

DAFTAR ISI

VOLUME 18

Nomor 1	April 2020
Aktivitas Penghambat Reseptor-β Adrenergik Ekstrak Air Kulit Batang Taya (Nauclea subdita (Korth) Steud) Pada Tikus Wistar Jantan Erfan Tri Prasongko, Finna Setiawan, Christina Avanti	1-6
Analisis Perencanaan dan Pengendalian Obat di Rumah Sakit Pluit Tahun 2015 Endang Setiawati, Anny Victor Purba, Wahyudi Uun Hidayat	7-14
Efektivitas Edukasi Media Booklet terhadap Kualitas Hidup Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 Rawat Jalan di RS Anwar Medika Khurin In Wahyuni, Antonius Adji Prayitno Setiadi, Yosi Irawati Wibowo	15-20
Profil Lipid dan Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Hiperlipidemia dengan Pemberian Ekstrak Kopi Hijau Fransiska Maria Charistiany, Diana Holiday , Fifteen Aprila Fajrin, Monica Cinuradha Aura Salsabina, Andrean Roni	21-27
Evaluasi Pelayanan Pemantauan Terapi Obat Di Rumah Sakit X Tangerang Febbyasi Megawaty, Shirley Kumala, Sesilia Andriani Keban	28-33
Formulasi Curcuma zedoaria sebagai Emulgel Antioksidan Yesi Desmiaty, Wiwi Winarti, Lindawati, Fahleni	34-40
Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Biologi Asam Kojat dari Fermentasi Cair Aspergillus fl avus LS03 Hani Mulyani, Rizna TD, Megawati, Sofa Fajriah	41-47
Uji Aktivitas Antihialuronidase In Vitro dan Karakteristik Fisik Nanostructured Lipid Carrier Ekstrak Rimpang Langkuas laki-laki (Alpinia zerumbet) Siti Umrah Noor, Dian Ratih Laksmiawati, Wahono Sumaryono	48-52
Pengaruh Pemberian Aspartam Secara Oral Terhadap Kadar AST dan ALT Serum Serta Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih Ros Sumarny, Sondang Khairani, Mohamad Rega Satria Ramadhan	53-60
Profil Proliferasi Sel Limfosit Benalu Batu (Begonia medicinalis) Asal Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah Akhmad Khumaidi, Agustinus Widodo, Arsa Wahyu Nugrahani, Ediat Sasmito, Nanang Fakhrudin	61-67

DAFTAR ISI

VOLUME 18

Nomor 1

April 2020

Sifat Fisikokimia dan Aktivitas Antioksi dan Crude Fukoidan Hasil Ekstraksi dari <i>Sargassum cinereum</i> Lilie Nurhidayati, Yashinta Fitriani, Syamsudin Abdillah, Esti Mumpuni, Mohamad Rafi	68-74
Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Etanol Buah Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i> (L.) Moench.) dan Uji Aktifitas Antikolesterol secara In-vitro Ratna Djamil, Sarah Zaidan, Vera Butar-Butar, Diah Kartika Pratami	75-80
Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Biji Pinang (<i>Areca Catechu L.</i>) Terhadap Isolat Bakteri Gigi Meiriza Djohari , Armon Fernando, Annisa Safitri	81-87
Formulasi Gel Transfersom Limbah Kulit Bawang Merah (<i>Allium cepa. L</i>) Menggunakan Perbandingan Fosfolipid dan Surfaktan Winda Permata Sari, Soniya Tamara, Sherli Permatasari, Septia Andini	88-95
Tinjauan Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) diaplikasikan untuk Sediaan Gel Wahyuning Setyani, Jacinda Yakub, Octavianus Yandri, Viola Resti Kawan, Theresia Jenny Haryanto, I Made Myasa Darmika	96-100
Uji Antidiare Granul dari Ekstrak Etanol Daun Kratom (<i>Mytragina speciosa</i> Korth) Terhadap Mencit Putih Jantan (<i>Mus musculus L</i>) Suhaimi, Dlian Kartikasari	101-108
Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Sabrang (<i>Eleutherine americana</i>) Terhadap <i>Shigella dysenteriae</i> dan <i>Salmonela enteritidis</i> Rizqy Dimas Monica, Achadiyahani, Astrid F. Khairani, Michael V.L Tumbol	109-117
Formulasi dan Aktivitas Gel yang Mengandung Nanopartikel Ekstrak Temulawak sebagai Antiacne Anastasya, Deni Rahmat, Anarisa Budiati	118-122
Formulasi Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei Hasil Induksi dengan NAA dan BAP Faizatun, Eerlingha Gangga, Sarah Anindita, Titiek Martati, Nur Miftahurrohmah ...	123-129
Potensi Minyak Atsiri Temu Kunci (<i>Kaempferia pandurata</i>) dan Komponennya sebagai Pelangsing Aromaterapi Irma H. Suparto, Rahmi Nur Wahidah, Irmannya Batubara	130-135

Ilustrasi pada sampul halaman depan:
Gambar 3 (Khairani *et al*) halaman 58

JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA
Terakreditasi sesuai SK Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan
Tinggi RI NO. 36 / E / KPT / 2019

Aktivitas Penghambat Reseptor- β Adrenergik Ekstrak Air Kulit Batang Taya (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) Pada Tikus Wistar Jantan

(β -Blocker Activity of Taya Stem Bark Extract (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) in Male Wistar Rats)

ERFAN TRI PRASONGKO^{1,4}, FINNA SETIAWAN², CHRISTINA AVANTI^{3*}

¹Magister Farmasi, ²Departemen Biologi Farmasi, ³Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Surabaya, Indonesia. ⁴Fakultas Farmasi, IIK Bhakti Wiyata, Kediri, Indonesia

Diterima: 6 November 2019, Disetujui: 1 April 2020

Abstrak: Beta-adrenergic receptor blocker (β -blocker) merupakan salah satu antihipertensi yang tepat digunakan untuk pasien hipertensi yang disertai penyakit jantung iskemik, gagal jantung, kardiomiopati obstruktif, diseksi aorta, atau aritmia jantung tertentu. Tanaman taya (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) merupakan potensi lokal alam Kalimantan yang secara empiris diyakini memiliki aktivitas sebagai antihipertensi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas inhibisi ekstrak air kulit batang taya pada reseptor- β adrenergik. Pengujian menggunakan tikus wistar jantan dengan metode Non Invasive Blood Pressure (CODA[®]). Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok yaitu kelompok normal, kelompok induksi (Epinefrin 1,2 μ g/kgBB), kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB. Kelompok induksi menunjukkan kenaikan tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, dan detak jantung yang berbeda signifikan dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB ($p < 0,05$). Kelompok ekstrak 100 mg/kgBB berbeda tidak signifikan tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, dan detak jantung dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak air kulit batang taya dosis 100 mg/kgbb memiliki aktivitas menghambat reseptor- β adrenergik pada tikus wistar jantan.

Kata kunci: β -Bloker, taya, tikus wistar jantan.

Abstract: Beta-adrenergic receptor blockers (β -blockers) are an appropriate treatment for patients with hypertension who have concomitant ischemic heart disease, heart failure, obstructive cardiomyopathy, aortic dissection or certain cardiac arrhythmias. Taya (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) is a local natural potential of Kalimantan that is empirically believed to have antihypertensive activities. This study aims to determine the activity of β -adrenergic receptor inhibitors of stem bark water extract in male wistar rats. Tests were carried out on male Wistar rats by the Non Invasive Blood Pressure method using the CODA[®] tool. Test animals were divided into 5 groups: normal group, induction group (Epinephrine 1.2 μ g/kgBW), 100 mg/kgBW extract group, 200 mg/kgBW extract group, and 4.5 mg/kgBW atenolol group. The induction group showed an increase in systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and heart rate that were significantly different from the normal group, the 100 mg/kgBW extract group, the 200 mg/kgBW extract extract group, and the 4.5 mg/kgBW atenolol group ($p < 0.05$). The 100 mg/kgBW extract group was not significantly different from systolic blood pressure, diastolic blood pressure, and heart rate with the normal group, the 200 mg/kgBW extract group, and the 4.5 mg/kgBW atenolol group ($p > 0.05$). The results of this study showed that taya bark water extracts 100 mg/kgbw had inhibitory activity of β -adrenergic receptors in male wistar rats.

Keywords: β -Blocker, taya, male wistar rat.

*Penulis korespondensi

E-mail: c_avanti@staff.ubaya.ac.id

PENDAHULUAN

HIPERTENSI merupakan suatu kondisi dimana tekanan darah mengalami peningkatan yang diakibatkan peningkatan curah jantung, resistensi perifer, atau keduanya⁽¹⁾. Pada pengukuran berkala terhadap penduduk diatas usia 18 tahun menunjukkan prevalensi hipertensi di dunia dan Indonesia semakin meningkat^(2,4). Beberapa kelompok terapi antihipertensi yang paling umum digunakan adalah diuretik, β -blocker, ACE inhibitor, antagonis reseptor angiotensin II, Calcium Channel Blocker (CCB), α adrenoceptor blocker, kombinasi α dan β -blocker, vasodilator langsung, dan beberapa obat yang bekerja secara terpusat (α 2-adrenoceptor agonists dan imidazoline II receptor agonists)⁽⁵⁾.

Beta-adrenergic receptor blocker

(β -blocker) merupakan regimen pengobatan yang tepat untuk pasien hipertensi sistemik yang disertai penyakit jantung iskemik, gagal jantung, kardiomiopati obstruktif, diseksi aorta, atau aritmia jantung tertentu. Mekanisme aksi β -blocker antara lain mengurangi detak jantung dan *cardiac output* (CO), menghambat pelepasan renin, mengurangi plasma volume, mengurangi resistensi vaskuler perifer, dan lain-lain⁽⁶⁾. Penggunaan sediaan antihipertensi konvensional berbahan sintesis banyak dikaitkan dengan berbagai kejadian efek samping sehingga penelitian serta penggunaan suplemen herbal sebagai antihipertensi menjadi semakin populer⁽⁷⁾.

Tanaman Taya (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) merupakan potensi lokal alam Indonesia yaitu Pulau Kalimantan. Secara empiris, masyarakat meyakini bahwa dengan mengonsumsi tanaman ini dapat menyembuhkan sakit perut, diabetes, masalah kulit, serta hipertensi⁽⁸⁾. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Yee (2014) menemukan adanya dua puluh satu senyawa pada tanaman ini⁽⁹⁾. Hingga saat ini belum ada penelitian terhadap tanaman taya tentang pengujian aktivitas penghambat reseptor- β adrenergik. Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti ingin menguji aktivitas penghambatan reseptor- β adrenergik ekstrak air kulit batang taya (*Nauclea subdita* (Korth) Steud) terhadap tikus wistar jantan.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Kulit Batang Tanaman Taya (*Nauclea subdita*) diperoleh dari Kalimantan, Indonesia dan dilakukan determinasi di Pusat Informasi Pengembangan Obat Tradisional (PIPOT) Universitas Surabaya, *Water for Injection* (Otsuka), Aqua DM (PT. Brataco), Atenolol (Internolol, Interbat), Adrenalin (Epinephrine, Phapros), tikus jantan galur Wistar (250-

350g) yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi UGM.

Alat. Alat-alat gelas (Pyrex), neraca analitik (Mettler Toledo), spuit injeksi (1 mL, Terumo) dan sonde (3 mL, OneMed), Freeze Dryer (Christ Alpha 1-2 LDplus), dan alat pengukur tekanan darah (*Non Invasive Blood Pressure System*) dari CODA[®].

METODE. Preparasi Sampel. Kulit batang taya dibersihkan dengan air, disortasi, dipotong, dikeringkan, dan diblender hingga menjadi serbuk. 80 gram serbuk sampel diekstraksi dengan metode refluks menggunakan Aqua DM (3 x 240 mL) pada suhu ≤ 60 °C. 450 mL ekstrak cair yang diperoleh kemudian dilakukan *freeze dry* dengan tekanan 0,050 mBar dan suhu -60 °C selama 48 jam.

Uji Aktivitas Penghambat Reseptor- β Adrenergik dengan Adrenalin sebagai Penginduksi.

Prosedur eksperimental untuk semua hewan uji sesuai dengan Undang-undang Komite Etik dan telah disetujui oleh Komisi Etik Universitas Surabaya dengan nomor protokol 102/KE/X/2019. Pada tahap ini digunakan lima kelompok hewan dengan masing-masing 5 (lima) hewan uji pada setiap kelompok, yaitu kelompok normal, kelompok induksi, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB sehingga total hewan uji yang digunakan adalah 25 hewan uji. Setelah pembagian hewan uji secara acak, kemudian dilakukan penimbangan berat badan tikus pada semua kelompok untuk menentukan dosis yang diberikan. Sebelum dilakukan pengukuran, seluruh hewan uji dipuasakan selama 18 jam. Pengukuran dilakukan dengan alat pengukur tekanan darah (*Non Invasive Blood Pressure System*) dari CODA[®] sebagai baseline. Pengukuran tekanan darah dilakukan dengan menggunakan masing-masing perwakilan 1 hewan uji dari setiap kelompok. Ekstrak air kulit batang taya dosis 100 mg/kg dan 200 mg/kg diberikan secara per oral (p.o) pada masing-masing kelompok ekstrak, atenolol 4,5 mg/kgBB diberikan secara per oral (p.o) pada kelompok atenolol, sedangkan pada kelompok normal dan kelompok induksi diberikan aqua DM secara per oral (p.o).

Pemberian induksi adrenalin 1,2 μ g/kgBB dilakukan secara intra peritoneal (i.p) 60 menit setelah pemberian bahan uji (ekstrak, atenolol, dan aqua DM). Kelompok yang mendapat induksi adrenalin adalah kelompok induksi, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, serta kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB, sedangkan kelompok normal mendapatkan aqua DM yang diberikan secara intra peritoneal (i.p). Pengukuran tekanan darah sistolik, tekanan darah diastolik, dan detak jantung dilakukan

pada semua kelompok pada menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 setelah pemberian bahan uji.

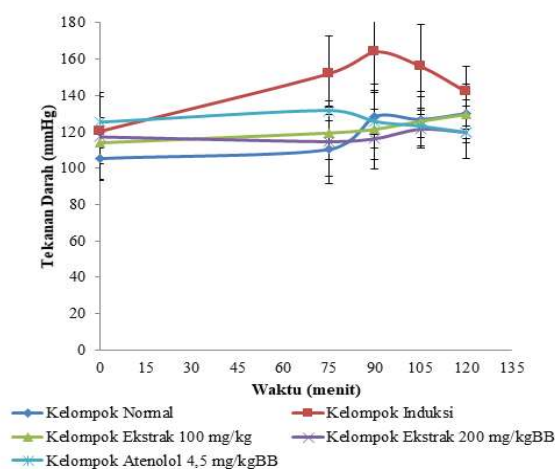
Analisis Statistik. Semua nilai pada studi ini diekspresikan sebagai mean \pm SD. Data dianalisis dengan Paired-Samples T Test dilanjutkan dengan *one-way analysis of variance* (ANOVA). Ketika ditemukan adanya signifikansi variasi antar kelompok, maka uji dilanjutkan dengan LSD (Least Significance Different) untuk membandingkan antar kelompok. Perbedaan dianggap signifikan ketika nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman. Berdasarkan determinasi tanaman yang dilakukan di Pusat Informasi Pengembangan Obat Tradisional (PIPOT) Universitas Surabaya, tanaman yang digunakan dalam penelitian teridentifikasi sebagai *Nauclea subdita* (Korth) Steud.

Uji Aktivitas Penghambat Reseptor- β Adrenergik dengan Adrenalin sebagai Penginduksi. Hasil pengukuran tekanan darah sistolik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Berdasarkan hasil analisis dengan menggunakan *Paired-Samples T Test*, hasil pengukuran tekanan darah sistolik kelompok normal pada menit-0 tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan menit-75 ($p=0,299$) dan berbeda signifikan dengan menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p=0,044$; $p=0,017$; dan $p=0,006$). Hal ini diduga karena tikus sedang dalam fase adaptasi terhadap perlakuan yang diberikan sehingga tekanan darah sistolik sedikit mengalami peningkatan⁽¹⁰⁾.

Kelompok induksi pada menit-0 tidak menunjukkan perbedaan signifikan dengan menit-75 dan menit-120 ($p=0,064$ dan $p=0,079$), sedangkan



Gambar 1. Profil tekanan darah sistolik tikus wistar jantan yang diberi ekstrak taya dibandingkan dengan yang diberi atenolol menggunakan metode *tail cuff*.

menit-0 menunjukkan perbedaan signifikan dengan menit-90 dan menit-105 ($p=0,023$ dan $p=0,047$). Pola ini menunjukkan adanya peningkatan tekanan darah yang mulai ditunjukkan pada menit ke-75 dan puncak kenaikan tekanan darah pada menit ke-90. Hal ini menunjukkan bahwa induksi adrenalin dapat meningkatkan tekanan darah sistolik⁽¹¹⁾. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Rumiya dkk (2016) yang menunjukkan peningkatan tekanan darah paling tinggi pada 30 menit setelah penginduksian adrenalin⁽¹⁴⁾. Tekanan darah sistolik kelompok atenolol tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara menit-0 dengan menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p=0,344$; $p=0,975$; $p=0,708$; dan $p=0,441$).

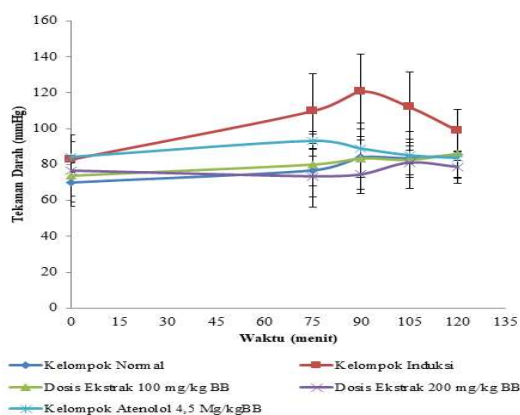
Hal ini menunjukkan bahwa atenolol mampu menurunkan tekanan darah sistolik yang naik akibat induksi adrenalin. Atenolol merupakan salah satu obat anti hipertensi dengan mekanisme menghambat pada reseptor beta adrenergik, sehingga ketika diberi adrenalin tidak terjadi kenaikan tekanan darah karena adrenalin tidak dapat berikatan dengan reseptor beta adrenergik. Hasil analisis dengan menggunakan ANOVA terhadap pengukuran terhadap tekanan darah sistolik menunjukkan bahwa pada menit-0 atau posisi baseline tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok normal, induksi, ekstrak 100 mg/kgBB, ekstrak 200 mg/kgBB, dan atenolol 4,5 mg/kgBB ($p=0,315$). Hal ini menunjukkan bahwa semua tikus berada pada posisi yang sama pada saat sebelum induksi adrenalin.

Pengukuran tekanan darah sistolik pada menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p < 0,05$). Kelompok induksi pada menit-75, menit-90, dan menit-105 menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak 200 mg/kgBB ($p < 0,05$).

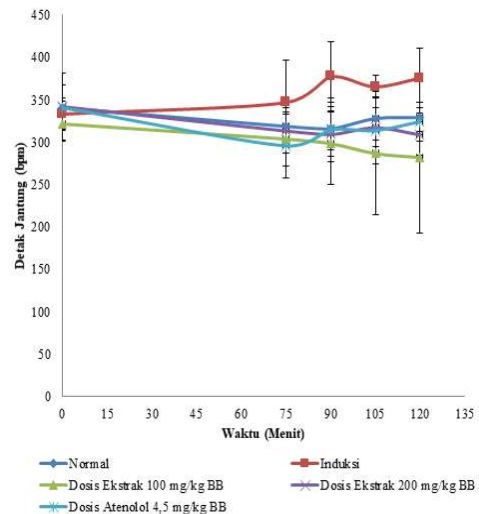
Pada penelitian ini, semua kelompok mendapatkan perlakuan yang sama. Apabila ada kenaikan tekanan darah pada kelompok normal, hal ini tentunya akan terjadi pada semua kelompok. Akan tetapi kenaikan darah yang terjadi pada kelompok induksi berbeda signifikan dengan yang terjadi pada kelompok normal. Sehingga dapat dipastikan bahwa kenaikan tekanan darah yang terjadi pada kelompok induksi merupakan hasil dari ikatan adrenalin dan reseptor beta adrenergic. Kelompok induksi menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB pada pengukuran menit-90 dan menit-105 ($p=0,002$ dan $p=0,002$) dan tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada menit-75 ($p=0,067$). Hal ini menunjukkan bahwa hewan uji pada kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB mengalami stres.

Pada pengukuran tekanan darah sistolik di menit-75, menit-90, dan menit-105, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB berbeda tidak signifikan dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB ($p>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa dengan dosis ekstrak 100 mg/kgBB mampu menurunkan tekanan darah sistolik sampai seperti keadaan normal. Penambahan dosis ekstrak dari dosis ekstrak 100 mg/kgBB menjadi 200 mg/kgBB tidak menunjukkan perbedaan signifikan dalam menurunkan tekanan darah sistolik. Hal ini terlihat pada hasil ANOVA yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan antara pengukuran tekanan darah sistolik kelompok ekstrak dosis 100 mg/kgBB dengan kelompok ekstrak dosis 200 mg/kgBB ($p>0,05$). Pada dosis ekstrak air kulit batang taya 100 mg/kgBB mulai menunjukkan aktivitas dalam menurunkan tekanan darah sistolik sebanding dengan atenolol 4,5 mg/kgBB. Hasil pengukuran tekanan darah sistolik pada menit-120 menunjukkan perbedaan tidak signifikan antar kelompok ($p=0,050$). Hal ini menunjukkan hewan uji yang diinduksi telah kembali pada kondisi normal.

Selain tekanan darah sistolik, pada pengujian dengan menggunakan metode tail cuff parameter lain yang terbaca adalah tekanan darah diastolik. Hasil pengukuran tekanan darah diastolik seperti ditunjukkan pada Gambar 2. Pola grafik hasil pengukuran tekanan darah diastolik memiliki kemiripan dengan pola grafik hasil pengukuran tekanan darah sistolik. Namun keduanya memiliki perbedaan karena data yang diperoleh tidak identik. Tekanan darah sistolik merupakan keadaan ketika ventrikel kiri mengalami kontraksi untuk mengalirkan darah secara sistemik. Hal ini memicu terjadinya kenaikan tajam pada tekanan darah di arteri. Tekanan



Gambar 2. Profil Tekanan Darah Diastolik Tikus Wistar Jantan yang Diberi Ekstrak Taya Dibandingkan dengan yang Diberi Atenolol Menggunakan Metode Tail cuff.



Gambar 3. Profil detak jantung tikus wistar jantan yang diberi ekstrak taya dibandingkan dengan yang diberi atenolol menggunakan metode tail cuff.

darah diastolik merupakan keadaan dimana ventrikel kiri mengalami relaksasi sehingga tekanan darah pada arteri akan mengalami pengurangan sampai mencapai titik terendah⁽¹⁾.

Pengukuran tekanan darah diastolik pada kelompok normal menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antara menit-0 dengan menit-75 ($p=0,330$) dan menunjukkan perbedaan signifikan antara menit-0 dengan menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p=0,038$; $p=0,018$; dan $p=0,007$). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi peningkatan tekanan darah diastolik yang diakibatkan karena tikus mengalami stres⁽¹²⁾. Kelompok induksi pada menit-0 berbeda signifikan dengan menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p=0,048$; $p=0,017$; $p=0,031$; dan $p=0,049$). Hasil ini menunjukkan bahwa induksi adrenalin yang digunakan mampu menaikkan tekanan darah diastolik⁽¹³⁾. Kelompok atenolol pada menit-0 menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p=0,073$; $p=0,373$; $p=0,706$; dan $p=0,882$).

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, pengukuran tekanan darah diastolik di menit-0 pada kelompok normal, kelompok induksi, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p=0,306$). Hasil ini menunjukkan semua hewan uji pada masing-masing kelompok memiliki tekanan darah diastolik normal ketika belum mendapatkan induksi adrenalin.

Pengukuran tekanan darah diastolik antar kelompok pada menit-75, menit-90, dan menit-105 menunjukkan

perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Kelompok induksi menunjukkan perbedaan tekanan darah diastolik yang signifikan dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak 200 mg/kgBB ($p < 0,05$). Kelompok induksi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB pada pengukuran di menit-75 ($p = 0,106$) dan menunjukkan perbedaan signifikan pada menit-90 dan menit-105 ($p = 0,003$ dan $p = 0,003$).

Kelompok ekstrak 100 mg/kgBB tidak memiliki perbedaan signifikan tekanan darah diastolik dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB pada pengukuran di menit-75, menit-90, dan menit-105 ($p > 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air kulit batang taya mampu menurunkan tekanan darah diastolik sampai seperti keadaan normal. Penambahan dosis ekstrak tidak menunjukkan perbedaan signifikan dalam menurunkan tekanan darah diastolik. Dosis ekstrak air kulit batang taya 100 mg/kgBB menunjukkan aktivitas dalam menurunkan tekanan darah diastolik sebanding dengan atenolol 4,5 mg/kgBB. Hasil pengukuran tekanan darah diastolik pada menit-120 menunjukkan perbedaan tidak signifikan antar kelompok ($p = 0,084$).

Hal ini menunjukkan bahwa tikus kembali normal. Parameter lain yang terbaca pada pengukuran dengan menggunakan metode tail cuff adalah detak jantung. Induksi menggunakan adrenalin dapat meningkatkan denyut jantung dan cardiac output, sehingga tekanan darah pun akan meningkat⁽¹⁵⁾. Berdasarkan hasil pengukuran dan seperti yang tersaji pada Gambar 3, menunjukkan detak jantung kelompok normal pada menit-0 tidak berbeda signifikan dengan menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p = 0,317$; $p = 0,187$; $p = 0,427$; dan $p = 0,348$). Pada kelompok induksi, pengukuran detak jantung pada menit-0 menunjukkan perbedaan tidak signifikan dengan pengukuran pada menit-75 ($p = 0,414$) dan menunjukkan perbedaan signifikan dengan pengukuran pada menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p = 0,032$; $p = 0,002$; dan $p = 0,018$). Hal ini menunjukkan penginduksian adrenalin yang merupakan agonis reseptor- β dan merupakan vasokonstriktor yang sangat poten mampu meningkatkan detak jantung⁽⁵⁾. Hasil pengukuran detak jantung pada kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB menunjukkan perbedaan tidak signifikan antara menit-0 dengan menit-75, menit-90, menit-105, dan menit-120 ($p = 0,070$; $p = 0,243$; $p = 0,054$; dan $p = 0,370$). Atenolol menunjukkan aktivitas dalam menurunkan detak jantung⁽¹⁾.

Berdasarkan hasil ANOVA menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan pada penguku-

ran detak jantung antar kelompok uji pada menit-0, menit-75, menit-105, dan menit-120 ($p = 0,665$; $p = 0,264$; $p = 0,077$; dan $p = 0,057$). Pada menit-90 menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar kelompok ($p = 0,027$). Kelompok induksi menunjukkan perbedaan signifikan dengan kelompok normal, kelompok ekstrak 100 mg/kgBB, kelompok ekstrak 200 mg/kgBB, dan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB ($p = 0,018$; $p = 0,003$; $p = 0,010$; dan $p = 0,015$).

Hal ini menunjukkan bahwa induksi adrenalin meningkatkan detak jantung pada hewan uji. Kelompok ekstrak 100 mg/kgBB menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan kelompok atenolol 4,5 mg/kgBB ($p = 0,502$). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air kulit batang taya menunjukkan aktivitas antihipertensi sebanding dengan atenolol dalam menghambat reseptor- β adrenergik. Kelompok ekstrak 100 mg/kgBB juga tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan dengan kelompok ekstrak 200 mg/kgBB ($p = 0,640$). Hal ini menunjukkan bahwa penambahan dosis ekstrak tidak berpengaruh terhadap aktivitasnya.

Aktivitas antihipertensi yang dimiliki oleh ekstrak air kulit batang taya tidak dapat dilepaskan dari kandungan senyawa naucline. Pada penelitian terhadap *Nauclea officinalis* yang mengandung naucline menunjukkan aktivitas sebagai vasorelaksan⁽¹⁶⁾.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil pengujian menunjukkan ekstrak air kulit batang taya memiliki aktivitas menghambat reseptor- β adrenergik. Ekstrak air kulit batang taya dosis 100 mg/kgBB menunjukkan aktivitas yang setara dengan atenolol 4,5 mg/kgBB.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas pendanaan penelitian dari Direktur Jendral Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi dengan nomo rkontrak 023/LPPM-01/DRPM/Multi/ FF/III/2019.

