 24 jam sebelum digunakan<sup>(14)</sup>. Pengambilan sampel dilakukan setiap jam selama 8 jam sebanyak 3 mL. Kadar terdifusi diukur dengan metode total flavonoid.

**Uji Iritasi Kulit.** Uji iritasi kulit dilakukan terhadap kelinci albino jantan sehat dengan bobot 2,5-3,5 kg. Pengujian dilakukan dengan uji pendahuluan terhadap 1 ekor kelinci dan dilanjutkan dengan penambahan 2 ekor kelinci. Parameter yang diamati terjadinya eritema dan edema lalu dihitung skor iritasinya<sup>(15,16)</sup>.

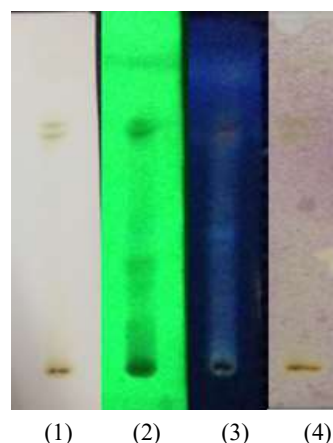
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakterisasi Simplisia.** Kadar air simplisia kering daun binahong sebesar 5,00 % (v/b). Kadar air simplisia lebih dari 10% dapat memicu terjadinya reaksi enzimatik dan menyebabkan pertumbuhan mikroba yang dapat mengakibatkan kerusakan pada simplisia sehingga menurunkan mutu simplisia. Kadar sari larut air sebesar 25,02% dan kadar sari larut etanol 5,43%.

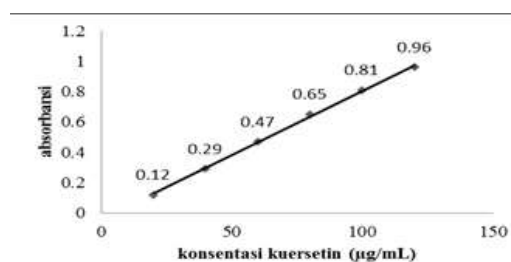
**Ekstraksi.** Rendemen EEDB pekat yang diperoleh adalah 14,61%. Rendemen EEDB pekat dari simplisia yang tumbuh di lokasi yang sama adalah sebesar 12,07%<sup>(17)</sup>. Hasil menunjukkan simplisia daun suji yang tumbuh di Perkebunan Manoko Lembang dan diekstraksi menggunakan refluks dengan pelarut etanol 96% memiliki nilai rendemen yang hampir sama. Perbedaan yang terjadi kemungkinan karena waktu panen yang berbeda.

**Karakterisasi Ekstrak.** Bobot jenis EEDB 1% adalah 0,93 gram/mL. Hasil penapisan fitokimia EEDB positif mengandung golongan senyawa flavonoid, fenol, dan steroid/triterpenoid. Hasil penapisan fitokimia EEDB yang berasal dari lokasi tumbuh yang sama mengandung senyawa flavonoid, saponin, alkaloid, dan steroid/triterpenoid<sup>(17)</sup>. Adanya perbedaan kandungan senyawa karena waktu panen yang berbeda. Pola kromatogram EEDB pada Gambar 1 menunjukkan hasil penyemprotan dengan DPPH 0,2% memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu sehingga disimpulkan EEDB mengandung senyawa antioksidan. Berdasarkan kurva

kalibrasi kuersetin pada Gambar 2 diperoleh regresi  $y = 0,0085x - 0,044$  dengan koefisien korelasi ( $R^2$ ) sebesar 0,9989. Hasil penetapan flavonoid total pada ekstrak adalah 2,47% ekivalensi kuersetin.



**Gambar 1.** Kromatogram lapis tipis pemantauan ekstrak, (1) di bawah sinar tampak, (2) di bawah sinar UV  $\lambda$  254 nm, (3) di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm, (4) disemprot DPPH 0,2% dalam metanol.



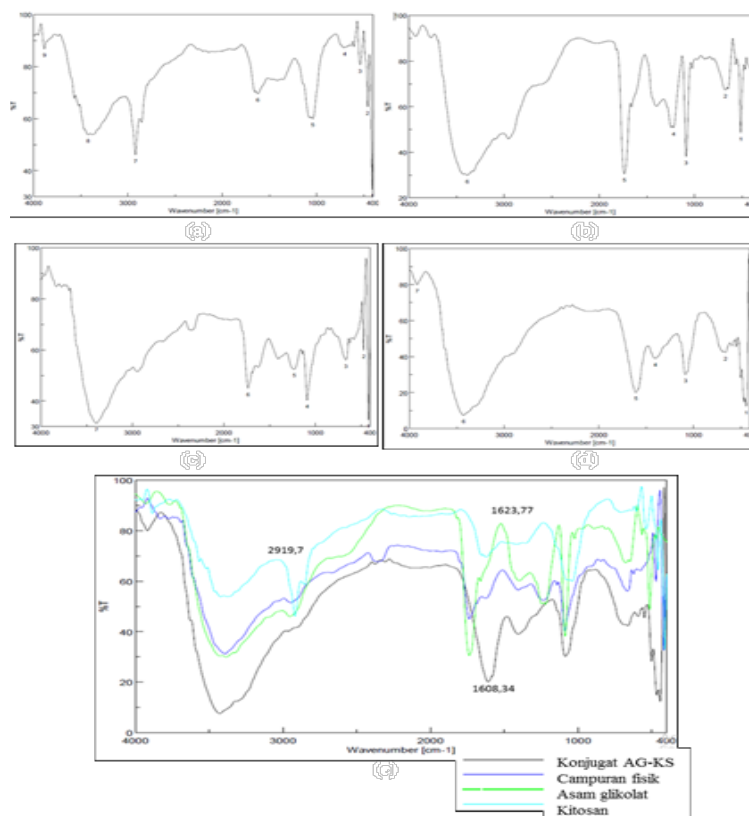
**Gambar 2.** Kurva kalibrasi kuersetin.

**Konjugat AG-KS.** Pada data inframerah di Gambar 3, tiga hal yang dapat mengindikasikan suatu reaksi terjadi adalah muncul atau hilangnya puncak baru, pergeseran puncak, dan perubahan intensitas puncak. Intensitas serapan suatu spektrum inframerah pada kadar zat yang sama menandakan kekuatan momen dipolnya. Kekuatan momen dipol menyatakan kepolaran dari suatu zat berdasarkan elektronegativitas relatif atom-atom yang terlibat dalam ikatan tersebut bergantung pada besarnya perbedaan muatan dan jarak antara kedua muatan<sup>(18)</sup>.

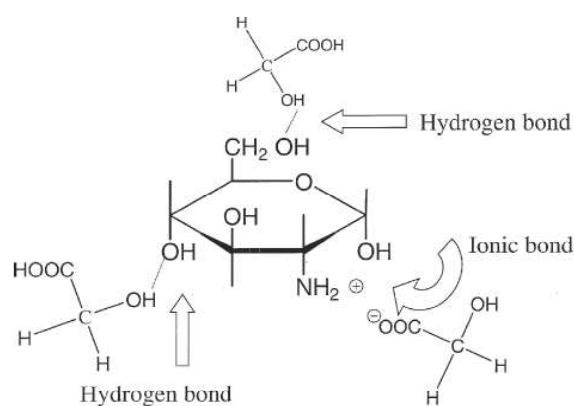
Pada spektrum konjugat AG-KS muncul pita baru pada 1608,34  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan pergeseran ikatan N-H karena terjadi interaksi ionik antara gugus amina dari KS—yang mengalami protonasi sehingga bermuatan positif—dengan gugus C=O karboksilat dari AG yang bermuatan negatif pada Gambar 4. Hal ini didukung dengan hilangnya ikatan

C=O karboksilat dari AG pada bilangan gelombang 1735,62 cm<sup>-1</sup>. Selain itu, tingkat serapan inframerah ikatan hidrogen pada bilangan gelombang 3200-3600

cm<sup>-1</sup> mengalami peningkatan pada spektrum konjugat AG-KS dibandingkan dengan spektrum AG dan KS, serta campuran fisik keduanya.



Gambar 3. Spektrum inframerah karakterisasi pembentukan konjugat AG-KS: (a) KS, (b) AG, (c) campuran fisik AG-KS, (d) konjugat AG-KS, (e) overlay spektrum KS, AG, campuran fisik dan konjugat AG-KS.



Gambar 4. Interaksi antara AG dengan KS pada konjugat AG-KS<sup>(42)</sup>.

**Formula Nanoemulsi Primer A1/M.** Pembuatan nanoemulsi ganda A/M/A dilakukan dengan metode dua tahap emulsifikasi<sup>(19)</sup>. Berdasarkan hasil optimasi

pada Tabel 1 dipilih PEG 400 sebagai kosurfaktan dalam formula karena dapat memberikan emulsi yang jernih dan stabil serta tidak terjadi pemisahan

fasa. Hasil optimasi penambahan jumlah ekstrak ditampilkan pada Tabel 2. Dipilih formula P3.3 karena mengandung konsentrasi ekstrak paling besar dan tidak menunjukkan pemisahan fasa. Berdasarkan hasil optimasi didapatkan formula A1/M yang optimum terdiri dari EEDB 5%, aquadeion 10%, polisorbat 80 27,5%, PEG 400 12,5%, dan IPM 45%.

IPM merupakan minyak non-trigliserida berat molekul rendah, dengan karakteristik polaritas tinggi, tegangan antarpermukaan rendah dan viskositas rendah. Minyak dengan karakteristik tersebut menguntungkan dalam pembuatan nanoemulsi karena lebih mudah menghasilkan ukuran nano dibandingkan dengan minyak mineral dan minyak tumbuhan yang memiliki ukuran molekul besar<sup>(20)</sup>.

IPM juga meningkatkan penetrasi percutan melalui mekanisme menginduksi ketidakteraturan pada struktur SC yang rigid dengan cara bagian polar dari gugus ester pada IPM berinteraksi dengan bagian polar dari membran interselular SC sedangkan bagian alkilnya berinteraksi dengan sel korneosit. Hal ini membuat fluiditas lipid membran interselular pada SC meningkat sehingga lebih mudah untuk dilewati<sup>(21)</sup>. Metode pencampuran dalam pembuatan A1/M merupakan metode pencampuran berenergi tinggi. Proses emulsifikasi menggunakan metode ini dapat memecah droplet menjadi globul-globul berukuran kecil dan mengusir gelembung udara dari dalam media sehingga menghasilkan daerah dengan aliran hidrodinamik yang kuat di sekitar fase air<sup>(22)</sup>.

**Tabel 1. Optimasi pemilihan kosurfaktan.**

	Jumlah bahan dalam sediaan (% b/b)		
	P1	P2	P3
Aquadeion	10	10	10
Polisorbat 80	27,5	27,5	27,5
Gliserin	12,5	0	0
Propilen glikol	0	12,5	0
PEG 400	0	0	12,5
Isopropil Miristat ad	100	100	100
Pengamatan	Translusen	Translusen	Jernih

**Tabel 2. Optimasi jumlah ekstrak.**

Formula	Jumlah bahan dalam sediaan (% b/b)		
	P3.1	P3.2	P3.3
Ekstrak	0,5	2	5
Aquadeion	10	10	10
Polisorbat 80	27,5	27,5	27,5
PEG 400	12,5	12,5	12,5
Isopropil Miristat ad	100	100	100
Pengamatan	Kuning jernih, stabil	Kuning kehitaman, stabil	Hitam pekat, stabil

**Formula Nanoemulsi Ganda A/M/A Menggunakan Desain Eksperimen.** Formula nanoemulsi A/M/A terdiri dari emulsi primer A1/M, surfaktan, peningkat viskositas, dan larutan konjugat AG-KS sebagai fase A2. Pada pembuatan emulsi ganda A/M/A diperlukan dua emulgator yaitu emulgator HLB rendah untuk stabilisasi permukaan A1/M dan emulgator HLB lebih tinggi untuk

stabilisasi permukaan M/A2<sup>(23)</sup>. Dalam penelitian ini digunakan kombinasi surfaktan polisorbat 80 - PEG 400 27.5% : 12.5% dengan HLB 13,94 sebagai emulgator A1/M dan kombinasi Cremophor RH 40 - Span 20 4:1 dengan HLB 14,52 sebagai emulgator kedua. Polimerik surfaktan lebih dipilih dibandingkan surfaktan monomer karena dapat meningkatkan pelingkupan fase dalam selama proses emulsifikasi

sehingga memberikan enkapsulasi yang lebih baik<sup>(24)</sup>. Pada tahap emulsifikasi pertama digunakan ultrasonikasi, sedangkan pada tahap kedua digunakan magnetic stirrer karena pada tahap ini globul yang terbentuk dapat rusak dan air yang telah terenkapsulasi pada fase dalam dapat keluar sehingga sebaiknya digunakan metode pencampuran berenergi rendah<sup>(25)</sup>.

Hasil uji pendahuluan optimasi formula A/M/A menggunakan desain fraksional faktorial 2-level tercantum pada Tabel 3. Respon ukuran globul dianalisa efek paretonya untuk mengidentifikasi faktor yang paling signifikan diantara keempat faktor

bebas tersebut. Hasilnya hanya penambahan propilen glikol yang signifikan mempengaruhi ukuran globul nanoemulsi A/M/A ( $P 0,022$ ,  $\alpha 0,05$ ). Namun, ukuran globul merupakan pengaruh beberapa faktor yang saling terkait, sehingga dipilih ketiga faktor (A, B, D) untuk dilanjutkan ke tahap Box-Behnken. Waktu dan kecepatan pencampuran atau waktu sonikasi perlu dioptimasi selama proses pembuatan dalam rangka efisiensi proses<sup>(26)</sup>. Dengan pertimbangan efisiensi, dipilih kecepatan pengadukan pada nilai minimum yaitu 550 rpm, konsentrasi surfaktan 10%. Hasil desain uji Box-Behnken ditampilkan pada Tabel 4. dan parameter statistiknya pada Tabel 5.

**Tabel 3. Desain fraksional faktorial 2-level formula nanoemulsi ganda A/M/A<sup>(2)</sup>.**

Formula	Faktor					Respon Ukuran
	Sonikasi	A1/M	Smix (%)	Waktu	Kecepatan	
1	5	10	10	50	550	832,8
2	10	20	10	50	1100	Invalid
3	10	10	5	30	550	322,4
4	10	10	10	30	1100	Invalid
5	5	20	5	30	1100	1165,9
6	5	10	5	50	1100	355,0
7	5	20	10	30	550	1589,3
8	10	20	5	50	550	Invalid

**Tabel 4. Hasil uji Box-Behnken formula nanoemulsi ganda A/M/A.**

Formula	Faktor			Respon Ukuran globul (nm)
	Sonikasi	A1/M	Waktu pengadukan (menit)	
1	7,5	20	30	506,9
2	10,0	15	30	552,0
3	10,0	15	50	331,0
4	5,0	15	30	1252,5
5	7,5	10	50	1020,6
6	7,5	20	50	1186,2
7	5,0	20	40	1189,5
8	10,0	20	40	814,6
9	7,5	15	40	324,7
10	5,0	15	50	561,1
11	5,0	10	40	354,5
12	7,5	15	40	302,3
13	7,5	10	30	642,8
14	10,0	10	40	276,2
15	7,5	15	40	294,9

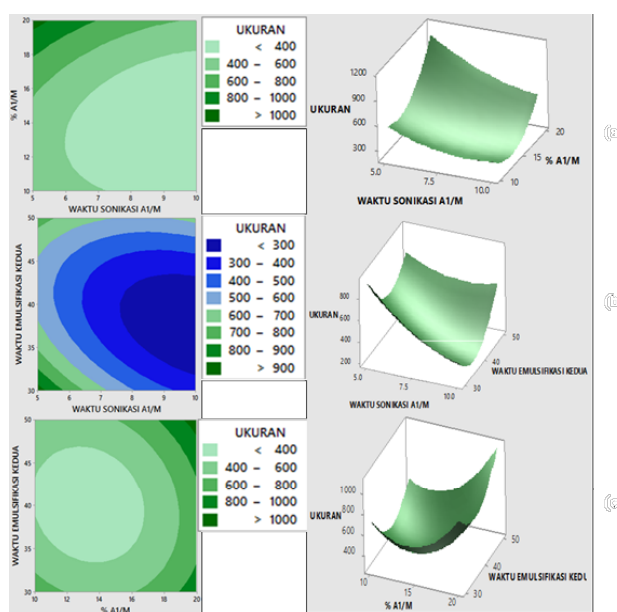
Tabel 5. Parameter statistika hasil uji *Box-Behnken* formula nanoemulsi ganda A/M/A.

Source	Df	Sum square	Mean square	F value	P value
Model	9	8476910	941879	2,66	0,147
$\eta_1$	1	4836672	4836672	13,66	0,014
$\eta_2$	1	1062007	1062007	3,00	0,144
$\eta_3$	1	138391	138391	0,39	0,559
$\eta_1^2$	1	1211675	1211675	3,42	0,124
$\eta_2^2$	1	15311	15311	0,04	0,843
$\eta_3^2$	1	832565	832565	2,35	0,186
$\eta_{12}$	1	255177	255177	0,72	0,435
$\eta_{13}$	1	208986	208986	0,59	0,477
$\eta_{23}$	1	2338	2338	0,01	0,938
Lack of fit	3	1076561	358854	1,04	0,526
Pure error	2	693386	346693		
Total	14				

\*p&lt;0,05

Berdasarkan analisis efek utama dari setiap faktor terhadap ukuran globul terlihat bahwa semakin lama waktu sonikasi A1/M, ukuran globul nanoemulsi ganda A/M/A yang dihasilkan semakin kecil karena terjadi pemecahan droplet menjadi ukuran yang lebih kecil melalui mekanisme disrupsi<sup>(27)</sup>. Pembentukan nanoemulsi dipengaruhi oleh kesetimbangan antara disrupsi dan koalesen. Meningkatnya konsentrasi

emulsi primer membuat surfaktan dalam formula tidak cukup lagi untuk dapat teradsorpsi pada permukaan droplet yang baru terbentuk sehingga mengakibatkan pecahnya droplet selama proses emulsifikasi yang akibatnya kembali menaikkan ukuran globul. Pembentukan ukuran globul yang lebih besar seiring dengan meningkatnya waktu pengadukan mengakibatkan terjadinya *over-processing* selama tahap emulsifikasi yang memicu koalesen<sup>(26)</sup>.



Gambar 5 Grafik kontur 2 dimensi dan 3 dimensi desain *Box-Behnken* nanoemulsi ganda A/M/A terhadap respon ukuran, (1) waktu sonikasi A1/M terhadap %A1/M, (2) waktu sonikasi A1/M terhadap waktu emulsifikasi kedua, (3) %A1/M terhadap waktu emulsifikasi kedua.

Hasil analisa pengaruh interaksi antar faktor terhadap respon digambarkan dalam pada Gambar 5. Berdasarkan grafik tersebut, nanoemulsi ganda dengan ukuran dibawah 400 nm dapat dihasilkan melalui formula A1/M sebanyak 12-16%, waktu sonikasi A1/M selama 6-10 menit, dan waktu emulsifikasi kedua menggunakan magnetic stirer selama 32-42 menit. Dari ketiga model matematik, ditentukan formula optimum melalui nilai turunan pertama dari masing-masing fungsi untuk tiap variabel. Nilai minimum atau maksimum dari satu persamaan diperoleh saat gradien t dari nilai turunan pertama sama dengan nol<sup>(28)</sup>. Hasil turunan pertama untuk setiap faktor atau formula optimum yaitu konsentrasi A1/M 14%, waktu sonikasi A1/M 10 menit, dan waktu emulsifikasi kedua selama 38 menit.

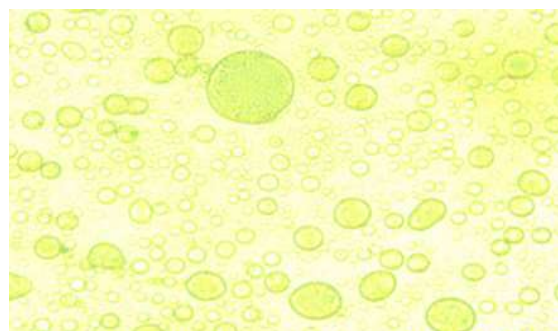
**Pengamatan Organoleptik, pH, Ukuran Globul, dan Potensial Zeta.** Hasil uji organoleptik terhadap sediaan hasil optimasi memiliki karakteristik encer, berwarna coklat, jernih, beraroma khas aromatik dan ekstrak. Sediaan berada pada pH 4,34 dengan ukuran globul sebesar  $214 \pm 104$  nm. Jika dibandingkan dengan prediksi ukuran menurut desain *Box-Behnken* maka galatnya sebesar 5,13%. Hasil analisis potensial zeta terhadap sediaan optimum didapatkan nilai -6,18 mV, larutan konjugat AG-KS -2,10 mV, dan larutan KS +15,69 mV. Muatan negatif pada sediaan dan larutan konjugat AG-KS kemungkinan disebabkan oleh AG bebas yang tidak terkonjugasi dengan KS. Suatu sistem koloid dengan nilai potensial zeta absolut (negatif maupun positif) diatas 30 mV stabil secara elektrik karena nilai tersebut mengindikasikan derajat tolak-menolak antar muatan sejenis dalam sistem dispersi<sup>(29,30)</sup>.

**Tipe Emulsi.** Hasil uji tipe emulsi ditampilkan pada Gambar 6. Berdasarkan gambar tersebut dapat dinyatakan bahwa tipe nanoemulsi ganda yang terbentuk adalah tipe air dalam minyak dalam air (A/M/A), ditandai dengan warna biru pada bagian luar globul (fase A2) yang didalamnya tersusun atas beberapa globul kecil (fase minyak) yang pada bagian tengahnya tampak titik-titik berwarna biru (fase A1). Emulsi ganda hasil optimasi termasuk kategori tipe C yang sangat menguntungkan dalam sistem penghantaran obat karena dapat memberikan pelepasan terkontrol dari bahan yang terenkapsulasi dibandingkan dengan tipe A dan B<sup>(31)</sup>.

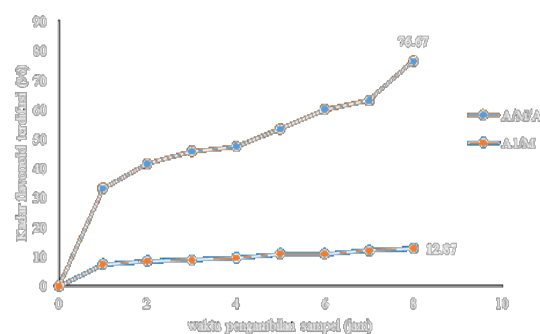
**Stabilitas Fisik Sediaan.** Hasil uji stabilitas fisik menggunakan metode sentrifuga tidak terjadi pemisahan fase pada sediaan. Hal tersebut mengindikasikan secara fisik sediaan stabil selama 1 tahun.

**Uji Penetrasi Menggunakan Sel Difusi.** Hasil uji penetrasi terhadap sediaan ditampilkan pada

Gambar 7, dengan kadar flavonoid terpenetrasi hingga jam ke-8 untuk sediaan optimum nanoemulsi ganda A/M/A mencapai 76,67% dan untuk emulsi primer A1/M mencapai 12,86%. Rendahnya kadar flavonoid terpenetrasi pada sistem A1/M karena minyak sebagai fase terluar dari sistem memiliki koefisien partisi yang rendah di cairan penerima sehingga jumlah flavonoid di cairan penerima sebanding dengan partisi dari minyak pembawanya di cairan penerima, akibatnya kadar flavonoid yang terukur di cairan penerima cenderung konstan tiap waktu pengambilan sampel<sup>(32)</sup>



Gambar 6. Nanoemulsi ganda A/M/A hasil optimasi.



Gambar 7. Profil difusi sediaan nanoemulsi ganda A/M/A dan emulsi primer A1/M.

**Uji Iritasi Kulit.** Hasil uji iritasi sediaan terhadap 3 ekor kelinci memberikan nilai indeks iritasi primer sebesar 0,41 dan termasuk dalam kategori iritasi sangat ringan<sup>(21)</sup>. Eritema tingkat 1 dan 2 yang muncul pada ketiga kelinci selama pengamatan pada jam ke-24, 48, dan 72 kemungkinan karena AG bebas yang belum terkonjugasi.

## SIMPULAN

Sediaan nanoemulsi ganda A/M/A terdiri dari emulsi primer A1/M yang mengandung EEDB 5%, polisorbitat 80 27,5%, PEG 400 12,5% dan isopropil miristat 45%. Hasil optimasi *Box-Behnken* terhadap formula

nanoemulsi ganda A/M/A untuk mendapatkan ukuran globul dibawah 400 nm terdiri dari waktu sonikasi A1/M 6-10 menit, konsentrasi A1/M 12-16%, surfaktan 10%, peningkat viskositas 2,5%, kecepatan dan waktu pengadukan tahap emulsifikasi kedua adalah 550 rpm selama 32-42 menit.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada pihak-pihak yang sudah membantu dalam penyediaan bahan penelitian: PT. BASF Indonesia dan PT. Paragon Technology and Innovation.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ganceviciene, Ruta, et al., 2012, Skin anti-aging strategies. *Dermato-endocrinology*, 4(3): 308-19.
- Baumann L., 2009, *Cosmetic dermatology principle and practice* 2nd ed, New York: The McGraw-Hill Companies. p. 3-8, 34-8.
- Draeos ZD., 2016, *Cosmetic dermatology products and procedure* 2nd ed, West Sussex: John Wiley & Sons, p. 5.
- Raust AA., 2012, Pengembangan formula matriks berbasis mikropartikel kitosan sebagai sistem penghantaran EEDB untuk kultivasi sel fibroblast [tugas akhir], Bandung: Program Sarjana Institut Teknologi Bandung.
- Amanda P., 2012, Isolasi suatu senyawa antioksidan dari ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera Cardifolia* (Ten.) Steenis [tugas akhir], Bandung: Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Sharad, J., 2013, Glycolic acid peel therapy – a current review, *Dove Press Journal: Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 6, 281-8.
- Rosen M., 2005, *Delivery system handbook for personal care and cosmetic products: technology, applications and formulations*, New York: William Andrew, p. 881-908.
- Kovács, A., Erős, I., & Csóka, I., 2016, Optimization and development of stable w/o/w cosmetic multiple emulsions by means of the Quality by Design approach, *International Journal of Cosmetic Science*, 38 (2), 128-38.
- Verma, D. D., Verma, S., Blume, G., & Fahr, A., 2003, Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin, *International Journal of Pharmaceutics*, 258 (1-2), 141-51.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliviera, E. P, Villar, L. S., dan Escaleira, L.A., 2008, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76, 965 – 77.
- Kementerian Kesehatan RI. Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2011, *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia edisi II*, Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.
- Dwiani, R. R. S., 2012, Formulasi emulsi ganda A/M/A  $\alpha$  – Arbutin dan uji aktivitas inhibisi sediaan terhadap enzim tirosinase, Tugas akhir Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Pamudji, J. S., Mauludin, R., Indriani, N., 2016, Development of nanostructured lipid carrier formulation containing of retinyl palmitate, *Int J Pharm Pharm Sci*, 8 (2), 256-60.
- Tofani, R. P., Sumirtapura, Y. C., & Darijanto, S. T., 2016, Formulation, characterisation, and in vitro skin diffusion of nanostructured lipid carriers for deoxyarbutin compared to a nanoemulsion and conventional cream. *Scientia Pharmaceutica*, 84 (4), 634-45.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI), 2014, Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan no 7 tentang pedoman uji toksisitas nonklinik secara in vivo, BPOM RI, Jakarta.
- OECD, 2015, Acute dermal irritation/corrosion. in OECD guidelines for the testing of chemicals section 4 no. 404, OECD, Paris.
- Raust, A., A., 2017, Pengembangan formula matriks berbasis mikropartikel kitosan sebagai sistem penghantaran ekstrak etanol daun binahong untuk kultivasi sel fibroblas, Tugas akhir Program Sarjana, Institut Teknologi Bandung.
- Watson, David G., 2005, *Pharmaceutical Analysis* 2nd ed., United Kingdom, Oxford, 135, 195.
- Mahmood, T., Akhtar, N., & Manickam, S., 2014, Interfacial film stabilized W/O/W nano multiple emulsions loaded with green tea and lotus extracts: systematic characterization of physicochemical properties and shelf-storage stabilit, *Journal of nanobiotechnology*, 12 (1), 20.
- Wang, Y., 2014, Preparation of Nano- and Microemulsion using Phase Inversion and Emulsion Titration Methods, Thesis Master of Food and Technology, Massey University, 6 – 36.
- Eichner, A., Stahlberg, S., Sonnenberger, S., Lange, S., Dobner, B., Ostermann, A., & Neubert, R. H., 2017, Influence of the penetration enhancer isopropyl myristate on stratum corneum lipid model membranes revealed by neutron diffraction and  $^2\text{H}$  NMR experiments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859 (5), 745-55.
- Delmas, T., Piraux, H., Couffin, A. C., Texier, I., Vinet, F., Poulin, P., & Bibette, J., 2011, How to prepare and stabilize very small nanoemulsions, *Langmuir*, 27(5), 1683-92.
- Schmidts, T., Dobler, D., Nissing, C., & Runkel, F., 2009, Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions, *Journal of Colloid and Interface Science*, 338 (1), 184-92.
- Benichou, A., Aserin, A., & Garti, N., 2004, Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters, *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 29-41.
- Schuch, A., Deiters, P., Henne, J., Köhler, K., &

- Schuchmann, H. P., 2013, Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water, *Journal of colloid and interface science*, 402, 157-64.
26. Rezaee, M., Basri, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Salleh, A. B., Chaibakhsh, N., & Karjiban, R. A., 2014, Formulation development and optimization of palm kernel oil esters-based nanoemulsions containing sodium diclofenac. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 539.
27. Ngan, C. L., Basri, M., Lye, F. F., Masoumi, H. R. F., Tripathy, M., Karjiban, R. A., & Abdul-Malek, E., 2014, Comparison of process parameter optimization using different designs in nanoemulsion-based formulation for transdermal delivery of fullerene, *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4375.
28. Saddler, David, Shea, Julia, Ward, Derek., 2011, 12 B Stationary Points and Turning Points, *Cambridge 2 Unit Mathematics Year 11*, Cambridge University Press, 318.
29. Grumezescu A. M., 2016, Emulsions nanotechnology in the agri-food industry vol. 3, Academic Press Elsevier, London, 18-9.
30. Ribeiro, R. C. D. A., Barreto, S. M. A. G., Ostrosky, E. A., Rocha-Filho, P. A. D., Veríssimo, L. M., & Ferrari, M., 2015, Production and characterization of cosmetic nanoemulsions containing *Opuntia ficus-indica* (L.) mill extract as moisturizing agent, *Molecules*, 20 (2), 2492-509.
31. Iqbal, M., Zafar, N., Fessi, H., & Elaissari, A., 2015, Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation, *International journal of pharmaceutics*, 496 (2), 173-90.
32. Ferreira, L. A. M., Seiller, M., Grossiord, J. L., Marty, J. P., & Wepierre, J., 1995, Vehicle influence on in vitro release of glucose: w/o, w/o/w and o/w systems compared, *Journal of controlled release*, 33 (3), 349-56.



## **Efek Pemberian Eugenol Isolat Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap Histologi Pankreas Tikus Diabetes**

### **(Eugenol Effect of Clove Flower (*Syzygium aromaticum*) Isolate on Histology Pancreas of Diabetic Rat)**

SINTAWAHYU UTAMI, I MADE SUDARMA\*, CANDRA DWIPAYANA HAMDIN

Fakultas Kedokteran, Fakultas MIPA Universitas Mataram jalan Majapahit  
Kota Mataram, 83115, Indonesia

\*Penulis korespondensi, Hp : 085339370602  
e-mail: sud\_arma@yahoo.com

Diterima 23 Januari 2019, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Diabetes melitus merupakan penyakit yang prevalensinya tinggi di Indonesia, dari tahun ketahun prevalensinya terus meningkat. Sehingga sebagian peneliti mulai melakukan eksplorasi bahan alam dalam pencegahan maupun penanganan diabetes melitus. Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) mengandung senyawa eugenol yang secara ilmiah dapat menurunkan kadar gula darah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian eugenol isolat bunga cengkeh terhadap histologi pankreas tikus diabetes. Bunga cengkeh diekstraksi menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut n-heksan, kemudian eugenol disolasi menggunakan metode asam-basa kemudian diuji dengan KLT. Pengaruh pemberian eugenol dilihat dengan menginduksi aloksan dengan dosis 125 mg/kgBB secara intraperitoneal kemudian emulsi eugenol dosis 10 mg/ KgBB dibandingkan dengan glibenklamid 1,35 mg/KgBB secara oral selama 14 hari kemudian dilakukan histologi pankreas. Pengamatan hasil histologi pankreas dilakukan dengan membuat preparat pankreas menggunakan pengecatan Hematoxilin Eosin (HE). Hasil penelitian menunjukkan tikus yang diinduksi aloksan mengalami kerusakan sel pankreas. Namun, setelah diberikan perlakuan glibenklamid dan senyawa eugenol mampu memperbaiki sel pankreas yang mengalami kerusakan akibat pemberian aloksan

**Kata kunci:** Cengkeh, eugenol, antidiabetes, histolog pankreas.

**Abstract:** Diabetes mellitus is disease with a high prevalence rate and continuously increase in Indonesia. So some researchers began to glance at natural resource for prevention and treatment of diabetes mellitus. Clove Flower (*Syzygium aromaticum*) contains eugenol that can chemically lower blood sugar levels. The aimed of this research is to know the effect of eugenol on pancreas histology of diabetic rats. Clove flowers was extracted used maseration method use n-hexan and eugenol was isolated tested with TLC. Alloxan-induced rats were dosed 125 mg / kg BW IP and then the eugenol was administered in dosage 10 mg / kg BW compared with glibenclamid 1,35 mg /Kg BW orally for 14 days. Observation of pancreatic histology results were made pancreatic preparations using Hematoxilin Eosin (HE) staining. The results showed that alloxan-induced rats had pancreatic cell damage. How ever, after being treated with Glibenclamide and Eugenol showed the improvement of damage organs. Giving the eugenol at a dose of 15 mg / kg BW showed the most significant improvement.

**Keywords:** Clove flower, eugenol, antidiabetic, pancreatic histology.

## PENDAHULUAN

POLA hidup yang tidak sehat menyebabkan terjadinya peningkatan resiko penyakit metabolik, salah satunya yaitu diabetes melitus<sup>(1)</sup>. Diabetes melitus merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya kelainan metabolisme glukosa. Gangguan metabolisme glukosa secara kontinyu menyebabkan sistem biologis berupaya untuk memperbaiki ketidakseimbangan metabolisme tersebut sehingga akan terjadi kerusakan pada sistem endokrin<sup>(2,3)</sup>.

Prevalensi diabetes melitus semakin meningkat hal ini dibuktikan Pada tahun 2015 di Indonesia jumlah penderita diabetes sebesar 10,3 juta dan diperkirakan pada tahun 2045 akan meningkat sebesar 16,7 juta<sup>(4)</sup>. Saat ini sebagian besar peneliti mulai tertarik untuk melakukan eksplorasi bahan alam dengan ketersediaan melimpah serta memiliki kandungan bioaktif. Sehingga dapat dimanfaatkan dalam pencegahan maupun pengobatan diabetes dengan efek samping minimal<sup>(3)</sup>.

Salah satu tanaman yang jumlahnya melimpah di Indonesia adalah cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Bunga cengkeh banyak mengandung senyawa kimia seperti eugenol dan kariofilen dan telah diuji efek farmakologi eugenol sebagai hepatoprotektor<sup>(5)</sup>. Senyawa ini juga digunakan sebagai antifungal karena memiliki selektivitas yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*, *C. krusei* dan *C. glabrata*<sup>(6)</sup>. Pada dosis 80 mg/KgBB senyawa eugenol memiliki efek hipoglikemik dengan menghambat enzim  $\alpha$ -amylase dan mampu meregenerasi sel  $\beta$  pankreas<sup>(7)</sup>. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka peneliti ingin mengetahui efek pemberian eugenol isolat bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) pada dosis 10 mg/KgBB, terhadap histologi pankreas tikus diabetes.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah albumin mayer's, aquadest, alkohol bertingkat, bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*), diklorometana (DCM), eugenol standar, formalin 10%, HCL pekat, hewan uji tikus jantan galur wistar, kertas label, kertas saring biasa, kertas saring whatman, kloroform, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat, n-heksan, pakan standar, paraffin, pewarna eosin, pewarna hematoksilin, plat klt, tissue, xilol

**ALAT.** Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat tulis, batang pengaduk, beaker glass, botol vial, blok kayu, chamber, corong biasa, corong pisah, dissecting set, entellan, gelas kimia, gelas ukur erlenmeyer, jarum, lampu uv 245

nm, magnet stirrer, mikrotom, mortar, neraca analitik, papan operasi, pipet volume, pipet tetes, pipa kapiler, pinset, rotary evaporator, rubber bulb, spuit 5 cc, stamper, timbangan, pot sampel, water bath.

**METODE. Ekstraksi bunga cengkeh.** Bunga cengkeh kering yang sudah diblender (500 g) dimaserasi dengan n-heksan (3,5 L) selama 24 jam. Kemudian disaring dan filtrat ditampung dalam erlenmeyer sedangkan residunya diekstraksi kembali dengan n-heksan selama 24 jam. Filtrat yang dihasilkan digabungkan dengan filtrat sebelumnya kemudian dievaporasi. Ekstrak kental kemudian ditimbang dan diuji menggunakan KLT yang dibandingkan dengan standar. Fase diam yang digunakan silika gel dan fase gerak menggunakan DCM : n-heksan (3:1).

**Isolasi Eugenol.** Ekstrak kental dilarutkan dengan DCM. Campuran ekstrak- DCM ditambahkan dengan NaOH yang telah dilarutkan dengan aquadest. Campuran tersebut kemudian distirrer suhu kamar. Lapisan yang berada dibawah dan berwarna coklat dipisahkan dari fase air yang berupa garam eugenolat. Kemudian diasamkan dengan menambahkan HCl pekat dengan pH = 3. Lapisan bawah (A) dikeluarkan dari corong pisah dan ditampung dalam gelas kimia. Lapisan atas diekstrak dengan DCM, kemudian diambil lapisan bawahnya (B) disatukan dengan lapisan bawah (A). Campuran kemudian dicuci dengan air sampai pH air netral. Setelah campuran netral, maka lapisan bagian bawah (eugenol kotor) dan kemudian disaring dengan pelarut DCM: n-heksan (1:1) dan pelarut yang tersisa diuapkan. Kemudian dilakukan pengujian dengan KLT dan penentuan kadar menggunakan GC-MS<sup>(8,9)</sup>.

**Pengujian secara in vivo.** 36 ekor tikus wistar yang digunakan sebagai hewan uji yang telah melewati telaah etik dengan No: 87/UN18.8/ETIK/2018. Kemudian dibagi menjadi kelompok kontrol (+), kontrol (-) dan kontrol normal, dan tiga kelompok perlakuan dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor tikus. Selanjutnya dilakukan induksi aloksan secara intraperitoneal dengan dosis 125 mg/kgBB kepada masing-masing hewan uji kecuali kelompok kontrol normal. Kelompok kontrol positif diberikan glibenklamid secara oral dengan dosis 1,35 mg/kgBB, kelompok kontrol negatif diberikan CMC-Na, sedangkan kelompok perlakuan diberikan eugenol dosis 10 mg/Kg BB selama 14 hari. Setelah perlakuan selama 14 hari, semua hewan uji di otopsi dan dilakukan pengamatan terhadap sel.

**Histologi pankreas.** Hewan uji dibius menggunakan kloroform kemudian organ pankreas diisolasi dan dilakukan penimbangan organ. Organ yang sudah diisolasi kemudian difiksasi menggunakan

formalin dan dilakukan rehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 30%, 50%, 60%, 70%, 80%, dan 96%. Selanjutnya dilakukan pembedahan paraffin dan dilakukan pemotongan organ dengan mikrotom dengan ukuran 3-4 mikron. Pewarnaan dilakukan dengan hematoxilin dan eosin. Hasil histologi diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Ekstraksi sampel.** Hasil pengujian kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa nilai Rf antara ekstrak bunga cengkeh dengan Rf standar eugenol adalah sama yaitu 0,75. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam ekstrak bunga cengkeh terdapat kandungan senyawa eugenol.

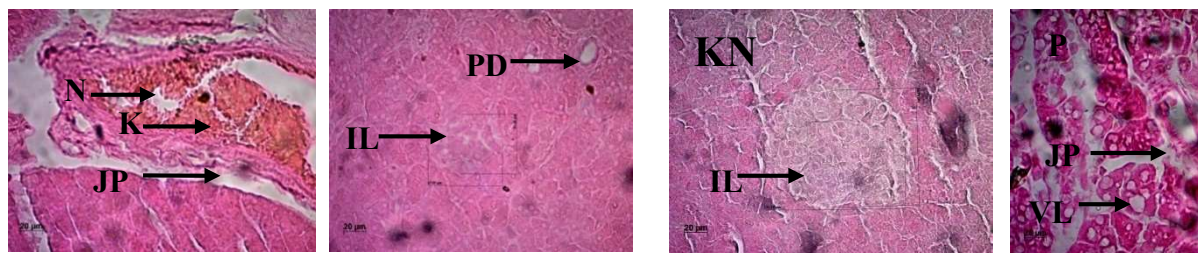
**Histologi pankreas.** Pada tabel 1 menunjukkan bahwa index organ pada masing-masing kelompok menunjukkan tidak terjadi perbedaan yang signifikan ( $P > 0,05$ ). Walaupun demikian data index organ tidak dapat digunakan sebagai patokan adanya kerusakan atau perbaikan pada sel<sup>(10)</sup>.

**Tabel 1. Index organ pankreas**

Kelompok	Index organ(%) Mean $\pm$ SD
Eugenol dosis 10 mg/kg BB	0,165 $\pm$ 0,037
Kontrol normal	0,194 $\pm$ 0,044
Kontrol negatif	0,201 $\pm$ 0,055
Kontrol positif	0,047 $\pm$ 0,243

Hasil pengamatan pada masing-masing kelompok berdasarkan gambar 1 menunjukkan bahwa tikus yang diberikan aloksan mengalami kerusakan pada sel pankreas meskipun terdapat variasi pada masing-masing individu tikus. Kerusakan sel pankreas ditandai dengan adanya nekrosis, kongesti, edema, vakuolisasi, dan dilatasi sel langerhan. Nekrosis merupakan kematian sel sebagai akibat dari kerusakan sel akut yang tidak terkontrol. Nekrosis dapat menyebabkan lisis pada sel yang dicirikan dengan adanya vakuola<sup>(10)</sup>. Sedangkan edema yaitu penambahan volume cairan yang ditandai dengan terbentuknya rongga kosong pada islet langerhan<sup>(11)</sup>.

Aloksan bekerja dengan menghasilkan spesies oksigen reaktif yaitu hydrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) dan radikal bebas hidroksi (OH) yang sangat reaktif dalam menyerang molekul biologis sehingga berdampak pada kerusakan sel pankreas<sup>(12)</sup>. Pemberian emulsi eugenol memperlihatkan kondisi sel pankreas yang mulai membaik. Namun, pada masing-masing kelompok menunjukkan perbaikan yang bervariasi. Pada pemberian dosis 10 mg/kg BB menunjukkan adanya vakuola lemak (VL) namun tidak terjadi kerusakan sel. Hasil histologi pada kontrol positif yang diberikan perlakuan suspensi glibenklamid menunjukkan adanya perbaikan, hal ini sesuai dengan teori bahwa mekanisme kerja glibenklamid adalah dengan membantu regenerasi sel  $\beta$  dan membantu meningkatkan pengeluaran insulin sehingga kadar gula darah dapat terkontrol<sup>(13)</sup>. Pada penelitian sebelumnya yang mengkaji efek senyawa eugenol memberikan



**Gambar 1 Histologi masing-masing kelompok. (K+) kontrol positif 40x; (K-) kontrol negatif; (KN) kontrol normal 40x; (P1) Perlakuan dosis 10 mg/kg BB.**

hipotesis bahwa senyawa eugenol bertindak sebagai penghambat enzim  $\alpha$  amylase dan  $\alpha$  glukosidase yang dapat menghambat penyerapan karbohidrat sehingga dapat dirubah menjadi glukosa<sup>(7)</sup>. Hasil histologi pankreas pada penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa eugenol mampu memperbaiki kerusakan sel pankreas, sehingga mampu membantu dalam mensekresikan insulin. Oleh karena itu, kadar gula darah puasa dan HbA1c dapat menurun dengan pemberian emulsi eugenol<sup>(3)</sup>.

## SIMPULAN

Pemberian senyawa eugenol mampu memperbaiki kerusakan sel pankreas pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan. Pemberian senyawa eugenol pada dosis 10 mg/kg BB tikus menunjukkan adanya perbaikan sel pankreas.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Prof. Ir. I Made Sudarma, M.Sc., Ph. D membiayai penelitian ini melalui skill penelitian berbasis kompetensi Ristek Dikti Th. 2018 dan kepada Candra Dwipayana Hamdin, S. Farm., M.Sc., Apt selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu untuk membimbing serta mengarahkan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuni, R., Arsunan, A.A., Zulkifli Abdullah A. 2013. Factor Related to Anxiety Levels In Patients With Diabete Mellitus Type 2 Bhayangkara Andi Mappang Audang Hospital. Makassar : Universitas Hasanuddin.
2. Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., and Posey, L. M., 2015. Pharmacotherapy : Patophysiologic Approach. 9th Edition, New York: MC Graw Hill, hal. 212-210.
3. Srinivasan, S., Sathis, G., Jayanthi, M., Muthukumar, J., Muruganthan, U., Ramachandran, V., 2013. Ameliorating effect of eugenol on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Cell Biochem., Vol. 385 No. 2, pp. 159-168. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24078031>, pada tanggal 21 Januari 2019.
4. Cho, N. Han., Whiting, D., Forouhi, N., Guariguata, L., Hambleton, I., Li, R., Majeed, A., Mbanya, J. C., Montoya, P. A., Motala, A., Narayan, K. M. V., Ramachandran, A., Rathmann, W., Roglic, G., Shaw, J., Silink, M., and Zhang, P. Internasional Diabetes Federation Diabetes Atlas. 7Th Edition. Diakses dari [www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition.html](http://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/134-idf-diabetes-atlas-8th-edition.html), pada tanggal 27 Desember 2017.
5. Sidabutar, D. M., Kairupan, C. F., dan Meilany, D., 2016. Pengaruh pemberian ekstrak daun cengkeh (*Syzygium aromaticum*) terhadap gambaran histopatologik hati tikus wistar yang diberikan parasetamol dosis toksik. Jurnal e-Biomedik (eBm), Vol. 4 No. 1, pp. 1-4. Diakses dari <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/ebiomedik/article/view/12224>, 21 Januari 2019.
6. Abrao, P.H.O., Pizi, R.B., Souza, T.B.d., Silva, N.C., and Fregnan, A.M. Synthesis And Biological Evaluation Of New Eugenol Mannich Bases As Promising Antifungal Agent. Diakses dari <http://Onlinelibrary.wiley.com/10.1111/cbdd.12345/full>, Pada tanggal 16 Januari 2018.
7. Mnafgui, K., Kaanich, F., Derbali, A., Hamden, K., Derbali, F., Slama, S., Allouche, N., and Elfeki, A., 2013. Inhibition of key enzymes related to diabetes and hypertension by Eugenol Invitro and in Alloxan-induced diabetic rats. Arch Physiol Biochem., Vol. 119 No. 5, pp. 1-9 Diakses dari <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13813455.2013.822521>, pada tanggal 22 Desember 2018.
8. Sudarma, M., Ulfa, M., Sarkono, 2009. Sintesis 4-Allil-2-metoksi-6-aminofenol dari Senyawa Bahan Alam Eugenol. Indo. J. Chem., Vol. 9 No. 1, pp. 84-88. Diakses dari <https://journal.ugm.ac.id/ijc/article/viewFile/21566/14271>, pada tanggal 21 Januari 2019.
9. Risayanti, Made Dwi, 2017, Penambahan Basa Organik ( Heksamina) dan Basa Anorganik (Natrium Bikarbonat) Pada Reaksi Sulfonasi Eugenol Hasil Isolasi Minyak Cengkeh, Skripsi, Mataram : Universitas Mataram.
10. Azhari, B., Luliana, sri., Robiyanto, 2017. Uji Aktivitas Antihiperkolesterolemia Ekstrak AirBuah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.) Pada Permodelan Tikus Jantan Galur Wistar Hiperkolesterolemia. Traditional Medicine Journal. Vol. 4, No 1, pp : 57-62, Diakses dari pada tanggal 20 Januari 2019.
11. Akrom, Harjani, P.D., dan Armansyah. Efek Hipoglikemik Ekstrak Etanol Umbi Ketela Rambat (*Ipomoea Batatas* P) (Euokr) Pada Mencit Swiss Yang Diinduksi Aloksan. Pharmacia, Vol.4, No.1, p : 65-76. Diakses dari <http://eprints.uad.ac.id/8612/>, pada Departemen kesehatan Republik Indonesia. 2008. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 261/MENKES/SK/IV/2009 tentang Farmakope Herbal Indonesia Edisi Pertama. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
12. Muliastari, H., Hamdin, C.D., Ihsan, M., 2017. Histologi Pankreas Tikus Diabetes Setelah Pemberian Suspensi Biji Buah Makasar (*Brucea Javanica* (L.) Merr). BioWallacea Jurnal Ilmiah Ilmu Biologi., Vol.3 No. 2, pp 88-93. Diakses dari <http://eprints.unram.ac.id/10077/>, pada tanggal 22 Desember 2018.
13. Lanzen, S., 2008. The Mechanism of alloxan and Streptozotocin Induced Diabetes. Diabetologia, Vol. 52. No. 2, pp. 226-216.
14. Krentz, A.J., and Bailey, C. J., 2005. Oral Antidiabetic Agents Current Role in Type 2 Diabetes Mellitus. UK : Aston University, Hal. 398-390.

## **Karakterisasi Nanopartikel dan Uji Antiagregasi Platelet secara *In-Vitro* terhadap Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum polycystum*) Hasil Hidrolisis Enzim Sellulase**

### **(In-Vitro Characterization of Nanoparticles and Antiaggregation Tests on Brown Seaweed Extracts (*Sargassum polycystum*) Types of Sellulase Enzyme Hydrolysis)**

KARTININGSIH\*, SYAMSUDIN ABDILLAH, PARTOMUAN SIMANJUNTAK, CYNTHIA, HARYO

Laboratorium Teknologi Farmasi Sediaan Semi Solid dan Cair Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Lenteng Agung, Jakarta Selatan.

\*Penulis korespondensi, Hp : 08128026680

e-mail: kartiningsih.kania2@gmail.com

Diterima 1 April 2019, Disetujui 13 September 2019

**Abstrak:** Rumput laut coklat mengandung fukoidan, yakni suatu polisakarida sulfat dengan bobot molekul besar (sekitar 100.000 Da) yang memiliki aktivitas antiagregasi platelet. Aktivitas ini tercapai apabila fukoidan memiliki bobot molekul kecil (3900-7600 Da) sehingga dilakukan pengecilan bobot molekul dengan cara hidrolisis enzim sellulase lalu dibuat bentuk nanopartikel untuk meningkatkan aktivitas. Tujuan penelitian ini untuk memperoleh nanopartikel ekstrak yang memenuhi persyaratan mutu fisik dan memiliki aktivitas antiagregasi platelet yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun sesudah dihidrolisis. Ekstraksi menggunakan metode maserasi kinetik 80% dilanjutkan dengan larutan Kalsium Klorida 2%. Hasil dikeringkan lalu dihidrolisis dengan enzim sellulase dan dibuat nanopartikel dengan metode gelasi ionik. Hasil karakterisasi nanopartikel berupa ukuran partikel sebesar 552,8, indeks polidispersitas sebesar 0,569, zeta potensial sebesar +53,5 mV, dan berbentuk sferis. Hasil pengujian aktivitas antiagregasi platelet secara in-vitro dengan konsentrasi 500 µg/mL menunjukkan persentase penghambatan agregasi platelet ekstrak rumput laut coklat sebesar 22,19% dan ekstrak setelah hidrolisis sebesar 57,94% dan nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis sebesar 72,93%. Nanopartikel ekstrak memenuhi persyaratan mutu fisik dan nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis memiliki aktivitas antiagregasi platelet paling tinggi dibandingkan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun setelah dihidrolisis.

**Kata kunci:** rumput laut coklat, fukoidan, hidrolisis enzim, nanopartikel, antiagregasi platelet.

**Abstract:** Brown seaweed contains fucoidan, a large molecular weight sulfate polysaccharide (about 100,000 Da) which has platelet antiaggregation activity. This activity is achieved if the fucoidan has a small molecular weight (3900-7600 Da) so this activity can increase by hydrolyzed with cellulase Enzym. The purpose of this study was to obtain extract nanoparticles that meet physical quality requirements and have a higher platelet antiaggregation activity than brown seaweed extract both before and after hydrolysis. Extraction was using kinetic maseration method using 80% ethanol after that using 2% calcium chloride solution. The results were dried and hydrolyzed with cellulase enzyme and nanoparticles were made by ionic gelation method. Nanoparticle characterization results in particle size of 552.8, polydispersity index of 0.569, potential zeta of +53.5 mV, and spherical shape. In-vitro testing results for platelet antiaggregation activity showed the percentage of platelet aggregation inhibition of brown seaweed extract with a concentration 500 µg/mL is 22.19% and extracts after hydrolysis was 57.94% and nanoparticles extract after hydrolysis was 72.93%. Extract nanoparticles meet physical quality requirements and extracted nanoparticles after hydrolysis have the highest platelet antiaggregation activity compared to brown seaweed extract both before and after hydrolysis.

**Keywords:** brown seaweed, fucoidan, enzyme hydrolysis, nanoparticles, platelet antiaggregation.

## PENDAHULUAN

INDONESIA merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah, salah satunya adalah tanaman sumber bahan obat alami<sup>(1)</sup>. Rumput laut merupakan salah satu sumber daya alam yang melimpah di perairan Indonesia<sup>(2)</sup>. Di Indonesia terdapat banyak jenis rumput laut, salah satunya adalah alga coklat (*Sargassum polycystum*)<sup>(3)</sup>. Akhir-akhir ini rumput laut mendapat perhatian penting dalam potensinya sebagai antibakteri, antioksidan dan antiagregasi platelet<sup>(4)</sup>. Fukoidan merupakan sekelompok senyawa polisakarida hetero yang ada pada dinding selaput rumput coklat dan beberapa invertebrata laut<sup>(5)</sup>. Fukoidan hanya dapat ditemukan pada alga coklat<sup>(6)</sup>. Struktur fukoidan biasanya mengandung L-fucose dan sulfat. Sebagian besar metode ekstraksi cenderung mengekstrak fukoidan sebagai multikomponen fukoidan bentuk kasar (*crude fukoidan*)<sup>(7)</sup>.

Aktivitas antiagregasi platelet dapat tercapai apabila fukoidan memiliki bobot molekul kecil, oleh sebab itu dilakukan dalam tahap untuk menurunkan bobot molekul fukoidan dengan cara hidrolisis secara enzimatis<sup>(8)</sup>. Dikarenakan senyawa fukoidan merupakan senyawa polimer dimana tersusun dari berbagai macam polisakarida, maka digunakan enzim sellulase sebagai enzim yang menghidrolisis fukoidan. Berdasarkan hasil penelitian (2018)<sup>(9)</sup>, dilakukan optimasi konsentrasi substrat, optimasi volume enzim, dan optimasi waktu hidrolisis menggunakan metode KLT dan diperoleh hasil konsentrasi substrat terbaik sebesar 2%, volume enzim terbaik sebesar 25 µL, dan waktu hidrolisis terbaik selama 12 jam

Sistem penghantaran obat dengan lokasi tertarget merupakan masalah utama dalam pengobatan banyak penyakit dan merupakan tantangan dalam penelitian di bidang kesehatan<sup>(10)</sup>. Suatu eksperimen dilakukan untuk mengetahui apakah fukoidan molekul kecil dapat meningkatkan bioavailabilitas dan efektivitas, namun diperoleh perbedaan yang tidak signifikan antara fukoidan bobot molekul besar dan fukoidan bobot molekul kecil<sup>(11)</sup>. Berdasarkan hal tersebut, dikembangkan teknologi nanopartikel dalam sistem penghantaran obat. Metode ini dapat membantu meningkatkan bioavailabilitas<sup>(12)</sup>. Dalam penelitian ini, dilakukan pembentukan nanopartikel fukoidan dengan metode gelasi ionik.

Agregasi platelet merupakan salah satu faktor yang mengakibatkan penyumbatan pada pembuluh darah arteri sehingga dapat menyebabkan gangguan *infark miokard* atau *stroke*<sup>(13)</sup>. Obat antiagregasi platelet digunakan pada pengobatan dan pencegahan

serangan *stroke* akibat terjadinya proses trombosis. Aspirin, klopidothromboprotein, dan dipiridamol merupakan contoh antiagregasi platelet, namun obat tersebut dapat menimbulkan efek samping terutama apabila digunakan dalam jangka panjang. Maka diperlukan adanya pengembangan bahan alam yang penggunaannya relatif lebih aman<sup>(14)</sup>. Sampai saat ini, belum ada penelitian mengenai aktivitas antiagregasi platelet pada *Sargassum polycystum* yang berasal dari Garut.

Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk membuat ekstrak *Sargassum polycystum* yang telah dihidrolisis oleh enzim sellulase dan dibentuk nanopartikel lalu diuji aktivitasnya sebagai antiagregasi platelet secara *in-vitro*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Rumput laut coklat (*Sargassum polycystum*) Garut, Jawa Barat, etanol 80%, kalsium klorida, air murni, asam asetat glasial, kitosan, natrium tripolifosfat, baku standar fukoidan, kalium bromida, KitADP (Adenosine Diphosphate), PRP (Platelet Rich Plasma), PPP (Platelet Poor Plasma), Enzim Sellulase, Dapar pH 5,5, Natrium Klorida 0,9%.

**Alat.** Timbangan analitik, pH meter, blender, alat-alat gelas, termometer, pengayak 4/18, masetor kinetik, magnetic stirrer-heater, botol vial, kertas saring, kertas whatman no. 1, lemari es, rotavapor vakum, *water bath*, mikroskop elektron transmisi, *particle size analyzer*, *zeta analyzer*, *freeze dryer*, kuvet spektrofotometer, mikropipet, vortex, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800).

**METODE. Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat yang Mengandung Fukoidan.** Rumput laut coklat diblender lalu dimaserasi kinetik dengan etanol 80% (*pretreatment*) selama 2x12 jam pada suhu ruang AC (20 °C), dibiarkan semalaman. Ekstrak etanol disaring, dibilas dengan etanol lalu diambil residunya. Residu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. 300 g residu dimaserasi kinetik dengan 3 L CaCl<sub>2</sub> 2% (w/v) pada suhu 70 °C selama 6 jam, lalu disaring. Filtrat diambil dan dipekatkan dengan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental, lalu dikeringkan dengan metode *freeze dry* sehingga diperoleh ekstrak kering rumput laut coklat.

**Pembuatan Ekstrak Rumput Laut Coklat yang Telah Dihidrolisis Enzim Sellulase.** Sebanyak 2 g ekstrak kering rumput laut coklat dilarutkan dalam larutan pH 5.5 asetat 0.02M hingga 100 mL. Kemudian ditambahkan 25 µL enzim (konsentrasi 110 Ui) dan dikocok hingga terdispersi merata. Dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Hasil yang



diperoleh disentrifugasi, diambil supernatant.

**Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat.** Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat dibuat dengan konsentrasi kitosan: ekstrak sebesar 20:20 mL.

**Karakterisasi Fukoidan secara Kualitatif dengan Metode FTIR.** Sebanyak 1 mg digerus dengan 200 mg kalium bromide sampai homogen. Selanjutnya serbuk sampel dibuat tablet tipis dan transparan pada tekanan 7000 Pa, lalu dimasukkan ke dalam *simple pan* untuk dibuat rekaman spektrum infra merah pada bilangan gelombang 4000-500  $\text{cm}^{-1}$ . Digunakan untuk menentukan gugus fungsional dalam ekstrak rumput laut coklat dan dibandingkan dengan spektrum dari baku pembanding fukoidan berdasarkan sidik jarinya.

**Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat Hasil Hidrolisis Enzim Sellulase.** Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat yang telah dihidrolisis dengan enzim sellulase dikarakterisasi ukuran partikel, zeta potensial dan bentuk morfologinya dengan metode TEM.

**Uji Aktivitas Antiagregasi Platelet secara In-Vitro.** Pengujian dilakukan berdasarkan metode LTA yang sudah dimodifikasi. Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis dan diukur pada panjang gelombang 600 nm. Sampel yang diuji adalah ekstrak rumput laut coklat sebelum hidrolisis enzim, ekstrak sesudah hidrolisis enzim, dan nanopartikel ekstrak sesudah hidrolisis enzim.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Hasil Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumput Laut Coklat Hasil Hidrolisis Enzim.** Ukuran Partikel. Berdasarkan hasil pengukuran ukuran partikel, diperoleh ukuran nanopartikel sebesar 552,8 nm. Hasil pemeriksaan ukuran partikel telah memenuhi syarat, dimana suatu partikel dikatakan berukuran nano apabila berada dalam rentang 10-1000 nm.

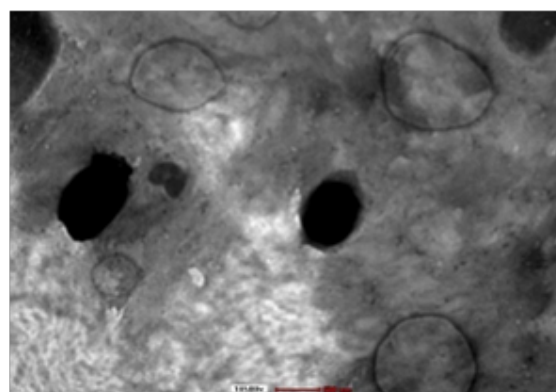
Dari hasil pengukuran zeta potensial menggunakan alat *Zeta Analyzer*, diperoleh nilai zeta potensial sebesar +53.5 mV. Hasil ini memenuhi syarat dimana partikel dalam nanosuspensi dikatakan terdistribusi dengan baik dan terhindar dari kecenderungan untuk beragregasi jika memiliki nilai diatas (+/-) 30 mV.

Berdasarkan hasil pemeriksaan morfologi nanopartikel dengan metode *Transmission Electron Microscopy* (TEM) pada perbesaran 18500x dengan ukuran partikel sebesar 500 nm. Dari hasil pengujian TEM didapatkan hasil morfologi berbentuk sferis atau bulat, namun terdapat pula partikel yang berbentuk amorf. Bentuk sferis yang dihasilkan menunjukkan

terjadi reaksi antara kitosan dengan ekstrak dimana kitosan yang digunakan akan menghasilkan morfologi partikel berupa lembaran membran. Namun bentuk amorf yang diperoleh dapat disebabkan karena pengadukan (*stirring*) yang kurang optimal sehingga nanopartikel belum homogen sempurna. Hasil karakterisasi nanopartikel ekstrak rumput laut coklat diperlihatkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

**Tabel 1. Hasil pemeriksaan ukuran partikel dan zeta potensial dari nanopartikel ekstrak.**

Karakterisasi nanopartikel	Hasil
Ukuran partikel	552,8 nm
Zeta potensial	+53.5 mv
Morfologi partikel	Sferis



**Gambar 1. Hasil pemeriksaan morfologi nanopartikel dengan TEM.**

**Hasil Pengujian Karakterisasi Fukoidan secara Kualitatif dengan Metode FTIR.** Berdasarkan hasil pengujian analisis gugus fungsi dengan FTIR, dapat disimpulkan bahwa ekstrak rumput laut coklat, ekstrak setelah hidrolisis dengan enzim selulase, serta nanopartikel ekstrak setelah hidrolisis diduga mengandung komponen dari senyawa fukoidan dengan adanya gugus sulfat. Kemudian, dapat disimpulkan pula bahwa hidrolisis ekstrak rumput laut coklat dengan enzim selulase serta pembuatan nanopartikel ekstrak tidak mempengaruhi struktur kimia ekstrak rumput laut coklat. (Tabel 2)

**Hasil Uji Aktivitas Antiagregasi Platelet.** Berdasarkan pengukuran persentase penghambatan agregasi platelet, diperoleh hasil bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak baik ekstrak kering, ekstrak setelah hidrolisis enzim, maupun nanopartikel ekstrak, maka semakin tinggi aktivitas penghambatan agregasi platelet.

Selain itu, ekstrak yang telah dihidrolisis enzim dalam bentuk nanopartikel memiliki rata-rata persentase penghambatan agregasi platelet yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut

coklat baik sebelum maupun sesudah dihidrolisis. Hal ini dapat disebabkan karena dalam bentuk nanopartikel, partikel obat memiliki ukuran partikel yang lebih kecil dengan luas permukaan yang besar sehingga lebih mudah berdifusi ke dalam membran pembuluh darah dan memiliki aktivitas penghambatan agregasi platelet yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut coklat baik sebelum maupun setelah dihidrolisis enzim.

Hasil penghambatan agregasi platelet diperoleh dengan membandingkan serapan sampel dengan serapan dari kontrol negatif. Pada penelitian, digunakan kontrol positif berupa klopidothrombin. Klopidothrombin digunakan sebagai kontrol positif dikarenakan klopidothrombin merupakan golongan obat antiplatelet yang memiliki kemampuan untuk

menghambat agregasi platelet yaitu sebagai antagonis reseptor ADP. Dari hasil penelitian, diperoleh penghambatan agregasi platelet pada kontrol positif sebesar 83,08%.

Hasil uji statistik menunjukkan ada perbedaan bermakna terhadap persentase penghambatan agregasi platelet dari ekstrak kering rumput laut coklat, ekstrak yang telah dihidrolisis enzim dan nanopartikel ekstrak. Setelah uji statistik dilanjutkan dengan *post hoc tests* diperoleh hasil ada perbedaan bermakna terhadap persentase penghambatan agregasi platelet dari ekstrak kering rumput laut coklat dengan ekstrak hasil hidrolisis, ekstrak kering rumput laut coklat dengan nanopartikel ekstrak dan ekstrak hasil hidrolisis dengan nanopartikel ekstrak. Hasil uji aktivitas antiagregasi platelet diperlihatkan pada Tabel 3.

**Tabel 2. Hasil pengujian karakterisasi fukoidan secara kualitatif dengan metode FTIR.**

BP fukoidan	Bilangan gelombang spesifik (cm <sup>-1</sup> )			Bilangan gelombang acuan (cm <sup>-1</sup> )	Indikasi gugus/struktur
	Ekstrak	Ekstrak hidrolisis	Nanopartikel ekstrak		
3410,85	3369,61	3397,28	3334,56	3400-an	Hidroksil/ O-H
1633,79	1626,55	1633,82	1620,91	1820-1600	Gugus karbonil/ C=O
1225,57	1236,58	1227,09	1255,07	1260-1240	Ester sulfat/ ikatan S=O
1015,54	1088,61	1116,25	-	1080-1010	Ikatan glikosidik
827,54	-	-	-	810-840	Ikatan C-O-S

**Tabel 3. Hasil uji antiagregasi platelet secara *in-vitro*.**

Ekstrak / Konsentrasi	125 µg/mL	250 µg/mL	500 µg/mL
Ekstrak	13,76%	18,45%	22,19%
E. Hidrolisis	44,83%	53,70 %	57,94%
E. Nano	64,86%	70,66%	72,93%

## SIMPULAN

Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat yang dibuat dengan metode gelas ionik memenuhi persyaratan mutu fisik nanopartikel yaitu rata-rata pengukuran ukuran partikel ekstrak rumput laut coklat adalah 552,8 nm dengan indeks polidispersi 0,569, nilai hasil pengukuran zeta potensial 53,5 mV, dan morfologi partikel berbentuk sferis.

Nanopartikel ekstrak rumput laut coklat hasil hidrolisis enzim selulase memiliki aktivitas penghambatan agregasi platelet sebesar 72,93% yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan ekstrak rumput laut coklat baik yang telah dihidrolisis enzim selulase sebesar 57,94% maupun yang tidak dihidrolisis enzim selulase sebesar 22,19% pada konsentrasi 500 µg/mL dan lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol positif (klopidothrombin) sebesar 83,08%.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Septiana AT, Asnani A. Kajian sifat fisikokimia ekstrak rumput laut coklat *Sargassum duplicatum* menggunakan berbagai pelarut dan metode ekstraksi. Agrotek. 2016 Nov 9;6(1):22-8.
2. Sahri A. Mengenal potensi rumput laut: kajian pemanfaatan sumber daya rumput laut dari aspek industri dan kesehatan. Majalah Ilmiah Sultan Agung. 2018 Jun 2;44(118):95-116.
3. Pakidi CS, Suwoyo HS. Potensi Dan Pmanfaatan Bahan Aktif Alga Cokelat *Sargassum sp.* Octopus: Jurnal Ilmu Perikanan. 2017 Jun 30;6(1):551562.
4. Dewanto SM, Iskandar Y, Barliana MI. Potensi Rumput Laut Coklat Jenis *Sargassum duplicatum* yang berasal dari Perairan Menganti-Kebumen sebagai Antiagregasi Platelet. Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran. 2011
5. Sinurat E, Marraskuranto E. Fucooidan from brown seaweed and its bioactivity. Squalen Bulletin of Marine



- and Fisheries Postharvest and Biotechnology. 2013 May 8;7(3):131-8.
6. Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, Rajasekar P, Prabhu NM. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: Structural characterization, in vitro antioxidant and anticancer activity. International journal of biological macromolecules. 2017 Sep 1;102:405-12.
  7. Thuy TT, Van TT, Hidekazu Y, Hiroshi U. Fucoidan from Vietnam *Sargassum swartzii*: Isolation, Characterization and Complexation with Bovine Serum Albumin. Asian Journal of Chemistry. 2012 Aug 1;24(8).
  8. Chollet L, Saboural P, Chauvierre C, Villemin JN, Letourneur D, Chaubet F. Fucoidans in nanomedicine. Marine drugs. 2016 Jul 29;14(8):145.
  9. Santoso, H. Preparasi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Rumpun Laut Coklat (*Sargassum polycystum*) Yang di Hidrolisis dengan Enzim Sellulase. 2018
  10. Rawat M, Singh D, Saraf S, Saraf S. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 2006;29(9):1790-8.
  11. Fitton JH. Therapies from fucoidan; multifunctional marine polymers. Marine drugs. 2011 Sep 30;9(10):1731-60.
  12. Martien R, Adhyatmika A, Irianto ID, Farida V, Sari DP. Perkembangan teknologi nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Majalah Farmaseutik. 2012;8(1):133-44.
  13. Cosemans JM, Angelillo-Scherrer A, Mattheij NJ, Heemskerk JW. The effects of arterial flow on platelet activation, thrombus growth, and stabilization. Cardiovascular research. 2013 May 10;99(2):342-52.
  14. Said KA. Penggunaan antiplatelet (aspirin) pada akut stroke iskemik. Co-ass Clinical at neurology departement dr. Zainoel Abidin Teaching Hospital, Faculty of Medicine University of Syiah Kuala. 2011;201.

## **Efek Ekstrak Petroleum Eter Daun Ara (*Ficus racemosa* Linn.) pada Indeks Fagositosis Mencit (*Mus musculus*)**

### **(Effect of Petroleum Ether Ara's Leaf Extract (*Ficus racemosa* Linn.) on Phagocytic Index of Mice (*Mus musculus*))**

ANDRILIANA TRIHASTUTY, SITI RAHMATUL AINI, CANDRA DWIPAYANA HAMDIN\*

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram, Jl. Majapahit No. 62, Mataram, NTB

\*Penulis korespondensi, Hp : 087738322422  
e-mail: candradwipayana@unram.ac.id

Diterima 23 Januari 2019, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Senyawa terpenoid daun ara diketahui memiliki aktivitas immunosupresan dengan menghambat proliferasi sel darah. Immunosupresan merupakan golongan obat yang dapat menekan respon imun berlebihan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas immunosupresan ekstrak petroleum eter daun ara (*Ficus racemosa*. Linn) terhadap mencit (*Mus musculus*). Uji immunosupresan dilakukan dengan metode bersihan karbon untuk mengetahui kemampuan fagositosis dengan karbon sebagai antigen yang diinjeksikan intravena, dilanjutkan dengan menghitung indeks organ. Seluruh data yang diperoleh kemudian dianalisis statistik menggunakan SPSS. Hasil uji bersihan karbon menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter daun ara dosis 560 mg/kgBB bersifat immunostimulan sedang dosis 1120 mg/kgBB bersifat immunostimulan lemah dengan nilai indeks fagositosis berturut-turut 1,5 dan 1,1; sedangkan dosis 1680 mg/kgBB bersifat immunosupresan dengan indeks fagositosis 0,7. Hasil uji indeks organ limfoid menunjukkan perbedaan signifikan antara ekstrak petroleum eter dosis 1680 mg/kgBB dengan kontrol negatif ( $p < 0,05$ ). Berdasarkan hasil uji respon imun non spesifik disimpulkan bahwa ekstrak petroleum eter daun ara dosis 1680 mg/kgBB mempunyai aktivitas immunosupresan.

**Kata kunci:** Immunosupresan, *Ficus racemosa* Linn., fagositosis, bersihan karbon.

**Abstract:** Terpenoid compound from ara's leaf is known to have immunosuppressant activity by inhibit blood cells proliferation. Immunosuppressant is a group of drugs that can suppress excessive immune responses. The aim of this research was investigated the immunosuppressant effect of petroleum ether from ara's leaf (*Ficus racemosa* Linn.) on mice (*Mus musculus*). The immunosuppressant activity was conducted by carbon clearance method to investigate the ability of phagocytosis with carbon as an antigen that is injected intravenously, followed by determining organ index. All data was analyzed by SPSS. The result showed that at dose of 560 mg/kgbw and 1120 mg/kgbw, extract found to have immunostimulant activity with phagocytic index values respectively of 1.5 and 1.1, while the dose of 1680 mg/kgbw was immunosuppressant with phagocytic index 0.7. The lymphoid organ index showed a significantly difference between petroleum ether from ara leaf extract by dose 1680 mg/kgbw with negative control ( $p < 0.05$ ). Based on the results of the non-specific immune response, it can be concluded that the petroleum ether ara's leaf extract by dose 1680 mg/kgbw has immunosuppressant activity.

**Keywords:** Immunosuppressant, *Ficus racemosa* Linn., phagocytosis, carbon clearance.

## PENDAHULUAN

RESPON dari sistem imun yang berlebihan dapat menyebabkan timbulnya penyakit autoimun salah satunya yaitu lupus. Prevalensi lupus berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) *online*, pada tahun 2016 terdapat 858 rumah sakit melaporkan kejadian lupus sejumlah 2166 pasien rawat inap, diantaranya 550 pasien meninggal dunia. Jumlah ini meningkat dari dua tahun sebelumnya<sup>(1)</sup>.

Penyakit autoimun dapat diobati dengan golongan obat yang berfungsi menekan respon imun yaitu immunosupresan<sup>(2)</sup>. Selain menggunakan obat konvensional, kecenderungan gaya hidup masyarakat untuk kembali ke alam (*back to nature*) menyebabkan penggunaan obat bahan alam juga terus meningkat. Potensi yang belum dieksplorasi dapat mendorong perkembangan penelitian terhadap tumbuhan berkhasiat obat, yaitu salah satunya tumbuhan *Ficus racemosa* Linn. Kelimpahan tumbuhan tersebut dapat dijadikan sebagai objek penelitian tumbuhan berkhasiat obat<sup>(3)</sup>.

Salah satu penelitian yang telah dilakukan oleh Gupta dkk (2016) menunjukkan bahwa senyawa terpenoid pada ekstrak daun *Ficus racemosa* Linn., yang diinduksi dengan HbsAg mampu menghambat persentase monosit dan granulosit pada dosis tinggi, sehingga memiliki aktivitas immunosupresan secara *in vitro* pada sampel darah manusia dengan dosis 6,25-25 mg/mL, 50 µL.

Penelitian secara *in vivo* immunosupresan ekstrak daun ara masih jarang dilakukan. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian tentang uji aktivitas immunosupresan petroleum eter daun ara (*Ficus racemosa* Linn.) terhadap mencit putih jantan dengan metode bersihan karbon pada indeks fagositosis dan (%) indeks organ.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun ara, petroleum eter teknis, petroleum eter p.a, aluminium foil, kertas saring, kloroform p.a, asam sulfat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a), natrium karboksil metil selulosa (CMC-Na) 0,5%, aquades, karbon (tinta cina), natrium klorida (NaCl) 0,9%, tablet prednison, asam asetat 1%, dan mencit jantan putih jenis *Balb/c*.

**Alat.** Gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, erlenmeyer, timbangan analitik KERN : ABJ 220-4, toples kaca bening, blender, batang pengaduk, pipet tetes, *rotary evaporator* R-215, cawan porselen, *hot plate* MSH-300, oven, mortar dan stamper, mikropipet berbagai ukuran, spuit injeksi 1 mL, sonde oral mencit, dan spektrofotometri UV-visibel.

**METODE. Pengambilan Sampel Daun Ara.** Sampel daun ara (*Ficus racemosa* Linn.) diperoleh di Dusun Rarung, Desa Pemepek, Kabupaten Lombok Tengah.

**Determinasi Tumbuhan.** Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram.

**Preparasi Sampel.** Sampel yang digunakan adalah daun ara, kemudian sampel dikumpulkan, dicuci, ditimbang, lalu dikeringanginkan. Sampel kering yang didapat kemudian diblender dan diayak, diperoleh serbuk halus daun ara. Sampel yang sudah dihaluskan kemudian dibawa ke Laboratorium Program Studi Farmasi Universitas Mataram.

**Ekstraksi.** Serbuk daun ara dimaserasi dengan pelarut petroleum eter selama 1 hari. Kemudian diremaserasi kembali sebanyak 2 x 24 jam. Filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi pada suhu 50 °C dilanjutkan dengan pengupuan menggunakan *waterbath* sampai dihasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dihitung (%) rendemen yang didapat. Rumus % rendemen ekstrak daun ara sebagai berikut:

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (g)}}{\text{Berat sampel awal (g)}} \times 100\%$$

**Skrining Fitokimia.** Identifikasi senyawa terpenoid: Sebanyak 5 mL ekstrak dicampur dengan 2 mL kloroform dan 3 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Hasil positif menunjukkan warna coklat kemerahan. Identifikasi senyawa steroid: Sebanyak 1 mL ekstrak dilarutkan dalam 10 mL kloroform dan beberapa tetes asam sulfat pekat (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ditambahkan dari sisi tabung reaksi. Hasil positif menunjukkan lapisan atas berubah menjadi merah dan lapisan asam sulfat terbentuk kuning dengan fluoresensi hijau<sup>(4)</sup>.

**Penyiapan Hewan Uji.** Hewan uji yang digunakan dalam penelitian adalah mencit putih jantan berusia 2-3 bulan dalam kondisi sehat, berat badan 20-35 gram, dan jenis mencit *Balb/c*. Terdapat lima kelompok (kelompok kontrol positif, kontrol negatif, perlakuan 1, perlakuan 2, dan perlakuan 3) dengan masing-masing kelompok terdiri dari lima ekor mencit.

**Penyiapan Sediaan Uji.** Penetapan kadar karbon: karbon (tinta cina) sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam cawan penguap dan diuapkan dalam oven pada suhu 105 °C selama 1 jam. Penyiapan larutan karbon: karbon (tinta cina) yang telah dikeringkan sebanyak 1,6 gram; kemudian dilarutkan dengan 25 mL NaCl fisiologis 0,9%; sehingga didapat

konsentrasi larutan 64 mg/mL (6,4%). Penyiapan kurva baku: tinta cina yang telah dikeringkan lalu ditimbang sebanyak 100 mg, didispersikan dalam 100 mL asam asetat sehingga konsentrasi 1 mg/mL. Masing-masing larutan dipipet sebanyak 2, 3, 4, 5, dan 6 mL, kemudian dicukupkan dengan asam asetat 1% hingga volume 50 mL, sehingga didapatkan kadar karbon 40, 60, 80, 100, dan 120 µg/mL. Dari masing-masing kadar tersebut dipipet sebanyak 4 mL, ditambahkan darah mencit yang diambil dari ujung vena ekor sebanyak 25 µL. Setelah dihomogenkan, ukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 650 nm. Plot adsorben yang diperoleh dengan kadar karbon, digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Sebagai blanko digunakan darah mencit dan aquadest<sup>(5)</sup>.

**Uji Respon Imun Non Spesifik.** Uji bersihan karbon: Pengujian terhadap respon imun non spesifik didasarkan pada aktivitas fagositik. Kelompok kontrol (+) diberi prednison dosis 2 mg/kgBB dan kelompok kontrol (-) diberi CMC Na 0,5%. Kelompok perlakuan 1 diberikan ekstrak daun ara dosis 560 mg/kgBB mencit, kelompok perlakuan 2 diberikan ekstrak daun ara dosis 1120 mg/kgBB mencit, dan kelompok perlakuan 3 diberikan ekstrak daun ara dosis 1680 mg/kgBB mencit. Pemberian sediaan uji satu kali sehari selama 7 hari secara oral. Pada hari ke-8 sebelum diinduksi, masing-masing kelompok diambil darah sebagai nilai awal kurva baku (menit ke-0), kemudian mencit diinduksi dengan suspensi karbon 0,1ml/10g BB secara intravena pada bagian ekor. Pengambilan darah dilakukan pada menit ke 5, 10, 15, dan 20 sebanyak 25 µL, kemudian dilisiskan dengan 4 mL asam asetat 1%, lalu diukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis 650 nm. Aktivitas fagositosis ditentukan berdasarkan perbandingan antara kemiringan garis regresi linier antara 100%-Transmitan terhadap waktu pada kelompok uji dan kontrol<sup>(7)</sup>. Dihitung konstanta fagositosis (K) dan indeks fagositosis (IF) dengan menggunakan rumus:

$$(K) = \frac{\text{Log A (n)} - \text{Log A (n-1)}}{t (n-1) - t (n)}$$

Keterangan:

K = Konstanta fagositosis

A = Absorban pada waktu ke-0

t = Waktu (5, 10, 15, dan 20)

n = Periode pengambilan (1, 2, 3, 4, n)

$$(IF) = \frac{\text{Konstanta fagositosis mencit Z}}{\text{Konstanta fagositosis rata-rata}}$$

Keterangan:

IF = Indeks fagositosis

Mencit Z = Mencit yang telah diperlakukan dan ditentukan harga konstanta fagositosis

Indeks fagositosis dari tiap kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol. Nilai indeks fagositosis <1 mempunyai aktivitas immunosupresan dan indeks fagositosis >1 mempunyai aktivitas immunostimulan. Uji indeks organ limfoid (limpa dan hati): mencit dianestesi menggunakan kloroform selama beberapa menit hingga mencit kehilangan kesadaran. Mencit dibedah dan diambil organ limpa dan hati. Masing-masing organ tersebut kemudian ditimbang dan dibandingkan dengan kelompok kontrol serta dihitung (%) indeks organ<sup>(2)</sup>.

$$(\%) \text{ Indeks organ} = \frac{\text{Bobot organ}}{\text{Bobot badan}} \times 100\%$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Determinasi Tumbuhan Ara (*Ficus racemosa* Linn.).

Langkah awal dalam penelitian ini yaitu dilakukan determinasi yang bertujuan untuk memastikan kebenaran dari tumbuhan yang akan diteliti dengan cara mengidentifikasi tumbuhan tersebut. Berdasarkan surat nomor 22/UN18.7/LB/2018 yang dikeluarkan oleh Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Mataram, menunjukkan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian adalah tumbuhan ara (*Ficus racemosa* Linn.).

**Preparasi Sampel.** Pemilihan pelarut petroleum eter karena senyawa terpenoid bersifat non polar, sehingga dipilih pelarut yang juga bersifat non polar serta sifat volatil yang dimiliki pelarut petroleum eter dapat dengan mudah diekstraksi dengan metode maserasi. Selain itu mengacu pada jurnal yang dilakukan oleh Gupta dkk (2016) menggunakan pelarut petroleum eter dalam mengekstraksi senyawa terpenoid sebagai immunosupresan. Sampel ekstrak kental daun ara yang diperoleh dengan metode maserasi didapatkan % rendemen sebesar 4,79%. Hasil yang didapat lebih sedikit dibandingkan penelitian yang dilakukan oleh Sree (2012), dengan hasil %rendemen yang diperoleh menggunakan metode sokletasi yaitu 6,47 %. Hal ini dikarenakan perbedaan metode ekstraksi yang digunakan, kelebihan dari metode sokletasi adalah proses ekstraksi yang kontinyu dan sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga rendemen yang dihasilkan lebih banyak dibanding metode ekstraksi maserasi<sup>(6)</sup>.

**Skrining Fitokimia.** Dilakukan uji pendahuluan skrining fitokimia dengan metode tabung pada senyawa terpenoid dan steroid. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak petroleum daun ara positif mengandung senyawa terpenoid, ditandai dengan terbentuk warna

cokelat kemerahan. Perubahan warna tersebut dikarenakan oleh oksidasi pada golongan senyawa terpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi<sup>(7)</sup>. Senyawa terpenoid diduga dapat bertindak sebagai immunosupresan.

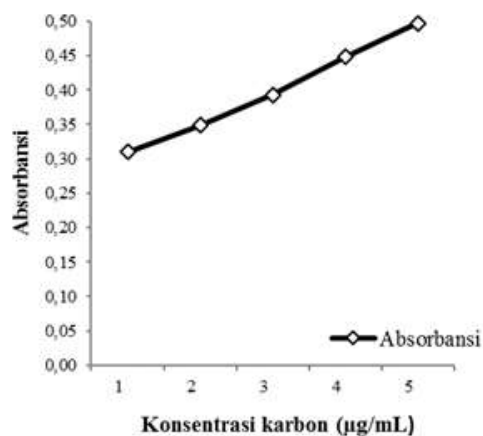
**Pengujian Imunosupresan.** Ekstrak petroleum daun ara kemudian dilakukan uji imunosupresan dengan metode bersihan karbon. Dalam darah, konsentrasi karbon akan berkurang seiring pertambahan waktu, karena proses fagositosis oleh sel-sel leukosit terutama pada sel neutrofi, monosit, makrofag dan eosinofil<sup>(8)</sup>.

**Kurva Baku.** Kemudian dibuat kurva baku untuk melihat hubungan linier antara konsentrasi karbon dalam darah dengan nilai absorbansi, diukur dengan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 650 nm. Dari kurva baku diperoleh persamaan absorbansi dan konsentrasi karbon yaitu  $y = 0,0024x + 0,2102$  dengan  $r = 0,9980$ . Pada Gambar 1 diperoleh hasil absorbansi karbon tertinggi pada konsentrasi paling tinggi. Semakin tinggi konsentrasi karbon dalam darah maka akan semakin tinggi nilai absorbansi yang diperoleh.

**Indeks Fagositosis.** Pada hari ke-8 masing-masing kelompok yang terlebih dahulu telah ditimbang kemudian diinjeksi intravena dengan larutan karbon

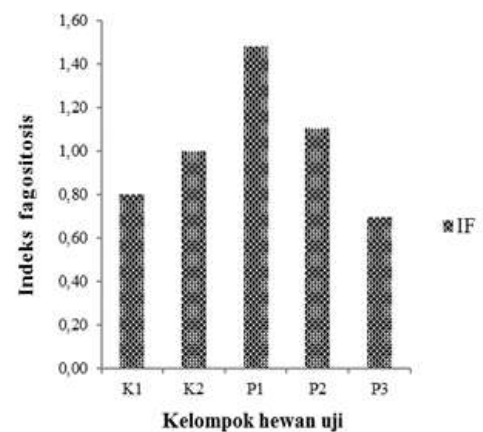
dimana sebelumnya telah di ambil masing-masing darah mencit dari vena sebagai t-0 (blanko). Setelah diinjeksi dengan larutan karbon kemudian diambil darah mencit pada menit ke-5, 10, 15 dan 20 yang akan di analisis dengan spektrofotometer UV Vis. Pada penelitian diperoleh hasil absorbansi karbon yaitu terjadi penurunan terbesar yaitu pada dosis 560 mg/kgBB kemudian terjadi penurunan berturut-turut pada dosis 1120 mg/kgBB, 1680 mg/kgBB dan kontrol positif prednison. Setelah didapat absorbansi karbon kemudian dihitung indeks fagositosis. Hasil indeks fagositosis masing-masing kelompok hewan uji dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Nilai rata-rata indeks fagositosis menunjukkan aktivitas fagositosis sel-sel fagositik terhadap partikel karbon sebagai antigen akibat pengaruh pemberian ekstrak petroleum eter daun ara. Berdasarkan Tabel 1 terlihat bahwa pemberian ekstrak petroleum eter dengan dosis yang lebih tinggi yaitu 1680 mg/kgBB dibandingkan dengan dosis 1120 mg/kgBB dan 560 mg/kgBB memiliki aktivitas fagositosis yang lebih rendah. Dosis yang digunakan dapat menentukan respons imun. Apabila dosis minimal suatu antigen telah dilampaui, semakin tinggi dosis yang digunakan akan terjadi peningkatan respons



**Gambar 1.** Absorbansi kurva baku karbon.

Keterangan: 1 = 40 µg/mL; 2 = 60 µg/mL; 3 = 80 µg/mL; 4 = 100 µg/mL; 5 = 120 µg/mL



**Gambar 2.** Absorbansi kurva baku karbon.

Keterangan: K1 = kontrol positif prednison; K2 = kontrol negatif CMC-Na; P1= perlakuan dosis ekstrak 560mg/kgBB; P2 = perlakuan dosis ekstrak 1120mg/kgBB; P3= perlakuan dosis ekstrak 1680mg/kgBB

**Tabel 1.** Rerata indeks fagositosis (IF).

Kelompok	IF	Keterangan
Suspensi prednison (Kontrol +)	0,8 ± 0,13	Imunosupresan
CMC-Na 0,5% (Kontrol -)	1 ± 0,48	-
Ekstrak petroleum eter daun ara 560 mg/kgBB mencit	1,5 ± 0,63	Imunostimulan sedang
Ekstrak petroleum eter daun ara 1120mg/kgBB mencit	1,1 ± 0,54	Imunostimulan lemah
Ekstrak petroleum eter daun ara 1680 mg/kgBB mencit	0,7 ± 0,17	Imunosupresan

Keterangan: t = (0, 5, 10, 15, dan 20) menit

imun, namun pada dosis tertentu akan terjadi sebaliknya yaitu penurunan respons imun atau bahkan dapat menghilangkan respons imun. Keadaan ini disebut dengan toleransi imunogenik<sup>(9)</sup>. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dengan dosis yang lebih besar dapat memberikan efek immunosupresan.

**Berat Organ Limfoid dan Indeks Organ Limfoid.** Dilakukan pembedahan untuk mengambil organ limfoid sekunder (hati dan limpa), masing-masing organ tersebut ditimbang menggunakan timbangan analitik, kemudian dilakukan perhitungan terhadap indeks organ. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada tabel Tabel 2 dan 3.

Dalam penelitian ini terdapat nilai perbedaan signifikan pada indeks organ limfoid jika dibandingkan dengan kontrol negatif CMC Na. Pemberian ekstrak petroleum eter daun ara (*Ficus racemosa* Linn.) dosis lebih besar dan pemberian prednison dapat menyebabkan penurunan indeks organ limfoid (%). Penurunan sel-sel imun tersebut berkorelasi dengan penurunan berat organ limfoid serta indeks organ seperti yang terlihat pada Tabel 2 dan 3. Selain itu, semakin menurun berat organ limfoid maka semakin berkurang sel fagositik yang dihasilkan dalam pembentukan antibodi. Namun, pada pemberian dosis yang lebih kecil yaitu dosis 560 mg/kgBB dan 1120 mg/kgBB mengalami peningkatan indeks organ limpa dan hati.

Aktivitas immunosupresan maupun immunostimulan ekstrak petroleum eter daun ara terhadap respon

imun non spesifik diduga karena terdapat kandungan terpenoid. Terpenoid telah ditemukan berguna dalam terapi beberapa penyakit seperti antiinflamasi dan imunomodulator<sup>(10)</sup>. Beberapa terpenoid, merupakan salah satu senyawa yang berperan mengatur sintesis kolesterol. Terpenoid dicurigai mampu menghambat aktivitas 3-hidroksi-3-metilglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reduktase, yang merupakan enzim kunci dalam sintesis kolesterol. Fungsi terpenoid dalam hal perubahan berat badan seperti itu penting dalam uji coba untuk mengelola kondisi penyakit seperti kanker atau penyakit kardiovaskular menggunakan faktor makanan<sup>(11)</sup>. Data indeks organ belum sepenuhnya memberikan gambaran mengenai apa yang terjadi pada organ tersebut. Dibutuhkan analisis mengenai gambaran histologi organ untuk memastikan kondisi jaringan yang sebenarnya secara jelas. Kelainan yang terjadi pada lingkup jaringan kemudian bisa dikaitkan dengan perubahan kondisi klinik hewan uji<sup>(12)</sup>.

## SIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak petroleum eter daun ara (*Ficus racemosa* Linn.) dosis 1680 mg/kgBB memiliki aktivitas immunosupresan dengan metode bersihan karbon pada indeks fagositosis 0,7 (IF<1) dan (%) indeks organ limfoid berbeda signifikan dengan kontrol negatif ( $p<0,05$ ).

**Tabel 2. Hasil rerata berat organ limfoid (g).**

Kelompok	Berat organ limfoid (g)	
	Hati	Limpa
Suspensi prednison (Kontrol +)	1,22 ± 0,07	0,16 ± 0,04
CMC-Na 0,5% (Kontrol -)	1,75 ± 0,10	0,30 ± 0,04
Ekstrak petroleum eter daun ara 560 mg/kgBB mencit	1,67 ± 0,14	0,27 ± 0,04
Ekstrak petroleum eter daun ara 1120mg/kgBB mencit	1,45 ± 0,12	0,23 ± 0,03
Ekstrak petroleum eter daun ara 1680 mg/kgBB mencit	1,34 ± 0,10	0,19 ± 0,01

**Tabel 3. Hasil rerata indeks organ limfoid (%).**

Kelompok	Indeks organ limfoid (g)	
	Hati	Limpa
Suspensi prednison (Kontrol +)	4,66 ± 0,32*	0,64 ± 0,08*
CMC-Na 0,5% (Kontrol -)	5,28 ± 0,33	0,88 ± 0,10
Ekstrak petroleum eter daun ara 560 mg/kgBB mencit	5,83 ± 0,68	0,95 ± 0,17
Ekstrak petroleum eter daun ara 1120mg/kgBB mencit	5,30 ± 0,46	0,83 ± 0,10
Ekstrak petroleum eter daun ara 1680 mg/kgBB mencit	4,66 ± 0,30*	0,66 ± 0,05*

Keterangan: \* = signifikan ( $p<0,05$ ) terhadap CMC-Na 0,5% (Kontrol -)

## DAFTAR PUSTAKA

1. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Situasi lupus di Indonesia. 2017. diambil dari URL: <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/infodatin/Infodatin-Lupus-2017.pdf>. diakses 15 Februari, 2018.
2. Puspitaningrum I, Lia K, dan Yuviant, DF. Aktivitas Imunomodulator fraksi etil asetat daun som Jawa (*Talinum triangulare* (Jacq.) Willd) terhadap respon imun non spesifik. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi. 2017. 24-5.
3. Goto, T., Nobuyuki, T., Shizuka, H., dan Teruo K. Various terpenoids derived from herbal and dietary plants function as PPAR modulators and regulate carbohydrate and lipid metabolism. Hindawi Journals Review Article. 2010. 1-9.
4. Ganatra S. H, Shweta P. D, dan Patil S. U. Preliminary phytochemicals investigation and TLC analysis of *Ficus racemosa* Leaves. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2012.4(5):2380-4.
5. Aldi Y, Nisya O, dan Dian H. Uji imunomodulator beberapa subfraksi ekstrak etil asetat meniran (*Phyllanthus niruri* [L]) pada mencit putih jantan dengan metoda *carbon clearance*. Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III. 2013:134-14.
6. Sree, M. S.. Pharmacological screening, leaves of *Ficus glomerata* for their anti ulcer activity. International Journal of Pharmaceutical Research and Development. 2012. 4(6):203-9.
7. Siadi K. Ekstrak bungil biji jarak pagar (*Jatropha curcas*) sebagai biopeptisida yang aktif dengan penambahan larutan NaCl. Jurnal Mipa. 2012. 35(2):77-6.
8. Subowo. Imunologi klinik Edisi ke-2. Bandung: Sagung Seto. 2013. p. 13-140.
9. Rifa'i M. Aspek biologi sel T regulator CD4+ CD25+ pada transplantasi sumsum tulang. Journal Exp.Life Sci. 2014. 4(1):1-9.
10. Thoppil, R. J dan Anupam B. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer. World Journal of Hepatology. 2017.3(9):228-21.
11. Hasanah U, Murni, dan Dahlia. Studi jenis dan potensi obat pada tumbuhan *Ficus*. Jurnal Pendidikan. 2017.2(7):986-4.
12. Hamdin, C. D, Cahyo, D., dan Galanova. D. Ketoksikan akut oral zat pewarna makanan daun jati (*Tectona Grandis* L. F.) pada tikus *Wistar*. Pro Food (Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan). 2018.4(1):240-6

## **Formulasi dan Uji Anti Inflamasi Masker *Peel Off* Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)**

### **(Formulation of Peel Off Mask Ekstract Etanol Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L.) and Activity as Anti Inflammatory)**

MIRATUN SYARIFAH\*, NINING SUGIHARTINI, LAELA HAYU NURANI

Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, DIY, Indonesia

\*Penulis korespondensi, Hp : 085239628321/082243173214

e-mail: miratunsyarifah@gmail.com

Diterima 14 Agustus 2018, Disetujui 23 September 2019

**Abstrak:** Inflamasi pada kulit seringkali terjadi pada kulit yang mengalami jerawat. Pengobatan jerawat bisa dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya dengan menjaga kebersihan kulit wajah. Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan bahan aktif skopoletin telah terbukti berkhasiat sebagai anti inflamasi. Buah mengkudu dikeringkan menjadi simplisia, di ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sampai menjadi ekstrak pekat. Ekstrak di formulasikan menjadi masker peel off dengan variasi konsentrasi sebesar 5%, 10 dan 15%. Masker yang dihasilkan dievaluasi sifat fisik meliputi uji pH, viskositas, daya lekat, dan daya sebar, serta uji daya anti inflamasi menggunakan hewan uji mencit dengan parameter jumlah ekspresi COX-2, uji daya iritasi menggunakan hewan uji kelinci. Hasil uji evaluasi sifat fisik masker peel off telah memenuhi syarat sifat fisik sediaan masker peel off. Sedangkan pada uji viskositas terdapat kelompok yang memenuhi syarat viskositas yaitu kelompok formula I dan II dan kelompok yang tidak memenuhi syarat viskositas yaitu kelompok formula III. Uji daya anti inflamasi pada hewan uji mencit bahwa masker menyebabkan penurunan jumlah ekspresi COX-2. Formula terbaik pada 3 sediaan, ditunjukkan pada formula I dengan nilai ekspresi COX-2 sebesar 22,635%. Hasil uji iritasi pada kelinci tidak menimbulkan iritasi. Berdasarkan hasil uji dapat disimpulkan bahwa nilai konsentrasi ekstrak etanol yang paling optimum ditunjukkan pada formula I dengan konsentrasi sebesar 5%.

**Kata kunci :** Inflamasi, masker peel off, ekstrak buah mengkudu, sifat fisik, uji daya antiinflamasi, daya iritasi.

**Abstract:** Inflammation of the skin often occurs in acne-prone skin. Acne can be prevented in various ways, one of them by maintaining clean skin. Noni fruit (*Morinda citrifolia* L.) with the active ingredient of scopoletin has been proven to be effective as an anti-inflammatory. Noni is dried into simplicia, extracted with ethanol 96% solvent until it becomes concentrated extract. The extract is formulated into a peel off mask with a concentration variation of 5%, 10 and 15%. The masks produced is evaluated for physical characteristic of pH, viscosity, spreadability, and adhesivity test), as well as anti-inflammatory properties using mice with the parameters of COX-2 expression and irritation test using rabbit. The evaluation results of the physical characteristic of the peel off mask fulfilled the physical characteristic requirements of the peel off mask preparation. Whereas in the viscosity test there were groups that met the viscosity requirements, namely the formula I and II groups and the group that did not meet the viscosity requirements, namely the formula III group. Anti-inflammatory test in mice showed that the mask lead to reduction in the amount of COX-2 expression. The best formula in 3 preparations was indicated in formula I with COX-2 expression value of 22.635%. The results of irritation test on rabbits did not cause irritation. According to the test results it can be concluded that the optimum value of the ethanol extract concentration is shown in formula I with a concentration of 5%.

**Keywords:** Inflammation, Peel off mask, Noni fruit extract, Physical Test, COX-2, Irritation.



## PENDAHULUAN

INFLAMASI adalah salah satu respon terhadap cedera jaringan ataupun infeksi. Inflamasi merupakan proses alami untuk mempertahankan homeostasis tubuh akibat adanya agen atau senyawa asing yang masuk<sup>(1)</sup>. Ada beberapa tanda terjadinya inflamasi yaitu kemerahan, bengkak, panas, nyeri dan hilangnya fungsi jaringan atau organ<sup>(2)</sup>.

Inflamasi menjadi salah satu kondisi yang menyebabkan terjadinya jerawat. Pengobatan jerawat bisa dilakukan dengan berbagai cara salah satunya dengan menjaga kebersihan kulit wajah. Tujuan penggunaan pembersih jerawat untuk menghilangkan sel-sel kulit mati, minyak berlebih, keringat, kotoran dan sisa kosmetik serta bisa mengurangi obstruksi ductus pilosebaceus, mencegah bakteri masuk ke dalam folikel sebaceus dan mengusahakan berkurangnya inflamasi<sup>(3)</sup>. Salah satu sediaan kosmetik pembersih wajah yang dapat digunakan untuk mengatasi jerawat adalah menggunakan sediaan kosmetik masker *peel off*.

Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan bahan aktif skopoletin telah terbukti berkhasiat sebagai anti inflamasi karena dapat menghambat aktivitas *siklooksigenase* (COX) dan *5 lipooksigenase* terhadap asam arakidonat sehingga jumlah prostaglandin menurun<sup>(4)</sup>.

Dalam penelitian ini akan dilakukan formulasi masker *peel off* dari bahan aktif ekstrak buah mengkudu yang berkhasiat untuk mengatasi inflamasi akibat jerawat. Masker *peel off* merupakan salah satu jenis masker wajah yang mempunyai keunggulan dalam penggunaannya yaitu dapat dengan mudah dilepas atau diangkat seperti membran elastis.

Formulasi masker *peel off* dilakukan dengan

penambahan zat aktif ekstrak etanol buah mengkudu dengan variasi konsentrasi FI 5%, FII 10% dan FIII 15% serta bahan tambahan seperti filming agent seperti PVA (Polivynil Alkohol) bahan pelunak, pelembab, pengawet, surfaktan dan pewangi. Basis yang digunakan dalam penelitian ini adalah polivinil alkohol. Senyawa PVA berperan dalam memberikan efek *peel off* karena memiliki sifat adhesive sehingga dapat membentuk lapisan film yang mudah dikelupas setelah kering<sup>(5)</sup>.

Berdasarkan hasil uraian di atas, maka perlu dilakukan evaluasi terhadap formula masker *peel off*. Parameter evaluasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah evaluasi sifat fisik ekstrak dan sediaan (uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji viskositas), uji daya anti inflamasi sediaan dengan melihat ekspresi COX-2, dan uji daya iritasi.

## BAHAN DAN METODE

**METODE.** Formulasi masker *peel off* dilakukan dengan penambahan zat aktif ekstrak etanol buah mengkudu dengan variasi konsentrasi FI 5%, FII 10% dan FIII 15% serta bahan tambahan seperti filming agent seperti PVA (Polivynil Alkohol) bahan pelunak, pelembab, pengawet, surfaktan dan pewangi. Basis yang digunakan dalam penelitian ini adalah polivinil alkohol.

Berdasarkan hasil uraian di atas, maka perlu dilakukan evaluasi terhadap formula masker *peel off*. Parameter evaluasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah evaluasi sifat fisik ekstrak dan sediaan (uji pH, uji daya sebar, uji daya lekat dan uji viskositas), uji daya anti inflamasi sediaan dengan melihat ekspresi COX-2, dan uji daya iritasi

**Identifikasi Buah Mengkudu.** Dilakukan

Tabel I. Formula Masker *Peel Off* Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)

Bahan	Konsentrasi (%)			Fungsi
	F1	F2	F3	
Eksstrak Buah Mengkudu	5	10	15	Zat aktif
PVA	12	12	12	Pembentuk film
HPMC	1	1	1	Peningkat Viskositas
TEA	2	2	2	Agen Pengalkali
Propilenglikol	10	10	10	Humektan
Propil Paraben	0,075	0,075	0,075	Pengawet
Metil Paraben	0,025	0,025	0,025	Pengawet
Essense Melati	0,5	0,5	0,5	Pengaroma
Essense Jeruk	0,5	0,5	0,5	Pengaroma
Etanol	10	10	10	Pelarut
Aquadest (mL) add	100	100	100	Pelarut

uji determinasi di lakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan menggunakan sampel buah mengkudu kemudian dilakukan indentifikasi oleh bagian laboratorium.

**Formulasi Masker Peel Off.** Masing-masing bahan ditimbang sesuai dengan komposisi yang tertera pada Tabel I. PVA dikembangkan dalam aquadestilata panas pada suhu 80°C hingga mengembang sempurna, pengadukan dilakukan di atas penangas air hingga didapatkan hasil yang homogen (wadah a). Kemudian HPMC dikembangkan dengan aquadestilata panas hingga mengembang sempurna (wadah b). Dilarutkan metil paraben dan propil paraben dengan aquadestilata secara perlahan-lahan kemudian dimasukkan kedalam propilenglikol (wadah c). Wadah b dan c dicampurkan secara berturut-turut pada wadah A. Ekstrak buah mengkudu ditambahkan sedikit demi sedikit lalu diaduk hingga homogen. Essense jeruk dan melati dimasukkan masing-masing 0,5 ml, diaduk hingga homogen. Aquadest ditambahkan hingga 100 ml dan diaduk hingga sediaan masker peel off yang homogen<sup>(6)</sup>.

**Evaluasi Sifat Fisik Sediaan Masker. (a) Uji pH.** Sejumlah 0,5 g masker peel off diencerkan dengan 5 ml aquades, kemudian di cek pHnya dengan alat pH meter<sup>(7)</sup>.

**(b) Uji Daya Sebar.** Sebanyak 1 g gel masker peel off diletakkan diatas kaca berukuran 20x20 cm dengan hati-hati. Selanjutnya ditutupi dengan kaca yang lain digunakan pemberat diatasnya sebesar 50 g hingga bobot mencapai 125 g dan diukur diameternya

**(c) Uji Daya Lekat.** Sediaan dioleskan pada kaca transparan, kemudian diamati waktu yang diperlukan sediaan gel tersebut mengering sampai terbentuk lapisan yang kering<sup>(8)</sup>.

**(d) Uji Viskositas.** Viskositas dari sediaan masker peel off ditentukan dengan menggunakan viscometer Rheosys dengan mencatat hubungan antara viskositas dan rpm<sup>(9)</sup>.

**Uji Daya Iritasi.** Masker peel off di evaluasi daya iritasi kulitnya dengan menggunakan hewan uji kelinci. Penelitian ini menggunakan 6 ekor kelinci New Zealand berkelamin jantan. Masing-masing kelinci yang telah dicukur bulunya dibagi menjadi 6 bagian yang berbentuk bujur sangkar dengan luas masing masing 2x3 cm dan jarak per area sekitar 2 cm. Kemudian kelinci diberi perlakuan sediaan masker peel off dengan variasi konstrasi FI, FII, FIII, kontrol basis, kontrol sehat, dan kontrol ekstrak buah mengkudu. Setelah 24 jam diamati perubahan yang terjadi pada punggung kelinci. Pengamatan dzilakukan selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam, hari ke 7 dan hari ke-14. Diamati seperti eritema dimana kulit menjadi kemerahan dan timbul berkas-berca<sup>(10)</sup>.

**Uji Daya Inflamasi.** Daya inflamasi dilakukan terhadap 7 kelompok mencit galur swiss jenis kelamin jantan dengan (berat badan 20-30 g) masing-masing menggunakan 6 mencit tiap kelompok. Adapun 7 kelompok tersebut adalah sebagai berikut :

- Kelompok Sehat. Pada kelompok ini mencit tidak diolesi agen inflamasi maupun sampel masker peel off (tidak diberi perlakuan).

- Kelompok Sakit. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil dengan konsentrasi 4%.

- Kelompok Kontrol Positif. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil dengan konsentrasi 4% kemudian diolesi produk pembanding voltadex® gel sebanyak 100 mg yang diketahui berkhasiat sebagai produk anti inflamasi.

- Kelompok Basis. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil konsentrasi 4% kemudian diolesi basis masker peel off.

- Kelompok Formula I. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil konsentrasi 4% kemudian diolesi masker peel off formula I dengan konsentrsi ekstrak sebanyak 5%.

- Kelompok Formula II. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil konsentrasi 4% kemudian diolesi masker peel off formula II dengan konsentrsi ekstrak sebanyak 10%.

- Kelompok Formula III. Pada kelompok ini mencit diolesi agen inflamasi yaitu sebanyak 0,1 ml crotton oil konsentrasi 4% kemudian diolesi masker peel off formula III dengan konsentrsi ekstrak sebanyak 15%.

Prosedur kerja yang dilakukan saat induksi inflamasi pertama-tama punggung mencit dicukur rambutnya dan kemudian diolesi perontok rambut veed. Dibersihkan bulu-bulu mencit dengan hati-hati jangan melukai kulitnya, didiamkan selama 24 jam. Setelah didiamkan 24 jam punggung mencit diolesi dengan 0,1 ml crotton oil dengan konsentrasi 4% pada luas area 2x2cm. Pengolesan basis masker peel off, formulasi I, II, III dari masker peel off dan voltadex sebesar 100 mg dilakukan selama 30 menit setelah penetesan croton oil. Hari berikutnya juga diberi perlakuan yang sama selama 3 hari berturut-turut. Setelah itu mencit dikorbakan dan diambil jaringan punggungnya untuk dibuat preparat pengecatan HE dan COX-2. Berdasarkan hasil pengecatan dapat diukur jumlah ekspresi COX-2.

Area pengambilan kulit disekitar daerah perlakuan dengan ukuran 1x1 cm. Hasil pemotongan jaringan kulit diletakkan di container yang telah berisi larutan formalin 10% hingga potongan kulit terendam sempurna yang kemudian dibawa ke bagian Laboratorium Patologi Anatomi Klinik

Asri Medical Center (AMC) untuk pengecatan hematoksin dan eosin (HE). Kemudian pengecatan imunohistokimia dengan antibody anti-COX-2 dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi RS Dr. Sardjito Yogyakarta. Hasil pengecatan dianalisis di bawah mikroskop cahaya (Olympus) di Laboratorium Farmakologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta<sup>(11)</sup>.

**Analisis Data.** Data evaluasi sifat fisik (pH, daya sebar, daya lekat, viskositas) dan uji antiinflamasi yang diperoleh dianalisis dengan uji hipotesis (uji homogenitas dan uji normalitas). Jika data hasil uji homogenitas dan uji normalitas menunjukkan hasil yang homogen dan terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji parametrik menggunakan analisis statistik one Way ANOVA. Akan tetapi jika tidak homogen atau tidak terdistribusi normal dilanjutkan dengan uji non parametrik menggunakan analisis statistik *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney* dengan menggunakan SPSS.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Identifikasi Buah Mengkudu.** Buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang digunakan untuk penelitian ini di determinasi di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Ahmad Dahlan. Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini bahwa benar sampel buah mengkudu spesies dari *Morinda citrifolia* L.

**Hasil Ekstraksi dan Hasil Uji Kadar Air Ekstrak.** Pembuatan ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Pelarut etanol 96% sangat efektif untuk mendapatkan kandungan senyawa saponin, flavonoid, tannin dan alkaloid<sup>(12)</sup>. Salah satu senyawa yang mudah larut dalam etanol 96% adalah senyawa skopoletin<sup>(13)</sup>. Selama proses perendaman sesekali dilakukan pengadukan dengan tujuan untuk menghomogenkan larutan selama proses perendaman dan mempercepat kontak antara sampel dan pelarut<sup>(14)</sup>. Hasil maserasi 5 kg simplisia kering didapatkan ekstrak etanol buah mengkudu sebanyak 256,258 g.

Berdasarkan hasil uji kadar air bahwa ekstrak etanol buah mengkudu yang diperoleh 7,98% v/b atau kurang dari 10% sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol buah mengkudu yang digunakan memenuhi persyaratan standar. Kadar air dalam ekstrak kurang dari 10% dapat meminimalisir tumbuhnya jamur dan kapang serta menghasilkan daya tahan penyimpanan dan mutu ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).

### Hasil Formulasi Sediaan Masker Peel

**Off Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).** Hasil formulasi sediaan masker peel off menunjukkan bahwa masker peel off yang dihasilkan berwarna coklat kehitaman, aroma khas buah mengkudu, dan homogen. Masker peel off yang dioleskan pada kulit memberikan efek lembab dan membutuhkan waktu 15-20 menit untuk kering pada kulit.

**Hasil Evaluasi Sifat Fisik Masker Peel Off. Uji pH.** Sediaan masker peel off seharusnya memiliki pH yang sesuai dengan pH kulit wajah yaitu 4,5-6,5. Untuk sediaan topikal yang akan digunakan pada kulit jika memiliki pH lebih kecil dari 4,5 dapat menimbulkan iritasi pada kulit sedangkan jika pH lebih besar dari 6,5 dapat menyebabkan kulit bersisik<sup>(15)</sup>.

Hasil pengujian pH ekstrak menunjukkan

**Tabel II. Data Hasil Uji pH Sediaan Masker Peel Off Buah Mengkudu**

Formula	pH ± SD
Ekstrak	3,44 ± 0,1
FI	6,06 ± 0,11
FII	5,42 ± 0,13
FIII	4,68 ± 0,08
Basis	6,32 ± 0,10

bahwa pH ekstrak bersifat asam sedangkan pH sediaan masker peel off sediaan yang telah di tambahkan ekstrak etanol buah mengkudu pada konsentrasi 5% memiliki rata-rata pH sebesar (6,06), pada konsentrasi 10% memiliki rata-rata pH sebesar 4,68 sedangkan pada kontrol basis pH sediaan memiliki nilai sebesar 6,32. Hal ini sesuai dengan yang dipersyaratkan, yaitu pH berada pada rentang pH normal kulit yaitu antara 4.5 -7. Sehingga konsentrasi pH yang dihasilkan pada masker peel off ini aman/tidak mengiritasi kulit. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak menyebabkan pH sediaan semakin menurun, ini disebabkan adanya kandungan asam kaproat, asam kaprilat, asam dekanat, asam benzoat dan asam kaprat termasuk golongan asam lemak. Asam kaproat dan asam kaprat inilah yang menyebabkan bau busuk yang tajam pada buah mengkudu.

**Viskositas.** Pengujian viskositas adalah faktor penting karena dapat mempengaruhi parameter daya sebar dan pelepasan zat aktif dari masker peel off. Masker peel off yang memiliki viskositas optimum akan mampu menahan zat aktif tetap terdispersi dalam basis masker peel off dan meningkatkan konsistensi masker peel off tersebut<sup>(16)</sup>. Viskositas sediaan gel sebaiknya berada pada range 7100-83144 cps<sup>(17)</sup>. Data hasil uji viskositas terlihat pada tabel III. bahwa nilai viskositas terdapat kelompok yang

**Tabel III. Data Hasil Uji Viskositas Sediaan Masker Peel Off Buah Mengkudu**

Formula	Viskositas $\pm$ SD
Ekstrak	24058,8 $\pm$ 1811,3
FI	29544 $\pm$ 2701
FII	60149 $\pm$ 32327
FIII	84694 $\pm$ 58449

memenuhi syarat viskositas dan tidak. Kelompok formula yang memenuhi persyaratan viskositas adalah kelompok formula I dan II. Sedangkan kelompok yang tidak memenuhi persyaratan yang telah ditetapkan adalah kelompok formula III.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa nilai viskositas dari sediaan masker peel off terdistribusi normal dan tidak homogen. Sehingga analisis data dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing kelompok yang menunjukkan hasil yang signifikan.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perbandingan antara kelompok Basis dan formula I menunjukkan bahwa nilai  $p > 0,05$  artinya bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok basis dan kelompok formula I. Sedangkan perbandingan antara kelompok Basis dan FII, Basis dan FIII menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan yang ditunjukkan dengan nilai  $p < 0,05$ . Artinya bahwa penambahan konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu mempengaruhi viskositas dari sediaan masker *peel off*.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perbandingan antara kelompok FI dan FII, kelompok FI dan kelompok FIII menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p < 0,05$ . Artinya bahwa semakin tinggi jumlah konsentrasi ekstrak pada tiap formula menyebabkan meningkatnya viskositas sediaan masker *peel off*.

**Uji Daya Lekat.** Uji daya lekat pada sediaan masker peel off ini dimaksudkan untuk mengetahui berapa lama sediaan masker peel off ini melekat pada kulit. Data hasil uji Daya lekat terlihat pada tabel IV. Hasil uji daya lekat pada formula I, II, III menghasilkan data lebih dari 4 detik. Hal ini sesuai dengan daya

lekat yang dipersyaratkan yaitu tidak kurang dari 4 detik<sup>(18)</sup>. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan tidak homogen ( $P < 0,05$ ). Sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dan *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan antar masing-masing kelompok. Hasil uji *Mann-Whitney* dan *Kruskal Wallis* menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) antar semua kelompok formula (FI, FII, FII) dan basis. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan ekstrak etanol buah mengkudu dapat mempengaruhi daya lekat suatu sediaan masker *peel off*.

**Uji Daya Sebar.** Uji daya sebar bertujuan untuk mengetahui luas area masker peel off dapat menyebar dan merata saat digunakan. Daya sebar adalah karakteristik yang berguna untuk memperhitungkan kemudahan saat pemakaian sediaan<sup>(19)</sup>. Bila diameter daya sebar kurang dari 5 cm maka gel tergolong dalam sediaan yang semikaku, namun jika diameter daya sebar antara 5-7 cm maka gel tergolong dalam sediaan yang semicair. Data hasil uji daya sebar terlihat pada tabel V.

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan rata-rata daya sebar sediaan masker *peel off* sebesar 4,7 cm maka hasil uji daya sebar pada sediaan ini tergolong kedalam jenis masker semikaku karena diameter sebaranya kurang dari 5 cm. Hasil uji daya sebar menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi menyebabkan meningkatnya daya sebar sediaan masker. Nilai daya sebar sediaan masker berhubungan dengan nilai viskositas. Nilai daya sebar harus berbanding terbalik dengan nilai viskositas. Jika viskositas sediaan masker meningkat dengan penambahan konsentrasi maka nilai daya sebar sediaan harus semakin rendah. Tetapi hasil uji daya sebar paada penelitian ini menunjukkan nilai yang berbanding lurus dengan nilai viskositas. Nilai daya sebar meningkat dan nilai viskositas juga meningkat setelah ditambahkan ekstrak.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen ( $p < 0,05$ ). Sehingga analisis data dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dan *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan antara masing-masing kelompok yang

**Tabel IV. Hasil Uji Daya Lekat**

Formula	Daya Lekat (detik)
FI	253,8 $\pm$ 3,56
FII	263,4 $\pm$ 1,51
FIII	272,2 $\pm$ 1,78
Basis	231,2 $\pm$ 2,38

**Tabel V. Data Hasil Uji Daya Sebar Sediaan Masker Peel Off Buah Mengkudu**

Formula	Daya Sebar (cm <sup>2</sup> )
FI	4,6 $\pm$ 0
FII	4,7 $\pm$ 0,05
FIII	4,8 $\pm$ 0,10
Basis	4,9 $\pm$ 0

menunjukkan hasil yang signifikan.

**Hasil Uji Anti Inflamasi.** Uji daya inflamasi dilakukan dengan tujuan untuk melihat aktivitas anti inflamasi pada sediaan masker *peel off* ekstrak etanol buah mengkudu. Parameter yang di uji pada penelitian ini adalah ekspresi COX-2. Hewan uji yang digunakan adalah 7 kelompok mencit galur swiss jenis kelamin jantan dengan (berat badan 20-30 g) masing-masing menggunakan 6 mencit pada tiap kelompok uji. Induktor inflamasi yang digunakan adalah croton oil konsentrasi 4% sebanyak 0,1 ml.

Data ekspresi COX-2 diperoleh data dari 7 kelompok uji. Kelompok kontrol sakit menyebabkan ekspresi COX-2 yang lebih intensif dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat. Hal ini disebabkan croton oil berefek sebagai inflamasi dan memiliki sifat irritant, sehingga minyak ini dipilih sebagai induktor inflamasi. Hal ini sesuai dengan penelitian . Data hasil uji inflamasi dapat dilihat pada tabel VI.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa

**Tabel VI. Data Hasil Uji Inflamasi Sediaan Masker Peel Off Buah Mengkudu**

Kelompok	COX-2
KSe	14,97 ± 5,02
KSa	30,52 ± 7,23
K+	24,28 ± 1500,40
FB	28,64 ± 6,70
FI	22,63 ± 2218,73
FII	18,99 ± 5,04
FIII	20,31 ± 4,35

Keterangan :

- KSe : Kontrol Sehat
- KSa : Kontrol Sakit
- K+ : Kontrol Positif
- FB : Formula Basis
- FI : Formula I
- FII : Formula II
- FIII : Formula III

data jumlah ekspresi COX-2 terdistribusi normal tetapi tidak homogen ( $p < 0,05$ ) sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney*. Hasil uji dengan *Kruskal Wallis* memiliki perbedaan yang signifikan dengan ditunjukkan dengan nilai ( $p < 0,05$ ). Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Perbandingan antara kelompok sehat dan kelompok sakit menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian croton oil dapat menyebabkan inflamasi pada kulit. Sehingga metode induksi dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi formula pada masker yang telah dibuat<sup>(9)</sup>. Croton oil memiliki mekanisme mengaktivasi fosfolipase A2

yang mengeluarkan asam arakhidonat dari membrane sel, asam arakhidonat ini selanjutnya dimetabolisme menjadi prostaglandin dan leukorin..

Hasil uji statistik kontrol sehat dan kontrol positif menunjukkan bahwa adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai ( $P < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa kontrol positif (voldatex gel) yang digunakan memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi. Sediaan voltadex yang mengandung natrium diklofenak bekerja dengan menghambat cyclooxygenase 1 (COX-1) dan cyclooxygenase 2 (COX-2) sehingga menghasilkan penghambatan prostaglandin sebagai mediator nyeri.

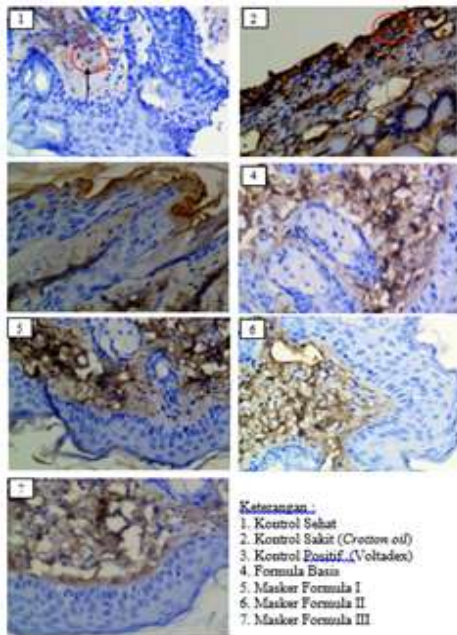
Hasil uji statistik antara kelompok kontrol sakit dan kelompok formula I, formula II, formula III menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai ( $p < 0,05$ ). Pemberian masker peel off ekstrak etanol buah mengkudu ternyata mampu menurunkan jumlah sel ekspresi COX-2.

Hasil uji statistik antara kelompok kontrol positif dan formula I, II dan III menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol formula baik kelompok formula I, II dan III memiliki kemampuan yang sama dengan produk yang ada dipasaran. Perbandingan antara kelompok basis dan kontrol sakit menunjukkan nilai ( $p > 0,05$ ) ini artinya bahwa basis tidak memberikan efek sebagai antiinflamasi. Perbandingan antara kelompok basis dan formula II dan III menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), ini artinya bahwa ekstrak buah mengkudu memiliki efek sebagai antiinflamasi.

Zat aktif yang berkhasiat sebagai antiinflamasi pada buah mengkudu adalah skopoletin. Skopoletin (6-metoksi-7-hidroksikumarin) merupakan senyawa kumarin<sup>(20)</sup>, kumarin terhidroksilasi. Kumarin, flavonoid dan asam fenolat, dan iridoid yang memiliki kemampuan menghambat produksi nitrit oksida (NO) dan aktivitas enzim siklooksigenase, sehingga menghambat produksi prostaglandin seperti mekanisme kerja OAIN<sup>(21)</sup>.

Hasil uji statistik kelompok basis dan kelompok formula I, formula II, formula III menunjukkan hasil yang berbeda signifikan yang ditunjukkan dengan nilai ( $p < 0,05$ ). Artinya bahwa formula yang mengandung ekstrak mempunyai aktivitas sebagai anti inflamasi.

Hasil uji statistik kelompok formula I dan formula II tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ ). Hasil uji pada kelompok formula I formula II dan formula III kelompok formula II dan III juga menunjukkan hasil yang tidak berbeda signifikan ( $P > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi tiap formula tidak mempengaruhi penurunan jumlah ekspresi



**Gambar 1. Mikrofotografi ekspresi COX-2 kulit mencit galur swiss dengan pembesaran 400x**

COX-2. Sehingga dipilih konsentrasi terbaik yang dapat menurunkan jumlah ekspresi COX-2 dengan konsentrasi yang paling kecil sebesar 5% dengan nilai ekspresi COX-2 sebesar 22,63%.

Hasil pewarnaan dengan teknik imunohistokimia (IHC) menggunakan antibodi COX-2 tampak warna coklat pada sitoplasma sel fibroblas, makrofag, neutrofil serta lapisan basal epitel dengan intensitas yang bervariasi mengindikasikan ekspresi positif COX-2<sup>(22)</sup>.

**Hasil Uji Daya Iritasi.** Pengujian keamanan sediaan dievaluasi dengan uji iritasi pada kulit punggung kelinci dengan menentukan tingkat iritasi primer dengan metode *Draize test*. Uji iritasi dilakukan untuk mencegah terjadinya efek samping terhadap kulit. Pengamatan yang dilakukan pada uji iritasi ini adalah reaksi kulit yang timbul dengan 2 parameter utama pengamatan, yaitu tingkat eritema (reaksi kemerahan maupun parutan) dan tingkat edema (bengkak) yang timbul, kemudian hasil pengamatan tersebut diberikan skor 0-4, sesuai dengan tingkat keparahannya. Uji iritasi dilakukan terhadap basis masker, 3 macam formula masker yaitu FI, FII, FIII dan 3 macam kontrol yaitu kontrol basis, kontrol ekstrak serta kontrol sehat. Penelitian ini menggunakan 6 ekor kelinci New Zealand berkelamin jantan.

Pengamatan dilakukan pada punggung kulit kelinci setelah diberi perlakuan dari pengamatan 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Untuk melihat reversibilitas diamati pada hari ke 7 hingga hari ke 14. Selama Hasil

**Tabel VII. Hasil Pengamatan Uji Iritasi Pada Sediaan Masker Peel Off Ekstrak Etanol Buah Mengkudu.**

Kelompok Uji	Indeks Iritasi
FI	0
FII	0
FIII	0
KB	0,3
KE	0

FI : Formula Masker peel off dengan konsentrasi ekstrak buah mengkudu sebesar 5%. FII: Formula Masker peel off dengan konsentrasi ekstrak buah mengkudu sebesar 10%. FIII: Formula Masker peel off dengan konsentrasi ekstrak buah mengkudu sebesar 15%. KB: Kontrol basis masker peel off tanpa penambahan ekstrak. KE: Ekstrak etanol buah mengkudu tanpa penambahan basis. KS: Kontrol sehat tanpa perlakuan.

pengamatan terlihat pada Tabel VII.

Hasil pengujian daya iritasi masker *peel off* ekstrak etanol buah mengkudu tidak menyebabkan iritasi pada kulit kelinci. Hal ini menunjukkan bahwa masker peel off berbahan aktif ekstrak etanol buah mengkudu tetapi basis masker peel off menunjukkan adanya iritasi yang sangat ringan dengan skor sebesar 0,3. Hal ini disebabkan karena kondisi individual hewan uji yang menyebabkan iritasi pada kulit kelinci. Jika senyawa PVA, propilenglikol, HPMC yang terkandung dalam masker peel off bukan menjadi penyebab terjadinya iritasi pada kulit kelinci. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Rowe *et.al*, 2009.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :1.Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu menyebabkan penurunan pH, peningkatan viskositas, daya lekat, dan daya sebar. 2. Penambahan konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu dalam sediaan masker peel off tidak mempengaruhi jumlah ekspresi COX-2. 3. Penambahan konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu dalam sediaan masker peel off tidak menyebabkan iritasi. Tetapi basis masker peel off yang dapat menyebabkan iritasi dengan kategori sangat ringan dengan skor sebesar 0,3. 4. Konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu yang paling optimal adalah konsentrasi ekstrak terkecil sebesar 5%.

## DAFTAR PUSTAKA

- Ikawati, Z., 2011, Farmakoterapi Penyakit Sistem Saraf Pusat, Bursa Ilmu, Yogyakarta.
- Colville T. dan Bassert J.M., 2016, Clinical Anatomy and Physiology for Veterinary Technicians-Thomas P. Colville, Joanna M. Bassert - Google Books, 3rd ed.