DAFTAR PUSTAKA

1. Alldredge BK, Affairs A, Francisco S, Francisco S, Corelli RL, Francisco S, et al. Applied therapeutics the clinical use of drugs tenth edition. Tenth. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. 291–330.
2. WHO. A global brief of hypertension. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2013.
3. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2014.380(9859):2224–60.
4. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Hasil utama Risetdas tentang prevalensi diabetes mellitus di Indonesia 2018. *Riskesmas*. 2018.8.
5. Katzung BG, Susan B. Masters, Anthony J. Trevor. Basic & clinical pharmacology twelfth edition edited. 12th ed. New York, USA: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2012. 169–92.
6. Frishman WH. Beta-adrenergic receptor blockers in hypertension. *Alive and Well. Prog Cardiovasc Dis*. 2016.59(3):247–52.
7. Tabassum N, Ahmad F. Role of natural herbs in the treatment of hypertension. *Pharmacogn Rev*. 2011.5(9):30.
8. Ruzanna F, Wahab R. Study on methanolic extracts of *Nauclea subdita* (Korth) Steud. Heartwood parts for the total phenolic contents and free radical scavenging activities study on methanolic extracts of *Nauclea subdita* (Korth) steud. Heartwood Parts for the Total Phenol. *J Biol Sci*. 2012.4(5):600–7.
9. Liew SY. Studies on chemical constituents and biological activities of *Nauclea officinalis* and *Nauclea subdita* [thesis]. Malaysia: University Of Malaya;2014.
10. Ayada C, Toru Ü, Korkut Y. The relationship of stress and blood pressure effectors. *Hippokratia*. 2015.19(2):99–108.
11. Cardoso BV, Custódio AH, Boer PA, Gontijo JAR. Effect of intracerebroventricular epinephrine microinjection on blood pressure and urinary sodium handling in gestational protein-restricted male adult rat offspring. *Co Biol*. 2019.8(bio038562):1–11.
12. Mucci N, Giorgi G, Ceratti SDP, Fiz-pérez J, Mucci F, Arcangeli G. Anxiety, stress-related factors, and blood pressure in young adults. *Front Psychol*. 2016.7:1–10.
13. Kimura DC, Nagaoka MR, Borges DR, Kouyoumdjian M, Kimura DC, Kouyoumdjian M. Angiotensin II or epinephrine hemodynamic and metabolic responses in the liver of L-NAME induced hypertension and spontaneous hypertensive rats. *World J Hepatol*. 2017.9(17):781–90.
14. Rumiayati, Hakim AR, Winarti AD & Septia DN. Antihypertensive testing of combination of *Apium graveolans* L., *Orthosiphon stamineus* Benth., and *Morinda citrifolia* L. extract on *Normotensive* and hypertensive sprague dawley rats. *Majalah Obat Tradisional (Traditional Medicine Journal)*. 2016.21(3):149–56.
15. Sukandar EY, Sigit JI, Dewi NP. Uji efek penurunan tekanan darah ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) pada tikus wistar jantan. *Acta Pharm Indones*. 2015.39(1&2):40–4.
16. Ishizuka M, Koga I, Zaima K, Kaneda T, Hirasawa Y, Hadi AHA, et al. Vasorelaxant effects on rat aortic artery by two types of indole alkaloids, naucline and cadamine. *J Nat Med*. 2013.67(2):399–403.

Analisis Perencanaan dan Pengendalian Obat di Rumah Sakit Pluit Tahun 2015

(Analysis of Drug Planning and Control at the Pluit Hospital in 2015)

ENDANG SETIAWATI*, ANNY VICTOR PURBA, WAHYUDI UUN HIDAYAT

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah, Jagakarsa,
Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia.

Diterima: 16 Oktober 2019, Disetujui: 27 Maret 2020

Abstrak: Perencanaan obat di Rumah Sakit Pluit dilakukan dengan menggunakan metode konsumsi dari pemakaian sebelumnya sehingga tidak dapat mengetahui obat apa saja yang harus diprioritaskan dalam perencanaan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran proses perencanaan obat di Rumah Sakit Pluit dengan menggunakan analisa ABC, ABC Indeks Kritis, VEN dan *Reorder Point* (ROP). Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif dan kuantitatif dengan pengambilan data secara retrospektif selama periode Mei-Oktober 2016 di Rumah Sakit Pluit. Hasil analisis ABC berdasarkan nilai investasi dari total item obat kelompok A memiliki persentase 69,90%; kelompok B 20,07% dan kelompok C 10,03%. Hasil analisis ABC berdasarkan pemakaian kelompok A 69,95%; kelompok B 20,04% dan kelompok C 10,01%. Hasil analisa VEN untuk kelompok V 3,24% menyerap investasi 5,15%; kelompok E 60,10% menyerap investasi 76,56% dan kelompok N 36,66% menyerap investasi 18,29%. Analisis perencanaan obat berdasarkan metode ABC dan VEN memiliki nilai investasi, nilai pemakaian dan NIK yang tinggi, sedang dan rendah. Sedangkan analisis pengendalian obat berdasarkan metode *Lead Time*, *Safety Stock* dan *Reorder Point* menjamin ketersediaan obat secara berkesinambungan.

Kata kunci: perencanaan, pengendalian, metode ABC, VEN, *safety stock*, *reorder point*.

Abstract: Drug planning at Pluit Hospital is carried out using a consumption method that is based on previous use. The purpose of this study was to determine the investment value and use of drug supplies based on a combination of consumption methods with ABC, VEN and Reorder Point (ROP) analysis. This research is a qualitative and quantitative descriptive study with retrospective data collection during the period May-October 2016 at Pluit Hospital. ABC analysis results based on the investment value of the total group A drug items have a percentage of 69.90%; group B 20.07% and group C 10.03%. ABC analysis results based on the use of group A 69.95%; group B 20.04% and group C 10.01%. VEN analysis results for group V 3.24% absorbed investment of 5.15%; group E 60.10% absorbed investment 76.56% and group N 36.66% absorbed investment 18.29%. Analysis of drug planning based on ABC and VEN methods has high, medium and low investment values, usage values and NIK. While the analysis of drug control based on the method of Lead Time, Safety stock and Reorder Point guarantees the availability of drugs on an ongoing basis.

Keywords: planning, control, analysis ABC, VEN, safety stock, reorder point.

*Penulis korespondensi
E-mail: endangsetiawati782@gmail.com

PENDAHULUAN

ANALISIS perencanaan dan pengendalian obat di rumah sakit merupakan manajemen logistik yang sangat penting bagi rumah sakit untuk mengelola persediaan logistik salah satunya adalah persediaan obat. Persediaan obat yang terlalu kecil maupun terlalu besar akan membuat rumah sakit mengalami kerugian⁽¹⁾.

Metode ABC indek kritis dapat membantu rumah sakit dalam merencanakan pemakaian obat dengan mempertimbangkan: utilisasi, nilai investasi, kekritisan obat (vital, esensial dan non esensial) dilihat dari hasil penelitian di instalasi farmasi rumah sakit Karya Husada yang dilakukan oleh Susi Suciati dkk⁽²⁾.

Penelitian pada RSUD Haji Surabaya tahun 2013 yaitu terdapat kerugian yang ditanggung oleh RSUD Haji Surabaya sebagai akibat *stockout* obat diperhitungkan dengan hilangnya biaya kesempatan (*opportunity cost*). Hal ini disebabkan karena perencanaan obat di unit logistik instalasi farmasi RSUD Haji Surabaya masih belum dilaksanakan secara efektif⁽³⁾.

Masalah pengelolaan obat publik di instalasi farmasi Kabupaten/Kota yang belum efektif dan efisien disebabkan oleh perencanaan belum menerapkan konsep obat esensial dan belum mencerminkan kebutuhan ril obat, realisasi pengadaan yang tidak mencapai 100% menyebabkan tingkat ketersediaan obat terganggu dan terjadi kekosongan obat dilihat dari penelitian yang dilakukan oleh Yohanes wahyu Waluyo dkk⁽⁴⁾.

Berdasarkan penelitian dari beberapa puskesmas di Surabaya, penggunaan metode kombinasi konsumsi dan epidemiologi sering menyebabkan terjadinya kekosongan obat⁽⁵⁾. Masalah yang ditemukan di instalasi farmasi Dinas Kesehatan Kota Semarang adalah metode perencanaan yang dilakukan belum sesuai kebutuhan obat yang sebenarnya, sehingga biasa terjadi kekosongan obat⁽⁶⁾.

Berdasarkan penelitian pada Rumah Sakit Islam Yarsi Pontianak disimpulkan bahwa sistem yang ada pada instalasi farmasi belum cukup baik dikarenakan kurangnya sistem yang ada. Hal ini akan menyebabkan terjadinya perangkap tugas, tidak adanya batas wewenang, tidak adanya peraturan untuk ditaati dan tidak efektifnya kinerja para pegawai⁽⁷⁾. Dibutuhkan juga pelatihan dan pendidikan staf untuk memperbaiki tata kelola pengelolaan obat^(4,8,9).

Perencanaan obat di instalasi farmasi Rumah Sakit Pluit selama ini menggunakan metode konsumsi dari pemakaian obat di farmasi rawat inap dan farmasi rawat jalan yang termasuk dalam formularium Rumah Sakit Pluit, kemudian diteruskan dengan proses pengadaan yang dilakukan tiga kali dalam seminggu

pada hari senin, rabu dan jum'at.

Metode konsumsi merupakan perhitungan yang didasarkan pada data pemakaian perbekalan farmasi periode yang lalu, dengan berbagai penyesuaian dan koreksi⁽¹⁰⁾. Metode ini dirasa kurang akurat bila tidak dikombinasi dengan metode lain, karena tidak dapat memberikan data mengenai nilai investasi. Penggunaan metode konsumsi di Rumah Sakit Pluit hanya berdasarkan dari resep obat yang terpakai, sehingga bila persediaan di gudang farmasi sudah menipis baru dilakukan pengadaan.

Pelayanan farmasi merupakan *revenue center* utama dalam rumah sakit. Pemasukan rumah sakit sebesar 50% dari keseluruhan berasal dari pengelolaan perbekalan farmasi^(2,3).

Dalam membuat perencanaan sediaan farmasi, yang perlu diperhatikan adalah pola penyakit, kemampuan masyarakat dan budaya masyarakat⁽¹¹⁾. Dilihat dari data perencanaan obat tahun 2015 ada sekitar 7,4 % obat yang dipesan tetapi tidak datang, dikarenakan kosong distributor. Hal-hal seperti inilah yang tidak dapat diprediksi kapan kita harus memesan obat kembali sesuai kebutuhan. Oleh karena itu diperlukan suatu manajemen logistik seperti perencanaan yang efisien dan efektif. Untuk itu perlu dilakukan penelitian agar diketahui seperti apa proses perencanaan dan pengendalian obat di RS Pluit.

Perencanaan yang telah dilakukan perlu dianalisis untuk melihat efisiensi perencanaan, dalam hal ini menggunakan metode ABC, metode VEN, dan juga menggunakan kombinasi ABC dan VEN. Metode ABC dipilih merupakan evaluasi dari sisi ekonomis serta menggunakan metode ABC indeks kritis untuk menilai tingkat kekritisan suatu obat dalam persediaan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui proses perencanaan obat di Rumah Sakit Pluit dan menganalisis kebutuhan obat berdasarkan analisa ABC, ABC Indeks Kritis, VEN dan *Reorder Point*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Daftar obat di Rumah Sakit Pluit, daftar harga obat periode 2015, jumlah pemakaian obat periode 2015.

METODE. Metode Penelitian Deskriptif Kualitatif dan Kuantitatif. Penelitian ini menggunakan metode deskriptif kualitatif dan kuantitatif dengan mengolah data ke dalam rumus. Data yang dikumpulkan berupa data primer dan sekunder.

Pengukuran variabel yang berasal dari data primer diperoleh melalui dari wawancara mendalam dengan informan yaitu dengan Kepala IFRS, Kepala bagian keuangan dan staf instalasi farmasi dengan

menggunakan pedoman wawancara mendalam, serta diperoleh melalui pengisian daftar cek obat oleh dokter umum dan dokter spesialis yang diminta memberi tanda check list (V,E,N) untuk mengetahui obat mana saja yang termasuk dalam obat vital, esensial dan non esensial. Sedangkan data sekunder diperoleh melalui telaah dokumen data nama-nama obat, harga obat, jumlah pemakaian obat dan *Lead Time*.

Dari data tersebut dilakukan pengelompokan berdasarkan nilai investasi dan pemakaian dalam analisis ABC. Selanjutnya ditentukan titik pesan kembali atau *Reorder Point* (ROP), analisis kebutuhan obat secara *Lead Time* dan persediaan pengaman (*Safety Stock*). Analisis data dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut (2,10,12,13,14,15,16,17):

1. Analisis ABC: A. Menghitung Nilai Investasi.

(1) Menghitung total investasi setiap jenis obat. (2) Diurutkan dari nilai investasi terbesar sampai yang terkecil. (3) Hitung akumulasi persennya. (4) Obat kelompok A dengan nilai investasi 70% dari total investasi obat. (5) Obat kelompok B dengan nilai investasi 20% dari total investasi obat. (6) Obat kelompok C dengan nilai investasi 10% dari total investasi obat.

B. Menghitung Nilai Pemakaian. (1) Menghitung total pemakaian obat. (2) Data pemakaian obat dikelompokkan berdasarkan jumlah pemakaian. Diurutkan dari pemakaian terbesar sampai yang terkecil. (3) Kelompok A dengan pemakaian 70% dari keseluruhan pemakaian obat. (4) Kelompok B dengan pemakaian 20% dari keseluruhan pemakaian obat. (5) Kelompok C dengan pemakaian 10% dari keseluruhan pemakaian obat.

C. Menentukan Nilai Kritis Obat. (1) Menyusun Kriteria nilai kritis obat. (2) Membagikan kuesioner berupa daftar obat kepada dokter untuk mendapatkan nilai kritis obat, dengan kriteria yang telah ditentukan.

Kriteria Nilai Kritis Obat. (1) Kelompok V atau kelompok obat vital adalah obat yang sangat esensial atau vital untuk memperpanjang hidup, untuk mengatasi penyakit penyebab kematian ataupun untuk pelayanan pokok kesehatan. Kelompok ini tidak boleh terjadi kekosongan.

(2) Kelompok E atau kelompok obat esensial adalah obat yang bekerja kausal, yaitu obat yang bekerja pada sumber penyebab penyakit, logistik farmasi yang banyak digunakan dalam pengobatan penyakit terbanyak. Kekosongan obat kelompok ini dapat ditoleransi kurang dari 48 jam.

(3) Kelompok N atau kelompok obat nonesensial adalah obat penunjang agar tindakan atau pengobatan menjadi lebih baik, untuk kenyamanan atau untuk mengatasi keluhan. Kekosongan obat kelompok ini dapat ditolerir lebih dari 48 jam.

D. Menentukan Nilai Indeks Kritis Obat. Untuk mendapatkan NIK obat menggunakan perhitungan sebagai berikut :

NIK = Nilai Pakai + Nilai Investasi + (2 x Nilai Kritis

E. Obat Kelompok ABC. Obat dikelompokkan kedalam kelompok ABC dengan kriteria sebagai berikut: (1) Kelompok A dengan NIK 9.5-12. (2) Kelompok B dengan NIK 6.5-9.4. (3) Kelompok C dengan NIK 4-6.4

2. ROP (Reorder Point).

Rumus *Reorder Point* = (LT x AU) + SS

Keterangan: LT (*Lead Time*), AU (*Average Usage*) dan SS (*Safety Stock*).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sistem pengelolaan obat di RS Pluit. Dari Hasil wawancara tentang perencanaan dengan kepala instalasi farmasi Rumah Sakit Pluit dengan menggunakan metode konsumsi dari pemakaian sebelumnya dilakukan setiap seminggu tiga kali yaitu hari Senin, Rabu dan Jumat. Dalam menentukan jumlah kebutuhan setiap obat hanya berdasarkan perkiraan dan pengalaman saja.

Perencanaan anggaran untuk kebutuhan obat untuk RS tidak pernah dilakukan secara tertulis, sehingga tidak diketahui berapa anggaran belanja setiap bulannya. Perencanaan di RS Pluit hanya berdasarkan dari resep yang masuk ke farmasi rawat jalan dan rawat inap dan yang termasuk dalam formularium.

Metode konsumsi merupakan metode yang sangat dikenal dan banyak digunakan di lingkungan RS. Perencanaan adalah langkah pertama dalam pengelolaan obat yang harus dibuat secara tertulis. Dengan dilakukannya perencanaan secara tertulis akan memudahkan koordinasi antara bagian yang menyediakan anggaran dengan pemakai obat, sehingga pemanfaatan dana akan lebih maksimal⁽¹⁷⁾.

Wawancara dengan kepala instalasi farmasi bahwa dalam melakukan perencanaan "Tidak Ada Tim Khusus Untuk Perencanaan" hanya bagian farmasi. Dalam melakukan perencanaan obat seharusnya ada pihak lain selain farmasi, untuk menghindari stok kosong atau berlebih, karena tidak adanya koordinasi antara dokter pemakai dengan penyedia kebutuhan obat.

Dalam penelitian ini peneliti mencoba menghitung perencanaan dengan metode konsumsi tetapi menggunakan rumus yaitu untuk pemakaian satu tahun dengan nilai rata-rata dikalikan 12 dan ditambah *buffer* stok sebanyak 20% ditambah *lead time*, *lead time* nya 2 hari dari hasil wawancara dengan kepala instalasi farmasi RS kemudian dikurangi sisa stok.

Dari hasil penelitian perhitungan perencanaan

dengan metode konsumsi dihasilkan terdapat 202 item obat yang tidak perlu dilakukan pemesanan karena stok masih tersedia dan ada 55 item obat yang selama satu tahun tidak ada pengeluaran sama sekali sehingga tidak perlu dilakukan pemesanan.

Pengadaan merupakan suatu proses untuk mendapatkan sediaan farmasi yang bermutu baik dan pengantaran yang tepat waktu. Pengadaan di RS Pluit dilakukan berdasarkan dari perencanaan yang dibuat. Penyimpanan di RS Pluit menggunakan metode *First In First Out* (FIFO) dan *First Expired First Out* (FEFO). Berdasarkan dari hasil wawancara dengan kepala instalasi farmasi RS bahwa setiap item obat di gudang farmasi dilengkapi dengan kartu stok untuk mencatat pemasukan dan pengeluaran obat.

Rumah Sakit Pluit mempunyai sistem distribusi yang dapat menjamin terlaksananya pengawasan dan pengendalian obat sampai ke pasien. Pelayanan obat untuk pasien rawat jalan di RS Pluit dilakukan berdasarkan resep individu, sedangkan untuk pasien rawat inap berdasarkan kombinasi yaitu sistem *floorstock* untuk obat-obat *emergency* dan sistem

unit dose. Untuk pasien rawat inap penyerahan obat pasien pulang sudah dilakukan oleh apoteker, tetapi pada saat apotekernya tidak ada ditempat dilakukan pendelegasian oleh asisten apoteker.

Analisis ABC. Analisis ABC adalah salah satu analisis yang berguna dalam pengelolaan obat karena dapat menentukan prioritas pemesanan berdasarkan investasi dan pemakaian obat⁽¹⁴⁾. Analisis ABC investasi bertujuan mengelompokkan obat berdasarkan nilai investasi yang terbagi menjadi investasi tinggi, sedang dan rendah.

Berdasarkan analisis ABC investasi pada Tabel 1 menunjukkan obat dengan nilai investasi tinggi atau kelompok A diantaranya adalah obat golongan antibiotik, albumin, PPI, antipiretik. Nilai investasi sedang atau Kelompok B diantaranya adalah obat antivertigo, jantung, antidiabetes, antihipertensi, antijamur. Sedangkan nilai investasi rendah atau kelompok C sebagian obat generik, suplement, antihistamin, obat ARV. Melihat dari isi tabel hasilnya sesuai dengan literatur^(10,12,13,14,15,18).

Tabel 1. Hasil analisis ABC investasi.

Kelompok	Jenis		Investasi	
	Jumlah item	%	Jumlah (Rp)	%
A	212	11.45	25,527,522,248	69.90
B	331	17.87	7,328,052,976	20.07
C	1309	70.68	3,662,198,206	10.03
Total	1852	100.00	36,517,773,431	100.00

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

Rumah sakit dapat mengawasi nilai investasi obat pada kelompok A yaitu dengan prioritas utama untuk pengadaan. Evaluasi terhadap kelompok A juga diperlukan, agar nilai investasi tidak melonjak secara drastis. Namun pengawasan juga diperlukan untuk kelompok B dan C karena walaupun nilai investasinya rendah tetapi pemakaiannya tinggi dan termasuk obat vital yang harus disediakan. Sebagai contoh obat pada Tabel 2.

Pengelompokkan obat berdasarkan nilai pemakaian diperlukan untuk mengetahui pemakaian tertinggi, sedang dan rendah ditunjukkan oleh Tabel 3. Kelompok A terdiri dari 222 obat diantaranya yaitu golongan obat ARV, antipiretik, PPI, obat jantung, antidiabetes, antihipertensi. Pemakaian sedang atau kelompok B terdiri dari 310 obat diantaranya yaitu

golongan antibiotik, pengencer dahak, suplement, obat TB, antijamur. Pemakaian rendah atau kelompok C terdiri dari 1320 diantaranya yaitu golongan obat kulit berupa cream, asam folat, narkotik, albumin, KB, asma.

Hasil tersebut menunjukkan kesesuaian dengan teori yang menyatakan bahwa analisa ABC pemakaian mengelompokkan item obat berdasarkan nilai pemakaian tertinggi, yaitu sebagai berikut³ :

- Kelompok A dengan pemakaian 70% dari keseluruhan pemakaian obat.
- Kelompok B dengan pemakaian 20% dari keseluruhan pemakaian obat.
- Kelompok C dengan pemakaian 10% dari keseluruhan pemakaian obat.

Obat-obatan yang memiliki nilai pemakaian

tertinggi berada pada kelompok A, sehingga untuk mencegah terjadinya kekosongan obat karena pemakaian yang sangat tinggi setiap bulannya, maka Rumah Sakit Pluit dapat melakukan pengawasan terhadap obat-obatan kelompok A nilai pemakaian. Namun rumah sakit tidak boleh mengabaikan obat-

obatan yang termasuk dalam kelompok B dan C, karena ada obat-obatan yang termasuk vital tetapi nilai pemakaian sedikit, seperti pada Tabel 4. Ketersediaan obat vital harus diutamakan dengan pengendalian yang baik.

Tabel 2. Daftar contoh obat kategori A, B dan C analisis ABC investasi.

No	Nama obat	Jumlah	Harga satuan (Rp)	Total harga (Rp)	Kelas
1	Merosan 1 g inj	1571	475525	747049775	A
2	Tripenem 1 gr inj.	1661	440000	730840000	A
3	Tricefin 1gr inj. St.	3774	175000	660450000	A
4	Broadced 1 gr inj.	3121	187000	583627000	A
5	Meropenem 1 g inj	2809	200000	561800000	A
6	Aminofusin hepar infus 500 ml	178	177500	31595000	B
7	Betaserc 24 mg tablet	3817	8140	31070380	B
8	Cordarone inj. St.	1015	30597.5	31056462.5	B
9	Aclasta 5mg/100ml inj	7	4422600	30958200	B
10	Zypraz 1 mg tablet	8670	3500	30345000	B
11	Ascardia 80 mg tablet	4210	850	3578500	C
12	Thyrax 0,1 mg tablet	3999	1907	7624773	C
13	Cedocard 5 mg tablet	5226	1033	5400200	C
14	Aspilet 80 mg tablet	1168	530	619040	C
15	Captopril 25 mg tablet	11020	125	1380035	C

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

Tabel 3. Hasil analisis ABC Pemakaian.

Kelompok	Jenis		Pemakaian	
	Jumlah Item	%	Jumlah	%
A	222	11.99	1969817	69.95
B	310	16.74	564266	20.04
C	1320	71.27	281765	10.01
Total	1852	100.00	2815848	100.00

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

Tabel 4. Daftar contoh obat kategori A, B dan C analisis ABC pemakaian.

No	Nama Obat	Jumlah	Kelas
1	Duviral (progam)150/300 mg tab	113111	A
2	Neviral (progam)200 mg kap	99049	A
3	Hiviral (progam)150 mg tab	83344	A
4	Aluvia (progam) 200/50 mg tab	47176	A
5	Vometa ft 10mg tablet	44411	A
6	Broadced 1 gr inj.	3121	B
7	Januvia 50 mg tablet	3115	B
8	Kcl 7,46% 25 ml st.	3069	B
9	Norvask 5mg tablet st.	3058	B
10	Starcef 100 mg cap.	3043	B
11	METHYCOBAL 500 ug INJ	851	C
12	Angioten 50mg tablet	850	C
13	Bestalin tablet st.	846	C
14	Diovan 80 capsul	846	C
15	Folavit 1mg tablet	846	C

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

Hasil Analisis VEN. Berdasarkan hasil analisa VEN pada Tabel 5 menunjukkan gambaran kelompok V hanya 60 item obat yang terdiri dari golongan cairan dasar, obat kolesterol, antihipertensi, jantung, obat ARV, obat *life saving*. Kelompok E terdapat 1113 item obat diantaranya yaitu golongan antivirus, golongan psikotropika, Narkotik, obat batuk, anti nyeri, antibiotik, antivertigo, antiemetik, narkotik, asam folat, obat TB, albumin, PPI. Kelompok N

terdapat 679 item obat diantaranya yaitu terdiri dari suplemen, obat kulit baik tablet maupun cream, vitamin, antivirus, obat mata.

Gambaran dari analisa VEN menunjukkan kelompok V yaitu obat-obatan yang sangat esensial (vital). Kelompok E yaitu obat esensial. Kelompok N yaitu obat non esensial dilihat dari hasilnya sesuai dengan literatur^(10,13,16,19,20).

Tabel 5. Hasil analisis VEN.

Kelompok	Jenis		Investasi	
	Jumlah item	%	Jumlah (Rp)	%
V	60	3.24	1,882,463,205	5.15
E	1113	60.10	27,957,313,822	76.56
N	679	36.66	6,677,996,404	18.29
Total	1852	100.00	36,517,773,431	100.00

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

Hasil Analisis ABC Indeks Kritis. Analisis ABC indeks kritis digunakan untuk meningkatkan efisiensi penggunaan dana dengan mengelompokkan obat, terutama obat-obat yang termasuk kategori vital. Berdasarkan pada Tabel 6, nilai indeks kritis kelompok A dengan NIK 9.5-12 terdapat 76 item obat atau 4.10% dari total obat secara keseluruhan dengan investasi sebesar 19.73% dari total investasi. Kelompok B dengan NIK 6.5-9.4 terdapat 559 item obat atau 30.18% dari total obat secara keseluruhan dengan investasi sebesar 65.54% dari total investasi. Kelompok C dengan NIK 4-6.4 terdapat 1217 item obat atau 65.17 % dari total obat secara keseluruhan

dengan investasi sebesar 14.74% dari total investasi.

ROP (Reorder Point). Penentuan titik ROP merupakan keadaan dimana harus memesan kembali kebutuhan obat⁽²¹⁾, sangat membantu dalam menjaga ketersediaan obat sehingga dapat memperkecil kekurangan ataupun kelebihan obat. Dari hasil penelitian Obat duviral yang paling tinggi safety stock nya yaitu sebesar 22.992 tablet untuk perbulan, *Lead Time* nya jg paling tinggi sebesar 628 tablet dari hasil wawancara dengan kepala instalasi farmasi RS *Lead Time* nya 2 hari dan ROP nya jg paling tinggi untuk titik pemesanan kembali yaitu ketika sisa stok 23.620 tablet.

Tabel 6. Hasil nilai indeks kritis.