- Colville, T. & Bassert, J. M., eds., Elsevier, Canada.
3. Grimes, P.E., 2009, Efficacious and Safe Cosmetic Procedures in Skin of Color. *Cos Derm* ; 22: 253-59.
  4. Tanko, 2012, Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Ethanol Extract of Bryophyllum Pinnatum Laboratory Animals, *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (JDMS)*.
  5. Birck, C., S. Degoutin, N. Tabary, V. Miri, dan M. Bacquet, 2014, New crosslinked cast films based on poly (vinyl alcohol): Preparation and physico-chemical properties, *Express Polymer Letters*. 8 (12): 941-952.
  6. Rahayu, et al., 2015
  7. Naibaho, O. H., Yamlean, P. V. Y., & Wiyono, W., 2013, Pengaruh Basis Salep Terhadap Formulasi Sediaan Salep Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum* L.) Sinko, P. J., 2011, *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika edisi 5*, diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB, 706, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
  8. Sinko, P. J., 2011, *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika edisi 5*, diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB, 706, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
  9. Sugihartini, N, 2013, Optimasi Komposisi Enh. ncer dan Emulgator pada Formulasi Krim Fraksi Etil Asestat Ekstrak Teh Hijau (*Camellia sinensis*, L) sebagai Sediaan Topikal Anti Inflamasi, Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
  10. Vieira, Rafael Pinto, 2009, Physical and Physicochemical Stability Evaluation of Cosmetic Formulations Containing Soybean Extract Fermented by *Bifidobacterium animalis*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 45 (3): 515-525.
  11. Utami, S. A., 2016, Uji Efek Antiinflamasi Topikal Ekstrak Milk Thistle pada Jumlah Neutrofil dan Ekspresi COX-2 Mencit Betina Terinduksi Karagenin. Skripsi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta.
  12. Nurhamdani, 2012
  13. Diana, Nurus, 2010, Pengukuran Kandungan Skopoletin Pada Beberapa Tingkat Kematangan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan Metode KLT Densitometri, Skripsi, Universitas Trunojoyo, Madura.
  14. Khunaifi, M, 2010, Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (ten.) Steenis) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, Skripsi. Malang: UIN Malang.
  15. Rahmawanty Dina., Nita Yulianti., dan Mia Fitriana., 2015, Formulasi dan Evaluasi Masker Wajah Peel Off Mengandung Kuersetin Dengan Variasi Konsentrasi Gelatin dan Gliserin, *Media Farmasi*.
  16. Madan, J., dan Singh, R., 2010, Formulation and Evaluation of Aloe Vera Topical Gels, *Int.J.Ph.Sci.*, 2 (2), 551-555.
  17. Chandira, R.M., 2010, Design, Development and Formulation of Antiacne Dermatological Gel. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 401- 414.
  18. Ulaen, S.P.J., Banne, Y., Suatan, R.A., 2012, Pembuatan Salep Anti Jerawat dari Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.), *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 3(2), 45-49.
  19. Ainaro, E.P., Gadri, A., dan Priani, S.E. 2015, Formulasi sediaan masker gel peel off mengandung lender bekicot (*Achatina fulica* Bowdich) sebagai pelembab kulit, *Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba Kesehatan dan Farmasi*: 86-95.
  20. Sholehah, D.N., 2010, Pengukuran Kandungan Skopoletin Pada Beberapa Tingkat Kematangan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* Linn) Dengan Metode KLT Densitometri, *Agrovigor*, Vol 3, No. 1, 1.
  21. Widasari, F., Bakhriansyah, M., & Istiana, 2014, Studi Interaksi Farmakodinamik Efek Analgesik Kombinasi Perasan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan Parasetamol, *Berkala Kedokteran*.
  22. Haque, A.F., 2016, Daya Antiinflamasi Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dalam Sediaan Krim Tipe M/A dalam Berbagai Variasi Dosis, Tesis, Program Pasca Sarjana Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.



# Isolasi dan Identifikasi Senyawa Geraniol dari Minyak Atsiri Tanaman Sereh Wangi *Cymbopogon nardus* (L) Rendle (Isolation and Identification of Geraniol Compounds from The Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L) Rendle)

SHIRLY KUMALA<sup>5\*</sup>, YELFI ANWAR<sup>1,2</sup>, ELVINA DHIAUL IFTITAH<sup>3</sup>, PARTOMUAN  
SIMANJUNTAK<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Program Doktor, Fakultas Farmasi, University Pancasila, Jakarta.

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas 17 August 1945, Jakarta.

<sup>3</sup>Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya,  
Malang.

<sup>4</sup>Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.

<sup>5</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta.

\*Penulis korespondensi, Hp : 08129026821

e-mail: fskumala@univpancasila.ac.id

Diterima 28 Maret 2019, Disetujui 2 Oktober 2019

**Abstrak:** Indonesia merupakan negara penghasil utama beberapa minyak atsiri seperti minyak sereh, minyak cengkeh, minyak kenanga, minyak akar wangi, minyak cendana, dan minyak nilam. Genus *Cymbopogon* (*Poaceae*) memiliki komponen minyak esensial yang paling penting yaitu citral, geraniol, sitronelol, sitronelal. Geraniol adalah salah satu senyawa kimia yang paling penting dalam industri aroma, wewangian, menunjukkan sifat insektisida dan penolak serangga alami yang menunjukkan toksisitas rendah serta kelas baru agen kemoprevensi untuk kanker, antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, beberapa efek vaskular, penambah penetrasi penghantaran obat transdermal. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa geraniol yang diperoleh dari *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle dan identifikasinya. Minyak atsiri sereh wangi diperoleh dari tanaman *Cymbopogon nardus* (L) Rendle dengan menggunakan metode destilasi uap-air, lalu dilakukan proses fraksinasi dan dilanjutkan proses isolasi dan pemurnian dengan kromatografi kolom dan diperoleh senyawa murni dari fraksi 5. Berdasarkan interpretasi data IR, Resonansi magnet inti (RMI proton dan karbon) dan spektra massa (GC-MS) untuk isolate dari fraksi 5 ditetapkan sebagai senyawa geraniol. Geraniol dari minyak atsiri tanaman sereh wangi *Cymbopogon nardus* (L) Rendle dapat diperoleh dengan metode destilasi uap-air, fraksinasi dan isolasi

**Kata kunci:** *Cymbopogon nardus* (L) Rendle, geraniol, kromatografi kolom, minyak atsiri, NMR.

**Abstract:** Indonesia is a major producer of several essential oils such as citronella oil, clove oil, cananga oil, vetiver oil, sandalwood oil, and patchouli oil. The *Cymbopogon* (*Poaceae*) genus has the most important components of essential oils, namely citral, geraniol, citronellol, citronellal. Geraniol is one of the most important chemical compounds in the aroma and fragrance industry and shows the nature of insecticides and natural insect repellents which show low toxicity and is suggested to represent a new class of chemoprevention agents for cancer, antimicrobial, anti-oxidant, anti-inflammatory and some vascular effects. Transdermal drugs also attract the attention of researchers and scientists in the field of formulation. This study aimed to obtain geraniol compounds obtained from *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle and identification. The citronella, essential oil was obtained from the *Cymbopogon nardus* (L) Rendle plant using a water-steam distillation method, then fractionation was carried out and continued by purification isolation by column chromatography. Based on the interpretation of IR data, Core magnetic resonance (proton and carbon RMI) and mass spectra for isolate 5 were determined as geraniol compounds. Geraniol can be obtained from *Cymbopogon nardus* (L) Rendle plants by water-steam distillation, fractionation and isolation methods.

**Keywords:** Chromatography column, *Cymbopogon nardus* (L) Rendle, geraniol, essential oil, NMR



## PENDAHULUAN

SALAH satu minyak atsiri yang dihasilkan dan dijadikan sumber devisa adalah minyak sereh wangi. Menurut data dari Departemen Kementrian Perdagangan Ekspor Non Migas periode 2013 – 2018, tren ekspor minyak atsiri 2013 – 2017 meningkat sebesar 4% dan perubahan 2018/2017 adalah 19,85%<sup>(1)</sup>.

Ganjewala melaporkan bahwa genus *Cymbopogon* (*Poaceae*) memiliki komponen minyak esensial yang banyak digunakan sebagai perasa, wewangian, kosmetik, sabun dan deterjen karena aroma khas lemon dan rose-like. Signifikansi aktivitas biologis dan farmakologis dari minyak esensial ini telah berkembang pesat dalam sepuluh tahun terakhir yaitu sebagai anti-inflamasi, antikanker, allelopati, penguraian radikal bebas dan aktivitas biologis lain serta penerapan penting industri terutama pada kemasan makanan<sup>(2)</sup>.

Telah dilaporkan destilasi uap – air minyak atsiri *Cymbopogon nardus* (Linn.) Rendle (*Syn Andropogon nardus* Linn.), mengandung beberapa komponen. Monoterpen yang menonjol adalah sitronelal (27,87%), geraniol (22,77%), geraniol (14,54%), sitronelol (11,85%) dan neral (11,21%)<sup>(3)</sup>.

Chen (2010) melaporkan geraniol adalah alkohol terpen komersial yang penting pada minyak esensial beberapa tanaman aromatik. Selain aroma yang menyenangkan, geraniol diketahui menunjukkan sifat insektisida, penolak serangga dan digunakan sebagai agen pengendali hama alami yang menunjukkan toksisitas rendah, serta disarankan mewakili kelas baru agen kemoprevensi untuk kanker, antimikroba, anti oksidan, antiinflamasi dan beberapa efek vaskular juga telah diselidiki<sup>(4)</sup>. Efek geraniol sebagai penambah penetrasi penghantaran obat transdermal juga menarik perhatian peneliti dan ilmuwan di bidang formulasi<sup>(5)</sup>. Aktivitas biosidalnya (bakterisidal, virisida dan fungisida) bahkan terhadap bakteri multi-resisten, juga bisa memberikan kenyamanan jiwa bagi pasien berkat aroma yang menyenangkan, serta sebagai pengawet makanan juga telah dijelaskan<sup>(6,7)</sup>. Selanjutnya, EO telah digunakan untuk melawan infeksi nosokomial, sebagai cairan pembersih untuk desinfeksi peralatan medis dan permukaan<sup>(8)</sup> atau sebagai aerosol di ruang operasi dan ruang tunggu untuk membersihkan udara untuk membatasi kontaminasi<sup>(9)</sup>.

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah eksperimental. Minyak atsiri *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle diperoleh dari

tanaman sereh wangi *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle yang ada di kebun percobaan Manoko, Lembang Bandung. Dilakukan proses destilasi, fraksinasi dan isolasi geraniol. Minyak atsiri, fraksi serta isolat yang diperoleh diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-MS); Gass Chromatography – Mass Spectroscopy (GC-MS) dan *Nuclear Magnetic Reconancy* (NMR).

**BAHAN.** Bahan yang digunakan pada tahap penelitian ini antara lain daun basah *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, aquades, silica gel, Etil Asetat, N-Hexane, plat KLT, geraniol standar diperoleh dari Shandong Nhu Pharmaceutical Co., Ltd .

**Alat Penelitian.** Peralatan yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan gelas destilasi uap-air, GC-MS merk Shimadzu GC-2010 Plus series (fase gerak : Helium; Fase diam : RT-5MS, 30 mm x 0,15 m ID x 0,25 µm), Infra merah merk FT-IR Perkin Elmer Spectrum, One, spectrometer NMR-JEOL JNM A 5000 500 Mhz (1H); dan 125 MHz (13C).

**METODE.** Minyak atsiri *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle yang diperoleh dari tanaman sereh wangi yang ada di kebun percobaan Manoko – Lembang, Bandung, diekstraksi dengan metode destilasi, proses destilasi dilakukan selama 7-8 jam. Daun tanaman sereh wangi yang digunakan sebanyak 750 kg. Dari hasil determinasi tanaman tersebut adalah tanaman sereh wangi (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle). Minyak atsiri yang dihasilkan dengan rendemen 1 % ( 7,50 L). Berbeda dengan yang dilaporkan oleh Hamzah dkk (2014), perolehan rendemen sebesar 1.69%<sup>(10)</sup>. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain desain alat yang digunakan, panas dan waktu yang digunakan untuk mencapai titik didih, dsb. Komponen senyawa kimia yang terdapat dalam minyak atsiri sereh wangi dapat dilihat pada tabel 1. Kemudian dilakukan proses fraksinasi dan isolasi dengan menggunakan kromatografi kolom. Isolat yang diperoleh diidentifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-MS), IR dan Nuclear Magnetic Reconancy (NMR).

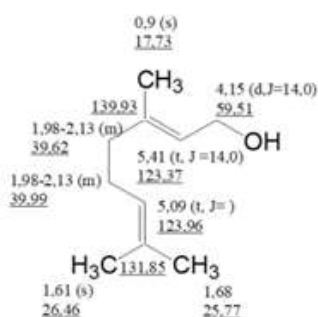
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Destilasi Minyak Atsiri Sereh Wangi.** Hasil analisis GC-MS pada Tabel 1. terlihat bahwa minyak atsiri sereh wangi *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle mengandung citronellal (35,72%), Citronelol (15,09%), geraniol (12,89%), linalool (1,2%), alpha terpineol (0,11). Hasil ini sama dengan yang pernah dilaporkan oleh wany dkk (2013) dan Riyanto dkk

**Tabel 1. Komponen minyak atsiri sereh wangi *Cymbopogon nardus* (L) Rendle.**

No	Komponen	R Time	Area	% Area	SI
1	Beta Myrcene	9,188	3421822	0,09	97
2	D Limonene	10,413	149518476	3,78	96
3	Linalool	12,548	47311656	1,2	97
4	Citronelal	15,164	1413835087	35,72	96
5	Alpha Terpeneol	16,458	4265735	0,11	97
6	Citronelol	18,568	597470174	15,09	98
7	Geraniol	19,579	510353648	12,89	93
8	Eugenol	22,146	15136864	0,38	96
9	Geranyl Acetat	22,647	118741291	3	96
10	Caryophyllene	23,480	77586083	1,96	95
11	Copaene	24,004	21591156	0,55	89
12	Germacrene	24,004	21591156	0,55	94
13	Alpha Cadinol	27,195	24411977	0,62	92

**Fraksinasi Minyak Atsiri Sereh Wangi.** Proses fraksinasi minyak sereh wangi dapat di lihat pada Gambar 1. 150 mL minyak atsiri Sereh Wangi *Cymbopogon nardus* (L) Rendle dilakukan selama 12 jam. Dengan menggunakan vakum pada tekanan 30 mmHg. Diperoleh geraniol pada fraksi 5 dengan range suhu 227 – 240 °C, rasio refluks 20 : 1, Temperatur labu 104,9 °C, Temperatur vapor 30,1 °C, Temperatur condensor 23 °C dengan rendemen 36% (54 mL). Proses fraksinasi ini berbeda dengan yang dilaporkan oleh Egi Agustian dkk, geraniol dapat



**Gambar 1. Struktur kimia geraniol berdasarkan spektra 1 H dan 13 C-NMR.**

difraksinasi pada suhu 133,7 °C, perolehan geraniol dari minyak sereh wangi (geraniol = 20.54%) pada fraksi 3, pada tekanan 30 mmHg, tekanan vacuum 60 mmHg, dengan rasio refluks 20:10 adalah 47,88%<sup>(13)</sup>. Hal ini disebabkan oleh beberapa faktor antara lain

jenis peralatan yang digunakan, metode fraksinasi yaitu tekanan, rasio refluks, T labu, T puncak yang digunakan. Perolehan hasil fraksinasi (sampel 150 mL minyak atsiri sereh wangi) dapat dilihat pada Tabel 2. Senyawa-senyawa yang terdapat pada fraksi 5 dapat di lihat pada Tabel 3.

**Tabel 2. Perolehan hasil fraksinasi (sampel 150 mL minyak atsiri sereh wangi).**

No Fraksi	Range Suhu (°c)	Volume Fraksi (mL(%))	Komponen Mayor (Td (°c), % Area)
1	156 – 180	4 (2,7)	A-Pinene (156 : 0,09) β-Myrcene (167 : 1,25) D-Limonene (177 : 39,28) D-Limonen (177 : 16,68) Linalool (198 – 200 : 1,84) Citronelal (205 : 77,77)
2	180 – 200	4 (2,7)	Linalool (198 – 200 : 1,06) Citronelol ( 225 : 23,24) Terpineol (218-219 : 1,17) Citronelol (225 : 26,68)
3	200 – 220	68 (45,33)	Geraniol (230 : 0,06)
4	220 – 227	4 (2,7)	β-Elementene (0,2) Spathulenol (0,2)
5	227 – 240	54 (36)	
6	240 – 300	2 (1,33)	
	Residu	25 (16,67)	

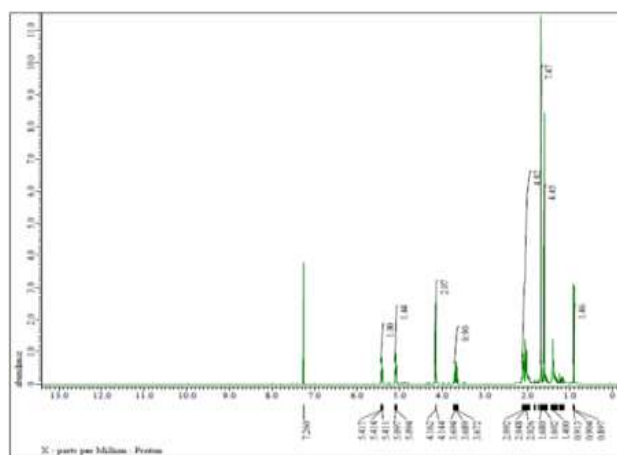
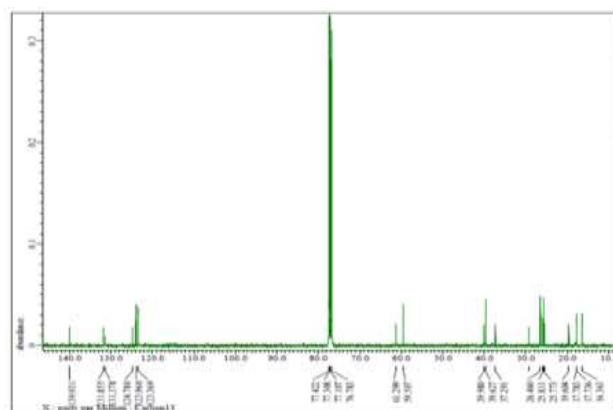
Tabel 3. Komponen fraksi 5.

No	Komponen	R Time	Area	% Area	SI
1	Beta-Myrcene	7,341	7988576	0,04	95
2	Citronellal	8,670	5706828	0,03	96
3	D-Limonene	8,999	97560553	0,46	96
4	Beta-Myrcene	9,487	29390062	0,14	97
5	Geraniol	9,755	11947526	0,06	89
5	D-Limonene	10,718	200018952	0,94	96
6	DL-Isopulegol	16,910	783730039	3,67	94

**Isolasi Geraniol dari Fraksi 5.** Untuk mendapatkan geraniol maka dilakukan isolasi dari fraksi 5 (45 mL) dengan menggunakan metode kromatografi kolom<sup>(14)</sup>. Eluen yang digunakan adalah N-Hexane : Etil Asetat (10 : 1). Hasil proses isolasi diperoleh fraksi 40 sampai dengan fraksi 65 memiliki spot yang sama dengan spot geraniol standar ( $R_f = 0.35$ ). Fraksi 40 sampai dengan fraksi 65 digabung lalu digunakan sebagai sampel untuk proses identifikasi dengan NMR. Diperoleh rendemen isolat geraniol sebanyak 0,02 % yaitu 1,042 g dari 50 mL fraksi 5. Berbeda dengan yang dilakukan oleh Daniel dkk (2015) yang telah berhasil memisahkan geraniol dari sitronelol melalui pengoksidaan geraniol menjadi geranial. Oksidasi selektif (hidrogen peroksida yang diaktifkan oleh platinum hitam) dari geraniol (dalam rhodinol) menjadi geranial. Hasil yang diperoleh adalah 81% geranial. Pemurnian menggunakan distilasi fraksional dilakukan untuk mendapatkan geraniol murni dan menghilangkan fraksi minor sitronelal<sup>(15)</sup>. Demikian juga isolasi geraniol yang dilakukan oleh Siwi dkk<sup>(13)</sup>.

**Analisis Resonansi Magnetik Inti (RMI Proton dan Karbon) untuk Isolat Murni.** Hasil analisis spektrum RMI Proton untuk isolat murni menunjukkan bahwa pergeseran kimia untuk metil ( $-CH_3$ ) terdapat pada  $\delta H$  1,62 (s,  $CH_3$  H-10); 1,68 (s, 2 x  $CH_3$ ; H-8, H-9); gugus metilen ( $CH_2$ ) terdapat pada  $\delta H$  1,98 ~ 2,13 (m; 2,13 Hz; H-4, H-9);  $\delta H$  4,15 ppm (t,  $J = 6$  Hz; H-6), 5,41 (t,  $J = 14$  Hz, H-2; 4,15 (d,  $J = 14$ ; H-1). Pergeseran kimia senyawa isolat dapat di lihat pada Tabel 4. Spektrum RMI Proton dapat dilihat pada Gambar 2. Hasil analisis RMI karbon menunjukkan bahwa terdapat 10 signal karbon yang terdiri dari 3 karbon untuk  $-CH_3$  ( $\delta C$  17,73; 25,77; 26,46), 3 karbon untuk  $-CH_2$  ( $\delta C$  39,62; 39,99; 59,51), 4 karbon untuk alkena ( $\delta C$  123,37; 139,93; 131,85; 123,96). Spektrum RMI karbon dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 3. Hasil analisis spektra infra merah (IR) menunjukkan adanya gugus hidroksil pada

bilangan gelombang  $3450\text{ cm}^{-1}$ ; alkena/alkane pada bilangan gelombang  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Data spektra MS (LC-MS) memberikan  $m/z$  154 untuk rumus molekul  $C_{10}H_{18}O$ . Berdasarkan perbandingan pergeseran kimia RMI proton dan karbon antara senyawa isolat dengan senyawa geraniol pada literatur, maka struktur kimia untuk isolate fraksi dapat ditetapkan sebagai geraniol (Gambar 1).

Gambar 2. Spektra 1H-NMR isolat Fraksi 5 minyak atsiri *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle.Gambar 3. Spektra 13C-NMR isolat Fraksi 5 minyak atsiri *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle

**Tabel 4. Pergeseran kimia untuk senyawa isolat fraksi 5.**

No	$\Delta H$ Isolat	Literatur(16)	$\Delta C$ Isolat	Literatur(16)
1	4,15 (D,J= 14, 0)	4,15 ~ 4,16 (2H, D)	59,51	59,3
2	5,41 (T,J = 14,0)	5,40 – 5,43 (1H, M)	123,37	123,3
3	-	-	139,93	139,7
4	1,98-2,13 (M)	2,09 ~ 2,11 (2H, D)	39,62	39,5
5	1,98-2,13 (M)	2,02 ~ 2,03 (2H, D)	39,92	39,5
6	5,09 (T, J= 6,0)	5,10 (1H, M)	123,96	123,9
7	-	-	131,85	131,7
8	1,68 (S)	1,61 (3H, S)	26,46	26,4
9	1,68	1,68 ~ 1,69 (3H, T)	25,77	25,6
10	0,9 (S)	1,40 (3H, T)	17,73	17,6

### SIMPULAN

Senyawa geraniol dari tanaman *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (12.89 %) dapat diperoleh dengan menggunakan metode destilasi, fraksinasi dan isolasi dengan kromatografi kolom. Berdasarkan perbandingan pergeseran kimia RMI proton dan karbon antara senyawa isolat fraksi 5 dengan senyawa geraniol pada literatur mempunyai kemiripan yang sama. Sehingga senyawa isolat fraksi 5 adalah geraniol.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. <http://www.kemendag.go.id/id/economic-profile/indonesia-export-import/growth-of-non-oil-and-gas-export-commodity>. Diakses tanggal 2 Februari 2019
- Ganjewala D, 2009, *Cymbopogon* essential oils, Chemical compositions and bioactivities. *Int J Essent Oil Ther.* 56–65.
- De Toledo LG, Dos Santos Ramos MA, Spósito L, Castilho EM, Pavan FR, De Oliveira Lopes É, et al, 2016, Essential oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A strategy to combat fungal infections caused by *Candida* species. *Int J Mol Sci.*;17(8).
- Chen W, Viljoen AM, 2010, Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. *South African J Bot [Internet].* 76(4):643–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Chen W, Viljoen AM, 2010, Geraniol - A review of a commercially important fragrance material. *South African J Bot [Internet].*;76(4):643–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2010.05.008>
- Singh BR, Agrawal R, Bhardwaj M, Dubey S, 2015, *Clinical & Medical Biochemistry : Open Access Antimicrobial Activity of Citronella Essential Oil on Antimicrobial Drug Resistant Bacteria from Veterinary Clinical Cases*, 1(1):1–9.
- Oliveira MMM de, Brugnera DF, Cardoso M das G, Alves E, Piccoli RH, 2010, Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control.*;21(4):549–53.
- Warnke PH, Becker ST, Podschun R, Sivananthan S, Springer IN, Russo PAJ, et al, 2009, The battle against multi-resistant strains: Renaissance of antimicrobial essential oils as a promising force to fight hospital-acquired infections, *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 37(7):392–7.
- Baser, K.H.C. GB, 2010, *Handbook Of Essential Oils, Science, Technology And Applications*, United States Of America: CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Hamzah MH, Che Man H, Abidin ZZ, Jamaludin H, 2014, Comparison of citronella oil extraction methods from *Cymbopogon nardus* grass by ohmic-heated hydro-distillation, hydro-distillation, and steam distillation, *BioResources*, 9(1):256–72.
- Pattusamy V, Nandini N, Vijay M, Bhemappa K, 2013, Chemical Analysis and Therapeutic Uses of Citronella Oil from *Cymbopogon Winterianus* : A Short Review, *Int J Adv Res.* 1(2320):77–82.
- Riyanto R, Untari DT, Cahyandaru N. Isolation and Application of the Lemongrass Essential Oil of *Cymbopogon Nardus* L.as a Growth Inhibitor of Lichens on Stone Cultural Heritage. *IOSR J Appl Chem [Internet].* 2016;09(09):109–17. Available from: <http://iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol9-issue9/Version-2/S090902109117.pdf>
- Siwi I R, Rusli M S AE, 2013, Pemisahan fraksi kaya sitronelal, sitronelol, dan geraniol minyak sereh wangi menggunakan distilasi fraksinasi vakum imastia rahma siwi, *TeknoL Dep Pertanian, Ind Pertanian, Fak TeknoL.*
- Grice ID, Rogers KL, Griffiths LR, 2011, Isolation of bioactive compounds that relate to the anti-platelet activity of *Cymbopogon ambiguus*, *Evidence-based Complement, Altern Med.*

15. Chong DJW, Latip JB, Hasbullah SAB, Sastrohamidjojo H, 2015, Separation of geraniol from citronellol by selective oxidation of geraniol to geranial, *Sains Malaysiana*, 44(8):1183–8.
16. Jeon JH, Lee CH, Lee HS, 2009, Food Protective Effect of Geraniol and Its Congeners against Stored Food Mites, 72(7):1468–71.

# Optimasi Formula Lipid Nanostruktur dengan Pentarget Manosa sebagai Sistem Penghantaran Rifampisin (Formula Optimization of NLC with D-Mannose Targeting for Rifampicin Delivery System)

TRI SUCIATI<sup>1\*</sup>, NURANI ISTIQOMAH<sup>1</sup>, BENNY PERMANA<sup>1</sup>, ELIN JULIANTI<sup>1</sup>,  
TITAH YUDISTIRA<sup>2</sup>, MARLIA SINGGIH WIBOWO<sup>1</sup>, YANI TRIYANI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesha No. 10, Bandung 40132, Indonesia

<sup>2</sup>Sistem Industri dan Tekno-ekonomi, Fakultas Teknik Industri, Institut Teknologi Bandung

<sup>3</sup>Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Bandung, Jl. Tamansari No. 2, Bandung 40116, Indonesia

\*Penulis korespondensi, Hp : 081395075530

e-mail: cicik.tsuciati@gmail.com

Diterima 19 Oktober 2018, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Akumulasi terbatas obat antituberkulosis di dalam makrofag menjadi penghalang keberhasilan terapi tuberculosis laten. Tujuan penelitian ini adalah mengembangkan formula nanopartikel termodifikasi D-manosa sebagai agen pentarget reseptor manosa untuk meningkatkan internalisasi rifampisin ke dalam makrofag. D-manosa dikonjugasi dengan kitosan menggunakan agen pereduksi amin. Konjugat kitosan-D-manosa dikarakterisasi menggunakan FTIR. Selanjutnya, konjugat diadsorpsikan pada partikel lipid nanostruktur (Nanostructured Lipid Carrier, NLC) secara elektrostatis. Formula NLC terdiri dari larutan lemak padat-cair dan rifampisin dalam etil asetat dan larutan konjugat kitosan-D-manosa yang dibuat dengan tehnik emulsifikasi menggunakan emulgator polisorbit 80. Solidifikasi nanopartikel NLC-kitosan-manosa dilakukan dengan metode gelasi ionotropik dan penguapan pelarut. Formula nanopartikel dioptimasi menggunakan metode statistik Box-Behnken. Keberhasilan pembentukan konjugat kitosan-D-manosa dikonfirmasi dari perubahan bilangan gelombang pita amida dan pembentukan basa Schiff pada spektra FTIR. Formula optimum nanopartikel memiliki diameter  $766,1 \pm 57,56$  nm dengan indeks polidispersitas  $0,32 \pm 0,02$ , efisiensi enkapsulasi  $91,54 \pm 0,18\%$  dan *drug loading*  $36,62 \pm 0,07\%$ . Profil pelepasan rifampisin dari nanopartikel hampir mirip pada pH 5,2 maupun 7,4. Formula NLC termodifikasi manosa ini berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai pentarget antibiotik intraselular pada makrofag.

**Kata kunci:** NLC, rifampisin, D-manosa.

**Abstract:** Limited accumulation of anti-tuberculosis drugs in macrophages become a barrier to the success of latent tuberculosis therapy. The purpose of this study is to develop a D-mannose modified nanoparticle formula as a targeting agent to the mannose receptors to increase the internalization of rifampicin into macrophages. D-mannose was conjugated with chitosan using an amine reducing agent. Chitosan-D-mannose conjugate was characterized using FTIR. Subsequently, the conjugate was adsorbed onto the nanostructured lipid carrier (NLC) electrostatically. The NLC formula consisted of an ethyl acetate solution of solid-liquid lipid blend and rifampicin and an aqueous solution of chitosan-D-mannose conjugate, which were emulsified using polysorbate 80. Solidification of the NLC-chitosan-mannose nanoparticles was carried out by ionotropic gelation and solvent evaporation. The nanoparticle formula was optimized using Box-Behnken design. The formation of chitosan-D-mannose conjugate was shown by the change of the amide band wave number and the Schiff base formation of the FTIR spectra. The optimum formula of nanoparticles had a diameter of  $766.1 \pm 57.56$  nm with a polydispersity index of  $0.32 \pm 0.02$ , encapsulation efficiency of  $91.54 \pm 0.18\%$  and drug loading of  $36.62 \pm 0.07\%$ . Rifampicin was released from the nanoparticles at pH 5.2 or 7.4 with a similar rate. This D-mannose modified NLC formula has the potential to be further developed as an intracellular antibiotic targeting to macrophages.

**Keywords:** NLC, rifampicin, D-mannose.

## PENDAHULUAN

TUBERCULOSIS (TB) terus menjadi penyebab umum kematian di seluruh dunia. Diperkirakan sekitar 10,4 juta kasus baru TB, dan 1,4 juta kematian akibat TB telah terjadi di seluruh dunia pada 2015<sup>(1)</sup>. Penyakit tuberkulosis disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Mtb memiliki beberapa strategi agar bisa masuk dan bertahan di dalam sel fagosit mononuklear dengan lebih lama. Salah satu caranya yaitu dengan melibatkan suatu reseptor fagosit untuk memulai jalur sinyal spesifik dan memodulasi beberapa proses imunobiologi selama dan setelah proses fagositosis.

Mtb latent memiliki senyawa lipoglikan yang mengandung manosa pada dinding selnya yaitu: mannose-capped lipoarabinomannan (ManLAM), yang secara langsung terlibat dalam regulasi proses ini. Keberadaan ManLAM pada permukaan Mtb membuat molekul ini berada pada posisi yang ideal untuk memediasi interaksi awal antara Mtb dan makrofag. Mtb berada pada fagosom yang tidak berkembang menjadi fagolisosom<sup>(2)</sup>. ManLAM pada permukaan Mtb mampu menekan produksi oksida nitrat, oksigen radikal, *inflammatory cytokin*, dan menghambat apoptosis Mtb<sup>(3)</sup>. Hal inilah yang menjadi aspek kritis dalam patogenesis tuberkulosis.

Terdapat beberapa jenis obat anti tuberkulosis yang biasanya diberikan secara kombinasi, salah satunya adalah rifampisin. Rifampisin adalah obat antituberkulosis yang diklasifikasikan sebagai *biopharmaceutical classification system* (BCS) kelas 2<sup>(5)</sup>. Pada penelitian ini, dikembangkan sistem penghantaran obat rifampisin dalam bentuk NLC (*nanostructure lipid carrier*) dengan permukaan yang telah dimodifikasi dengan penambahan agen pentarget berupa D-manosa. D-manosa merupakan monosakarida yang berupa isomer dari glukosa yang dihipotesakan memiliki kemiripan struktur dengan caps manosa pada dinding Mtb.

D-manosa memiliki polaritas yang berbeda dengan rifampisin yang bersifat hidrofobik. Oleh karenanya D-manosa dikonjugasikan dengan kitosan yang kemudian ditambahkan pada rifampisin yang berada dalam sistem NLC. NLC merupakan generasi kedua dari teknologi lipid nanopartikel setelah SLN (*Solid Lipid Nanoparticle*). Perbedaan NLC dan SLN dapat dilihat dari komposisi matriks padat. Berbeda dengan SLN yang hanya terdiri dari lipid padat, fase lipid dalam NLC mengandung lipid padat dan cair pada suhu ruang<sup>(6)</sup>. SLN dan NLC dikembangkan untuk mengatasi keterbatasan pembawa koloid lainnya, seperti emulsi, liposom dan nanopartikel polimer, karena memiliki profil pelepasan yang baik

dan penghantaran obat tertarget dengan stabilitas fisik yang prima. Namun NLC dapat memberikan stabilitas dan kapasitas pemuatan atau loading obat yang lebih baik dibandingkan dengan SLN<sup>(7)</sup>.

Proses pencarian formula optimum untuk menentukan jenis dan perbandingan komponen formulasi pada umumnya memakan waktu dan biaya yang tidak sedikit karena banyaknya parameter yang harus diteliti. *Design of Experiments* (DOE) adalah salah satu metode yang dapat digunakan untuk meminimalisasi jumlah eksperimen dan mengidentifikasi efek variabel dan interaksi yang dominan<sup>(8)</sup>. Desain skrining seperti *Full Factorial Design* dapat dipilih untuk menentukan parameter yang paling penting diantara sejumlah variabel independen dengan jumlah percobaan yang terbatas, sedangkan respon permukaan seperti *Box-behnken design* dapat digunakan untuk menentukan daerah optimum dari respon yang sedang diamati. Metode tersebut dapat menghasilkan model matematika spesifik yang menyajikan informasi tentang bagaimana respon dipengaruhi oleh beberapa variabel, yang memberikan prediksi level optimum dari variabel faktor yang dibutuhkan untuk memberikan respon terbaik.

Pada penelitian ini dilakukan optimasi untuk mencari formula optimum NLC pada respon ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi, dan *drug loading* dengan menggunakan desain eksperimen, beserta evaluasinya. Formula nanopartikel ini diharapkan menjadi sediaan obat antituberkulosis yang ampuh secara farmakologi karena dapat mentarget langsung, menjanjikan secara industri karena efisiensi enkapsulasi obat pada proses pembuatan tinggi, dan nyaman digunakan oleh pasien karena loading obat yang tinggi sehingga dapat memudahkan pengaturan regimen dosis. Semua itu diharapkan berujung pada peningkatan kualitas terapi untuk pasien terutama pasien tuberkulosis laten.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Rifampisin, asam oleat, stearil alkohol, polisorbitat 80, natrium triasetoksiborohidrida, kitosan, STPP, D-manosa, etil asetat, tetrahidrofuran, asam asetat, natrium hidroksida, metanol, etanol, aquades, aquadeion dan bahan kimia lain yang terdapat pada laboratorium.

**Alat.** IKA® T-25 ULTRA-TURRAX digital, Thermolyne Plate Magnetic Stirrer (Nuova), sonikator probe (Branson, Model 5510), spektrofotometer UV-Visibel (Becman DU 7500i), freeze dryer (Telstar LyoQuest), spray dryer (EYELA), spektrofotometri infra merah (Jasco FT-IT-4200), Photon Correlation Spectroscopy (DelsaTM Nano C Particle Analyzer, Becman Coulter), alat timbang (Mettler Toledo),

sentrifuga (Hettich EBA 85), lemari pendingin, dan peralatan lain yang umum digunakan di laboratorium.

#### METODE. Konjugasi Kitosan dan D-manosa.

Dilakukan dengan bantuan agen pereduksi amin yaitu natrium triasetoksiborohidrida. Kitosan dicampurkan dengan natrium triasetoksiborohidrida dalam pelarut tetrahidrofuran, lalu distirer selama 1 jam dalam keadaan tertutup rapat. Kemudian ditambahkan D-manosa dalam aquadeion pH 4 lalu distirer kembali selama 24 jam<sup>(9)</sup>. Konjugat yang dihasilkan dikarakterisasi dengan spektrofotometri FTIR dan dibandingkan dengan spektra kitosan dan D-manosa.

**Pembuatan NLC Metode Emulsifikasi dengan Pelarutan.** Lipid padat (stearil alkohol) dicampurkan dengan lipid cair (asam oleat) dan rifampisin. Digunakan etil asetat untuk melarutkan lipid dan rifampisin. Sebagai fasa air, dicampurkan konjugat kitosan-manosa dan polisorbate 80 serta aquadeion. Fasa air dan fasa minyak dicampurkan dengan ultraturax dan dilakukan sonikasi untuk mengecilkan ukuran partikel. Setelah itu sediaan ditetesi dengan larutan STPP sambil distirer selama 30 menit. Evaluasi sediaan yang dilakukan meliputi penentuan ukuran partikel, efisiensi enkapsulasi, dan *drug loading*.

#### Penentuan Formula Optimum NLC Rifampisin.

Dilakukan dengan metode desain eksperimen (*design of experiment*, DOE) yang terdiri dari 2 tahap yaitu: (1) *fractional factorial design* untuk menentukan komponen formula dan dilanjutkan (2) optimasi komponen formulasi menggunakan desain Box-behnken. Pada tahap 1 dipilih 5 faktor yaitu rifampisin, jumlah lipid (stearil alkohol dan asam oleat 1:1), polisorbate 80 sebagai surfaktan, konjugat kitosan-manosa dan STPP. Sedangkan untuk respon uji yang diteliti adalah ukuran partikel (Y1), efisiensi enkapsulasi (Y2), dan loading obat (Y3). Tahap kedua dengan desain Box-Behnken dipilih 3 faktor yang signifikan pada tahap 1 dengan 3 level konsentrasi dalam 15 formula. Didapat persamaan matematika serta plot kontur dan permukaan dari masing-masing respon. Dilakukan analisis statistika untuk mencari formula yang optimum.

Setelah didapat formula optimum, dilakukan evaluasi sediaan yang meliputi penentuan ukuran partikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta menggunakan alat *particle size analyzer*. Selain itu juga dihitung efisiensi enkapsulasi (EE) dan *drug loading* (DL) dari sediaan. Penentuan EE dan LO dilakukan dengan metode sentrifuga 13000 rpm selama 3x15 menit dan perhitungan secara tidak langsung dengan mengukur kadar rifampisin yang tidak terjerat yaitu dalam supernatan. Konsentrasi rifampisin diukur menggunakan spektrofotometer sinar tampak pada panjang gelombang 475 nm.

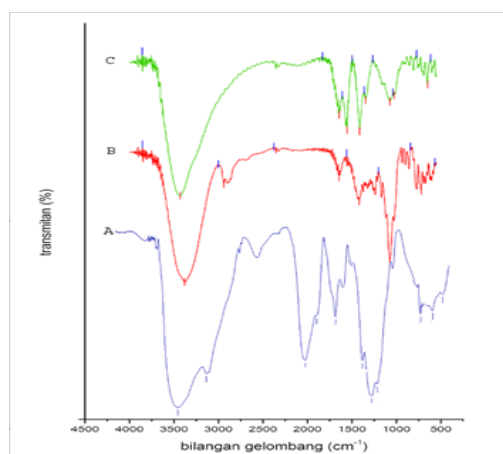
$$EE (\%) = \frac{\text{jumlah rifampisin awal} - \text{rifampisin tidak terjerat}}{\text{jumlah rifampisin awal}} \times 100\%$$

$$DL (\%) = \frac{\text{jumlah rifampisin awal} - \text{rifampisin tidak terjerat}}{\text{jumlah padatan dalam sediaan}} \times 100\%$$

Pelepasan obat ditentukan dengan metode disolusi termodifikasi. Medium yang digunakan adalah dapar fosfat (PBS) pH 7,4 dan pH 5,2 dengan penambahan 500 µg/mL asam askorbat sebagai antioksidan untuk mencegah proses degradasi rifampisin. Kantung dialisis diisi dengan sediaan yang jumlah rifampisannya diketahui, kemudian ditempatkan dalam 200 mL PBS pH 7,4 atau pH 5,2 dengan suhu 37 °C dan agitasi sedang. Setiap 3 mL *aliquot* diambil pada waktu tertentu dan kemudian diganti dengan 3 mL medium baru. Konsentrasi rifampisin kemudian diukur menggunakan spektrofotometer.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Konjugasi Kitosan-Manosa.** Spektra FTIR konjugat kitosan-D-manosa menunjukkan adanya puncak pada 3426,84 cm<sup>-1</sup> yang menandakan adanya gugus N-H. Pada bilangan gelombang 1556,11 cm<sup>-1</sup> muncul puncak yang menandakan bahwa amin sekunder telah terbentuk yang mengindikasikan proses konjugasi telah terjadi. Pada bilangan gelombang 1643,97 cm<sup>-1</sup> masih terdapat puncak yang menandakan bahwa masih terdapat amin primer yang belum berubah menjadi amin sekunder. Selain itu, terdapat puncak pada bilangan gelombang 1415,80 cm<sup>-1</sup> yang menandakan terbentuknya ikatan C=N yang mengindikasikan pembentukan basa Schiff (R-CH=N-R). Hal ini telah dilaporkan peneliti sebelumnya bahwa pembentukan basa Schiff (R-CH=N-R) ditunjukkan dengan adanya N-H bending dari amin sekunder pada 1558.54 cm<sup>-1</sup> dan C=N stretch pada 1410.01 cm<sup>-1(10)</sup>. Spektrum inframerah konjugasi kitosan-manosa diperlihatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektrum infra merah dari (A) kitosan, (B) D-manosa, (C) konjugat kitosan-manosa



**Hasil Desain Eksperimen.** Hasil percobaan tahap pertama *fractional factorial design* dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil percobaan menunjukkan bahwa 3 dari 8 formula tidak dapat dilakukan evaluasi karena proses emulsifikasi sediaan gagal. Hal ini dapat disebabkan karena kombinasi level konsentrasi tinggi dan rendah ekstrim yang bertemu dalam satu seri formula yang menyebabkan emulsi tidak terbentuk. Contohnya pada sediaan nomor 2 dimana jumlah rifampisin dan lipid tinggi bertemu dengan Polisorbat rendah dan konjugat tinggi. Dengan kombinasi ini surfaktan tidak

mampu menstabilkan emulsi fasa air dan minyak yang keduanya dalam konsentrasi tinggi sehingga emulsi memisah dan rifampisin tidak terjerat dalam NLC. Hal tersebut menunjukkan bahwa kelima faktor tidak saling independen dan mempengaruhi satu sama lain. Berdasarkan hasil tersebut, dikembangkan desain respon permukaan yaitu Box-behnken design dengan mereduksi faktor, mengurangi rentang level tinggi dan rendah dari faktor, serta memastikan faktor yang dipilih adalah faktor yang paling signifikan.

**Tabel 1. Hasil Respon Eksperimen *Fractional Factorial Design*.**

Formula	Faktor					Respon		
	Rifampisin (%)	Lipid (%)	Polisorbat 80 (%)	Konjugat (%)	STPP (%)	Ukuran (nm)	EE (%)	DL (%)
1	1,00	0,50	3,00	0,25	0,04	T	T	T
2	1,00	1,00	3,00	0,75	0,04	T	T	T
3	0,75	0,50	6,00	0,75	0,04	800,10	36,91	13,84
4	0,75	1,00	3,00	0,25	0,12	T	T	T
5	0,75	0,50	3,00	0,75	0,12	441,40	46,34	17,38
6	0,75	1,00	6,00	0,25	0,04	415,30	43,38	16,27
7	1,00	0,50	6,00	0,25	0,12	856,10	80,52	29,28
8	1,00	1,00	6,00	0,75	0,12	396,70	29,96	10,90

Keterangan :

\*T = Tidak dapat diukur.

Pertimbangan faktor yang dipilih beserta level konsentrasinya dilakukan berdasarkan percobaan yang telah dilakukan sebelumnya. Dipilih tiga faktor yaitu jumlah lipid, Polisorbat 80, dan konjugat kitosan-manosa. Sedangkan untuk rifampisin (4:3 terhadap lipid) dan STPP (6,25:1 terhadap konjugat kitosan-

manosa) dibuat tetap. Respon uji yang dipilih adalah ukuran partikel (Y1), efisiensi enkapsulasi (Y2), dan loading obat (Y3) dalam sediaan. Pada desain ini terdapat 3 tingkat konsentrasi dengan 15 percobaan yang dirancang oleh perangkat lunak Minitab 17®. Hasil percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil Respon Eksperimen *Box-behnken Design*.**

No.	Faktor			Respon eksperimen		
	Lipid (%)	Polisorbat 80 (%)	Konjugat (%)	Ukuran (nm)	EE (%)	DL (%)
1	0,75	5,00	0,75	806,80	91,69	36,67
2	1,00	6,00	0,75	401,00	89,91	38,91
3	0,75	4,00	0,50	754,70	91,88	40,83
4	0,75	5,00	0,75	605,10	91,33	36,53
5	0,50	4,00	0,75	1262,60	89,49	31,23
6	1,00	5,00	1,00	663,10	93,13	37,31
7	1,00	5,00	0,50	1023,60	93,54	44,05
8	0,75	6,00	0,50	937,60	90,39	40,17
9	0,75	6,00	1,00	648,20	89,98	32,75
10	0,75	4,00	1,00	939,60	92,95	33,83
11	0,50	5,00	0,50	755,60	87,26	35,00
12	0,50	6,00	0,75	844,80	84,24	29,40
13	0,75	5,00	0,75	725,40	91,59	36,64
14	0,50	5,00	1,00	736,80	85,24	26,35
15	1,00	4,00	0,75	891,80	93,95	40,66

Analisis statistik juga dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Minitab® 17. Prosedur regresi permukaan respon dipilih untuk menemukan koefisien dan untuk memplot kontur dan respon permukaan.

Analisis kontur dan plot permukaan yang diperoleh digunakan untuk optimasi dan penentuan koefisien interaksi antar berbagai factor<sup>(12)</sup>. Ekspresi matematis dari desain eksperimental diwakili dalam persamaan polinomial.

$$Y = \alpha_0 + \alpha_A X_A + \alpha_B X_B + \alpha_C X_C + \alpha_{A^2} X_A^2 + \alpha_{B^2} X_B^2 + \alpha_{C^2} X_C^2 + \alpha_{AB} X_A X_B + \alpha_{AC} X_A X_C + \alpha_{BC} X_B X_C \quad (1)$$

Keterangan:

$X_A$  adalah jumlah lipid (%),  $X_B$  adalah jumlah Polisorbat 80 (%), dan  $X_C$  adalah jumlah konjugat (%).

Dalam persamaan polinomial ini, parameter positif menunjukkan efek sinergis, yang mana output naik dengan kenaikan variabel input. Sebaliknya, tanda negatif menunjukkan efek antagonis dimana output turun dengan elevasi pada variabel input<sup>(13)</sup>.

Plot kontur (*contour plots*) dan plot respons permukaan (*response surface plots*) adalah diagram yang menggambarkan nilai respon. Plot ini berguna

untuk memproyeksikan besarnya efek untuk setiap variabel dan interaksi, juga dapat menjelaskan hubungan antara variabel independen dan respon dependen. Model yang dikurangi digunakan untuk merencanakan plot kontur dua dimensi dan plot permukaan respons tiga dimensi menggunakan perangkat lunak. Metode *response surface* memberikan kecenderungan matematis yang dapat menemukan tingkat optimum dari faktor-faktor yang diperlukan untuk respon yang dihasilkan<sup>(14)</sup>.

Desain uji Box-Behnken menghasilkan model matematika untuk respon  $Y_1$  (ukuran partikel, nm) sebagai berikut:

$$Y_1 = 1718 - 268 X_A - 531 X_B + 2527 X_C + 899 X_A^2 + 81 X_B^2 + 419 X_C^2 - 73 X_A X_B - 1367 X_A X_C - 474 X_B X_C \quad (2)$$

Berdasarkan uji ANOVA dengan ( $\alpha < 0,05$ ), pada respon ukuran partikel tidak terdapat faktor yang signifikan ( $P \text{ value} > 0,05$ ). Perlu konfirmasi atau eksperimen kembali untuk meyakinkan apakah tidak adanya faktor signifikan tersebut disebabkan oleh kesalahan percobaan atau memang tidak ada faktor yang signifikan untuk respon ukuran partikel diperlihatkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil ANOVA pada Eksperimen Box-behnken Design.

Faktor	Respon eksperimen					
	Ukuran partikel (nm)		Efisiensi enkapsulasi (%)		Loading obat (%)	
	Nilai F	Nilai P	Nilai F	Nilai P	Nilai F	Nilai P
$X_A$	1,01	0,360	59,39	0,001*	1369,7	0,000*
$X_B$	2,72	0,160	18,96	0,007*	25,54	0,004*
$X_C$	0,62	0,468	0,32	0,597	802,8	0,000*
$X_A^2$	0,25	0,641	9,85	0,026*	51,74	0,001*
$X_B^2$	0,52	0,505	0,30	0,610	0,81	0,410
$X_C^2$	0,05	0,827	0,02	0,899	5,50	0,066
$X_{AB}$	0,03	0,874	0,29	0,612	0,01	0,916
$X_{AC}$	0,62	0,468	0,52	0,504	6,63	0,050*
$X_{BC}$	1,19	0,326	0,44	0,535	0,32	0,596

Keterangan :

\*faktor signifikan ( $\alpha < 0,05$ ).

Respon ukuran partikel merupakan respon yang sangat dipengaruhi oleh formulasi. Dapat dilihat dari grafik plot interaksi (Gambar 2A) bahwa adanya konjugat mempengaruhi ukuran partikel karena berinteraksi dengan lipid maupun polisorbat 80, digambarkan dengan bentuk grafik yang berpotongan untuk grafik lipid-konjugat dan polisorbat 80-konjugat. Selain itu, berdasarkan empiris waktu tunggu antara proses pengerjaan dengan proses pengukuran ukuran partikel juga mempengaruhi hasil ukuran sehingga

harus dikontrol dengan baik.

Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam grafik *main effects* (Gambar 2B), dapat dilihat ketiga grafik memiliki tren cenderung menurun, yang artinya semakin tinggi konsentrasi ketiga faktor maka semakin kecil ukuran partikel. Namun grafik tersebut belum menggambarkan nilai maksimum ukuran partikel yang terkecil karena kurva seharusnya membentuk lembah. Rentang level low dan high perlu diperluas agar mendapat daerah optimum. Akan tetapi

karena pada respon ukuran partikel yang diperlukan adalah rentang ukuran partikel 0,2–1 µm, maka daerah tersebut sudah didapatkan.

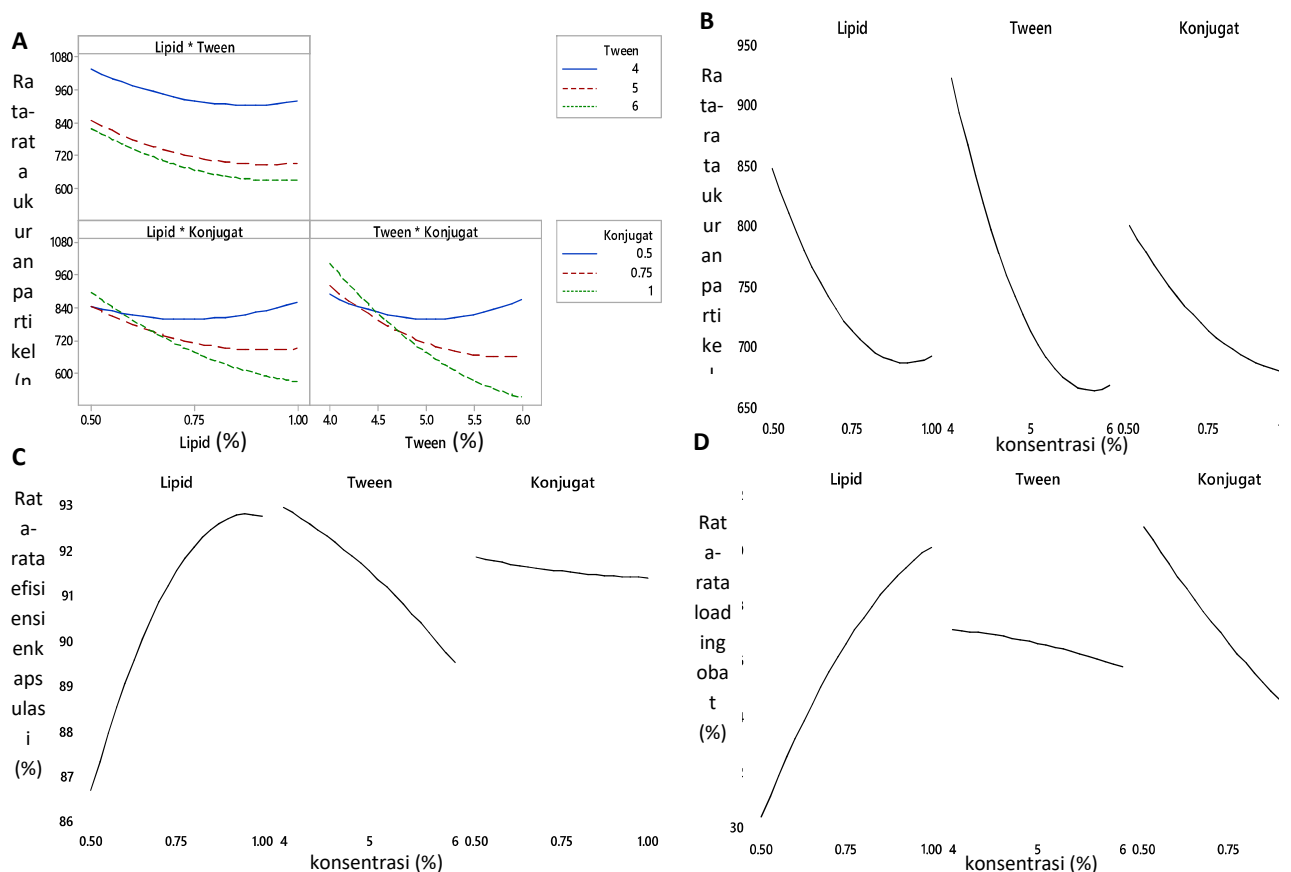
Model matematika yang didapat dari percobaan untuk Y2 (Efisiensi enkapsulasi, %) diberikan dalam Persamaan 3 dengan  $r^2 = 0,9474$ .

$$Y2 = 70,7 + 45,0 XA + 1,65 XB - 0,1 XC - 29,15 X2A - 0,315 X2B + 1,24 X2C + 1,21 XAB + 6,41 XAC - 1,48 XBC \quad (3)$$

Pada respon efisiensi enkapsulasi, didapat 3 faktor yang signifikan berdasarkan uji ANOVA. Faktor-faktor tersebut yaitu lipid (0,001), polisorbitat 80 (0,007), dan interaksi antara lipid-lipid (0,026). Untuk meningkatkan validitas persamaan, maka faktor lain yang tidak signifikan dapat dihapus menyisakan

variabel yang signifikan saja.

Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam plot *main effects* (Gambar 2C), dapat dilihat untuk faktor lipid, grafik menaik drastis menandakan lipid sangat signifikan untuk mempengaruhi efisiensi enkapsulasi. Akan tetapi grafik ini belum mencapai puncaknya, yang mungkin dapat ditemui apabila rentang diperlebar. Untuk faktor polisorbitat 80, grafik terlihat menurun sehingga jumlah nilai enkapsulasi bisa optimum bila polisorbitat 80 berada pada rentang bawah. Namun hal ini tidak mutlak karena jumlah polisorbitat 80 juga mempengaruhi terbentuknya emulsi, perlu diperhatikan dengan faktor-faktor lainnya. Untuk faktor konjugat, grafik cenderung mendatar yang juga belum terlihat puncak optimumnya. Terlihat bahwa konjugat tidak terlalu berpengaruh terhadap respon efisiensi enkapsulasi.



Gambar 2. Plot interaksi yang terjadi pada (A) respon ukuran partikel dan plot efek utama untuk (B) respon ukuran partikel, (C) efisiensi enkapsulasi, (D) loading Rifampisin.

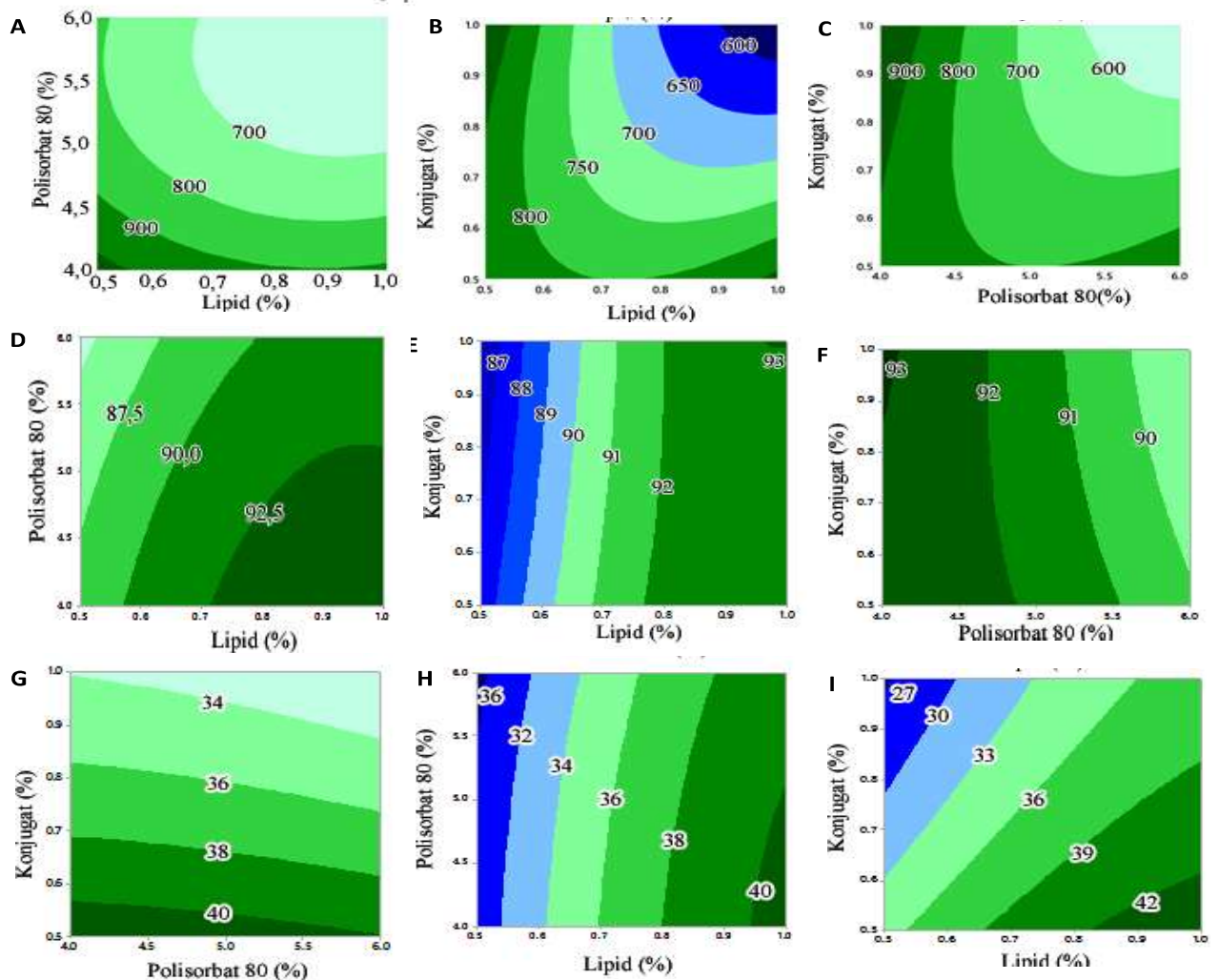
Pengaruh tiap level terhadap respon efisiensi enkapsulasi digambarkan dalam plot kontur dan permukaan (Gambar 3 D, E, F), yang dapat dengan jelas dilihat daerah dari masing-masing nilai respon. Kontur yang baik adalah yang berhasil menggambarkan daerah puncak, seperti terlihat pada respon ukuran partikel yang telah mencapai daerah optimum (Gambar 3 A, B, C). Kontur yang didapat kali ini belum bisa mencapai daerah puncak yang disebabkan oleh rentang level yang terlalu sempit. Model matematika yang didapat dari percobaan untuk Y3 (*Drug Loading*, nm) adalah sebagai berikut.

$$Y3 = 26,75 + 46,74 XA + 1,33 XB - 29,44 XC - 22,28 X2A - 0,174 X2B + 7,26 X2C + 0,082 XAB + 7,66 XAC - 0,421 XBC \quad (4)$$

Pada respon *drug loading*, didapat 5 faktor yang signifikan berdasarkan uji ANOVA. Faktor-faktor tersebut yaitu lipid (0,000), polisorbate 80 (0,004), konjugat (0,000), interaksi lipid-lipid (0,001), dan

interaksi lipid-konjugat (0,050). Dengan banyaknya faktor yang signifikan maka persamaan yang didapat bisa lebih memprediksi hasil percobaan. Untuk meningkatkan validitas persamaan, maka faktor lain yang tidak signifikan dapat dihapus menyisakan variabel yang signifikan saja.

Faktor lipid dan konjugat terlihat sangat mempengaruhi *drug loading*. Hal ini karena lipid dan konjugat memberikan kontribusi massa yang signifikan terhadap sediaan NLC, sehingga mempengaruhi nilai *drug loading*. Apabila dilihat pengaruh masing-masing faktor dalam grafik *main effects* (Gambar 2D), dapat dilihat grafik lipid cenderung menaik namun belum mencapai titik optimumnya, untuk polisorbate 80, grafik cenderung mendatar yang menandakan tidak terlalu mempengaruhi nilai *drug loading*, sedangkan untuk konjugat, grafik cenderung menurun dan belum terlihat titik optimumnya. Pengaruh tiap level terhadap respon *drug loading* digambarkan dalam plot kontur dan permukaan (Gambar 3 G, H, I), yang dapat dengan jelas dilihat daerah dari masing-masing nilai respon.



Gambar 3. *Contour plot* hasil optimasi NLC yang termodifikasi kitosan-manosa konjugat dengan metoda Box Behnken terhadap parameter I. ukuran partikel (A, B, C), II. enkapsulasi efisiensi (D, E, F), dan III. loading obat (G, H, I) sebagai respon dari perubahan konsentrasi lipid, polisorbate 80, dan konjugat.

Formula optimum yang dipilih adalah formula titik tengah (center) dari analisis kontur yang didapat serta kestabilan fisik formula. Tiga percobaan titik tengah (center) dilihat kedekatannya antara hasil eksperimen dengan prediksi melalui persamaan polinomial yang didapat pada tiap respon. Dapat dilihat pada Tabel 4 bahwa untuk tiap formula menghasilkan perbedaan kecil antara hasil prediksi dengan hasil rata-rata eksperimental untuk ukuran, EE, dan DL. Dengan demikian, nilai dari center points dianggap mewakili sebagai formula optimum sediaan NLC rifampisin.

**Tabel 4. Perbandingan Hasil Eksperimen dan Hasil Prediksi dari tiga center points.**

Respon eksperimen	Rata-rata hasil eksperimen	Hasil prediksi	Galat (%)
Ukuran Partikel (nm)	712,433	703,437	1,263
EE (%)	91,537	91,644	0,117
DL (%)	36,615	36,614	0,003

**Tabel 5. Formula Optimum COS-ACE-NLC dengan Rifampisin terenkapsulasi.**

Faktor	Jumlah (%)
Rifampisin	1,00
Lipid (Stearil Alkohol : Asam Oleat 1:1)	0,75
Polisorbat 80	5,00
Konjugat kitosan-mannosa	0,75
STPP	0,12
Ad aquadeion	

Ukuran NLC rifampisin berada pada target yang diharapkan, yaitu 0,2–1  $\mu\text{m}$ . Ukuran partikel diharapkan dapat berukuran nano agar lebih mudah masuk ke dalam target, namun karena ditargetkan untuk makrofag, ukuran maksimum yang dapat difagosit adalah bisa sampai 1  $\mu\text{m}$ , yang mana dengan ukuran yang lebih besar maka makrofag akan lebih mudah mengenali zat tersebut sebagai benda asing<sup>(15)</sup>. Indeks polidispersitas berada pada angka 0,324 (<0,5) yang menunjukkan homogenitas ukuran globul yang terbentuk cukup seragam.

Zeta potensial salah satunya dapat digunakan untuk memprediksi keberhasilan proses konjugasi. Nilai zeta yang positif kemungkinan besar menandakan berhasilnya proses manasilasi NLC karena proses penambahan polimer pada formula (stearilamin) menyebabkan nanopartikel memiliki muatan positif dari gugus amin pada permukaan<sup>(16)</sup>. Begitu pula dengan kitosan pada percobaan ini yang memiliki muatan positif dari gugus amin. Nilai negatif, atau pengurangan nilai zeta potensial disebabkan oleh pelingkupan dengan manosa yang menutupi muatan positif sehingga menurunkan nilai zeta potensial yang menandakan berhasilnya pengikatan manosa

### Evaluasi Formula Optimum Nanopartikel.

Formula yang digunakan untuk evaluasi adalah formula optimum pada Tabel 5. Formula tersebut diujikan dengan pengukuran ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial, efisiensi enkapsulasi, drug loading, dan uji pelepasan.

Ukuran Partikel, Indeks Polidispersitas, dan Zeta Potensial. Evaluasi ukuran partikel, indeks polidispersitas dan zeta potensial dilakukan terhadap sampel. Hasil yang didapat adalah ukuran partikel  $766,1 \pm 57,56$ ; indeks polidispersitas  $0,324 \pm 0,01$ ; dan zeta potensial sebesar  $-3,20 \pm 1,75$  mV.

pada gugus amin<sup>(16)</sup>. Pada percobaan ini didapatkan nilai negatif kemungkinan karena terlalu banyaknya manosa yang terikat pada permukaan nanopartikel sehingga membuat muatan menjadi negatif.

Nilai zeta yang tinggi menandakan stabilitas fisik dari tumbukan elektrostatik antarpartikel<sup>(16)</sup>. Oleh karenanya nilai yang didapat pada percobaan ini menandakan formula kurang stabil karena nilainya mendekati netral. Dapat dilakukan perbaikan dengan pengurangan jumlah STTP yang digunakan untuk menetralkan sisa muatan konjugat setelah proses adsorpsi pada permukaan NLC. Selain itu, proses pengeringan dapat dijadikan alternatif untuk menjaga kestabilan.

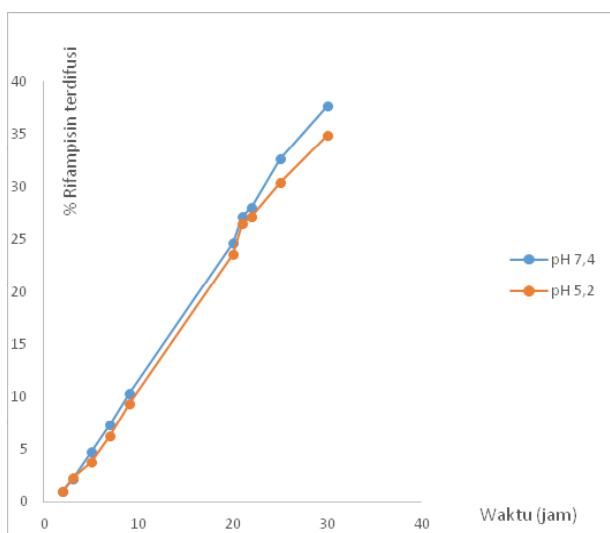
**Efisiensi Enkapsulasi dan Drug Loading.** Nilai efisiensi enkapsulasi dan drug loading didapatkan dengan metode sentrifuga. Perhitungan dilakukan dengan cara tidak langsung yaitu dengan mengukur kadar rifampisin yang terdapat dalam supernatan. Dari tiga sediaan didapat efisiensi enkapsulasi sebesar  $91,537 \pm 0,184$  % dan drug loading sebesar  $36,615 \pm 0,073$ %. Dengan nilai ini maka dapat dinyatakan formula optimum NLC memiliki efisiensi enkapsulasi dan drug loading yang baik, yang berarti sistem

NLC ini cocok untuk membawa rifampisin. Nilai % yang tinggi ini memang diharapkan, karena NLC adalah salah satu sistem utama untuk membawa atau menggabungkan obat-obat lipofilik, salah satunya rifampisin<sup>(16)</sup>.

**Uji Pelepasan.** Pelepasan rifampisin secara *in vitro* dari NLC diukur dalam medium disolusi fisiologis simulasi untuk memprediksi keefektifan formula secara *in vivo*. Pada percobaan ini uji dilihat pengaruh pH terhadap pelepasan obat pada sediaan. Pada percobaan ini dilihat pengaruh pH 5,2 dan 7,4 dalam pelepasan rifampisin. Kedua pH tersebut merepresentasikan kondisi dalam makrofag, yang mana pH 5,2 merupakan pH dalam fagolisosom sedangkan 7,4 adalah pH dalam sitoplasma. Pelepasan obat dari NLC terjadi karena proses difusi terkontrol.

Dari kurva pada Gambar 4 terlihat bahwa jumlah rifampisin yang dilepaskan terhadap waktu pada pH 5,2 dan 7,4 menghasilkan profil pelepasan yang hampir mirip (berimpit). Secara teori, kelarutan kitosan yang lebih tinggi pada pH 5. Pada pH 5, kitosan berada dalam keadaan terprotonasi sehingga kelarutannya dalam PBS meningkat. Namun hal tersebut berlaku untuk kitosan dengan BM tinggi, sedangkan pada formula NLC rifampisin ini yang digunakan adalah kitosan dengan BM rendah, sehingga secara umum profil kelarutannya akan sama. Harapannya, rifampisin akan cepat melepas pada pH 5,2 yaitu pada makrofag, namun proses pelepasan pada makrofag juga dipengaruhi oleh enzim yang mana pada percobaan *in vitro* kali ini tidak ditambahkan.

Pelepasan rifampisin yang juga terjadi pada pH 7,4 bukan merupakan suatu masalah karena NLC yang berukuran kecil dapat terabsorpsi dan masuk ke peredaran darah sehingga bekerja membunuh Mtb melalui jalur sistemik.



Gambar 4. Grafik profil pelepasan rifampisin dari nanopartikel terhadap waktu dalam pH 5,2 dan 7,4.

Pelepasan yang lebih tinggi pada pH asam dapat menguntungkan di mana agen etiologis TB berada di dalam sel yang terinfeksi<sup>(16)</sup>. Pelepasan obat yang jauh lebih rendah pada nilai pH yang lebih netral, mencegah obat tersebut dilepaskan pada sel yang tidak terinfeksi. Untuk penelitian lebih lanjut dapat diselidiki pelepasan pada pH 6,2 yakni pH cairan nasal dan fagosom<sup>(16)</sup>.

## SIMPULAN

Formula NLC optimum dari penelitian ini terdiri dari jumlah lipid padat dan lipid cair (stearil alkohol dan asam oleat 1:1) sebanyak 0,75%, Polisorbat 80 sebanyak 5%, konjugat kitosan-manosa 0,75%, rifampisin 1% dan STPP 0,12%. Formula optimum memiliki ukuran partikel  $766,1 \pm 57,56$  nm, zeta potensial  $-3,20 \pm 1,75$  mV, efisiensi enkapsulasi  $91,54 \pm 0,18$  %, dan *drug loading*  $36,62 \pm 0,07$ %. Formula nanopartikel NLC-kitosan-D-mannose ini diharapkan dapat meningkatkan targeting rifampisin pada sel makrofag melalui antaraksi dengan reseptor manosa. Lebih lanjut, rifampisin dapat dilepaskan pada kecepatan yang hampir sama pada pH 5,2 dan 7,4 yang mengindikasikan potensi aktivitasnya dalam endosome maupun sitoplasma.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini disponsori oleh hibah Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi, Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2016. 2016.
2. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E & Schlesinger LS. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 2005. 202(7): 987-999.
3. Torrelles JB, & Schlesinger LS. Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannose cell wall determinants impacts adaptation to the host. *Tuberculosis*. 2010. 90(2): 84-93
4. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. 2015.
5. Becker C. Preparation of biowaiver recommendations for antituberculosis drugs [dissertation]. Senckenberg: Universitätsbibliothek Johann Christian. 2009.
6. Pardeike J, Hommoss A, & Müller RH. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International journal of pharmaceutics*. 2009. 366(1): 170-184

7. Naseri N, Valizadeh H, & Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2015. 5(3): 305.
8. Yang X, Patel S, Sheng Y, Pal D., & Mitra AK. Statistical design for formulation optimization of hydrocortisone butyrate-loaded PLGA nanoparticles. *AAPS PharmSciTech*. 2014. 15(3): 569-587.
9. Chaubey P, & Mishra B. Mannose-conjugated chitosan nanoparticles loaded with rifampicin for the treatment of visceral leishmaniasis. *Carbohydrate polymers*. 2014. 101: 1101-1108.
10. Gribble GW & Ferguson DC. Reactions of sodium borohydride in acidic media. Selective reduction of aldehydes with sodium triacetoxyborohydride. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1975. (13): 535-536.
11. Nkuzinna OC, Menkiti MC, Onukwuli OD, Mbah GO, Okolo BI, & Egbujor MC. Application of Factorial Design of Experiment for Optimization of Inhibition Effect of Acid Extract of *Gnetum africana* on Copper Corrosion. *Natural Resources*. 2014. 5(07): 299.
12. Trinh TK & Kang LS. Application of response surface method as an experimental design to optimize coagulation tests. *Environmental Engineering Research*. 2010. 15(2): 63-70.
13. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. 4th Wiley. New York; 1997. p. 704.
14. McCarron PA, Woolfson AD, & Keating SM. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly (isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 1999. 193(1): 37-47.
15. Hirota K & Terada H. Endocytosis of particle formulations by macrophages and its application to clinical treatment. In *Molecular Regulation of Endocytosis*. InTech. 2012.
16. Pinheiro M, Ribeiro R, Vieira A, Andrade F, & Reis S. Design of a nanostructured lipid carrier intended to improve the treatment of tuberculosis. *Drug design, development and therapy*. 2016. 10:2467.

# **Aktivitas Antibakteri Fraksi *Allium ascalonicum* Linn A562275sal Lembah Palu terhadap *Shigella dysenteriae***

## **(Antibacterial Activity of *Allium ascalonicum* Linn. Fractions from the Palu Valley against *Shigella dysenteriae*)**

AKHMAD KHUMAIIDI\*, KUMALAHAYATI MAULINA, ARSA WAHYU NUGRAHANI

Jurusan Farmasi, FMIPA Universitas Tadulako, Palu-Indonesia, 94118.

\*Penulis korespondensi, Hp : 082291562275

e-mail: akhmadkhumaidipalu@gmail.com

Diterima 20 Mei 2019, Disetujui 8 Oktober 2019

**Abstrak:** Bawang merah (*Allium ascalonicum* Linn.) dari lembah Palu merupakan salah satu tanaman khas Sulawesi Tengah yang digunakan sebagai obat tradisional seperti untuk mengobati penyakit infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi yang mempunyai aktivitas tinggi dari sampel umbi dan daun bawang merah dari lembah Palu dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan menentukan golongan senyawa yang memiliki aktivitas tersebut. Penelitian dengan ekstraksi bawang merah menggunakan metode maserasi dengan etanol 96% terhadap kedua sampel. Fraksinasi cair-cair digunakan sebagai metode fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air secara berurutan. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dengan teknik sumuran dan KLT Bioautografi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan aktivitas tertinggi dari sampel umbi, sedangkan pada sampel daun fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan mampu memberikan aktivitas penghambatan yang baik. Golongan senyawa yang teridentifikasi dengan metode kromatografi lapis tipis adalah senyawa flavonoid untuk sampel umbi (Rf 0,18). Pada sampel daun teridentifikasi senyawa steroid pada fraksi etil asetat (Rf 0,62) dan senyawa terpenoid (Rf 0,48) pada fraksi n-heksan. Berdasarkan hal tersebut Bawang merah dari lembah Palu berpotensi dapat dikembangkan sebagai bahan antibakteri.

**Kata kunci:** *Allium ascalonicum* Linn, fraksi, umbi, daun, antibakteri, KLT bioautografi.

**Abstract:** Shallot (*Allium ascalonicum* Linn.) is one of the typical plants of Central Sulawesi which is used as traditional medicine such as to treat infectious diseases. This study aims to determine the fractions that have high activity from bulbs and leaves in inhibiting the growth of *Shigella dysenteriae* bacteria and determining the organic compounds that have antibacterial activities. Extraction was carried out by maceration method using ethanol 96% for both samples. Liquid-liquid fractionation was used as a fractionation method using n-hexane, ethyl acetate and water solvents, sequenly. The antibacterial activity test used the diffusion method with the pile technique and TLC-bioautography. The results showed that ethyl acetate fraction gave the highest activity of bulbs samples, while in leaves samples ethyl acetate fraction and n-hexane fraction were able to provide good inhibitory activity. The organic compounds were identified by thin layer chromatography method. Flavonoids compounds have identified for bulbs samples (Rf 0.18). In the leaves samples, steroids compounds were identified in the ethyl acetate fraction (Rf 0.62) and terpenoid compounds (Rf 0.48) in the n-hexane fraction. Based on the result, the shallot is potentially be developed as an antibacterial material.

**Keywords:** *Allium ascalonicum* Linn, fractions, bulbs, leaves, antibacterial, TLC-bioautography.



## PENDAHULUAN

BAWANG merah (*Allium ascalonicum* Linn.) dari lembah Palu (Gambar 1) merupakan bawang merah dengan karakteristik yang berbeda dengan bawang merah asal daerah lain. Bawang merah ini mempunyai tekstur yang padat, bila digoreng rasanya gurih dan renyah serta memiliki cita rasa yang khas serta lebih dikenal sebagai “Bawang Goreng Palu”. Bawang merah ini memiliki kemiripan dengan bawang merah Sumenep, Bima, dan Filipina<sup>(1,2)</sup>.

Bawang merah dari lembah Palu umumnya digunakan oleh masyarakat sebagai bumbu masak atau makanan ringan<sup>(3)</sup>. Disisi lain, secara empiris bawang merah dari lembah Palu oleh masyarakat suku Kaili telah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Bawang merah tersebut telah digunakan secara turun-temurun sebagai obat untuk alergi<sup>(4)</sup>, sakit pinggang<sup>(5)</sup> serta digunakan untuk mengobati penyakit usus buntu<sup>(6)</sup>. Selain manfaat pengobatan diatas, bawang merah ini juga digunakan untuk mengatasi penyakit infeksi seperti mengobati penyakit disentri<sup>(7)</sup>.

Hasil penelitian terhadap bawang merah tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan jus hasil samping pengolahan bawang merah (bawang goreng) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus sp*, *E. coli* dan *Salmonella sp*<sup>(8)</sup>. Selain itu juga, telah dilaporkan bahwa minyak atsiri umbi bawang merah dapat menghambat dan membunuh beberapa bakteri<sup>(9)</sup>.

Berdasarkan hal itu, perlu dilakukan pengujian tingkat fraksi (fraksi n-heksan, etil asetat dan air) sehingga dapat diketahui secara lebih jauh mengenai aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* dan diketahui golongan senyawa kimia yang memberikan aktivitas tersebut pada fraksi dengan aktivitas yang tinggi.



Gambar 1. Bawang merah dari lembah Palu (*Allium ascalonicum* Linn.)

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Umbi dan daun bawang merah (*A. ascalonicum* L.) yang diperoleh dari Desa Labuan Toposo, Kecamatan Labuan, Kabupaten Donggala, Sulawesi Tengah yang telah diidentifikasi di Laboratorium Biodiversitas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Tadulako, Palu-Sulawesi Tengah, isolat *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari UPT Laboratorium Kesehatan Provinsi Sulawesi Tengah, etanol 96%, n-heksan, etil asetat, dimetilsulfoksida (DMSO), pereaksi asam sulfat ( $H_2SO_4$ ) 10%, pereaksi besi (III) klorida ( $FeCl_3$ ), kloroform, pereaksi Dragendorf, pereaksi Liebermann-Burchard, pereaksi aluminium triklorida ( $AlCl_3$ ), larutan 0,5 Mc. Farland 1, akuades steril, lempeng KLT GF245 nm (Merck), medium nutrien agar (NA) (Merck).

**Alat.** Seperangkat alat KLT dan identifikasi, bejana maserasi, vacum rotary evaporator (Eyela OSB 2100), lampu UV 254 nm dan 366 nm, gelas kimia (Pyrex), lampu bunsen, cawan porselin, cawan petri (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), inkubator (Eyela®), labu ukur 10 mL (Pyrex), laminar air flow (Streamline), ose loop, oven (Shellab®), autoclave (Hirayama), jangka sorong (Tricle Brand), micropipet 10 -100  $\mu$ L (Accubiotech®), pinset, pencadangan baja, tabung reaksi (Pyrex), dan timbangan digital (Citizen®MB).

**METODE. Pengolahan sampel.** Sampel yang telah diambil, disortasi basah, lalu dicuci dengan air mengalir, selanjutnya dirajang (dipisah antara umbi/bulbus dan daun), dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan terlindung dari cahaya matahari langsung, kemudian disortasi kembali.

**Ekstraksi.** Ekstraksi sampel dilakukan secara maserasi, yaitu merendam umbi bawang merah dari lembah Palu sebanyak 663,06 g dan daunnya sebanyak 196,70 g etanol 96% dengan volume masing-masing 3 liter pada temperatur kamar dan terlindung dari sinar matahari. Perendaman dilakukan selama 5x24 jam sambil sesekali diaduk, disaring, lalu filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50 °C dengan kecepatan 40 rpm hingga didapatkan ekstrak kental, lalu dikeringkan.

**Fraksinasi.** Fraksinasi dilakukan dengan metode fraksinasi cair-cair yaitu menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air secara berkesinambungan. Ekstrak umbi sebanyak 56,67 g dan ekstrak daun sebanyak 20,00 g dilarutkan dalam air-etanol (2:1) sebanyak 60 mL, dimasukkan ke dalam corong pisah, ditambahkan 100 mL n-heksan, lalu dikocok

secara perlahan-lahan dan didiamkan sampai terjadi pemisahan antara fraksi n-heksan dan air-etanol. Fraksi n-heksan dipisahkan, kemudian diulangi beberapa kali terhadap lapisan air-etanol sampai larutan berwarna bening. Fraksinasi dilanjutkan menggunakan etil asetat dengan proses yang sama dengan n-heksan. Hasil fraksinasi selanjutnya dikeringkan dan diuji aktivitas antibakterinya.

**Pengujian Aktivitas Antibakteri.** Pengujian antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar teknik sumuran. Medium NA cair, dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat (lapisan dasar), setelah itu ditanam pencadang baja pada permukaan lapisan dasar yang diatur jaraknya agar daerah pengamatan tidak bertumpu. Medium agar dicampurkan ke dalam cawan petri yang berisi 0,1 mL suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* lalu dibiarkan hingga memadat (lapisan kedua). Pencadang diangkat menggunakan pinset sehingga terbentuk sumur-sumur. Larutan uji konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, 80%, kontrol negatif dan kontrol positif (ampisilin) sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C.

**KLT Bioautografi.** Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam cawan petri steril lalu ditambahkan 10 mL medium NA. Fraksi dengan aktivitas antibakteri tertinggi ditimbang 2 mg dan dilarutkan dalam 600 µL kloroform : metanol (1:1). Kemudian ditotolkan pada lempeng KLT sebanyak 5 µL dengan *loading dose* 15 µg/µL, kemudian dilusi dengan menggunakan eluen hasil pemisahan terbaik yaitu n-heksan : kloroform (2:1) untuk fraksi n-heksan. Kemudian fraksi etil asetat menggunakan eluen heksan : etil asetat : etanol (10:2:1). Lempeng KLT dibiarkan beberapa saat untuk menghilangkan pelarutnya. Lempeng KLT kemudian diamati pada lampu UV 254 nm dan 366 nm, setelah itu ditempelkan pada permukaan medium padat yang berisi 0,1 mL suspensi bakteri yang telah disetarakan kekeruhannya dengan 0,5 McFarland 1 (1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL). Lempeng KLT ditempelkan selama 15 menit agar senyawa yang terdapat pada lempeng berdifusi ke medium. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diamati zona jernih yang terbentuk pada medium yang diletakkan lempeng KLT yang berisi noda lalu diidentifikasi komponen kimia yang memberikan zona hambat<sup>(10)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Ekstraksi.** Ekstraksi umbi bawang merah dari lembah Palu secara maserasi menghasilkan ekstrak kental

sebanyak 105,47 g dengan nilai persen rendemen 15,90%, sedangkan daunnya menghasilkan ekstrak kental sebanyak 20,15 g dengan nilai persen rendemen 10,24%. Melalui hasil tersebut, menunjukkan bahwa senyawa kimia pada umbi cenderung lebih banyak jika dibandingkan dengan senyawa yang ada pada daun bawang merah.

Hasil rendemen ekstrak umbi dengan pelarut etanol 96 % ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan menggunakan air suling yang dibantu dengan pengadukan selama 24 jam (27,4 %)<sup>(11)</sup>. Hal ini disebabkan oleh adanya proses pengadukan selama 24 jam secara terus-menerus sehingga akan lebih memudahkan dalam melarutkan (meningkatkan kelarutan) senyawa yang ada pada simplisia<sup>(12)</sup>. Hasil rendemen ekstrak daun dengan pelarut etanol 96 % ini lebih tinggi jika dibandingkan ekstraksi menggunakan pelarut metanol (80%) yang menghasilkan rendemen 4,87±0,20%<sup>(13)</sup>. Hasil yang berbeda ini diduga karena adanya perbedaan tempat tumbuh seperti perbedaan curah hujan dan intensitas cahaya matahari (Palu memiliki intensitas curah hujan yang lebih rendah jika dibandingkan dengan daerah Bogor, sedangkan intensitas cahaya matahari di Palu lebih tinggi jika dibandingkan daerah Bogor). Curah hujan yang tinggi lebih cenderung menghasilkan kadar air yang lebih tinggi, sedangkan daerah dengan intensitas cahaya matahari yang lebih tinggi cenderung akan lebih meningkatkan intensitas fotosintesis tanaman sehingga mengakibatkan jumlah komponen kimia yang dihasilkan lebih banyak<sup>(14,15)</sup>.

Hasil fraksinasi sampel umbi dan daun bawang merah dari lembah Palu menggunakan metode fraksinasi cair-cair, dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Fraksi Umbi dan Daun Bawang merah dari lembah Palu**

Sampel	Fraksi	Bobot Fraksi (g)	Persen Rendemen (%)
Umbi	n-heksan	9,73	16,21
	Etil Asetat	16,09	26,81
	Air	31,08	51,80
Daun	<i>Recovery</i>	56,90	94,82
	n-heksan	3,94	19,70
	Etil Asetat	2,18	10,90
	Air	11,28	56,40
	<i>Recovery</i>	17,40	87,00

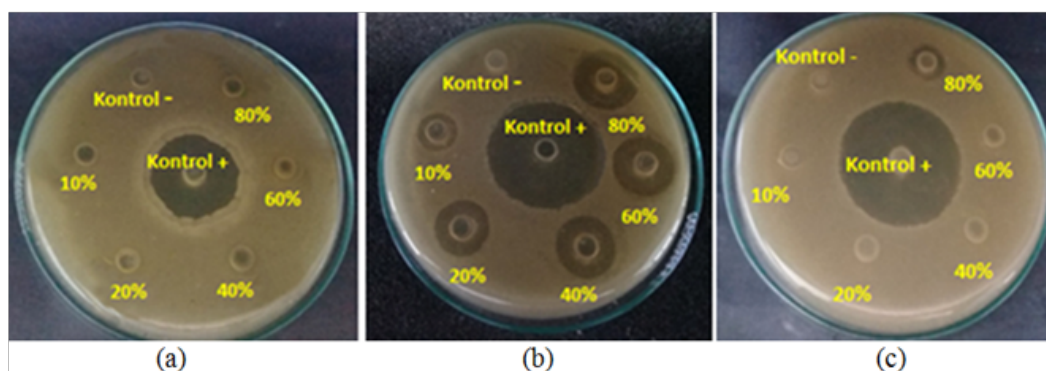
Hasil fraksinasi menunjukkan bahwa fraksi air memiliki persen rendemen terbesar dari fraksi-fraksi lainnya pada kedua sampel. Hal ini diduga terjadi akibat dari pengaruh etanol yang digunakan saat melarutkan ekstrak etanol sehingga mampu melarutkan sebagian yang bersifat kurang polar yang seharusnya terlarut pada pelarut n-heksan. Interaksi air-etanol lebih berpengaruh kuat terhadap senyawa-senyawa yang memiliki kepolaran yang lebih rendah sehingga menyebabkan kecenderungan senyawa yang relatif nonpolar tertarik/terlarut ke pelarut tersebut. Pengaruh ini menyebabkan senyawa-senyawa yang harusnya larut ke dalam pelarut n-heksan lebih tertarik ke air-etanol sehingga fraksi air menjadi lebih banyak.

Penggunaan gabungan air dan pelarut organik dapat digunakan dalam ekstraksi bahan kimia yang larut dalam air dan/atau pelarut organik<sup>(16,17)</sup>. Hasil ini relatif sama dengan penelitian yang telah dilakukan oleh peneliti lain<sup>(18)</sup>.

**Aktivitas Antibakteri Umbi.** Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada sampel umbi bawang merah dari lembah Palu menggunakan metode difusi agar dengan teknik sumuran, menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan air dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* sedangkan fraksi n-heksan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri tersebut (Gambar 2). Hasil pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji aktivitas antibakteri fraksi umbi terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*

Sampel Uji	Konsentrasi (%)	Loading Dose (mg/ $\mu$ L)	Diameter Zona Hambat $\pm$ SD (mm)
Fraksi	10	0,1	0,00 $\pm$ 0,00
n- heksan	20	0,2	0,00 $\pm$ 0,00
	40	0,4	0,00 $\pm$ 0,00
	60	0,6	0,00 $\pm$ 0,00
	80	0,8	0,00 $\pm$ 0,00
Ampisilin	0,1	0,001	30,73 $\pm$ 0,84
Kontrol negatif	100	0	0,00 $\pm$ 0,00
Fraksi	10	0,1	11,20 $\pm$ 0,58
Etil Asetat	20	0,2	14,72 $\pm$ 1,32
	40	0,4	16,68 $\pm$ 1,37
	60	0,6	17,68 $\pm$ 1,33
	80	0,8	19,25 $\pm$ 0,95
Ampisilin	0,1	0,001	32,37 $\pm$ 1,67
Kontrol negatif	100	0	-
Fraksi	10	0,1	0,00 $\pm$ 0,00
Air	20	0,2	0,00 $\pm$ 0,00
	40	0,4	0,00 $\pm$ 0,00
	60	0,6	0,00 $\pm$ 0,00
	80	0,8	11,67 $\pm$ 1,35
Ampisilin	0,1	0,001	34,52 $\pm$ 0,84
Kontrol negatif	100	0	0,00 $\pm$ 0,00



Gambar 2. Uji aktivitas antibakteri umbi *Allium ascalonicum* terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*  
(a) Fraksi n-heksan; (b) Fraksi etil asetat; (c) Fraksi air

Hasil ini menggambarkan bahwa fraksi yang memberikan aktivitas penghambatan adalah fraksi yang bersifat semipolar hingga polar. Secara umum, senyawa-senyawa relatif polar yang dikandung oleh *Allium ascalonicum* antara lain flavonoid dan glikosidanya, saponin seperti furostanol saponin, dan senyawa dengan kandungan sulfur seperti  $\gamma$ -glutamyl-S-propylsistein-S-oksida dan  $\gamma$ -glutamyl-S-propenilsistein. Senyawa flavonoid dan senyawa dengan kandungan sulfur diketahui memiliki aktivitas antibakteri<sup>(19)</sup>.

**Aktivitas Antibakteri Daun.** Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada sampel daun bawang merah dari lembah Palu menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* sedangkan fraksi air tidak memberikan penghambatan pada seri konsentrasi uji yang digunakan (Gambar 3). Hasil pengukuran zona hambat dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri sampel umbi dan daun bawang merah dari lembah Palu, terdapat perbedaan yang signifikan pada masing-masing sampel. Pada sampel umbi, hasil fraksi yang memberikan aktivitas antibakteri yaitu fraksi etil asetat dan fraksi air. Pada fraksi etil asetat, zona hambat yang terbentuk pada semua konsentrasi uji yaitu konsentrasi 10%, 20%, 40%, 60%, dan 80% dengan masing-masing zona hambat yang terbentuk yaitu 11,20 mm, 14,72 mm, 16,68 mm, 17,68 mm, dan 19,25 mm secara berturut-turut. Pada fraksi air, zona hambat yang terbentuk hanya pada konsentrasi tertinggi yaitu 80% dengan zona hambatnya 11,67 mm. Aktivitas antibakteri fraksi air relatif lebih lemah jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat pada sampel umbi. Hal ini dapat terjadi diduga karena senyawa-senyawa yang kecenderungan berkhasiat sebagai antibakteri pada *Allium ascalonicum* terutama seperti senyawa flavonoid lebih terlarut ke dalam pelarut etil asetat, sedangkan senyawa organo-sulfur, senyawa S-alk(en)il-L-sistein sulfoksida (seperti aliin

dan  $\gamma$ -glutamilsistein) relatif terlarut ke dalam pelarut polar seperti etanol atau metanol<sup>(20,21,22,23)</sup>.

Pada sampel daun, fraksi yang memberikan aktivitas antibakteri yaitu fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan. Pada fraksi etil asetat, zona hambat yang terbentuk adalah di semua konsentrasi uji mulai dari konsentrasi terendah hingga konsentrasi tertinggi, masing-masing 14,7 mm, 16,77 mm, 18,40 mm, 19,83 mm, dan 21,13 mm secara berurutan. Sedangkan pada fraksi n-heksan, zona hambat yang terbentuk masing-masing dari konsentrasi terendah ke konsentrasi tertinggi yaitu 9,35 mm, 10,08 mm, 10,72 mm, 12,55 mm dan 15,68 mm secara berturut-turut. Aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri dari fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan daun bawang merah tidak lepas dari kandungan kimia yang dikandungnya.

Secara umum kandungan kimia daun *Allium ascalonicum* masih belum banyak dilaporkan. Tetapi pada genus yang sama (spesies *Allium sativum*) daunnya memiliki kadar fenolik total sebesar  $176.94 \pm 7.67$  mg GAE/g<sup>(24)</sup>. Pada daun spesies *Allium ursinum* mengandung total senyawa organo-sulfur sebesar 52,1%. Selain itu, senyawa volatil pada daun yang banyak adalah metil-2-propenil trisulfida (7,1%), diikuti oleh di-2-propenil disulfida (6,0%). Kandungan lain pada daun *Allium ursinum* adalah senyawa phytol. Senyawa organo-sulfur yang ada di dalam *Allium sp.* diduga dapat memberikan efek yang menguntungkan dalam bidang kesehatan seperti antimikroba, antitrombotik, antitumor, hipolipidemia dan hipoglikemik. Berdasarkan studi literatur, fraksi atau ekstrak dengan polaritas sedang (semipolar) seperti fraksi etil asetat mengandung senyawa-senyawa organo-sulfur<sup>(25)</sup>. Daun *Allium sp.* ditemukan mengandung alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, tanin, saponin, gula pereduksi, protein dan minyak. Senyawa seperti asam gallat, asam kumarat, asam kafeat, asam tannat, asam vanilat, asam klorogenat, kaempferol, dan kuersetin dapat terkandung dalam sampel daun<sup>(26)</sup>.

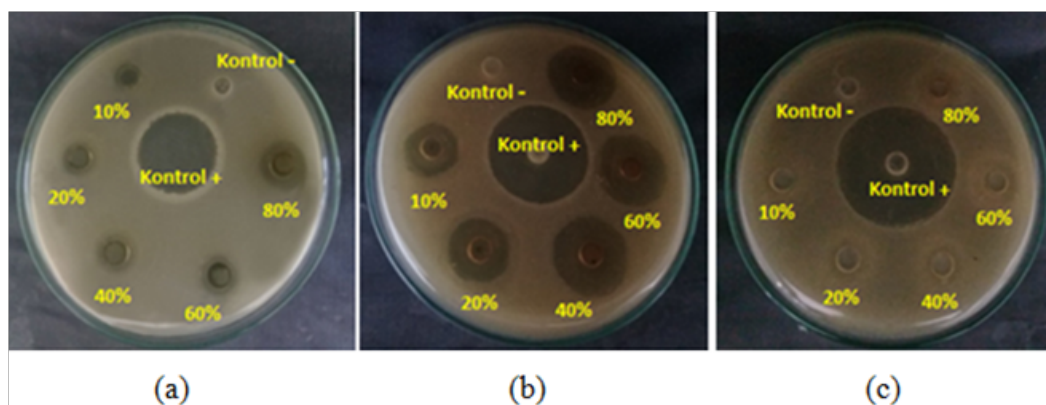
Hasil penelitian ini membuktikan bahwa sampel umbi dan daun bawang merah dari lembah Palu (*Allium ascalonicum* Linn.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Namun, aktivitas antibakteri dari zona hambat yang diberikan oleh kedua sampel (semua fraksi) masih belum

sebanding dengan ampisilin sebagai kontrol positif. Hal ini dapat terjadi karena fraksi masih merupakan kumpulan beberapa senyawa yang masih belum diketahui secara keseluruhan komponen kimia yang berkhasiat antibakteri beserta masing-masing mekanisme dan interaksinya.

**Tabel 3. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun terhadap bakteri *Shigella dysenteriae***

Sampel Uji	Konsentrasi (%)	Loading Dose (mg/ $\mu$ L)	Diameter Zona Hambat $\pm$ SD (mm)
Fraksi	10	0,1	9,35 $\pm$ 0,72
n-heksan	20	0,2	10,08 $\pm$ 0,21
	40	0,4	10,72 $\pm$ 0,85
	60	0,6	12,55 $\pm$ 1,38
	80	0,8	15,68 $\pm$ 0,90
	Ampisilin	0,1	0,001
Kontrol negatif	100	0	0,00 $\pm$ 0,00
Fraksi	10	0,1	14,7 $\pm$ 0,72
	20	0,2	16,77 $\pm$ 0,37
	40	0,4	18,40 $\pm$ 0,77
	60	0,6	19,83 $\pm$ 0,58
	80	0,8	21,13 $\pm$ 0,58
Ampisilin	0,1	0,001	38,44 $\pm$ 5,99
Kontrol negatif	100	0	0,00 $\pm$ 0,00
Fraksi	10	0,1	0,00 $\pm$ 0,00
	20	0,2	0,00 $\pm$ 0,00
	40	0,4	0,00 $\pm$ 0,00
	60	0,6	0,00 $\pm$ 0,00
	80	0,8	0,00 $\pm$ 0,00
Ampisilin	0,1	0,001	33,82 $\pm$ 0,25
Kontrol negatif	100	0	0,00 $\pm$ 0,00





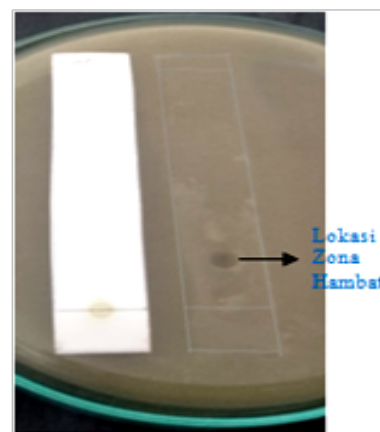
Gambar 3. Uji aktivitas antibakteri daun *Allium ascalonicum* terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*  
(a) Fraksi n-heksan; (b) Fraksi etil asetat; (c) Fraksi air

**KLT Bioautografi.** Hasil pengujian aktivitas antibakteri yang memberikan aktivitas penghambatan cukup tinggi pada sampel umbi adalah fraksi etil asetat sedangkan pada sampel daun adalah fraksi etil asetat dan n-heksan. Selanjutnya fraksi tersebut dilakukan identifikasi komponen kimia yang memberikan aktivitas dengan metode bioautografi kontak (Gambar 4 dan Gambar 5).

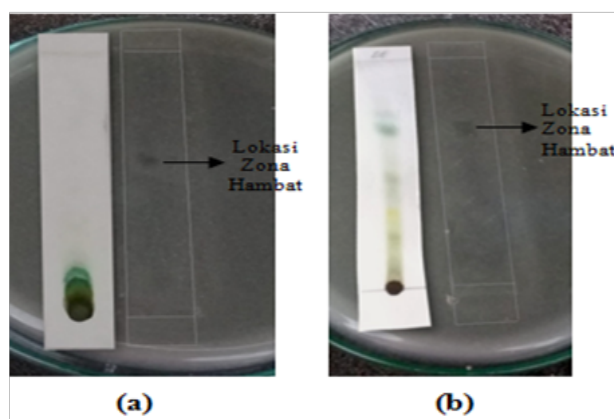
Hasil uji metode KLT bioautografi menghasilkan masing-masing satu zona hambat yang terbentuk pada masing-masing sampel. Pada sampel umbi (fraksi etil asetat), zona hambat yang terbentuk terletak pada nilai Rf 0,18 dengan menggunakan eluen n-heksan : etilasetat : etanol (10:2:1). Pada sampel daun, nilai Rf untuk fraksi etil asetat adalah 0,62 dengan eluen n-heksan : etilasetat : etanol (10:2:1), serta fraksi heksan nilai Rf 0,48 dengan eluen n-heksan : kloroform (2:1).

Senyawa dengan nilai Rf 0,18 yang memberikan zona hambat pada sampel umbi, jika dilihat dari eluen yang digunakan dalam proses pengelusan dapat dikatakan memiliki polaritas yang relatif polar, karena dengan eluen yang polaritasnya antara semipolar-polar (heksan : etilasetat : etanol (10:2:1)) setelah dielusi berada di bagian bawah lempeng. Hal ini menunjukkan adanya interaksi yang cukup kuat antara senyawa yang memberikan zona hambat dengan lempeng (silika gel F254 nm). Interaksi tersebut diduga terjadi karena adanya interaksi ikatan hidrogen antara senyawa yang memberikan zona hambat dengan residu silanol pada lempeng yang digunakan. Gugus hidroksil (-OH) pada lempeng memberikan interaksi dengan gugus polar lain pada senyawa yang dielusi seperti gugus hidroksil (-OH), ikatan rangkap seperti karbonil (C=O) ataupun senyawa dengan ikatan rangkap (C=C) dan gugus amina (-NH<sub>2</sub>). Semakin banyak gugus polar yang dimiliki memberikan interaksi yang semakin kuat antara sampel dengan lempeng silika yang akan mengakibatkan senyawa

memiliki nilai Rf yang kecil<sup>(27)</sup>. Hal ini juga terjadi pada senyawa dengan nilai Rf 0,62 untuk fraksi etil asetat pada sampel daun, hanya saja polaritas senyawa ini relatif lebih rendah jika dibandingkan dengan senyawa yang memiliki Rf 0,18. Senyawa dengan nilai Rf 0,48 untuk fraksi n-heksan pada sampel daun dapat dikatakan memiliki polaritas yang relatif rendah (eluen n-heksan : kloroform (2:1)) jika dibandingkan dengan dua senyawa sebelumnya.



Gambar 4. Hasil KLT bioautografi fraksi etil asetat sampel umbi



Gambar 5. Hasil KLT bioautografi sampel daun  
(a) Fraksi etil asetat dan (b) Fraksi n-heksan

**Identifikasi Golongan Senyawa. Sampel Umbi.**

Hasil identifikasi golongan senyawa pada sampel umbi bawang merah dari lembah Palu, dapat dilihat pada Tabel 4 berikut.

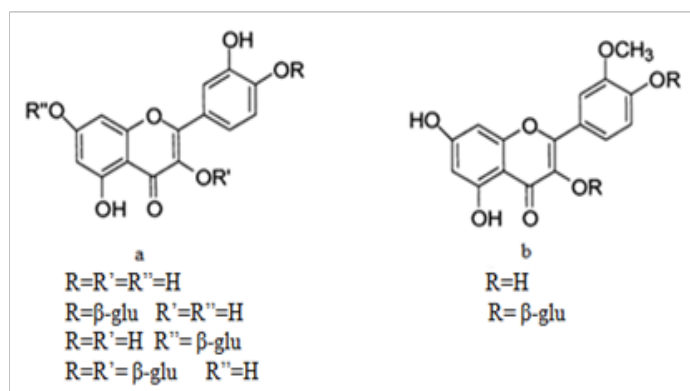
Berdasarkan hasil identifikasi dengan menggunakan semua pereaksi yang digunakan, noda pada sampel umbi (Rf 0,18) memberikan perubahan warna dari noda yang kurang nampak menjadi noda yang lebih terang warnanya yaitu warna kuning-kecoklatan setelah disemprot menggunakan pereaksi aluminium triklorida. Hal ini menunjukkan bahwa golongan senyawa yang memberikan aktivitas tersebut adalah golongan flavonoid. Senyawa flavonoid akan memberikan warna kuning setelah bereaksi dengan aluminium triklorida karena senyawa flavonoid akan membentuk kompleks dengan aluminium<sup>(28)</sup>. Selain

hal itu, senyawa flavonoid seperti khalkon setelah disemprot dengan asam sulfat memberikan warna kuning dan dengan feri klorida berwarna coklat kehitaman<sup>(29)</sup>. Hal ini memberikan penguatan bahwa senyawa yang diduga yang berkhasiat antibakteri adalah golongan flavonoid.

Disisi lain, telah dilaporkan bahwa bulbus bawang merah (*Allium ascalonicum* Linn.) mengandung senyawa flavonoid seperti kuersetin dan isorhamnetin (Gambar 6) baik dalam bentuk aglikon ataupun glikosidanya<sup>(30)</sup>. Flavonoid yang terkandung dalam tumbuhan juga telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antibakteri adalah melalui penghambatan sintesis asam nukleat atau melalui penghambatan fungsi membran sitoplasma<sup>(31)</sup>.

**Tabel 4. Hasil KLT senyawa antibakteri fraksi etil asetat umbi bawang merah**

Pereaksi	Nilai Rf	Warna Noda		
		UV254 nm	UV366 nm	Penampak Noda
Aluminium triklorida (AlCl <sub>3</sub> )	0,18	Hitam	Biru	Kuning-coklat
	0,57	Hitam	Cokelat	Ungu-hitam
	0,88	Hitam	Cokelat	Biru
	0,94	Hitam	Biru	Merah muda
Feri klorida (FeCl <sub>3</sub> 1%)	0,18	Hitam	Hitam	Coklat-hitam
	0,24	Hitam	Hitam	Hitam
	0,90	Hitam	Hitam	Hitam
Asam sulfat (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%)	0,18	Hitam	Cokelat	Kuning
	0,65	Hitam	Biru	Hitam
	0,88	Hitam	Ungu	Merah muda
	0,94	Hitam	Merahmuda	Merah muda
Liebermann-Burchard	0,18	Hitam	Biru	-
Dragendorff	0,18	Hitam	Biru	-



**Gambar 6. Struktur senyawa flavonoid (a) Kuersetin dan (b) Isorhamnetin**

**Sampel Daun.** Hasil identifikasi golongan senyawa pada sampel daun fraksi etil asetat dan n-heksan dapat dilihat pada Tabel 5 dan 6.

Pada sampel daun bawang merah dari lembah Palu fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan, diduga senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah senyawa steroid dan terpenoid secara berurutan. Hal ini ditunjukkan pada hasil penyemprotan fraksi etil asetat dengan pereaksi Liebermann-Burchard dan asam sulfat noda yang muncul adalah noda dengan warna hijau setelah dipanaskan. Pada fraksi n-heksan noda yang memberikan zona hambat setelah diidentifikasi dengan pereaksi asam sulfat dan setelah dipanaskan berubah menjadi merah muda<sup>(32)</sup>. Mekanisme senyawa

terpenoid sebagai antibakteri diduga disebabkan oleh kemampuan menghasilkan perubahan permeabilitas membran dan kebocoran bahan intraseluler. Selain itu juga diduga senyawa tersebut memiliki kemampuan dalam melewati membran sel, menembus bagian dalam sel dan berinteraksi dengan situs intraseluler penting untuk aktivitas antibakteri<sup>(33)</sup>. Senyawa steroid dapat memiliki aktivitas antibakteri diduga disebabkan oleh ikatan peroksida dan vinil dalam strukturnya. Mekanisme tersebut dapat dijelaskan oleh fakta bahwa senyawa steroid mirip dengan sterol normal yang digunakan dalam sel bakteri, sehingga dapat dikatakan senyawa steroid menggantikan senyawa sterol di membran sel bakteri<sup>(34)</sup>.

**Tabel 5. Hasil KLT senyawa antibakteri fraksi etil asetat daun bawang merah**

Pereaksi	NilaiRf	Warna Noda		
		UV254 nm	UV 366 nm	Penampak Noda
Aluminium triklorida (AlCl <sub>3</sub> )	0,3	Hitam	Cokelat	Cokelat
	0,37	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,41	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,47	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,65	Hitam	Hitam	Hijau
	0,71	Hitam	Hitam	Cokelat
Feri klorida (FeCl <sub>3</sub> 1%)	0,3	Hitam	Cokelat	Hitam
	0,37	Hitam	Merah muda	Hitam
	0,41	Hitam	Merah muda	Hitam
	0,5	Hitam	Hitam	Hitam
	0,68	Hitam	Hitam	Hitam-biru
	0,72	Hitam	Hitam	Hitam
Asam sulfat (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%)	0,17	Hitam	Biru	Cokelat
	0,27	Hitam	Cokelat	Hijau
	0,42	Hitam	Merah muda	Hijau
	0,5	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,62	Hitam	Hitam	Hijau
	0,68	Hitam	Biru	Hitam-biru
	0,78	Hitam	Hitam	Merah muda
	0,9	Hitam	Hitam	Merah muda
	0,94	Hitam	Biru	Merah muda
Liebermann-Burchard	0,3	Hitam	Cokelat	Cokelat
	0,37	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,41	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,47	Hitam	Merah muda	Cokelat
	0,65	Hitam	Hitam	Hijau
	0,71	Hitam	Hitam	Cokelat
Dragendorff	0,17	Hitam	Biru	Cokelat
	0,27	Hitam	Cokelat	Cokelat
	0,3	Hitam	Cokelat	Cokelat
	0,32	Hitam	Cokelat	Hijau
	0,47	Hitam	Merah muda	Hijau
	0,68	Hitam	Merah muda	Cokelat
0,92	Hitam	Cokelat	Cokelat	



Tabel 6. Hasil KLT senyawa antibakteri fraksi n-heksan daun bawang merah

Pereaksi	NilaiRf	Warna Noda		
		UV 254 nm	UV 366 nm	Penampak Noda
Aluminium triklorida (AlCl <sub>3</sub> )	0,22	Hitam	Biru	Hitam
Feri klorida (FeCl <sub>3</sub> 1%)	0,48	Hitam	Biru	Birukehitaman
Asam sulfat (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%)	0,48	Hitam	Biru	Merah muda
	0,61	Hitam	Cokelat	Merah muda
Liebermann-Burchad	-	-	-	-
Dragendorf	0,88	Hitam	Biru	Biru-hitam

### SIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat pada sampel umbi memberikan aktivitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan teridentifikasinya senyawa flavonoid (Rf 0,18) yang memberikan aktivitas penghambatan, sedangkan pada sampel daun terdapat dua fraksi (fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan) yang memberikan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri tersebut dengan teridentifikasinya senyawa steroid (Rf 0,62) dan senyawa terpenoid (Rf 0,48) dari fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan secara berurutan.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih diucapkan kepada Bapak Moh. Iqbal, M.Sc., dan Bapak Sahlan, S.Si., dari Laboratorium Biodiversitas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Tadulako yang telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

- Anisa N, Rostiati, Kadir S. Mutu bawang goreng dari bawang merah lembah Palu. e-J. Agrotekbis. 2013. 1 (1) : 37-43.
- Ansar M, Wahyudi I, Bahrudin. Growth and yield of shallot lembah palu variety on different direction and form of seedbeds growing on dry land. Agroland: The Agriculture Science Journal. 2016. 3(1) : 14– 21.
- Ete A dan Alam N. Karakteristik mutu bawang goreng palu sebelum penyimpanan. Jurnal Agroland. 2009. 16(4):273-280.
- Islami MY, Ibrahim N, Nugrahani AW. Studi etnofarmasi suku Kaili Moma di Kecamatan Kulawi Kabupaten Sigi Provinsi Sulawesi Tengah. Jurnal Farmasi Galenika. 2016. 3(1):27-33.
- Dianto I, Anam S, Khumaidi A. Studi etnofarmasi tumbuhan berkhasiat sebagai obat pada suku Kaili Ledo di Kabupaten Sigi Provinsi Sulawesi Tengah. Jurnal Farmasi Galenika. 2015. 1(2):85-91.
- Megawati, Anam S, Pitopang R. Studi etnobotanitumbuhan obat pada masyarakat suku Kaili Ija di Desa Bora Kecamatan Sigi Biromaru Kabupaten Sigi Sulawesi Tengah. Biocelebes. 2016. 10(1):76-90.
- Novitasiah HR, Yuniati E, Ramadhanil. Studi etnofarmasi komparatif tumbuhan rempah yang bernilai sebagai obat di Desa Tombi Kecamatan Ampibabo Kabupaten Parigi Moutong Sulawesi Tengah. Biocelebes. 2012.6(2):66-77.
- Mozin S, Rosyidi D, Sjojfan O, Widodo E. The effect of shallot (*Allium ascalonicum* L.) by-product as an antibacterial and alternative phytobiotic on characteristics of small intestine of broiler. Livestock Research for Rural Development. 2015. 27(4):1-4.
- Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, Fernandez X, Chemat F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the alliaceae family. Molecules. 2014. 19. 20034-20053; doi:10.3390/molecules191220034.
- Choma IM and Jesionek W. TLC-direct bioautography as a high throughput method for detection of antimicrobials in plants, Chromatography. 2015.2:225-238; doi:10.3390/chromatography2020225.
- Mohammadi-Motlagh HR, Mostafaie A, Mansour K. Anticancer and anti-inflammatory activities of shallot (*Allium ascalonicum*) extract. Arch Med Sci. 2011. 7 (1): 38-44. DOI: 10.5114/aoms.2011.20602.
- Arroy JDV, Ruiz-Espinosa H, Luna-Guevara JJ, Luna-Guevara ML, Hernández-Carranza P, Ávila-Sosa R & Ochoa-Velasco CE. Effect of solvents and extraction methods on total anthocyanins, phenolic compounds and antioxidant capacity of *Renealmia alpinia* (Rottb.) maas peel. Czech J. Food Sci. 2017. 35 (5): 456–465. doi: 10.17221/316/2016-CJFS.
- Yuniarti T. Potensi bawang-bawangan (*Allium spp.*) dalam menghambat pembentukan blackspot pada udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) [disertasi].

- Bogor : Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor; 2018. Hal. 71.
14. Deedad A, Samudin S, Ansar M. The growth of lembah palu shallot variety under various concentrations of atonic. *J. Agroland*. 2017. 24 (1) : 10 – 17 .
  15. Anni IA, Saptiningsih E, Haryanti S. Pengaruh naungan terhadap pertumbuhan dan produksi tanaman bawang daun (*Allium fistulosum* L.) di Bandungan, Jawa Tengah. *Jurnal Biologi*, 2013. 2 (3) : 31-40.
  16. Ababutain IM. Impact of solvent type on antibacterial activities of *Lawsonia inermis* leaves. *Journal of Food, Agriculture & Environment* Vol.13 (1): 51-53. 2015
  17. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of food and drug analysis*. 2014. 22: 296 -302.
  18. Samavati SF, Mohammadi-Motlagh HR , Mostafaie A. A highly pure sub-fraction of shallot extract with potent in vitro anti-angiogenic activity. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 2014 Autumn. 3(4): 237–245.
  19. Charoenchai L, Luprasong C, Meksuriyen D. Characterization of some organosulfur compounds in shallot bulbs. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences (TJPS)*. 2018. Vol.42 (Supplement Issue).
  20. Khalfallaha A, Berrehala D, Bensouicib C, Kabouchea A, Semraa Z, Voutquenne-Nazabadiokod L, Magidd AA & Kabouchea Z. Flavonoids, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Evax pygmaea*. *Pharmaceutical Biology*. 2017. 55 (1):2292–2296 <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1405997>.
  21. Bakht J, Khan S, Shafi M. Antimicrobial potentials of fresh *Allium cepa* against gram positive and gram negative bacteria and fungi. *Pak. J. Bot.* 2013. 45(S1): 1-6.
  22. Teshikaa JD, Zakariyyaha AM , Zaynaba T , Zenginb G, Rengasamyc KRR, Pandianc SK, Fawzia MM. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. 59(S1):S39–S70 <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1499074>.
  23. Ichikawa M, Ide N, Yoshida J, Yamaguchi H, Ono K. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54: 1535–1540.
  24. Chang TC, Chang HT , Chang ST , Lin SF , Chang YH , Jang HD. A comparative study on the total antioxidant and antimicrobial potentials of ethanolic extracts from various organ tissues of *Allium spp.* *Food and Nutrition Sciences*. 2013. 4: 182-190. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.48A022>.
  25. Ivanovaa A, Mikhovaa B, Najdenskib H, Tsvetkovab I, Kostovaa I. Chemical composition and antimicrobial activity of wild garlic *Allium ursinum* of Bulgarian origin. *Natural Product Communications*. 2009. 4 (8): 1059 – 1062.
  26. Miri SM, Roughani A. *Allium species* growing in Iran: Chemical compositions and pharmacological activity. *The First National Congress and International Fair of Medicinal Plants and Strategies for Persian Medicine that Affect Diabetes*. 2018.
  27. Cai L. Thin layer chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 6.3.1-6.3.18, Supplement 8. 2014. doi: 10.1002/9780470089941.et0603s08.
  28. Peşal A and Pырzyska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay, food analytical methods. 2014.7(9):1776-1782, doi 10.1007/s12161-014-9814-x.
  29. Sharma B, Agrawal SC, Gupta KC. Colour reactions of chalcones and their mechanism (a review), *Oriental Journal of Chemistry*. 2008. 24(1): 289-294.
  30. Fattorusso E, Iorizzi M, Lanzotti V, & Tagliatalata-Scafati O. Chemical composition of shallot (*Allium ascalonicum* Hort.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. 50 (20):5686-5690. doi: 10.1021/jf020396t.
  31. Cushnie TPT, Andrew J, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005. 26:343–356, doi:10.1016/j.ijantimicag.
  32. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. Thin layer chromatography in phytochemistry. *Chromatographic Science Series*. 2008. Volume 99. Boca Raton : CRC Press Taylor & Francis Group. p.528
  33. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al., Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes, antimicrobial agents and chemotherapy. 2005. 49(6):2474–2478. doi:10.1128/AAC.49.6.2474-2478.
  34. Doğan A, Otlı S, Çelebi Ö, Kiliçle PA, Sağlam AG, Doğan ANC, et al. An investigation of antibacterial effects of steroids, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2017. 41: 302-305. doi:10.3906/vet-1510-24.

## **Skrining Virtual dan Elusidasi Moda Ikatan Senyawa dalam Bawang Putih (*Allium sativum* L.) sebagai Penghambat Reseptor *Advanced Glycation End Products***

### **(Screening Virtual and Binding Mode Elucidation of Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) as an Inhibitor *Advanced Glycation End Products* Receptor)**

ESTI MULATSARI\*, ESTI MUMPUNI, IKHSAN RAMADHAN

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan

\*Penulis korespondensi, Hp : 085729086842

e-mail: estimulatsari@univpancasila.ac.id

Diterima 22 Juli 2019, Disetujui 26 September 2019

**Abstrak:** Diabetes memiliki dampak jangka panjang seperti aterosklerosis, nefropati, dan retinopati yang disebabkan oleh pembentukan *Advanced Glycation End Products* (AGEs). Penelitian secara *in vitro* pada ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) terhadap aktivitas penghambatan pembentukan AGEs telah banyak dilakukan, namun belum diketahui mekanisme penghambatan dan senyawa apa yang berperan aktif dalam aktivitas penghambatan tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining virtual senyawa – senyawa dalam bawang putih (*Allium sativum* L.) yang aktif menghambat reseptor *Advanced Glycation Endproduct* sehingga senyawa aktif bisa dipertimbangkan sebagai kandidat senyawa obat. Metode yang digunakan adalah *molecular docking* dengan software PLANTS, YASARA, *MarvinSketch*, dan visualisasi ikatan senyawa uji pada asam amino reseptor menggunakan PyMOL, piridoksamin dan aminoguanidin digunakan sebagai kontrol positif inhibitor AGEs. Hasil docking 24 senyawa uji diperoleh tujuh senyawa yang aktif menghambat reseptor 3B75.pdb dan lima senyawa aktif menghambat reseptor 3O3U.pdb. Kandidat senyawa obat terdiri dari senyawa organosulfur, fenol dan flavonoid. Senyawa  $\gamma$ -glutamyl-sistein, E-ajoene,  $N\alpha$ -(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)-L-Arginin, Kaempferol-3-o- $\beta$ -D-glukopiranososa, Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glukopiranososa merupakan senyawa – senyawa dalam bawang putih yang memiliki kemampuan menghambat baik reseptor 3B75 maupun 3O3U dengan aktivitas yang lebih baik dari piridoksamin dan aminoguanidin.

**Kata kunci:** Inhibitor, *advanced glycation endproducts*, diabetes, bawang putih (*Allium sativum* L.)

**Abstract:** Diabetic has long-term effects such as atherosclerosis, nephropathy, and retinopathy caused by the formation of *Advanced Glycation End Products* (AGEs). In vitro studies on garlic extract (*Allium sativum* L.) have been carried out on the inhibition activity of AGEs formation, but inhibitory mechanisms and which active compounds are involved in these activities are unknown. This study aims to do a virtual screening of garlic compounds (*Allium sativum* L.) on *Advanced Glycation Endproduct* receptors so that active compounds can be considered as candidates for drug compounds. The method used is molecular docking with PLANTS, YASARA, *MarvinSketch* software, and visualization of test compound bonds on receptor amino acids using PyMOL. Pyridoxamine and Aminoguanidine as a positive control of AGEs inhibitors. The docking results of 24 test compounds obtained seven compounds that active in inhibiting 3B75 receptor and five compounds in 3O3U receptor. Candidates for drug compounds consist of organosulfur, phenols and flavonoids.  $\gamma$ -glutamyl-cysteine, E-ajoene,  $N\alpha$ -(1-Deoxy-Dfructose-1-YL)-L-Arginine, Kaempferol-3-o- $\beta$ -D-glucopyranose, and Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glucopyranose are compounds in garlic which have an ability to inhibit 3B75 and 3O3U receptors and predicted have better activity than pyridoxamine and aminoguanidine.

**Keywords:** Inhibitor, *advanced glycation endproducts*, diabetic, garlic (*Allium sativum* L.)

## PENDAHULUAN

HIPERGLIKEMIA dalam jangka waktu lama menyebabkan terbentuknya AGEs yang mana akan berujung pada akumulasi di berbagai jaringan sehingga dapat meningkatkan stress oksidatif. Hal ini akan memicu sistem pertahanan tubuh untuk mengeliminasi produk tersebut dengan menggunakan makrofag dengan reseptor *advanced glycosylation*, makrofag akan mengsekresikan TNF- $\alpha$  dan ILE-1 (*pro-inflammatory cytokine*) yang dapat menyebabkan inflamasi lokal pada pembuluh darah, hal inilah yang mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati serta menjadi awal mula berbagai komplikasi pada penderita diabetes<sup>(1)</sup>.

Penghambatan pembentukan AGEs pada penyakit diabetes dapat membatasi kerusakan jaringan, memperlambat progresivitas penyakit dan meningkatkan kualitas hidup, untuk itu diperlukan obat yang dapat mencegah pembentukan senyawa AGEs (*Inhibitor Advance Glycation End Product*) baik obat modern maupun obat tradisional yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Pemanfaatan tanaman obat di Indonesia pada saat ini semakin meningkat, dan Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki berbagai jenis tanaman obat. Bawang putih (*Allium sativum* L.) adalah bahan alami yang sering digunakan masyarakat untuk pengobatan, seperti mengurangi kolesterol dan menjaga kadar glukosa darah<sup>(2)</sup>. Berbagai penelitian telah dilakukan mengenai aktivitas inhibisi terhadap reseptor *advance glycation end product* dari berbagai senyawa alamiah, antara lain ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L.) yang terbukti dapat menghambat pembentukan AGEs secara *in vitro* dengan S-metil-sistein (SMC) sebagai kandungan terbanyak<sup>(2,3)</sup>. Namun belum diketahui senyawa apa saja dari kandungan bawang putih (*Allium sativum* L.) yang memiliki efek penghambatan terhadap pembentukan AGEs serta belum ada penjelasan pasti tentang mekanisme penghambatannya terhadap reseptor AGEs. RAGE (*Receptor Advanced Glycation End product*) adalah reseptor transmembran (*G-protein-coupled receptor*), merupakan protein permukaan sel multifungsi dari sistem kekebalan tubuh manusia yang dianggap memiliki peran penting pada diabetes, peradangan kronis, penyakit neurodegeneratif dan kanker. Struktur RAGE terbagi menjadi lima domain, terdiri dari sitoplasmik domain yang bertanggungjawab pada transduksi sinyal, transmembrane domain, variable domain tempat mengikat ligan, dan dua domain konstan<sup>(4)</sup>. RAGE diketahui terlibat dalam berbagai keadaan patologis terkait peradangan. Aktivasi RAGE dan transduksi sinyal yang dihasilkan tergantung pada jenis dan

konsentrasi ligan yang berikatan pada reseptor. RAGE dapat berinteraksi dengan berbagai ligand terutama *advanced glycation end products* (AGEs), amfoterin (HMGB1), keluarga protein S10<sup>(5)</sup>.

Piridoksamin dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap pembentukan AGEs, menghambat modifikasi kimiawi protein dan mengikat senyawa reaktif yang berasal dari karbohidrat dan lemak<sup>(6)</sup>. Oleh karena itu, pada penelitian ini digunakan piridoksamin sebagai kontrol positif untuk dibandingkan dengan senyawa uji. Skrining virtual dilakukan secara *in silico* dengan melakukan docking senyawa uji pada RAGE. Software yang digunakan antara lain ChemSketch, YASARA dan PyMol, serta PLANTS sebagai operator docking ligan-reseptor. *Score docking* dinyatakan dalam bentuk ChemPLP yang menentukan afinitas interaksi ligan-reseptor<sup>(7)</sup>. Metode ini telah banyak digunakan untuk uji aktivitas biologis suatu senyawa seperti uji aktivitas senyawa sebagai antibakteri, antioksidan, dan antikanker<sup>(8-9)</sup>. Dari penelitian ini diharapkan dapat diketahui senyawa dalam bawang putih (*Allium sativum* L.) yang dapat dijadikan kandidat senyawa obat penghambat pembentukan AGEs.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Struktur virtual 2D senyawa dalam bawang putih (*Allium sativum* L.) : Gamma-glutamyl-sistein, 3-(Allylsulphonyl)-L-alanine, Diallyl thiosulfinate, Diallil disulfida (DADS), Diallil sulfida (DAS), Diallil trisulfida (DATS), Metalil sulfida, Dipropil sulfida, Dipropil disulfida, Allil merkaptan, Allil metil sulfida, E-ajoene, 2-vinil-(4H)-1,3-dithiin, Selenometionin, S-propilsistein (SPC), S-etil-sistein (SEC), Smetil-sistein (SMC), Selenosistein, Se-(metil)selenosistein, kempferol-3-O- $\beta$ -Dglukopiranos, iso-rhamnetin-3-O- $\beta$ -Dglukopiranos, N $\alpha$ -(1-deoxy-Dfructose-1-yl)-L-arginin, S-alil sistein (SAC), S-allilmerkaptosistein (SAMC) [10]. Reseptor *advance glycation end product* (RAGE) dengan kode pdb : 3B75, 4IW2, 3O3U , 2MOV [11]. Struktur 2D piridoksamin dan aminoguanidin.

**Alat.** Software : Protein-Ligand ANT System (PLANTS) yang dapat diunduh di <http://www.tcd.uni-konstanz.de/index.php>. YASARA yang dapat diunduh di : <http://www.yasara.org/viewdl.htm>, ChemSketch yang dapat diunduh di: <http://www.chemaxon.com/marvin/download-user.html>, PyMOL yang dapat diunduh di: <https://pymol.org> Hardware : Laptop ASUS A455L Intel Core i3-4005U 1,7GHz, NVIDIA 930M, 64-bit Operating System.

**METODE.** Secara umum metode penelitian yang digunakan mengacu pada prosedur *molecular*

*docking* dengan PLANTS oleh Korb O, et al, 2006 dan Purnomo, H, 2011<sup>(12,13)</sup>.

**Preparasi Reseptor.** Struktur komplek protein dalam format (.pdb) didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB) di-download dari situs <http://www.rscb.org/> dipreparasi kembali dengan program YASARA dari prosedur ini dapat diperoleh tiga file yaitu protein. mol2, ref\_ligand.mol2 dan ligand.mol2.

**Preparasi Ligan Protein, Ligan Pembeding, dan Ligan Uji.** Preparasi ligan protein, ligan senyawa pembeding, ligan senyawa uji dengan MarvinSketch pada pH 7,4, Ligan disimpan sebagai *ligand\_2D*. mrv., Pilih *Conformational search* lalu simpan hasil pencarian konformasi sebagai ligan dan tipe file .mol2., Prosedur diatas dilakukan untuk setiap satu ligan.

**Penentuan nilai RMSD.** *Native* ligan yang sudah dipreparasi, lalu dioptimasi dengan struktur kristal protein menggunakan program PLANTS hingga didapat score. Dipilih score terbaik lalu disimpan dalam bentuk file mol 2. Dihitung besarnya nilai RMSD pose hasil optimasi dengan referensi hasil eksperimen atau struktur kristal protein dengan program YASARA.

**Docking Ligan Pembeding Terhadap Reseptor.** Dari tiga file yang diperoleh dari prosedur preparasi protein kemudian dilakukan docking dengan menggunakan program PLANTS, dengan mengetik *command* pada lembar kerja cmd, program PLANTS akan membaca protokol plantsconfig yang telah di set sebelumnya hingga diperoleh besarnya nilai best score dari ligan senyawa pembeding yang nantinya akan dibandingkan dengan nilai best score dari ligan senyawa uji.

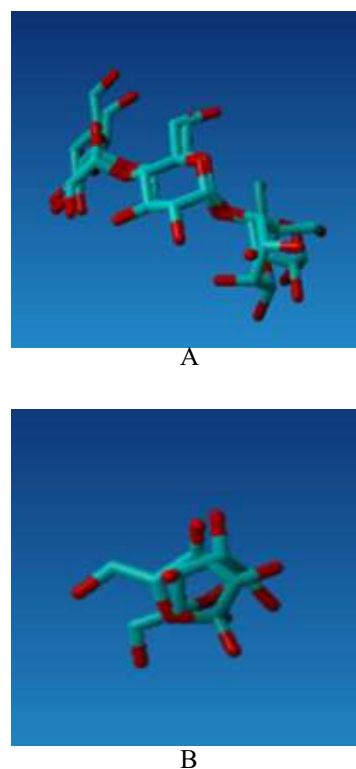
**Docking Ligan Uji Terhadap Reseptor.** Pada prosedur ini dilakukan docking antara masing-masing ligan senyawa uji menggunakan program PLANTS. Hasil docking diperoleh nilai *best score* ligan senyawa uji, nilai inilah yang akan dibandingkan dengan best score ligan senyawa pembeding.