Kelompok	Indeks kritis		Jumlah investasi	
	Jumlah item	%	(Rp)	%
A	76	4.10	7,203,645,473	19.73
B	559	30.18	23,933,229,090	65.54
C	1217	65.17	5,380,898,867	14.74
Total	1852	100.00	36,517,773,431	100.00

Sumber data :Data yang telah diolah, 2015

SIMPULAN

Hal-hal yang perlu dipertimbangkan dalam perencanaan dan pengendalian obat di Rumah Sakit yaitu anggaran, pemakaian periode sebelumnya, stok akhir, besar kecilnya gudang, *lead time*, *safety stock*, pola penyakit, penetapan kebutuhan obat dengan menggunakan analisa ABC, ABC indeks kritis, VEN, ROP. Penggunaan analisa ABC, ABC indeks kritis, VEN, ROP secara efektif dapat membantu Rumah Sakit dalam perencanaan dan pengendalian obat dengan mempertimbangkan nilai pemakaian, nilai investasi, penggolongan obat berdasarkan vital, esensial dan non esensial sehingga mengetahui kapan waktu yang tepat dalam pemesanan obat.

DAFTAR PUSTAKA

- Verawaty DM, Damayanti DD, Santosa B. Perencanaan Kebijakan Persediaan Obat dengan Menggunakan Metode Probabilitas Continous Review (s,S) System pada Bagian Instalasi Farmasi Rumah Sakit AMC. Karya Ilmiah. Bandung : Universitas Telkom Teknik Industri. 2015.
- Suciati S, Adisasmito WBB. Analisis Perencanaan Obat Berdasarkan ABC Indeks Kritis di Instalasi Farmasi. Jurnal Manajemen Pelayanan Kesehatan. 1 Maret 2006; 9: 19-21, 25.
- Mellen RC, Pudjirahardjo WD. Factor Penyebab dan Kerugian Akibat *Stockout* dan *Stagnant* obat di Unit Logistic RSU Haji Surabaya. Jurnal Administrasi Kesehatan Indonesia. Jan-Mar 2013; 1(1): 99, 100.
- Waluyo YW, Athiyah U, Rochmah TN. Analisis Faktor yang Mempengaruhi Pengelolaan Obat Publik di Instalasi Farmasi Kabupaten (studi di Papua Wilayah Selatan). Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. April 2015; 13(1): 101.
- Athijah U, Zairina E, Sukorini AI, Rosita EM, Putri AP. Perencanaan dan Pengadaan Obat di Puskesmas Surabaya Timur dan Selatan. Jurnal Farmasi Indonesia. 1 Jan 2010; 5(1): 16,22,23.
- Pratiwi F, Dwiprahasto I, Budiarti E. Evaluasi Perencanaan dan Pengadaan Obat di Instalasi Farmasi Dinas Kesehatan Kota Semarang. Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi. Des 2011; 1(4): 237-238.
- Permana IS. Analisis Sistem dan Prosedur Pengadaan Obat-obatan pada Rumah Sakit Islam Yarsi Pontianak (Artikel Penelitian). Pontianak: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Tanjungpura; 2013. (abstrak)
- Masirri H, Suryawati S, Munawaroh S. Upaya Perbaikan Perencanaan dan Distribusi Obat Puskesmas

- Melalui Monitoring *Training Planning* di Kabupaten Kolaka. JMPK. 3 Sept 2004; 07(03): 126.
9. Azis S, Herman MJ, Mun'im A. Kemampuan Petugas Menggunakan Pedoman Evaluasi Pengelolaan dan Pembiayaan Obat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. Agust 2005; 2(2): 72
 10. Kementrian Kesehatan RI bekerjasama dengan Japan Internasional Cooperation Agency (JICA). Pedoman Pengelolaan Perbekalan Farmasi di Rumah Sakit. Jakarta: Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan; 2010
 11. MENKES No. 1027 tahun 2006 tentang Standar Pelayanan Kefarmasian di Apotek dapat dilihat di www.depkes.go.id
 12. Devnani M, Gupta AK, Nigah R. ABC and VED Analysis of the Pharmacy Store of a Tertiary Care Teaching, research and referral healthcare institute of India. *J Young Pharm*. 2010; 2(2): 201,202.
 13. Kementrian Kesehatan RI bekerjasama dengan Japan Internasional Cooperation Agency (JICA). Materi Pelatihan Manajemen Kefarmasian di Instalasi Farmasi Kabupaten/Kota. Jakarta: Direktorat Bina Obat Publik dan Perbekalan Kesehatan dan Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan; 2010.
 14. Hadiani AM. Klasifikasi Obat Gawat Darurat Menggunakan Analisis ABC-VED di Instalasi Farmasi RSUD Dr Moewardi Surakarta. *Jurnal Teknik Waktu*. Juli 2011;9(2): 66.
 15. Singh S, Gupta AK, Latika, Devnani M. ABC and VED Analysis of the Pharmacy Store of a Tertiary Care, Academic Institute of the Northern India to identify the categories of drugs needing strict management control. *JYP*. Apr-Jun 2015; 7(2): 77.
 16. Management Sciences for Health and World Health Organization. 2007. Drug and therapeutics committee training course. Submitted to the U.S. Agency for international development by the rational pharmaceutical management plus program. Arlington, VA : Management Sciences for Health.
 17. Maimun A. Perencanaan Obat Antibiotic Berdasarkan Kombinasi Metode Konsumsi dengan Analisis ABC dan *Reorder Point* terhadap Nilai Persediaan dan *Turn Over Ratio* di Instalasi Farmasi RS Darul Istiqomah Kaliwungu Kendal (Tesis). Semarang : Universitas Diponegoro Semarang. 2008.
 18. Kumar MS, Chakravarty BA. ABC-VED Analysis of Expendable Medical Stores at a Tertiary Care Hospital. *Medical Journal Armed Forces India*. 2015; 71.
 19. Titi YN. Rancang Bangun Sistem Pendukung Keputusan Pemilihan Supplier Optimal pada Apotek Antara dengan Metode ABC-VEN dan *Analytical Hierarchy Procces*. *Jurnal TIN Universitas Tanjungpura*; 1(2).
 20. Kritchanchai D, Meesamut W. Developing Inventory Management in Hospital. *IJSCM*. June 2015; 4(2), h 12,13.
 21. Wijaya A, Arifin M, Soebijono T. Sistem Informasi Perencanaan Persediaan Barang. *JSIKA*. 2013(2): 15,16.

Education Effectiveness of Booklet Media in Quality of Life of Diabetes Mellitus Type 2 Outpatients in Anwar Medika Hospital

(Efektivitas Edukasi Media *Booklet* terhadap Kualitas Hidup Pasien Diabetes Mellitus Tipe 2 Rawat Jalan di Rumah Sakit Anwar Medika)

KHURIN IN WAHYUNI^{1,2*}, ANTONIUS ADJI PRAYITNO SETIADI¹, YOSI IRAWATI WIBOWO¹

¹Faculty Pharmacy, University Surabaya

²STIKES Anwar Medika Hospital

Submitted: 21 February 2019, Accepted: 27 April 2020

Abstract: DM management is expected to improve the quality of life of patients because the quality of life is the final result of each medical intervention; therefore, it becomes a standard of every successful therapy. One of the improvements in quality of life can be done through education. In providing education, booklet method can be an effective way to deliver information about the activities problem. This study used one-group pre-test post-test design. This study aims to determine the quality of life before and after giving education to outpatients in Anwar Medika Hospital from November 2017 to January 2018 with sample of 109 patients. The measurement of quality of life improvement was measured by the Diabetes Quality of Life (DQOL) score which has 4 domains: satisfaction domain, the impact of DM concerns due to DM and physical, psychological and social concerns. Quantitative analysis carried out by the Wilcoxon signed rank test and showed that there are differences in quality of life with significance of 0.000 ($p < 0.005$) from each domain. Therefore, it can be concluded that, education could impact an important role on improving quality of life.

Keywords: Education, booklet, quality of life.

Abstrak: Penatalaksanaan DM diharapkan dapat meningkatkan kualitas hidup pasien karena kualitas hidup merupakan hasil akhir dari setiap intervensi sehingga menjadi tolak ukur keberhasilan terapi. Salah satu peningkatan kualitas hidup dapat melalui pemberian edukasi. Dalam pemberian edukasi, metode *booklet* dapat membantu penyampaian informasi terhadap permasalahan. Pada penelitian ini menggunakan *one-group pre-test post-test design*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas hidup sebelum dan sesudah pemberian edukasi pada pasien rawat jalan RS Anwar Medika dari November 2017-Januari 2018 dengan sampel 109 pasien. Pengukuran peningkatan skor kualitas hidup diukur dengan skor Diabetes *Quality of Life* (DQOL) yang memiliki 4 domain yaitu domain kepuasan, dampak DM, kekhawatiran karena DM dan kekhawatiran fisik, psikologi dan sosial. Analisis kuantitatif dilakukan dengan menggunakan uji Wilcoxon *signed rank* yang menunjukkan terdapat perbedaan nilai kualitas hidup total dengan signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,005$) dari masing-masing domain sehingga dalam hal ini edukasi dapat berperan penting dalam peningkatan kualitas hidup.

Kata kunci: Edukasi, *booklet*, kualitas hidup

*Correspondence author
E-mail: khurinain87@gmail.com

INTRODUCTION

DIABETES mellitus (DM) is a group of metabolic diseases characterized by hyperglycemia due to decreased insulin secretion, insulin action, or both⁽¹⁾. WHO predicts an increase in diabetes sufferers by 2-3 times in Indonesia, which is 8.4 million sufferers in 2000 to 21.3 million in 2030. This is in line with the opinion of the International Diabetes Federation (IDF) that predicts an increase in DM patients in Indonesia in 2035 to reach 14.1 million⁽²⁾.

Based on the 2012 Hospital's annual report in East Java, the second highest number cases of outpatients in government public hospitals type B and C are diabetes type 2⁽³⁾. Generally, diabetes mellitus type 2 occurs when lifestyle patterns and behavior have been formed. Handling people who suffers from diabetes type 2 requires active participation from patients, families, and the community. Healthcare team accompanies every patient in their progress of healthy behavioral life changes. In order to achieve successful behavior change, comprehensive education and efforts to increase motivation are needed. Poor management DM can decrease the quality of life. Therefore, education needs to be given to improve patient self-management. Education also can help to improve the quality of life within patient mental health by reducing anxiety and depression⁽⁴⁾.

Diabetes related education has been an important component of diabetes management since 1930. Education for patients with diabetes type 2 aims to regulate glycemic control, prevent microvascular and macrovascular complications and improve the quality of life by influencing knowledge, attitudes, behavior to be healthy⁽⁵⁾. On the treatment process of outpatient with time limitation it is necessary to have media to assist the implementation of education such as booklets. Educational material of early level in booklets can be DM pathophysiology, blood sugar control, pharmacological interventions, non-pharmacology, and management of hypoglycemia.

A study conducted by Faria *et al.* (2012) stated that the quality of life of people with diabetes mellitus before and after given an education showed significant results ($p < 0.005$). According to Rubin and Peyrot⁽⁶⁾, the quality of life is a health result which is important for life, represents the ultimate goal of all health interventions so it is important to conduct research related to the effectiveness of education in the effort of changing the quality of life for patients with diabetes type 2 in Anwar Medika Hospital.

MATERIALS AND METHODS

METHOD. This research uses one-group pre-test post-test design. The research was conducted at Anwar Medika General Hospital, Krian Sidoarjo.

Research Instruments. The quality of life research instruments used Diabetes Quality of Life (DQOL) questionnaire that has been validated and reliable. The validation of questionnaire related to it language and how accurate it will able to be delivered to people is necessary and it validated by some expert opinion, expert examined the content of questionnaire, and they checked and decided whether the questionnaire meet the domain and easy to understand or not. After the questionnaire being approved, researcher done the construct validity toward 20 patients in Anwar Medika Hospital then the data being processed used SPSS Program.

The question consider as valid if they have probability value of [sig. (2-tailed)] < significant value (α) 0.05 and it correlation can be seen by *Pearson correlation* while questionnaire consider as reliable if *Croanbach's Alpha* > 0.7. Validity test produced 30 questions valid with the r value > 0.444 and reliability 0.967. Thus, this questionnaire has 30 questions with positive and negative questions. DQOL has 4 domains, namely satisfaction; impact of DM; worries about DM; concerns about physical, psychological, and social. The questionnaire was modified by Tyas from Munoz and Thiagaraj. Answers uses a Likert scale where positive questions on satisfaction, scale: 4 = very satisfied; 3 = satisfied; 2 = not satisfied; 1 = very dissatisfied. For positive questions about the scale's impact: 1 = never; 2 = rare; 3 = often; 4 = at any time. Meanwhile for negative questions has a score, namely: 4 = never; 3 = rare; 2 = often; 1 = at any time. The validation results show $r > 0.444$ with a reliability of 0.967 in 20 patients. Category data from the quality of life questionnaires are low, medium, and high ranges, by searching for mean values and standard deviations (SD) then analyzed by descriptive method.

Sample. Sampling was conducted by consecutive sampling method; in this method each patient who meets the criteria was included into the study until a certain period of time, therefore the numbers of required patients are fulfilled. The number of samples in this study is 109 obtained by the Slovin formula because the population in this study was known. Inclusion criteria, consist of diabetes mellitus type 2 patients from November 2017 to January 2018 with an age range of 18-60 years, able to communicate, with or

without complications. And for exclusion criteria were patients with diabetes mellitus type 1, who has other disease that burdened diabetes type 2, pediatric and geriatric diabetes were unable to communicate. Drop out criteria is patients who were loss contact or died.

Procedure. On the first meeting, patient was given an information concern and DQOL pre-test questionnaires. On the second, third, and fourth meeting, patient obtain an education for 15 minutes personally by researcher while they are waiting their turn to take the medicine in outpatient pharmaceutical installation Anwar Medika Hospital with booklet that has been examined by *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*⁽⁷⁾. However, those booklet has been modified based on the first educational material from *Consensus on the Management and Prevention of Diabetes Mellitus Type 2 in Indonesia*⁽¹⁾.

The meeting of education done during their weekly check up. The educated material has different content every meeting. On second meets, the material regarding the education of lab result and something related to the diagnosis of DM type 2, DM pathophysiology, DM medicine knowledge, and its implementation when hypoglycemia happen. On the third meeting, the material provided was regarding therapy of non pharmacology and the fourth meeting, the material provided was regarding complication. Post-test done in fifth week, the patient have their DQOL in outpatient pharmaceutical installation of Anwar Medika Hospital.

RESULT AND DISCUSSION

Demography. Based on Table 1, it was found that most people with DM were at the age above 45 years old. This is consistent with the study of Smeltzer *et al.*, who states that the majority of patients with diabetes type 2 mostly experienced by people around 40 years old and over. Because at the age of 40 years old and above, the insulin retention in diabetes type 2 will increase beside their history of heredity and obesity⁽⁷⁾. According to Gratia (2013) there is a relationship between age and incidence of DM type 2 which is, at the age of > 45 years old has higher risk of developing diabetes type 2 than the age under 45 years old. The older a person, the more physiological function of the organs will decrease, one of them is the endocrine system, decreased function of pancreatic beta cells to produce insulin. Moreover, in older individual there is a decrease in mitochondrial activity in muscle cells by 35%.

Table 1. Demographic characteristics of research subjects.

Variable	Sum	%
1. Age	26-35	2 1.8
	36-45	8 7.3
	46-55	57 52.3
	56-65	42 38.5
2. Gender	Male	45 41.3
	Female	64 58.7
3. Occupation	Pension	5 4.6
	Housewife	53 48.6
	Entrepreneur	17 15.6
	Civil servant	5 4.6
	Private employee	16 14.7
4. Education	Others	13 11.9
	Low (SD-SMP)	66 60.6
	Medium (SMA-DIII)	18 16.5
	Higher (S1-S2)	25 22.9
5. Period of suffering	< 10 years	85 77.1
	> 10 years	24 22.9
6. Complication of DM	No	65 62.4
	Yes	44 37.6

That case related to an increase of fat levels in the muscles by 30% and cause resistance of insulin⁽⁸⁾. By the gender characteristics, mostly patients of diabetes type 2 are women within the percentage of 58.7%, this is in line with Adikusuma research (2010) which states that women are more suffered from type 2 diabetes, this is also supported by research in the United States which indicated that the patient of diabetes type 2 mostly women, because physically, women tend to have bigger opportunity to increase her body mass index, excessive fat deposits inside the body will cause a resistance⁽⁹⁾.

Postmenopausal women condition after the ovary stops producing hormones, the estrogen hormone produced exclusively from androstenedione by the adrenal gland and encounter aromatization to estron in the process of converting peripheral extraglands. Mainly, this transformation occurs in fat tissue, thus it causes postmenopausal women have more fat tissue and changes in her body composition in. Fat accumulation of visceral, which is mainly central abdominal fat in menopausal women, affects the production of reduced adiponectin protein. Adiponectin works by making body cells more sensitive to insulin action. Low serum adiponectin levels are associated with insulin resistance conditions that can increase blood glucose levels and eventually develop into diabetes mellitus type 2⁽¹⁰⁾.

The results showed that 48.6% of patients consist of housewives. Patients admitted, they are only stay

at home, only doing necessary activities and watching TV. Therefore, it reduced their activity. Beside, they rarely doing any exercise, patients who only doing small activity tend to have greater risk of developing diabetes mellitus, this was supported by research conducted in 13 European countries by Balkau *et al.* (2008). The study states that physical activity in daily life is the main factor that determines insulin sensitivity, so the less activity they carried out, the less insulin sensitivity, it causes a risk of causing DM type 2.

On education category, the higher results are elementary school with 60.5%. Minimum education system will lead into a lack of understanding regarding the risk factors for diabetes type 2, and this is in line with the research of Dedi Irawan (2010) which states that education levels have an influence on DM type 2⁽¹¹⁾. The higher education level, the better knowledge they got to prevent diseases including DM type 2. Suffering period of diabetes mellitus in this study 77.1% were at <10 years this is likely to cause 62.4% have no complications. Duration of DM is counted from the beginning of the patient being diagnosed by the doctor having DM type 2. According to Issa & Baiyewu (2006) that the quality of life in DMs type 2 patients in Nigeria experiences a better quality of life with the period of having DM under 8 years⁽¹²⁾.

Education Effectiveness to The Quality of Life. The results of total quality of life before and after education showed significant results with $p < 0.005$ (Table 2). The quality of life questionnaire had 30 questions with 4 domains which was positive satisfaction, positive and negative DM impacts, negative DM concerns, and negative physical, psychological, and social concerns. From four overall domains, it showed significant of $p = 0.000$ (Table 2).

On questions of satisfaction domains, the value of a low classification question found in DM knowledge,

Table 2. The difference result of pre-test and post-test on quality of life.

Variable	Statistic	
	Z	Asymp. Sig. (2-tailed)
1. Total post-test QOL and total pre-test QOL	-9.065 ^b	0.000
2. Post-test satisfaction domain and pre-test satisfaction	-9.032 ^b	0.000
3. DM effect post-test domain and DM effect pre-test domain	-9.071 ^b	0.000
4. DM concern post-test domain and DM concern pre-test domain	-8.646 ^b	0.000
5. Physical, mental, and social worries post-test domain and physical, mental, and social worries pre-test domain	-8.555 ^b	0.000

a. Wilcoxon signed ranks test

b. Based on negative ranks

satisfaction, and satisfaction of sleep quality (Table 3). Knowledge of diabetes mellitus type 2 patient is important to be improved because patients who get adequate knowledge will improve their understanding and it will affect their behavior. According to Bloom's theory, to change the attitude of patients due to education, the patient must experience the stages from knowing to understanding that have an impact on behavior changes therefore to obtain a better attitudes continuity education should be given.

On the question of quality of sleep satisfaction obtain low points because someone who suffers from diabetes mellitus type 2 usually feels discomfort due to symptoms or signs of the disease that affects patient's sleep quality. On the case of patients with

Table 3. Average results of pre-test and post-test satisfaction test based on DQOL questionnaire question.

No	Question	Average of pre-test (x)	Category	Average of post-test (x)	Category
1	Satisfaction	2.368	Medium	2.985	High
2	DM Effect	2.517	Medium	3.284	High
3	DM Concern	2.449	Medium	3.495	High
4	Physical, mental, and social worries	2.491	Medium	3.573	Medium
5	Satisfaction of DM knowledge	2.119	Low	2.835	Low
6	Quality of total sleep	2.193	Low	2.872	Low
7	Satisfaction to a social relation	2.651	High	3.037	Medium
8	Sense about social activity	2.486	Medium	2.954	Medium
9	Satisfaction in daily activities	2.257	Medium	2.954	Medium
10	Sense about performance	2.550	High	3.018	Medium
11	Satisfaction of time doing exercise	2.394	Medium	2.917	Medium
12	Satisfaction of relaxing time	2.394	Medium	3.082	High
13	Satisfaction to the whole of life	2.220	Low	3.064	Medium

Table 4. Average results of pre-test and post-test domains impacts of DM based on DQOL problem.

No	Question	Average of pre-test (x)	Category	Average of post-test (x)	Category
14	Sense of pain	2.303	Medium	3.083	Medium
15	Shame sense because of DM	3.101	High	3.725	High
16	Normal blood sugar	2.669	Medium	3.321	Medium
17	Unable to sleep at night	2.312	Medium	3.174	Medium
18	Boundary to friendship	2.936	High	3.596	High
19	Total good feeling	2.303	Medium	2.927	Low
20	Being limited by diet	2.523	Medium	3.312	Medium
21	Boundary of exercising because of DM	2.615	Medium	3.312	Medium
22	Unable to do activities	2.394	Medium	3.339	Medium
23	Relaxing activity is disturbed because of DM	2.385	Medium	3.468	Medium
24	Able to tell about DM to others	2.431	Medium	3.128	Medium
25	Frequently going to the bathroom	2.229	Low	3.027	Low

Table 5. Average results of pre-test and post-test domain concerns due to DM based on DQOL questionnaire questions.

No	Question	Average of pre-test (x)	Category	Average of post-test (x)	Category
26	Fear of passing away	2.358	Medium	3.495	Medium
27	Fear of body looking different	2.761	High	3.633	High
28	Fear of occurring complication	2.229	Medium	3.358	Medium

Table 6. Average results of pre-test and post-test domain physical, psychological, and social concerns based on DQOL questionnaire questions.

No	Question	Average of pre-test (x)	Category	Average of post-test (x)	Category
29	Fear of losing job	2.367	Medium	3.495	Medium
30	Fear of being unable to go far or travelling	2.615	High	3.651	High

neuropathy complications, extreme pain is a symptom which causes patients to wake up frequently. This is a common complaint in patients with diabetes mellitus type 2, especially in chronic patients with poor glucose control⁽¹³⁾. Beside the pain, sleep disorders also caused by nocturia at night which interferes with sleep and patient the sleep cycle. If blood sugar levels above 160-180 mg/dL, glucose will reach urine. If the levels are higher, the kidneys will throw excessed water away to dilute a large amount of lost glucose. Because the kidneys produce excessive amounts of urine, patient often urinate in large amounts. Thus, patient will feel excessively thirsty; and this condition will disturb patient's sleep at night because they often wake up just want to drink⁽¹³⁾.

On the questionnaire domain regarding the impact of DM, the lowest score on the question whether the patient feels good and about the feeling of going to the bathroom more often than normal people (Table 4), for good feelings the results of the study showed that patient has a low score because according to Noerhayati (2014) bad quality of life is experienced by people with DM type 2 and their perception about thir disease has not showing any improvement or recovery. This related to negative feelings about DM

type 2 that suffered by patient, based on the theory (King & Hinds, 2007) a decrease in physical function for patients with DM will indirectly affect their psychological state such as the emergence of feelings of sadness, disappointment, anxiety, and depression and that will reduce their happiness⁽¹⁴⁾. Patients who have negative feelings such as despair, anger, shame, and feel they do not care about improving their health, will affect their quality of life⁽¹⁴⁾.

Regarding the questions about necessary of going to the bathroom more often than normal people is caused by one of the symptoms from DM called polyuria. Polyuria occurs because blood glucose increases and exceed the absorbency of the kidneys, and it causes osmotic diuresis. The characteristic of glucose is inhibit the water reabsorption by kidney tubules and it causes the large amounts of water expense along with glucose in form of urine⁽¹⁵⁾.

In the domain of concern regarding DM type 2, lower score come from the questions of the worries on complications (Table 5). Patients feel that the disease can be worse and causing other additional disease. According to Nugroho and Purwanti (2010) patients who know that they are diagnosed with diabetes mellitus will be worry of what happen in the future

on their life. Furthermore, this condition causes an anxiety that can eventually cause stress and can be worsen the condition of Diabetes Mellitus⁽¹⁶⁾. While in the domain of concern for physical, psychological, and social aspects, the lowest results occur on the question regarding job loss (Table 6). Diabetes Mellitus gives psychological effect and physiological as well. On physical concern, patient can be stress on managing their self such as diet, physical activity, recovering the symptoms, and treatment. On psychological concern, patient can be stress of rejection, worry, feelings helpless and had a bad stigma about disease⁽¹⁷⁾. Patients in this study experienced a fear of their physical abilities will be reduced. Therefore, they choose to not carry out a hard activity such as work and ofcourse it will influence their loss of job regarding their feeling of DM type 2. It will affect their physical and their amount of activities.

CONCLUSION

Based on the explanation regarding diabetes mellitus type 2 and their effect on physical and psychological, and the importance of education system for diabetes mellitus type 2 patients to prevent their bad impact on health, it can be concluded that applying one of method which is booklet method will give a significant difference on before and after doing the intervention.

ACKNOWLEDGEMENT

The gratitude expression is dedicated by the author to the Director of Anwar Medika Hospital and to all service employees of Anwar Medika Hospital.

REFERENCES

- Indonesia PE. pengelolaan dan pencegahan diabetes melitus tipe 2 di Indonesia. Pb. Perkeni. 2015.
- KKR I. Badan penelitian dan pengembangan kesehatan. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas). 2013.
- Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. Profil Kesehatan Provinsi Jawa Timur Tahun 2011. Surabaya: Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Timur. 2012. Diakses dari <http://www.depkes.go.id/>.
- Tankova T, Dakovska G, Koev D. Education and quality of life in diabetic patients. Patient Education and Counseling. 2004;53(3):285-90.
- Atak N, Gurkan T, Kose K. The effect of education on knowledge, self management behaviours and self efficacy of patients with type 2 diabetes. Australian Journal of Advanced Nursing. 2008;26(2):66.
- Rubin RR, Peyrot M. Quality of life and diabetes. Diabetes/metabolism research and reviews. 1999;15(3):205-18.
- Brunner LS. Brunner & Suddarth's textbook of medical-surgical nursing. Lippincott Williams & Wilkins. 2010.
- Iroth GS, Kandou GD, Malonda NS. Hubungan antara umur dan pola makan dengan kejadian diabetes melitus tipe 2 pada pasien rawat jalan di wilayah kerja puskesmas Tenga kecamatan Tenga. Media Kesehatan. 2017;9(3).
- Adikusuma W, Perwitasari DA, Supadmi W. Evaluasi kualitas hidup pasien diabetes melitus tipe 2 Rumah Sakit Umum PKU Muhammadiyah Bantul. Prosiding Simposium Nasional "Peluang dan Tantangan Obat Tradisional dalam Pelayanan Kesehatan Formal". 2014.
- Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. Endocrine reviews. 2016;37(3):278-316.
- Irawan D. Prevalensi dan faktor risiko kejadian diabetes melitus tipe 2 di daerah urban indonesia. Universitas Indonesia, Fakultas Kesehatan Masyarakat. Depok: Universitas Indonesia. 2010.
- Issa BA, Baiyewu O. Quality of life of patients with diabetes mellitus in a Nigerian Teaching Hospital. Hong Kong Journal of Psychiatry. 2006;16(1).
- Gustimigo ZP. Kualitas tidur penderita diabetes melitus. Jurnal Majority. 2015;4(8):133-8.
- King CR, Hinds PS. Quality of life: from nursing and patient perspectives. Jones & Bartlett Publishers; 2011.
- Kusniawati. Analisis faktor yang berkontribusi terhadap self care diabetes pada klien diabetes melitus tipe 2 di Rumah Sakit Umum Tangerang. Tesis. 2011. Diunduh dari <http://lontar.ui.ac.id/file?file=digital/20281676-T%20Kusniawati.pdf>.
- Nugroho SA, Purwanti OS. Hubungan antara tingkat stres dengan kadar gula darah pada pasien diabetes melitus di Wilayah Kerja Puskesmas Sukoharjo I Kabupaten Sukoharjo.
- Wingert AN, Johnson N, Melton ST. Understanding stress among adults diagnosed with type 2 diabetes at a younger age. PLAID: People Living with And Inspired by Diabetes. 2015;1(1).