**Visualisasi Interaksi Ligan dan Reseptor.** Langkah selanjutnya adalah membuat file hasil docking dari masing-masing ligan senyawa uji dengan program YASARA (tipe file.pdb). File hasil *docking* inilah yang akan divisualisasi dan diinterpretasi untuk diketahui interaksi-interaksi yang terjadi menggunakan aplikasi PyMOL.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Reseptor yang digunakan dalam metode *molecular docking* merupakan struktur yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB) dalam bentuk kristal yang sudah

disesuaikan dengan struktur asli dari reseptor pada tubuh manusia serta memiliki nilai resolusi yang baik. Nilai resolusi atau biasa disebut dengan *Root Mean Square Deviation* (RMSD) didapatkan dengan validasi reseptor menggunakan metode molecular docking, dipilih reseptor yang menghasilkan nilai RMSD kurang dari atau sama dengan 2 Å. (Tabel 1). Dari empat jenis reseptor *advanced glycation end products* yang divalidasi, diperoleh dua reseptor yang memenuhi persyaratan yaitu dengan kode PDB : 3B75 dan 3O3U, reseptor ini memenuhi syarat RMSD kurang dari atau sama dengan 2 Å. Validasi protokol molecular docking dengan RMSD kurang dari 2Å bertujuan agar posisi ligan yang berikatan pada sisi aktif protein (*active site*) pergeserannya tidak terlalu jauh karena konversi dari 2 Å sama dengan 0,2 nm sesuai dengan kisaran ukuran diameter suatu atom yaitu sekitar 0,1 nm. Superposisi dari ligand referensi dengan ligand hasil docking ditunjukkan oleh Gambar 1.



**Gambar 1.** *Alignment* posisi *ligand* referensi dengan *ligand* hasil *docking* A) Hasil RMSD reseptor 3O3U B) Hasil RMSD reseptor 3B75

*Docking* dilakukan pada sisi aktif dari reseptor dengan senyawa pembeding dan senyawa uji. Score ChemPLP yang diperoleh dari native ligand, senyawa pembeding dan senyawa uji pada sisi aktif reseptor dibandingkan satu sama lain. Nilai ChemPLP merepresentasikan energi bebas Gibbs, dimana semakin kecil nilai  $\Delta G$  interaksi ligan dengan

reseptor akan semakin stabil<sup>(14,15)</sup>. Score ChemPLP pada piridoksamin dan aminoguanidin menunjukkan korelasi dengan pengujian secara *in vitro*. Aktivitas piridoksamin dalam penghambatan pembentukan

AGEs secara *in vitro* lebih baik dibandingkan dengan aminoguanidin, sesuai dengan score ChemPLP piridoksamin yang lebih negatif (Tabel 2).

**Tabel 1. Nilai RMSD Reseptor *Advanced Glycation Endproduct*.**

No.	Reseptor	Kode	RMSD (Å)
1	<i>Crystal Structure of Glycated Human Haemoglobin</i>	3B75	2,0465
2	<i>Human Serum Albumin-glucose complex</i>	4IW2	2,8766
3	<i>Crystal Structure of Human Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)</i>	3O3U	1,3517
4	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Specifically Recognizes Methylglyoxal derived AGEs,</i>	2MOV	4,0200

**Tabel 2. Score ChemPLP senyawa pembanding.**

<i>In Silico</i>	Reseptor		Score (ChemPLP)	
		<i>Native ligand</i>	Piridoksamin	Aminoguanidin
	3B75	-52,8628	-55,6736	-43,0837
	3O3U	-100,4580	-72,0426	-50,5360
Inhibisi pembentukan AGEs secara <i>in vitro</i> dengan konsentrasi 10 mM (21)			20,4%	15%

Hasil *docking* senyawa uji yaitu senyawa-senyawa dalam bawang putih ditunjukkan oleh Tabel 3. Hasil *docking* senyawa-senyawa di dalam bawang putih pada reseptor 3B75 menunjukkan kandidat senyawa aktif yang memiliki aktivitas yang lebih baik atau setara dengan pembandingnya (piridoksamin) sebanyak tujuh senyawa dari dua puluh empat senyawa uji. Beberapa dari senyawa tersebut merupakan turunan alami dari senyawa inti pada bawang putih (*Allium sativum* L.) yaitu senyawa organosulfur dan flavonoid. Senyawa dengan nilai ChemPLP terbaik (paling negatif) ialah senyawa N $\alpha$ -(1-Deoksi-D-fructosa-1-YL)-L-Arginin. Senyawa ini potensial dikembangkan untuk kandidat obat sebagai penghambat reseptor 3B75. Reseptor 3B75.pdb merupakan struktur kristal hemoglobin manusia yang terglykasi, dimana terdapat ikatan antara glukosa dengan sisi aktif hemoglobin, yang pada akhirnya produk hasil glykasi ini akan menjadi proses awal dari terbentuknya AGEs. Inhibisi pada reseptor-reseptor tersebut akan mencegah pembentukan AGEs di dalam tubuh. Pada reseptor 3O3U.pdb diperoleh lima senyawa yang memiliki *score* ChemPLP lebih negatif dari senyawa pembanding dengan senyawa Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glukopiranosida yang memiliki nilai paling negatif. Reseptor 3O3U.pdb adalah struktur kristal dari reseptor *advanced glycation end products*, dimana pada enzim ini terdapat interaksi

antara reseptor dengan *native ligand* berupa protein yang terglykasi, interaksi keduanya dapat memicu timbulnya inflamasi di dalam tubuh. Dengan demikian inhibisi pada reseptor ini akan mencegah terjadinya inflamasi lokal pada jaringan sehingga mencegah terjadinya komplikasi akibat diabetes..

Dari hasil yang didapatkan, beberapa senyawa yang memiliki afinitas kuat terhadap reseptor diprediksi mempunyai aktivitas penghambatan pembentukan AGEs berdasarkan aktivitas senyawa pembanding. Senyawa  $\gamma$ -glutamil-sistein, E-ajoene, N $\alpha$ -(1-Deoksi-D-fructosa-1-YL)-L-Arginin, Kaempferol-3-o- $\beta$ -D-glukopiranosida, Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glukopiranosida merupakan senyawa – senyawa dalam bawang putih yang memiliki kemampuan menghambat baik reseptor 3B75 maupun 3O3U. Senyawa Ekstrak bawang putih telah dibuktikan aktivitas penghambatan pembentukan AGEs pada penelitian sebelumnya<sup>(2)</sup>.

Interaksi senyawa – senyawa aktif dengan asam amino pada bindingsite reseptor ditunjukkan pada Gambar 2. Gambar 2 menunjukkan konformasi *ligand*, posisi ligand dalam *bindingsite* reseptor dan asam amino – asam amino yang berinteraksi. Salah satu interaksi yang terjadi antara ligand dan asam amino ialah terbentuknya ikatan hidrogen ikatan tersebut terbentuk pada jarak – jarak tertentu sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 4. Dari hasil visualisasi,

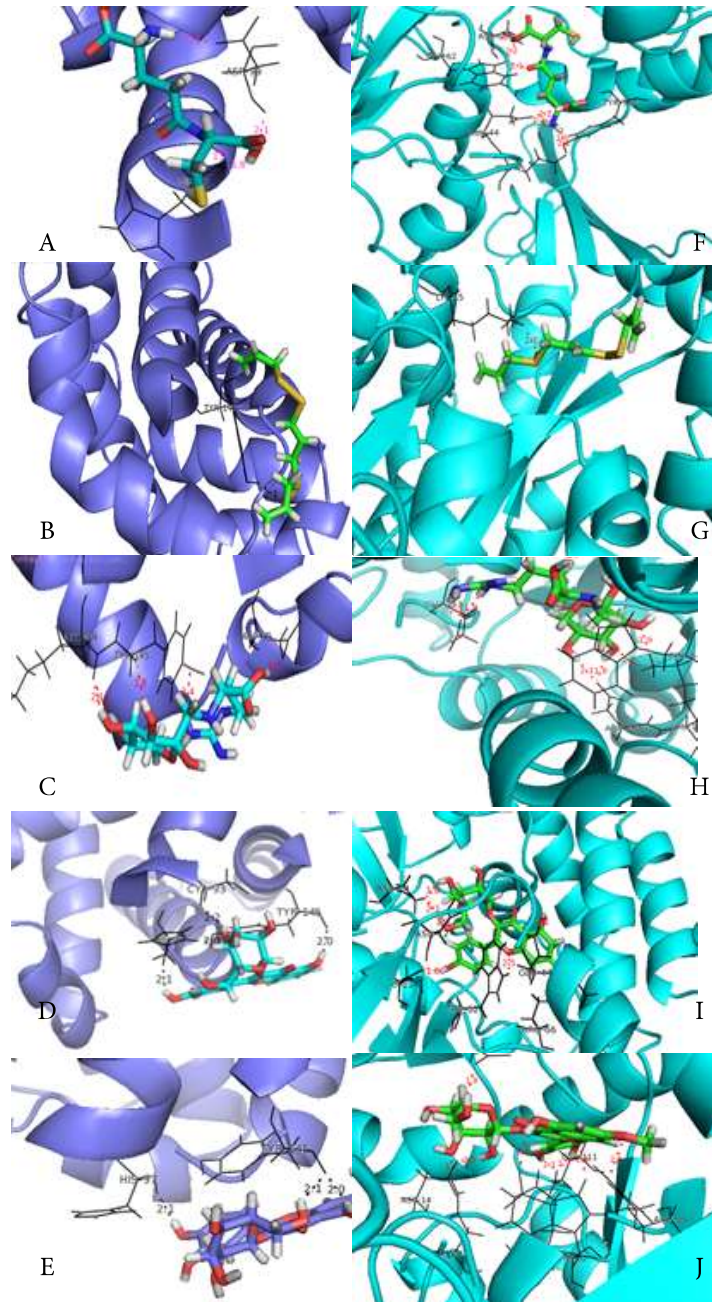
diperoleh asam amino yang berperan penting terhadap afinitas senyawa uji pada reseptor 3B75, yaitu : ASP-99, HIS-97, TYR-145, LYS-144, CYS-93. Asam amino yang berperan adalah asam aspartat (ASP), histidin (HIS), triosin (TYR), lisin (LYS), sistein (CYS). Letak ikatan senyawa uji pada asam amino di reseptor 3B75 kurang lebih sesuai dengan ikatan *native ligand* pada asam amino reseptor, yaitu pada ASP-99, HIS-97, TYR-145, THR-38 dan CYS-93. Sedangkan asam amino yang berperan penting terhadap afinitas senyawa uji pada reseptor 3O3U, yaitu : GLU-45,

GLU-44, GLU-111, GLU-153, ASP-14, ASP-65, ARG-66, ASN-12, TYR 341, TRP-62, TRP-340, LYS-15, SER-337. Asam amino yang berperan adalah asam glutamat (GLU), asam aspartat (ASP), arginin (ARG), asparagin (ASN), triosin (TYR), triptofan (TRP), lisin (LYS), serin (SER). Letak ikatan senyawa uji pada asam amino di reseptor 3B75 kurang lebih sesuai dengan ikatan *native ligand* pada asam amino reseptor, yaitu pada GLU-44, GLU111, GLU-153, ASP-14, ASP-65, ARG-66, TYR-155, TRP-62 sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 3<sup>(16,17)</sup>.

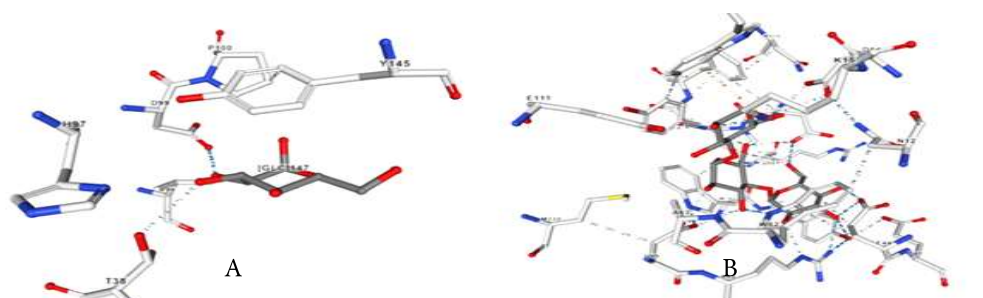
**Tabel 3. Score ChemPLP senyawa–senyawa dalam bawang putih.**

No	Senyawa Uji	Nilai ChemPLP	
		Reseptor 3B75 Pembanding (Piridoksamin) - -55,6736	Reseptor 3O3U Pembanding (Piridoksamin) - 72,0426
1	? -glutamil-sistein	-63,2606	-82,2877
2	3-(allilsulfinil)-l-alanin	-54,9378	-68,3679
3	Diallyl thiosulfinate	-40,8349	-54,2105
4	Diallil sulfida	-47,2528	-57,8295
5	Diallil disulfida	-48,9827	-59,9141
6	Diallil trisulfida	-50,7523	-63,4587
7	Dipropil sulfida	-46,6395	-56,8507
8	Dipropil disulfida	-48,3996	-59,4590
9	Metalil sulfida	-52,7606	-63,4595
10	Allil metil sulfida	-41,1645	-50,4572
11	Allil merkaptan	-37,8241	-46,1420
12	E-ajoene	-59,1436	-81,9154
13	2-vinil-(4h)-1,3-dithiin	-47,6077	-57,0295
14	S-metil-sistein	-51,4021	-60,1852
15	S-etil-sistein	-53,6580	-63,2132
16	S-propilsistein	-56,1459	-67,9839
17	S-alil sistein	-55,4593	-68,9643
18	S-allilmerkaptosistein	-58,7543	-70,0091
19	Selenosistein	-47,2377	-53,4695
20	Selenometionin	-42,7372	-64,2301
21	Se-(metil)selenosistein	-50,9521	-61,3888
22	N $\alpha$ -(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)- L-Arginin	-75,5167	-98,1765
23	Kempferol-3-o- $\beta$ -Dglukopiranososa	-65,7408	-85,3187
24	Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D- glukopiranososa	-71,1706	-99,7423





Gambar 2. Interaksi ligand dengan reseptor pada *binding site* reseptor A)  $\gamma$ -glutamil-sistein-3B75.pdb. B) E-ajoene-3B75.pdb. C)  $\alpha$ -(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)-L-Arginin-3B75.pdb. D) Kempferol-3-o- $\beta$ -D-glukopiranos-3B75.pdb. E) Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glukopiranos-3B75.pdb. F)  $\gamma$ -glutamil-sistein. G) E-ajoene-3O3U.pdb. H)  $\alpha$ -(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)-L-Arginin-3O3U.pdb. I) Kempferol-3-o- $\beta$ -D-glukopiranos-3O3U.pdb. J) Iso-rhamnetin-3-o- $\beta$ -D-glukopiranos-3O3U.pdb.



Gambar 3. A) ikatan *native ligand* pada asam amino reseptor 3B75 B) ikatan *native ligand* pada asam amino reseptor 3O3U.



Tabel 5. Asam Amino yang berinteraksi dengan ligand.

Senyawa uji	3B75		3O3U	
	Asam amino	Panjang ikatan (Å)	Asam amino	Panjang ikatan (Å)
γ -glutamil-sistein	ASP-99 HIS-97	2,1 1,7 1,8	GLU-45	2,1
			GLU-44	2,0
			ASP-65	2,5
			TYR 341	2,1
			TRP-62	2,2
E-ajoen	TYR-145	2,3	LYS-15	2,1
Nα-(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)-L-Arginin,	ASP-99 LYS-144 TYR-145	2,1 2,1 1,8 2,4	GLU-153	1,9
			ASP-14	2,1
			ASP-65	1,5
			TRP-62	2,1
			LYS-15	1,9
			LYS-15	2,2
Kempferol-3-o-β-D-glukopiranos	CYS-93 HIS-97 TYR-145	2,2 2,0 2,1 2,0	ARG-66	2,2
			GLU-44	2,1
			TRP-62	2,5
			ASN-12	2,3
			ASP-14	1,8
Iso-rhamnetin-3-o-β-D-glukopiranos	HIS-97 TYR-145	2,1 2,0 2,1	GLU-111	2,1
			GLU-111	1,8
			GLU-153	1,8
			ARG-66	2,6
			GLU-44	2,1
			GLU-153	1,8
			TRP-62	2,4
ASN-12	1,7			
ASP-14	2,1			
GLU-111	1,7			
GLU-111	2,1			

## SIMPULAN

Hasil *docking* 24 senyawa uji diperoleh tujuh senyawa aktif menghambat reseptor 3B75.pdb dan lima senyawa aktif menghambat reseptor 3O3U.pdb. Kandidat senyawa obat terdiri dari senyawa organosulfur, fenol dan flavonoid. Senyawa γ-glutamil-sistein, E-ajoene, Nα-(1-Deoksi-Dfructosa-1-YL)-L-Arginin, Kaempferol-3-o-β-D-glukopiranos, Iso-rhamnetin-3-o-β-D-glukopiranos merupakan senyawa – senyawa dalam bawang putih yang memiliki kemampuan menghambat baik reseptor 3B75 maupun 3O3U.

## DAFTAR PUSTAKA

- Rashid G, Korzets Z, Bernheim J, 2006, Advanced glycation end products stimulate tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta secretion by peritoneal macrophages in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis, *Isr Med Assoc J*, 8(1):36–9.
- Sovia E, Jenderal U, Yani A, 2014, Aktivitas inhibisi ekstrak bawang putih dan S-metil sistein terhadap reaksi glikasi albumin secara in vitro, *Maranatha Journal of Medicine and Health*, 98 – 109.
- Singh R, Morinda citrifolia L, 2012, (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties, *J Diabetes Endocrinol*, 3(6):77–91.
- Neeper M, Marie A, Brett J, Yanq S Du, Pan YE, Elliston K, et al, 1992, Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins, *J Biol Chem*, 30 : 14998–5004.
- Penumutthu SR, Chou R-H, and Yu C, Structural Insights into Calcium-Bound S100P and the V Domain of the RAGE Complex, *PLoS ONE* 2014 ; 9(8): e103947, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103947>
- Adrover M, Vilanova B, Frau J, Muñoz F, and Donoso J, 2008, The pyridoxamine action on Amadori compounds : A reexamination of its scavenging capacity and chelating effect, *Bioorg Med Chem*,

- 16:5557–69,
7. Saputri KE, Fakhmi N, Kusumaningtyas E, Priyatama D, Santoso B, 2016, Docking molekular potensi anti diabetes melitus tipe 2 turunan zerumbon sebagai inhibitor aldosa reduktase dengan autodock-vina, *Chim Nat Acta*, 4(1):16,
  8. Purwangana A, Mumpuni E, Mulatsari E, In vitro and In silico antibacterial activity of 1,5-bis(3'-ethoxy-4'-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one, *Int J, Pham Pham Sci* 2018 ;(10) 5 : 71–6.
  9. Mumpuni E and Mulatsari E, 2018, Molecular Docking and Toxicity Test of Apigenin Derivative Compounds as an Anti-Aging Agent, *J Applied Chem, Sci*, 5(1): 409-13.
  10. Anita Y, Radifar, M., Kardono, L,B., & Hanafi, M, & Istyantono, E,P., Structure-based design of eugenol analogs as potential estrogen receptor antagonists, *Bioinformation*, 2012 ; 8 (19) : 901 – 6.
  11. Triana V, 2006, Macam-macam vitamin dan fungsinya dalam tubuh manusia, *J Kesehat Masy*, 40–7.
  12. Korb O, Stützle T, Exner TE, 2006, PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design, *Lect notes Comput Sci vol 4150 Ant colony Optim swarm Intell - ANTS2006 Proc*, 4150 : 247–58.
  13. Purnomo H, 2011, Molecular docking PLANTS (Penambatan molekul PLANTS) (Protein-Ligand-Ant-System), Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
  14. Balavignesh V, Srinivasan E, Ramesh Babu NG, Saravanan N, 2013, Molecular docking study on NS5B polymerase of hepatitis c virus by a screening of volatile compounds from acacia concinna and ADMET prediction, *Int J Pharm Life Sci*, 4 : 2548 – 58.
  15. Kumar KM, Anitha P, Sivasakthi V, Bag S, Lavanya P, Anbarasu A, et al, 2014, In silico study on penicillin derivatives and cephalosporins for upper respiratory tract bacterial pathogens, *Biotech*, 4 : 241-51.
  16. <https://www.rcsb.org/3d-view/3B75?preset=ligandInteraction&sele=GLC> diakses 3 Juni 2018
  17. <https://www.rcsb.org/3d-view/3O3U?preset=ligandInteraction&sele=MLR> diakses 3 Juni 2018

**Uji In Vitro dan Studi *In Silico*  
Senyawa Turunan *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide  
sebagai Kandidat Antituberkulosis**

**(In Vitro and In Silico Study of *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide  
as Antituberculosis Candidate)**

RUSWANTO RUSWANTO<sup>1\*</sup>, NUR RAHAYUNINGSIH<sup>1</sup>, NUR LAELI DWI HIDAYATI<sup>1</sup>,  
GINNA SRI NURYANI<sup>1</sup>, RICHA MARDIANINGRUM<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bakti Tunas Husada Tasikmalaya,  
Jl. Cilolohan No. 36 Kota Tasikmalaya 46115

<sup>2</sup>Program Studi Farmasi Fakultas Kesehatan, Universitas Perjuangan Tasikmalaya  
Jl. Pembela Tanah Air 177 Kota Tasikmalaya 46115

\*Penulis korespondensi, Hp : 082121745574

e-mail: ruswanto@stikes-bth.ac.id

**Diterima 29 Januari 2019, Disetujui 12 September 2019**

**Abstrak:** Telah dilakukan penelitian tentang studi *in vitro* dan *in silico* senyawa turunan *N*-Benzoylisonicotinohydrazide. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bahwa senyawa turunan *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide dapat menghambat aktivitas bakteri gram positif, gram negatif, dan *Mycobacterium tuberculosis*, serta mempunyai interaksi yang baik dengan *enoyl-acyl carrier protein reductase* dari *Mycobacterium tuberculosis*. Dari uji *in vitro* dihasilkan bahwa senyawa *N'*-Benzoylisonicotinohydrazide memiliki *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedangkan besarnya MIC senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) adalah sebesar 3,125 µg/mL. Dari studi *in silico* didapat bahwa nilai *binding affinity* antara senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dan enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) mempunyai *binding affinity* yang paling kecil sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut mempunyai interaksi yang stabil dan paling baik dibanding senyawa-senyawa lainnya. Dengan demikian, senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dapat digunakan sebagai kandidat antituberkulosis yang lebih poten.

**Kata kunci:** Tuberculosis, *in vitro*, *in silico*, *N*-Benzoylisonicotinohydrazide.

**Abstract:** There have been *in silico* and *in vitro* studies of *N*-Benzoylisonicotinohydrazide derivatives as antituberculosis candidates. The aims of this research were determined that the *N'*-benzoylisonicotinohydrazide derivatives could inhibit the activity of gram-positive, gram-negative, and *Mycobacterium tuberculosis*, as well as having good interactions with *enoyl-acyl carrier protein reductase* from *Mycobacterium tuberculosis*. From the *in vitro* test it was found that the *N'*-benzoylisonicotinohydrazide compound had a *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) of 0.33 µg/mL against the *Bacillus subtilis*, while the MIC of *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide against *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) was 3.125 µg/mL. From the *in silico* study, it was found that the *binding affinity* value between *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide enzyme *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) had the smallest *binding affinity* so that it could be predicted that it had a stable interaction than other compounds. Therefore the *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide could be used as a more potent antituberculosis candidate.

**Keywords:** Tuberculosis, *in vitro*, *in silico*, *N*-Benzoylisonicotinohydrazide.

## PENDAHULUAN

TUBERKULOSIS merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikrobakteria. Mikrobakteria penyebab tuberkulosis yaitu *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv), dapat ditularkan melalui udara saat pasien tuberkulosis batuk dan percikan ludah yang mengandung bakteri tersebut terhirup oleh orang lain saat bernafas. *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) merupakan suatu basil gram positif. Basil mikrobakteri ini sangat sukar dibunuh dan sesudah pengobatan kemoterapi eliminasi basil dari tubuh sangat lambat sehingga pengobatan infeksi mikrobakteri memerlukan waktu lama<sup>(1)</sup>.

Salah satu pengobatan tuberkulosis dapat menggunakan obat isoniazid. Penemuan isoniazid adalah tonggak utama dalam kemoterapi tuberkulosis. Isoniazid merupakan salah satu senyawa yang banyak digunakan dalam penemuan dan pengembangan obat. Banyak peneliti yang telah melakukan pengembangan obat dengan modifikasi molekul dan mensintesis turunan isoniazid yang bertujuan untuk mendapatkan senyawa baru, dimana beberapa turunan isoniazid menunjukkan aktivitas isoniazid terhadap tuberkulosis<sup>(2-5)</sup>.

Untuk mengurangi resistensi obat antituberkulosis seperti isoniazid, banyak peneliti melakukan pengembangan obat untuk menemukan senyawa baru dengan aktivitas yang lebih baik. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan sintesis tiga senyawa turunan *isonicotinohydrazide* yaitu senyawa *N'-(4-fluorobenzoyl)-isonicotinohydrazide*, *N'-(3-bromobenzoyl) isonicotinohydrazide*, *N'-(3-chlorobenzoyl) isonicotinohydrazide*<sup>(6)</sup>.

Dalam pengembangan obat tidak hanya modifikasi molekul dan sintesis senyawa, tetapi perlu dilakukannya penelitian secara *in vitro* terhadap senyawa yang telah dimodifikasi<sup>(7)</sup>. Untuk membuktikan bahwa tiga senyawa turunan isoniazid yang telah disintesis mempunyai aktivitas sebagai kandidat anti tuberkulosis, maka peneliti telah melakukan uji secara *in vitro* terhadap bakteri gram positif dan spesies mikrobakteri termasuk *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv). Selain uji *in vitro*, peneliti juga telah melakukan studi interaksi secara *in silico* antara senyawa-senyawa tersebut dengan enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* dari *Mycobacterium tuberculosis*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Turunan senyawa isoniazid yaitu *N-Benzoylisonicotinohydrazide* (a), *N'-(2-*

*Chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide* (b), *N'-(2-Flurobenzoyl)isonicotinohydrazide* (c) dan isoniazid (d). Bahan-bahan dalam studi *in silico* diantaranya struktur senyawa turunan isoniazid yang dibuat dengan *MarvinSketch* versi 5.2.5.1 dan reseptor tuberkulosis yang didapatkan dari *Protein Data Bank* (PDB) dengan alamat web <http://www.rcsb.org/pdb/>. Bahan dalam studi *in vitro* yaitu tiga senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohydrazide*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, media *Middlebrook 7H9*, media natrium agar, *Mueller hinton agar*, resazurin, NaCl, dimetilsulfoksida, aquadest steril.

**Alat.** Peralatan untuk studi *in silico* diantaranya perangkat keras berupa komputer dengan spesifikasi model sistem: Acer dengan *processor* N2840 RAM (*Random Acces Memory*) 2 gigabyte, perangkat lunak yang digunakan adalah *AutoDock*, *Marvin Sketch* versi 5.2.5.1, *Pose view*, *PreADMET*. Peralatan untuk studi *in vitro* adalah cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, jarum ose, erlenmeyer, *beaker glass*, pipet mikro, bunsen, besi pelubang, *autoclave*, inkubator, rak tabung, pipet ukur, *microplate*, *laminar air flow*.

**METODE. Studi In Vitro: Uji Aktivitas Antibakteri.** Suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 1 mL, dimasukan media *mueller hinton agar* 20 mL, dihomogenkan dengan cara digoyangkan membentuk angka delapan dan tunggu media sampai padat. Kemudian dilakukan metode sumuran dengan cara dibuat 4 lubang yang akan dimasukan larutan uji dengan konsentrasi bervariasi 100-0,195 µg/mL. Kemudian diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam<sup>(8)</sup>.

**Uji Aktivitas Antituberkulosis.** Uji antimikobakteri dilakukan dengan *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). Larutan senyawa dengan konsentrasi 100-0,195 µg/mL yang telah dilarutkan dimasukan kedalam *microplate* untuk pengontakan dengan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* sebanyak 30 µL. Media *middlebrook 7H9* sebanyak 100 µL dimasukan kedalam setiap sumur pada *microtiter plate*. Setelah 7 hari inkubasi, 30 µL larutan resazurin ditambahkan ke setiap sumur dan kembali diinkubasi 24 jam. Setelah hari ke 8, diamati apakah terjadi perubahan warna dari biru (bakteri tidak tumbuh) proses oksidasi menjadi merah muda (bakteri tumbuh) proses reduksi<sup>(9)</sup>.

**Studi In Silico: Screening Ligand Based Drug Likeness.** *Drug Scan* digunakan untuk mengamati sifat kesamaan dengan obat yang telah ada (*drug likeness*) dilakukan menggunakan aturan *the rule of good medicine* (*Lipiniski's rule of five*) dan bioavailabilitas oral dari ligan. Parameter yang digunakan diantaranya berat molekul <500 g/mol, lipofilitas <5, donor

ikatan hidrogen <5, aseptor ikatan hidrogen <10 dan *refractory molar* antara 40-130. Parameter tersebut ditentukan menggunakan *software MarvinSketch 5.2.5.1*<sup>(10,11)</sup>.

**Preparasi Ligan.** Ligan digambar menggunakan *software MarvinSketch 5.2.5.1* dalam bentuk dua dimensi selanjutnya dilakukan optimasi geometri pada ligan, diprotonasi pada pH 7,4. Ligan disimpan dengan format *file.mrv*. Kemudian dilakukan *Conformational search* lalu simpan hasil pencarian konformasi dengan format *file .mol2*<sup>(12,13)</sup>.

**Validasi Metode Docking.** Parameter yang digunakan untuk validasi *docking* ini adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Metode *docking* dikatakan valid apabila nilai RMSD yang diperoleh adalah  $\leq 2$ <sup>(14-15)</sup>.

**Docking Ligan Uji terhadap Reseptor.** Untuk melakukan *docking* dari senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide* digunakan *software Autodock*. Reseptor hasil validasi dimasukkan ke dalam *software* tersebut lalu digunakan ligan alami yang digunakan untuk proses validasi. Selanjutnya *gridbox* diatur sesuai dengan hasil yang telah dipakai untuk proses validasi. Hasil yang diperoleh berupa *binding affinity* terendah dan konstanta inhibisi<sup>(16)</sup>.

**Prediksi ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion) dan Toksisitas.** Pada penelitian ini dilakukan prediksi ADME pada senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide*. Struktur senyawa ini dikonversi menjadi *mol file* (\*.mol) lalu dimasukkan pada program *PreADMET*, yang secara otomatis menghitung penyerapan prediksi untuk sel Caco-2, HIA (*Human Intestinal Absorption*), dan protein plasma yang terikat. Kemudian dilakukan uji toksisitas terhadap senyawa turunan *N-benzoylisonicotinohidrazide* dengan program *PreADMET*<sup>(17)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Studi In Vitro: Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif.

Penentuan uji aktivitas antibakteri pada senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide*, *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide*, dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide* bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis*) dan gram negatif (*Escherichia coli*).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1. Aktivitas tertinggi pada konsentrasi 100  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan aktivitas terendah senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide* pada konsentrasi 0,781  $\mu\text{g/mL}$ , *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide* pada konsentrasi 12,5  $\mu\text{g/mL}$  dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide* pada konsentrasi 1,562  $\mu\text{g/mL}$ . Uji aktivitas antibakteri ketiga senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohidrazide* menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan terbentuknya zona hambat (bakteriostatik).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif *Bacillus subtilis* dapat dilihat pada Tabel 2. Uji aktivitas terhadap bakteri *Bacillus subtilis* menunjukkan bahwa senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohidrazide* memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan adanya zona hambat yang terbentuk. Senyawa *N'-benzoylisonicotinohidrazide* memberikan aktivitas yang lebih baik dibandingkan senyawa *N'-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide* dan *N'-(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide*, hal ini dikarenakan senyawa tersebut memiliki konsentrasi paling rendah yaitu 0,391  $\mu\text{g/mL}$  sehingga mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *Bacillus subtilis*.

Tabel 1. Diameter daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
0,195	0	0	0
0,391	0	0	0
0,781	2,20 $\pm$ 0,14	0	0
1,562	3,35 $\pm$ 0,21	0	3,70 $\pm$ 0,07
3,125	5,60 $\pm$ 0,14	0	4,05 $\pm$ 0,42
6,25	5,40 $\pm$ 0,14	0	4,70 $\pm$ 0,07
12,5	6,35 $\pm$ 0,21	4,35 $\pm$ 0,57	5,13 $\pm$ 0,04
25	8,50 $\pm$ 0,28	4,75 $\pm$ 0,71	5,31 $\pm$ 0,06
50	9,90 $\pm$ 0,42	4,90 $\pm$ 0,64	5,85 $\pm$ 0,71
100	16,50 $\pm$ 0,42	5,13 $\pm$ 0,88	6,05 $\pm$ 0,85

Tabel 2. Diameter daya hambat terhadap *Bacillus subtilis*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
0,195	0	0	0
0,391	4,25 ± 0,07	0	0
0,781	4,60 ± 0,14	0	0
1,562	4,85 ± 0,07	0	0
3,125	5,30 ± 0,28	3,30 ± 0,07	2,55 ± 0,42
6,25	6,40 ± 0,14	3,65 ± 0,15	3,10 ± 0,07
12,5	6,90 ± 0,28	3,80 ± 0,07	3,35 ± 0,28
25	7,45 ± 0,07	4,00 ± 0,21	3,50 ± 0,35
50	7,60 ± 0,14	4,60 ± 0,07	3,80 ± 0,07
100	8,30 ± 0,71	5,30 ± 0,49	4,40 ± 0,64

Tabel 3. Diameter daya hambat terhadap *Escherichia coli*.

Konsentrasi	Daya hambat (mm)		
	N-Benzoyl	2-Cloro	2-Floro
0,195	0	0	0
0,391	0	0	0
0,781	3,18 ± 0,11	0	0
1,562	3,28 ± 0,04	0	0
3,125	3,40 ± 0,07	0	2,80 ± 0,07
6,25	3,60 ± 0,07	0	3,00 ± 0,14
12,5	3,73 ± 0,04	2,85 ± 0,42	3,25 ± 0,14
25	3,90 ± 0,07	3,20 ± 0,07	3,58 ± 0,14
50	3,95 ± 0,28	3,60 ± 0,35	3,80 ± 0,07
100	4,65 ± 0,42	4,50 ± 0,49	4,00 ± 0,64

Hasil pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram negatif *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 3. Dari hasil uji aktivitas senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide terhadap bakteri *Escherichia coli*, ketiga senyawa tersebut dapat memberikan aktivitas dengan adanya daya hambat yang terbentuk. Namun aktivitas yang lebih baik terdapat pada senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide dengan konsentrasi terendah 0,781 µg/mL dengan diameter zona hambat 3,18 mm. Sifat aktivitas antibakteri ditentukan berdasarkan diameter zona hambat, dimana zona hambat yang dihasilkan termasuk kategori sangat lemah. Menurut Muharni (2017), suatu antibakteri atau antibiotik dikatakan mempunyai aktivitas terhadap bakteri jika mempunyai kekuatan sebagai berikut: bila memberikan nilai zona hambat dengan ukuran 6-10 mm dikategorikan lemah, 11-20 mm dikategorikan aktif, dan 21-30 mm atau lebih dikategorikan sangat aktif. Perbedaan zona hambatan untuk masing-masing konsentrasi dapat disebabkan oleh perbedaan besar kecilnya konsentrasi<sup>(18)</sup>.

Uji aktivitas antibakteri dari senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazine dilakukan dengan metode difusi sumuran. Berdasarkan Prayoga (2013), kelebihan dari metode sumuran yaitu terjadi proses osmolaritas konsentrasi yang lebih tinggi dari metode difusi *disk*. Pada metode sumuran setiap lubang diisi dengan konsentrasi larutan senyawa maka osmolaritas terjadi lebih menyeluruh dan lebih homogen serta konsentrasi yang dihasilkan lebih tinggi dan lebih kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri<sup>(19)</sup>.

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki hambatan tertinggi terhadap pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif pada konsentrasi 100 µg/mL, hal ini sesuai yang dikatakan oleh Auliyah (2016) bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi aktivitas antibakteri, sehingga terbentuknya zona hambat yang kuat. Senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki struktur kimia yang terdapat atom N, kontribusi atom N dapat memberikan efektifitas interaksi kimiawi dengan

reseptor pada masing-masing bakteri. Sehingga senyawa kimia memiliki struktur yang spesifik dengan fungsi yang spesifik, artinya senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide secara in vitro dapat berfungsi sebagai antibakteri<sup>(20)</sup>.

Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO (dimetil sulfoksida) tidak memiliki aktivitas, akan tetapi berfungsi untuk melarutkan suatu senyawa hasil sintesis atau pun ekstrak, sedangkan kontrol positif menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Untuk pengujian ini, antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif yaitu isoniazid.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri dari senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, dilakukan uji penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari konsentrasi terendah yang memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli*.

**Hasil Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).** Penentuan MIC dilakukan terhadap bakteri gram positif dan negatif berdasarkan konsentrasi terendah dari aktivitas masing-masing senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide. Hasil penentuan MIC dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4 pada penentuan MIC terhadap bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa dari ketiga senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide mampu memberikan aktivitas MIC pada konsentrasi 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis* dibandingkan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hal ini dikarenakan bakteri *Bacillus subtilis* memiliki struktur dinding sel bakteri lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja.

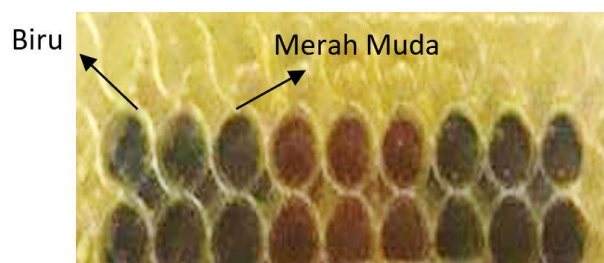
Pada bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki peptidoglikan pada dinding sel lebih tebal sehingga membentuk suatu struktur yang kaku. Sedangkan bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli* merupakan kelompok bakteri gram negatif yang mempunyai sifat kurang rentan terhadap beberapa antibiotik. Struktur dinding sel bakteri gram negatif relatif lebih kompleks dan berlapis tiga dimana lapisan luar berupa lipoprotein,

lapisan tengah berupa lipopolisakarida, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan. Berdasarkan Mambang (2014), salah satu mekanisme antibiotik ialah merusak struktur dinding sel pada membran plasma sehingga kemampuan membran plasma sel bakteri sebagai penghalang osmosis menjadi berkurang dan mengganggu sejumlah biosintesis yang diperlukan dalam membran<sup>(21)</sup>.

**Hasil Uji Aktivitas Antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv).** Uji aktivitas antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) dilakukan menggunakan metode *Resazurin Microtiter Assay* (REMA). Metode REMA merupakan salah satu metode yang baru dikembangkan dimana dapat memberikan hasil uji sensitivitas obat antituberkulosis (OAT) yang cepat dan tepat dengan pengerjaan yang lebih sederhana<sup>(9)</sup>.

Pada metode REMA pembacaan hasil dilakukan dengan melihat warna yang terbentuk. Pada hari ke-8 tidak ada perubahan warna pada medium yang telah diberikan indikator resazurin maka hasil dinyatakan negatif. Metode ini menggunakan medium cair *middlebrook* 7H9 dan pengamatannya menggunakan indikator redoks yaitu resazurin. Resazurin memiliki warna biru yang tidak berfluoresens dan dapat tereduksi menjadi warna merah muda yang berfluoresens dalam bentuk resorufin, dimana berubah warna ini untuk mendeteksi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*<sup>(22)</sup>. Adapun perubahan warna pada pengujian *Mycobacterium tuberculosis* terdapat pada Gambar 1.

*Mycobacterium tuberculosis* merupakan penyebab penyakit tuberkulosis. Munculnya strain resisten antibiotik spesies ini menggarisbawahi kebutuhan



Gambar 1. Pengujian *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabel 4. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

Jenis Bakteri	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (µg/mL)			
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro	INH (+)
<b>Gram Positif</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,65	10,42	1,21	6,25
<i>Bacillus subtilis</i>	0,33	2,26	2,35	3,13
<b>Gram Negatif</b>				
<i>Escherichia coli</i>	0,65	10,42	2,35	2,60

obat baru yang efektif terhadap mikobakteria yang resisten terhadap obat antituberkulosis lini pertama. Penggunaan obat yang resisten ini dapat dikembangkan dengan mencari turunan dari suatu senyawa obat untuk didapatkan efektivitasnya sebagai antimikobakteri. Isoniazid merupakan obat lini pertama yang sudah resisten penggunaannya, maka dalam penelitian ini senyawa turunan isoniazid dilakukan uji secara *in vitro* terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) untuk mengetahui aktivitas senyawa obat baru sebagai obat antituberkulosis (Tabel 5).

Dari hasil penelitian ketiga senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv), akan tetapi senyawa *N'*-(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide memiliki potensi yang lebih besar untuk menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) dengan nilai MIC 3,125 µg/mL dari konsentrasi tertinggi 100 µg/mL. Hal ini karena senyawa turunan senyawa *N'*-benzoylisonicotinohidrazide memiliki lipofilitas yang lebih tinggi daripada kontrol positif yaitu isoniazid, sehingga senyawa tersebut lebih mudah masuk ke dalam sel bakteri.

Menurut Setiabudy (2016), isoniazid secara *in vitro* bersifat tuberkulostatik dan tuberkulosis. Isoniazid dapat menghambat biosintesis asam mikolat yang merupakan unsur penting dalam dinding sel mikrobakterium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai MIC 3,125 µg/mL<sup>(23)</sup>.

**Studi *In Silico*: Docking.** Proses *docking* menggunakan program *AutoDock*. Reseptor yang digunakan adalah 1KZN, 1JJJ dan 2x23. Pada proses validasi ini nilai yang dilihat adalah nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD). Reseptor 1JJJ dan 2x23

memiliki nilai RMSD ≤ 2 Å. Akan tetapi reseptor 1KZN tidak memenuhi syarat dimana nilai RMSD ≥ 2 Å, sehingga reseptor 1KZN dianalisis kualitas stereokimianya (Ramachandran Plot). Hasil analisis menggunakan Ramachandran Plot diperoleh nilai *disallowed region* berada dibawah 0,8% yaitu 0,6%. Pada analisis reseptor juga dilakukan dengan melihat nilai *most favored region* (daerah yang disukai) dimana kualitas yang baik memiliki persentase *most favored region* lebih besar dari 50%. Hasil menunjukkan persentase *most favored region* sebesar 89,9%.

Berdasarkan hasil *docking* antara senyawa dengan reseptor diperoleh konformasi senyawa dengan energi terkecil. Semakin kecil nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan senyawa semakin tinggi begitu pula sebaliknya semakin besar nilai *binding affinity* maka afinitas antara reseptor dengan senyawa semakin rendah<sup>(24)</sup>. Nilai *binding affinity* senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide dapat dilihat pada Tabel 6. Dari data yang diperoleh ditunjukkan bahwa pada reseptor antibakteri menunjukkan nilai energi bebas ikatan (*binding affinity*) senyawa uji lebih rendah daripada ligan alami dan senyawa pembanding sehingga interaksi obat dengan reseptor stabil. Sedangkan pada reseptor tuberkulosis nilai *binding affinity* dari ketiga senyawa uji yang lebih rendah yaitu *N'*-(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide sebesar -7,50 kkal/mol, ligan alami sebesar -7,31 kkal/mol, dan isoniazid -4,47 kkal/mol. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa uji lebih baik dari ligan alami dan isoniazid karena energi bebas ikatannya lebih rendah dari isoniazid sehingga interaksi tersebut stabil.

**Visualisasi Hasil *Docking*.** Visualisasi hasil *docking* dilakukan untuk mengetahui interaksi antara senyawa dengan residu asam amino dari reseptor

Tabel 5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv).

Jenis bakteri	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)			
	N-Benzoyl	2-Chloro	2-Fluro	INH (+)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	25	3,125	6,26	3,125

Tabel 6. Perbandingan nilai *binding affinity* senyawa turunan *N'*-benzoylisonicotinohidrazide, ligan alami dan isoniazid.

Kode PDB	Senyawa	Nilai <i>binding affinity</i> (kkal/mol)	Konstanta inhibisi (µM)
1KZN	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-6,72	11,84
	Isoniazid	-4,91	251,72
	Ligan Alami	-5,42	105,62
1JJJ	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-6,71	12,07
	Isoniazid	-4,54	467,73
	Ligan Alami	-6,15	31,15
2x23	<i>N'</i> -benzoylisonicotinohidrazide	-7,02	7,1
	<i>N'</i> -(2-Chlorobenzoyl)isonicotinohidrazide	-7,50	3,2
	<i>N'</i> -(2-flurobenzoyl)isonicotinohidrazide	-6,35	22,18
	Isoniazid	-4,47	528,83
	Ligan Alami	-7,31	4,39



Tabel 7. Hasil visualisasi ligan pada reseptor.

PDB ID	Ligan	Asam amino	
		Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
1KZN	Ligan alami	Arg136	Pro79, Ile90, Asn46, Ala47
	Ligan uji	Asn46	Glu50, Ile78
1JIJ	Ligan alami	Asp40, Asp195, Asp177, Gly38, His50	Gly38
	Ligan uji	Gly193, Gly38	Cys37, Gly38
2x23	Ligan alami	Tyr158	Ala157, Met103, Ile215, Ile202, Val203, Met161, Ala198, Leu218, Phe149
	Ligan uji	Ile194, Pro156	Phe149

1KZN, 1JIJ dan 2X23. Adapun interaksi senyawa dapat dilihat pada Tabel 7. Berdasarkan data hasil visualisasi, semakin banyak ikatan ligan dengan asam amino reseptor maka semakin dekat jarak antara ikatan, maka ikatan yang dihasilkan akan semakin stabil (kuat) dan baik. Adanya ikatan hidrogen dapat mempengaruhi sifat fisika kimia obat sehingga berperan penting terhadap aktivitas biologis obat.

**Screening Ligand Based Drug Likeness.** Dari hasil uji *drug scan* diketahui bahwa senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide* memiliki berat molekul <500 g/mol sehingga senyawa akan mudah diabsorpsi. Log P <5 berhubungan dengan lipofilitas atau hidrofobisitas molekul obat yaitu kemampuan suatu senyawa kimia untuk larut dalam lemak, minyak, lipid, atau pelarut non polar. Donor ikatan hidrogen <5 dan aseptor ikatan hidrogen <10 berhubungan dengan aktivitas biologis dari molekul obat. *Refractory molar* antara 40-130 dimana nilai ini merupakan ukuran nilai total polarisabilitas dari molekul obat. Sehingga semua senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide*

memenuhi aturan Lipinski. Hasil *Drug Scan Likeness* terdapat pada Tabel 8.

**Prediksi ADME dan Toksisitas.** Prediksi ADME ini dilakukan untuk memprediksi sifat farmakokinetik yaitu absorpsi, distribusi, metabolisme, dan eliminasi didalam tubuh secara *in silico*. Parameter yang digunakan diantaranya Caco-2 digunakan untuk menentukan nilai permeabilitas senyawa, parameter HIA (*Human intestinal Absorption*) untuk memprediksikan proses penyerapan obat didalam usus manusia, dan parameter *Protein Plasma Binding* untuk mengetahui nilai dalam persen suatu obat yang terikat dengan protein plasma. Tabel 8 menunjukkan bahwa semua senyawa turunan *N'-benzoylisonicotinohydrazide* memenuhi syarat dimana Caco-2 4-70 nm/sec, HIA 70-100 %, *Protein Plasma Binding* 90 %. Hasil data prediksi ADME dan toksisitas terdapat pada Tabel 9. Pada uji toksisitas hasil menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut memiliki efek mutagenik.

Tabel 8. Hasil *drug scan*.

Parameter	Hasil		
	N-benzoyl	2-Chloro	2-Fluro
Berat Molekul	241,245	275,69	259,236
Lipofilisitas (Log P)	0,87	1,47	1,01
Donor ikatan hidrogen	2	2	2
Aseptor ikatan hidrogen	5	6	6
Refraktori molar	66,52	71,32	66,73

Tabel 9. Hasil *drug scan*.

Senyawa	Parameter	Hasil	Keterangan
<i>N'-(2-Chloro benzoyl)isonicotinohydrazide</i>	Caco-2 (nm/sec)	18,5589	Sedang
	HIA (%)	93,057875	Baik
	<i>Plasma protein binding</i> (%)	81,444766	Ikatan Kimia Lemah
<i>N'-benzoyl isonicotinohydrazide</i>	Caco-2 (nm/sec)	21,0139	Sedang
	HIA (%)	91,917087	Baik
	<i>Plasma protein binding</i> (%)	69,713785	Ikatan Kimia Lemah

## SIMPULAN

Senyawa *N'*-benzoylisonicotinohydrazide memiliki MIC sebesar 0,33 µg/mL terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, sedangkan besarnya MIC senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (H<sub>37</sub>Rv) adalah sebesar 3,125 µg/mL. Dari studi *in silico* dapat dilihat bahwa nilai *binding affinity* antara senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide enzim *enoyl-acyl carrier protein reductase* (2X23) mempunyai *binding affinity* yang paling kecil sehingga dapat diprediksi bahwa senyawa tersebut mempunyai interaksi yang stabil dan paling baik dibanding senyawa-senyawa lainnya sehingga senyawa *N'*-(2-chlorobenzoyl)isonicotinohydrazide dapat digunakan sebagai kandidat antituberkulosis yang lebih poten.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi atas dana hibah penelitian PDUPT 2017-2019.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Siswandono. Kimia Medisinal edisi II. Surabaya: Airlangga University Press. 2016.
2. Alea GV, Lagua FMG, Caparas MNS. Synthesis and Characterization of Methyl-2-hydroxy-5- [(1)-1-[2-zinylidene] butyl} benzoate, a New Isonicotinoyl hydrazone Derivative of Methyl Salicylate. DLSU Research Congress Manila. 2014; 1-5.
3. Cassano R, Trombino S, Ferrarelli T, Cavalcanti P, Giraldi C, Lai F, et al. Synthesis, characterization and in-vitro antitubercular activity of isoniazid-gelatin conjugate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2012. 64(5). 712–8. DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01461.x.
4. Coelho TS, Cantos JB, Bispo MLF, Gonçalves RSB, Lima CHS, da Silva PEA, et al. In vitro antimycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene) isonicotinohydrazide derivatives against isoniazid-resistant strains. *Infectious Disease Reports*. 2012. 4(1), 49–51. DOI: 10.4081/idr.2012.e13.
5. Hearn M. and Cynamon M. In Vitro and In Vivo Activities of Acylated Derivatives of Isoniazid Against *Mycobacterium tuberculosis*. *Drug Design and Discovery*. 2003. 18(4), 103–8. DOI: 10.1080/10559610390450705.
6. Ruswanto, Mardianingrum R, Nofianti T, and Rahayuningsih N. Synthesis and Molecular Docking of Isonicotinohydrazide Derivatives as Anti-tuberculosis Candidates. *Mal. J. Fund. Appl. Sci.* 2019; 15(3). 367-71
7. Tiruveedhula., et al. Design and synthesis of novel antimicrobials with activity against Gram-positive bacteria and mycobacterial species, including *M. tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2013; 7830–40.
8. Zaenab, dkk. Uji antibakteri siwak (*Salvadora persica* Linn.) terhadap *Streptococcus mutans* (ATC31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*. *Makara Kesehatan*. 2004; 8(2):37-40.[diakses 16 Mei 2014]. <http://journal.ui.ac.id/health/article/download/287/283>.
9. Purnamasari., et al. Perbandingan Metode Proporsi dengan Metode *Resazurin Microtiter Assay* (Rema) untuk Deteksi *Mycobacterium tuberculosis* yang Resisten Terhadap Rifampisin. *Jurnal Medula*. 2015. 2(2).
10. Choy YB and Prausnit, MR. The rule of five for non-oral routes of drug delivery: Ophthalmic, inhalation and transdermal. *Pharmaceutical Research*. 2011. 28(5). 943–8. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0292-6>.
11. Athar M, Lone MY, Jha PC. First protein drug target's appraisal of lead-likeness descriptors to unfold the intervening chemical space. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2017. 72: 272–82. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.12.019>.
12. Ruswanto R, Nofianti T, Mardianingrum R, Lestari T, Sepriyani A. Desain dan Studi In Silico Senyawa Turunan Kuwanon-H sebagai Kandidat Obat Anti HIV Design and In Silico Study of Kuwanon-H as Anti HIV Drug Candidate. *Jurnal Kimia Valensi*. 2018. 4(1): 57–66.
13. Ruswanto, Mardianingrum R, Novitriani K. Sintesis Dan Studi in Silico Senyawa 3-NitroN'-[( Pyridin-4-YI Carbonyl] Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis. *Jurnal Chimica et Natura Acta*. 2015. 3(2): 54-61.
14. Trott O, dan Olson AJ. Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2009. ol. 31, No. 2.
15. Herlina T, Mardianingrum R, Gaffar S, Supratman U. Isoquinoline Alkaloids from *Erythrinapoeppigiana* (Leguminosae) and Cytotoxic Activity Against Breast Cancer Cells Line MCF-7 In Silico. *J. Phys.: Conf. Ser.* 821. 2017. doi:10.1088/1742-6596/812/1/012091.
16. Ruswanto R, Mardianingrum R, Lestari T, Nofianti T, Tuslinah L, dan Nurmalik D. In silico study of the active compounds in bitter melon (*Momordica charantia* L) as antidiabetic medication. *Pharmaciana*. 2018.8(2). 176–194.
17. Ruswanto, Richa M, Tita N, Tresna L. Molecular Docking of 1-Benzoyl-3-Methylthiourea as Anti Cancer Candidate and Its Absorption, Distribution, and Toxicity Prediction. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017. 9(5): 680–4.
18. Muharni, Fitrya., dan Sofa F. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Mushi di

- Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2017. 7(2). 127-35.
19. Prayoga. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* [Skripsi]. Jakarta : Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Prodi Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah. 2013.
  20. Auliyah, P. Efek Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella thypi* [Skripsi]. Universitas Taduloka. 2016.
  21. Mambang., Rosidah., dan Dwi Suryanto. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tempe Terhadap Bakteri *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. 2014. 25(1).
  22. Syahputra, Gita. Resazurin si Indikator Aktivitas Sel. BioTrends. 2015. 6(2).
  23. Setiabudy, R. Farmakologi dan Terapi Edisi 6. Jakarta : FKUI. 2016.
  24. Ruswanto, Mardianingrum R, Novitriani K. Sintesis Dan Studi in Silico Senyawa 3-NitroN<sup>3</sup>-[( Pyridin-4-YI) Carbonyl] Benzohydrazide Sebagai Kandidat Antituberkulosis. Chimica et Natura Acta. 2015. 3(2).

## **Pengaruh Metode Ekstraksi terhadap Kandungan Senyawa Polifenol dan Aktivitas Antioksidan pada *Rubus fraxinifolius* (Effect of Extraction Method on Polyphenol Content and Antioxidant Activity of *Rubus fraxinifolius*)**

YESI DESMIATY<sup>1,2</sup>, BERNA ELYA<sup>1\*</sup>, FADLINA CHANY SAPUTRI<sup>1</sup>, IIS IRAWATTY DEWI<sup>2</sup>,  
MUHAMMAD HANAFI<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta

<sup>3</sup>Pusat Penelitian Kimia Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Serpong

\*Penulis korespondensi, Hp : 08122044958

e-mail: [berna.elya@farmasi.ui.ac.id](mailto:berna.elya@farmasi.ui.ac.id)

Diterima 13 Agustus 2019, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Tanaman *Rubus fraxinifolius* dapat ditemukan di daerah pegunungan Jawa Barat. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Kandungan senyawa polifenol pada tanaman berkontribusi secara substansial terhadap aktivitas antioksidan dan metode ekstraksi akan mempengaruhi kandungan senyawa yang tersari. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi pengaruh metode ekstraksi organ daun, buah muda, dan batang *R. fraxinifolius* terhadap kandungan polifenol serta aktivitas antioksidannya. Bagian daun, buah, dan batang *R. fraxinifolius* diekstraksi cair padat secara maserasi, refluks, dan Soxhlet menggunakan pelarut metanol. Terhadap masing-masing ekstrak dilakukan penetapan kadar polifenol total dengan pereaksi Folin-Ciocalteu serta uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH. Rendemen ekstrak terbanyak adalah ekstrak refluks daun *R. fraxinifolius* sebesar 30,20%. Kandungan polifenol total tertinggi adalah pada ekstrak Soxhlet daun *R. fraxinifolius* sebesar 48,79 mg GAE/g ekstrak. Aktivitas antioksidan tertinggi yaitu ekstrak Soxhlet daun *R. fraxinifolius* sebesar 98,29% pada 100 bpj. Dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *R. fraxinifolius* yang diekstraksi secara Soxhlet memiliki kandungan polifenol serta aktivitas antioksidan tertinggi.

**Kata kunci:** *Rubus fraxinifolius*, metode ekstraksi, rendemen, polifenolat, antioksidan.

**Abstract:** *Rubus fraxinifolius* can be founded in the mountainous regions of West Java. Previous studies have shown that this plant has potent antioxidant activity. The content of polyphenol compounds in this species contributes substantially to antioxidant activity, and the extraction method will affect the content of the compound. In this study, an evaluation of the extraction method effect on leaves, young fruits, and stems of *R. fraxinifolius* on the content of polyphenols and their antioxidant activity, have been done. The leaves, fruits, and stems of *R. fraxinifolius* were extracted by maceration, reflux, and Soxhlet using methanol as a solvent. Each extract was determined the total polyphenol content using Folin-Ciocalteu reagent and antioxidant activity test using DPPH reduction method. The highest extract yield was *R. fraxinifolius* leaf reflux extract (30.20%). The highest total polyphenol content was given by the Soxhlet extract of leaf *R. fraxinifolius* (48.79 mg GAE/g extract). The highest antioxidant activity was leaf Soxhlet extract of *R. fraxinifolius* (98.29% at 100 ppm). From this study it was shown that the methanol extract of *R. fraxinifolius* leaves extracted by soxhlet gave the highest polyphenol content and antioxidant activity.

**Keywords:** *Rubus fraxinifolius*, extraction method, extract yield, polyphenol, antioxidant.

## PENDAHULUAN

GENUS *Rubus* dari familia *rosaceae* yang ditemukan terdistribusi luas diseluruh dunia. Ditemukan sekitar 50 spesies di Asia Tenggara dan Australia. *Rubus* ini umumnya tumbuh pada daratan tinggi dengan ketinggian diatas 1000 m dpl<sup>(1)</sup>. *Rubus fraxinifolius* adalah salah satu *Rubus* yang banyak ditemukan di daerah pengunungan di Indonesia. Di daerah Jawa Barat dikenal dengan nama "arben", buahnya dapat dimakan dan dijual secara komersial. Buahnya mengandung gula yang cukup tinggi, vit C, serta zat besi<sup>(2)</sup>.

Beberapa pustaka menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan kandungan polifenolat serta flavonoid yang tinggi. Secara tradisional, tanaman ini dikenal berkhasiat dalam meredakan *morning sickness*, anti diare, disentri, memperkuat kehamilan, membantu persalinan, serta digunakan dalam meredakan kram menstruasi<sup>(3-6)</sup>. Organ daun dan batang *R. fraxinifolius* tidak dimanfaatkan oleh masyarakat. Batang arben berduri tajam serta tidak ada informasi penggunaan tradisional dari daun arben sehingga penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan dan manfaat lain dari tanaman ini.

Metode ekstraksi yang dilakukan terhadap suatu simplisia akan mempengaruhi kandungan senyawa yang tersari pada ekstrak. Untuk mendapatkan ekstrak yang memiliki aktivitas biologi tertinggi serta dalam pengembangan produk herbal, maka perlu dilakukan observasi metode ekstraksi yang menghasilkan kandungan senyawa aktif terbaik. Metode ekstraksi konvensional yang umum digunakan adalah dengan cara maserasi, refluks, dan Soxhlet. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan 3 cara yaitu maserasi, refluks, dan Soxhlet dengan parameter rendemen, kadar polifenolat, serta aktivitas antioksidan terhadap organ daun, buah, dan batang *R. fraxinifolius*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Daun, batang, dan buah muda *R. fraxinifolius*, metanol teknis (Brataco), pereaksi Folin-Ciocalteu (Sigma), natrium karbonat, asam galat (Sigma), DPPH (Sigma).

**METODE. Penyiapan Simplisia dan Ekstrak.** Daun, batang, dan buah muda *R. fraxinifolius* diperoleh dari daerah Cibodas, Jawa Barat, dideterminasi di Lembaga Biologi, LIPI, Cibinong. Semua bahan dibersihkan, dikering anginkan hingga diperoleh simplisia kering dan dihaluskan hingga derajat halus 4/18. Terhadap sejumlah 50 gram serbuk simplisia,

masing-masing dilakukan ekstraksi cair padat yaitu maserasi (250 mL x 3), Soxhlet (750 mL), dan refluks (250 mL x 3) menggunakan metanol sebagai pelarut. Masing-masing ekstrak diuapkan pada rotavapor dan dikeringkan di atas tangas air.

**Penetapan Kadar Polifenolat Total.** Pengujian dilakukan menggunakan metode *microplate* modifikasi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu<sup>(7)</sup>. Sejumlah 20 µL masing-masing ekstrak dalam metanol dicampur dengan larutan Folin-Ciocalteu (Sigma) (1:4 dalam air suling) dalam sumuran *96-nunc microplate*, kemudian ditambahkan 80 µL natrium karbonat (100 g/L). Campuran diinkubasi selama 2 jam dan serapan diukur pada 750 nm menggunakan *Versamac microplate spectrophotometer*. Kadar akhir ekstrak dalam sumuran adalah 100 bpj. Selanjutnya serapan ekstrak di plot pada kurva kalibrasi asam galat sebagai larutan standar sehingga diperoleh angka kesetaraan asam galat dalam mg GAE/g ekstrak.

**Uji aktivitas antioksidan.** Penentuan aktivitas antioksidan didasarkan pada kemampuan ekstrak dalam meredam radikal bebas DPPH menggunakan metode *microplate* yang dimodifikasi<sup>(7)</sup>. Sejumlah 180 µL larutan DPPH dalam metanol (6 mg/100 mL) dicampur dengan 20 µL ekstrak pada sumuran *96-nunc microplate* sehingga diperoleh kadar akhir ekstrak 100 bpj per sumuran. Campuran dikocok dan diinkubasi pada suhu kamar terlindung cahaya selama 30 menit. Pengukuran serapan ekstrak dilakukan menggunakan alat *microplate reader* (Versamac) pada panjang gelombang 516 nm dengan larutan kontrol adalah larutan DPPH dalam metanol. Dihitung persen peredaman radikal bebas DPPH masing-masing secara triplo.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Cair Padat (ECP) adalah suatu fenomena perpindahan massa, yaitu zat terkandung dalam matriks padat bermigrasi ke pelarut yang kontak dengan matriks. Fenomena transportasi massa ini dapat ditingkatkan dengan perubahan gradien konsentrasi, koefisien difusi, atau merusak membran sel. Efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh kondisi proses.

Beberapa faktor akan mempengaruhi konsentrasi komponen yang diinginkan dalam ekstrak seperti suhu, rasio cairan-padat, laju alir, dan ukuran partikel. Misalnya, kandungan polifenolat ekstrak almon ditemukan tiga kali lebih tinggi bila proses ECP dilakukan pada suhu 50 °C jika dibandingkan ekstraksi pada suhu 25 °C. Waktu kontak dan rasio cairan-padat juga menjadi variabel yang signifikan. Metode ekstraksi beberapa senyawa polifenolat

lebih efektif menggunakan metanol atau etanol asam sebagai pengekstraksi<sup>(8)</sup>.

Dari hasil ekstraksi, dapat terlihat bahwa rendemen tertinggi adalah daun *R. fraxinifolius* yang diperoleh dengan cara refluks (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa metode panas dapat menyari senyawa yang terkandung dalam simplisia. Metode refluks merupakan metode ekstraksi yang sederhana, murah, dan mudah di *upscale* pada skala industri.

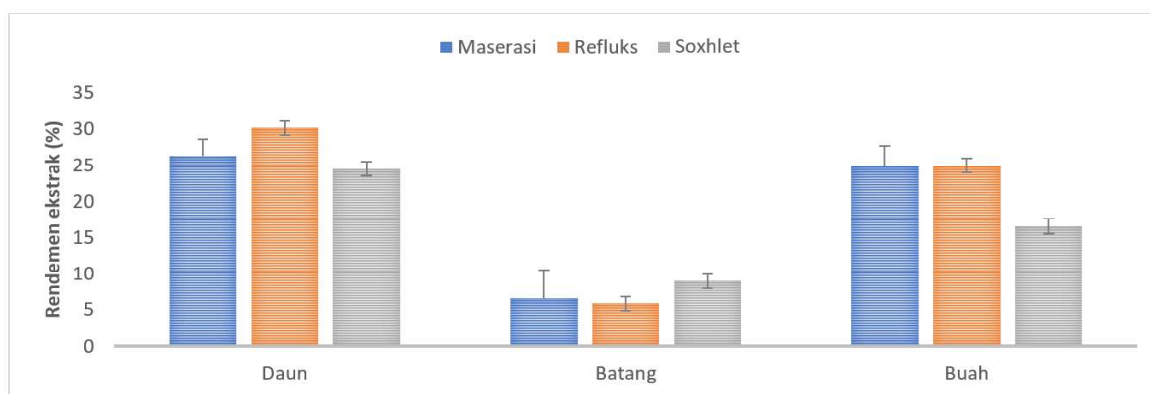
Senyawa polifenolat merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder terbesar dalam tanaman, memiliki struktur yang berbeda-beda mengandung satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil menyertainya. Beberapa penelitian menunjukkan senyawa polifenolat memiliki aktivitas kuat dalam menghambat aktivitas enzim dan antioksidan<sup>(9,10)</sup>.

Telah diuji secara eksperimental bahwa polifenolat tidak hanya mencegah berbagai penyakit tetapi juga berdampak pada penekanan perkembangan penyakit dan bahkan berkontribusi pada proses penyembuhan. Oleh karena itu, polifenolat saat ini mewakili

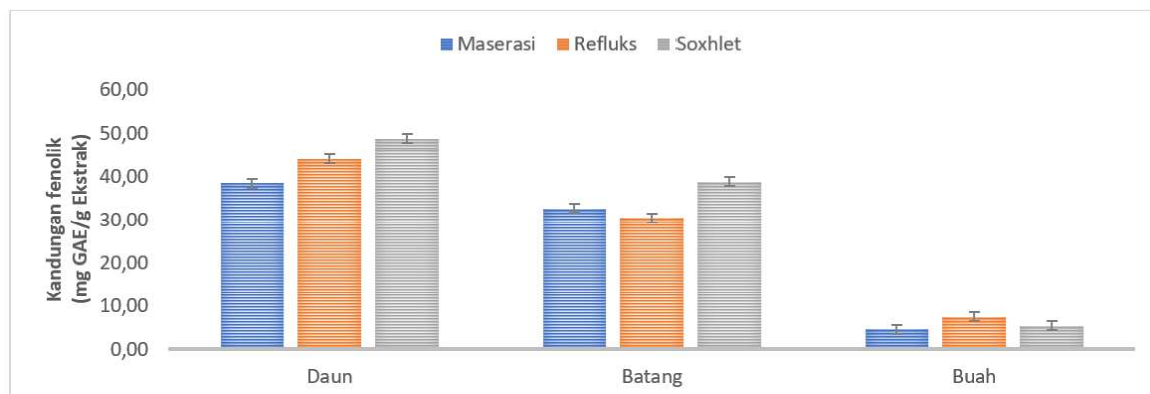
target utama penelitian antioksidan dan antikanker. Pereaksi Folin Ciocalteu (FCR) merupakan pereaksi yang umum digunakan pada pengukuran kadar senyawa polifenolat pada ekstrak<sup>(11)</sup>. FCR merupakan campuran fosfotungstat dan fosfomolibdat yang akan mengoksidasi senyawa polifenolat menjadi senyawa kompleks berwarna biru sehingga dapat diukur secara kolorimetri<sup>(12)</sup>.

Dari hasil penelitian (Gambar 2) menunjukkan bahwa kandungan polifenolat tertinggi diperoleh dari daun dengan metode ekstraksi menggunakan Soxhlet. Sementara bagian buah *R. fraxinifolius* mengandung lebih sedikit polifenolat, hal ini sesuai dengan beberapa penelitian lainnya<sup>(3,10)</sup>. Kandungan polifenolat dari buah *R. fraxinifolius* terutama dari golongan antosianin, elagitanin, serta proantosianidin<sup>(10)</sup>.

Salah satu metode yang dapat menggambarkan aktivitas antioksidan pada suatu simplisia, ekstrak atau sumber biologis lainnya adalah dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (*α, α-diphenyl-β-picrylhydrazyl*). Metode ini dikembangkan oleh Blois (1958) yang didasarkan pada reaksi reduksi



Gambar 1. Hasil rendemen ekstrak *R. fraxinifolius* dengan beberapa metode ekstraksi (n=2).



Gambar 2. Hasil kandungan total polifenolat ekstrak *R. fraxinifolius* (n=3).



Gambar 3. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak *R. fraxinifolius* (n=3).

elektron tak berpasangan pada atom nitrogen oleh atom hidrogen dari antioksidan dan membentuk gugus hidrazin yang berwarna kuning. Pada metode ini dapat diukur perubahan serapan DPPH yang belum bereaksi dengan sisa DPPH yang telah bereaksi dengan antioksidan. Uji antioksidan menggunakan DPPH ini merupakan metode yang valid, akurat, reproduibel, mudah, serta murah. Salah satu kelemahan metode ini adalah kurang baik bila bahan uji berupa emulsi atau plasma, karena protein yang terdapat dalam plasma akan mengendap<sup>(13)</sup>.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa daun dan batang *R. fraxinifolius* memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang sangat kuat (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian lainnya yang menunjukkan bahwa daun *R. fraxinifolius* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat sementara buahnya memiliki aktivitas yang lebih lemah<sup>(3,5,6)</sup>. Ekstraksi menggunakan cara Soxhlet dapat menyari lebih banyak senyawa yang bersifat antioksidan.

Dari analisis korelasi Pearson, diperoleh hasil koefisien korelasi (r) antara aktivitas antioksidan dengan kandungan polifenolat sebesar 0,9578. Menurut kriteria Guilford, angka koefisien korelasi (r) > 0,9 menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat. Hal ini sesuai dengan penelitian lain yang juga menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan diberikan oleh senyawa-senyawa yang memiliki gugus polifenolat<sup>(14,15)</sup>

### SIMPULAN

Pada penelitian ini didapatkan hasil bahwa metode refluks pada ekstraksi *R. fraxinifolius* memberikan hasil rendemen lebih banyak, tetapi metode Soxhlet dapat menyari senyawa polifenolat dan senyawa

antioksidan lebih banyak. Organ daun *R. fraxinifolius* memiliki senyawa polifenolat dan senyawa antioksidan lebih banyak dibandingkan organ lainnya. Penelitian ini bermanfaat sebagai acuan pada penelitian *R. fraxinifolius* selanjutnya.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Kalkman C, Verheij EWM, Coronel R. *Rubus* [Internet]. PROSEA (Plant Resources of South-East Asia) Foundation. 1991 [cited 2019 Sept 8]. Available from: <http://proseanet.org>
2. Surya MI, Suhartati S, Ismaini L, Lusini Y, Destri D, Anggraeni D, et al. Fruit Nutrients of Five Species of Wild Raspberries (*Rubus spp.*) from Indonesian Mountain's Forests. *J Trop Life Sci.* 2018;Jan 15;8(1):75–80.
3. Bakar MFA, Ismail NA, Isha A, Ling ALM. Phytochemical Composition and Biological Activities of Selected Wild Berries (*Rubus moluccanus L.*, *R. fraxinifolius Poir.*, and *R. alpestris Blume*). Evidence-Based Complement Altern Med. 2016. 1–10.
4. Shamsudin NA, Matawali A, Azlan J. Comparison of Antioxidant Activity and Phytochemical Content of Borneo Wild Berry, *Rubus fraxinifolius* (Rogimot). Vol. 6, Transactions on Science and Technology. 2019.
5. Galvez MAC. Evaluation of DPPH Free Radical Scavenging Activity and Phytochemical Screening of Selected Folkloric Medicinal Plants in Tinoc, Ifugao, Cordillera Administrative Region, Philippines. *Int J Sci Res Publ.* 2014;5(12).
6. Desmiaty Y, Elya B, Saputri FC, Hanafi M, Prastiwi R. Antioxidant Activity of *Rubus fraxinifolius Poir.* and *Rubus rosifolius J. Sm.* Leaves. *J Young Pharm.* 2018;10(2s):S93–6.
7. Bobo-García G, Davidov-Pardo G, Arroqui C, Virseda P, Marín-Arroyo MR, Navarro M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity

- on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *J Sci Food Agric*. 2015;95(1):204–9.
8. Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem*. 2011;126(4):1821–35.
  9. Karim AA, Azlan A, Ismail A, Hashim P, Abd Gani SS, Zainudin BH, et al. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocoa pod extract. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):381.
  10. Barcelo R. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Edible Wild Fruits in Benguet , Cordillera Administrative Region , Philippines. *Electron J Biol*. 2015;11(3):80–9.
  11. Mojzer EB, SKerget M, Knez Z, Bren U. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*. 2016;21(7).
  12. Pientaweeratch S, Panapisal V, Tansirikongkol A. Antioxidant, anti-collagenase and anti-elastase activities of *Phyllanthus emblica* , *Manilkara zapota* and silymarin: an in vitro comparative study for anti-aging applications. *Pharm Biol*. 2016;54(9):1865–72.
  13. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol*. 2011;48(4):412–22.
  14. Fu L, Xu BT, Xu XR, Qin XS, Gan RY, Li H Bin. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*. 2010;15(12):8602–17.
  15. Poulin RC, Sasikumar JM, Meseret CE, Selvakumar P. In vitro analysis of antioxidant capacity of Indian yellow raspberry (*Rubus ellipticus* Smith.). *International Food Research Journal*. 2015; 22(4): 1338-1346



## Variasi Basis Salep Minyak Kemiri (*Aleurites moluccana*) dan Uji Daya Penyembuhannya pada Luka Kelinci

### (Base Variations of The Candlenut Oil Ointment (*Aleurites moluccana*) and The Healing Potential Test on Wounds in Rabbits)

PAULINA V. Y. YAMLEAN<sup>1\*</sup>, EDWIN DE QUELJOE<sup>1</sup>, WIDDHI BODHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Farmasi, FMIPA Universitas Sam Ratulangi

<sup>2</sup>Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi

\*Penulis korespondensi, Hp : 081356337914

e-mail : olan\_0506@yahoo.co.id

Diterima, 15 November 2018, Disetujui 17 Desember 2018

**Abstrak:** Kemiri di Indonesia masih terbatas penggunaannya secara tradisional seperti bumbu masak dan obat tradisional. Penelitian tentang minyak Kemiri belum banyak dilakukan. Tujuan penelitian ini ialah membuat variasi basis salep terhadap mutu sediaan salep minyak kemiri 12,5% dan Uji daya penyembuhannya terhadap luka terbuka pada kelinci yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*. Metode penelitian ini ialah eksperimen laboratorium menggunakan 3 variasi basis salep yaitu basis hidrokarbon, basis absorpsi dan basis larut air dengan larutan uji minyak kemiri 12,5%. Hasil penelitian menunjukkan uji mutu salep dengan tiga variasi basis salep memenuhi syarat uji organoleptik, uji homogenitas, dan uji pH, tetapi salep minyak kemiri 12,5% dengan basis hidrokarbon tidak memenuhi syarat daya sebar. Hasil uji Anova menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara variasi basis salep dan besar luka penyembuhan. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga variasi basis salep minyak Kemiri 12,5% dapat digunakan dalam penyembuhan luka terbuka pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*) yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

**Kata kunci:** Minyak kemiri, variasi basis salep, kelinci.

**Abstract:** Candlenut plant in Indonesia is still limited to traditional uses such as cooking spices and traditional medicines. Only a few research has been done on Candlenut oil. The purpose of this study is to make ointment base variations toward the quality of Candlenutoil ointment with 12.5% concentration and its healing potential test on open wounds in rabbits infected with the *Staphylococcus aureus* bacteria. This research method is a laboratory experiment using 3 variations of base ointment namely hydrocarbon base, absorption base and water soluble base with Candlenut oil test solution of 12.5%. The results showed the quality test of the ointment with three variations of ointment base fulfilled the requirements of organoleptic test, homogeneity test, and pH test, but Candlenutoil ointment of 12.5% with hydrocarbon base did not meet the scattering power requirement. The results of the ANOVA test showed no significant difference between the base variations of the ointment and the size of wound healing. This shows that the three variations of the 12.5% Candlenut oil ointment base can be used in healing open wounds on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) infected with the *Staphylococcus aureus* bacteria.

**Keywords:** Candlenut oil, ointment base variations, rabbit.

## PENDAHULUAN

PEMANFAATAN kemiri di Indonesia masih terbatas pada penggunaan tradisional seperti bumbu masak dan obat tradisional. Tanaman kemiri secara empiris biasanya dibakar dengan arang dan dioleskan disekitar pusar untuk menyembuhkan diare, Selain itu dapat digunakan untuk menyembuhkan luka dengan cara mengoleskan minyak kemiri yang didapat dari kemiri yang dibakar. digunakan juga sebagai penyubur rambut. Kandungan minyak dalam biji kemiri tergolong tinggi, yaitu 55–66% dari berat bijinya, mengandung asam lemak rantai panjang dan mengandung asam lemak tak jenuh yaitu asam oleat, asam linoleat dan asam linolenat<sup>(1)</sup>. Biji kemiri mempunyai biji yang keras bentuk bulat, diameter 2,5–3,5 cm<sup>(2)</sup>. Biji kemiri sering digunakan untuk mengobati bengkak, demam, kudis, pemeliharaan rambut, luka bakar dan sakit kepala. Pengobatan tersebut menggunakan kandungan minyak dari biji kemiri sebagai obat luar. Kandungan zat kimia dalam biji Kemiri yang diduga memiliki manfaat dalam penyembuhan luka bakar adalah saponin, flavonoida dan polifenol<sup>(3)</sup>.

Penelitian tentang Kemiri telah dilakukan diantaranya Pengujian Penumbuh Rambut dari sediaan cair ekstraksi campuran Kemiri (*Aleurites moluccana L.*) dan kedelai (*Glycine max (L.) Merrill*) tidak menyebabkan iritasi<sup>(4)</sup>. Gel minyak biji kemiri (*Aleurites moluccana*) dengan konsentrasi 30% b/b sudah menunjukkan adanya efek menyembuhkan luka sebanding dengan *bioplacenton* pada kelinci galur lokal<sup>(5)</sup>.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, peneliti tertarik untuk membuat suatu formulasi sediaan farmasi lainnya yaitu sediaan salep dengan variasi basis salep terhadap mutu sediaan salep minyak kemiri dan daya uji penyembuhannya terhadap luka terbuka pada kelinci yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

Salep merupakan sediaan setengah padat yang ditujukan untuk pemakaian topikal pada kulit atau selaput lendir. Formulasi salep dibutuhkan adanya suatu basis, basis sendiri merupakan zat pembawa yang bersifat inaktif dari sediaan topical dapat berupa bentuk cair atau padat yang membawa bahan aktif untuk berkontak dengan kulit. Pemilihan basis salep yang tepat sangat penting karena basis salep mempengaruhi efek terapeutik dari suatu salep. Salep yang digunakan pada epidermis, mukosa, salep penetrasi atau bentuk cream memerlukan basis salep yang berbeda-beda. Kelarutan dan stabilitas obat di dalam basis, juga sifat luka pada kulit, menentukan pilihan dari pembawa sediaan semipadat. Basis salep dikelompokkan menjadi 4 kelompok besar yaitu

basis hidrokarbon, basis salep absorpsi, basis salep tercuci air dan basis salep larut dalam air. Basis salep yang digunakan dalam suatu formulasi sediaan obat harus bersifat inert dengan kata lain tidak merusak ataupun mengurangi efek terapi dari obat yang dikandungnya<sup>(6)</sup>. Berdasarkan hal tersebut maka perlu diteliti lebih lanjut pengaruh penggunaan basis salep terhadap daya antibakteri sediaan salep minyak kemiri terhadap penyembuhan luka kelinci

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Biji kemiri, *n*-heksan teknis, alkohol 70%, alkohol 96%, *Nutrien Agar* (Oxoid), NaCl 0,9 %, HCl 0,1 N, akuades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 N, BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,175%, BHA, cera alba, metilparaben, propilparaben, PEG 400, PEG 4000, lanolin anhidrat, vaselin putih, *aluminium foil*, kelinci

**METODE.** Jenis penelitian ini ialah eksperimen laboratorium, menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu 4 (empat) perlakuan dan masing-masing perlakuan diulangi sebanyak 2 (dua) kali, dengan demikian jumlah kelinci yang digunakan yaitu sebanyak 4 ekor kelinci.

**Persiapan Sampel.** Sampel biji Kemiri sebanyak 2 kg dikumpulkan dan dibersihkan dari sisa kotoran (pengotor), selanjutnya dicuci dibawah air mengalir sampai bersih. Setelah bersih dari pengotor, sampel dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 400 °C. Setelah itu, Sampel yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Hasilnya dimasukkan ke dalam wadah gelas tertutup.

**Pembuatan Minyak Kemiri.** Pembuatan minyak kemiri dilakukan dengan cara soxletasi dan destilasi. Serbuk buah kemiri yang digunakan sebanyak 250 g dengan pelarut *n*-heksan sebanyak 500 mL. Proses destilasi dilakukan berulang hingga didapatkan minyak kemiri sebanyak 77,3536 g minyak kemiri

**Formulasi dan Pembuatan Salep Minyak Kemiri.** Formulasi sediaan salep Salep Minyak Kemiri dengan berbagai basis dapat dilihat pada Tabel 1.

**Evaluasi Sediaan Salep Minyak Kemiri.** Untuk memenuhi syarat pengujian salep, dilakukan beberapa pengujian diantaranya :

**Uji Organoleptik.** Uji organoleptik meliputi bentuk, warna, bau dari sediaan salep.

**Uji Homogenitas.** Uji homogenitas merupakan uji terhadap pencampuran bahan-bahan dalam suatu sediaan salep yang menunjukkan susunan yang homogen. Hasil uji homogenitas pada sediaan salep dikatakan homogen bila tidak terdapat partikel-partikel yang menggumpal dan juga mempunyai warna yang merata pada seluruh bagian salep<sup>(7)</sup>.

Untuk dapat mengetahui sediaan salep homogen atau tidak dapat diketahui dengan mengambil sedikit dari sediaan dan digoreskan pada sekeping kaca atau bahan transparan lainnya

**Uji pH.** Uji pH dilakukan dengan menggunakan kertas indikator universal ataupun pH meter, dimana pH salep harus sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-6,5. Sebanyak 0,5 g salep Minyak Kemiri diencerkan dengan 5 ml aquades, kemudian pH stik dicelupkan selama 1 menit. Perubahan warna yang terjadi pada pH stik menunjukkan nilai pH dari salep.

**Uji Daya Sebar.** Sebanyak 0,5 g salep diletakkan diatas kaca bulat yang berdiameter 15 cm, kaca lainnya diletakkan diatasnya dan dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebar salep diukur. Setelahnya, ditambahkan 100 g beban tambahan dan didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter yang konstan<sup>(8)</sup>.

Tabel 1. Formulasi sediaan salep minyak biji kemiri.

Bahan	Konsentrasi basis (g)		
	Hidrokarbon	Absorbsi	Larut Air
Ekstrak kental	12,5	12,5	12,5
BHA	0,001	0,001	0,001
Cera alba	2	3	
Metil paraben			0,02
Propil paraben	0,01	0,01	
PEG 400			69,879
PEG 4000			17,6
Lanolin anhidrat		3	
Vaselin putih	85,489	81,480	
	100	100	100

**Penyiapan Hewan Uji dan Pembuatan Luka yang Terinfeksi Infeksi Bakteri.** Hewan uji yang digunakan berumur 2-3 bulan dengan berat badan antara 1,2-1,5 kg. Sebelum pembuatan luka, kelinci terlebih dahulu diaklimatisasi selama 5 hari. Sehari sebelum pembuatan luka, hewan uji dicukur bulunya di daerah punggung sampai licin dan dibersihkan dengan alkohol 70 %, selanjutnya dibuat luka sayat dengan ukuran panjang 1,5 cm pada bagian punggung kelinci menggunakan pisau bedah sampai bagian subkutan. Suspensi bakteri *S.aureus* diberikan sebanyak 0,2 mL pada masing-masing lokasi. Pengamatan dilakukan

setelah 24 jam untuk melihat adanya infeksi pada luka yang dibuat.

**Perlakuan dan Pengamatan Luka.** Kulit kelinci yang telah terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus* diberikan perlakuan dengan mengoleskan masing-masing 0,3 g sediaan salep Minyak Kemiri dan kontrol positif dengan perlakuan sebagai berikut :

Perlakuan A: Luka diberi Gentamicin salep (Kontrol Positif).

Perlakuan B: Luka diberi salep minyak kemiri dasar hidrokarbon.

Perlakuan C: Luka diberi salep minyak kemiri dasar salep absorpsi.

Perlakuan D: Luka diberi salep minyak kemiri dasar salep larut dalam air.

Sediaan salep diberikan dengan cara mengoleskan secara merata pada daerah luka tiga kali sehari. Kemudian dilakukan pengamatan setiap hari selama 8 hari, ukur diameter penutupan luka.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan salep dengan variasi dasar salep perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kelayakan salep tersebut untuk dapat digunakan sebagai obat pada bagian kulit. Pembuatan salep Minyak Kemiri dilakukan dengan cara sokletasi. Proses sokletasi dimaksudkan untuk menarik kandungan minyak Kemiri yang dikandung dalam biji Kemiri. Hasil sokletasi kemudian dilanjutkan dengan proses destilasi untuk menarik pelarut h-heksan yang masih tersisa. Dari hasil proses destilasi didapatkan minyak kemiri sebanyak 77,3536 g.

**Uji Organoleptik.** Uji organoleptik dilakukan dengan melihat bentuk, warna dan bau dari sampel Salep Minyak Kemiri. Hasil organoleptik dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan pengamatan organoleptis variasi basis salep berpengaruh pada warna dan

Tabel 2. Hasil uji organoleptik.

Jenis salep	Bentuk	Warna	Bau
SMK Basis hidrokarbon	12,5% Setengah padat	Kuning muda	Khas minyak Kemiri
SMK Basis absorpsi	12,5% Setengah padat	Kuning muda	Khas minyak Kemiri
SMK Basis larut air	12,5% Setengah padat	Putih susu	Khas minyak Kemiri

Ket : SMK : Salep Minyak Kemiri

konsistensi, namun tidak berpengaruh pada bau. Bau dari salep minyak Kemiri yaitu bau khas minyak kemiri. Warna salep dengan basis hidrokarbon dan absorpsi cenderung kuning muda, sedangkan warna salep dengan basis larut air berwarna putih susu.

**Uji Homogenitas.** Sediaan salep dinyatakan homogen jika dasar salep, bahan aktif dan bahan tambahan lain tercampur merata. Hasil Uji dapat dilihat pada Tabel 3.

Hasil pengamatan secara visual menunjukkan susunan salep yang homogen, tidak mengumpal serta tidak terdapat butiran kasar, memiliki warna yang merata

**Tabel 3. Hasil uji homogenitas.**

Jenis salep	Homogenitas
SMK 12,5% Basis hidrokarbon	Homogen
SMK 12,5% Basis absorpsi	Homogen
SMK 12,5% Basis larut air	Homogen

Ket : SMK : Salep Minyak Kemiri.

pada seluruh bagian salep. Berdasarkan teori, sediaan salep dikatakan homogen bila susunan partikel-partikel tidak ada yang menggumpal dan tidak tercampur. Hasil uji juga menunjukkan tidak ada perubahan homogenitas selama 4 minggu penyimpanan pada semua formula salep. Hasil tersebut menunjukkan bahwa variasi basis salep tidak berpengaruh pada homogenitas salep.

**Uji pH.** Pengujian pH sediaan salep harus disesuaikan dengan pH kulit manusia yaitu 4,5-6,5. Hasil pengukuran pH dengan menggunakan pH meter dapat dilihat pada Tabel 4. dibawah ini.

Berdasarkan hasil uji didapatkan pH salep Minyak Kemiri dengan ketiga basis yang sesuai dengan kulit

**Tabel 4. Hasil uji pH.**

Jenis salep	pH
SMK 12,5% Basis hidrokarbon	5
SMK 12,5% Basis absorpsi	5
SMK 12,5% Basis larut Air	5

Ket : SMK : Salep Minyak Kemiri.

yaitu 4,5-6,5, sehingga aman untuk digunakan, karena pH yang asam akan mengiritasi kulit, sedangkan pH yang basa dapat membuat kulit bersisik<sup>(6)</sup>.

**Uji Daya Sebar.** Daya sebar merupakan kemampuan penyebaran sediaan Salep Minyak Kemiri

pada kulit. Daya sebar mempunyai korelasi dengan kemampuan penetrasi suatu zat kedalam stratum korneum<sup>(9)</sup>. Hasil Uji Daya Sebar dapat dilihat pada Tabel 5.

Semakin besar daya sebar yang dimiliki suatu sediaan maka semakin tinggi kecepatan sediaan

**Tabel 5. Hasil uji daya sebar.**

Jenis salep	Daya Sebar (mm)
SMK 12,5% Basis hidrokarbon	4,5
SMK 12,5% Basis absorpsi	5
SMK 12,5% Basis larutAir	3,8

Ket : SMK : Salep Minyak Kemiri.

salep menyebar pada kulit sehingga luas permukaan kulit yang bersentuhan dengan salep semakin besar pula. Pengujian daya sebar untuk setiap sediaan salep dilakukan untuk melihat kemampuan sediaan menyebar pada kulit, dimana suatu dasar salep sebaiknya memiliki daya sebar yang baik untuk menjamin pemberian bahan obat yang memuaskan. Urutan daya sebar salep dari yang terluas yaitu salep, basis absorpsi, basis hidrokarbon dan terakhir basis larut air. Daya sebar salep basis luas dikarenakan memiliki konsistensi yang lebih lembek dibanding dengan basis lainnya. Hasil pengujian dari ketiga sediaan salep minyak kemiri dengan basis yang berbeda menunjukkan kemampuan Salep melewati membran. Semakin luas membran tempat sediaan menyebar maka koefisien difusi semakin besar yang mengakibatkan difusi obat pun semakin meningkat, sehingga semakin besar daya sebar suatu sediaan maka makin baik<sup>(10)</sup>. Minyak Kemiri basis absorpsi yang memenuhi syarat daya sebar. Perbedaan daya sebar sangat berpengaruh pada kecepatan difusi zat aktif dalam membran.

#### **Uji Aktivitas Antibakteri Salep Minyak Kemiri 12,5% dengan Variasi Basis Salep.**

Proses penyembuhan luka pada kelinci dengan ketiga variasi basis salep dapat dilihat pada Tabel 6. Proses penyembuhan luka ialah pengamatan terhadap penyembuhan luka pada kelinci yang telah diinfeksi bakteri *S.aureus* dan diolesi oleh salep minyak kemiri dengan tiga variasi basis salep. Proses penyembuhan pada luka disebabkan karena salep Minyak Kemiri mengandung berbagai komponen kimia yang berkhasiat sebagai antibakteri, diantaranya flavonoid, saponin dan polifenol. Dalam proses penyembuhan luka dibutuhkan senyawa yang dapat memacu pembentukan kolagen yaitu saponin, merupakan protein struktur yang berperan

dalam proses penyembuhan luka. Flavonoid bekerja dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sitoplasma, demikian pula saponin bekerja dengan merusak membran sitoplasma sedangkan polifenol bekerja dengan cara mendenaturasi protein dan mengurangi tegangan permukaan sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel bakteri<sup>(11)</sup>. Salep dengan basis hidrokarbon cenderung memiliki daya hambat yang lebih kecil dibandingkan dengan basis lain karena basis hidrokarbon merupakan basis berlemak dimana mempunyai sifat lemak atau bebas air dan media pengujinyapun menggunakan nutrient agar yang cenderung mengandung banyak air sehingga salep yang mengandung zat aktif sukar untuk berdifusi atau melepaskan suatu zat aktif sehingga pelepasan zat aktifnyapun kurang maksimal. Basis salep hidrokarbon bertahan pada kulit untuk waktu yang lama sehingga memungkinkan larinya lembab ke udara dan sukar dicuci

Basis absorpsi memiliki daya hambat yang cukup

bahan berlemak, sehingga dapat meningkatkan hidrasi dari stratum korneum dan meningkatkan penetrasi dari minyak kemiri. Efek hidrasi kulit yang meningkat akan meningkatkan absorpsi obat. Selain itu salep basis larut air mengandung PEG yang bersifat larut dalam air menyebabkan obat mudah terlepas dan terserap oleh kulit lebih cepat<sup>(12)</sup>.

Pada hasil pengukuran panjang luka infeksi pada setiap perlakuan dapat dilihat bahwa hasil yang diperoleh tidak berbeda signifikan, kecuali pada perlakuan kontrol negatif, dimana pada hari kelima luka masih belum sembuh total. Hal ini disebabkan karena tidak adanya bahan aktif yang terkandung didalam basis salep yang dapat menghambat pertumbuhan bahkan membunuh bakteri. Berbeda halnya dengan hasil pengukuran pada perlakuan kontrol positif, dimana pada hari kelima panjang luka kelinci walaupun belum sembuh total.

Hasil pengamatan yang diperoleh dilanjutkan dengan analisis variabel secara sistematis

**Tabel 6. Hasil pengukuran panjang penyembuhan luka pada kelinci dengan ketiga variasi basis salep.**

Hari Ke-	SMK Basis hidrokarbon (mm)	SMK Basis absorpsi (mm)	SMK Basis larut Air (mm)	Kontrol + (mm)
1	1,5	1,5	1,5	1,5
2	1,5	1,5	1,5	1,5
3	1	1,5	1,5	1
4	0,7	0,9	0,8	1
5	0,6	0,7	0,6	0,9
6	0	0	0,4	0,3
7	0	0	0,3	0,2
8	0	0	0	0

besar karena basis ini merupakan basis yang dapat bercampur dengan air dengan jumlah tertentu, dimana basis ini mengandung lanolin anhidrat yang mana dapat bercampur dengan air dengan membentuk emulsi air dalam minyak sehingga basis absorpsi dapat melepaskan atau dapat berdifusi dengan cukup baik. Basis larut air memiliki daya hambat yang paling besar karena basis ini tidak mengandung bahan lemak dan mudah larut dalam air, karena basis salep ini mengandung PEG 400 dan PEG 4000 yang merupakan basis salep yang tidak berlemak sehingga dapat bercampur dengan media uji nutrien agar yang bersifat polar dan dapat berdifusi dengan baik. Basis larut air terdiri dari fase air dan tidak mengandung

menggunakan uji statistik ANOVA. Hal ini dimaksudkan untuk melihat apakah ada efek dari tiga variasi basis salep perlakuan terhadap penyembuhan luka yang infeksi bakteri dengan data yang lebih spesifik dan signifikan secara sistematis. Dalam pengujian ANOVA diperlukan hipotesa data dimana  $H_0$  tidak ada perbedaan panjang luka pada kelinci dan  $H_1$  adanya perbedaan panjang luka pada kelinci dengan taraf signifikan ( $\alpha = 0,05$  atau 5%). Untuk pengambilan keputusan yang didasarkan pada perbandingan F hitung dan F tabel dengan persyaratan jika F hitung lebih kecil dari F tabel maka  $H_0$  diterima dan jika F hitung lebih besar dari F tabel maka  $H_0$  ditolak.

Hasil dalam pengujian ANOVA dengan menggunakan uji F menunjukkan nilai F hitung sebesar 0,116 dan sig. 0,950. Dapat disimpulkan hasilnya signifikan ( $p > 0,05$ ), hal ini menunjukkan bahwa perbedaan basis tidak berpengaruh terhadap uji penyembuhan luka terbuka pada tikus. Selanjutnya dilakukan uji LSD hasilnya signifikan ( $p > 0,05$ ) antara ketiga basis. Dengan dapat disimpulkan  $H_0$  diterima.

### SIMPULAN

Ketiga formula salep dengan variasi basis salep minyak kemiri 21,5% memenuhi mutu sediaan salep meliputi uji mutu sediaan salep, organoleptik, homogenitas, pH, tetapi tidak memenuhi daya sebar untuk salep dengan basis larut air. Ketiga variasi basis salep minyak kemiri 12,5% memenuhi daya penyembuhan terhadap luka pada kelinci yang terinfeksi bakteri *Staphylococcus aureus*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada Universitas Sam Rotalangi atas dana yang diberikan pada skim riset dasar unggulan UNSRAT dengan nomor kontrak 1872/UN12.13/LT/2018.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ginting M, Surbakti D, Thamrin. Sintesis dan karakteristik senyawa polihidroksi yang diperoleh melalui epoksidasi minyak kemiri. *Jurnal Penelitian MIPA*. 2008. 2 (1) 1
- Krisnawati, H. Kallo.M dan Kanninen. M.. *Aleurites moluccana* (L) Willd. *Ecology. Silviculture and Productivity*. CCIFOR.Bogor. Indonesia. 2011. Hal 1-4
- Heyne K, 1987. Diambil dari: URL: <https://id.wikipedia.org/wiki/Kemiri>. Diakses tanggal 15 Agustus 2018.
- Izemi1, B. Boy Rahardjo Sidharta, Yanuartono. Potensi Sediaan Cair Ekstrak Campuran Kemiri (*Aleurites moluccana* L.) dan Kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) sebagai Penumbuh Rambut. *e-journal.uajy.ac.id/8622*. 2015. Hal 1-11
- Richa Yuswantina, Istianatus Sunnah dan I Nyoman Dwika Dharmanta. 2014. Diakses tanggal 3 Agustus 2018. Kode Jurnal: *jpfarmasidd140494*.
- Pongsipulung Grace. 2013..diambil dari URL:<https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/pharmacon/article/view/462/370>. Diakses tanggal 2 Agustus 2018.
- Lachman, Leon. *Teori dan Praktek Farmasi Industri*. UI-Press : Jakarta. 2008.
- Astuti I. Y., D. Hartanti, dan Aminiati A. Peningkatan Aktivitas Antijamur Candida albicans Salep Minyak Atsiri Daun Sirih (*Piper bettle* LINN.) melalui Pembentukan Kompleks Inklusi dengan  $\beta$ -siklodekstrin. *Majalah Obat Tradisional*. 2010. Hal 94-9
- Akhtar. N.,Adnan, Q. Ahmad, M. Mehmood, A.,Farzana, K. Rheological studies and characterization of different oil. *J. Chem*. 2009. Soc.Pak.31(2).Hal. 201-6
- Hasyim. N. K.L, Pare. I, Junaid, Kurniati A. Formulasi dan Uji Efektivitas Gel Luka Bakar Ekstrak Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata* L.) pada Kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. 16(2) : 2012. Hal 89-94
- Ginting, M. Surbakti, D, Thamrin. Sintesis dan Karakterisasi Senyawa Polihidroksi yang diperoleh melalui Epoksidasi Minyak Kemiri. *Jurnal Penelitian MIPA* (2) . 2008. 1.1
- Naibaho. H. Olivia. 2013. Diambil dari <https://ejournal.unsrat.ac.id/index.php/pharmacon/article/view/1553>. Diakses tanggal 30 Mei 2018.

## Selektivitas Pemisahan Isoniazid dan Asetilisoniazid dalam Plasma Manusia In-Vitro secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

### (Separation Selectivity of Isoniazid and Asetilisoniazid in Human Plasma In-Vitro by High Performance Chromatography)

NOVI YANTIH<sup>1\*</sup>, YAHDIANA HARAHAP<sup>2</sup>,  
WAHONO SUMARYONO<sup>1</sup>, RIAN TO SETIABUDY<sup>3</sup>, LESTARI RAHAYU<sup>1</sup>

- 1) Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta, Indonesia
  - 2) Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Depok, Indonesia
  - 3) Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, Indonesia
- \*Penulis korespondensi, Hp : 08129624502  
e-mail: novi.yantih@univpancasila.ac.id

Diterima 28 Maret 2019, Disetujui 2 Oktober 2019

**Abstrak:** Dalam rangka studi farmakokinetik isoniazid (INH) sebagai obat anti tuberkulosis, metode bioanalisis diperlukan. Masalah utama yang timbul dalam bioanalisis INH ini adalah struktur INH mirip dengan asetilisoniazid (AcINH) sebagai metabolitnya. Oleh karena itu, metode pemisahan yang selektif diperlukan untuk memisahkan INH dari metabolit dan matriksnya. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji selektivitas metode pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia *in-vitro* menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Sistem KCKT yang digunakan adalah fase balik dengan detektor UV dan heksan sulfonat sebagai pereaksi pasangan ion. Kondisi optimum yang diperoleh menggunakan fase diam C18, fase gerak heksansulfonat pH 2,47–metanol (65:35) dengan laju alir 1ml/menit, dan deteksi pada 265nm. Selektivitas pemisahan metode ditunjukkan dengan nilai resolusi  $\geq 1,5$ . Nilai faktor ikutan untuk INH dan asetilisoniazid berturut-turut adalah 1,297, dan 1,912. Nilai k yang kurang dari 10 dan nilai N yang lebih besar dari 5000 menunjukkan efisiensi pemisahan yang baik. Hasil percobaan menunjukkan bahwa presisi dan akurasi metode memenuhi syarat untuk uji selektivitas sesuai FDA pada konsentrasi INH dan AcINH berturut-turut 0.1244 dan 0.1188 $\mu\text{g/mL}$  Metode KCKT yang dikembangkan selektif untuk pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia *in-vitro*.

**Kata Kunci:** isoniazid, asetilisoniazid, kromatografi cair kinerja tinggi, plasma manusia

**Abstract:** Bioanalysis method is needed to pharmacokinetic study of INH as antituberculosis. The main problem is INH structure is similar to that of acetyl isoniazid (AcINH) as its metabolite. Therefore, a selective separation method is needed to separate the INH from its metabolite and matrix. The aim of this study was to test the selectivity of separation method of INH and AcINH in human plasma *in-vitro* by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC system used a reversed phase with UV detector and hexane sulphonate as an ion counter. The optimum conditions was obtained by using C18 as stationary phase, hexane sulphonate (pH 2.47)-methanol (65:35) as mobile phase, with flow rate of 1mL/min, and UV detector at wavelength of 265nm. The selectivity of method separation was indicated by a resolution value of  $\geq 1.5$ . The tailing factor for INH and AcINH were 1.297, dan 1.912, respectively. The k values were less than 10 and N values were greater than 5000 indicate good separation efficiency. The developing of HPLC was a selective for separating of INH and AcINH in human plasma *in-vitro*.

## PENDAHULUAN

DERIVATIF asam nikotinat, isoniazid (INH), adalah salah satu obat pilihan pertama untuk infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. INH bersifat bakterisid, yaitu dapat membunuh 90% populasi kuman dalam beberapa hari pertama pengobatan dan efektif terhadap kuman dalam keadaan metabolik aktif, yaitu kuman yang sedang berkembang. Mekanisme kerja berdasarkan terganggunya sintesis asam mikolat, yang diperlukan untuk membangun dinding bakteri<sup>(1,2)</sup>.

Dalam rangka studi farmakokinetik isoniazid (INH) sebagai antituberkulosis, metode bioanalisis INH diperlukan. Masalah utama yang timbul dalam bioanalisis INH ini adalah struktur INH mirip dengan asetilisoniazid (AcINH) sebagai metabolitnya<sup>(2,3)</sup>. Selain itu, kadar analit yang cukup kecil dalam matriks biologi yang kompleks. Oleh karena itu, metode pemisahan yang selektif diperlukan untuk memisahkan INH dari metabolit dan matriksnya.

Penetapan kadar INH dan metabolitnya telah dilaporkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)<sup>(4,5,6,7)</sup>. Metode KCKT adalah metode yang baik untuk memisahkan analit dari campuran dalam matriks yang kompleks seperti plasma disamping penggunaannya untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Metode yang tersedia masih memerlukan peningkatan selektivitas terutama antara analit dengan matriksnya. Peningkatan selektivitas metode bioanalisis selain memperhatikan faktor selektivitas juga harus memperhatikan faktor sensitivitas. Semakin kecil konsentrasi analit yang dapat dibedakan responnya dengan matriks maupun analit lain dalam sampel, maka selektivitas metode semakin meningkat. Oleh karena itu pengujian selektivitas metode bioanalisis dilakukan pada konsentrasi terkecil atau *lower limit of quantification*. Pengujian selektivitas menjadi penting sebelum divalidasi parameter analitik lainnya.

Pada penelitian sebelumnya selektivitas metode dilaporkan untuk konsentrasi INH 4,74<sup>(4)</sup>, dan 0,023-5,16 µg/mL<sup>(5)</sup> dalam matriks plasma manusia, sedangkan dalam plasma tikus pada konsentrasi 0,2<sup>(6)</sup> µg/mL dan dalam matriks urin pada konsentrasi 1,25 µg/mL<sup>(7)</sup>. Berdasarkan hal tersebut, pada penelitian ini dilakukan uji selektivitas metode pemisahan INH dan AcINH dalam plasma manusia menggunakan KCKT. Pengujian dilakukan pada konsentrasi lebih kecil dari konsentrasi yang telah dilaporkan peneliti sebelumnya dengan metode KCKT yang lebih sederhana menggunakan detektor UV.

## BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Bahan baku isoniazid (Zhejiang Jiangbei Pharmaceutical, Zhejiang, China), bahan baku piridoksin hidroklorida dan baku pembanding nikotinamida sebagai baku internal, baku pembanding sintesis asetilisoniazid, kalium bromida, asam klorida, natrium hidroksida, asam fosfat, dan asam heksansulfonat dari Merck, Darmstadt, Germany dengan mutu *pro analysis*, asam asetat glasial dan metanol *pro HPLC* (Mallinckrodt, Dublin, Irlandia), plasma darah manusia dari PMI (Jakarta Pusat, Indonesia), akuabidestilata steril (Otsuka, Indonesia).

### Alat

Alat analisis utama yang digunakan dalam penelitian adalah kromatograf cair kinerja tinggi (Shimadzu LC 20 AD), spektrofotometer UV-VIS (UV-1800), dan Fourier Transform Infrared (Shimadzu FT-IR 8400s).

### Metode

#### Pemilihan Larutan Pengendap Protein

Plasma sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditambahkan larutan stok INH, AcINH, baku internal, dan larutan pengendap protein, kemudian divorteks selama 1 menit dan disentrifugasi dengan 3000rpm selama 30 menit. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril dan metanol dengan jumlah ½, 1, dan 3 kali dari jumlah plasma. Selanjutnya larutan sampel dicek pH-nya dan diinjeksi ke dalam kromatograf sebanyak 20 µL. Larutan pengendap protein yang dipilih adalah larutan pengendap protein yang dapat menghasilkan larutan yang jernih dengan endapan protein terbanyak yang diamati secara visual.

#### Pemilihan Panjang Gelombang Optimal

Larutan INH, AcINH, dan baku internal masing-masing dibuat spektrum serapannya pada panjang gelombang 200-400nm dan ditampilkan secara *overlay*, sehingga dapat ditentukan panjang gelombang optimum untuk ke-3 analit.

#### Pemilihan Komposisi dan Laju Alir Fase Gerak

Pemilihan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan komposisi fase gerak yang dapat memberikan hasil yang efektif dan efisien dalam analisis secara KCKT. Plasma sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam tabung kemudian ditambahkan sejumlah larutan stok INH, AcINH, dan baku internal dan larutan pengendap protein kemudian divorteks selama 1 menit dan disentrifugasi dengan 3000rpm selama 30 menit. Kondisi kromatograf yang digunakan adalah sebagai berikut:



- Kolom : Oktadesilsilan (C18) atau Oktilsilan (C8) 250x4,6mm
- Volume injeksi : 20 $\mu$ L
- Fase gerak :
  1. Dapar fosfat – metanol atau asetonitril dalam berbagai komposisi
  2. Dapar formiat – metanol
  3. Larutan heksansulfonat 5, 10, dan 20mM–metanol dalam berbagai komposisi
- Laju alir : 0,8, 1, atau 1,2mL/menit

Fase gerak yang dipilih adalah fase gerak yang dapat menghasilkan pemisahan yang baik antara analit dan baku internal serta matriks plasma yang ditandai dengan nilai N (jumlah lempeng) yang tinggi, faktor ikutan  $\leq 1,2$  dengan luas puncak yang besar, dan resolusi  $>1,5$ , serta faktor kapasitas kurang dari 10<sup>(8)</sup>. Pengujian awal dilakukan optimasi pemisahan analit dan baku internal dalam air sebelum dilakukan di dalam plasma.

#### Uji Kesesuaian Sistem

Sebanyak 20  $\mu$ L satu konsentrasi larutan sampel disuntikkan ke dalam sistem KCKT sebanyak lima kali, kemudian diukur luas puncaknya. Syarat kesesuaian sistem adalah  $KV \leq 2\%$ , faktor ikutan  $\leq 1,2$ , faktor kapasitas kurang dari 10, dan selektivitas yang tinggi.

#### Pembuatan Kurva kalibrasi

Sebanyak 20 $\mu$ L larutan blangko plasma, larutan blangko plasma ditambah baku internal, dan 6-8 konsentrasi INH dan AcINH. Plasma selanjutnya ditambah pengendap protein, disentrifuse dan supernatan disuntikkan ke dalam kromatograf pada masing-masing konsentrasi. Data pengukuran dibuat kurva kalibrasi hubungan rasio respon terhadap konsentrasi analit. Linearitas ditunjukkan dari perhitungan nilai koefisien korelasi (r) pada persamaan garis linear. Kurva kalibrasi selalu dibuat pada setiap analisis.

#### Penentuan Batas Kuantifikasi Terendah

Batas kuantifikasi terendah/*lower limit of quantification* (LLoQ) ditentukan terlebih dahulu sebelum uji selektivitas metode. Sebanyak 200  $\mu$ L plasma disiapkan yang mengandung INH dan AcINH dengan konsentrasi yang diturunkan setengah kali dari LOQ yang diperoleh dari perhitungan menggunakan data kurva kalibrasi, serta mengandung baku internal. Selanjutnya, plasma ditambah larutan pengendap protein, kemudian divorteks selama 30 detik dan disentrifugasi dengan kecepatan 10000 rpm selama 10 menit lalu diambil supernatannya. Sebanyak 20  $\mu$ L larutan supernatan disuntikkan ke dalam kromatograf sebanyak 5 kali. Dari data pengukuran kemudian

baku relatif (SBR). Percobaan diulang kembali hingga diperoleh hasil akurasi (% kesalahan) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta SBR kurang dari 20%<sup>(9,10)</sup>.

#### Uji Selektivitas Metode

Sebanyak 20  $\mu$ L larutan yang berasal dari preparasi plasma dari sumber 6 subyek berbeda disuntikkan ke dalam kromatograf sebanyak 5 kali pada konsentrasi LLoQ. Selektivitas ditunjukkan dengan akurasi (% kesalahan) tidak menyimpang dari -20% dan +20%, serta SBR kurang dari 20%, baik untuk INH maupun AcINH<sup>(9,10)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Pemilihan Larutan Pengendap Protein

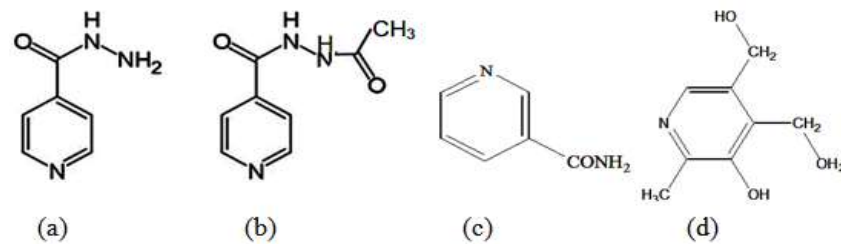
Pemilihan ini dilakukan untuk mengetahui larutan pengendap protein yang cocok yang dapat digunakan dalam mengendapkan protein yang terdapat pada plasma secara efektif. Larutan pengendap protein yang digunakan adalah asetonitril dan metanol. Larutan pengendap protein yang dipilih adalah larutan pengendap protein yang dapat menghasilkan larutan yang jernih dengan jumlah endapan terbanyak.

Hasil menunjukkan pengendapan dengan asetonitril lebih efektif dalam mengendapkan dengan perbandingan 1:1 terhadap jumlah plasma, namun larutan yang dihasilkan tidak jernih karena terbentuk partikel koloid. Partikel koloid dapat dihasilkan karena adanya senyawa dalam plasma berukuran partikel kecil yang tidak terlarut dalam asetonitril. Partikel koloid tersebut tidak mengendap dengan sentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 3000rpm. Hasil pengendapan dari kombinasi asetonitril dengan metanol menunjukkan pengendapan yang paling optimum pada perbandingan asetonitril-metanol (5:1), namun INH kurang stabil dalam sistem pelarut tersebut. Hal ini terlihat dari munculnya beberapa puncak pada kromatogram INH.

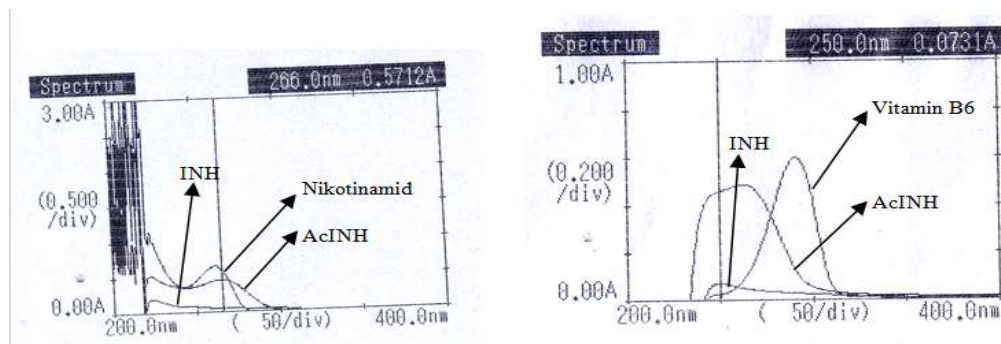
Berdasarkan optimasi pengendap protein, metanol dengan perbandingan 3:1 terhadap plasma digunakan untuk analisis selanjutnya, karena analit lebih stabil dan larutan uji jernih, meskipun hasil pengendapan kurang optimal dibanding dengan asetonitril.

### Pemilihan Panjang Gelombang Optimal

Panjang gelombang dioptimasi untuk dijadikan dasar pemilihan panjang gelombang deteksi pada KCKT. Panjang gelombang dipilih berdasarkan panjang gelombang yang memberikan respon optimal untuk ketiga analit. Penentuannya dengan membuat spektrum serapan *overlay* dari ketiga analit (INH, AcINH, dan baku internal) pada panjang gelombang 200-400nm. Struktur kimia ke 4 analit dapat dilihat



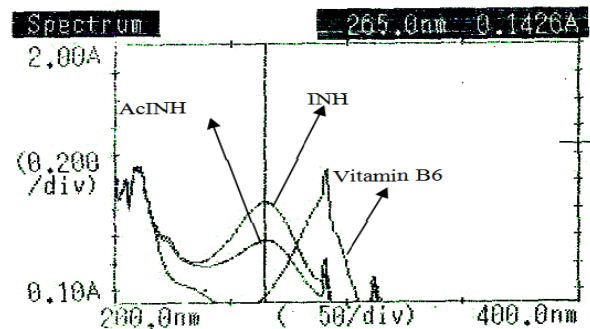
Gambar 1. Struktur kimia INH (a), AcINH (b), nikotinamid (c), dan vitamin B6 (d)



Gambar 2. Spektrum serapan *overlay* INH dan AcINH dengan nikotinamid (a) dan dengan vitamin B6 (b) masing-masing pada konsentrasi 20 bpj pada medium dasar fosfat-metanol pH 3,5

yang sama dari gugus parsial piridin. Adanya gugus aoksokrom yang berbeda dari ke-4 analit menyebabkan panjang gelombang serapan maksimum dan kemampuan menyerap cahaya berbeda-beda, sehingga profil dan respon instrumen (serapan) keempat analit berbeda pula.

Pada Gambar 2 dapat dilihat bahwa respon INH paling kecil dibandingkan analit lainnya pada konsentrasi yang sama (20 bpj). Hal ini disebabkan gugus aoksokrom pada AcINH, nikotinamid, dan vitamin B6 lebih potensial dalam menyebabkan adanya pergeseran hiperkromik dibandingkan gugus hidrazin. Gugus hidroksi memberi dampak lebih besar dalam pergeseran batokromik dibandingkan gugus amida. pH fase gerak yang asam menyebabkan elektron sunyi pada gugus hidroksi lebih stabil dibandingkan pada gugus amida, sehingga densitas elektron sunyi terdelokalisasi pada struktur vitamin B6 menjadi lebih tinggi. Peningkatan densitas elektron sunyi yang terdelokalisasi akan menggeser panjang gelombang kearah yang lebih besar (pergeseran merah/batokromik). Hal ini dapat dilihat dari profil spektrum serapan vitamin B6, nikotinamid, dan INH. Panjang gelombang serapan maksimum dari vitamin B6 sekitar 270nm, sedangkan nikotinamid dan INH, berturut-turut pada sekitar 260 dan 250nm. Penambahan gugus asetil pada INH juga menunjukkan pengaruh yang besar terhadap respon dan panjang gelombang serapan maksimum. Gugus asetil menyebabkan terjadinya pergeseran hiperkromik dan batokromik, sama seperti



Gambar 3. Spektrum serapan ultraviolet INH, AcINH, dan Vitamin B6 dengan konsentrasi masing-masing 12 bpj pada tampilan *overlay*

analit baik menggunakan nikotinamid, maupun vitamin B6 sebagai baku internal adalah 250nm, karena pada panjang gelombang tersebut INH paling optimal. Panjang gelombang makin pendek makin tidak spesifik karena pada panjang gelombang tersebut dapat terjadi eksitasi elektron sigma ( $\sigma$ ) dari *single bond* maupun elektron phi ( $\pi$ ), sehingga pada percobaan selain panjang gelombang 250nm, dicoba juga optimasi sistem KCKT pada panjang gelombang 263, 265, 266, dan 270nm.

Hasil percobaan selanjutnya menunjukkan panjang gelombang deteksi yang digunakan adalah pada 265nm dalam kondisi fase gerak menggunakan pereaksi pasangan ion heksansulfonat 20mM-metanol (65:35). Pada kondisi pelarut yang digunakan ini terlihat bahwa sensitifitas metode meningkat dengan semakin besarnya serapan INH dan AcINH (Gambar

pH 3,5.

### Pemilihan Fase Gerak

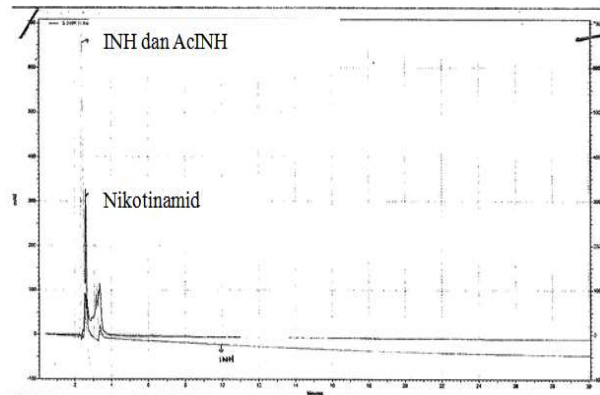
Pemilihan fase gerak dilakukan untuk mendapatkan komposisi fase gerak yang dapat memberikan hasil yang efektif dan efisien dalam analisis secara KCKT. INH memiliki 3 pKa, yaitu 1,8, 3,5, dan 10,8<sup>(11)</sup>. Berdasarkan persamaan Handerson-Hasselbalch<sup>(12)</sup> dapat dihitung pH optimum agar ketersediaan bentuk tidak terion analit menjadi tinggi. Dari perhitungan diperoleh pH 2,5 sampai dengan pH 3,0 yang dapat menghasilkan bentuk INH tidak terion hingga sekitar 75%. pH yang lebih tinggi dari 3,5 akan menghasilkan bentuk terion INH lebih dari 50%. Dasar perhitungan menggunakan nilai pKa 3,5, karena dengan pKa 1,8 dan 10,8 dihasilkan nilai pH yang lebih kecil dari 2 dan lebih besar dari 9. pH untuk sistem KCKT yang terlalu asam/basa dapat merusak kolom.

Pada awal penelitian, baku internal yang digunakan adalah nikotinamid karena nikotinamid memiliki gugus fungsi dan struktur yang mirip dengan INH sehingga diharapkan factor kapasitas pemisahan kecil. Namun, hasil pemisahan analit dan baku internal belum efektif pada sistem dengan menggunakan dapar fosfat pH 7–asetonitril dengan perbandingan 70:30 dengan kolom C8 panjang 25 cm<sup>(4)</sup>.

Pada Gambar 4 terlihat jelas bahwa puncak INH, AcINH, dan nikotinamid muncul di waktu retensi yang hampir sama. Kromatogram yang dihasilkan pecah jika digunakan fase gerak dengan komposisi asetonitril. Oleh karena itu pada penelitian ini, beberapa komposisi fase gerak telah dicoba yaitu dapar fosfat 0,1 M pH 2,8; 3; 3,5; 4; 4,5; 4,5; 5 dengan metanol dalam beberapa perbandingan, heksasulfonat dengan metanol, dan dapar formiat dengan metanol dan digunakan 2 jenis kolom yaitu C8 (panjang 250mm) dan C18 (panjang 150 mm dan panjang 250

mm) serta baku internal vitamin B6. Hasil waktu retensi INH, AcINH, dan vitamin B6 sebagai baku internal dalam air dengan laju alir 1ml/menit dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan Tabel 1 dapat dilihat bahwa pada penggunaan dapar fosfat 0,1M pH 2,8 dan pH 3,5 waktu retensi yang dihasilkan INH, AcINH, dan vitamin B6 berdekatan. Namun, pada perbandingan 50:50 baik pada pH 2,8 maupun 3,5 memberikan waktu retensi INH, AcINH, dan vitamin B6 yang mulai memisah.

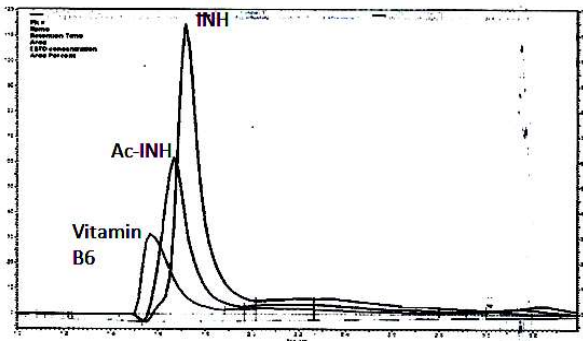
Berdasarkan Gambar 5 dan 6 terlihat bahwa ketiga analit menghasilkan retensi yang mulai berjauhan, namun belum memenuhi kriteria pemisahan yang baik. Dengan demikian, kondisi KCKT dengan fase gerak dapar fosfat pH 2,8 dan 3,5-metanol dengan berbagai perbandingan, kolom C18 panjang 150mm dan 250mm tidak dapat digunakan karena belum menghasilkan pemisahan antara ketiga analit. Selain dengan menggunakan dapar fosfat, pada penelitian ini dilakukan juga optimasi dengan menggunakan dapar formiat pH 2,8-metanol dengan perbandingan



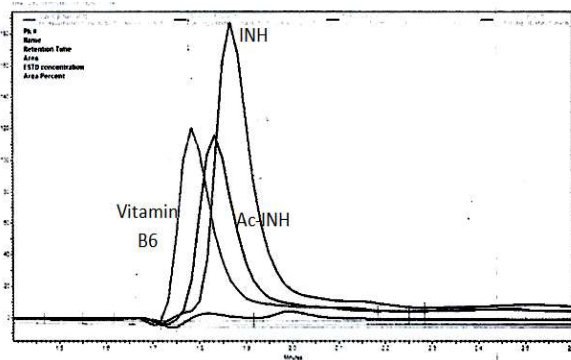
Gambar 4. Kromatogram INH, AcINH, dan nikotinamid tampilan overlay

Tabel 1. Waktu retensi analit dan baku internal dalam fase gerak dapar fosfat-metanol

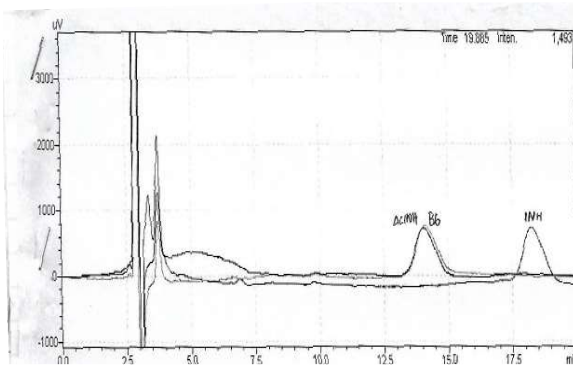
pH	Perbandingan dapar fosfat 0,1 M-Metanol	Waktu retensi (menit)		
		INH	AcINH	Vitamin B6
2,8	85:15	1,866	1,867	1,707
	80:20	1,717	1,667	1,700
	60:40	1,732	1,716	1,600
	50:50	1,717	1,667	1,566
	40:60	1,701	1,649	1,583
3,5	70:30	1,950	1,900	1,717
	60:40	1,767	1,733	1,600
	50:50	1,867	1,833	1,783
	40:60	1,700	1,667	1,667
	30:70	1,750	1,717	1,667



Gambar 5. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay dengan fase gerak dapar fosfat 0,1 M pH 2,80-metanol (50:50)



Gambar 6. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay dengan fase gerak dapar fosfat 0,1 M pH 3,5-metanol (50:50)



Gambar 7. Kromatogram INH, AcINH, dan vitamin B6 tampilan overlay fase gerak dapar formiat-metanol (60:40)

30:70; 40:60; 50:50; 60:40 menggunakan kolom C8 panjang 250mm pada panjang gelombang 266nm dan laju alir 1ml/menit. Berdasarkan hasil percobaan, kromatogram menunjukkan pemisahan yang belum efektif untuk INH, AcINH, dan vitamin B6. Pada penggunaan 60:40 diperoleh waktu retensi pada menit ke-18, sehingga kondisi tersebut tidak efektif dan efisien (Gambar 7).

Penelitian dilanjutkan dengan menggunakan fase gerak pasangan ion heksasulfonat 20mM dengan metanol perbandingan 65:35 menggunakan kolom C18 panjang 25cm dengan suhu 25°C, 30°C, dan 40°C serta laju alir yang disesuaikan yaitu 0,5 ml/menit; 0,8 ml/menit; dan 1ml/menit. Preparasi sampel yang digunakan berupa campuran ketiga analit dalam air. Berdasarkan hasil yang didapatkan, resolusi terbaik (> 1,5) diperoleh pada kondisi kolom C18 250mm dengan suhu 30°C, fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) dengan 1 ml/menit, dan panjang gelombang deteksi 265nm.

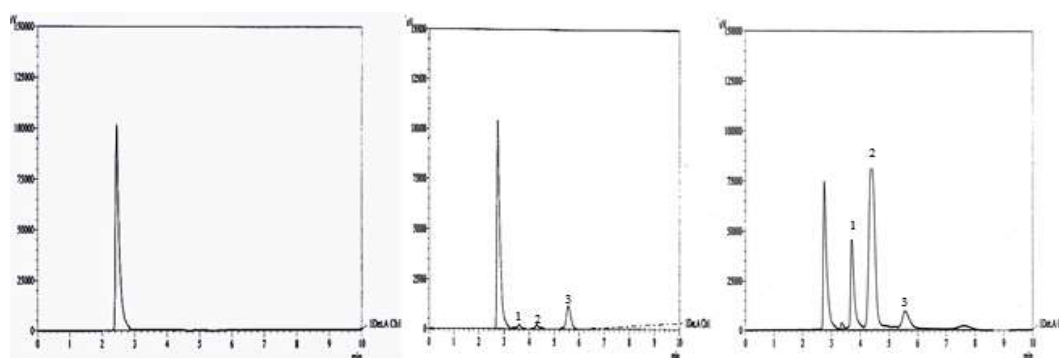
Berdasarkan Tabel 2 dan 3 dapat disimpulkan bahwa kondisi optimum untuk memisahkan INH, AcINH, dan vitamin B6 dengan fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2.47-metanol (65:35) menggunakan baik kolom C8 maupun C18 dengan panjang kolom 25 cm memenuhi persyaratan karena nilai resolusi ketiga analit diantara >1,5 dan nilai faktor ikutan ketiga analit di bawah 1,2<sup>(8)</sup>. Penggunaan kolom C8 menghasilkan waktu pemisahan yang lebih cepat dari kolom C18. Hal ini karena kolom C18 lebih nonpolar dari C8, sehingga pasangan ion yang bersifat nonpolar tertahan lebih lama pada kolom C18 dibandingkan C8. Mekanisme pemisahan dengan kromatografi fase balik pasangan ion ini adalah meningkatkan afinitas analit polar terhadap fase diam yang nonpolar dengan terbentuknya pasangan ion antara analit yang terion dengan pereaksi pasangan ionnya. Peningkatan afinitas terjadi karena analit akan menjadi lebih nonpolar setelah membentuk pasangan ion, karena pereaksi pasangan ion memiliki gugus nonpolar. Pada penelitian ini gugus heksan adalah

Tabel 2. Waktu retensi dengan fase gerak heksasulfonat 20mM-metanol (65:35) dalam berbagai suhu dan laju alir pada kolom C18

Suhu (°C)	Laju alir (ml/menit)	Waktu retensi (menit)			Resolusi
		INH	AcINH	Vitamin B6	
25	0,5	5,651	5,217	7,605	<1,5
	0,8	3,957	3,595	5,476	<1,5
	1	3,656	3,288	5,111	<1,5
30	0,5	6,308	5,751	8,805	<1,5
	0,8	4,021	3,670	5,643	<1,5
	1	3,952	3,479	5,587	>1,5
40	0,5	5,962	5,568	8,184	<1,5
	0,8	3,693	3,475	5,102	<1,5

**Tabel 3. Waktu retensi, luas area, faktor ikutan, dan resolusi analit dengan fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) pada kolom C18 dan C8**

Analit	Konsentrasi (µg/mL)	Luas Puncak	Waktu retensi (menit)	Faktor ikutan	Resolusi
Kolom C18					
AcINH	12	468510	3,479	1,260	2,020
INH	12	693558	3,952	1,263	1,885
Vitamin B6	12	255548	5,587	1,261	3,535
Kolom C8					
AcINH	12	102446	3,779	1,160	3,183
INH	12	95023	4,069	1,101	1,508
Vitamin B6	12	302145	5,011	0,911	1,923

**Gambar 8. Kromatogram blangko plasma (a), sampel plasma mengandung AcINH (1) dan INH (2) pada konsentrasi LLoQ (b), dan sampel plasma konsentrasi AcINH (1) dan INH (2) masing-masing 17,5µg/mL menggunakan sistem fase diam C18 suhu 30°C, fase gerak heksasulfonat 20mM pH 2,47-metanol (65:35) dengan laju alir 1mL/men, detektor UV-265nm dan Vitamin B6 (3) sebagai baku internal**

gugus nonpolar dari pereaksi pasangan ion. Kolom yang digunakan selanjutnya adalah kolom C18 (Gambar 8) karena area puncak yang dihasilkan untuk ke-3 analit lebih besar dari area pada penggunaan kolom C8. Hal ini akan meningkatkan sensitivitas metode.