Profil Lipid dan Gambaran Histopatologi Aorta Tikus Hiperlipidemia dengan Pemberian Ekstrak Kopi Hijau

(The Lipid Profile and Aorta Histopathology On Hyperlipidemic Rat by Giving Green Coffee Extract)

FRANSISKA MARIA CHRISTIANTY*, DIANA HOLIDAH, FIFTEEN APRILA FAJRIN,
MONICA CINURADHA AURA SALSABINA, ANDREAN RONI

**Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jalan Kalimantan I No. 02 Sumbersari, Jember,
Jawa Timur, 68121, Indonesia**

Diterima: 1 April 2019, Disetujui: 26 Maret 2020

Abstrak: Tingginya prevalensi dan resiko kematian akibat penyakit kardiovaskular mendorong dikembangkannya alternatif pengobatan yang berasal dari alam. Kopi hijau merupakan kopi yang belum mengalami proses penyangraian. Kopi hijau di pasaran diklaim dapat menurunkan berat badan, meskipun efek terhadap kardiovaskular masih kontroversial. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji kopi hijau terhadap profil lipid dan gambaran histopatologi aorta pada tikus model hiperlipidemia. Ekstrak kopi hijau dibuat dengan metode remaserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Tikus diinduksi dengan pemberian pakan tinggi lemak untuk membuat model hiperlipidemia dan diberi perlakuan dengan ekstrak kopi hijau dosis 200; 400; dan 800 mg/kg BB. Tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan darah untuk pengukuran profil lipid dan dilakukan pengamatan terhadap preparat histopatologi aorta tikus. Hasil menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kopi hijau (terutama dosis 200 mg/kg BB) selama 14 hari pada tikus model hiperlipidemia dapat memperbaiki profil lipid secara signifikan, kecuali kadar HDL. Pengamatan dengan mikroskop menunjukkan bahwa ekstrak kopi hijau dapat memperbaiki gambaran histopatologi aorta tikus meskipun tidak sampai menyamai kondisi normalnya. Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah ekstrak kopi hijau berpotensi untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif obat tradisional yang memiliki efek antihiperlipidemia dan efek protektif terhadap kardiovaskular.

Kata Kunci: ekstrak kopi hijau, profil lipid, aorta

Abstract: The high prevalence and risk of death from cardiovascular disease has led to the development of alternative treatments derived from nature. Green coffee has not undergone a roasting process. The product is claimed as a weight loser, even though the cardiovascular effects are still controversial. This study aim was to determine the impact of green coffee bean extract on rat lipid profiles and aortic histopathology. Green coffee bean extract made by a re-maceration method using 96% ethanol. Rats were induced with high-fat diet then treated with green coffee bean extract at a dose of 200; 400; and 800 mg/kg BB. Rats were sacrificed, blood was taken for lipid profile measurements and observations were made on histopathological preparations of rat aorta. The results showed that administration of green coffee bean extract (especially doses of 200 mg/kg BW) for 14 days in hyperlipidemic mice could significantly improve lipid profiles, except HDL levels. Microscopic observations showed that green coffee bean extract could enhance the rat aorta histopathology even though it did not match normal conditions. We can conclude that green coffee bean extract has potential effects to be developed as an alternative to traditional medicine that has antihyperlipidemic effects and cardiovascular protective effects.

Keywords: green coffee bean extract, lipid profile, aorta

*Penulis korespondensi
E-mail: fransiska.farmasi@unej.ac.id

PENDAHULUAN

PENYAKIT jantung dan pembuluh darah atau *cardiovascular disease* (CVD) merupakan sekelompok gangguan atau penyakit, baik pada jantung maupun pembuluh darah otak maupun perifer^(1,2). Penyakit kardiovaskular merupakan penyebab utama kematian secara global. Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2015 menunjukkan 17,7 juta orang di dunia meninggal akibat penyakit kardiovaskular atau 31% dari jumlah kematian di seluruh dunia. Kematian yang disebabkan oleh penyakit kardiovaskular, terutama penyakit jantung koroner dan stroke diperkirakan akan terus meningkat mencapai 23,3 juta kematian pada tahun 2030⁽³⁾. Lebih dari 3/4 kematian akibat penyakit kardiovaskular terjadi di negara berkembang yang berpenghasilan rendah sampai sedang, termasuk di Indonesia. Berdasarkan hasil wawancara, prevalensi CVD di Indonesia mencapai 7,2%, sementara berdasarkan riwayat diagnosis tenaga kesehatan hanya ditemukan sebesar 0,9%⁽⁴⁾.

Beberapa faktor resiko, seperti hipertensi, hiperlipidemia, diabetes, inflamasi, obesitas, serta kebiasaan merokok diketahui dapat menyebabkan disfungsi endotel yang mengawali terjadinya gangguan pada sistem kardiovaskular^(5,6). Hiperlipidemia merupakan kondisi peningkatan konsentrasi lipid dalam darah. Hiperlipidemia merupakan penyebab utama aterosklerosis dan penyakit-penyakit yang berhubungan dengan aterosklerosis, seperti *coronary heart disease* (CHD), *ischemic cerebrovascular disease*, *peripheral vascular disease* dan pankreatitis⁽⁷⁾.

Aterosklerosis merupakan penyakit kronis yang ditandai dengan deposisi kolesterol yang berlebihan pada bagian intima pembuluh darah arteri. Aterosklerosis dihubungkan dengan adanya gangguan pada metabolisme kolesterol, yakni terjadi peningkatan *low density lipoprotein* (LDL), kolesterol, dan trigliserida bertanggungjawab untuk kondisi tersebut^(7,8). Pada tahap lanjut, plak aterosklerosis pada dinding vaskular dapat ruptur dan membentuk trombus yang dapat menyumbat lumen pembuluh darah dan menyebabkan munculnya gejala infark miokard maupun stroke. Dengan demikian, aterosklerosis bertanggung jawab sebagai salah satu penyebab morbiditas dan mortalitas pada penyakit kardiovaskular^(5,9).

Tingginya resiko kematian akibat penyakit kardiovaskular inilah yang mendorong dilakukannya penelitian-penelitian, khususnya yang berbasis bahan alam mengingat potensi keanekaragaman hayati yang dimiliki oleh Indonesia. Salah satu tanaman yang akan diteliti potensinya adalah kopi. Kopi

merupakan salah satu minuman yang digemari oleh masyarakat di seluruh dunia, termasuk di Indonesia. Kebiasaan minum kopi pada masyarakat Indonesia sudah dilakukan sejak jaman dahulu kala dan menjadi budaya⁽¹⁰⁾.

Kabupaten Jember adalah daerah di Jawa Timur dengan tingkat produktivitas kopi yang besar. Berdasarkan data Ditjen Perkebunan tahun 2016, diketahui Jember merupakan kabupaten terbesar kedua dalam produksi kopi Robusta pada tahun 2015, yakni 2.845 ton untuk perkebunan rakyat, 2.251 ton untuk perkebunan besar negara, dan 4.454 ton untuk perkebunan swasta⁽¹¹⁾. Selain itu, kopi sendiri merupakan salah satu produk unggulan Jember yang sangat berpotensi untuk dikembangkan dalam rangka meningkatkan kesehatan masyarakat.

Kopi hijau merupakan kopi yang belum mengalami proses pemanggangan (*roasted coffee*) seperti halnya kopi hitam⁽¹²⁾. Saat ini, produk kopi hijau makin populer di Indonesia yang diklaim dapat menurunkan berat badan. Beberapa studi baik secara preklinik maupun klinis menunjukkan bahwa kopi hijau berperan dalam menurunkan berat badan⁽¹³⁾. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan kopi instan dengan 200 mg ekstrak kopi hijau selama 12 minggu dapat menurunkan berat badan pada pasien obes^(12,14). Hasil review sejumlah uji klinis terhadap penggunaan kopi hijau sebagai suplemen penurunan berat badan, dinyatakan bahwa kopi hijau sangat berpotensi tetapi masih banyak keterbatasan dikarenakan jumlah sample yang terlalu sedikit, relevansi klinis yang masih belum jelas⁽¹²⁾. Review lain menyebutkan bahwa ekstrak kopi hijau belum dapat direkomendasikan sebagai terapi yang efektif dan aman dalam menurunkan berat badan (BB)⁽¹⁵⁾.

Khasiat kopi hijau sebagai penurunan berat badan ini dihubungkan dengan komponen terbesar dalam kopi hijau yaitu asam klorogenat. Biji kopi hijau Robusta paling banyak mengandung asam klorogenat dibandingkan dengan biji kopi lainnya⁽¹⁶⁾. Asam klorogenat diketahui dapat memperbaiki steatosis hati dan resistensi insulin pada mencit yang diberi pakan tinggi lemak⁽¹⁷⁾. Selain itu, asam klorogenat menunjukkan sifat anti-obesitas dan meningkatkan metabolisme lipid pada mencit obese yang diinduksi pakan tinggi lemak⁽¹⁸⁾. Pemberian ekstrak etanol kopi hijau 400 mg/kg BB lebih efisien dalam menurunkan kadar LDL, meningkatkan *high density lipoprotein* (HDL), dan menurunkan kadar kolesterol total secara signifikan pada tikus putih yang diinduksi diet tinggi lemak, namun tidak ada perbedaan dalam menurunkan trigliserid⁽¹⁹⁾.

Selain kandungan asam klorogenat, kopi hijau

juga mengandung kafein yang merupakan stimulant sistem saraf pusat. Beberapa penelitian dalam review menghubungkan efek kafein terhadap peningkatan faktor resiko penyakit kardiovaskular, seperti peningkatan tekanan darah, aritmia ventrikular, meskipun hasilnya juga tidak konsisten⁽²⁰⁾.

Sampai sejauh ini, hasil penelitian kopi hijau sebagian besar masih dihubungkan dengan khasiat penurunan berat badan, namun terkait profil lipid dan gambaran histopatologi aorta belum banyak diteliti. Oleh karena itu, dalam penelitian ini, penulis ingin membuktikan apakah ekstrak kopi hijau dapat memperbaiki profil lipid sekaligus gambaran histopatologi aorta pada tikus model hiperlipidemia.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biji kopi hijau Robusta *premium grade* (diperoleh dari Koperasi Ketakasi, desa Sidomulyo, Kecamatan Silo, Kabupaten Jember), etanol 90%, aquades, HCl 2N, NaCl, NH₄OH 28%, NaCl 90%, CMC Na, minyak jelantah, kuning telur puyuh, pakan BR II, formalin, *Follin Ciocalteu*, AlCl₃, *Bromocresol green* (BCG), kloroform, dapar fosfat, eter, reagen kolesterol CHOD-PAP (kolesterol oksidase, kolesterol esterase, dan peroksidase), reagen trigliserida GPO-PAP (Lipoprotein lipase, *Glycerolkinase*, *Glycerol 3-P-oxidase*, peroksidase), reagen LDL-Cholesterol (heparin dan sodium sitrat), dan reagen HDL-Cholesterolprecipitin (*phosphotungstic acid* dan MgCl), hematoksilin-eosin, entelan, *xylo*, alkohol.

Alat. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan hewan (Ohaus), bak tikus, papan dan alat bedah, sonde, objek dan *cover glass*, pipet mikro (Socorex), mikrotube (Eppendorf), *yellow tip*, *blue tip*, *vortex*, mikroskop (Olympus), *centrifuge*, oven, neraca analitik (Ohaus), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-1800), corong Buchner, *rotary evaporator* (Steroglass Strike 300), *photometer* (Biolyzer), dan seperangkat alat gelas (Pyrex).

METODE. Pembuatan ekstrak kopi hijau. Ekstrak dibuat dengan cara remaserasi, yaitu dengan mencampurkan 1000 g serbuk kopi hijau dengan etanol 96% sebanyak 3 kali bobot serbuk. Campuran direndam selama 5 hari sambil diaduk. Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi. Ampas kemudian diremaserasi menggunakan cairan penyari yang baru dan direndam selama 2 hari sambil diaduk. Maserat kemudian dipisahkan kembali. Seluruh maserat yang terkumpul diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C hingga kering.

Penetapan Kadar Fenol Total, Flavonoid, dan Alkaloid. Penetapan kadar fenol total. Standar yang digunakan dalam penelitian ini yaitu asam galat. Sebanyak 75 ml aquades, 5 ml Follin Ciocalteu dan 10 ml larutan Na₂CO₃ 14 % dimasukkan dalam labu takar yang berisi 0,1 ml sampel, kemudian ditambah aquades sampai volume 100 ml. Larutan dikocok 10 menit kemudian didiamkan 30 menit pada suhu ruangan. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 760 nm.

Penetapan kadar flavonoid. Sebanyak 1 mL sampel direaksikan dengan 1 mL reagen AlCl₃ (2% v/v etanol) dan diinkubasi dalam kuvet, kemudian diukur absorbansinya dengan panjang gelombang terpilih. Kadar flavonoid dinyatakan dalam mg QE (ekuivalen kuersetin) dalam 1 gram ekstrak.

Penetapan kadar alkaloid. Kandungan alkaloid pada larutan sampel ekstrak kopi hijau diuji menggunakan metode BCG. Standar yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berberin. Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam HCl 2 N kemudian disaring. 1 mL larutan uji diambil ditambah 5 mL dapar fosfat pH 4,7 dan 5 mL larutan BCG 10-4 M. Campuran dikocok dan diekstraksi dengan 5 mL kloroform. Lapisan kloroform diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang terpilih.

Pengujian Aktivitas *in Vivo*. Pembuatan model hiperlipidemia dan perlakuan. Seluruh prosedur pemeliharaan dan perlakuan hewan uji telah mendapat persetujuan komisi etik Politeknik Negeri Jember dengan sertifikat nomor 615/PL17/LL/2018. Tikus yang telah diadaptasikan selama seminggu, ditempatkan dalam wadah secara berkelompok (5-7 ekor). Sebelum diinduksi, diukur profil lipid normal terlebih dahulu, kemudian tikus diberi pakan tinggi lemak sampai mencapai kondisi hiperlipidemia, yang ditandai dengan peningkatan profil lipid secara signifikan pada minggu ke-3 (dibuktikan dengan uji T). Pakan tinggi lemak yang digunakan terdiri campuran telur puyuh dan minyak jelantah 7:3 yang diberikan dengan sonde. Dilakukan juga penambahan propiltiourasil 0,01% dalam air minum untuk mempercepat kondisi hiperlipidemia. Induksi dilakukan selama 21 hari. Setelah kondisi hiperlipidemia tercapai, perlakuan dengan ekstrak kopi hijau dengan tiga peringkat dosis, yakni 200 mg/kg BB; 400 mg/kg BB, dan 800 mg/kg BB, yang diberikan selama 2 minggu secara per oral menggunakan sonde. Sebagai kontrol positif digunakan simvastatin dosis 0,9 mg/kg BB. Tikus kemudian dikorbankan dengan dianestesi menggunakan eter. Darah diambil secara intrakardial untuk pengukuran profil lipid. Aorta dipisahkan dan difiksasi dalam *neutral buffer formalin* (NBF) 10%.

Pemeriksaan kadar kolesterol, trigliserida, LDL

dan HDL. Sebanyak 10 µl serum sampel dicampur dengan 100 µl reagen, dibiarkan 10 menit pada suhu 25°C, disentrifus 15 menit 4000 rpm kemudian dipisahkan supernatnya. Sebanyak 50 µl supernatan yang diperoleh ditambah dengan 500 µl reagen kolesterol. Selain itu dibuat juga blanko reagen dengan mencampurkan 50 µl aquabides dan 500 µl reagen kolesterol. Masing-masing dicampur hingga homogen, diinkubasi selama 5 menit suhu 37°C atau 10 menit suhu 25°C dan diukur kadarnya (mg/dl) dengan menggunakan Biolyzer 100TM.

Pembuatan preparat dan pengamatan histopatologi aorta. Aorta yang telah difiksasi dibuat preparat dengan blok paraffin dan dilakukan pewarnaan dengan hematoxilin eosin. Preparat kemudian diamati di bawah mikroskop (perbesaran 100x dan 400x). Pengamatan meliputi adanya kerusakan struktur jaringan aorta, sel busa dan penebalan dinding aorta.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Kopi Hijau dan Penetapan Kadar Fenol Total, Flavonoid, serta Alkaloid. Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi 1000 g serbuk kopi hijau sebesar 13,437%. Pada penelitian ini dilakukan skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung pada sampel ekstrak kopi hijau, yakni identifikasi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, glikosida saponin, dan polifenol dengan melalui uji penegasan KLT serta tanin dengan reaksi pengendapan dan perubahan warna. Berdasarkan hasil skrining, diketahui ekstrak biji kopi hijau positif mengandung polifenol, flavonoid, serta alkaloid. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan biji kopi mengandung senyawa polifenol diantaranya yang utama adalah asam klorogenat. Asam klorogenat sendiri merupakan ester yang terbentuk dari satu molekul asam kuinic dan 1-3 molekul asam hidroksisinamat. Selain itu, kopi juga mengandung dua tipe alkaloid utama, yakni kafein dan trigonelin⁽²¹⁾.

Hasil penetapan kadar fenol total didapatkan kandungan fenol total ekstrak kopi hijau sebesar 171,633 ± 10,114 mg GAE/mL ekstrak; kandungan

flavonoid ekstrak kopi hijau sebesar 15,000 ± 0,252 mg QE/g ekstrak; dan kandungan alkaloid ekstrak kopi hijau sebesar 1,005 ± 0,123 mg BE/mL ekstrak. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1. Sejauh ini belum ada referensi yang dapat digunakan sebagai pembandingan untuk hasil penetapan kadar fenol total, flavonoid, dan alkaloid. Berdasarkan penelitian yang sudah ada, kandungan komponen utama kopi, yakni asam klorogenat bervariasi antara 4,4%-7,5%; sedangkan kafein berkisar antara 1,25-2,5%⁽²¹⁾.

Profil lipid (kadar kolesterol, trigliserida, LDL, HDL). Diet tinggi lemak ditambah propiltiourasil selama 21 hari pada penelitian ini terbukti dapat meningkatkan profil lipid secara signifikan dibandingkan sebelum diinduksi berdasarkan hasil Uji T, terutama pada kadar kolesterol (p=0,02) dan kadar trigliserida (p=0,005), sehingga dapat digunakan untuk tahapan selanjutnya. Kuning telur puyuh memiliki kandungan kolesterol yang lebih tinggi dibandingkan dengan kuning telur lainnya⁽²²⁾, sedangkan minyak jelantah dapat memperburuk kondisi hiperlipidemia dengan meningkatkan resiko kardiovaskular karena mengandung asam lemak jenuh. Hasil penelitian lain menunjukkan bahwa pemberian minyak jelantah (*deep frying*) berpengaruh bermakna terhadap peningkatan jumlah sel nekrosis pada jantung tikus putih (*Rattus norvegicus strain wistar*)⁽²³⁾. Sementara itu, penambahan propiltiourasil dalam air minum dimaksudkan untuk merusak kelenjar tiroid sehingga menghambat pembentukan hormon tiroid, sehingga terjadi peningkatan lipolisis dan biosintesis kolesterol endogen di hati. Kombinasi propiltiourasil 0,01% dengan pakan tinggi lemak dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam darah lebih baik dibandingkan hanya pakan tinggi lemak⁽²⁴⁾.

Pemberian perlakuan dengan ekstrak kopi hijau (EKH) berbagai dosis dapat menurunkan kembali profil lipid tersebut. Tabel 2 menunjukkan bahwa persen penurunan kadar lipid terbesar terjadi pada kelompok kontrol positif, sedangkan persen penurunan kadar terkecil terdapat pada kelompok kontrol negatif. Berdasarkan hasil analisis Anova satu arah, didapatkan bahwa kadar kolesterol, trigliserida, dan LDL yang memiliki perbedaan bermakna antar kelompok

Tabel 1. Penetapan kadar flavonoid, fenol total dan alkaloid ekstrak kopi hijau.

Replikasi	Kadar (satuan ekuivalen)		
	Flavonoid (mg QE/g ekstrak)	Fenol (mg GAE/mL ekstrak)	Alkaloid (mg BE/mL ekstrak)
1.	14,874	168,648	1,036
2.	15,291	163,347	0,869
3.	14,836	182,903	1,109
Rata-rata ± SD	15,000 ± 0,252	171,633 ± 10,114	1,005 ± 0,123

Tabel 2. Rata-rata persen penurunan profil lipid.

Kelompok	Rata-rata persen penurunan kadar (mg/dL)			
	Kolesterol	Trigliserida	LDL	HDL
CMC Na 1%	3,37 ± 0,21 ^a	4,31 ± 0,66 ^a	-25,54 ± 10,88 ^a	-84,89 ± 34,96
Simvastatin	55,87 ± 7,48 ^b	38,15 ± 3,78 ^b	23,33 ± 12,33 ^b	-162,63 ± 79,41
EKH 200 mg/kg BB	64,64 ± 6,28 ^b	38,92 ± 7,28 ^b	34,26 ± 13,99 ^b	-57,71 ± 24,01
EKH 400 mg/kg BB	31,49 ± 5,09 ^c	33,93 ± 3,07 ^b	16,01 ± 7,61 ^b	-50,25 ± 36,04
EKH 800 mg/kg BB	35,93 ± 2,85 ^c	43,27 ± 5,89 ^b	32,69 ± 7,45 ^b	35,41 ± 6,84

Keterangan: Huruf superscript yang berbeda menunjukkan antar kelompok terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), uji Anova dilanjutkan LSD

($p < 0,001$; $p < 0,001$ dan $p = 0,008$), sedangkan kadar HDL tidak memiliki perbedaan yang bermakna ($p = 0,072$). Hasil uji lanjutan kadar kolesterol dengan *Least Significant Difference* (LSD) menunjukkan bahwa kelompok yang diberi CMC Na 1% (kontrol negatif) berbeda signifikan dengan kelompok yang diberi simvastatin (kontrol positif) dan semua kelompok perlakuan dengan ekstrak kopi hijau. Hal ini berarti bahwa simvastatin dan ekstrak kopi hijau dapat menurunkan kadar kolesterol tikus yang diinduksi diet tinggi lemak. Di antara kelompok perlakuan, hanya dosis 200 mg/kg BB yang efektifitasnya setara dengan simvastatin ($p = 0,400$); sedangkan antara dosis 400 dan 800 mg/kg BB justru tidak berbeda signifikan ($p = 0,547$), yang artinya kedua dosis tersebut memiliki efek yang setara dalam menurunkan kadar kolesterol, tetapi belum menyamai kontrol positif.

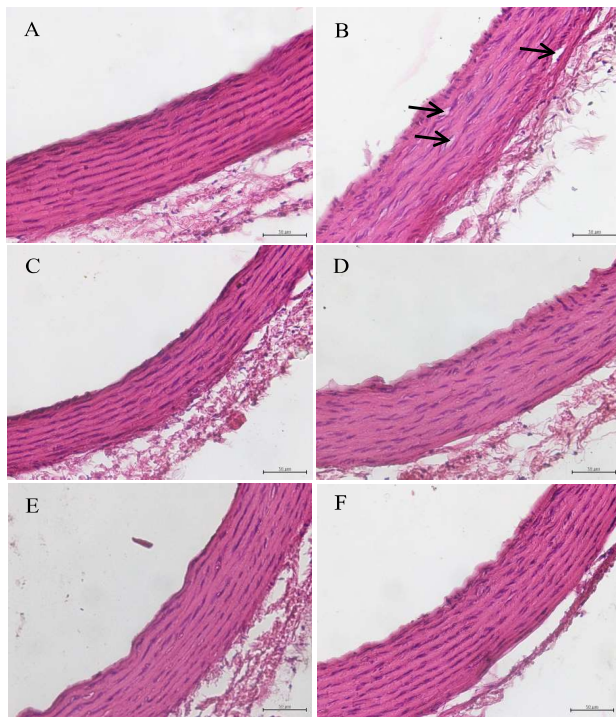
Hasil uji LSD kadar trigliserida dan LDL menunjukkan bahwa seluruh kelompok perlakuan berbeda signifikan apabila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$). Hal ini berarti baik simvastatin, maupun ekstrak kopi hijau berbagai dosis mampu menurunkan kadar trigliserida dan LDL pada tikus model hiperlipidemia. Namun demikian, di antara kelompok perlakuan, menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dengan kontrol positif, yang berarti bahwa ekstrak dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB memiliki efektifitas yang setara dengan simvastatin dalam menurunkan kadar trigliserida dan LDL. Sedangkan pada kadar HDL tidak dijumpai adanya perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak biji kopi hijau (terutama dosis 200 mg/kg BB) dapat memperbaiki profil lipid, terutama menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, dan LDL pada tikus putih model hiperlipidemia. Hasil yang berbeda terdapat pada penelitian yang dilakukan oleh Setyono *et al.*, dimana pemberian ekstrak etanol kopi hijau dosis 400 mg/kg BB lebih efisien dalam menurunkan kadar LDL, meningkatkan HDL, dan menurunkan kadar kolesterol total secara signifikan pada tikus putih yang diinduksi diet pakan tinggi lemak, namun tidak ada perbedaan dalam menurunkan trigliserid⁽¹⁹⁾. Pada penelitian lain, tetapi dengan hewan uji yang berbeda (mencit model

obese), diperoleh hasil bahwa ekstrak kopi hijau dosis 200 mg/kgBB (setara dengan 140 mg/kgBB untuk tikus) dapat menurunkan kadar kolesterol, trigliserida, LDL, dan meningkatkan kadar HDL⁽²⁵⁾. Sejalan dengan penelitian tersebut, penelitian lain juga menyebutkan bahwa ekstrak etanol biji kopi hijau dosis 200 dan 400 mg/kgBB (setara dengan dosis 140 mg/kg BB dan 280 mg/kg BB untuk tikus) juga dapat menurunkan kadar trigliserida secara signifikan⁽²⁶⁾. Perbedaan hasil tersebut dengan penelitian ini, selain karena perbedaan hewan uji yang digunakan, juga dapat dipengaruhi antara lain oleh tempat hidup dan proses pengolahan kopi karena perbedaan tempat tumbuh (bergantung pada ketinggian tempat) juga akan berpengaruh terhadap kadar senyawa aktif suatu tanaman, demikian pula dengan pengolahannya.

Senyawa yang diduga berperan dalam perbaikan profil lipid ini adalah asam klorogenat dan asam kafeat. Kedua senyawa tersebut dapat menghambat aktivitas asam lemak sintase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase dan asil-CoA:cholesterol asiltransferase secara signifikan. Hal ini dapat menyebabkan menurunnya kadar kolesterol dan LDL dalam darah⁽¹⁸⁾. Selain itu, berdasarkan penelitian sebelumnya, asam klorogenat pada biji kopi hijau diduga dapat menurunkan kadar kolesterol dengan cara menghambat lipolisis trigliserida di jaringan adiposa sehingga dapat mengurangi transpor asam lemak bebas (*free fatty acid*/FFA) menuju hati. Penurunan asam lemak bebas ini akan berakibat pada menurunnya sintesis trigliserida di hati sehingga menyebabkan sintesis VLDL menurun. Asam klorogenat juga dapat menurunkan kerja SREBP-1 yang merupakan faktor transkripsi yang mengontrol sintesis lemak dan kolesterol di hati⁽²⁷⁾. Kafein dalam biji kopi diduga juga berperan dalam aktivitas antihiperlipidemia. Sebuah penelitian menunjukkan kafein dosis 20 dan 40 mg/kg BB secara per oral dapat menurunkan kadar trigliserida 2 jam pertama pada mencit terinduksi *olive oil*, namun terkait mekanismenya belum diketahui secara pasti⁽²⁶⁾.