#### Uji Kesesuaian Sistem

Kesesuaian sistem diuji untuk memberikan jaminan bahwa sistem kromatografi yang digunakan akan bekerja dengan baik selama analisis berlangsung. Hasil dari penyuntikan sebanyak 6 kali memberikan simpangan baku rata-rata (SBR) ketiga analit yang kurang dari 2,0%. Resolusi ke-2 analit >1,5. Nilai faktor ikutan untuk INH dan AcINH berturut-turut adalah 1,297, dan 1,912. Nilai k yang kurang dari 10 dan nilai N yang lebih besar dari 5000 menunjukkan efisiensi pemisahan yang baik. Hasil menunjukkan metode memenuhi persyaratan Farmakope Indonesia Edisi V<sup>(8)</sup>.

#### Kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi dibuat untuk digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi analit dalam sampel. Kurva juga sekaligus dapat menggambarkan linearitas metode. Persamaan kurva yang dihasilkan adalah  $Y=0,6219X-0,0388$  dengan  $r=0,9992$  untuk INH dan  $Y=0,4908X-0,0254$  dengan  $r=0,9998$  untuk AcINH

titik konsentrasi yang diuji memenuhi syarat akurasi dan presisi metode<sup>(9,10)</sup>.

#### Batas Kuantifikasi Terendah

Batas kuantifikasi terendah atau *lower limit of quantification* (LLOQ) merupakan konsentrasi terendah dari analit dalam sampel yang masih dapat ditentukan dengan tetap memenuhi syarat akurasi dan presisi<sup>(9,10)</sup>. Semakin kecil nilai LLOQ menunjukkan semakin sensitifnya suatu metode analisis. Dalam analisis kadar obat dalam plasma, diperlukan suatu metode yang cukup sensitif yang dapat mengukur hingga konsentrasi terkecil obat dalam plasma. Menurut EMEA (2012), metode dapat digunakan untuk studi farmakokinetik bila nilai LLOQ yang dapat lebih kecil sama dengan 5%  $C_{maks}$ <sup>(9)</sup>. LLOQ untuk INH dan AcINH berturut-turut adalah 0.1258 dan 0.1188µg/mL. Hasil menunjukkan bahwa metode cukup sensitif dalam mengkuantifikasi INH dan AcINH dalam plasma manusia. LLOQ ini memberi hasil yang lebih baik dari analisis INH dalam urin dengan spektrofotometri cahaya tampak pada studi farmakokinetik INH<sup>(13)</sup>. Hal ini memperkuat bukti bahwa metode KCKT lebih sensitif dari metode spektrofotometri<sup>(14,15)</sup>. Bila dibandingkan LLOQ dari penelitian sebelumnya dengan metode KCKT, hasil penelitian juga lebih sensitif. Hasil penelitian dengan



asetonitril-heptansulfonat 20mM pH 2,5 pada laju alir 2mL/menit menunjukkan nilai LLoQ lebih kecil yaitu 0,023 µg/mL<sup>(5)</sup>. Namun, dari sisi efisiensi metode ini lebih baik karena penggunaan fase gerak yang lebih sedikit. Nilai LLoQ hasil penelitian ini cukup memadai untuk studi farmakokinetik INH karena lebih kecil dari 1/20 (seperduapuluh) Cmaks INH dalam plasma, yaitu sebesar 0,2 µg/mL<sup>(2)</sup>. Sesuai dengan EMEA, LLoQ untuk studi farmakokinetik harus lebih kecil dari 5% Cmaks analit<sup>(9)</sup>.

#### Uji Selektivitas Metode

Uji selektivitas metode untuk melihat kemampuan metode menghasilkan respon yang berbeda antara analit dengan analit lainnya maupun antara analit dengan matriks. Analisis dalam plasma manusia perlu diuji selektivitasnya pada simulasi analit dalam matriks yang berasal dari 6 plasma manusia yang berbeda<sup>(9,10)</sup>. Konsentrasi analit dalam matriks plasma adalah pada konsentrasi LLoQ. Hasil menunjukkan bahwa metode selektif dengan nilai SBR dan % kesalahan yang memenuhi syarat<sup>(9,10)</sup>.

### SIMPULAN

Sistem kromatografi cair kinerja tinggi menggunakan kolom fase balik C18, fase gerak heksansulfonat 20mM pH 2,47 dengan laju alir 1 mL/menit, volume injeksi 20µL, detektor pada 265nm, dan baku internal vitamin B6 menghasilkan pemisahan yang selektif untuk analisis INH, AcINH dalam plasma.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kemenristekdikti yang telah mendanai penelitian ini melalui program hibah Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi.

### DAFTAR PUSTAKA

1. WHO (World Health Organization). 2010. Treatment of Tuberculosis: Guidelines. 4th. Geneva: World Health Organization; Stop TB Initiative (World Health Organization).
2. Klein DJ, S Boukouvala, EM McDonagh, SR Shuldiner, N Laurieri, CF Thorn, RB Altman, TE Klein. *PharmGKB summary: isoniazid pathway, pharmacokinetics*. Pharmacogenet Genomics; 2016. 26(9): 436–444.
3. Teixeira RLF, RG Morato, PH Cabello, LMK Muniz, ASR Moreira, AL Kritski, FCQ Mello, PN Suffys, AB Miranda, dan AR Santos. *Genetic polymorphisms of NAT2, CYP2E1 and GST enzymes and the occurrence of antituberculosis drug-induced hepatitis in brazilian TB patients*, Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011. 106 (6). Rio de Janeiro. Sept. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000600011>.
4. Stella. Optimasi dan validasi metode analisis isoniazid dan pirazinamid dalam tablet 4 fixed dosecombination(4FDC) dan plasma in vitro secara kromatografi cair kinerja tinggi [Skripsi] FMIPA UI. 2011.
5. Madhavi R, Mohana KA, Shobha RG, Mounika D. Isoniazid: *A Review of Analytical Methods*. Asian J. Pharm. Ana. 2015. 5(1):41-5.
6. Bhandari R, IP Kaur. *A sensitive HPLC method for determination of isoniazid in rat plasma, brain, liver, and kidney*, J Chromat Separation Techniq, 2012. 3(3):1-5. ISSN2157-7064 JCGST.
7. Kumar AKH, V Sudha, G Ramachandran. *Simple and rapid method for simultaneous determination of isoniazid and acetylisoniazid in urine by HPLC*. Asian J Biomed and Pharm Sci. 2014. 4(34):46-50.
8. Kemenkes. Farmakope Indonesia V. Direktorat Jendral Bina Farmasi dan Alat Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. 2014. ISBN 987-602-235-463-5:567-9.
9. EMEA (European Medicines Agency). 2012. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009.
10. FDA (Food Drug Administration). Guidance for industry bioanalytical method of validation; available from: [www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm). 2018.
11. Atta NF, A Galal, RA Ahmed. *Voltammetric behavior and determination of isoniazid using PEDOT electrode in presence of surface active agents*. Int J Electrochem Sci. 2011. 6(10):5097-113.
12. Oommen V, Ganesh G, Vadivel K, Kanthakumar P. The Henderson-Hasselbalch equation : a three dimensional teaching model. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 2016. 60(1):70-75.
13. Brown SA, NA Ezejiofor, OE Orisakwe. *Pharmacokinetics of isoniazid with or without ofloxacin*. International Current Pharmaceutical Journal. 2012.1(12):403-9.
14. Skoog DA, DM West, FJ Holler. SR Crouch. *Fundamental of analytical chemistry*. Ninth Edition. Mary Finch Publisher. 2014. ISBN-13: 978-0-495-55828-6. ISBN-10: 0-495-55828-1
15. Snyder LR, JJ Kirkland, JW Dolan. *Introduction to modern Liquid Chromatography*. Third Edit. United States of America: Wiley Publication. 2010.

## **Potensi Biduri (*Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton) sebagai Tanaman Obat**

### **(Prospect of Biduri (*Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton) as Medicinal Plant)**

MEUTIA FARADILLA\*, HILDA MAYSARAH

Jurusan Farmasi, Universitas Syiah Kuala, Aceh, Indonesia.

\*Penulis korespondensi, Hp : 08562075084

e-mail: meutia.faradilla@gmail.com

Diterima 28 Februari 2019, Disetujui 2 Oktober 2019

**Abstrak:** *Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton atau yang dikenal dengan nama Biduri di Indonesia telah digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai antiinflamasi, antitoksin, dan antipiretik. Tanaman ini sering dijumpai di daerah yang beriklim panas dan gersang. Penelitian tentang potensi tanaman ini belum banyak dilakukan di Indonesia. Artikel ini bertujuan untuk menelaah potensi tanaman biduri sebagai sumber tanaman obat. Penelaahan dilakukan dengan mengkaji literatur penelitian tanaman biduri baik yang bersumber dari jurnal internasional maupun nasional. Hasil telaah menunjukkan bahwa berbagai jenis ekstrak dari tanaman biduri memiliki potensi terapeutik untuk dikembangkan lebih lanjut. Terhadap ekstrak-ekstrak tersebut juga telah dilakukan pengujian dan isolasi fitokimia untuk mencari zat aktif yang berperan dalam aktivitas farmakologi yang diuji. Berdasarkan telaah yang telah dilakukan, tanaman biduri memiliki potensi yang besar untuk diteliti dan dikembangkan lebih lanjut menjadi salah satu sumber tanaman obat di Indonesia.

**Kata kunci:** Biduri, *Calotropis gigantea*, tanaman obat.

**Abstract:** *Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton or known as Biduri in Indonesia has been used in traditional medicine as an anti-inflammatory, antitoxin and antipyretic. This plant is often found in hot and arid climates. Research on the potential of this plant has not been done much in Indonesia. This article aims to examine the potential of Biduri as a source of medicinal plants. The study was carried out by reviewing research literatures of the botanical plants both sourced from international and national journals. The results of the study indicate that various types of extracts from the biduri plant have therapeutic activities for further development. The phytochemical testing and isolation has also been carried out to look for active substances that play a role in the pharmacological activity being tested. Based on the studies that have been carried out, biduri plants have great potential to be researched and further developed to become one of the sources of medicinal plants in Indonesia.

**Keywords:** Biduri, *Calotropis gigantea*, medical plants

## PENDAHULUAN

*Calotropis gigantea* (L.) W.T. Aiton atau dikenal sebagai widuri, biduri, rubek, rubik di Sumatera memiliki banyak manfaat baik untuk bidang kesehatan maupun non-kesehatan. Biduri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah, dan pantai berpasir. Tanaman ini memiliki getah berwarna putih, encer, rasanya pahit dan kelat, bay menyengat, dan beracun.

Secara empiris, masyarakat telah menggunakan kulit akar *Calotropis gigantea* sebagai kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), pemicu kerja enzim pencernaan (alteratif), dan peluruh kencing (diuretik). Bunga biduri berkhasiat tonik dan peningkat nafsu makan, sementara daunnya berkhasiat rubifasien dan menghilangkan gatal. Daun biduri digunakan oleh masyarakat untuk mengobati kudis, luka, sariawan, gatal pada cacar air, campak, demam, dan batuk. Getahnya meski beracun dan dapat menyebabkan muntah, tapi berkhasiat sebagai obat pencahar.

Akar *Calotropis gigantea* secara tradisional digunakan sebagai antidot gigitan ular dan antiskabies<sup>(1)</sup>. Serbuk bunga *Calotropis gigantea* dalam dosis kecil digunakan dalam pengobatan flu, batuk, asma, gangguan pencernaan, inflamasi, dan hilang nafsu makan<sup>(2)</sup>. Di India, getah tanaman *Calotropis gigantea* digunakan pada kulit yang terkena duri untuk menghentikan perdarahan dan sebagai antiinflamasi<sup>(3)</sup>.

Pada beberapa literatur lain, masyarakat menggunakan *Calotropis gigantea* untuk mengoobati bronchitis, dyspepsia, paralisis, pembengkakan,

dan demam<sup>(4)</sup>. Dalam pengobatan tradisional di Bangladesh, akar dan daun *Calotropis gigantea* digunakan untuk mengobati tumor abdominal, sifilis, lepra, penyakit kulit, wasir, luka, rematik, gigitan insektisida, ulcer dan kaki gajah. Beberapa bagian dari tanaman ini dilaporkan memiliki efek terapeutik seperti antiinflamasi, analgesik, sedatif, anti-diare, dan antipiretik<sup>(2)</sup>.

Selama ini potensi tanaman biduri sebagai tanaman obat atau penghasil senyawa obat yang berkhasiat belum banyak diteliti lebih lanjut, terutama di Indonesia. Oleh karena itu, penulis berusaha mengumpulkan berbagai literatur tentang *Calotropis gigantea* dalam artikel ini sebagai informasi komprehensif yang dapat digunakan untuk penelitian dan pengembangan tanaman ini ke depannya.

## METODE

Artikel ini merupakan hasil telaah laporan atau artikel penelitian dari tanaman Biduri yang telah dipublikasikan di berbagai jurnal ilmiah baik di tingkat Nasional maupun Internasional. Literatur yang dikaji berasal dari artikel yang dipublikasikan antara tahun 2005 hingga tahun 2017, dengan tambahan dua artikel dari tahun 1992 yang memeriksa kandungan fitokimia dari tanaman *Calotropis gigantea*. Artikel penelitian yang dikaji mencakup informasi mengenai kandungan berbagai jenis ekstrak dari tanaman Biduri dan potensi aktivitasnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Kandungan Fitokimia *Calotropis gigantea*.** Berikut ini adalah hasil elusidasi metabolit sekunder yang terkandung pada tanaman *Calotropis gigantea*:

**Tabel 1. Kandungan senyawa kimia dalam *Calotropis gigantea*.**

No	Bagian tanaman	Senyawa yang terkandung	Sumber
1	Tanaman utuh	Tannin, flavonoid, triterpenoid, alkaloid, glikosida, glikosida jantung, calotropin, calotropin D1, calotropin D2, procerosterol, taraxsterol	Chandrawat & Sharma, 2016; (5) Deshmukh, et.al., 2009 (6)
2		Kardenolida, pregnane, terpena, flavonoid, steroid	Habib, et.al., 2010 (2)
3	Kulit akar	Calotroposide A, calotroposide B, oxypregnane-digoglycosida, calotropin, frugosida, 4-o-β-D-glucopyranosyl frugosida	
4	Daun	Isorhamnetin-3-o-rutinosida, isoharmnetin-3-o-glucopyranoside dan taraxesteryl acetate, isrhamnetin-3-o[2-o-β-D-galactopyranoside, ascorbic acid, opyrocathelic acid, β-amyirin, taxasterol, tarasterol, β-sitosterol, 19-Nor and 18, 20 epoxy cardenolides, 15-β-hydroxycardenolides, 16-hydroxy calactinic acid, methylester	Chandrawat & Sharma, 2016; (5)



Hasil elusidasi menggunakan HPLC terhadap ekstrak metanol akar *Calotropis gigantea* yang difraksinasi dengan berbagai campuran seperti n-heksan dan air, etil asetat-air, n-butanol-air menunjukkan keberadaan senyawa-senyawa seperti  $\alpha$ -amyirin methylbutanoate dan  $\beta$ -amyirin methylbutanoate,  $\alpha$ -amyirin acetate,  $\beta$ -amyirin acetate, calotropide A, B, C, D, E, F dan G, coroglaucigenin, cardenolides, frugoside, dan 4'- $\beta$ -D-glucosylfrugoside<sup>(1)</sup>.

Isolasi terhadap ekstrak metanol daun *Calotropis gigantea* menunjukkan adanya senyawa-senyawa lignan seperti 9'-methoxypinoresinol dan senyawa 5-hydroxymethylfurfural terglukosilasi yaitu calofurfuralside A dan B. Senyawa lain yang dapat diisolasi dari ekstrak ini adalah 2-methylpyridin-3-ol, 5-hydroxymethylfurfural, (+)-syringaresinol, (+)-pinoresinol, (+)-pinoresinol 4-O-[6"-O-vanilloyl]- $\beta$ -D-glucopyranoside, isoliquiritigenin, 14 $\alpha$ -hydroxypregna-4,6-diene-3,20-dione, pregna-4,6-diene-3,20-dione, dan calotropone<sup>(4)</sup>.

**Aktivitas Farmakologi. Aktivitas Penyembuhan Luka.** Beberapa penelitian telah dilakukan untuk memeriksa aktivitas farmakologi dari tanaman *Calotropis gigantea*. Ekstrak metanol getah *Calotropis gigantea* pada dosis 50 mg/kg BB yang diujikan pada tikus Wistar meningkatkan ketebalan epitel gingiva dan meningkatkan jumlah fibroblast tikus wistar jantan yang sebelumnya diberi perlakuan punch biopsy. Getah biduri dapat meningkatkan proses penyembuhan yang ditandai dengan peningkatan kolagen, sintesis DNA dan protein, serta epitelisasi yang berperan untuk mengurangi luka. Kemampuan ekstrak methanol *Calotropis gigantea* dalam proses penyembuhan luka diduga disebabkan kandungan enzim proteolitik (kalotropin) yang terdapat dalam getah<sup>(7,8)</sup>.

Aktivitas penyembuhan luka juga ditemukan pada ekstrak etanol 95% kulit akar *Calotropis gigantea* yang diujikan pada tikus wistar pada dosis 50 mg/hewan yang diberikan secara topikal. Ekstrak etanol kulit akar *Calotropis gigantea* yang diberikan secara topikal meningkatkan persentase kontraksi luka dan menyempurnakan proses penyembuhan luka yang menandakan proses pembentukan epitel dan kolagen yang lebih cepat bila dibandingkan dengan povidone iodine yang digunakan sebagai kontrol<sup>(6)</sup>.

Ekstrak kasar yang diperoleh dari getah *Calotropis gigantea* dengan cara mempresipitasi supernatan getah *Calotropis gigantea* lalu disuspensikan dalam 10 mM dapar fosfat, mengandung banyak protein dan memiliki aktivitas caseinolytic dan proteolytic pada rentang uji 10-100  $\mu$ g. Pada dosis 10  $\mu$ g ekstrak kasar getah *Calotropis gigantea* mampu menghidrolisis kasein dan substrat lain seperti fibrinogen dan benang

fibrin yang terdapat pada bekuan plasma dengan pola dose-dependent. Selain itu, ekstrak kasar getah *Calotropis gigantea* juga berpotensi mempercepat pembentukan bekuan darah pada plasma manusia.

Hidrolisis fibrinogen oleh ekstrak kasar getah *Calotropis gigantea* tidak menyebabkan terbentuknya bekuan benang fibrin. Potensi getah *Calotropis gigantea* pada dosis rendah untuk menginduksi pembentukan bekuan plasma selama proses rekalsifikasi yang menjelaskan peran getah *Calotropis gigantea* untuk menghentikan perdarahan pada pengobatan tradisional. Namun, pada dosis tinggi, getah *Calotropis gigantea* justru menginduksi perdarahan pada daerah yang diberikan getah. Potensi perdarahan dari getah *Calotropis gigantea* ini lebih kuat dari enzim tripsin dan papain<sup>(3)</sup>.

**Aktivitas Antimikroba.** Ekstrak metanol dan fraksi kloroform dari akar *Calotropis gigantea* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus megaterium* yang seringkali terdapat pada pus yang menyebabkan luka dan keracunan makanan. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak metanol dan fraksi kloroform terhadap *Bacillus megaterium* adalah 128  $\mu$ g/mL dan 64  $\mu$ g/mL, sementara besaran KHM terhadap *Pseudomonas aeruginosa* untuk kedua bahan uji tersebut adalah 64  $\mu$ g/mL. Fraksi petroleum ether memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dan *Shigella sonnei* dengan KHM masing-masing sebesar 128  $\mu$ g/mL dan 64  $\mu$ g/mL. Sementara fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* dengan KHM 32  $\mu$ g/mL<sup>(9)</sup>.

Ekstrak etanol 80% akar *Calotropis gigantea* diujikan secara *in vivo* pada mencit jantan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan menunjukkan potensi aktivitas antimalaria dengan dosis efektif 50% yang diperoleh adalah 4,26 mg/Kg BB<sup>(10)</sup>.

**Aktivitas Antikanker.** Tiga senyawa hasil isolasi ekstrak metanol daun *Calotropis gigantea* memiliki aktivitas sitotoksik terhadap lini sel PANC-1 dalam DMEM dengan konsentrasi IC<sub>50</sub> sebesar 3,7  $\mu$ M dan secara signifikan menghambat pembentukan koloni PANC-1<sup>(4)</sup>. Isolat yang berasal dari cardenolida, senyawa kimia yang terdapat pada kulit akar *Calotropis gigantea* juga memiliki aktivitas antiproliferatif ketika diujikan pada kultur sel HeLa<sup>(11)</sup>.

Ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* menurunkan jumlah sel fibroblast dan memperbaiki serat kolagen pada mencit yang diinduksi DMBA dengan pola penurunan tergantung pada dosis yang diberikan. Pada dosis uji 150 mg/kg BB, ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* memiliki aktivitas penurunan proliferasi sel fibroblast paling tinggi. Diduga kandungan kardenolida dalam

ekstrak berperan dalam inhibisi enzim ATPase yang menyebabkan produksi ATP di mitokondria sel kanker menurun sehingga sel kekurangan energi dan mati<sup>(12)</sup>.

Hasil pengujian ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* pada mencit Swiss albino menunjukkan dosis letal ekstrak adalah 225 mg/kg BB. Ekstrak ini kemudian diujikan pada mencit yang diinduksi tumor Ehrlich's ascites carcinoma untuk melihat potensinya sebagai antikanker. Pada dosis 200 mg/kg bb, ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* menunjukkan potensi tertinggi dalam inhibisi pertumbuhan sel, menghambat proliferasi Ehrlich's ascites carcinoma, mampu memperpanjang masa hidup hewan coba sebesar 65,1%, dan menekan peningkatan berat badan pada hewan uji yang diinduksi dengan tumor. Hasil uji tersebut mengindikasikan ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* memiliki efek sitotoksik langsung atau efek tidak langsung yang bersifat lokal yang meliputi aktivasi makrofag, inhibisi permeabilitas vaskular dan defisiensi cairan nutrisi<sup>(2)</sup>.

Pemberian ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* pada mencit yang diinduksi Ehrlich's ascites carcinoma juga memperbaiki parameter hematologi (haemoglobin, hitung sel darah merah dan putih total, persentase limfosit dan neutrophil) dan biokimia (kadar gula darah, kolesterol total, trigliserida, serum urea) mendekati atau kembali ke kadar normal. Hasil uji mengindikasikan efek protektif ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* pada sistem haemopoietik.

Aktivitas enzimatis seperti ALP, SGPT, dan SGOT pada hewan uji yang diinduksi karsinoma juga kembali ke kadar normal pada kelompok yang diberikan ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea*. Ini menunjukkan kemampuan protektif ekstrak etil asetat bunga *Calotropis gigantea* terhadap efek hepatotoksik yang diakibatkan oleh karsinoma<sup>(2)</sup>.

Pengujian aktivitas antikanker dari ekstrak kulit akar *Calotropis gigantea* pada mencit jantan Swiss albino yang diinduksi Ehrlich's ascites carcinoma, diketahui dosis letal ekstrak metanol, fraksi petroleum eter, dan fraksi kloroform *Calotropis gigantea* masing-masing adalah 259,2 mg/kg BB, 905,1 mg/kg BB, dan 482,5 mg/kg BB. Dari keseluruhan sampel uji, peningkatan masa hidup hewan uji yang diinduksi tumor terjadi pada hewan uji yang diberikan terapi/intervensi fraksi kloroform dosis 40 mg/kg BB. Ekstrak metanol (10 dan 20 mg/kg BB) dan fraksi kloroform (20 dan 40 mg/kg BB) kulit akar *Calotropis gigantea* menunjukkan aktivitas penurunan nilai ALP dan SGOT pada hewan uji yang diinduksi tumor<sup>(13)</sup>.

**Efek Terhadap Sistem Syaraf Pusat.** Ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* menunjukkan aktivitas pada sistem syaraf pusat. Pemberian ekstrak etanol *Calotropis gigantea* dosis tunggal dosis 500

mg/kg bb terhadap tikus Wistar yang diinduksi kejang menunjukkan penurunan kekejangan pada tungkai-tungkai tikus. Ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* juga menunjukkan penundaan onset kejang yang disebabkan oleh strychnine, namun tidak mampu mencegah terjadinya kejang. Pada dosis 200 dan 500 mg/kg BB, ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* menunjukkan potensi sebagai *muscle relaxant*<sup>(14)</sup>.

Pengujian aktivitas sedatif dan ansiolitik ekstrak etanol daun *Calotropis gigantea* pada mencit Swiss albino jantan menunjukkan potensinya sebagai sedatif pada dosis 400 mg/kg dilihat dari onset kerja yang lebih cepat dan durasi sedasi yang lebih lama bila dibandingkan dengan diazepam<sup>(15)</sup>.

Isolat cardenolide yang diperoleh dari (buah/lateks) *Calotropis gigantea* menunjukkan respon menghambat hipoksia yang diinduksi oleh aktivitas transkripsi HIF-1 dengan pola dose-dependent response. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak uji berkisar antara 21.8 – 64.9 nM<sup>(16)</sup>. Ekstrak etanol bunga *Calotropis gigantea* pada dosis 500 mg/kg BB menunjukkan aktivitas analgesik ketika diujikan pada mencit Swiss albino dengan menggunakan metode plat panas dan asam asetat<sup>(17)</sup>.

## SIMPULAN

Berdasarkan berbagai hasil uji aktivitas dan telaah kandungan kimia yang telah dilakukan, biduri (*Calotropis gigantea*) sangat berpotensi untuk diformulasikan menjadi bentuk sediaan, baik dalam bentuk jamu, obat herbal terstandar, atau fitofarmaka. Telaah kandungan kimia juga dapat diteruskan ke tahap selanjutnya yaitu uji aktivitas sehingga kandungan metabolit sekunder tunggal dari *Calotropis gigantea* berpotensi menjadi senyawa obat baru.

## DAFTAR PUSTAKA

1. K. Isao, Z. Ru-song, P. Jong Dae, B. Nam in, T. Yasuyuki, Y. Masayuki SH. NII-Electronic Library Service. Chem Pharm Bull. 1992;40(8):2007–13.
2. Habib MR, Aziz MA, Karim MR. Inhibition of Ehrlich's ascites carcinoma by ethyl acetate extract from the flower of *Calotropis gigantea* L. in mice. J Appl Biomed [Internet]. 2010;8(1):47–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.2478/v10136-009-0007-7>
3. Rajesh R, Raghavendra Gowda CD, Nataraju A, Dhananjaya BL, Kemparaju K, Vishwanath BS. Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity. Toxicol. 2005;46(1):84–92.
4. Nguyen KDH, Dang PH, Nguyen HX, Nguyen MTT, Awale S, Nguyen NT. Phytochemical and cytotoxic studies on the leaves of *Calotropis gigantea*. Bioorganic

- Med Chem Lett [Internet]. 2017;27(13):2902–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.04.087>
5. Chandrawat P, Sharma RA. The Genus *Calotropis* : An Overview on Bioactive Principles and their Bioefficacy. 2016;5(1):61–70.
  6. Deshmukh PT, Fernandes J, Atul A, Toppo E. Wound healing activity of *Calotropis gigantea* root bark in rats. *J Ethnopharmacol*. 2009;125(1):178–81.
  7. Meilawaty Z. Pemberian ekstrak metanolik getah biduri (*Calotropis gigantea*) terhadap Ketebalan Epitel Gingiva Tikus Wistar. *Stomatognatic (JKG Unej)*. 2012;9(2):73–6.
  8. Meilawaty Z. Sel Fibroblas Gingiva Tikus Wistar Pada Penyembuhan Luka. *J Prodentia* [Internet]. 2013;1(2):71–7. Available from: <http://jprodentia.ub.ac.id/index.php/prodentia/article/view/24/26>
  9. Alam MA, Habib MR, Nikkon R, Rahman M, Karim MR. Antimicrobial Activity of Akanda (<i>Calotropis gigantea</i> L.) on Some Pathogenic Bacteria. *Bangladesh J Sci Ind Res* [Internet]. 2008;43(3):397–404. Available from: <http://www.banglajol.info/index.php/BJSIR/article/view/1156>
  10. Fiisyatirodiyah, H. Abdul, M.Roihatul HEK. Potensi Terapi Tunggal Antimalaria Ekstrak Etanol Akar Widuri. *J Farma Sains*. 2015;1(2):3–10.
  11. Van Khang P, Zhang ZG, Meng YH, Guo DA, Liu X, Hu LH, et al. Cardenolides from the bark of *Calotropis gigantea*. *Nat Prod Res* [Internet]. 2014;28(15):1191–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2013.06.002>
  12. Muslikhah. Pengaruh ekstrak etanol daun widuri (*Calotropis gigantea*) terhadap gambaran histologis fibrosarkoma pada mencit jantan (*Mus musculus*) yang diinduksi 7,12-dimetilbenz(a)antrasena (DMBA) secara *in vivo*. Malang: Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik; 2010. hal 59-70.
  13. Habib MR, Karim MR. Evaluation of antitumour activity of *Calotropis gigantea* L. root bark against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Asian Pac J Trop Med* [Internet]. 2011;4(10):786–90. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(11\)60194-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(11)60194-6)
  14. Ghule SD, Vidyasagar G, Bhandari A, Sharma P, Gunjal AP. CNS activity of leaves extract of *Calotropis gigantea*. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(S2):S902–5.
  15. Khan IN, Sarker MMI, Ajrin M. Sedative and anxiolytic effects of ethanolic extract of *Calotropis gigantea* (Asclepiadaceae) leaves. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet]. 2014;4(Suppl 1):S400–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2221169115303014>
  16. Parhira S, Zhu GY, Chen M, Bai LP, Jiang ZH. Cardenolides from *Calotropis gigantea* as potent inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2016;194(October):930–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.10.070>
  17. Pathak AK, Argal A. Analgesic activity of *Calotropis gigantea* flower. *Fitoterapia*. 2007;78(1):40–2.





## **Analisis *In-Silico* Senyawa Kimia dalam Teh Hijau yang Bekerja pada Aktivator (PPAR- $\gamma$ ) sebagai Antiobesitas**

### **(In-Silico Analysis of Chemical Compounds in Green Tea Working on Activators PPAR- $\gamma$ as Antiobesity)**

FARIDAH\*, ESTI MUMPUNI, YUDHA ISWARA YUNANTO

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta 12640

\*Penulis korespondensi, Hp : 08121315178

e-mail: faridah@univpancasila.ac.id

Diterima 28 Agustus 2019, Disetujui 22 Oktober 2019

**Abstrak:** Teh hijau dikenal banyak memiliki manfaat dan umum digunakan masyarakat sebagai antiobesitas, tetapi senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiobesitas. Tujuan penelitian untuk mencari bahwa senyawa kimia yang terdapat dalam tanaman teh hijau mempunyai aktivitas sebagai antiobesitas pada reseptor PPAR- $\gamma$ . Metode penelitian dilakukan dengan cara analisis *in silico* melalui *molecular docking* terhadap senyawa yang terdapat dalam tanaman teh hijau untuk mencari senyawa aktif dan memodelkan interaksi senyawa aktif pada reseptor yang berperan sebagai antiobesitas. *Software* yang digunakan adalah PLANTS, YASARA, *ChemSketch*, dan *Pymol*. Mula-mula dilakukan validasi internal pada reseptor PPAR- $\gamma$  dengan kode 2ATH. Proses docking dilakukan terhadap native ligand, senyawa pembandingan dan masing-masing senyawa uji dengan reseptor PPAR- $\gamma$  yang sama, dan senyawa pembandingan yang digunakan sebagai kontrol positif ialah Pioglitazone. Hasil penelitian menunjukkan sisi aktif terdapat 3 senyawa aktif dengan sisi aktif ikatan ligan pada reseptor PPAR- $\gamma$  yaitu ARG288, LYS367, PHE363, HIS323, HIS449, ILE326, MET364, LEU340, CYS285, SER342. Terdapat 3 senyawa aktif yaitu epigallocatekin-3-galat, epikatekin-3-galat dan teaflavin sebagai antiobesitas dengan mekanisme kerja mengaktivasi PPAR- $\gamma$ .

**Kata Kunci:** teh hijau, *in-silico*, antiobesitas, PPAR- $\gamma$

**Abstract:** Greentea has many benefits and recently used by citizen as an antiobesity, however it has not been researched yet. The purpose of this research is to find the chemical compound in greentea plants that potentially has an antiobesity activity at the PPAR- $\gamma$  receptor. The method that been used in this research is in-silico analysis trough molecular docking of chemical compound that potentially has an antiobesity activity in greentea plants. The software that been used in this research is PLANTS, YASARA, Chem Sketch, and Pymol. First step, the internal validation was performed on native ligand, comparative compound, and each of the trial compound with the same PPAR- $\gamma$  receptor, and the comparative compound that been used as a positive control is pioglitazone. The result showed there are 3 active compounds with active sides of ligand binding at PPAR- $\gamma$  receptor, they are ARG288, LYS367, PHE363, HIS323, HIS449, ILE326, MET364, LEU340, CYS285, SER342. There are 3 active compounds that have the potential as antiobesity, namely epigallocatekin-3-galat, epikatekin-3-galat dan theaflavin by activating PPAR- $\gamma$  receptor.

**Keywords:** green tea, in-silico, antiobesity, PPAR- $\gamma$

## PENDAHULUAN

OBESITAS merupakan suatu kelainan kompleks pengaturan nafsu makan dan metabolisme energi yang dikendalikan oleh beberapa faktor biologik spesifik. Secara fisiologis, obesitas didefinisikan sebagai suatu keadaan dengan akumulasi lemak yang tidak normal atau berlebihan di jaringan adiposa sehingga dapat mengganggu kesehatan seperti diabetes, gagal jantung, hipertensi, *osteoarthritis*, dan kanker<sup>(1)</sup>. Seiring dengan berkembangnya zaman serta perubahan tren dan pola hidup yang kurang sehat, saat ini banyak sekali masyarakat yang menderita obesitas. Obesitas dianggap sebagai sinyal pertama munculnya kelompok penyakit–penyakit non infeksi (*Non Communicable Diseases*) yang banyak terjadi di negara maju maupun negara berkembang. Obesitas ditandai dengan peningkatan indeks masa tubuh (IMT), yang didefinisikan sebagai berat badan individu dibagi dengan kuadrat dari tinggi ( $\text{kg/m}^2$ )<sup>(2)</sup>.

Klasifikasi Berat badan yang diusulkan berdasarkan IMT pada penduduk Asia dewasa : Normal ( $18,5 - 22,9 \text{ kg/m}^2$ ), Beresiko ( $23 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ ), Obesitas Tingkat I ( $25 - 29,9 \text{ kg/m}^2$ ), Obesitas Tingkat II ( $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ). Obesitas dapat terjadi karena faktor internal dan eksternal. Penyebab-penyebab dari faktor internal; seperti genetik, endokrin, umur. Faktor eksternal; seperti gaya hidup, tingkah laku, lingkungan, masalah sosial dan ekonomi<sup>(2)</sup>.

Beberapa senyawa dalam tanaman telah ditemukan mempunyai potensi sebagai anti-obesitas, dan minum teh merupakan minuman yang lazim dikonsumsi tidak hanya di Indonesia tapi dunia terutama di Asia, tetapi senyawa aktif yang berpotensi sebagai anti-obesitas dan bekerja pada reseptor PPAR- $\gamma$  secara *in vivo*<sup>(3)</sup>, dalam penelitian ini dilakukan uji aktivitas secara *in silico*, karena efisien dan efektif dalam hal waktu dan biaya, selektif langsung diuji pada reseptor atau sel target dan akurat.

## BAHAN DAN METODE

**Bahan.** Senyawa kimia dalam tanaman teh hijau (*camelia sinensis*) terdiri dari : epigalokatekin-3-galat, epigalokatekin, epikatekin-3-galat, epikatekin katekin kuersetin, kaempferol, mirisetin, kafein, teaflavin<sup>(2)</sup>, pioglitazone, reseptor PPAR- $\gamma$  2ATH<sup>(4)</sup>.

### Metode

#### Preparasi Reseptor (Protein)

1. Struktur kompleks protein dalam format (.pdb) didapatkan dari Protein Data Bank (PDB) di-download dari situs <http://mm.rcsb.org/>
2. Dipreparasi kembali dengan program

YASARA diperoleh dua file yaitu protein.mol2 dan ref\_ligand.mol2<sup>(4)</sup>.

#### Preparasi Native Ligan, Senyawa Pembanding dan Senyawa Uji

1. Preparasi dilakukan menggunakan *software* Marvin Sketch pada pH 7,4. Disimpan sebagai ligand\_2D.mrv.
2. Dipilih *conformational search* lalu disimpan hasil pencarian konformasi sebagai *ligand* dan tipe.mol2
3. Prosedur diatas dilakukan untuk setiap satu ligan/senyawa<sup>(4)</sup>.

#### Optimasi Protein

1. Native ligan yang sudah dipreparasi, selanjutnya dioptimasi dengan reseptor yang digunakan (PPAR- $\gamma$ ) menggunakan program PLANTS hingga didapat *score docking* dan dipilih *score* terbaik lalu disimpan dalam bentuk file .mol2
2. Dihitung nilai RMSD dengan program YASARA<sup>(5)</sup>.

#### Docking Senyawa Pembanding

1. File ligan pembanding yang diperoleh dari prosedur preparasi protein kemudian dilakukan *docking* menggunakan program PLANTS.
2. Diperoleh besarnya *score docking* dari ligan pembanding atau kontrol positif (Pioglitazone) yang nantinya akan dibandingkan dengan nilai *score docking* dari ligan senyawa uji<sup>(4)</sup>.

#### Docking Senyawa Uji

1. Pada prosedur ini dilakukan docking antara masing-masing ligan senyawa uji menggunakan program PLANTS.
2. Hasil *docking* diperoleh *score docking* ligan senyawa uji, nilai ini yang akan dibandingkan dengan *score docking* ligan kontrol positif (Pioglitazone)<sup>(4)</sup>.

#### Visualisasi Interaksi Ligan dan Reseptor

1. File hasil *docking* dari masing-masing ligan senyawa uji menggunakan program Pymol
2. File *docking* divisualisasi dan diinterpretasi untuk diketahui interaksi yang terjadi<sup>(4)</sup>.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Analisis Reseptor Yang Digunakan

Reseptor yang berperan mengontrol bermacam-macam gen target yang terlibat dalam homeostasis lipid

dan glukosa ialah *Peroxisome proliferators-activated receptors-gamma* (PPAR- $\gamma$ ). PPAR- $\gamma$  dapat berperan sebagai agonis endogen terhadap Thiazolidinedione<sup>(1)</sup>. Senyawa Pioglitazone yang termasuk golongan thiazolidinedione digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. Reseptor dapat digunakan dalam aplikasi docking sebaiknya berbentuk struktur kristal, *human*, dan setelah divalidasi menghasilkan *Root mean Square Deviation* (RMSD) kurang dari 2 Å<sup>(4)</sup>. Ligan uji dianggap memiliki potensi dapat masuk ke dalam reseptor dan di serap oleh tubuh jika memenuhi aturan Lipinski dengan kriteria:

1. BM < 500 gram/mol
2. Jumlah grup donor proton ikatan hidrogen < 5
3. Jumlah grup akseptor proton ikatan hidrogen < 10
4. Jumlah logaritma koefisien partisi dalam air dan 1-oktanol < 5<sup>(6)</sup>.

Setelah dilakukan validasi terhadap reseptor (Tabel 1), maka reseptor yang digunakan ialah reseptor PPAR- $\gamma$  dengan kode PDB: 2ATH karena mempunyai nilai RMSD sama dengan 1,1274 Å memenuhi

**Tabel 1. Hasil validasi beberapa reseptor PPAR- $\gamma$**

No	Protein	Kode	RMSD (Å)
1	Crystal structure of the ligand binding domain of human PPAR-gamma in complex with an agonist. Resolution: 2.07 Å	2F4B	2,4081
2	Crystal structure of the ligand binding domain of human PPAR-gamma in complex with an agonist. Resolution: 2.28 Å	2ATH	1,1274

persyaratan (<2Å).

### Simulasi Docking

Berdasarkan hasil *docking* senyawa uji dan kontrol positif terhadap reseptor PPAR- $\gamma$  (Tabel 2), terdapat 3 senyawa aktif dari tanaman Teh Hijau (*Camelia sinensis*) secara *in silico* menggunakan metode *molecular docking*<sup>(5)</sup>.

Penambatan molekul (*molecular docking*) merupakan penelitian dengan metode komputasi yang bertujuan untuk memperkirakan interaksi dan afinitas suatu ligan dengan suatu makromolekul (umumnya protein). Suatu molekul ligan dan protein diprediksi dengan teknik penempatan pada area tertentu (*active site*) sehingga memberikan hasil yang optimal. Menghasilkan suatu pose interaksi dan suatu nilai yang menentukan baik tidaknya suatu pose interaksi (*score docking*). Skor *docking* dihitung antara lain dengan satuan nilai *ChemPLP*. Nilai *ChemPLP* dihitung berdasarkan energi bebas Gibbs dimana semakin kecil (semakin negatif) terhadap senyawa kontrol positif maka dapat dikatakan memiliki afinitas ikatan yang baik, menunjukkan bahwa senyawa tersebut dengan mudah berikatan dengan reseptor<sup>(5,7)</sup>.

Hasil skor dilakukan pemilihan, senyawa uji dinyatakan aktif bila nilai *ChemPLP* lebih kecil (lebih negatif) dan dinyatakan tidak aktif bila nilai *ChemPLP* lebih besar (lebih positif) dibandingkan kontrol positif yaitu senyawa pioglitazon. Hasil skor tersebut dilakukan pengujian *statistic one-tailed paired T-test* untuk menentukan apakah skor senyawa uji berbeda nyata terhadap skor senyawa kontrol positif. Selanjutnya, senyawa aktif sebagai ligan pada reseptor PPAR- $\gamma$  secara *in silico* divisualisasi menggunakan aplikasi Pymol. Aplikasi Pymol akan menunjukkan bentuk ikatan dari suatu senyawa dengan reseptornya secara 3D. Pymol juga dapat digunakan untuk melihat jarak ikatan dari struktur yang diuji dengan asam

**Tabel 2. Hasil docking senyawa uji dan kontrol positif**

No	Tanaman Uji	Senyawa uji	Score docking		Keterangan
			Senyawa uji	Kontrol Positif (Pioglitazone)	
1	Teh Hijau ( <i>Camelia sinensis</i> )	<b>Epigalokatekin-3-galat</b>	<b>-92.8161</b>		<b>Aktif</b>
		Epigalokatekin	-79.5497	-92.7878	Tidak aktif
		<b>Epikatekin-3-galat</b>	<b>-98.8874</b>		<b>Aktif</b>
		Epikatekin	-78.6327		Tidak aktif
		Katekin	-80.8683		Tidak aktif
		Kuersetin	-69.4521		Tidak aktif
		Kaempferol	-74.7001		Tidak aktif
		Mirisetin	-77.8231		Tidak aktif
		Kafein	-66.2206		Tidak aktif
		<b>Teaflavin</b>	<b>-101.215</b>		<b>Aktif</b>



amino nya. Sehingga dari analisis dapat diketahui asam amino yang aktif dalam binding site reseptor<sup>(7)</sup>.

Dari data di atas diperoleh 3 senyawa uji yang diprediksi aktif dalam mengaktivasi reseptor PPAR- $\gamma$  yaitu epigalokatekin-3-galat, epikatekin-3-galat, dan teaflavin. Hasil dari penelitian ini bersifat sebagai penelitian tahap awal untuk membantu penelitian studi *in vitro* dan *in vivo* dalam pendekatan mekanisme kerja untuk menentukan senyawa potensial yang akan digunakan dalam penelitian dan diuji coba sehingga penelitian lebih efisien dan efektif.

Pada senyawa yang dinyatakan inaktif tidak menutup kemungkinan diantara senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antiobesitas pada reseptor lain, namun pada penelitian ini aktivitas antiobesitas yang diuji ialah aktivasi reseptor PPAR- $\gamma$ . Senyawa-senyawa inaktif tersebut ada kemungkinan memiliki aktivitas antiobesitas dengan mekanisme yang berbeda.

### SIMPULAN

Terdapat 3 senyawa aktif yaitu epigalokatekin-3-galat, epikatekin-3-galat dan teaflavin sebagai antiobesitas dengan mekanisme kerja mengaktivasi PPAR- $\gamma$ . Interaksi asam amino yang dapat meningkatkan afinitas senyawa ligan pada reseptor PPAR- $\gamma$ , yaitu serin dan arginin.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Kurdanti W, Suryani I, Syamsiatun NH, et al. Faktor-faktor yang mempengaruhi kejadian obesitas pada remaja. *J Gizi Klin Indones*. 2015;11(4):179-190. doi:10.22146/ijcn.22900.
2. Krisanti D. Herbal Medicine for Obesity. *J Med Planta*. 2011;1(3):91
3. Soegondo, S. Farmakoterapi pada Pengendalian Glikemia Diabetes Melitus Tipe 2. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi V: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta. 1134 hlm; 2009.
4. Struktur Kimia Ligan Protein PPAR- $\gamma$ . Diakses pada tanggal 28 November 2017 pukul 19.00 WIB (<https://www.rcsb.org/structure/2ATH>)
5. Pranowo H D. Peran Kimia Komputasi dalam Desain Molekul Obat. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada. 2009.
6. Dewi K. Pengaruh Ekstrak Teh Hijau (*Camellia Sinensis* var. *Assamica*) Terhadap Penurunan Berat Badan, kadar Trigliserida dan Kolesterol Total Pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Jkm*. 2008;7(2):155-162.
7. Aplikasi Pymol diakses pada tanggal 23 November 2017 pukul 06.00 WIB (<https://mmmf.rcsb.org/>)

## **Aktivitas Immunomodulator Ekstrak Etanol Kemukus (*Piper cubeba*), Kiseureuh (*Piper aduncum*), dan Cabe Jawa (*Piper retrofractum*) pada Mencit Jantan Galur Balb/C**

### **(Immunomodulatory Activity of Ethanolic Extract of Kemukus (*Piper cubeba*), Kiseureuh (*Piper aduncum*), dan Cabe Jawa (*Piper retrofractum*) in Balb/C Mice)**

MOHAMMAD ROSENO\*, YAYAT SUDARYAT, DAN WIDYASTIWI

Jurusan Farmasi, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Bandung, 41061, Indonesia

\* Penulis korespondensi, Hp. 0895360982578

e-mail: mohammad.roseno@gmail.com

Diterima 14 Agustus 2018, Disetujui 12 September 2019

**Abstrak:** Tanaman dari keluarga Piperaceae telah diketahui memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi, antibakteri, antikanker, dan aktivitas lain yang mengarah pada aktivitas sistem imun. Beberapa tanaman dari keluarga ini juga telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai immunomodulator. Kemukus (*Piper cubeba*), kiseureuh (*Piper aduncum*), dan cabe jawa (*Piper retrofractum*) adalah tiga tanaman dari keluarga *piperaceae* yang banyak tersebar di daerah Jawa Barat, namun belum banyak diteliti. Penelitian bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas immunomodulator ketiga tanaman dari keluarga *piperaceae* tersebut pada mencit jantan galur Balb/c dengan metode bersihan karbon. Penelitian dilakukan dengan membagi hewan coba menjadi 12 kelompok, yaitu kelompok kontrol normal, pembandingan immunosupresan, pembandingan immunostimulan, serta masing-masing tiga kelompok variasi dosis kemukus, kiseureuh, dan cabe jawa. Parameter aktivitas immunomodulator ditinjau dari indeks fagositosis, kadar leukosit darah tepi, dan kadar leukosit limpa. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol kemukus (*P. cubeba*) memiliki aktivitas immunomodulator sebagai immunosupresan, sedangkan cabe jawa (*P. retrofractum*) sebagai immunostimulan. Ekstrak etanol kiseureuh (*P. aduncum*) dosis rendah memiliki aktivitas immunosupresan, sedangkan pada dosis sedang dan tinggi memiliki kecenderungan sebagai immunostimulan. Ketiga tanaman tersebut juga mempengaruhi jumlah komponen granulosit darah tepi, namun tidak mempengaruhi jumlah komponen granulosit limpa. Temuan ini menunjukkan bahwa *P.cubeba*, *P.aduncum*, and *P.retrofractum* berpotensi untuk dikembangkan sebagai immunomodulator, baik immunostimulan maupun immunodepresan.

**Kata Kunci:** *Piper cubeba*, *Piper retrofractum*, *Piper aduncum*, immunomodulator, carbon clearance

**Abstract:** Plants of Piperaceae family have been widely known for its antiinflammation, anticancer, and other activities related to immune system. Several plants of Piperaceae family have also been reported to have activity as immunomodulators. *Piper cubeba*, *Piper aduncum*, and *Piper retrofractum* belong to piperaceae family and widely distributed in West Java, Indonesia. However, research related to these plants are still limited. Thereby, purpose of this study were to evaluate the immunomodulatory activity of ethanolic extracts of these plants in Balb/C mice. Animals were divided into 12 groups : normal control group, immunosuppressant comparison, immunostimulant comparison, and low, moderate, and high dose of *P.cubeba*, *P.aduncum*, and *P.retrofractum*. Phagocytosis index, peripheral blood leukocyte levels, and splenic leukocyte levels were analyzed. The results showed that ethanolic extract of *P.cubeba* has immunosuppressant activity, meanwhile *P.retrofractum* tend to have immunostimulant activity. Low doses of *P.aduncum* acts as immunosuppressant, and at medium and high doses has a tendency to be immunostimulant. Ethanolic extract of *P.cubeba*, *P.aduncum*, and *P.retrofractum* affect the number of peripheral blood granulocyte components, but did not affect the number of splenic granulocyte components. These findings conclude that *piperaceae* family, especially *P.cubeba*, *P.aduncum*, and *P.retrofractum*, are potential source to be developed as immunomodulators.

**Keywords:** *Piper cubeba*; *Piper retrofractum*; *Piper aduncum*; immunomodulatory; carbon clearance

## PENDAHULUAN

SISTEM pertahanan tubuh berperan untuk melakukan berbagai proses non-spesifik dan spesifik untuk menolak, mencegah dan menghancurkan bibit infeksi yang masuk ke dalam tubuh<sup>(1)</sup>. Respons imun yang tidak tepat justru dapat menyebabkan kerusakan sistem imun, seperti hipersensitivitas, autoimunitas, ataupun imunodefisiensi<sup>(2,3)</sup>.

Gangguan sistem imun tersebut dapat ditangani dengan pemberian obat-obat tertentu. Beberapa obat bekerja dengan cara menghambat kerja sistem imun, seperti obat golongan antihistamin, antiinflamasi, dan kortikosteroid. Beberapa lainnya bekerja dengan mengaktifasi sistem imun, seperti imunostimulan<sup>(4)</sup>. Meskipun demikian, penggunaan obat-obatan ini dalam jangka panjang dapat menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan misalnya penggunaan glukokortikoid dapat menyebabkan tukak lambung; penyembuhan luka yang tertunda; atrofi otot, kulit dan jaringan lemak; osteoporosis; gangguan tidur dan perubahan psikis; dan peningkatan tekanan intraocular. Sedangkan penggunaan antihistamin terutama generasi pertama dapat menimbulkan efek sedasi dan efek mirip antikolinergik<sup>(5,6)</sup>.

Banyaknya efek samping yang diakibatkan oleh obat-obatan tersebut, memicu pengembangan obat berbasis bahan alam. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk dikembangkan adalah tanaman keluarga Piperaceae. Tanaman dari keluarga ini tersebar luas di daerah tropis dan sub tropis, dan telah banyak digunakan sebagai tanaman obat. Tanaman ini memiliki banyak kandungan seperti piperin, piperidine, chavicin, protein, cineole, p-cymene, lignin, sesquiterpenes, piperlotine, schimiditin dan carvone. Kandungan minyak atsiri seperti terpenes, phellandrene, caryophyllene, piperonal-dihydrocarbeol dan caryophyllene oxide juga ditemukan dalam jumlah besar dalam tanaman ini. Kegunaan tanaman ini juga beragam seperti antifungi, antibakteri, antiinflamasi, antiameba, antiplatelet, insektisida, antioksidan, sitotoksik, antiplasmodial, dan khasiat lainnya<sup>(7)</sup>.

Keluarga Piperaceae berpotensi untuk dikembangkan menjadi immunomodulator. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa tanaman dari keluarga ini memiliki kemampuan dalam memodulasi sistem imun. Piperin dalam *P.longum* diketahui memiliki aktivitas sebagai imunostimulan, dengan meningkatkan leukosit total dengan meningkatkan proliferasi sel punca pada proses hematopoiesis di sumsum tulang. Efek lain pada sistem imun adalah melalui peningkatan titer antibodi yang berperan

pada imunitas humoral<sup>(8)</sup>. Di lain sisi, *P.betle* justru menunjukkan aktivitas sebagai immunosupresan dengan menekan aktivitas imun selular dan humoral, yang mengindikasikan potensi tanaman dalam penyakit autoimun<sup>(9)</sup>.

Kemukus (*P.cubeba*), kisureuh (*P.aduncum*), dan cabe jawa (*P.retrofractum*) juga merupakan tanaman dalam keluarga piperaceae yang banyak tersebar di daerah Jawa Barat. Beberapa penelitian menunjukkan kemukus (*P.cubeba*) menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan<sup>(10)</sup>, antiulcer<sup>(11)</sup> antibakteri, antifungi (*C. albicans*), hepato-protector<sup>(11,12)</sup>, antisitotoksik<sup>(13)</sup>, nefroprotektif<sup>(14)</sup> dan antiparasit<sup>(15)</sup>. Kisureuh (*P.aduncum*) memiliki aktivitas sebagai insektisida<sup>(16)</sup>, antibakteri<sup>(17)</sup>, dan efek lainnya. Sedangkan cabe jawa (*P.retrofractum*) secara tradisional buahnya digunakan sebagai stimulan, karminatif, antihipertensi, relaksan otot, larvasida<sup>(18)</sup>, aprodisiak<sup>(19)</sup>, antibakteri, antifungi, dan aktivitas lainnya.

Tidak seperti tanaman lain dalam keluarga piperaceae yang telah banyak diteliti potensinya sebagai immunomodulator, penelitian terhadap kemukus (*P.cubeba*), kisureuh (*P.aduncum*), dan cabe jawa (*P.retrofractum*) masih sangat terbatas. Berdasarkan masalah tersebut peneliti tertarik untuk mengkaji aktivitas immunomodulator dari ekstrak etanol beberapa tanaman keluarga Piperaceae, yaitu kemukus (*P.cubeba*), kisureuh (*P.aduncum*), dan cabe jawa (*P.retrofractum*) pada mencit galur Balb/c dengan metode *carbon clearance*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian merupakan penelitian *true experimental*, dilakukan di Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Bandung pada bulan Maret-November 2017. Simplisia tanaman kemukus (*Piper cubeba*) dan cabe jawa (*Piper retrofractum*) diperoleh dari salah satu toko herbal di Bandung, Kisureuh (*Piper aduncum*) didapatkan dari daerah Garut, Jawa Barat. Ketiga tanaman tersebut sudah diuji kebenarannya melalui determinasi dari Sekolah Tinggi Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung. Protokol penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Poltekkes Bandung No. 19/KEPK/PE/V/2017

### Alat dan bahan

Bahan yang digunakan : Buah kemukus (*Piper cubeba*), Kisureuh (*Piper aduncum*) dan cabe jawa (*Piper retrofractum*), etanol 96% (Brataco®), aquadest, pewarna Giemsa, NaCl fisiologis, Na-CMC, larutan dapar fosfat, asam asetat 1% dan mencit putih jantan galur Balb/C dengan berat 20-35 gram

Alat yang digunakan : spektrofotometer UV-Vis

(Mercks Spectroquant® Pharo 300)

### Prosedur kerja

Uji Bersihan Karbon : Mencit dibagi menjadi 12 kelompok. Tiap kelompok terdiri dari 3 ekor mencit jantan. Hewan dikelompokkan sebagai berikut: kelompok 1 (NaCMC (2%)), kelompok 2 (suspensi ekstrak etanol buah kemukus dosis 2,8 mg/20gbb), kelompok 3 (suspensi ekstrak etanol buah kemukus dosis 5,6 mg/20gbb), kelompok 4 (suspensi ekstrak etanol buah kemukus dosis 11,2 mg/20gbb), kelompok 5 (suspensi ekstrak etanol buah kiseureh dosis 2,8 mg/20gbb), kelompok 6 (suspensi ekstrak etanol buah kiseureh dosis 5,6 mg/20gbb), kelompok 7 (suspensi ekstrak etanol buah kiseureh dosis 11,2 mg/20gbb), kelompok 8 (suspensi ekstrak etanol buah cabe jawa dosis 3 mg/20gbb), kelompok 9 (suspensi ekstrak etanol buah cabe jawa dosis 6 mg/20gbb), kelompok 10 (suspensi ekstrak etanol buah cabe jawa dosis 12 mg/20gbb), kelompok 11 (suspensi immunosupresan metilprednisolon), kelompok 12 (suspensi imunostimulan fitofarmaka).

Setiap kelompok diberikan sediaan secara oral satu kali sehari selama 6 hari berturut-turut. Setelah pemberian suspensi sampel pada masing-masing kelompok, ujung ekor mencit dilukai dan darah ditampung pada plat tetes yang ditambahkan Na-EDTA hingga homogen. Darah diambil 25µl dan dilisis dengan 4 ml asam asetat 1%. Contoh darah pertama ini dipakai sebagai blanko (menit ke-0). Kemudian 0,1 ml/10 g BB suspensi karbon disuntikkan secara intravena pada bagian ekor, darah mencit diambil 25µl selama menit ke 3, 6, 9, 12, dan 15 setelah penyuntikkan. Masing-masing darah dilisis dengan 4 ml asam asetat 1% dan diukur serapannya pada panjang gelombang 650 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Konstanta fagositosis (K) dan indeks fagositosis (IF) dengan menggunakan rumus :

$$(K) = \frac{\log A(n) - \log A(n-1)}{t(n-1) - t(n)}$$

dimana:

K : Konstanta fagositosis

A : Absorbansi

T : Waktu (3, 6, 9, 12 dan 15)

n : Periode pengambilan (1, 2, 3, 4)

$$(IF) = \frac{\text{Konstanta Fagositosis mencit Z}}{\text{Konstanta Fagositosis kelompok kontrol}}$$

dimana:

- IF : Indeks fagositosis dari tiap kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol.
- Mencit Z: Mencit yang telah diperlakukan dan

ditentukan harga konstanta fagositosis

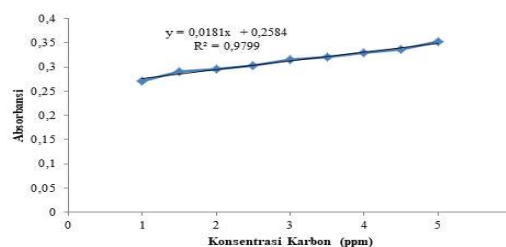
Penghitungan Jumlah Sel Leukosit: Sebanyak 1 ml darah diteteskan pada kaca objek lalu diratakan dengan kaca objek lain untuk memperoleh lapisan darah homogen, ditunggu hingga kering, lalu ditetesi metanol dibiarkan 5 menit, kemudian ditetesi larutan Giemsa (yang sudah diencerkan dengan air suling) sebanyak 10 tetes dan dibiarkan 20 menit, dibilas dengan aquadest mengalir dan dikering-anginkan. Kemudian dihitung jumlah sel eosinofil, neutrofil batang, neutrofil segmen, basofil, limfosit, dan monosit di bawah mikroskop perbesaran 100x dengan menggunakan minyak imersi.

Penghitungan Sel Limfosit dan Monosit Limpa: Ditimbang 50 mg limpa dari mencit yang telah dikorbankan, kemudian disuspensikan ke dalam 3 mL larutan dapar fosfat pH 7,4. Suspensi limpa diambil sebanyak 20 µL dan diteteskan di atas kaca objek, lalu dibiarkan mengering. Setelah itu difiksasi dengan metanol selama dua menit, kemudian dibilas dengan aquadest dan dikering-anginkan. Untuk pewarnaan, preparat yang telah difiksasi lalu diwarnai dengan cara meneteskan pewarna Giemsa sebanyak 5 tetes yang sebelumnya telah diencerkan dengan aquadest 1:10. Dibiarkan kontak selama 30 menit, lalu dibilas dengan aquadest, kemudian dikering-anginkan. Preparat yang telah diwarnai, dihitung jumlah limfosit dan monositnya di bawah mikroskop perbesaran 100x dengan menggunakan minyak imersi.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 % untuk *P. aduncum*, *P. cubeba*, dan *P. retrofractum* adalah masing-masing sebesar 19,50%, 10,81%, dan 8,49%.

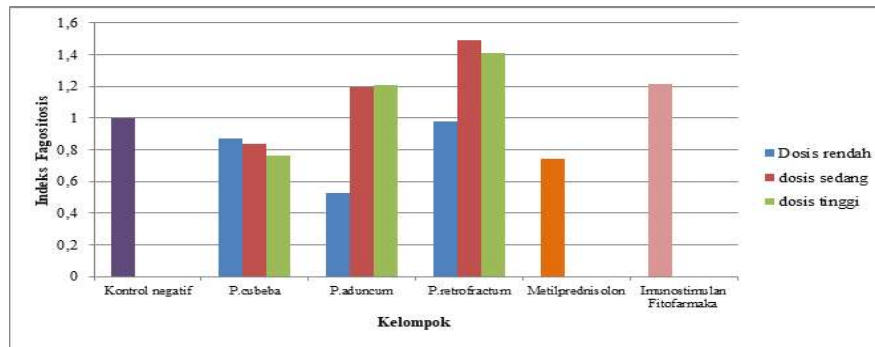
Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu dilakukan pembuatan kurva kalibrasi yang bertujuan untuk memastikan akurasi metode yang digunakan. Kurva kalibrasi karbon dalam matriks darah dapat dilihat pada Gambar 1. Nilai R<sup>2</sup> yang didapat adalah 0.9799. Hal ini menunjukkan bahwa metode



Gambar 1. Uji Akurasi karbon (ppm) dalam matriks darah hewan

Tabel 1. Konstanta Fagositosis Setiap Kelompok Selama Perlakuan

Kelompok	(log A(n)-Log A(n1))/3					Konstanta Fagositosis (K)
	3	6	9	12	15	
Kontrol negatif	0.0138	-0.0047	0.0066	0.0058	0.0050	<b>0.0053</b>
<i>P. cubeba</i> dosis rendah	0.0279	-0.0168	-0.0089	0.0228	-0.0019	<b>0.0046</b>
<i>P. cubeba</i> dosis sedang	0.0015	0.0025	0.0065	0.0115	0.0001	<b>0.0044</b>
<i>P. cubeba</i> dosis tinggi	-0.0048	0.0167	0.0089	-0.0098	0.0092	<b>0.0041</b>
<i>P. aduncum</i> dosis rendah	0.0038	0.0096	0.0034	0.0043	-0.0072	<b>0.0028</b>
<i>P. aduncum</i> dosis sedang	0.0247	-0.0093	0.0057	0.0015	0.0089	<b>0.0063</b>
<i>P. aduncum</i> dosis tinggi	0.0007	0.0143	-0.0081	0.0177	0.0075	<b>0.0064</b>
<i>P. retrofractum</i> dosis rendah	0.0189	0.0093	-0.0092	0.0020	0.0050	<b>0.0052</b>
<i>P. retrofractum</i> dosis sedang	0.0006	0.0118	-0.002	0.0101	0.0186	<b>0.0079</b>
<i>P. retrofractum</i> dosis tinggi	0.0106	0.0082	0.0036	0.0090	0.0061	<b>0.0075</b>
Metilprednisolon	-0.0021	0.0061	0.0101	0.0026	0.0021	<b>0.0039</b>
Imunostimulan fitofarmaka	0.0063	0.0121	0.0132	0.0180	-0.0174	<b>0.0064</b>



Gambar 2. Indeks Fagositosis setiap Kelompok Perlakuan

pengukuran karbon akurat dan dapat digunakan untuk pengujian *carbon clearance*.

Aktivitas immunomodulator ditunjukkan oleh nilai konstanta fagositosis. Nilai konstanta fagositosis yang tinggi menunjukkan aktivitas senyawa sebagai immunostimulan, sedangkan nilai rendah menunjukkan kecenderungan senyawa bersifat immunosupresan. Nilai konstanta fagositosis masing-masing kelompok dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 menunjukkan nilai konstanta tertinggi ditunjukkan oleh kelompok *P. retrofractum* dosis sedang, lebih tinggi dibanding pembeding immunostimulan fitofarmaka dengan nilai masing-masing 0.0078 dan 0.0064. Nilai konstanta fagositosis paling rendah ditunjukkan oleh kelompok *P. aduncum* dosis rendah ( $K=0.0028$ ), lebih rendah dibanding pembeding metilprednisolon ( $K=0.0039$ ). Konstanta fagositosis antar kelompok kemudian dibandingkan dengan kontrol negatif (normal) sehingga didapatkan indeks fagositosis yang ditunjukkan oleh Gambar 2.

Kemukus (*P. cubeba*) menunjukkan aktivitas immunosupresan yang meningkat seiring peningkatan dosis. Semakin tinggi dosis kemukus, meningkat pula efek immunosupresan yang disebabkan. *P. cubeba* juga menurunkan kadar neutrofil darah tepi. Kelompok

*P. cubeba* dosis tinggi memiliki rata-rata kadar neutrofil paling rendah di antara seluruh kelompok uji. Neutrofil merupakan komponen leukosit yang akan memberikan respon awal pada reaksi imun, penekanan pada jumlah dan fungsi neutrofil dapat menurunkan sistem imun non spesifik secara keseluruhan. Penelitian ini menunjukkan adanya potensi kemukus (*P. cubeba*) sebagai immunosupresan. Penelitian lain menunjukkan efek *P. cubeba* pada proses *downregulation* sitokin proinflamasi, seperti TNF- $\alpha$  and IL-6 sehingga dapat menurunkan reaksi inflamasi pada hewan coba<sup>(11)</sup>.

Kisereuh (*P. aduncum*) memiliki efek immunomodulator, dimana pada dosis rendah memiliki efek immunosupresan, sedangkan pada dosis sedang dan tinggi memiliki efek immunostimulan. Hubungan dosis-respon yang tidak linear juga ditemukan pada penelitian lain yang menyatakan bahwa peningkatan dosis *P. aduncum* tidak memberikan efek yang searah dengan efek antiinflamasi, antigenotoksik, dan antitumor dari *P. aduncum*. Peningkatan kadar tannin yang terekstraksi dapat memberikan efek antinutrisional, dimana tannin dapat membentuk kompleks dengan komponen makanan lain dan menurunkan absorpsi senyawa aktif lain dari *P. cubeba*<sup>(20)</sup>. Namun demikian, *P. aduncum* dosis

Tabel 2. Kadar Komponen Leukosit Darah Tepi

Kelompok	Kadar Komponen Leukosit Darah Tepi (%)				
	Eosinofil	Neutrofil	Basofil	Limfosit	Monosit
Kontrol Negatif	-	36.33±4.16	-	52.00±5.57	11.67±4.51
<i>P. cubeba</i> Dosis Rendah	-	38.67±4.04	-	56.00±2.65	5.33±2.31
<i>P. cubeba</i> Dosis Sedang	-	40.33±2.08	-	53.67±2.52	6.00±2.00
<i>P. cubeba</i> Dosis Tinggi	1.33±1.15	30.67±2.52	-	61.00±2.65	7.00±1.00
<i>P. aduncum</i> Dosis Rendah	0.67±0.58	37.00±11.27	-	53.33±17.67	9.00±7.21
<i>P. aduncum</i> Dosis Sedang	-	37.00±7.81	-	58.00±9.64	5.00±2.65
<i>P. aduncum</i> Dosis Tinggi	-	38.33±5.51	-	55.33±4.04	6.33±1.53
<i>P. retrofractum</i> Dosis Rendah	0.33±0.58	44.00±2.00	-	51.67±1.53	3.67±1.53
<i>P. retrofractum</i> Dosis Sedang	0.67±0.58	59.67±4.04	-	33.67±3.51	6.00±1.73
<i>P. retrofractum</i> Dosis Tinggi	0.33±0.58	44.67±11.59	-	46.67±13.58	8.33±2.52
Metilpredinisolon	0.33±0.58	35.33±3.06	-	59.33±6.11	5.00±2.65
Imunostimulan fitofarmaka	-	34.33±4.51	-	61.67±7.77	4.00±3.46

Tabel 3. Kadar Komponen Leukosit Limpa

Kelompok	Kadar Komponen Leukosit (%)				
	Eosinofil	Neutrofil	Basofil	Limfosit	Monosit
Kontrol Negatif	1.33±0.58	14.00±5.00	-	81.00±8.00	3.67±2.52
<i>P. cubeba</i> Dosis Rendah	-	16.33±1.15	-	81.33±0.58	2.33±0.58
<i>P. cubeba</i> Dosis Sedang	0.67±0.58	8.33±4.16	-	86.33±3.79	4.67±0.58
<i>P. cubeba</i> Dosis Tinggi	1.00±0.00	14.00±3.46	-	81.00±3.61	4.00±1.00
<i>P. aduncum</i> Dosis Rendah	1.00±0.00	13.67±9.29	-	82.67±9.29	2.67±1.53
<i>P. aduncum</i> Dosis Sedang	0.67±0.58	5.33±2.52	-	91.00±3.61	3.00±1.00
<i>P. aduncum</i> Dosis Tinggi	0.67±0.58	3.00±3.61	-	93.00±6.93	3.33±3.21
<i>P. retrofractum</i> Dosis Rendah	-	4.33±5.13	-	94.00±5.00	1.67±1.15
<i>P. retrofractum</i> Dosis Sedang	0.67±0.58	12.00±8.19	-	83.00±9.85	4.33±1.15
<i>P. retrofractum</i> Dosis Tinggi	0.67±1.15	6.00±2.00	-	88.00±3.61	5.33±4.51
Metilpredinisolon	1.67±0.58	12.33±2.08	-	80.00±6.56	6.00±4.36
Imunostimulan fitofarmaka	0.33±0.58	9.33±4.73	-	87.00±1.73	3.33±2.52

rendah memberikan aktivitas immunosupresan yang paling baik diantara seluruh kelompok dengan indeks fagositosis 0.5, artinya *P. aduncum* dosis rendah mampu menurunkan fagositosis sel sebesar 50% dari respon normal. *P. aduncum* sangat berpotensi sebagai immunodepresan yang bermanfaat untuk banyak kondisi seperti inflamasi kronis, autoimun, kondisi lainnya. Namun demikian, penelitian lebih lanjut harus dilakukan untuk memahami secara spesifik mekanisme kerja *P. aduncum* dalam memodulasi sistem imun.

Berbeda dengan dua tanaman family Piperaceae lainnya, *P. retrofractum* cenderung menunjukkan aktivitas immunostimulan. Aktivitas immunostimulan *P. retrofractum* dosis sedang bahkan lebih tinggi dibanding kelompok pembanding immunostimulan fitofarmaka dengan indeks fagositosis mencapai 1.5. *P. retrofractum* juga meningkatkan kadar neutrofil darah tepi yang berperan penting dalam proses fagositosis. Hal ini sejalan dengan penelitian lain yang menyatakan bahwa pemberian ekstrak *P. retrofractum*

meningkatkan neutrofil secara bermakna pada tikus yang diberi diet kuning telur<sup>(21)</sup>.

Satu hari setelah pemaparan antigen, darah tepi hewan coba diambil dan dibuat apusan untuk dihitung eosinofil, neutrofil, basofil, limfosit, dan monositnya. Kadar masing-masing komponen sel darah putih dapat dilihat pada Tabel 2. Pada penelitian ini, dilakukan juga perhitungan leukosit dalam suspensi limpa. Hitung jenis masing-masing komponen leukosit limpa dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 2 menunjukkan kadar Eosinofil darah tepi tertinggi dicapai oleh kelompok *P. cubeba* dosis tinggi; kadar neutrophil tertinggi dicapai oleh kelompok *P. retrofractum* dosis sedang dan terendah pada kelompok *P. cubeba* dosis tinggi; kadar limfosit tertinggi dicapai oleh kelompok pembanding immunostimulan fitofarmaka, dan terendah pada kelompok *P. retrofractum* dosis sedang; dan kadar monosit tertinggi dicapai oleh kelompok kontrol negatif dan terendah pada kelompok *P. retrofractum* dosis rendah.

Tabel 4. Analisis Korelasi Variabel Leukosit dengan Aktivitas Fagositosis

Variabel		Sig. (p)	Kekuatan Korelasi (r)	Interpretasi
Konstanta Fagositosis	Darah Tepi			
	Eosinofil	0.274	-0.216	Lemah
	Neutrofil	0.012*	0.701	Kuat
	Limfosit	0.049*	-0.552	Sedang
	Monosit	0.404	-0.089	Sangat lemah
Konstanta Fagositosis	Limpa			
	Eosinofil	0.209	-0.289	Lemah
	Neutrofil	0.068	-0.507	Sedang
	Limfosit	0.102	0.439	Sedang
	Monosit	0.324	0.165	Sangat lemah

Tabel 3 menunjukkan kadar eosinofil limpa tertinggi dicapai oleh kelompok pembanding metilprednisolon; kadar neutrofil tertinggi dicapai oleh kelompok *P.cubeba* dosis rendah dan terendah pada kelompok *P.aduncum* dosis tinggi; kadar limfosit tertinggi dicapai oleh kelompok *P.retrofractum* dosis rendah, dan terendah pada kelompok pembanding metilprednisolon; dan kadar monosit tertinggi dicapai oleh kelompok pembanding metilprednisolon dan terendah pada kelompok *P.retrofractum* dosis rendah.

Untuk mengetahui faktor yang mempengaruhi aktivitas fagositosis, dilakukan analisis korelasi antara komponen leukosit darah tepi dan limpa dengan konstanta fagositosis. Hasil analisis korelasi dapat dilihat pada tabel 4. Tidak dilakukan analisis terhadap basofil, dikarenakan tidak ditemukan basofil pada darah tepi maupun suspensi limpa.

Tabel 4 menunjukkan bahwa peningkatan kadar neutrofil dalam darah tepi berkorelasi kuat dengan peningkatan aktivitas fagositosis, dan penurunan kadar leukosit (ditunjukkan dengan arah korelasi negatif) berkorelasi sedang dengan peningkatan aktivitas fagositosis.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara umum, peningkatan komponen granulosit memiliki korelasi yang kuat dengan aktivitas fagositosis karbon. Komponen granulosit, terdiri dari neutrofil, basofil, dan eosinofil, merupakan sistem imun non spesifik. Peningkatan kadar neutrofil pada darah tepi berkorelasi kuat dengan aktivitas fagositosis. Neutrofil merupakan komponen leukosit yang dikenal juga sebagai *polymorphonuclear* (PMN) karena bentuknya yang beragam. Neutrofil merupakan leukosit yang paling banyak dijumpai pada darah tepid an merupakan lini pertama pada pertahanan tubuh terhadap pathogen infeksius, seperti bakteri, fungi, dan protozoa. Neutrofil merupakan leukosit yang pertama bermigrasi dari darah ke area yang terinfeksi untuk membunuh dan memfagositosis patogen<sup>(22)</sup>.

## SIMPULAN

Ekstrak etanol kemukus (*Piper cubeba*) memiliki aktivitas imunomodulator sebagai immunosupresan, dimana peningkatan dosis meningkatkan efek immunosupresan. Ekstrak etanol kiseureh (*Piper aduncum*) dosis 2,8 mg/20gbb memiliki aktivitas imunomodulator sebagai immunosupresan, sedangkan pada dosis 5,6 mg/20gbb dan 11,2 mg/20gbb memiliki kecenderungan sebagai immunostimulan. Ekstrak etanol cabe jawa (*Piper retrofractum*) memiliki aktivitas imunomodulator sebagai immunostimulan, dengan aktivitas tertinggi dicapai pada dosis 5,6 mg/20gbb. Ekstrak etanol kemukus (*Piper cubeba*), kiseureh (*Piper aduncum*), dan cabe jawa (*Piper retrofractum*) mempengaruhi jumlah komponen granulosit darah tepi terutama aktivitas neutrofil untuk proses fagositosis.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami ucapkan kepada pihak Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah memberikan bantuan dana penelitian. Tidak ada konflik kepentingan dalam penyusunan naskah publikasi ini..

## DAFTAR PUSTAKA

- Katzung B. Farmakologi Dasar dan Klinik. VI. Jakarta: ECG; 2011.
- Krisna SB. Imunologi: Diagnosis dan Prosedur Laboratorium. 5th ed. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2010.
- Global Asthma Network. The Global Asthma Report 2014. Vol. 5. 2014. 14-16 p.
- Lerner A, Jeremias P, Matthias T. The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. Int J Celiac Dis. 2016;3(4):151-5.
- Hall PD, Weimert NA. Function and Evaluation of the Immune System. In: DiPiro JT, Talbert RL,

- Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, editors. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*. 7th ed. New York: McGraw Hill; 2008. p. 1417–30.
6. Skidgel RA, Erdos EG. Autocoids : Drug Therapy of Inflammation. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 11th ed. New York: McGraw Hill; 2012.
  7. Ghosh R, Darin K, Nath P, Deb P. An Overview of Various Piper Species for Their Biological Activities. *Int J Pharma Res Rev*. 2014;3(1):67–75.
  8. Nahak G, Sahu RK. Phytochemical Evaluation and Antioxidant activity of Piper cubeba and Piper nigrum. *J Appl Pharm Sci*. 2011;01(08):153–7.
  9. Alsaïd M, Mothana R, Raish M, Al-Sohaibani M, Al-Yahya M, Ahmad A, et al. Evaluation of the effectiveness of Piper cubeba extract in the amelioration of CCl<sub>4</sub>-induced liver injuries and oxidative damage in the rodent model. *Biomed Res Int*. 2015; 2015.
  10. Pachpute AP, Deshmukh TA, Jagdishprasad S, Tibrewal J. Antioxidant and Hepatoprotective Activity of an Ethanol Extract of Piper cubeba Fruits. *Int J Res Dev Pharm Life Sci*. 2013;2(2):321–9.
  11. Graidist P, Martla M, Sukpondma Y. Cytotoxic Activity of Piper cubeba Extract in Breast Cancer Cell Lines. *Nutrients*. 2015;7:2707–18.
  12. Ahmad QZ, Jahan N, Ahmad G, Tajuddin. Nephroprotective Effect of Kabab Chini (Piper cubeba) in Gentamycin- Induced Nephrotoxicity. *Saudi J Kidney Dis Transplant*. 2017;23(4):1–7.
  13. Esperandim VR, Ferreira DS, Rezende KCS, Magalhaes LG, Souza JM, Pauletti PM, et al. In Vitro Antiparasitic Activity and Chemical Composition of the Essential Oil Obtained from the Fruits of Piper cubeba. *Planta Med*. 2013;79:1653–1655.
  14. Syahroni YY, Priyono D. Aktivitas Insektisida Campuran Ekstrak Buah Piper aduncum (Piperaceae) dan Sapindus rarak (Sapindaceae) terhadap Larva *Crocidolomia pavonana*. *J Entomol Indones*. 2013;10(1):39–50.
  15. Brazao MA, Brazao F, Maia JG, Monteiro M. Antibacterial activity of the Piper aduncum oil and dillapiole, its main constituent , against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoam y del Caribe Plantas Med y Aromáticas*. 2014;13(July):517–26.
  16. Chansang U, Zahir NS, Bansiddhi J, Boonruad T, Thongsrirak P, Mingmuang J, et al. Mosquito larvicidal activity of aqueous extracts of long pepper (*Piper retrofractum* Vahl) from Thailand. *J Vector Ecol*. 2005;30(2):195–9.
  17. Rahmawati N, Bachri MS. The aphrodisiac effect and toxicity of combination Piper retrofractum L, *Centella asiatica*, and *Curcuma domestica* infusion. *Aphrodisiac Eff Infus*. 2012;3(1):19–22.
  18. Kanjwani DG, Marathe TP, Chiplunkar S V, Sathaye SS. Evaluation of Immunomodulatory Activity of Methanolic Extract of Piper betel. *Scand J Immunol*. 2008;67:589–93.
  19. Vaidya A, Rathod M. An In Vitro Study of The Immunomodulatory Effects of Piper nigrum (Black pepper) and *Elettaria cardamomum* (cardamom) Extracts Using a Murine Macrophage Cell Line. *Am Int J Res Formal, Appl Nat Sci*. 2014;8(1):18–27.
  20. Finato AC, Fraga-silva TF, Uliana A, Prati C, Mazzeu BF, Felipe LG, et al. Crude Leaf Extracts of Piperaceae Species Downmodulate Inflammatory Responses by Human Monocytes. *PLoS One*. 2018;13(6):1–14.
  21. George A, Chinnappan S, Choudhary Y, Bommu P, Sridhar M. Immunomodulatory Activity of An Aqueous Extract of *Polygonum minus* Huds on Swiss Albino Mice Using Carbon Clearance Assay. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014;4(5):398–400.
  22. Dashputre NL, Naikwade NS. Immunomodulatory Activity of *Abutilon indicum* Linn on Albino Mice. *Int J Pharma Sci Res*. 2010;1(3):178–84.



## **Formulasi Sediaan Krim Tabir Surya dari Ekstrak Etanol Buah Bisbul (*Diospyros blancoi*) (Sunscreen Cream Formulation of Bisbul fruit (*Diospyros blancoi*) Ethanol Extract)**

HARRY NOVIARDI<sup>1\*</sup>, DEVI RATNASARI<sup>2</sup>, MUHAMMAD FERMADIANTO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Teknologi Industri dan Farmasi Bogor, Bogor, 16151

<sup>2</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Singaperbangsa Karawang,  
Karawang, 41361

\*Penulis korespondensi, Hp : 0251-8323819

e-mail: [harry.noviardi@sttif.ac.id](mailto:harry.noviardi@sttif.ac.id)

Diterima 17 September 2019, Disetujui 28 Oktober 2019

**Abstrak:** Buah bisbul merupakan salah satu tanaman tropis yang tumbuh di Indonesia. Kandungan fitokimia buah bisbul antara lain golongan senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, dan fenolik. Golongan senyawa flavonoid dan fenolik berpotensi sebagai antioksidan. Antioksidan dapat menghambat proses kerusakan sel kulit akibat oksidasi. Penelitian ini bertujuan untuk membuat krim tabir surya yang optimum, sesuai mutu, stabilitas, dan memiliki khasiat sebagai tabir surya yang berbahan dasar buah bisbul (*Diospyros blancoi*). Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bisbul setengah matang yang dibuat menjadi ekstrak kental. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Hasil rendemen ekstrak yang diperoleh sebesar 12%. Selanjutnya, dibuat menjadi sediaan krim tabir surya dengan konsentrasi 10, 20, dan 40%. Krim yang telah dibuat, kemudian dievaluasi kualitas krim meliputi uji organoleptik, uji pH, daya lekat, daya sebar, viskositas, stabilitas, dan nilai *Sun Protection Factor* (SPF). Berdasarkan pada hasil penelitian, ekstrak buah bisbul dapat dibuat menjadi sediaan krim tabir surya. Nilai SPF yang diperoleh dari konsentrasi ekstrak 10, 20, dan 40% secara berturut-turut adalah 9,25; 10,02; dan 13,00. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa formula dengan konsentrasi 40% merupakan krim terbaik yang memiliki nilai SPF tertinggi sebesar dengan proteksi kategori maksimal.

**Kata kunci:** Buah bisbul (*Diospyros blancoi*), krim, SPF, tabir surya.

**Abstract:** Bisbul fruit is one of the tropical plants that grows in Indonesia. Phytochemical contents of bisbul fruit are alkaloids, tannins, flavonoids, and phenolic compounds. Flavonoids and phenolic compounds are potentially as antioxidants. Antioxidants could inhibit skin cell damage due to oxidation process. This study aimed to make the optimum sunscreen cream, based on quality, stability, and activity as a sunscreen from bisbul fruit (*Diospyros blancoi*). The sample used in this research was bisbul, which made into extract. The extraction was done by a maceration method using 95% ethanol solvent. The results showed that extract yield obtained was 12%. Furthermore, made into a sunscreen cream preparation with concentrations of 10, 20, and 40%. The cream had been made, then was evaluated the quality organoleptic test, pH, adhesiveness, dispersive power, viscosity, stability, and the Sun Protection Factor (SPF) value. The results showed that of bisbul extract could be made into a sunscreen cream. The SPF value obtained from the extract concentration of 10, 20, and 40% consecutively were 9.25, 10.02, and 13.00. Furthermore, it could be concluded that the formula with a concentration of 40% was the best quality of the cream and the highest SPF value of 13.00 with maximum protection.

**Keywords:** Bisbul fruit (*Diospyros blancoi*), cream, SPF, sunscreen.

## PENDAHULUAN

INDONESIA merupakan negara beriklim tropis yang memiliki paparan sinar matahari yang tinggi<sup>(1)</sup>. Radiasi sinar matahari terdiri atas sinar inframerah (>760 nm), sinar tampak (400-760 nm), dan sinar UV (ultraviolet) yang terdiri atas UV A (320-400 nm), UV B (290-320 nm) serta UV C (200-290 nm). Sinar matahari yang sampai di permukaan bumi dan mempunyai dampak negatif kerusakan terhadap kulit adalah sinar UV A dan UV B, sedangkan UV C tertahan karena diabsorpsi seluruhnya oleh lapisan ozon sehingga tidak mencapai permukaan bumi<sup>(2)</sup>.

Paparan sinar matahari selain memberikan efek menguntungkan juga memberikan efek merugikan pada tubuh manusia bergantung pada panjang dan frekuensi paparan, intensitas sinar matahari, dan sensitivitas individu yang terpapar<sup>(3)</sup>. Paparan sinar UV yang berlebihan dapat mengakibatkan *sunburn*, eritema, hiperpigmentasi, penuaan dini, bahkan kanker kulit. Untuk mencegah efek merugikan tersebut, dapat dilakukan beberapa cara, salah satunya adalah pemakaian tabir surya<sup>(4)</sup>. Tabir surya (*sunscreen*) adalah bahan yang dapat mengabsorpsi, memantulkan, atau menghamburkan radiasi UV sehingga dapat menjaga kulit dari efek UV yang membahayakan<sup>(5)</sup>.

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron, dapat meredam radikal bebas dan *Reactive Oxygen Species*<sup>(6)</sup>. Penggunaan antioksidan pada sediaan tabir surya dapat meningkatkan aktivitas fotoprotektif dan dapat mencegah berbagai penyakit yang ditimbulkan oleh radiasi sinar ultraviolet. Adapun beberapa senyawa aktif antioksidan seperti flavonoid, tanin, antrakuinon, sinamat, vitamin C, vitamin E, dan betakaroten telah dilaporkan memiliki kemampuan sebagai pelindung terhadap sinar ultraviolet<sup>(7)</sup>. Berdasarkan pada penelitian Widowati et al. (2005) salah satu tanaman yang mempunyai efek antioksidan adalah buah bisbul (*Diospyros blancoi*)<sup>(8)</sup>.

Senyawa fenolik khususnya golongan flavonoid mempunyai potensi sebagai tabir surya karena adanya gugus kromofor (ikatan rangkap tunggal terkonjugasi) yang mampu menyerap sinar UV, baik UV A maupun UV B sehingga mengurangi intensitasnya pada kulit. Efektivitas sediaan krim tabir surya berdasarkan pada penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) yang menggambarkan kemampuan tabir surya dalam melindungi kulit dari eritema.

Tabir surya dapat dibuat dalam berbagai sediaan farmasi salah satunya adalah sediaan krim. Krim adalah bentuk sediaan setengah padat mengandung satu atau lebih bahan obat terlarut atau terdispersi dalam bahan dasar yang sesuai<sup>(8)</sup>. Tipe krim dibedakan menjadi dua tipe, yaitu krim tipe minyak dalam air

(M/A) dan air dalam minyak (A/M)<sup>(9)</sup>. Krim tipe M/A (*vanishing cream*) mudah dicuci dengan air, jika digunakan pada kulit, maka akan terjadi penguapan dan peningkatan konsentrasi dari suatu obat yang larut dalam air, sehingga mendorong penyerapannya ke dalam jaringan kulit. Sedangkan krim tipe A/M memiliki daerah sebaran lebih baik dan rasa panas minimal pada kulit<sup>(2)</sup>.

Berdasarkan pada uraian di atas, maka dilakukan penelitian dengan membuat formulasi sediaan krim tabir surya dari ekstrak etanol buah bisbul (*Diospyros blancoi*) dengan tiga konsentrasi yang berbeda (10, 20, dan 40%) untuk menentukan formulasi yang terbaik dari evaluasi fisik dan nilai SPF. Konsentrasi ekstrak dibuat berdasarkan pada penelitian Juwita (2013) yang telah dimodifikasi<sup>(10)</sup>. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui konsentrasi ekstrak buah bisbul yang paling optimum sebagai tabir surya berdasarkan pada penentuan nilai *Sun Protection Factor* (SPF) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pada penelitian ini tipe krim yang digunakan dalam formulasi adalah tipe A/M sebagai basis karena lebih lama melekat di kulit dan dapat melembutkan kulit.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bisbul (*Diospyros blancoi* A.DC) didapat dari Jl. Pemuda Kota Bogor, Etanol 95%, sorbitan monostearat (PT.Brataco), trietanolamin (TEA), cera alba (PT.Brataco), metil paraben (PT.Brataco), propil paraben (PT.Brataco), parafin cair (PT. Brataco), aquades, vitamin C, 1,1- difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), pereaksi Bouchardat, Dragendrof, asam klorida 2 N, ammonia P, eter P, kloroform P, natrium sulfat anhidrat P, metanol P, magnesium P, asam klorida P, larutan FeCl<sub>3</sub> 1%.

**Alat.** Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan gelas, neraca digital Acis AD-300i, sudip, oven (Mettler), pH meter, pipet tetes, kaca preparat, penangas air, *rotary evaporator* (Ika) RV 10, lumpang dan alu, viskometer brookfield MLVT 115, cawan porselin, spektrofotometer UV-vis (Shimadzu) UV mini-1240V, dan *Elisa reader* Epoch 2, *blender* (Miyako) Bl-152 Gf, *mixer* (Maspion), aluminium foil, desikator, sentrifugator 80-2.

**METODE. Pembuatan Serbuk Simplisia.** Buah bisbul setengah matang dibersihkan dan daging buah dipisahkan dari biji dan kulit buahnya. Daging buah dipotong kecil-kecil sebanyak 2,5 kg. Kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40 °C sampai simplisia kering. Setelah itu diserbukkan menggunakan *blender* Miyako BL-152 GF lalu diayak

menggunakan ayakan ukuran 40 mesh<sup>(3,10)</sup>. Simplisia selanjutnya ditentukan kadar air dan komposisi fitokimianya.

**Pembuatan Ekstrak Kental.** Serbuk kering buah bisbul dimaserasi menggunakan etanol 95%, dengan cara merendam satu bagian serbuk dengan 10 bagian pelarut. Perendaman dilakukan selama 6 jam pertama sambil sekali-sekali diaduk. Simplisia didiamkan selama 18 jam dan disaring menggunakan kain saring. Hasil filtrat dipisahkan dan ampasnya di remaserasi selama 2 hari menggunakan pelarut yang sama. Filtrat hasil remaserasi digabungkan dengan hasil filtrat maserasi yang pertama. Kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacum evaporator* pada suhu 60 °C sampai pelarut habis menguap<sup>(11)</sup>. Setelah mendapatkan ekstrak kental, dihitung rendemen ekstrak total.

**Uji Antioksidan Ekstrak Kental Buah Bisbul<sup>(12)</sup>.** Metode yang digunakan untuk menganalisis daya antioksidan adalah metode DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil). Uji DPPH berdasarkan pada pengukuran penentuan absorpsi DPPH pada panjang maksimum 514-517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis *Elisa Reader* Epoch 2. Aktivitas dinyatakan dengan konsentrasi efektif yang mampu meredam radikal bebas sebesar 50%.

**Pembuatan Larutan Stok DPPH 125 µM.** Sebanyak 4,9 mg DPPH (BM 394,32 gram/mol) dimasukkan ke dalam labu ukur, kemudian ditambahkan etanol pro analisis sampai 100 mL. Untuk mencegah terkena sinar matahari, labu ukur dilapisi alumunium foil dan larutan diletakkan di tempat gelap.

**Preparasi Sampel dan Vitamin C.** Sebanyak 10 mg sampel dan 10 mg vitamin C masing-masing dilarutkan dengan DMSO sebanyak 1 mL di dalam tabung reaksi yang berbeda. Selanjutnya, disonikasi hingga larut dan divorteks agar larutan homogen. Untuk deret konsentrasi sampel, yaitu 19,53; 39,06; 78,12; 156,24; dan 312,48 bpj, sedangkan untuk vitamin C deret konsentrasinya yaitu, 1,25; 2,5; 5; 10; dan 20 bpj.

**Pengukuran Sampel dan Vitamin C.** Sebanyak 100 µL sampel dan vitamin C dimasukkan ke dalam *microplate* dilakukan sebanyak dua kali pengulangan. Untuk ulangan 1 dan 2 ditambahkan DPPH sebanyak 100 µL, sedangkan untuk kontrol negatif hanya ditambahkan etanol 95% sebanyak 100 µL. Inkubasi dilakukan pada suhu ruang dengan kondisi gelap selama 30 menit. Larutan diukur di alat *Elisa Reader* pada panjang gelombang 517 nm.

**Pembuatan Formula Sediaan Krim.** Pada pembuatan sediaan krim, langkah yang pertama dilakukan adalah pembuatan basis krim dengan

cara fase minyak (cera alba, Parafin cair, sorbitan monostearat) dipanaskan pada suhu 70 °C dalam penangas air. Setelah melebur semua ditambahkan propil paraben. Selanjutnya, dilarutkan trietanolamin dengan air panas dalam cawan porselin yang berbeda, setelah larut semua ditambahkan metil paraben. Fase air dalam keadaan panas dimasukkan ke dalam fase minyak sedikit demi sedikit dan diaduk dengan *mixer* sampai terbentuk basis krim. Campuran fase minyak dan air ditambahkan ekstrak buah bisbul dan diaduk sampai homogen. Konsentrasi ekstrak etanol 95% buah bisbul yang digunakan setiap 20 g, yaitu 2, 4, dan 8 g. Krim yang terbentuk dimasukkan ke dalam pot krim. Formula yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 1<sup>(10)</sup>.

Tabel 1. Formula krim ekstrak etanol buah bisbul<sup>(10)</sup>.

Bahan	F1 (gram)	F2 (gram)	F3 (gram)
Ekstrak buah bisbul	2,00	4,00	8,00
Cera alba	2,70	2,40	1,80
Nipagin	0,20	0,20	0,20
Nipasol	0,02	0,02	0,02
Parafin cair	9,00	8,00	6,00
Sorbitan monostearat	0,36	0,32	0,24
Trietanolamin	0,54	0,48	0,36
Aquades ad	20,00	20,00	20,00

**Pemeriksaan Organoleptik.** Pemeriksaan pemerian sediaan krim tabir surya terdiri atas Pemeriksaan warna, aroma, dan tekstur<sup>(13,14)</sup>.

**Homogenitas.** Pemeriksaan homogenitas dilakukan dengan cara: sediaan ditimbang 0,1 g kemudian dioleskan secara merata dan tipis pada kaca arloji. Krim harus menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terlihat adanya bintik-bintik<sup>(13,14)</sup>.

**Pemeriksaan pH Krim.** Pemeriksaan dilakukan dengan menggunakan alat pH meter. Alat tersebut dikalibrasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Kalibrasi dilakukan dengan menggunakan larutan dapar pH 4 dan 10. Pemeriksaan pH dilakukan dengan mencelupkan elektroda ke dalam 1 gram sediaan krim yang diencerkan dengan air suling hingga 10 mL<sup>(13,14)</sup>.

**Uji Daya Sebar.** Sebanyak 0,1 gram krim ditimbang dan diletakkan ditengah-tengah kaca bulat. Kemudian kaca penutup ditimbang dan diletakkan di atas krim dan didiamkan selama satu menit dan diukur diameter krim yang menyebar. Selanjutnya, ditambahkan beban seberat 50 gram di atas kaca penutup dan dibiarkan selama satu menit, lalu dicatat diameter krim yang menyebar. Percobaan dilanjutkan dengan beban seberat 100, 150, dan 200 gram<sup>(15)</sup>.

**Uji Daya Lekat.** Uji daya lekat menggunakan dua buah kaca transparan yang pada salah satu ujung

kaca transparan ditekan beban 50 g selama 5 menit, melepaskan beban seberat 20 g dan dicatat waktunya hingga kedua objek tersebut terlepas. Pengujian dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-21. Adapun syarat waktu daya lekat yang baik adalah tidak kurang dari 4 detik<sup>(16)</sup>.

**Uji Viskositas.** Viskositas dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield, yaitu dengan memasang spindel No.4 pada alat. Kemudian, dicelupkan ke dalam sediaan sampai batas tertentu dan atur kecepatan 30 rpm pada suhu (25 °C). Tiap masing-masing pengukuran dibaca skalanya (*dial reading*) ketika jarum merah telah stabil. Nilai viskositas dalam sentipoise (cps) diperoleh dari hasil perkalian *dial reading* dengan faktor koreksi untuk masing-masing spindel<sup>(17,18)</sup>.

**Uji Stabilitas. Penyimpanan Pada Suhu Rendah.** Sampel krim ekstrak buah bisbul disimpan pada suhu rendah (4±2 °C) selama 28 hari. Kemudian dilakukan pengamatan organoleptik (perubahan warna, aroma, homogenitas), serta pengukuran pH dengan pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu<sup>(19)</sup>. Pengukuran viskositas dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-21<sup>(20)</sup>.

**Penyimpanan Pada Suhu Kamar.** Sampel krim ekstrak buah bisbul disimpan pada suhu kamar (28±2°C) selama 28 hari, kemudian dilakukan pengamatan organoleptik (perubahan warna, aroma, homogenitas), serta pengukuran pH dengan pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu<sup>(19)</sup>. Pengukuran viskositas dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-21<sup>(20)</sup>.

**Penyimpanan Pada Suhu Tinggi.** Sampel krim ekstrak buah bisbul disimpan pada suhu tinggi (40±2°C) selama 28 hari. Kemudian, dilakukan pengamatan organoleptik (perubahan warna, aroma, homogenitas), serta pengukuran pH dengan pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu<sup>(19)</sup>. Pengukuran viskositas dilakukan pada hari ke-0 dan hari ke-21<sup>(20)</sup>.

**Cycling Test.** Sampel krim ekstrak buah bisbul disimpan pada suhu rendah (4±2 °C) selama 24 jam, lalu dipindahkan ke oven suhu 40 °C selama 24 jam, perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang selama 6 siklus dan diamati adanya perubahan kondisi fisik krim (perubahan warna, bau, homogenitas) dibandingkan setelah percobaan dan sebelum percobaan<sup>(21)</sup>.

**Uji Sentrifugasi.** Sampel krim ekstrak buah bisbul dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi. Kemudian, dimasukkan ke dalam sentrifugator dengan kecepatan putaran 3750 rpm selama 5 jam. Hasil penelitian tersebut ekuivalen dengan efek gravitasi selama satu tahun, kondisi fisik krim dibandingkan setelah percobaan dan sebelum percobaan<sup>(21)</sup>.

**Penentuan Nilai SPF.** Sebanyak 0,1 gram masing-masing krim ekstrak buah bisbul (F1, F2, dan F3) dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 25 mL, dicampur hingga homogen. Penentuan efektivitas tabir surya dilakukan dengan menentukan nilai SPF secara in vitro dengan alat spektrofotometer UV-Vis. Krim ekstrak buah bisbul di encerkan sampai 4000 bpj. Sebelumnya spektrofotometer dikalibrasi dengan menggunakan etanol 96% dimasukkan dalam spektrofotometer UV-Vis untuk proses kalibrasi<sup>(22)</sup>. Kemudian dibuat kurva serapan uji dalam kuvet pada panjang gelombang antara 290-320 nm dengan interval 5 nm menggunakan etanol 96% sebagai blanko. Kemudian hasil absorbansi dicatat dan dihitung nilai SPFnya<sup>(1,23-25)</sup>. Untuk menghitung nilai SPF digunakan rumus:

$$SPF = CF \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda)$$

Keterangan:

EE = Spektrum efek eritema

I = Spektrum intensitas sinar (Tabel 2)

Abs = Absorbansi

CF = Faktor koreksi

**Tabel 2. Nilai EE x I pada panjang gelombang 290-320 nm.**

Panjang gelombang (λ nm)	Nilai EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

**Analisis Data.** Pada penelitian ini data yang diperoleh dilakukan analisis data menggunakan uji anova SPSS 16.0 dengan tingkat kepercayaan 95%. Data yang dianalisis yaitu nilai SPF, daya sebar, daya lekat, dan viskositas krim.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakteristik Simplisia Buah Bisbul.** Buah bisbul yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah bisbul jenis *Diospyros blancoi* A.DC / *Diospyros discolor* Willd, suku ebenaceae. Serbuk simplisia yang didapat sebanyak 1150 mg dari ± 2,5 kg daging buah bisbul (tanpa biji dan kulit buah). Serbuk buah bisbul berwarna kuning kecoklatan, beraroma khas bisbul, dan tidak berasa. Simplisia dinilai cukup aman dan baik bila mempunyai kadar air kurang dari 10%<sup>(26)</sup> karena bila lebih dari 10% simplisia akan mudah

ditumbuhi jamur dan menjadi rusak sehingga tidak dapat digunakan. Hasil kadar air diperoleh sebesar 8,05%, hasil tersebut sesuai dengan literatur. Hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 3.

**Tabel 3. Hasil uji fitokimia serbuk buah bisbul.**

Pengujian	Hasil	
Alkaloid	Bouchardat	+
	Dragendorf	+
Saponin		+
Tanin		+
Fenolik		+
Flavonoid		+
Triterpenoid		+
Steroid		-
Glikosida		+

**Rendemen Ekstraksi Buah Bisbul.** Ekstraksi serbuk buah bisbul menggunakan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan selama 3 x 24 jam sesekali diaduk menggunakan pelarut etanol 95%. Hasil ekstraksi serbuk bisbul berupa ekstrak kental berwarna coklat kekuningan, beraroma khas bisbul, dan memiliki nilai pH 3 karena memiliki kandungan flavonoid dan fenolik yang bersifat asam. Serbuk simplisia yang diekstrak sebanyak 995 gram dan diperoleh ekstrak sebanyak 119,3 gram sehingga diperoleh rendemen sebesar 12%. Pemilihan pelarut berdasarkan pada keamanan dan kemudahan menguap dari pelarut sehingga dalam penelitian ini digunakan etanol 95% sebagai pelarut. Etanol 95% dipilih sebagai pelarut karena lebih efektif menarik metabolit sekunder khususnya flavonoid dan tanin yang berguna sebagai antioksidan dan tabir surya<sup>(27)</sup>.

**Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kental dan Krim Ekstrak Buah Bisbul.** Penentuan antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Metode ini dipilih karena prosedur pengukuran antioksidan yang mudah dan dapat dilakukan dalam waktu yang singkat. Uji peredaman warna radikal bebas DPPH merupakan uji untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel yang akan diujikan dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas DPPH. Perubahan warna yang diamati dari larutan yang berwarna ungu menjadi warna kuning<sup>(28)</sup>. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis *Elisa Reader* Epoch 2 dengan panjang gelombang 517 nm. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi sampel yang dapat meredam DPPH sebanyak 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Hasil Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4. Hasil uji antioksidan.**

Sampel	Nilai $IC_{50}$ (ppm)	Kategori <sup>(12)</sup>
F1	4802,63	Lemah
F2	3510,11	Lemah
F3	638,32	Lemah
Ekstrak	69,13	Kuat
Vitamin C	4,31	Sangat kuat

Berdasarkan pada hasil uji aktivitas antioksidan ketiga formulasi memiliki aktivitas antioksidan kategori lemah. Hasil pengujian menunjukkan F3 memiliki nilai aktivitas antioksidan lebih baik dibandingkan F2 dan F1, hal ini ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$  F3, yaitu sebesar 638,32 sedangkan F1 sebesar 3510,11 dan F2 sebesar 4802,63. Pada F3 konsentrasi ekstrak buah bisbul yang ditambahkan ke dalam basis krim sebesar 40% lebih banyak dibandingkan F1 dan F2. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak sebesar 69,13 bpj dan aktivitas antioksidannya lebih kuat dibanding yang telah dibuat sediaan. Aktivitas antioksidan setelah dibuat sediaan menjadi lebih lemah karena kemungkinan terjadi reaksi antara ekstrak dengan salah satu komponen dalam sediaan krim, sehingga aktivitas antioksidan sediaan lebih kecil dari ekstrak. Vitamin C sebagai pembanding memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 4,31 yang termasuk kategori sangat kuat.

**Hasil Evaluasi Fisik Sediaan Krim. Pemeriksaan organoleptik.** Pemeriksaan organoleptik krim meliputi pemeriksaan warna, aroma, tekstur. hasil pemeriksaan organoleptik dapat dilihat pada Tabel 5.

**Tabel 5. Hasil pemeriksaan organoleptik krim.**

Krim	Warna	Aroma	Tekstur
F1	Krem	+	Lembut
F2	Coklat muda	++	Lembut
F3	Coklat tua	+++	Lembut
Basis krim	Putih susu	-	Lembut

Keterangan:

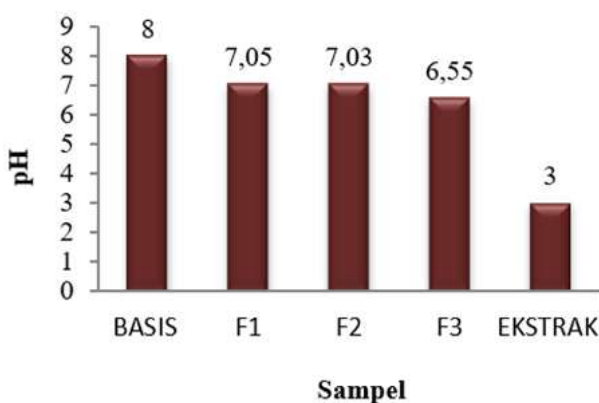
- + = Khas bisbul lemah
- ++ = Khas bisbul sedang
- +++ = Khas bisbul kuat
- = Tidak beraroma

Berdasarkan pada pemeriksaan yang telah dilakukan warna pada setiap formulasi berbeda F1 memiliki warna krem, F2 memiliki warna coklat muda, dan F3 memiliki warna coklat tua. Warna kecoklatan dari sediaan diakibatkan oleh penambahan ekstrak etanol buah bisbul yang berwarna coklat kekuningan. Hal ini dibuktikan sebelum penambahan ekstrak etanol buah bisbul warna basis krim berwarna putih. Aroma atau bau yang dihasilkan adalah khas

buah bisbul. Aroma yang dihasilkan krim ekstrak buah bisbul tergantung dari konsentrasi ekstrak yang ditambahkan dalam sediaan krim. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka aroma yang dihasilkan semakin meningkat, dari ketiga formula yang paling kuat aroma khas bisbulnya yaitu formula 3 karena konsentrasi ekstrak yang ditambahkan ke dalam sediaan krim paling besar dibandingkan formula 1 dan 2.

**Homogenitas.** Berdasarkan pada pemeriksaan homogenitas ketiga krim sesuai dengan literatur yaitu homogen. Krim dinyatakan homogen apabila mempunyai tekstur yang tampak rata dan tidak menggumpal.

**Hasil Uji pH Sediaan Krim.** pH krim menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak kental buah bisbul yang ditambahkan dalam sediaan krim. Hal tersebut dikarenakan ekstrak buah bisbul memiliki pH asam yaitu pH 3. Semakin banyak konsentrasi ekstrak buah bisbul yang ditambahkan maka semakin asam pH krim yang dihasilkan. Penurunan pH krim cenderung kecil karena kandungan asam dari ekstrak seperti flavonoid merupakan asam lemah sehingga hanya sebagian kecil terdisosiasi menjadi  $H^+$ . Nilai pH pada sediaan krim yang diperoleh berkisar 6,55-7,05; sementara itu pH basis krim (kontrol -) adalah 8,00. Hal ini menunjukkan bahwa pH krim sesuai dengan standar mutu sediaan krim tabir surya yaitu, 4,5-8,0 meskipun kurang sesuai dengan pH kulit yaitu 4,5-7,0. Hasil yang dihasilkan diharapkan masih bisa diterima karena rentang pH nya tidak terlalu jauh. krim yang memiliki pH terlalu basa akan menyebabkan kulit bersisik sedangkan jika pH terlalu asam menimbulkan iritasi kulit<sup>(29)</sup>. Hasil pengujian pH dapat dilihat pada Gambar 1.



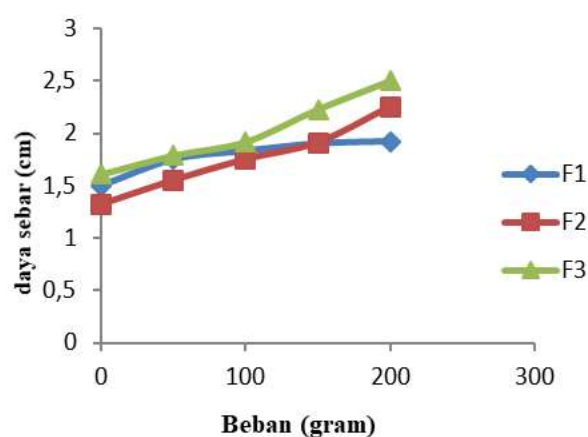
Gambar 1. Hasil evaluasi pH awal krim.

**Hasil Uji Daya Sebar.** Pengukuran daya sebar krim dilakukan dengan meletakkan krim ditengah-tengah kaca bulat. Kemudian, diukur diameternya selama satu menit lalu percobaan diulang dengan

menambahkan beban seberat 50, 100, 150, dan 200 gram. Pengukuran daya sebar dilakukan sebanyak tiga ulangan. Hasil uji daya sebar dapat dilihat pada Tabel 6. Berdasarkan hasil rerata pada Tabel 6 maka dapat dibuat grafik hubungan beban krim yang digunakan dan hasil rerata daya sebar krim untuk mengetahui formulasi yang lebih baik daya sebaranya. Hubungan antara beban krim dan hasil rerata daya sebar dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan pada hasil pengujian diperoleh uji daya sebar pada F3 lebih luas penyebarannya dibandingkan dengan F1 dan F2. Hal disebabkan oleh tingkat kekentalan pada F1 dan F2 yang lebih kental dibandingkan dengan F3. Hal tersebut disebabkan karena viskositas F3 lebih rendah dibandingkan dengan F1 dan F2. Semakin tinggi viskositas krim semakin kecil daya sebaranya.

Tabel 6. Hasil uji daya sebar krim ekstrak buah bisbul.

Beban (g)	Hasil daya sebar (cm)		
	F1	F2	F3
	Rerata±SD	Rerata±SD	Rerata±SD
0	1,50±0,25	1,32±0,09	1,61±0,10
50	1,75±0,12	1,55±0,04	1,79±0,07
100	1,83±0,07	1,75±0,12	1,92±0,07
150	1,90±0,03	1,91±0,03	2,23±0,22
200	1,92±0,07	2,25±0,25	2,50±0,25

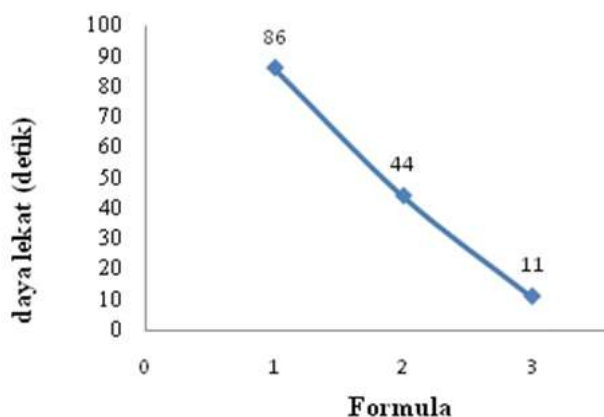


Gambar 2. Hubungan antara beban krim dan daya sebar krim.

**Hasil Uji Daya Lekat.** Pengujian daya lekat menggunakan dua buah kaca transparan yang pada salah satu ujung kaca ditekan beban 50 gram selama 5 menit, kemudian melepaskan beban seberat 20 gram dan dicatat waktunya hingga kedua kaca tersebut terlepas. Hasil rerata uji daya lekat dapat dilihat pada Tabel 7 (Gambar 3). Pengujian daya lekat dilakukan sebanyak 3 ulangan. Berdasarkan pada hasil pengujian semua formula sesuai dengan literatur waktu daya lekat yang baik, yaitu tidak kurang dari 4 detik<sup>(30)</sup>.

**Tabel 7. Hasil uji daya lekat ekstrak buah bisbul.**

Formula	Hasil daya lekat (detik)
F1	86±15,27
F2	44±5,13
F3	11±3,60

**Gambar 3. Hubungan antara formula dan waktu daya lekat krim.**

**Hasil Cycling Test.** Pengujian *cycling test* dilakukan pada hari ke-1 sediaan krim dibuat dengan cara sampel krim ekstrak buah bisbul disimpan pada suhu rendah ( $4\pm 2$  °C) selama 24 jam, lalu dipindahkan ke oven pada suhu  $40\pm 2$  C selama 24 jam, perlakuan ini adalah satu siklus. Percobaan diulang selama 6 siklus dan diamati adanya perubahan kondisi fisik krim pada kondisi awal dan setelah siklus ke-6. Hasil pengujian *cycling test* dapat dilihat pada Tabel 8.

Berdasarkan pada uji *cycling test* didapatkan adanya perubahan kondisi fisik seperti warna dan aroma pada F1 dan adanya perubahan fisik krim seperti warna, aroma, dan homogenitas pada F2 dan F3. Hal tersebut disebabkan karena perubahan suhu penyimpanan yang tidak stabil menyebabkan kandungan dalam krim ekstrak buah bisbul terpisah dan warna menjadi lebih gelap dan aroma menjadi lebih kuat.

**Hasil Uji Sentrifugasi.** Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan fisik dari formula krim yang mengandung ekstrak buah bisbul dari konsentrasi 10, 20, dan 40%. Pengujian sentrifugasi dilakukan pada hari ke-1 menggunakan sentrifugator. Sampel

krim ekstrak buah bisbul dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, kemudian dimasukkan ke dalam dalam sentrifugator dengan kecepatan putaran 3750 rpm selama 5 jam. Berdasarkan hasil pengujian, ketiga krim stabil dan diharapkan stabil dalam penyimpanan 1 tahun dari efek gravitasi. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 9.

**Tabel 9. Hasil uji sentrifugasi.**

Formula	Hasil pengujian sentrifugasi	
	Awal	Akhir
F1	Tidak terjadi pemisahan	Tidak terjadi pemisahan
F2	Tidak terjadi pemisahan	Tidak terjadi pemisahan
F3	Tidak terjadi pemisahan	Tidak terjadi pemisahan

**Hasil Uji Stabilitas Fisik Sediaan Krim.** Uji stabilitas dilakukan dengan penyimpanan pada suhu rendah ( $4\pm 2$  °C), suhu kamar ( $28\pm 2$  °C), dan suhu tinggi ( $40\pm 2$  °C). Pada uji ini dilakukan pengamatan organoleptik (warna, aroma, tekstur, dan homogenitas) dan pH selama 28 hari. Hasil pengamatan organoleptik dapat dilihat pada Tabel 10. Pengamatan dilakukan setiap minggunya. Pada masing-masing krim mengalami perubahan warna menjadi lebih kecoklatan pada penyimpanan di suhu  $40\pm 2$  °C disebabkan oleh proses pemanasan. Sementara pada suhu rendah ( $4\pm 2$  °C) dan suhu kamar ( $28\pm 2$  °C) tidak terjadi perubahan. Semakin besar konsentrasi ekstrak buah bisbul yang digunakan semakin menjadi tua warna krim setelah disimpan. Hal ini disebabkan karena suhu yang tinggi membuat polifenol (flavonoid) dalam ekstrak semakin mudah teroksidasi. Semakin banyak konsentrasi polifenol di dalam krim terlihat akibat dari proses oksidasinya yang ditandai dengan warna kecoklatan<sup>(31)</sup>.

Pada pengamatan tekstur di penyimpanan suhu  $40\pm 2$  °C, krim mengalami perubahan tekstur menjadi lebih cair karena proses pemanasan yang membuat krim menjadi kurang stabil. Pengamatan aroma pada semua suhu penyimpanan tidak begitu terjadi perubahan pada masing-masing krim. Hasil pengamatan pH dapat dilihat pada Tabel 11.

**Tabel 8. Hasil pengujian cycling test.**

Formula	Hasil pengamatan fisik krim					
	Sebelum			Setelah		
	Warna	Aroma	Homogenitas	Warna	Aroma	Homogenitas
F1	Krem	Khas bisbul lemah	Homogen	Coklat muda	Stabil	Homogen
F2	Coklat muda	Khas bisbul sedang	Homogen	Coklat tua	Stabil	Homogen
F3	Coklat tua	Khas bisbul kuat	Homogen	Coklat tua	Stabil	Homogen

**Tabel 10. Hasil pengamatan organoleptik pada variasi suhu penyimpanan.**

Formula	Minggu ke-	Pengamatan suhu rendah ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ )			
		Warna	Aroma	Tekstur	Homogenitas
F1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2
F2	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2
F3	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2

Formula	Minggu ke-	Pengamatan suhu kamar ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ )			
		Warna	Aroma	Tekstur	Homogenitas
F1	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2
F2	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2
F3	1	1	1	1	1
	4	1	1	1	2

Formula	Minggu ke-	Pengamatan suhu tinggi ( $40\pm 2^\circ\text{C}$ )			
		Warna	Aroma	Tekstur	Homogenitas
F1	1	1	1	1	1
	4	2	1	2	2
F2	1	1	1	1	1
	4	2	1	2	2
F3	1	1	1	1	1
	4	2	1	2	2

Keterangan :  
 Warna = 1 (tidak berubah), 2 (sedikit berubah)  
 Aroma = 1 (tidak berubah), 2 (sedikit berubah)  
 Tekstur = 1 (tidak berubah), 2 (sedikit berubah)  
 Homogenitas = 1 (tidak berubah), 2 (sedikit berubah)

**Tabel 11. Hasil pengamatan pH pada suhu rendah ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ), kamar ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ), dan  $40\pm 2^\circ\text{C}$ .**

Formula	Suhu rendah				Suhu kamar				Suhu tinggi			
	Minggu ke-				Minggu ke-				Minggu ke-			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1	7,05	7,21	7,29	7,40	7,05	7,05	7,04	7,03	7,05	7,03	7,02	7,02
F2	7,03	7,05	7,21	7,29	7,03	7,03	7,02	7,00	7,03	6,99	6,88	6,75
F3	6,55	6,88	6,91	6,91	6,56	6,56	6,55	6,55	6,55	6,55	6,54	6,54

Berdasarkan hasil pengamatan pada penyimpanan di suhu  $4\pm 2^\circ\text{C}$ , krim mengalami kenaikan pH menjadi lebih basa dikarenakan pada suhu rendah reaksi hidrolisis yang terjadi dapat dicegah sehingga pH krim tidak mengalami penurunan seperti krim pada penyimpanan di suhu kamar dan suhu  $40\pm 2^\circ\text{C}$ . Pada dua kondisi penyimpanan tersebut, reaksi hidrolisis antara polifenol (flavonoid) dengan glikosida terjadi lebih cepat sehingga polifenol terlepas dari glikosidanya dan terdapat dalam bentuk bebas yang lebih asam. Semakin besar konsentrasi ekstrak buah

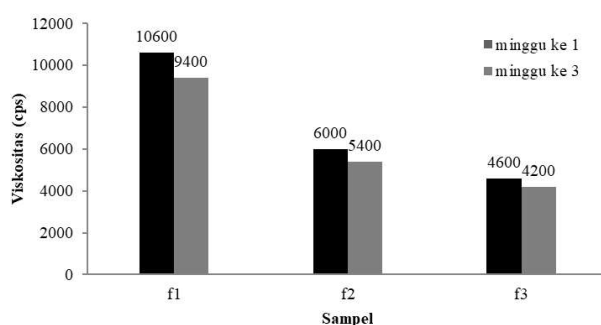
bisbul maka pH yang dihasilkan semakin asam karena kandungan polifenol / flavonoid<sup>(31)</sup>.

**Stabilitas Viskositas Sediaan Krim.** Pengukuran viskositas dilakukan menggunakan viskometer Brookfield MLVT 115 pada spindel 4 dengan kecepatan 30 rpm. Faktor koreksi untuk spindel 4 adalah 200. Viskositasnya (cps) adalah angka hasil pengukuran x faktor koreksi. Pengukuran viskositas dilakukan pada minggu ke-1 dan minggu ke-3.

Berdasarkan pada hasil pengujian, viskositas krim mengalami penurunan dari minggu ke-1 karena sifat



ekstrak buah bisbul yang higroskopik atau menyerap molekul air dari lingkungannya sehingga volume air dalam krim meningkat. Semakin besar konsentrasi ekstrak dalam krim dan semakin lama penyimpanan, maka viskositas krim akan semakin cair. Selain itu semakin banyak fase air dalam krim mempengaruhi viskositas krimnya pula. Berdasarkan pada hasil pengukuran yang telah dilakukan, ketiga krim pada minggu ke-1 dan minggu ke-3 sesuai dengan viskositas krim yang baik, yaitu 2000-50000 cps. Hasil pengamatan viskositas dapat dilihat pada Gambar 4



Gambar 4. Hasil viskositas krim pada minggu ke-1 dan ke-3.

**Nilai SPF Sediaan Krim.** Pengujian nilai SPF dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV mini-1240V dengan rentang panjang gelombang 290-320 nm. Hal yang pertama dilakukan yaitu menimbang sebanyak 0,1 gram masing-masing sampel kemudian dilarutkan dalam etanol 96% sebanyak 25 mL dan dicampur hingga homogen kemudian diukur serapannya. Sebelumnya spektrofotometer UV-Vis dikalibrasi dengan menggunakan etanol 96%. Hasil dari uji nilai SPF dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil pengujian nilai SPF.

Sampel	Nilai SPF	Kategori Proteksi
Ekstrak	36,02±0,42	Ultra
Basis krim	1,60±0,08	-
F1	9,26±0,63	Maksimal
F2	10,02±0,00	Maksimal
F3	13,00±0,12	Maksimal

Berdasarkan hasil pengukuran yang telah dilakukan, ekstrak buah bisbul memiliki nilai SPF sebesar 36,02 yang berarti memiliki kemampuan ultra sebagai tabir surya. Pada F1, F2, dan F3 masing-masing memiliki nilai 9,26; 10,02; dan 13,00. Dari ketiga formula F3 memiliki nilai SPF tinggi yaitu sebesar 13,00 yang memiliki kemampuan maksimal sebagai tabir surya, sedangkan pengujian yang dilakukan pada basis krim tanpa ekstrak sebesar

1,60 yang tidak memiliki kemampuan sebagai tabir surya. Hal tersebut menunjukkan basis krim tidak memberikan pengaruh terhadap nilai SPF formula sehingga semakin besar konsentrasi yang ditambahkan pada sediaan krim maka semakin besar nilai SPF yang didapat.

**Hubungan Nilai SPF dengan Nilai IC<sub>50</sub>.** Buah bisbul memiliki salah satu kandungan terpenting yaitu flavonoid yang berperan sebagai antioksidan dan berguna sebagai bahan aktif tabir surya<sup>(31)</sup>. Berdasarkan pada hasil penelitian didapat aktivitas antioksidan dan nilai SPF menunjukkan adanya hubungan. Semakin besar aktivitas antioksidannya maka semakin besar nilai SPF krim. Hasil nilai SPF dan nilai IC<sub>50</sub> dapat dilihat pada Tabel 13.

**Hasil Analisis Data.** Berdasarkan pada analisis

Tabel 13. Hasil pengujian nilai SPF.

Sampel	SPF	IC <sub>50</sub> (bpj)
F1	9,25±0,63	4802,63
F2	10,02±0,00	3510,11
F3	13,00±0,12	638,32
Ekstrak	36,02±0,42	69,13

data yang dilakukan semua data yang diuji terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ). Kemudian, dilakukan uji satu arah Anova dengan taraf kepercayaan 95%. Data yang diuji yaitu aktivitas tabir surya, daya sebar, daya lekat, dan viskositas. Berdasarkan pada uji tersebut semua data adanya pengaruh yang signifikan antara setiap formula terhadap aktivitas tabir surya, daya sebar, daya lekat, dan viskositas krim ( $p < 0,05$ ).

Selanjutnya, data aktivitas tabir surya dilakukan uji lanjutan uji BNT (beda nyata terkecil) untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan aktivitas krim tabir surya secara bermakna pada setiap formula. Berdasarkan pada uji tersebut dapat disimpulkan bahwa aktivitas krim tabir surya setiap formula uji berbeda secara bermakna dengan basis krim dan ekstrak ( $p < 0,05$ ).

## SIMPULAN

Kandungan fitokimia ekstrak etanol 95% buah bisbul terdiri atas alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, fenolik, triterpenoid, dan glikosida. Formula sediaan krim dengan kandungan ekstrak buah bisbul 40% memiliki nilai SPF tertinggi sebesar 13,0. Krim memiliki kestabilan yang baik pada penyimpanan suhu rendah ( $4±2^{\circ}\text{C}$ ) dan kamar ( $28±2^{\circ}\text{C}$ ) berdasarkan pada nilai pH, viskositas, organoleptik, daya sebar, dan daya lekat.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Yulianti E, Adelsa A, Putri, A . Penentuan nilai SPF (*sun protection factor*) ekstrak etanol 70% temu mangga (*Curcuma mangga*) dan krim ekstrak etanol 70% temu mangga (*Curcuma mangga*) secara in vitro menggunakan metode spektrofotometri. *Majalah Kesehatan FKUB*. 2015; 2(1):41-50.
2. Shovyana HH, Zulkarnain AK. Stabilitas fisik dan aktivitas krim *W/O* ekstrak etanolik buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpha* (Scheff.) Boerl.) sebagai tabir surya. *Trad. Med. J*. 2013;18(2):109-17.
3. Damogalad V, Edy HJ, Supriati HS. Formulasi krim tabir surya ekstrak kulit nanas (*Ananas winosus* L MERR) dan uji in vitro *sun protecting faCtor* (SPF). *Pharmacon*. 2013; 2(2): 39-43.
4. Rejeki S, Wahyuningsih SS. Formulasi gel tabir surya minyak nyamplung (Tamanu Oil) dan uji nilai SPF secara in vitro. *University Research Colloquim*. 2015; 97-103.
5. Subchan P, Malik DA, Namason WT. Fotoproteksi. *MDVI*. 2011. 38(3):141-8.
6. Retnaningsih C, Darmono, Widianarko, B, Muis, SF. Peningkatan aktivitas antioksidan superoksida dismutase pada tikus hiperglikemi dengan asupan tempe koro benguk (*Mucuna pruriens* L.). *Agritech*. 2013; 33(2):154-161.
7. Ayuningrum. Uji stabilitas fisik dan penentuan nilai SPF (*sun protection factor*) krim tabir surya ekstrak kulit buah pepaya (*Carica papaya* L.).[Artikel]. Ungaran: Sekolah Tinggi Kesehatan Ngudi Waluyo Ungaran. 2016.
8. Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Indonesia Edisi Lima. Jakarta: KemenKes RI. 2014.
9. Kementerian Kesehatan RI. Formularium Nasional. Jakarta: KemenKes RI. 2015.
10. Juwita AP, Yamlean PVY, Edy HJ. Formulasi krim ekstrak etanol daun lamun (*Syringodium isoetifolium*). *Pharmacon*. 2013; 2(2):8-12.
11. Departemen Kesehatan RI. Farmakope Herbal Indonesia Edisi I. Jakarta: DepKes RI. 2013.
12. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenilpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*. 2004; 26(2):212-6.
13. Departemen Kesehatan RI. Formularium Kosmetika Indonesia (Cetakan I). Jakarta: DepKes RI. 1985.
14. Agustin R, Defitri YO, Lucida H. Formulasi krim tabir surya dari kombinasi etil p-metoksisinamat dengan katekin. Dalam Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik III. 2013; 184-97.
15. Nova. Formulasi ekstrak metanol kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) pada uji iritasi primer [skripsi]. Yogyakarta. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta. 2012.
16. Safitri NA, Puspita OK, Yurina V. Optimasi formula sediaan krim ekstrak stroberi (*Fragaria x ananassa*) sebagai krim anti penuaan. *Majalah Kesehatan FKUB*. 2014; 1(4):235-40.
17. Budiarti TK. Aktivitas antioksidan dari buah bakau (*Rhizophora mucronata* Lamk.) pada formulasi skin lotion dengan karaginan [skripsi]. Bogor: Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. 2014.
18. Nurdianti L, Rahmiyani I. Uji aktivitas antioksidan krim ekstrak daun mangga (*Mangifera indica* L) terhadap DPPH (1,1-Dipenyl-2-Picrylhydrazil). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 2016; 16(1):49-52.
19. Bulan AS, Susanti L, Pranata W. Formulasi ekstrak buah jambu biji sebagai lotion antioksidan. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2014; 11(1):38-41.
20. Sharon N, Anam S, Yuliet. Formulasi krim antioksidan ekstrak etanol bawang hutan. *Online Jurnal of Natural Science*. 2013; 2(3):111-22.
21. Wihelmina. Pembuatan dan penentuan nilai SPF nanoemulsi tabir surya menggunakan minyak kencur (*Kaempferia galanga* L.) sebagai fase minyak [skripsi]. Jakarta: Universitas Indonesia. 2011.
22. Mokodompit AN, Edy HJ, Wiyono W. Penentuan nilai *sun protective factor* (SPF) secara in vitro krim tabir surya ekstrak etanol kulit alpukat. *Pharmacon*. 2013; 2(3): 84-5.
23. Sayre RM, Agin PP, Levee GJ, Marlowe E. A comparison of in vivo and in vitro testing sunscreens formulas. *Photo Chem. Photo Biol*.1979.;29(3):559-66.
24. Alhabsyi DF, Edi S, Wewengkang DS. Aktivitas antioksidan dan tabir surya pada ekstrak kulit buah pisang goroho (*Musa acuminata* L). *Pharmacon*. 2014; 3(2):107-14
25. Daud NS, Al Hajri NS, La Ode Z, Ervianingsih. Formulasi lotion tabir surya ekstrak etanol beras merah (*Oryza nivara*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2016; 1(2): 143-57.
26. Departemen Kesehatan RI. *Materia Medika Indonesia*, Edisi III. Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta: DepKes RI. 1979.
27. Harliany D, Taufiqurrohman I, Dewi N. Uji variasi konsentrasi pelarut etanol terhadap kadar total flavonoid ekstrak daun ramania (*Bouea macrophylla* Griffith). *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2017.;1(1):1-5.
28. Widyastuti, Fratama RI, Seprialdi A. Pengujian aktivitas antioksidan dan tabir surya ekstrak etanol kulit buah naga super merah (*Hylocereus costaricensis* (F.A.C. Weber) Britton & Rose). *Scientia*. 2015; 5(2): 69-73.
29. Mu'awanah, Isnin AU, Setiaji B, Syoufia A. Pengaruh konsentrasi *virgin coconut oil* (VCO) terhadap stabilitas emulsi kosmetik dan nilai *sun protection factor* (SPF). *Berkala MIPA*. 2014; 24(1): 5-6.
30. Zam UAZ, Sutaryono, Yetti OK. Formulasi krim ekstrak etanol buah strawberry (*Fragaria* Sp.). *Cerata Journal of Pharmacy Science*. 2013;4(1):1-12
31. Setiawan T. Uji stabilitas fisik dan penentuan nilai SPF krim tabir surya yang mengandung ekstrak daun teh hijau (*Camellia Sinensis* L) oksil metoksisinamat dan titanium dioksida [Skripsi]. Depok: FMIPA Universitas Indonesia. 2010.