Gambaran Histopatologi Aorta. Pengamatan preparat histopatologi aorta dilakukan setelah pengukuran profil lipid. Hasil pengamatan dengan



Gambar 1. Histopatologi aorta tikus, potongan melintang dengan pewarnaan HE, perbesaran 400x. A. Aorta tikus normal, B. kontrol negatif (CMC Na 1%), C. kontrol positif (simvastatin 0,9 mg/kg BB), D. EKH 200 mg/kg BB, E. EKH 400 mg/kg BB, F. EKH 800 mg/kg BB, → vakuolisasi.

mikroskop menunjukkan bahwa ekstrak kopi hijau dapat memperbaiki gambaran histopatologi aorta tikus model hiperlipidemia meskipun tidak sampai menyamai kondisi normalnya (Gambar 1). Pada gambar tersebut terlihat bahwa pada kelompok normal, lapisan dinding aorta tersusun rapi. Sel-sel otot polos vaskular dan sel endotel masih tersusun rapi (A). Pada tikus model hiperlipidemia, khususnya kontrol negatif, tampak bahwa sel otot polos pada bagian tunika intima mulai tidak beraturan, tampak adanya vakuolisasi (→). Lapisan sel endotel juga tidak tersusun rapi. Pada kelompok perlakuan, baik dengan simvastatin maupun ekstrak kopi hijau berbagai dosis menunjukkan adanya perbaikan pada struktur histologi aorta. Hanya sedikit vakuolisasi yang tampak. Berdasarkan penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya, ekstrak air kopi hijau dan kopi justru dapat menginduksi vakuolisasi ringan dari tunika media pada aorta tikus dibandingkan dengan tikus normal⁽²⁸⁾. Perbedaan hasil ini diduga akibat adanya perbedaan pelarut yang digunakan untuk ekstrak, sehingga senyawa yang tertarik dalam ekstrak juga akan berbeda.

SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kopi hijau dengan dosis 200 mg/kg BB berpotensi untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif obat

tradisional yang memiliki efek antihiperlipidemia dan efek protektif terhadap kardiovaskular.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Universitas Jember melalui Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LP2M) Unej atas dana hibah penelitian yang telah diberikan melalui program Penelitian Dosen Pemula.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization (WHO). Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Edited by: Mendis, S., Puska P., and Norrving, B. Geneva: WHO in Collaboration with World Heart Federation and World Stroke Organization. 2011.
2. World Health Organization (WHO). Cardiovascular Diseases (CVDs). Report on the Fact sheet No. 317. Geneva: WHO. 2013.
3. Kemenkes RI. Info Datin: Situasi kesehatan jantung. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2014.
4. Kemenkes RI. Profil kesehatan Indonesia 2012. Jakarta: Pusat Data dan Informasi Kemenkes RI. 2013.
5. Munzel T, Gori T, Bruno RM, and Taddei S. Translational medicine: is oxidative stress a therapeutic target in cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2010. 31:2741–9.
6. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella L, and Rezzani R. Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *BioMed Res Int*. 2014. 1-28.
7. Nirosha K, Divya M, Vamsi S, and Sadiq M. A review on hyperlipidemia. *Int. J Novel Trends Pharm Sci*. 2014. 4(5): 81-92.
8. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, and Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2013. 424: 245–52.
9. Wang H and Huo Y. Adhesion molecule and atherosclerosis – part II: pro inflammatory factors atherosclerosis: molecular and cellular mechanisms. British: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2010: 43-62.
10. Gumulya D and Helmi IS. Kajian Budaya Minum Kopi Indonesia. *Dimensi*. 2017. 13(2): 153-72.
11. Dirjen Perkebunan. Statistik perkebunan Indonesia 2015-2017: Kopi. Jakarta: Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan, Direktorat Jenderal Perkebunan, Kementerian Pertanian; 2016.
12. Onakpoya I, Terry R, and Ernst E. The use of green coffee extract as a weight loss supplement: a systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. *Gastroenterol Res Pract*. 2011. 2011:1-6.
13. Samadi M, Mohammadshahi M, and Haidari F. Green coffee bean extract as a weight loss supplement. *J Nutr Disorders Ther*. 2015. 5(4): 1-3.

14. Natania O and Musyabiq S. Efektivitas asam klorogenik dalam ekstrak kopi hijau untuk penurunan berat badan pasien obesitas. *Majority*. 2017. 7(1): 94-99.
15. Buchanan R and Becket RD. Green coffee for pharmacological weight loss. *Evid-Based Complementary Altern Med*. 2013. 18(4):309-313.
16. Farah, A. *Coffee: Emerging health effects and disease prevention*, 1st ed. New York: WileyBlackwell Publishing Ltd; 2012.
17. Ma Y, Gao M, and Liu D. Chlorogenic acid improves high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance in mice. *Pharm Res*. 2015. 32(4):1200-9
18. Cho AS, Jeon AM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, et al. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol*. 2010. 48:937-43.
19. Setyono J, Nugroho DA, Mustofa, and Saryono. Efek orlistat, ekstrak biji kopi hijau, dan kombinasinya terhadap kadar adiponektin dan profil lipid. *Jurnal Ners*. 2014. 9(1):26-34.
20. Cappelletti S, Daria P, Sani G, and Aromatario M. Caffeine: cognitive and physical performance enhancer or psychoactive drug. *Curr Neuropharmacol*. 2015. 13:71-88.
21. Patay EB, Bencsik T, and Papp N. Phytochemical overview and medicinal importance of *Coffea* species from the past until now. *Asian Pac J Trop Med*. 2016. 9(12):1127-1135.
22. Aziz Z, Cyriac S, Beena V, and Philomina PT. Comparison of cholesterol content in chicken, duck and quail eggs. *J Vet Anim Sci*. 2012. 43: 64-66.
23. Nurfadilah, Nurainiwati SA, Agustini SM. Pengaruh pemberian minyak deep frying terhadap perubahan histopatologi jantung tikus putih (*Rattus novergicus* strain Wistar). *Saintika Medika: Jurnal Ilmu Kesehatan dan Kedokteran Keluarga*. 2013. 9(1): 1-5.
24. Hasimun P, Sukandar EY, Adnyana IK, and Tjahjono DH. A simple method for screening antihyperlipidemic agents. *Int J Pharm*. 2011. 7(1):74-78.
25. Choi BK, Park SB, Lee DR, Lee HJ, Jin YY, Yang SH, et al. Green coffee bean extract improves obesity by decreasing body fat in high-fat-diet induced obese mice. *Asian Pac J Trop Med*. 2016. 2016:1-9.
26. Shimoda H, Seki E, and Aitani M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. *BMC Complem Altern M*. 2006. 6(9): 1-9.
27. Murase T, Misawa K, Minegishi Y, Aoki M, Ominami H, Suzuki Y, et al. Coffee polyphenols suppress diet-induced body fat accumulation by downregulating SREBP-1c and related molecules in C57BL/dJ mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011. 300: E122-33.
28. Nagla MF and Amr AR. Effect of green and roasted coffee beans extracts on some physiological parameters and histological structures in rats. *Afr J Biol Sci*. 2009. 5(2):181-95.

Evaluasi Pelayanan Pemantauan Terapi Obat di Rumah Sakit X Tangerang

(Evaluation of Therapeutic Drug Monitoring Services in Tangerang X Hospital)

FEBBYASI MEGAWATY*, SHIRLY KUMALA, SESILIA ANDRIANI KEBAN

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah,
Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 16 Oktober 2019, Disetujui: 6 April 2020

Abstrak: Pemantauan terapi obat (PTO) merupakan suatu kegiatan untuk meningkatkan efektivitas terapi dan meminimalkan risiko Reaksi Obat yang Tidak Dikehendaki (ROTD). Tujuan penelitian ini untuk menggambarkan kesesuaian pelaksanaan PTO dengan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia (Permenkes) Nomor 72 Tahun 2016 tentang Standar Pelayanan Kefarmasian di Rumah Sakit dan mengevaluasi pelaksanaan PTO yang dilakukan apoteker terhadap pasien rawat inap. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pengambilan data secara retrospektif menggunakan dokumen PTO pasien rawat inap selama periode Januari – Mei 2016 di rumah sakit X Tangerang. Hasil penelitian menunjukkan kesesuaian pelaksanaan PTO oleh apoteker berdasarkan standar adalah 73%. Jumlah pasien yang memenuhi kriteria inklusi sebanyak 50 pasien. Profil potensi pasien yang mendapatkan PTO berdasarkan diagnosis penyakit adalah hipertensi 10 pasien (20%), gagal jantung kongestif 9 pasien (18%) dan diabetes mellitus 8 pasien (16%). Profil potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan resep dengan jumlah obat lebih dari sepuluh adalah 29 pasien (58%). Profil potensi terjadinya interaksi obat pada pasien yang terdiagnosis lebih dari tiga macam penyakit adalah 19 pasien (38%). Pelaksanaan PTO sesuai standar pelayanan kefarmasian membutuhkan kompetensi apoteker farmasi klinik dengan pengalaman 2 tahun kerja. Potensi interaksi obat dapat dikontrol dengan melakukan prioritas PTO berdasarkan jumlah obat, komplikasi penyakit dan jenis penyakit.

Kata Kunci : Pemantauan terapi obat, resep polifarmasi, interaksi obat.

Abstract: Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is a clinical practice to increase the effectiveness of therapy and minimize the risk of adverse drug reactions (ADR). The purpose of this study is to describe the implementation of TDM, and whether it is in accordance with the Regulation of the Minister of Health of the Republic of Indonesia (Permenkes) Number 72 of 2016 concerning pharmaceutical service standards at hospitals and the evaluation of TDM services conducted by pharmacists on inpatients. This research covers a descriptive study with a collection of retrospective data from TDM documents of inpatients during the period of January–May 2016 at X Hospital, Tangerang. The implementation of TDM by pharmacists based on the standards was 73%. The number of patients who met the inclusion criteria were 50 patients. Based on the diagnosis of the disease, patients with the potential of receiving TDM were patients with hypertension (10 patients; 20%), congestive heart failure (9 patients; 18%), and diabetes mellitus (8 patients; 16%). Whereas patients with both potential drug interaction and prescribed with more than 10 drugs was 29 patients (58%), patients with both potential drug interaction and diagnosed with three types of diseases was 19 patients (38%). The implementation of TDM in accordance with pharmaceutical service standards requires the competence of clinical pharmacist pharmacists with 2 years work experience. Potential drug interactions can be controlled by prioritizing TDM based on the number of drugs, complications of the disease and type of disease.

Keywords: Therapeutic drug monitoring, adverse drug reaction, drug interaction.

*Penulis korespondensi
E-mail: febbyasi80@gmail.com

PENDAHULUAN

PELAYANAN farmasi klinik merupakan pelayanan langsung yang diberikan apoteker kepada pasien dalam rangka meningkatkan outcome terapi dan meminimalkan risiko terjadinya efek samping karena obat, untuk tujuan keselamatan pasien (*patient safety*) sehingga kualitas hidup pasien (*quality of life*) terjamin. Apoteker memberikan pelayanan kefarmasian berdasarkan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 72 tahun 2016 tentang Standar Pelayanan Keperawatan di Rumah Sakit. Standar farmasi bertujuan untuk meningkatkan mutu pelayanan kefarmasian, menjamin kepastian hukum bagi tenaga kefarmasian dan melindungi pasien serta masyarakat dari penggunaan obat yang tidak rasional dalam rangka keselamatan pasien⁽¹⁻³⁾.

Pemantauan Terapi Obat (PTO) adalah suatu proses yang mencakup kegiatan untuk memastikan terapi obat yang aman, efektif dan rasional bagi pasien. Kegiatan tersebut mencakup pengkajian pilihan obat, dosis, cara pemberian obat, respons terapi, reaksi obat yang tidak dikehendaki (ROTD), dan rekomendasi perubahan atau alternatif terapi. PTO harus dilakukan secara berkesinambungan dan dievaluasi secara teratur pada periode tertentu agar keberhasilan ataupun kegagalan terapi dapat diketahui. Seleksi pasien yang mendapatkan terapi obat adalah yang memiliki resep polifarmasi, kompleksitas penyakit dan penggunaan obat serta respons pasien yang sangat individual meningkatkan munculnya masalah terkait obat. Evaluasi pelaksanaan kegiatan perlu dilakukan untuk menjamin mutu dan pengendalian mutu pelayanan kefarmasian di rumah sakit. Kegiatan tersebut harus didukung oleh sumber daya manusia, sarana dan peralatan serta mempertimbangkan faktor risiko yang akan terjadi⁽¹⁾.

Beberapa risiko yang berpotensi terjadi dalam melaksanakan pelayanan farmasi klinik adalah faktor risiko yang terkait karakteristik kondisi klinik pasien (umur, gender, etnik, ras, status kehamilan, status nutrisi, status sistem imun, fungsi ginjal dan fungsi hati); faktor risiko yang terkait penyakit pasien (tingkat keparahan dan tingkat cedera yang ditimbulkan oleh keparahan penyakit); dan faktor risiko yang terkait farmakoterapi pasien (toksisitas, rute dan teknik pemberian serta ketepatan terapi). Setelah melakukan identifikasi apoteker harus mampu melakukan analisa, mengevaluasi dan mengatasi risiko melalui melakukan sosialisasi terhadap kebijakan pimpinan rumah sakit; mengidentifikasi pilihan tindakan untuk mengatasi risiko; menetapkan pilihan; menganalisa risiko yang mungkin masih ada dan mengimplementasikan rencana tindakan dengan menghindari, mengurangi,

memindahkan, menahan dan mengendalikan risiko. Beberapa unit di rumah sakit yang memiliki risiko tinggi antara lain *Intensive Care Unit*, Unit Gawat Darurat dan kamar operasi⁽⁴⁻⁵⁾.

Hasil meta-analisis yang dilakukan di Amerika Serikat pada pasien rawat inap didapatkan hasil angka kejadian reaksi obat yang tidak dikehendaki (ROTD) yang serius sebanyak 6,7% dan ROTD yang fatal sebanyak 0,32%. Sementara penelitian yang dilakukan di rumah sakit di Perancis menunjukkan masalah terkait obat yang sering muncul antara lain pemberian obat yang kontraindikasi dengan kondisi pasien (21,3%), cara pemberian yang tidak tepat (20,6%), pemberian dosis yang sub terapeutik (19,2%) dan interaksi obat (12,6%). Data dari penelitian yang dilakukan di satu rumah sakit di Indonesia menunjukkan 78,2% pasien geriatri selama rawat inap mengalami masalah terkait obat⁽⁶⁻⁹⁾.

Instalasi Farmasi Rumah Sakit X di Tangerang sampai saat ini belum melakukan evaluasi kesesuaian pelaksanaan PTO berdasarkan Standar Pelayanan Keperawatan di Rumah Sakit dan pelaksanaan PTO terhadap pasien rawat inap. Pelayanan farmasi klinik mulai tahun 2015 di *Intensive Care Unit* (ICU) dan tahun 2016 mulai dilaksanakan di ruang rawat inap VIP, kelas I sampai kelas III yang dilakukan secara bertahap apoteker yang bertanggung jawab terhadap pasien rawat inap berjumlah 5 orang dan yang memiliki pengalaman kerja diatas 2 tahun berjumlah 1 orang. Peneliti melakukan evaluasi kesesuaian pelaksanaan PTO untuk peningkatan mutu pelayanan farmasi klinik terhadap pasien rawat inap di rumah sakit dan menggambarkan keberadaan apoteker memiliki peran yang penting dalam mencegah munculnya potensi terjadinya interaksi obat^(2,10-12).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Data Hasil Pelaksanaan Pemantauan Terapi Obat Pasien Rawat Inap 2016.

METODE. Penelitian deskriptif ini dilakukan secara retrospektif menggunakan data pasien rawat inap. Kriteria inklusi merupakan pasien rawat inap yang mendapat pelayanan PTO oleh apoteker di Rumah Sakit X Tangerang periode Januari – Mei 2016. Kriteria eksklusi merupakan pasien rawat inap yang tidak mendapat pelayanan PTO di Rumah Sakit X Tangerang periode Januari – Mei 2016.

Pelaksanaan PTO disesuaikan Standar Pelayanan Keperawatan di Rumah Sakit dicatat pada formulir evaluasi dengan metode wawancara kegiatan yang dilakukan apoteker rawat inap dan dianalisis secara deskriptif. Evaluasi pelaksanaan PTO dengan cara mendata jumlah resep rawat inap, jumlah obat yang

terdapat dalam satu resep, dan jumlah diagnosis penyakit. Profil potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan pengkajian resep menggunakan *drug interaction checker* pada aplikasi *Medscape*⁽⁵⁾.

Sampel penelitian diperoleh dari objek yang diteliti mewakili seluruh populasi dengan menghitung besarnya sampel menggunakan ukuran proporsi dengan derajat akurasi pada tingkat yang bermakna berdasarkan rumus Slovin dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil pengkajian resep diperoleh dengan menggunakan rumus persentase dapat dilihat pada Gambar 2. Evaluasi pelaksanaan PTO berupa profil potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan jumlah obat, jumlah diagnosis penyakit dan penyakit yang menjadi prioritas dilaksanakan PTO.

$$n = \frac{N}{1 + N(d^2)}$$

Keterangan:
n = jumlah sampel minimal
N = jumlah populasi
D = tingkat kesalahan (5%)

Gambar 1. Rumus Slovin.

$$P(s) = \frac{S}{N} \times 100\%$$

Keterangan:
P(s) = persentase sub variable
S = jumlah skor tiap sub variabel
N = total skor sub variabel

Gambar 2. Rumus Persentase

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil wawancara kepada apoteker rawat inap yang melaksanakan PTO adalah 73% sesuai dengan Permenkes Nomor 72 Tahun 2016 sebagaimana ditunjukkan pada Tabel 1. Kegiatan pemantauan efektivitas dan efek samping terapi obat; pemantauan terapi obat; dan tindak lanjut rekomendasi tidak dilakukan karena tidak apoteker farmasi klinik dan pengalaman kerja apoteker masih dibawah 2 tahun sehingga kompetensi apoteker belum bisa melakukan assessment. Apoteker di rumah sakit X Tangerang melaksanakan PTO berdasarkan prioritas pasien dengan diagnosa komplikasi penyakit atau kompleksitas regimen seperti polifarmasi, variasi rute pemberian, variasi aturan pakai atau cara pemberian khusus^(3,12).

Jumlah 1.640 lembar resep pasien baru rawat inap di ruang ICU/ICCU/NICU/PICU, ruang VIP, dan ruang kelas I & II. yang mendapatkan pelayanan PTO 222 orang sebagaimana ditunjukkan pada tabel 2. Perhitungan sampel pasien rawat inap yang memenuhi kriteria inklusi menggunakan rumus slovin yaitu dari rata-rata perbulan pasien yang mendapatkan pelayanan PTO 44 orang pada *margin of error* 5% adalah sebesar 39,6 orang digenapkan menjadi 40 orang. Pemilihan *sample* dilakukan secara acak dan menambahkan 25% untuk menghindari kesalahan *sampling*, sehingga diperoleh sample penelitian 50 orang.

Tabel 1. Hasil evaluasi pelaksanaan pemantauan terapi obat pada pasien rawat inap berdasarkan standar Permenkes Nomor 72 Tahun 2016.

Parameter	Sub parameter	Skor
Pengkajian pemilihan obat, dosis, cara pemberian, respon terapi, reaksi obat yang tidak dikehendaki (ROTD)		1
Pemberian rekomendasi penyelesaian masalah terkait obat		1
Pemantauan efektivitas dan efek samping terapi obat		0
Tahapan Pemantauan Terapi Obat	Pengumpulan data pasien	1
	Identifikasi masalah terkait obat	1
	Rekomendasi penyelesaian masalah terkait obat	1
	Pemantauan	0
	Tindak lanjut	0
Penelusuran informasi dan penilaian kritis terhadap bukti terkini dan terpercaya		1
Kerahasiaan informasi		1
Kerjasama dengan tim kesehatan lain (dokter dan perawat)		1
Persentase		

Keterangan: skor 1) Dilaksanakan 0) Tidak dilaksanakan

Tabel 2. Profil pasien rawat inap Januari – Mei 2016.

Keterangan	Januari	Februari	Maret	April	Mei	Total	Rata-rata per-bulan
Jumlah resep	6.457	7.398	6.302	6.548	5.021	31.826	6.365
Jumlah pasien baru ICU/ICCU/NICU/PICU, VIP, Kelas I & II	584	293	291	271	201	1.640	328
Pasien yang mendapatkan pelayanan PTO	54	64	52	15	37	222	44

Tabel 3. Pasien rawat inap yang mendapatkan pemantauan terapi obat (n=50).

Keterangan Asal ruangan	Jumlah pasien	Persentase
ICU/ICCU/NICU/PICU	28	56
VIP	13	26
Kelas I & II	9	18

Tabel 4. Profil potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan kategori Klinis (n=50).

Jenis interaksi	Jumlah	Persentase
Kontra Indikasi	5	10
Serius	10	20
Monitoring	12	24
Minor	15	30
Tidak ada	11	22

Tabel 5. Profil Potensi terjadi interaksi obat pada pasien rawat inap ruang ICU/ICCU/NICU/PICU, VIP, Kelas I & II (n=50).

Jumlah Obat	Jumlah	%	Potensi terjadi interaksi obat			
			Ada	%	Tidak ada	%
Jenis kelamin						
Laki-laki	27	54	21	77.78	6	22.22
perempuan	23	46	19	82.60	4	17.39
Jumlah obat						
>10 item obat	29	58	28	96.55	1	3.44
6 – 10 item obat	17	34	10	58.82	7	41.18
<5 item obat	4	8	1	25	3	75
Jumlah penyakit						
>3 penyakit	19	38	18	94.73	1	5.26
2 penyakit	13	26	10	76.92	3	23.08
1 penyakit	18	36	11	61.11	7	38.89

Evaluasi pelaksanaan PTO terdiri dari pasien laki-laki 27 orang (54%) dan pasien perempuan 23 orang (46%) berdasarkan tabel 3. Pasien rawat inap yang paling banyak mendapatkan PTO adalah pasien baru di ruang ICU/ICCU/NICU/PICU sebanyak 28 orang (56%) karena sering mendapatkan resep polifarmasi. Profil potensi terjadinya interaksi obat ditunjukkan pada tabel 4 yang termasuk kontra indikasi terdapat pada 5 pasien (10%) dan tingkat keparahan serius

(mayor) ada 10 pasien (20%) mempunyai efek yang berpotensi mengancam nyawa/mampu menyebabkan kerusakan permanen. Data ini tidak dilakukan analisa secara klinis karena keterbatasan dilakukan secara retrospektif, sehingga peneliti tidak dapat melakukan pemantauan gejala klinik yang terjadi pada pasien. Selain itu, data tidak dapat dievaluasi sampai tahap akhir yaitu tindak lanjut PTO.

Profil potensi terjadinya interaksi obat sebagaimana

Tabel 6. Profil penyakit yang dilakukan pemantauan terapi obat (n=50).

Nama penyakit	Jumlah	Persentase
Hipertensi (HT)	10	20
Gagal Jantung Kongestif (CHF)	9	18
Diabetes Mellitus (DM)	8	16
Gastroenteritis (GEA)	4	8
Gagal Ginjal Kronis (CKD)	4	8
Shock Sepsis	2	4
Febris	2	4
Lain – lain	11	22

ditunjukkan pada tabel 5, berdasarkan jumlah obat paling banyak terjadi pada pasien yang mendapatkan resep > 10 item obat yaitu 28 orang (56%) sedangkan pasien yang mendapatkan resep < 5 item obat yaitu 1 orang (2%) paling sedikit terjadi interaksi obat. Profil potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan jumlah penyakit paling banyak terjadi pada pasien yang menderita > 3 penyakit adalah 18 orang (36%), sedangkan pasien yang menderita satu penyakit potensi terjadinya interaksi obat adalah 11 orang (22%). Hal ini dapat dijadikan acuan untuk apoteker sebagai pedoman melakukan seleksi pasien prioritas yang mendapatkan pelayanan PTO^(7,8,13).

Profil penyakit yang paling banyak dilakukan PTO oleh apoteker sebagaimana ditunjukkan pada tabel 6 adalah hipertensi (17%), gagal jantung kongestif (15%) dan diabetes mellitus (14%). Pertimbangan apoteker memilih pasien mendapat PTO berdasarkan jenis obat yang beresiko tinggi seperti obat dengan indeks terapi sempit (contoh: digoksin, fenitoin), obat yang bersifat nefrotoksik (contoh: gentamisin), hepatotoksik (contoh: OAT), antikoagulan (contoh: warfarin, heparin), obat yang sering menimbulkan ROTD (contoh: metoklopramid, AINS), dan obat kardiovaskular (contoh: nitrogliserin).

Apoteker melakukan identifikasi potensi interaksi obat dengan mengkategorikan ada indikasi tetapi tidak ada terapi, pemberian obat tanpa indikasi, pemilihan obat yang tidak tepat, dosis tidak sesuai (terlalu tinggi atau terlalu rendah), dan ketidakpatuhan pasien. Rekomendasi diberikan apoteker untuk meningkatkan kualitas hidup pasien berdasarkan catatan penggunaan obat dari awal pasien masuk rawat inap rumah sakit sampai pasien pulang di *medical record* dan formulir PTO. Jadwal pemberian obat selama masa perawatan bervariasi karena ada yang terapi dilakukan sampai sembuh dan terapi yang dihentikan karena menyebabkan peningkatan hasil pemeriksaan fisik atau pemeriksaan laboratorium. Apoteker langsung merekomendasikan solusi untuk obat yang tidak sesuai terapi kepada dokter dan melakukan pemantauan efek

obat terhadap pasien.

Rencana pemantauan terapi obat memiliki 3 tahap yaitu menetapkan parameter farmakoterapi, menetapkan sasaran terapi, dan menetapkan frekuensi pemantauan. Tahap PTO menggunakan metode *Subjective Objective Assessment Planning* (SOAP). Apoteker melakukan pencatatan data subyektif berdasarkan wawancara pasien dan melihat kondisi fisik yang dikeluhkan oleh pasien disesuaikan dengan potensi reaksi obat yang dikonsumsi. Data obyektif merupakan tanda vital (tekanan darah, suhu tubuh, denyut nadi, kecepatan pernafasan), hasil pemeriksaan laboratorium dan diagnostik⁽¹¹⁾.

Analisis profil potensi terjadinya interaksi obat dapat meminimalkan ROTD serta kemungkinan timbulnya masalah baru terkait obat yang dilakukan secara teratur oleh apoteker rawat inap. Rekomendasi terapi dapat diberikan kepada dokter dengan meneruskan terapi obat, menghentikan terapi obat, perubahan rute pemberian atau interval pemberian obat harus tercatat dalam *medical record* dan formulir PTO untuk ditindak lanjuti. Apoteker dapat melakukan evaluasi berdasarkan respon dari dokter terhadap rekomendasi apoteker, tindak lanjut yang sudah dilakukan dan pemantauan keberhasilan terapi obat dengan perkembangan data subjektif atau objektif pasien selama di rawat⁽¹⁴⁾.

SIMPULAN

Gambarkan pelaksanaan PTO kesesuaiannya dengan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia (Permenkes) Nomor 72 Tahun 2016 tentang Standar Pelayanan Kefarmasian di Rumah Sakit sudah dilakukan berdasarkan jumlah dan kemampuan apoteker. Pelaksanaan PTO yang dilakukan apoteker terhadap pasien rawat inap prioritas untuk mengetahui potensi terjadinya interaksi obat berdasarkan kategori klinis, jumlah obat, jumlah diagnosa penyakit dan jenis penyakit.

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia nomor 72 tahun 2016 tentang Standar Pelayanan Kefarmasian di Rumah Sakit. Jakarta: DepKes RI; 2016.
2. Jason Lazarou et al. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients. *JAMA*. 1998.279(15) dan J. Simon Bell, et al drug related problems in the community setting, download from www.medscape.com 24/05/2009.
3. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Pemantauan Terapi Obat. Jakarta: DepKes RI; 2009
4. Maher RL, Hanlon JT, Hajjar ER. Clinical consequences of polypharmacy in elderly. *Expert Opin Drug Saf*. 2014.13(1):57–65. doi: 10.1517/14740338.2013.827660.
5. Abe J, Umetsu R, Uranishi H, et al. Analysis of polypharmacy effects in older patients using japanese adverse drug event report database. *PLoS One*. 2017. 12(12).
6. Ahmed B, Nanji K, Mujeeb R & Patel MJ. Effects of polypharmacy on adverse drug reactions among geriatric outpatients at a Tertiary Care Hospital in Karachi. A prospective cohort study. *PLoS One*. 2014. 9(11).
7. American Pharmacist Association. Monitoring drug therapy: three steps for pharmacist. American Pharmacist Association. 2012. URL <https://pharmacist.com/monitoring-drug-therapy-three-steps-pharmacists> (accessed 23.3.18)
8. Coleman JJ, Ferner RE. & Evans SJW. Monitoring for adverse drug reaction. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2009.61(4):371-8.
9. Farias TF, Aguiar KS, Rotta I, Belletti KMS & Carlotto J. Implementing a clinical pharmacy service in hematology. *Einstein: Sao Paulo*. 2016.14(3):384-90.
10. Kang JS. & Lee MH. Overview of therapeutic drug monitoring. *Korean Journal of Internal Medicine*. 2009.24(1):1-10.
11. Kannan B, Nagella AB, Prabhu AS, Sasidharan GM, Ramesh AS & Madhugiri V. Incidence of potential drug-drug interactions in a limited and stereotyped prescription setting – comparison of two free online pharmacopoeias. *Cureus Journal of Medical Science*. 2016.8(11).
12. Lombardi N, Wei L, Ghaleb M, Pasut E, Leschiutta, S, Rossi P. & Troncon MG. Evaluation of the implementation of a clinical pharmacy service on an acute internal medicine ward in Italy. *BMC Health Services Research*. 2018.18(1):289.
13. Saddique AA. Development of clinical pharmacy services at King Khalid Univesity Hospital and its impact on the quality of healthcare provided. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2012.20(3):273-7.
14. Talasaz A H. The Potential role of clinical pharmacy services in patients with cardiovascular diseases. *The Journal of Tehran University Heart Center*. 2012.7(2): 41-6.

Formulasi *Curcuma zedoaria* sebagai Emulgel Antioksidan (Formulation of *Curcuma zedoaria* as an Antioxidant Emulgel)

YESI DESMIATY*, WIWI WINARTI, LINDAWATI, FAHLENI

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah,
Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 4 Maret 2019, Disetujui: 16 Desember 2019

Abstrak: *Curcuma zedoaria* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan potensial untuk dibuat menjadi sediaan antioksidan topikal. Emulgel adalah gabungan emulsi M/A dengan basis gel, memiliki banyak keuntungan diantaranya adalah kenyamanan dalam pemakaian. Pada penelitian ini dibuat formulasi emulgel menggunakan Sepigel 305[®] dengan variasi konsentrasi 3%, 4%, dan 5%. Pada basis gel ditambahkan ekstrak etanol *C. zedoaria* dengan variasi konsentrasi 1%, 2%, dan 5%. Terhadap sediaan dilakukan evaluasi mutu fisik dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Pada formula terpilih dilakukan uji stabilitas dipercepat selama tiga bulan pengamatan. Ekstrak etanol *C. zedoaria* memiliki aktivitas antioksidan dengan IC_{50} $49,72 \pm 0,32$ bpj. Sediaan emulgel terbaik adalah F2 yang mengandung Sepigel 305[®] 4% dan ekstrak 2%. Hasil uji stabilitas dipercepat menunjukkan sediaan stabil secara fisik (organoleptik, homogenitas, viskositas, sifat alir, kemampuan menyebar, dan uji tipe emulsi), pH memenuhi syarat dengan IC_{50} 135.8 bpj. Ekstrak etanol *C. zedoaria* dapat dibuat sediaan emulgel dengan menggunakan Sepigel 305[®], stabil secara fisik dan kimia, serta memiliki aktivitas antioksidan yang baik selama tiga bulan penyimpanan.

Kata kunci: *Curcuma zedoaria*, emulgel, Sepigel 305[®], antioksidan, DPPH.

Abstract: *Curcuma zedoaria* has a high antioxidant activity and potential to be made a topical antioxidant preparation. Emulgel is a combination of O/W emulsion with a gel base, and it has many advantages, including convenience in use. In this study, an emulgel formulation was made using Sepigel 305[®] with various concentrations (3%, 4%, and 5%). The emulgel formulation, the ethanol extract of *C. zedoaria*, was added with concentrations 1%, 2%, and 5%. The preparation was evaluated for physical quality and antioxidant activity using the DPPH method. In the selected formula, had been observing the accelerated stability tests were carried out for three months. Ethanol extract of *C. zedoaria* has antioxidant activity with IC_{50} 49.72 ± 0.32 ppm. The best emulgel preparation is F2, which contains Sepigel 305[®] 4% and extract 2%. The F2 emulgel formulation was found to be stable physicochemical properties (organoleptic, homogeneity, viscosity, flow properties, dispersion ability, and emulsion type test) upon the accelerated stability tests, and pH met the requirements with antioxidant activity gave IC_{50} 135.8 ppm. Ethanol extract of *C. zedoaria* can be made emulgel preparations using Sepigel 305[®], physically and chemically stable, and has an excellent antioxidant activity for the three months of storage.

Keywords: *Curcuma zedoaria*, emulgel, Sepigel 305[®], antioxidant, DPPH.

*Penulis korespondensi
E-mail: yesi.desmiaty@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

CURCUMA zedoaria merupakan salah satu tanaman suku Zingiberaceae yang banyak digunakan sebagai bahan obat tradisional di Indonesia (Jamu) dan umum dikenal dengan nama temu putih. Tanaman ini juga banyak ditemukan dan digunakan di Bangladesh, Sri Lanka, India, Cina, Jepang, serta Thailand. Secara tradisional rimpang *C. zedoaria* digunakan dalam pengobatan gangguan menstruasi, dispepsia, mual, kanker, karminatif, ekspektoran, diuretik, serta stimulan. Minyak atsiri rimpang *C. zedoaria* dilaporkan mengandung setidaknya 31 senyawa, yaitu 15 terpen, 9 alkohol, 6 keton, dan senyawa lainnya. Rimpang *C. zedoaria* mengandung polisakarida homogen, seskuiterpen termasuk *curcuzedoalide* serta mengandung kurkuminoid dengan kandungan terbanyak adalah kurkumin⁽¹⁻⁵⁾.

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa rimpang dan daun *C. zedoaria* memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat^(2,3,6,7). Dilaporkan pula ekstrak tanaman memiliki aktivitas anti-proliferasi dan invasi sel TE-8 yang menunjukkan potensinya sebagai anti kanker esofagus⁽⁸⁾, anti *Salmonella typhi*⁽⁹⁾, aktivitas mempercepat penyembuhan luka pada kasus diabetes⁽⁴⁾, serta aktivitas sitotoksik terhadap sel AGS sehingga potensial sebagai anti kanker lambung⁽⁵⁾.

Emulgel adalah suatu emulsi minyak dalam air atau air berminyak, yang di buat menjadi bentuk gel dengan cara mencampurnya dengan suatu *gelling agent*. Penggabungan emulsi dengan basis gel terbukti dapat meningkatkan stabilitas dan membuatnya menjadi sistem *dual control release* sehingga pelepasan zat aktif pada emulgel akan lebih baik dibandingkan dengan sistem *topical drug delivery* lainnya. Adanya fase gel membuat sediaan tidak terasa berminyak pada pemakaian sehingga lebih disukai⁽¹⁰⁾. Pada penelitian ini dilakukan formulasi emulgel berkhasiat antioksidan dari ekstrak etanol *C. zedoaria* dengan menggunakan Sepigel 305[®] sebagai *gelling agent*. Sepigel 305[®] juga berfungsi sebagai *stabilizing agent* sehingga sistem emulsi tetap stabil selama penyimpanan. Evaluasi sediaan emulgel meliputi pemeriksaan mutu fisik, kimia, dan aktivitas antioksidan. Formula terbaik dilanjutkan untuk uji stabilitas dipercepat selama tiga bulan dengan penyimpanan sediaan pada suhu 40°C dengan frekuensi pengujian pada bulan ke 0, 1, 2, dan 3.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Temu putih (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Sigma),

vitamin C, metanol p.a, etanol 96%, Sepigel 305[®], propilen glikol, paraffin cair, Tween 20, Span 20, metil paraben, propil paraben, natrium metabisulfit, parfum dan aquadest.

Alat. Seperangkat alat refluks, timbangan mikroanalitik (Mettler MT5), vakum evaporator (Heidolph), Spektrofotometri UV-VIS (UV 1800-Shimadzu), *water bath* (Memmert), sentrifugator (Kokusan, H-103 N), lumpang dan alu, *Ultraturrax homogenizer* (IKA T25, Jerman) dan mikroskop optik (Olympus).

METODE. Penyiapan Simplisia, Pembuatan Ekstrak dan Pemeriksaan Ekstrak. Bahan tanaman daun dan rimpang segar *C. zedoaria* dibersihkan dari pengotor, dikeringkan lalu digiling dan diayak dengan ayakan nomor 4/18 menjadi serbuk simplisia. Simplisia kering diekstraksi menggunakan alat refluks dengan pelarut etanol 96% selama 1 jam, disaring dan ekstraksi diulang sebanyak 7 kali. Semua ekstrak dikumpulkan, dipekatkan menggunakan rotavapor, dan dikentalkan diatas penangas air. Ekstrak yang diperoleh diuji organoleptis dan ketercampuran pelarut.

Uji Antioksidan Ekstrak. Aktivitas antioksidan diukur menggunakan metode yang diusulkan oleh Blois *et al* dengan modifikasi⁽¹¹⁾. Serbuk DPPH dilarutkan dalam metanol p.a (0,4 mM). Larutan DPPH (1,0 mL) ditambah 1,0 mL larutan ekstrak dalam metanol dengan seri konsentrasi dan ditambahkan metanol hingga 5,0 mL. Diperoleh konsentrasi akhir ekstrak adalah 25, 35, 45, 55, dan 65 bpj. Campuran diinkubasi pada suhu kamar dalam gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan yang dihasilkan dipantau pada 516,5 nm menggunakan spektrofotometri UV-VIS (UV 1800-Shimadzu). Semua pengujian dilakukan triplo. Nilai serapan yang diperoleh dari uji aktivitas antioksidan digunakan untuk menentukan persen (%) peredaman radikal bebas, dengan rumus:

$$\% \text{ hambatan} = \frac{\text{serapan blangko} - \text{serapan sampel}}{\text{serapan blangko}} \times 100\%$$

Dari hasil persen penghambatan dan konsentrasi ekstrak dihitung IC_{50} ekstrak.

Formulasi Sediaan Emulgel. Formula sediaan emulgel dapat dilihat pada Tabel 1. Fase minyak dibuat dengan mencampurkan Span 20 dengan paraffin cair pada suhu 70-80°C, lalu diaduk sampai homogen. Fase air dibuat dengan mencampur air dengan Tween 20, kemudian dipanaskan pada suhu 70-80°C, aduk sampai homogen. Fase minyak ditambahkan sedikit demi sedikit ke fase air sambil terus diaduk hingga terbentuk emulsi. Emulsi dicampurkan dengan Sepigel 305[®] yang telah dikembangkan hingga terbentuk

emulgel. Ekstrak *C. zedoaria* yang telah didispersikan dengan propilenglikol kemudian ditambahkan natrium metabisulfit, metil dan propil paraben, dan parfum secukupnya hingga aroma khas *C. zedoaria* tertutupi. Homogenkan dengan menggunakan *stirrer* pada rpm dan waktu yang optimum hingga homogen.

Evaluasi Sediaan Emulgel. Evaluasi fisika meliputi : uji organoleptik (uji warna, bau, dan bentuk emulgel); uji homogenitas emulgel (emulgel dioleskan diatas kaca objek lalu ditutup dan diamati tidak adanya butiran kasar); uji viskositas (menggunakan viskometer Brookfield tipe RV); uji sifat alir (dibuat kurva baku antara rpm dan gaya); uji tipe emulsi (menggunakan metode pewarnaan biru metilen dan sudan III kemudian diamati dibawah mikroskop); uji daya sebar (emulgel dimasukkan pada cincin teflon diameter luar 55 mm, ketebalan 3 mm, diameter dalam 15 mm dengan beralas kaca, diratakan, cincin teflon diangkat hati-hati, emulgel yang terbentuk ditutup dengan lempeng kaca dengan beban 200 gram, didiamkan selama 3 menit, diukur diameter permukaan emulgel yang melebar menggunakan jangka sorong, dan dihitung nilai penyebaran yaitu hasil perkalian kuadrat jari-jari dengan 3,14). Evaluasi kimia yaitu uji pH menggunakan pH meter. Uji aktivitas antioksidan sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria* menggunakan metode DPPH.

Uji Stabilitas Sediaan Emulgel. Terhadap formula terpilih dilakukan uji stabilitas sediaan selama 3 bulan pada oven suhu 40°C. Uji meliputi uji: evaluasi stabilitas fisik (organoleptik, homogenitas, viskositas dan sifat alir, kemampuan menyebar, dan uji tipe emulsi), evaluasi stabilitas kimia (pemeriksaan pH) dan uji aktivitas antioksidan.

Tabel 1. Formula emulgel ekstrak *C. zedoaria*.

Bahan	Formula (% (b/v))			
	Blangko	I	II	III
		1	1	1
Ekstrak <i>C. zedoaria</i>	-	2	2	2
		5	5	5
Sepigel 305®	4	3	4	5
Propilen glikol	5	5	5	5
Paraffin cair	4	4	4	4
Tween 20	2,5	2,5	2,5	2,5
Span 20	1,5	1,5	1,5	1,5
Metil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Propil paraben	0,2	0,2	0,2	0,2
Na. metabisulfit	0,1	0,1	0,1	0,1
Parfum	-	q.s	q.s	q.s
Air suling ad	100	100	100	100

HASIL DAN PEMBAHASAN

Curcuma zedoaria merupakan salah satu simplisia yang ditemukan dalam banyak resep jamu Indonesia. Hasil penelusuran pustaka menunjukkan telah banyak penelitian mengenai aktifitas rimpang *C. zedoaria*^(1-9,12). Untuk lebih meningkatkan manfaat dari rimpang ini maka pada penelitian dikembangkan formulasi sediaan emulgel antioksidan.

Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Jawa Barat yang menyatakan bahwa tanaman yang digunakan adalah *Curcuma Zedoaria* (Christm.) Roscoe. Hasil karakterisasi ekstrak kental *C. zedoaria* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakterisasi ekstrak kental *C. zedoaria* (Christm.) Roscoe.

No.	Uji	Hasil
1	Organoleptik	Warna : coklat hitam pekat Bau : wangi khas <i>C. zedoaria</i> Rasa : pahit Bentuk : ekstrak kental
2	pH	5,31
3	Ketercampuran pelarut	Air : (1:30) Propilenglikol : (1:10) Etanol 96 % : (1:10)
4	Rendemen ekstrak	14,93 %

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak. Hasil uji aktivitas antioksidan diperoleh IC_{50} ekstrak etanol *C. zedoaria* sebesar $49,72 \pm 0,32$ bpj menunjukkan ekstrak ini memiliki aktivitas sangat kuat ($IC_{50} < 50$ bpj). Digunakan vitamin C sebagai kontrol positif dengan IC_{50} $2,31 \pm 0,01$ bpj. Semua pengujian dilakukan triplo.

Hasil Uji Evaluasi Sediaan Emulgel Ekstrak *C. zedoaria*. Formulasi gel umumnya memberikan pelepasan obat lebih cepat dibandingkan dengan salep dan krim konvensional dan sediaan emulgel merupakan salah satu bentuk sediaan yang menguntungkan dalam sistem penghantaran bahan obat yang bersifat hidrofobik pada kulit^(13,14). Sehingga pada penelitian ini dipilih sediaan dalam bentuk emulgel yang diharapkan dapat lebih meningkatkan manfaat dari ekstrak *C. zedoaria*.

Hasil evaluasi fisik, kimia, serta antioksidan sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria* dapat dilihat pada Tabel 3. Dari hasil pemeriksaan organoleptik menunjukkan semua formula memberikan sediaan yang berwarna coklat muda dengan aroma khas temu putih yang berbaur dengan aroma parfum. Perbedaan konsentrasi Sepigel 305® mempengaruhi konsistensi emulgel. Formula 1 memiliki konsistensi semi solid

Tabel 3. Data parameter uji sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria*.

Parameter Uji	F 1	F2	F3
Sediaan emulgel dengan ekstrak <i>C. zedoaria</i> 1%			
Warna	Coklat muda	Coklat muda	Coklat muda
Bau	Aroma parfum	Aroma parfum	Aroma parfum
Bentuk	Semi solid (+)	Semi solid (++)	Semi solid (+++)
Homogenitas	H/R	H/R	H/R
Viskositas	55000	75000	90000
Sifat Alir	Plastis	Plastis	Plastis
Daya Sebar	4481,4 mm ²	3837,42 mm ²	2781,39 mm ²
pH	5,3	5,35	5,36
Aktivitas Antioksidan IC ₅₀	222,36 bpj	295,00 bpj	340,62 bpj
Sediaan emulgel dengan ekstrak <i>C. zedoaria</i> 2%			
Warna	Coklat muda	Coklat muda	Coklat muda
Bau	Aroma parfum	Aroma parfum	Aroma parfum
Bentuk	Semi solid (+)	Semi solid (++)	Semi solid (+++)
Homogenitas	SH	H/R	H/R
Viskositas	60000	75000	95000
Sifat Alir	Plastis	Plastis	Plastis
Daya Sebar	4389,07 mm ²	3759,16 mm ²	2578,97 mm ²
pH	5,28	5,33	5,34
Aktivitas Antioksidan IC ₅₀	113,68 bpj	116,34 bpj	199,93bpj
Sediaan emulgel dengan ekstrak <i>C. zedoaria</i> 5%			
Warna	Coklat pekat	Coklat pekat	Coklat pekat
Bau	Aroma parfum	Aroma parfum	Aroma parfum
Bentuk	Semi solid (+)	Semi solid (++)	Semi solid (+++)
Homogenitas	KH	KH	KH
Viskositas	70000	87500	100000
Sifat Alir	Plastis	Plastis	Plastis
Daya Sebar	4126,68 mm ²	3721,22 mm ²	2477,06 mm ²
pH	5,27	5,31	5,32
Aktivitas Antioksidan IC ₅₀	64,32 bpj	69,75 bpj	70,31 bpj

Keterangan:

F1 = Sepigel 305® 3% F2 = Sepigel 305® 4% F3 = Sepigel 305® 5%
 KH = kurang homogen SH = sedikit homogen H = homogen
 R = permukaan halus dan rata

namun tidak sekenyal seperti formula 2 dan 3. Sepigel 305® adalah suatu *gelling agent* dan pengental emulgel berbasis air (M/A) yang sangat baik, berbentuk kompleks, dan bersifat nonionik⁽¹⁵⁾ sehingga pada penelitian ini diharapkan terbentuk emulgel minyak dalam air (M/A) yang memiliki tekstur yang baik, nyaman digunakan di kulit, dan tetap stabil selama penyimpanan.

Pada uji homogenitas menunjukkan sediaan emulgel dengan konsentrasi ekstrak 2% memberikan homogenitas yang dapat bercampur dengan baik dan merata. Berdasarkan hasil evaluasi viskositas, emulgel F2 yang mengandung ekstrak *C. zedoaria* 2% memiliki viskositas terbaik. Hasil evaluasi uji daya sebar menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin menurun kemampuan menyebar sediaan emulgel. Kemampuan menyebar erat kaitannya dengan viskositas sediaan yaitu semakin besar viskositas, maka semakin kecil kemampuan menyebar suatu sediaan. Berdasarkan diameter

penyebaran yang didapatkan, menunjukkan bahwa semua formula sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria* dikategorikan sebagai emulgel semi cair (50 mm < diameter < 70 mm). Hasil pengamatan uji tipe emulgel menunjukan bahwa sediaan dengan konsentrasi 1%, 2%, dan 5% pada F1, F2, dan F3 merupakan emulgel tipe minyak dalam air (M/A). Semua sediaan memiliki sifat yang tidak lengket dan mudah dibersihkan dengan air sehingga lebih nyaman digunakan pada kulit.

Berdasarkan hasil uji kimia (pengukuran pH) sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria* konsentrasi ekstrak 1%, 2%, dan 5% pada formula 1, 2 dan 3 dengan adanya peningkatan konsentrasi Sepigel 305® terjadi peningkatan pH sediaan. Hal ini membuktikan bahwa variasi konsentrasi Sepigel 305® berpengaruh terhadap pH sediaan. Pada blangko, pH yang dihasilkan lebih tinggi dari F1, F2, dan F3. Semakin meningkat konsentrasi ekstrak *C. zedoaria*, semakin menurun pH sediaan emulgel, karena ekstrak memiliki pH asam. Semua formula masih memenuhi

rentang pH kulit yaitu 4,5 – 6,5 sehingga jika sediaan diaplikasikan ke kulit tidak menimbulkan iritasi.

Dari hasil uji aktivitas antioksidan sediaan, terlihat semakin meningkat konsentrasi Sepigel 305® menyebabkan semakin menurun aktivitas antioksidan, sementara peningkatan konsentrasi ekstrak *C. zedoaria* pada sediaan menyebabkan semakin meningkatnya aktivitas antioksidan.

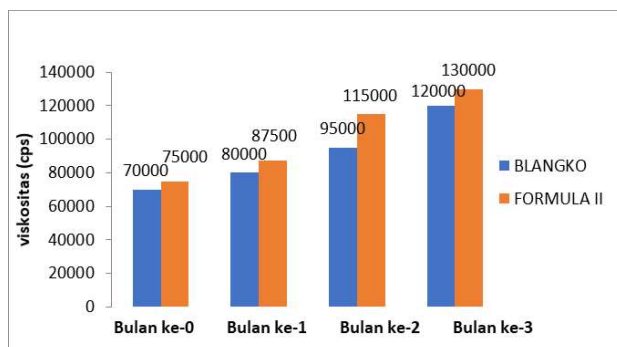
Dari hasil evaluasi ketiga formula, dipilih sediaan emulgel F2 dengan konsentrasi ekstrak *C. zedoaria* 2% sebagai formula yang terbaik, karena memiliki sediaan yang homogen, halus dan rata, memiliki pH yang masih masuk dalam rentang pH kulit dan juga yang memiliki bentuk, viskositas, dan kemampuan menyebar baik. Formula ini akan dilanjutkan pada pengujian stabilitas selama 3 bulan.

Uji Stabilitas Sediaan Emulgel. Uji stabilitas terhadap sediaan emulgel terpilih (F2) dilakukan selama 3 bulan pada suhu 40°C. Uji meliputi: evaluasi stabilitas fisik (organoleptik, homogenitas, viskositas dan sifat alir, kemampuan menyebar, dan uji tipe emulsi), evaluasi stabilitas kimia (pemeriksaan pH) dan uji aktivitas antioksidan.

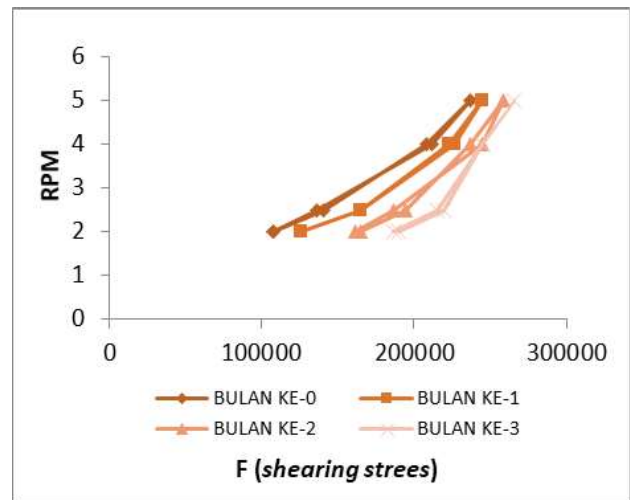
Berdasarkan hasil uji organoleptik sediaan emulgel pada bulan ke 1-3 menunjukkan bahwa blangko dan F2 tidak mengalami perubahan warna, bau, dan bentuk. Hal ini menunjukkan bahwa blangko dan F2 stabil selama masa penyimpanan pada suhu 40°C selama 3 bulan. Hasil uji homogenitas sediaan emulgel pada bulan ke 1-3 menunjukkan blangko dan F2 tidak mengalami perubahan dimana sediaan masih tetap homogen dengan permukaan yang halus dan rata. Evaluasi stabilitas viskositas ini bertujuan untuk melihat ada atau tidaknya perubahan profil kekentalan selama penyimpanan. Pada Gambar 1 dapat dilihat hasil evaluasi viskositas sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria*. Hasil pengukuran viskositas emulgel ekstrak *C. zedoaria* selama 3 bulan menunjukkan terjadi peningkatan nilai viskositas pada blangko

dan F2. Pada Gambar 2 menggambarkan reogram dari hasil evaluasi sifat alir blangko dan F2 yang dilakukan pada suhu 40°C selama 3 bulan. Penentuan sifat alir emulgel ekstrak *C. zedoaria* menggunakan viskometer Brookfield tipe RV.

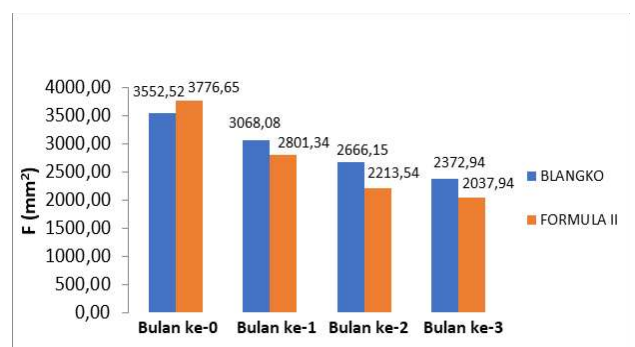
Hasil uji daya sebar sediaan emulgel ekstrak *C. zedoaria* dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil uji stabilitas sediaan emulgel pada suhu 40°C terjadi penurunan daya sebar pada blangko dan F2 karena viskositas sediaan yang semakin meningkat dan kemampuan menyebar akan semakin menurun pada tiap bulannya sehingga tekanan yang dibutuhkan suatu sediaan untuk menyebar akan semakin besar. Hal ini menunjukkan konsistensi sediaan masker gel cukup untuk menyebar saat diaplikasikan dan mampu mengalir dari tube dengan baik. Hasil uji tipe emulsi dan sentrifugasi sediaan emulgel pada suhu 40°C menunjukkan sediaan tetap stabil dalam bentuk M/A dan tidak mengalami pemisahan fase selama 3 bulan.



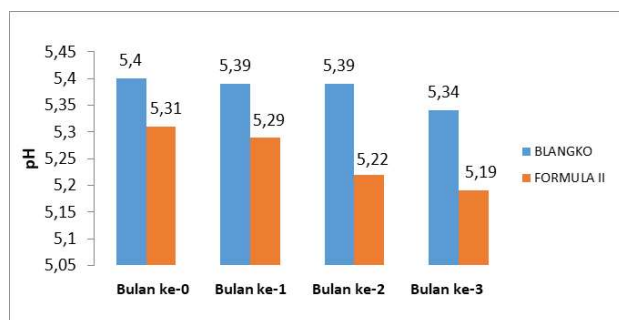
Gambar 1. Diagram hasil uji stabilitas viskositas emulgel ekstrak *C. zedoaria*.



Gambar 2. Grafik uji stabilitas sifat alir emulgel ekstrak *C. zedoaria* 2%.



Gambar 3. Diagram uji stabilitas daya sebar emulgel ekstrak *C. zedoaria* 2%.



Gambar 4. Hasil uji stabilitas pH sediaan emulgel pada suhu 40°C.

Hasil uji pH sediaan emulgel (Gambar 4) selama 3 bulan menunjukkan terjadinya penurunan pH selama penyimpanan. Hal ini disebabkan karena komponen aktif sediaan yang dipercepat dengan adanya peningkatan suhu. Reaksi kimia akan berlangsung lebih cepat pada suhu tinggi. Namun pH formula dan blangko masih memenuhi rentang pH kulit yaitu 4,5 – 6,5 sehingga jika sediaan diaplikasikan tidak menimbulkan iritasi. Pada Gambar 5 terlihat bahwa aktivitas antioksidan sediaan emulgel mengalami sedikit penurunan, tetapi hingga bulan ke-3 tetap memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sedang.

SIMPULAN

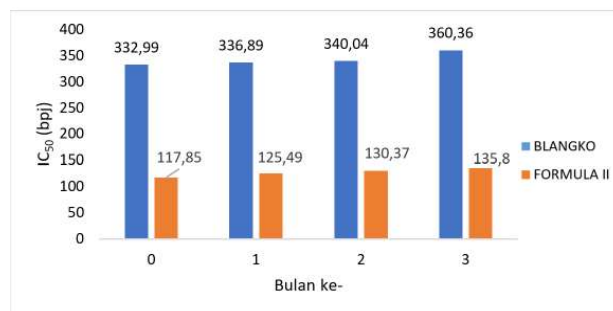
Ekstrak etanol *C. zedoaria* memiliki aktivitas antioksidan sebesar 49,72 bpj yang tergolong antioksidan kuat. Sediaan emulgel terbaik adalah sediaan yang mengandung ekstrak *C. zedoaria* 2% dengan konsentrasi Sepigel 305® 4% (F2), stabil secara fisik dan kimia, memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 117,85-135,8 bpj.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih pada Fakultas Farmasi Universitas Pancasila yang telah memberikan dana Hibah Insentif Fakultas Farmasi Universitas Pancasila 2018.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lan TTP, Huy ND, Luong NN, Nghi N Van, Tan TH, Quan LV, et al. Identification and characterization of genes in curcuminoid pathway of *Curcuma zedoaria* Roscoe. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(10):839–46.
2. Lobo R, Prabhu KS, Shirwaikar A, Shirwaikar A. *Curcuma zedoaria* Roscoe. (white turmeric): a review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(1):13–21.



Gambar 5. Hasil uji aktivitas antioksidan sediaan emulgel.

3. Huang SJ, Chyau CC, Tsai CH, Chen CC, Mau JL, Tsai SY. Antioxidant properties of extracts from *Curcuma zedoaria* rhizome. *Adv Mater Res*. 2015;1120–1:920–5.
4. Xu N, Wang L, Guan J, Tang C, He N, Zhang W, et al. Wound healing effects of a *Curcuma zedoaria* polysaccharide with platelet-rich plasma exosomes assembled on chitosan/silk hydrogel sponge in a diabetic rat model. *Int J Biol Macromol*. 2018;117(2017):102–7.
5. Jung EB, Trinh TA, Lee TK, Yamabe N, Kang KS, Song JH, et al. Curcuzedoalide contributes to the cytotoxicity of *Curcuma zedoaria* rhizomes against human gastric cancer AGS cells through induction of apoptosis. *J Ethnopharmacol*. 2018;213:48–55.
6. Singh P, Singh S, Kapoor IPS, Singh G, Isidorov V, Szczepaniak L. Chemical composition and antioxidant activities of essential oil and oleoresins from *Curcuma zedoaria* rhizomes, part-74. *Food Biosci*. 2013;3:42–8.
7. Desmiaty Y, Winarti W, Nursih AMM, Nisrina H, Finotory G. Antioxidant and antielastase activity of *Kaempferia rotunda* and *Curcuma zedoaria*. *Res J Chem Environ*. 2018;22(Special Issue 1):95–8.
8. Hadisaputri YE, Miyazaki T, Suzuki S, Kubo N, Zuhrotun A, Yokobori T, et al. Molecular characterization of antitumor effects of the rhizome extract from *Curcuma zedoaria* on human esophageal carcinoma cells. *Int J Oncol*. 2015;47(6):2255–63.
9. Rina Yanti Eff A. Efek anti-tifoid minyak atsiri temu putih (*Curcuma zedoria* Rosc.) pada tikus (*Rattus norvegicus* L) yang terinfeksi *Salmonella typhi*. *Pharm Sci Res*. 2018;5(3):116–22.
10. Ajazuddin, Alexander A, Khichariya A, Gupta S, Patel RJ, Giri TK, et al. Recent expansions in an emergent novel drug delivery technology: Emulgel. *J Control Release*. 2013;171(2):122–32.
11. 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):93–6.
12. Elfahmi, Woerdenbag HJ, Kayser O. Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *J Herb Med*. 2014;4(2):51–73.

13. Khullar R, Kumar D, Seth N, Saini S. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. *Saudi Pharm J.* 2012;20(1):63–7.
14. Mohammed Haneefa KP, Easo S, Hafsa P V., Prasad Mohanta G, Nayar C. Emulgel: An advanced review. *J Pharm Sci Res.* 2013;5(12):254–8.
15. Bergamante V, Ceschel GC, Marazzita S. Effect of vehicles on topical application of *Aloe vera* and *Arnica montana* Components. *Drug Deliv.* 2007;14:427–32.

Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Biologi Asam Kojat dari Fermentasi Cair *Aspergillus Flavus* LS03

(Isolation, Characterization and Biological Activities Assay of Kojic Acid from Liquid Fermentation of *Aspergillus Flavus* LS03)

HANI MULYANI¹, RIZNA TD, MEGAWATI DAN SOFA FAJRIAH

Pusat Penelitian Kimia, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia – LIPI
Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan, Banten 15314.

Diterima: 22 November 2019, Disetujui: 27 Maret 2020

Abstrak: *Aspergillus flavus* LS03 merupakan salah satu jenis jamur yang diisolasi dari tanah rhizosfer daerah Lombok Barat, yang menunjukkan potensi sebagai inhibitor α -glukosidase dan penangkap radikal bebas DPPH pada tahap awal screening aktivitas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi metabolit sekunder sebagai antidiabetes dan antioksidan dari kapang *A. flavus* LS03 yang ditumbuhkan pada media cair kaldu kentang (PDB). Pengujian aktivitas antidiabetes dilakukan berdasarkan penghambatan enzim α -glukosidase sedangkan antioksidan didasarkan pada kemampuan peredaman radikal bebas DPPH. Hasil pemisahan dan pemurnian diperoleh isolat aktif (1) yang diidentifikasi sebagai 5-Hidroksi-2-(hidroksimetil)-1,4-piran (asam kojat) berdasarkan data spektroskopi. Asam kojat (1) menunjukkan potensi kuat sebagai inhibitor enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 35,34 dan 149,9 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci: *Aspergillus flavus* LS03, inhibitor α -glukosidase, antioksidan, asam kojat,

Abstract: *Aspergillus flavus* LS03 is a type of fungus isolated from rhizosphere soil in West Lombok, which showed potential as an α -glucosidase inhibitor and free radical scavenger in the early stages of screening activity. This study aimed to identify and characterize secondary metabolite as antidiabetic and antioxidants from *A. flavus* LS03 fungus grown on liquid medium of potato broth (PDB). The testing of antidiabetic activity is based on the inhibition of the α -glucosidase enzyme while the antioxidant is based on the ability to reduce DPPH free radicals. The result of separation and purification was obtained by active isolate (1) which was identified as 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-1,4-piran (kojic acid) based on spectroscopic data. Kojic acid (1) shows strong potential as an α -glucosidase enzyme inhibitor and free radical DPPH with IC_{50} values of 35.34 and 149.9 $\mu\text{g / mL}$, respectively.

Keywords: *Aspergillus flavus* LS03, α -glucosidase inhibitor, antioxidant, kojic acid.

*Penulis korespondensi
E-mail: hmulyani@yahoo.com

PENDAHULUAN

PENYAKIT *degeneratif* adalah penyakit yang menyebabkan terjadinya kerusakan atau penghacuran terhadap jaringan atau organ tubuh, seperti penyakit jantung koroner, diabetes melitus, hipertensi, dan stroke. Jenis penyakit tersebut disebut juga *non communicable diseases* (NCDs) atau penyakit tidak menular. Proses dari kerusakan ini dapat disebabkan oleh penggunaan seiring dengan usia maupun karena gaya hidup yang tidak sehat. Di Indonesia, penyakit degeneratif mulai menjadi perhatian karena meningkatnya angka kejadian dan angka kematian. Berdasarkan data dari *International Diabetes Federation* (IDF), Indonesia tercatat sebagai negara peringkat keenam dengan beban penyakit diabetes mellitus (DM)- type 2 terbanyak di dunia dengan lebih dari 10 juta penduduk menderita diabetes 2017. Angka ini dilaporkan kian meningkat seiring berjalannya waktu, terbukti dari laporan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) yang menunjukkan prevalensi diabetes mellitus pada penduduk dewasa Indonesia sebesar 6,9% di tahun 2013, dan melonjak pesat ke angka 8,5% di tahun 2018⁽¹⁾.

Hiperglikemia merupakan faktor utama dalam perkembangan penyakit diabetes, dan mendorong produksi radikal bebas reaktif yang pada akhirnya akan menyebabkan stress oksidatif dalam berbagai jaringan⁽²⁾. Peningkatan produksi radikal bebas dan pengurangan pertahanan antioksidan sebagian dapat memediasi inisiasi dan perkembangan komplikasi terkait diabetes⁽³⁾. Oleh karena itu, senyawa aktif yang mampu menghambat peningkatan kadar gula darah dan juga mampu meredam radikal bebas dapat bermanfaat bagi pasien diabetes, tidak hanya untuk mempertahankan kadar antioksidan dalam tubuh tetapi juga untuk mengobati komplikasi jangka panjang yang dapat timbul. Hal ini mendorong penelitian untuk mencari sumber bahan obat dari bahan alam, termasuk tanaman dan mikroorganisme⁽⁴⁾.

Kapang dalam genus *Aspergillus* (*Moniliaceae*) telah banyak dilaporkan sebagai penghasil senyawa bioaktif seperti lovastatin, *xanthone*, butirolakton, antrakuinon, poliketida, dan alkaloid, beberapa di antaranya memiliki beragam kegiatan biologis seperti antikolesterol, antibakteri, antioksidan dan antikanker^(5,6). Dalam rangka pencarian senyawa aktif antidiabetes dan antioksidan dari kapang *Aspergillus*⁽⁷⁾, kami melakukan penelitian terhadap kapang *Aspergillus flavus* LS03 yang diisolasi dari tanah rhizosfer di daerah Lombok pada tahun 2007. Pada tahap pengujian awal, skrining awal ekstrak *Aspergillus flavus* LS03 menunjukkan penghambatan kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH dengan aktivitas masing-masing sebesar 43,84 μ g/mL dan 67,36 μ g/mL.

Berdasarkan hasil tersebut kapang *A. flavus* LS03 memiliki potensi sebagai sumber baru senyawa menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut

untuk mengisolasi senyawa tersebut dan mengetahui faktor-faktor yang dapat mempengaruhi produksi senyawa aktif tersebut. Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder yaitu faktor kimia (komposisi media kultur), faktor fisika (suhu, cahaya, kelembaban dan lain-lain), faktor genetik (genotipa sel), dan faktor stres lingkungan (logam berat, sinar UV)⁽⁸⁾. Oleh karena itu pada penelitian ini juga akan dilakukan kajian pengaruh media terhadap produksi senyawa aktif dari kapang *A. flavus* LS03 menggunakan media PDB (Potato Dextrose Broth), dan Potato Malt Peptone (PMP).

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah kapang *A. flavus* LS03 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, LIPI. Media fermentasi PDB (*potato dextrose broth*), glukosa, PDA (*potato dextrose agar*), malt ekstrak, Pepton diperoleh dari Difco. Reagen pengujian yang digunakan antara lain α -glukosidase [(EC 3.2.1.20)] tipe I: dari *Saccharomyces cerevisiae* dan p-nitrophenyl α -D-glucopyranoside (pNPG) diperoleh dari Wako Pure Chemical Industries Ltd. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan Follin-Ciocalteu 2 N diperoleh dari Sigma.

Alat. *Biosafety cabinet* (LabTech -1503B-A2), *room incubator* (Memmert), autoklaf (SIBATA), neraca analitik, penguap vacuum berputar (Buchi), dan spectrometer Hitachi U2000. Alat identifikasi terdiri dari Spectrometer FTIR Shimadzu PRESTIGE 21, LCMS/MS Xevo G2-XS QTOF (Waters) dan spektroskopi NMR JNM ECA500 (JEOL).

METODE. Pemilihan media pertumbuhan kapang *A. flavus* LS03. Isolat *A. flavus* LS03 ditumbuhkan pada 2 media berbeda masing-masing 1000 mL yaitu dengan menggunakan (PDB), dan (PMP) dengan tujuan untuk mengetahui media fermentasi yang dapat meningkatkan produksi dan aktivitas antidiabetes dan antioksidan. Adapun komposisi nutrisi pada media yang digunakan:

1. PDB : PDB 2.4%
2. PMP : PDB 2.4% ditambahkan 1,0% malt ekstrak, dan 0,1% pepton)

Kaldu fermentasi yang telah disterilkan diinokulasikan dengan menambahkan isolat *A. flavus* LS03 yang sebelumnya ditumbuhkan pada media agar selama 7 hari pada suhu 30°C diinokulasikan secara aseptik menggunakan cok bor berdiameter 6 mm sebanyak tiga buah pada 50 ml media cair yang digunakan, kemudian diinkubasi selama 10 hari pada suhu kamar. Setelah masa inkubasi selesai, biomasa dan filtrat dipisahkan kemudian masing-masing diekstraksi dengan etil asetat, dan dikeringkan dengan rotari evaporator. Ekstrak kering yang diperoleh digunakan untuk pengujian aktivitas menghambat kerja enzim

α -glukosidase dan radikal bebas DPPH.

Ekstraksi dan Isolasi. Peningkatan skala fermentasi dari *A. flavus* LS03 dilakukan setelah diketahui media fermentasi yang menghasilkan aktifitas tertinggi menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH. Fermentasi dilakukan dengan skala 5 L. Ekstrak etil asetat yang diperoleh diuji aktivitas menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH. Ekstrak yang paling aktif menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH dimurnikan lebih lanjut sehingga diperoleh senyawa aktif.

Pemisahan dilakukan dengan metode kromatografi kolom menggunakan silica gel G₆₀ (70-230 mesh) sebagai fase diam dengan eluen sistem peningkatan kepolaran. Eluat diidentifikasi dengan KLT. Eluat yang menunjukkan bercak tunggal pada KLT yang menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH diidentifikasi lebih lanjut untuk menentukan struktur kimianya berdasarkan identifikasi dengan metode analisis spektrofotometri UV-Vis, FTIR, NMR dan LC-MS.

Uji Aktivitas Penghambatan Enzim α -glukosidase. Pengukuran aktivitas dilakukan menurut metoda Kim *et al.*⁽⁹⁾. Larutan *p*-nitrofenil- α -D-glukopiranosida 5 mM sebanyak 250 μ L dan buffer fosfat pH 7,0, 1M sebanyak 495 μ L ditambahkan kedalam tabung reaksi yang berisi 5 μ L larutan contoh dalam DMSO dengan variasi konsentrasi 100; 50; 25; dan 10 μ g/mL. Setelah homogen larutan di preinkubasi selama 5 menit pada suhu 37°C, reaksi dimulai dengan penambahan 250 μ L larutan α -glukosidase (0,063 unit), inkubasi dilanjutkan selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan 1 ml Na₂CO₃ 0.2 M. Aktivitas enzim diukur berdasarkan pembacaan serapan *p*-nitrofenol yang terbentuk pada λ 400 nm. Kuersetin digunakan sebagai baku pembanding.

Presentasi aktivitas penghambatan diukur dengan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(C - S)}{C} \times 100$$

C = Absorban blanko (DMSO)

S = Absorban sampel (selisih absorban dengan dan tanpa enzim)

Pengujian Peredaman Radikal Bebas DPPH.

Aktivitas antioksidan dari ekstrak terhadap radikal bebas DPPH diukur menurut metoda Yen & Chen⁽¹⁰⁾. Larutan ekstrak (10-200 μ g) dalam 4 mL metanol ditambahkan larutan 1 ml DPPH (1 mM dalam metanol). Campuran dikocok dan didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Serapan yang dihasilkan diukur pada panjang gelombang 515 nm. Persen inhibisi sampel

dihitung berdasarkan perbedaan serapan antara blanko dan sampel.

Presentasi aktivitas penghambatan diukur dengan menggunakan persamaan:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(C - S)}{C} \times 100$$

C = Absorban blanko (metanol)

S = Absorban sampel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemilihan Media Optimum Kapang *A. flavus* LS03.

Pemilihan media cair yang sesuai akan mempengaruhi pertumbuhan kapang *A. flavus* LS03 yang pada akhirnya akan mempengaruhi sekresi metabolit sekunder yang diinginkan. Pada penelitian ini, dilakukan pemilihan media tumbuh yang sesuai untuk meningkatkan sekresi metabolit aktif, dengan mengkulturkan kapang *A. flavus* LS03 pada dua media yaitu PDB, dan PMP diinkubasi kondisi statis selama 10 hari pada suhu kamar. Setelah masa inkubasi selesai, biomasa dipisahkan dari filtrat, kemudian masing-masing keringkan dengan menggunakan evaporasi. Bobot ekstrak etil asetat dan aktivitas menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH dari setiap ekstrak dapat dilihat pada Tabel 1.

Pada Tabel 1 dapat dilihat bobot ekstrak pada media PDB filtrat lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak lainnya, diduga penambahan sumber nitrogen tidak mempengaruhi bobot ekstrak dan konsentrasi metabolit yang disekresikan oleh *A. flavus* LS03. Aktivitas penghambatan α -glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH dari setiap ekstrak yang diperoleh diukur dengan metoda spektrometri. Pada Tabel 1 ekstrak etil asetat media PDB filtrat menunjukkan aktivitas kuat baik pada penghambatan enzim α -glukosidase maupun peredaman radikal bebas DPPH dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Media PDB filtrat merupakan media yang paling cocok untuk menghasilkan senyawa aktif penghambatan α -glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH. Ekstrak etil asetat PDB filtrat (ekstraseluler) memperlihatkan aktivitas penghambatan enzim α -glukosidase maupun peredaman radikal bebas DPPH menunjukkan aktifitas tertinggi bandingkan dengan ekstrak biomasa (intraseluler), hal ini dikarenakan senyawa metabolit sekunder yang dikeluarkan oleh kapang *A. flavus* LS03 tersebut terjadi secara ekstraseluler. Berdasarkan hasil tersebut media PDB filtrat merupakan media yang paling sesuai untuk pertumbuhan kapang *A. flavus* LS03, Selanjutnya dilakukan fermentasi dengan skala lebih besar untuk mengisolasi senyawa menghambat kerja enzim α -glukosidase dan radikal bebas DPPH dari kapang *A. flavus* LS03.

Tabel 1. Bobot ekstrak etil asetat *A.flavus* LS03 dan aktivitas antidiabetes dan antioksidan.

Media	Ekstrak	Bobot ekstrak /1000 mL (g)	IC ₅₀ (µg/mL)	
			DPPH	α- Gis
PDB	B	0,43	314,29	149,90
	F	1,50	78,90	85,89
PMP	B	0,41	424,11	400,29
	F	0,52	138,94	229,95

Keterangan: B = biomasa; F = filtrat

Isolasi dan Pengujian Aktivitas Penghambatan α-glukosidase dan Peredaman Radikal Bebas DPPH. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, media PDB dipilih sebagai media yang paling sesuai dengan waktu fermentasi 10 hari menunjukkan aktivitas penghambatan α-glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH tertinggi. Berdasarkan hal tersebut, media ekstrak etil asetat PDB filtrat dipilih untuk penelitian lebih lanjut isolasi untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang aktif sebagai menghambat kerja enzim α-glukosidase dan radikal bebas DPPH.

Tahapan penelitian lebih lanjut, dilakukan fermentasi dengan skala 5 L media PDB dan waktu fermentasi 10 hari, sehingga diperoleh ekstrak biomasa dan ekstrak filtrat yang mencukupi untuk penelitian lebih lanjut. Setelah masa inkubasi selesai, biomasa dipisahkan dari filtrat, kemudian masing-masing keringkan dengan menggunakan evaporasi. Media ekstrak etil asetat PDB filtrat dipilih untuk penelitian lebih lanjut isolasi untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang aktif sebagai antidiabetes dan antioksidan dari kapang *A. flavus* LS03 dengan cara kromatografi. Ekstrak PDB filtrat yang dihasilkan berupa pasta berwarna coklat kehitaman yang bercampur dengan kristal, sehingga untuk memperoleh senyawa murni, pada ekstrak tersebut dilakukan reskristalisasi dari pelarut *n*-heksana dan metanol hingga diperoleh berupa kristal berwarna putih kekuningan berupa jarum tajam isolat (1) sebanyak 35 mg. Selanjutnya pada isolat (1) dilakukan uji aktivitas penghambatan α-glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH dan analisa spektrometri untuk mengidentifikasi struktur molekul dengan menggunakan instrumen spektrometer UV-Vis, FTIR, NMR dan LC-MS.

Hasil isolasi fermentasi ekstrak PDB filtrat menghasilkan isolat (1) yang mempunyai aktivitas penghambatan α-glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Tabel 2. Penelitian tentang metabolit yang dihasilkan *A. flavus* telah banyak dilaporkan menghasilkan metabolit sekunder yang mempunyai bioaktivitas menguntungkan. Isolat (1) mempunyai potensi penghambatan α-glukosidase dan peredaman radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Tabel 3 dengan nilai IC₅₀ masing-masing 35,34 dan

149,9 µg/mL.

Teknologi fermentasi merupakan upaya manusia dalam memanfaatkan bahan-bahan yang relatif murah bahkan kurang berharga menjadi produk yang bernilai ekonomi tinggi dan berguna bagi kesejahteraan hidup manusia. *A. flavus* bisa dimanfaatkan proses transformasi sel mikroba dapat digunakan untuk mengubah suatu senyawa menjadi senyawa lain yang masih memiliki kemiripan struktur namun memiliki nilai komersial yang lebih tinggi. Proses transformasi dengan menggunakan mikroba ini lebih baik dapat berlangsung pada suhu rendah tanpa menggunakan katalis logam berat bila dibandingkan dengan proses kimia. Berkaitan dengan penggunaan reagen kimia yang lebih sedikit produksi yang dihasilkan dan membutuhkan katalis logam berat yang berpotensi menimbulkan proses yang tidak ramah lingkungan.

Identifikasi Senyawa Aktif. Untuk menentukan struktur molekul senyawa murni isolat (1) dilakukan analisis spektrometri ultraviolet untuk mengetahui adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan FTIR untuk mengidentifikasi gugus-gugus fungsional. Penentuan jumlah posisi proton dan karbon dilakukan dengan spektrometri resonansi magnetik inti proton (¹H-RMI) dan karbon 13 (¹³C-RMI), Spektrometri massa untuk mengetahui bobot molekul senyawa.

Isolat (1) dianalisis dengan spektrometer UV/Vis menunjukkan puncak absorpsi pada λ maksimum 215 nm dalam pelarut metanol yang menunjukkan adanya senyawa yang mengandung gugus karbonil yang berkonjugasi dengan gugus etilen⁽¹¹⁾. Identifikasi isolat (1) dengan spektrometri inframerah dilakukan untuk penentuan gugus fungsi. Data FTIR (Gambar 1) menunjukkan adanya gugus hidroksi (-OH) yang muncul pada bilangan gelombang ν 3360 cm⁻¹, gugus C-H alifatik pada ν 2926 cm⁻¹ (tajam), gugus keton ν 1616 cm⁻¹. Selain itu, gugus aromatik juga muncul pada ν 1105 cm⁻¹, 1074 cm⁻¹ dan 1053 cm⁻¹.

Untuk mengetahui jumlah proton dan karbon yang dimiliki isolat (1) maka dilakukan pengukuran dengan ¹H-RMI dan ¹³C-RMI. Berdasarkan hasil spektrometri magnet inti proton (¹H-RMI, CD₃OD, 500 MHz) pada Gambar 2 terlihat adanya dua buah proton singlet CH sp₂ pada pergeseran kimia pada δ_H 7,95 (1H, s, H-2) dan 6,49 (1H, s, H-3) ppm. Selain itu, gugus metilen

oksi (CH₂-OH) juga muncul pada pergeseran kimia δ_H 4.41 ppm (s, 2H, H-7). Untuk pengukuran jumlah karbon, dilakukan

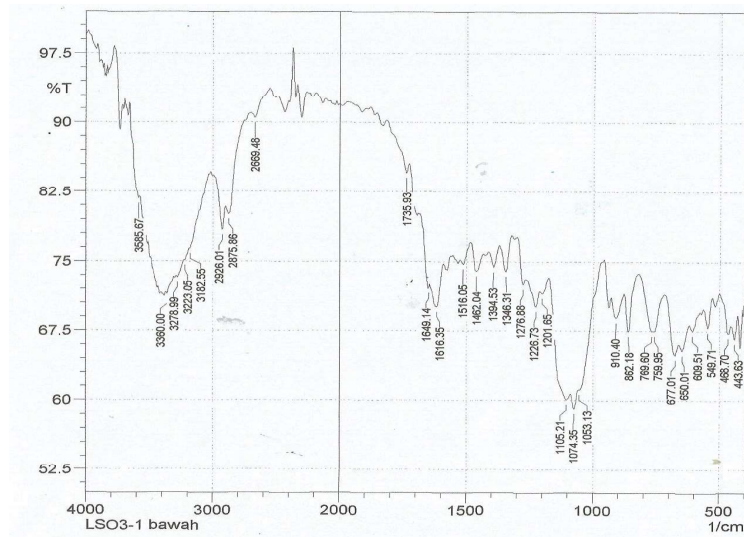
pengukuran dengan ¹³CNMR yang ditunjukkan pada Gambar 3.

Tabel 2. Data bobot dan rendemen ekstrak kapang *A. flavus* LS03 media PDB.

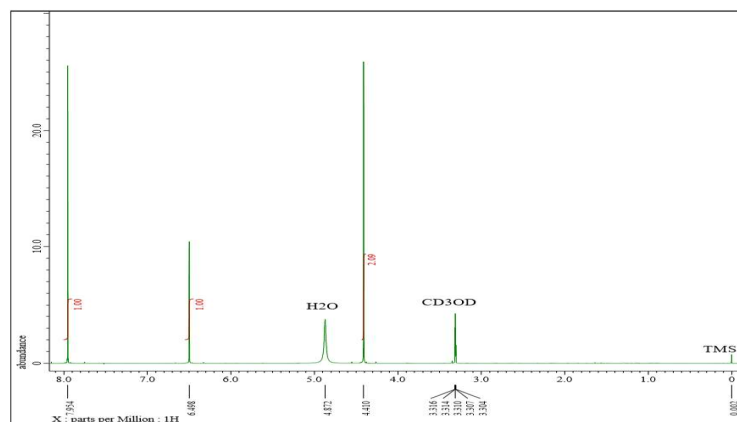
No	Sampel	Bobot sampel (g)	Rendemen (%)
1	Biomasa	2,2345	0,04
2	Filtrat	5,1243	0,10

Tabel 3. Bioaktivitas isolat (1).

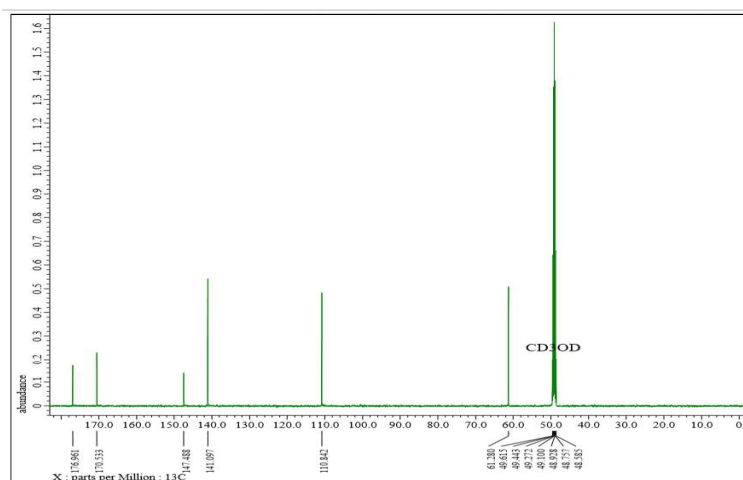
Sample	IC ₅₀ (µg/mL)	
	α-GIs	DPPH
Asam Kojat	35,34	149,9



Gambar 1. Spektrum FTIR isolat (1).



Gambar 2. Spektrum ¹HNMR isolat (1) dalam CD₃OD.



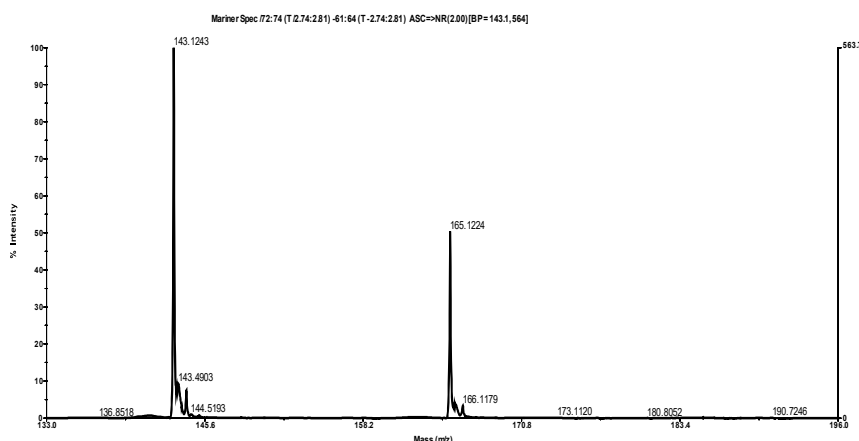
Gambar 3. Spektrum ^{13}C -NMR isolat (1) dalam CD_3OD .

Berdasarkan data ^{13}C -RMI (CD_3OD , 125 MHz), isolat **1** mempunyai 6 buah karbon, terdiri dari 2 buah karbon metin, 1 buah metilen, dan 3 buah karbon kuarterner. Dua buah CH sp_2 muncul pada pergeseran kimia δ_{C} 141,1 (C-6) dan 110,8 (C-3) ppm, 1 buah metilen oks ($\text{CH}_2\text{-OH}$) muncul pada pergeseran kimia δ_{C} 61,3 ppm (C-7), dan 3 buah karbon kuarterner terlihat pada pergeseran kimia δ_{C} 147,5 (C-5), 170,5 (C-2), dan 176,9 (C-4). Gugus karbonil pada ester siklik muncul pada pergeseran kimia δ_{C} 176,9 ppm.

Penentuan bobot molekul dari isolat (**1**) dalam pelarut metanol dilakukan dengan spektrometer LC-MS, menghasilkan puncak tunggal pada waktu retensi 2,8 menit dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan hasil pengamatan dengan LC-MS menunjukkan bahwa senyawa isolat (**1**) dengan bobot molekul (m/z) 143,12 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, dengan demikian bahwa senyawa isolat (**1**) memiliki berat molekul sebesar 142,12.

Berdasarkan hasil analisis spektrometer UV/Vis, FTIR, ^1H -NMR dan ^{13}C -NMR, LC-MS dan perbandingan dengan literature⁽¹²⁾ isolat **1** merupakan senyawa 5-hidroksi-2-hidroksimetil-1,4-piron (asam kojat). Asam kojat sangat mudah larut dalam air, etanol, dan aseton; mudah larut dalam etil asetat, kloroform, dan piridin. Asam kojat membentuk kristal jarum prismatis dengan aseton, etanol, eter etil asetat dan metanol. Titik leburnya adalah 153-154 $^{\circ}\text{C}$ dan memiliki nilai pKa berkisar dari 7,90 hingga 8,03. Gambar 5 menunjukkan rumus bangun dari asam kojat.

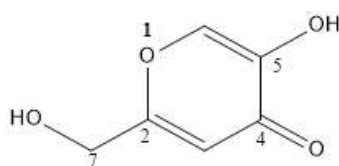
Asam kojat adalah metabolit sekunder yang banyak diproduksi oleh spesies jamur dari genus *Aspergillus* dan *Penicillium* melalui proses fermentasi dalam kondisi aerob. *A. flavus* merupakan salah satu jenis jamur yang tidak hanya sering mengkontaminasi makanan, juga bersifat patogen pada tumbuhan dan manusia. Jamur jenis ini dapat menyebabkan infeksi



Gambar 4. Hasil analisis LC-MS dari isolat (1).

Aspergillo dan juga merupakan jamur yang paling banyak menghasilkan aflatoksin akan tetapi kapang *A. flavus* menghasilkan metabolit sekunder yang berguna bagi manusia yaitu memiliki potensi yang paling besar dalam memproduksi asam kojat dibandingkan dengan spesies *Aspergillus* lain⁽¹³⁾.

Asam kojat dalam dunia kedokteran sebagai penghilang rasa sakit dan antiinflamasi, sedangkan dalam industri makanan, asam kojat digunakan sebagai prekursor untuk penguat rasa, pengawet, dan antioksidan yang dapat meningkatkan stabilitas lemak dan minyak⁽¹⁴⁾. Penggunaan asam kojat yang paling banyak ditemui adalah dalam bidang kosmetik, yaitu sebagai pemutih dan pelindung terhadap radiasi sinar UV⁽¹⁵⁾.



Gambar 5. Struktur asam kojat.

Hasil uji terhadap enzim α -glukosidase dan antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan bahwa asam kojat mempunyai potensi sebagai inhibitor α -glukosidase dan penangkap radikal bebas dengan IC_{50} masing-masing sebesar 35,34 dan 149,9 $\mu\text{g/mL}$. Mekanisme kerja asam kojat didefinisikan dengan baik dan telah terbukti bertindak sebagai inhibitor kompetitif dan reversibel dari hewan dan tumbuhan polifenol oksidase, xanthine oksidase, dan beberapa asam oksida-amin⁽¹⁴⁾. Asam kojat mengandung senyawa-senyawa fenolik umumnya menunjukkan aktivitas sebagai antioksidan, terutama senyawa yang memiliki gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus $-\text{OH}$ dan $-\text{OR}$ ⁽¹⁶⁾.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, asam kojat dari kapang *A. flavus* LS03, berpotensi sebagai antidiabetes dengan aktivitas sebagai penghambat α -glukosidase dan juga mampu meredam radikal bebas. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui mekanisme lebih lanjut dari senyawa ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Balitbangkes. Hasil utama Riskesdas 2018-Kementrian Kesehatan. Diambil dari www.kemkes.go.id/re-sources/download/infoterkini. Diakses 23 Maret 2020.
- Ramkumar, K.H., Thayumanavan, B., Palvannan, T., Rajaguru, P. Inhibitory effect of *Gymnema montanum* leaves on α -glucosidase activity and α -amylase activity and their relationship with polyphenolic content. *Med. Chem. Res.*, 19, 948-96, 2009
- Yao Y, Sang W, Zhou M, Ren G. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *J. Agric. Food Chem.* 2010. 58: 770-4.
- Mayur, B., Sandesh, S., Shruti, S., Yum, S.S. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of *Carpesium abrotanoides* L. *J. Medic. Plant Res.* 2010. 4(15), 1547-53.
- Al-Fakih AA, Almaqtri WQA. Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology.* 2019. 10(4):191-209.
- Dewi RT, Tachibana S, Darmawan A. Antidiabetic and antioxidative activities of butyrolactone I from *Aspergillus terreus* MC751. *World Academy, Science Engineering Technology.* 2012. 70:882-7.
- Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Medical Mycology.* 2009. 47: 542-6.
- Mariska I. Metabolit Sekunder: Jalur pembentukan dan kegunaannya. Badan Litbang Bioteknologi & Sumberdaya Genetik Pertanian. [serial online]. Diambil dan URL: <http://biogen.litbang.pertanian.go.id>, 2013. Diakses 28 November 2017.
- Kim YM, Wang MH, and Rhee HI. A novel α -glucosidase inhibitor from pine bark. *Carbohydr Res.* 2004. 339: 715-7.
- Yen GC, Chang YC, Sheu F, and Chiang HC. Isolation and characterization of antioxidants compound from *Aspergillus candidus* broth filtrate. *J. Agri Food Chem.* 2001. 49: 1426-31.
- Kosela S. Cara mudah dan sederhana penentuan struktur molekul berdasarkan *spectra data* (NMR, MASS, IR, UV). Lembaga penerbit Fakultas Ekonomi Universitas Indonesia: 2010. h. 200-1.
- Li Y, Teng Z, Parkin KL, Wang Q, Zhang Q, Luo W, Luo W, Ma D, Zhao M. Identification of bioactive metabolites dihydroconadensolid, kojic acid, and vanillic acid in soy sauce using GC-MS, NMR spectroscopy, and single-crystal X-ray diffraction. *J. agric. Food Chem.* 2014. 62 (33):8392-801.
- Sulistyaningrum LS, Optimasi asam kojat oleh galur mutan *Aspergillus flavus* NTGA7A4UVE10. Tesis sarjana Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok. 2008. h. 40-1.
- Burdock GA, Soni, Carabin. Evaluation of health aspect of kojic Acid in food. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 2001. 33(1):80-101.
- Ohyama Y and Mishima Y. Melanogenesis - inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance Journal* 1990. 6:53-8.
- Chandra S and Dave R. In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An Overview. *Afr. J. Microbiol Res.* 2009. 3(13): 981-96.

Uji Aktivitas Antihialuronidase In Vitro dan Karakteristik Fisik *Nanostructured Lipid Carrier* Ekstrak Rimpang Langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet*)

(In Vitro Antihyaluronidase Activity and Physical Properties of *Alpinia zerumbet* Rhizome Extract-Loaded Nanostructured Lipid Carrier)

SITI UMRAH NOOR*, DIAN RATIH LAKSMITAWATI,
WAHONO SUMARYONO

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah,
Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 10 Januari 2020, Disetujui: 31 Maret 2020

Abstrak: Rimpang langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm) mengandung senyawa fenolat, memiliki aktivitas antihialuronidase yang dapat mengurangi kerutan pada kulit. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan karakteristik fisik serta aktivitas antihialuronidase *nanostructured lipid carrier* (NLC) dari ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* secara in vitro. Serbuk rimpang *Alpinia zerumbet* 4/18 diekstraksi dengan metode maserasi kinetik menggunakan pelarut etanol 70%, dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada tekanan 100 mmHg dan pada suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$. Ekstrak yang dihasilkan dipreparasi ke dalam nanopartikel dengan sistem penghantaran NLC menggunakan polietilen glikol-8 beeswax, isopropil miristat dan akrilil glikosida dengan metode *high speed homogenization-ultrasonication*. NLC ekstrak yang dihasilkan dilakukan karakterisasi meliputi ukuran dan morfologi nanopartikel, indeks polidispersitas, dan potensial zeta, serta ditentukan uji aktivitas antihialuronidase menggunakan metode dari Sigma Aldrich dan Tu&Tawata dengan sedikit modifikasi. Hasil karakterisasi NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* adalah berukuran 171,3 nm; indeks polidispersitas 0,37; dan zeta potensial -26,8 mV dengan bentuk sferis. Hasil uji aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak adalah 552,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dapat disimpulkan NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dapat di formulasi ke dalam sediaan topikal yang berpotensi sebagai antihialuronidase dengan kemampuan mengurangi kerutan pada kulit.

Kata kunci: Ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet*, NLC, aktivitas antihialuronidase.

Abstract: The rhizome of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt & R.M. Sm) contains phenolic compounds, has antihyaluronidase activity which can reduce wrinkles on the skin. This study aims to determine the physical characteristics and antihyaluronidase activity of the nanostructured lipid carrier (NLC) of the *Alpinia zerumbet* rhizome extract in-vitro. *Alpinia zerumbet* rhizome powder (4/18) was extracted by kinetic maceration method using 70% ethanol solvent, concentrated with a rotary vacuum evaporator at 100 mm Hg at a temperature of $\pm 50^{\circ}\text{C}$. The resulting extract was prepared into NLC nanoparticles using polyethyleneglycol 8-beeswax, isopropyl myristate, and acrylyl glucoside with the high speed homogenization-ultrasonication method. The resulting NLC extracts were characterized by nanoparticle size and morphology, polydispersity index, and zeta potential and antihyaluronidase activity test was determined using the Sigma Aldrich and Tu & Tawata methods with slight modifications. The results of the NLC characterization of *Alpinia zerumbet* rhizome extract size were 171.3 nm; polydispersity index were 0.37; zeta potential were -26.8 mV; and had a spherical shape. The results of the antihyaluronidase activity of *Alpinia zerumbet* rhizome extract loaded NLC was 552.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It was concluded that the *Alpinia zerumbet* rhizome extract loaded NLC can be formulated into topical preparations which have the potential to be antihyaluronidase with the ability to reduce wrinkles on the skin.

Keywords: *Alpinia zerumbet* rhizome extract, NLC, antihyaluronidase activity.

*Penulis korespondensi
E-mail: siti.umrahnor@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

SALAH satu tanda kerusakan atau penuaan kulit ialah hilangnya elastisitas dan fleksibilitas yang menyebabkan timbulnya kerut. Semakin bertambahnya usia, konsentrasi asam hialuronat semakin berkurang sehingga kulit menjadi kendur, pucat, dan kusam⁽¹⁾. Asam hialuronat memberikan pengaruh pada hidrasi maupun molekul pembentuk matriks ekstraselular dan dipengaruhi beberapa senyawa diantaranya hialuronidase yang terdapat pada dermis kulit^(2,3). Hialuronidase merupakan mukopolisakarida yang menghidrolisis glikosaminoglikan pada matriks ekstraselular. Ketika asam hialuronat menurun dan aktivitas hialuronidase meningkat, maka kelembaban dan ketegangan kulit berkurang, sehingga dibutuhkan inhibitor hialuronidase yang memiliki efek anti-kerut dan antipenuaan⁽⁴⁾.

Polifenol merupakan senyawa yang memiliki efek antioksidan, salah satu senyawanya adalah golongan fenolat⁽⁵⁾. Langkuas laki-laki (*Alpinia zerumbet*) merupakan tanaman yang tumbuh di daerah tropis dan subtropis⁽⁶⁾. Memiliki kandungan polifenol pada bagian rimpang yaitu *5,6-dyhydrokawain* (DK), *dihydro-5,6-dyhydrokawain* (DDK), dan *12-labdadiene-15*⁽⁷⁾. Hasil penelitian Chompoo, dkk, bahwa ekstrak etanol rimpang *Alpinia zerumbet* memiliki kandungan fenolat dan aktivitas antioksidan yang cukup besar⁽⁸⁾. Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penentuan aktivitas antihialuronidase (IC₅₀) in vitro dari nanopartikel ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet*. Aktivitas Antihialuronidase (IC₅₀) in vitro dari ekstrak telah ditentukan dan diperoleh sebesar 81,04 µg/mL.

Aplikasi teknologi nanopartikel dalam bidang farmasi mempunyai keunggulan seperti meningkatkan kelarutan dan mengurangi dosis penggunaan. Sifat pembawa bahan nanopartikel mempunyai keuntungan seperti mencegah hidrasi kulit, meningkatkan efek absorpsi, meningkatkan penetrasi bahan aktif dan bersifat lepas terkendali. Nanopartikel ekstrak yang dibuat menggunakan sistem penghantaran *Nanostructured Lipid carrier* (NLC)⁽⁹⁾. NLC memiliki keunggulan seperti *loading drug* yang besar, memiliki potensi untuk meningkatkan performa farmasetika dan spektrum aplikasi yang besar (dermal, oral, maupun i.v.), serta memiliki stabilitas yang lebih baik dibandingkan dengan liposom⁽¹⁰⁾. NLC ekstrak dipreparasi menggunakan lipid padat, lipid cair, emulgator golongan surfaktan dan ekstrak etanol rimpang *Alpinia zerumbet*. NLC ekstrak yang diperoleh dilakukan karakterisasi dan uji aktivitas antihialuronidase.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rimpang *Alpinia zerumbet* (Bogor), asam hialuronat (Sigma Aldrich H5542, USA), *bovine serum albumin* (BSA) (Sigma Aldrich A4503), *hyaluronidase from bovine testes, Type I-S*. (Sigma Aldrich H3506), larutan HCl (Merck 109057, Jerman), polietilenglikol-8 beeswax (Gattefosse, Perancis), akrilil glikosida (BASF, Jerman), Na fosfat monobasik (Merck 567545), NaCl (Merck 1064040500), Na asetat (Merck 1062681000), asam asetat (Merck 100063), NaOH (Merck 106498), dan air murni.

METODE. Pembuatan NLC Ekstrak. Ekstraksi serbuk rimpang *Alpinia zerumbet* (4/18) dilakukan dengan metoda maserasi kinetika menggunakan etanol 70%, lalu ekstrak cair diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu ± 50 °C, tekanan 100 mmHg, dan kecepatan 70 rpm sampai diperoleh ekstrak kental⁽⁹⁾. Pembuatan NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dilakukan dengan metode *High speed homogenization-ultrasonication* yaitu polietilen glikol-8 beeswax dan isopropil miristat dilebur diatas tangas air pada suhu 60°C, hasil leburan ditambahkan ekstrak rimpang yang sudah dilarutkan dalam propilenglikol. Air murni dan akrilil glikosida dipanaskan pada suhu 60°C. Hasil leburan yang sudah berisi ekstrak rimpang dicampurkan ke dalam campuran air murni dan akrilil glikosida dengan diaduk menggunakan *stirrer* (IKA, RW-20) pada kecepatan 500 rpm. Selanjutnya diaduk kembali menggunakan *ultraturax* (IKA, T25) pada kecepatan 20000 rpm selama 10 menit dan didinginkan pada suhu 2-5°C sambil diaduk menggunakan *ultraturax* dengan kecepatan 5000 rpm. Selanjutnya dilakukan ultrasonikasi menggunakan alat *sonicator* (Qsonica, Q700) pada 50 amplitudo selama 10 menit. Nanopartikel NLC ekstrak yang terbentuk dilakukan karakterisasi⁽¹¹⁾.

Karakterisasi NLC Ekstrak⁽¹²⁾. Ukuran Nanopartikel dan Indeks Polidispersitas. Ukuran nanopartikel dan indeks polidispersitas diukur berdasarkan distribusi populasi nanopartikel. Dilakukan dengan cara sejumlah NLC ekstrak dimasukan ke dalam wadah, dilakukan pengenceran dan dianalisis menggunakan *Particle size analyzer zetasizer* (Malvern).

Zeta Potensial. Aliquot (fraksi) kecil (100µL) dari NLC ekstrak didispersikan pada 50,0 mL aquadest dan diukur dengan menggunakan *Particle size analyzer Zetasizer* (Malvern).

Morfologi Nanopartikel. Morfologi NLC ekstrak dilakukan dengan menggunakan *Transmission Electron Microscopy* (JEOL JEM 1400). Sampel NLC ekstrak diencerkan dengan perbandingan 1:10.

Kemudian sampel diteteskan ke atas *Cu substrated grid* dan dibiarkan sampai kering. Selanjutnya ditetesi dengan larutan uranyl asetat 2%, didiamkan sampai kering dan dianalisa dengan menggunakan TEM pada 100KV dengan berbagai perbesaran.

Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak. Pembuatan Reagen Uji Aktivitas Antihialuronidase. Dapar Fosfat (300mM pH 5,35 pada suhu 37°C). Sebanyak 36 mg/mL Na fosfat monobasik dilarutkan dalam air murni kemudian diatur pH 5,35 dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

Larutan Asam Hialuronat (0.3% w/v). Larutkan 0,3 mg/mL asam hialuronat dalam dapar fosfat. Panaskan larutan pada suhu 90-95°C menggunakan *magnetic stirrer* hingga larutan tercampur semua selama 15-30 menit. Pastikan larutan tidak mendidih. Setelah larutan mendingin, atur pH 5,35 dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

Enzyme Diluent. 20 mM natrium fosfat, 77mM natrium klorida, dan 0,01% (w/v) *bovine serum albumin* pH 7 pada 37°C. Larutkan 2,4 mg/mL natrium fosfat monobasik, mengandung 4,5 mg/mL natrium klorida dan 0,1 mg/mL BSA dalam air murni. Atur pH 7, pada suhu 37°C dengan 1 N NaOH dan 1 N HCl.

Larutan Asam Albumin. 24 mM natrium asetat, 79 mM asam asetat, dan 0,1% (w/v) BSA (pH 3,75, 25°C). Larutkan 3.27 mg/mL natrium asetat dalam air murni, mengandung 4,5 µL/mL asam asetat dan 1 mg/mL BSA, atur pH 3,75 dengan 5 N HCl.

Hialuronidase. Larutkan 0,02 mg enzim hialuronidase dalam 1 mL *enzyme diluent*.

Cara Uji Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak. Penghambatan aktivitas enzim hialuronidase diukur berdasarkan metode yang telah dijabarkan oleh Sigma Aldrich dan Tu & Tawata (2015) dengan sedikit modifikasi⁽¹³⁾. Campuran larutan yang terdiri dari 25 µL sampel (0,78 – 50 µg/mL), 3 µL enzim *hyaluronidase from bovine testes type I-S* (0,02 mg/mL, Sigma H3506), dan 12 µL dapar fosfat (300 mM, pH5,35, Sigma 0751) diinkubasi menggunakan alat inkubator ESCO pada suhu 37°C selama 10 menit. Selain itu disiapkan juga untuk kontrol yang hanya berisi 3 µL enzim dan 37 µL dapar fosfat serta blangko yang hanya berisi 15 µL dapar fosfat dan 25 µL sampel. Selanjutnya tiap sumur *96 well-microtiter plate* dari campuran larutan tersebut ditambahkan sebanyak 10 µL substrat asam hialuronat dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 45 menit. Larutan berupa *acidic albumin* ditambahkan sebanyak 100 µL ke dalam larutan tersebut dan diamkan di suhu ruang selama 10 menit. Absorbansi diukur menggunakan panjang gelombang 600 nm menggunakan alat ELISA reader (Multiskan Go Reader Thermo Fisher Scientific TM Multiscan, N12391)

Persentase Aktivitas antihialuronidase NLC Ekstrak. Aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan ELISA reader dengan metode determinasi turbidimetrik (persen (%) transmiter pada panjang gelombang 600 nm, *light path* 1 cm). Metode ini digunakan dengan cara mengukur absorbansi dari fragmen asam hialuronat yang terbentuk akibat penguraian asam hialuronat oleh hialuronidase. Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung persentase aktivitas penghambatan hialuronidase dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Aktivitas antihialuronidase} = \frac{C - S}{C} \times 100\%$$

C = Absorbansi aktivitas enzim hialuronidase tanpa sampel

S = Absorbansi aktivitas enzim hialuronidase dengan penambahan sampel yang diuji

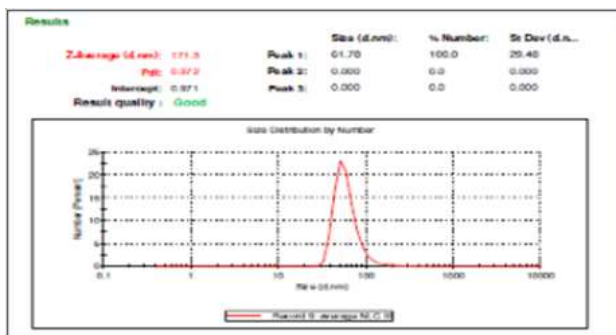
IC₅₀ dihitung dengan menggunakan absorbansi persamaan regresi linier, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

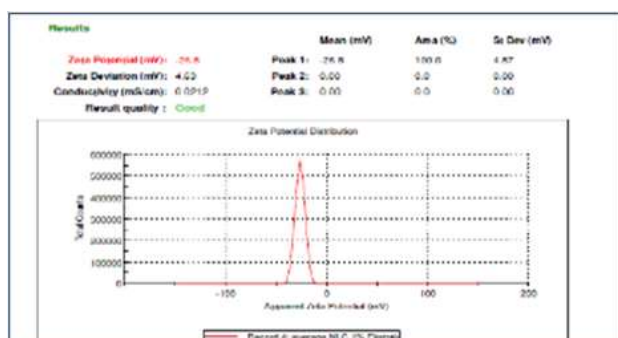
Karakterisasi NLC Ekstrak. Ukuran Nanopartikel dan Indeks Polidispersitas NLC Ekstrak. Pada Tabel 1 dan Gambar 1, ukuran nanopartikel NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* adalah 171,3 nm. Dihasilkan ukuran nanopartikel yang kecil karena pada pembuatan NLC ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode *High speed homogenization-ultrasonication*. Gaya pengadukan yang besar dan gelombang yang tinggi dapat memecah partikel menjadi lebih kecil. Nanopartikel dengan ukuran sub-mikron memberikan *uptake intraseluler* yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan mikropartikel dan memiliki rentang availabilitas yang besar dalam target biologis sehingga relatif lebih mudah terdistribusi. Dengan ukuran NLC ekstrak yang kecil diharapkan pelepasan zat aktif ke dalam kulit lebih cepat dan terdistribusi merata ke dalam jaringan intraseluler. Indeks polidispersitas (*polydispersity index*, PDI)

Tabel 1. Ukuran nanopartikel, PDI, dan zeta potensial NLC.

Bahan	Ukuran nanopartikel (nm)	Indeks polidispersitas	Zeta potensial (mV)
NLC ekstrak	171,3	0,37	-26,8



Gambar 1. Ukuran nanopartikel dan PDI NLC ekstrak.

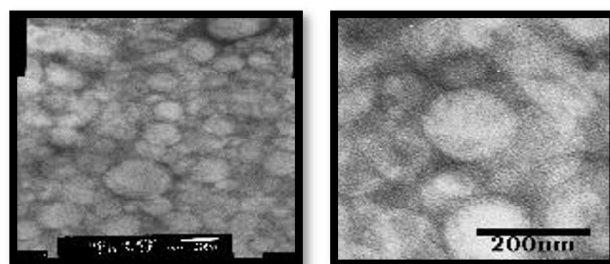


Gambar 2. Zeta potensial NLC ekstrak.

yang dihasilkan adalah 0,37. PDI menunjukkan keseragaman ukuran nanopartikel. PDI NLC ekstrak mendekati nol yang artinya ukuran nanopartikel yang dihasilkan adalah seragam.

Zeta Potensial NLC Ekstrak. Pada Tabel 1 dan Gambar 2, dihasilkan zeta potensial NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* -26,8 mV. Zeta potensial yang dihasilkan merupakan ukuran *repulsive force* diantara partikel. Zeta potensial menentukan sistem koloid dari nanopartikel yang distabilkan oleh gaya elektrostatis. Nilai zeta potensial lebih besar dari -30 mV hingga +30 mV umumnya dianggap memiliki gaya tolak yang cukup untuk mencapai stabilitas koloid fisik yang lebih baik. Setiap partikel akan saling tolak menolak satu sama lain sehingga tidak terjadi kecenderungan beragregasi. Menurut teori DLVO, stabilitas koloid dari partikel-partikel dalam emulsi bergantung pada gaya tolak menolak (gaya lapisan rangkap elektrik) untuk melawan gaya tarik-menarik (gaya Van der Waals) yang dapat menyebabkan agregasi *irreversible*. Diharapkan sistem koloid dalam NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* terdispersi merata dan stabil⁽¹⁴⁾.

Morfologi Nanopartikel NLC Ekstrak. *Transmission Electron Microscopy* merupakan teknik untuk menentukan bentuk dan morfologi dari nanopartikel lipid. Hasil analisis morfologi NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dengan menggunakan alat *Transmission Electron Microscopy* JEOL JEM 1400 (Gambar 3), menunjukkan bahwa



Gambar 3. Morfologi NLC ekstrak pada perbesaran 40.000x.

globul nanopartikel NLC ekstrak memiliki ukuran dibawah 200 nm dengan bentuk sferis. Pada gambar terlihat bahwa nanopartikel NLC ekstrak berbentuk padat, terdistribusi merata, dan cukup seragam, sesuai dengan hasil PDI (0,37<1) yang rendah.

Aktivitas Antihialuronidase NLC Ekstrak. Pengukuran absorbansi asam hialuronat pada panjang gelombang 600 nm. Konsentrasi NLC ekstrak yang dilakukan adalah: a). *Working solution*: 12000; 8000; 4000; 2000; 1000; 500; 250 ($\mu\text{g/mL}$). b). *Final concentration*: 800,00; 533,33; 266,67; 133,33; 66,67; 33,33; 16,67 ($\mu\text{g/mL}$). Hasil analisis data uji aktivitas antihialuronidase dapat dilihat pada Tabel 2.

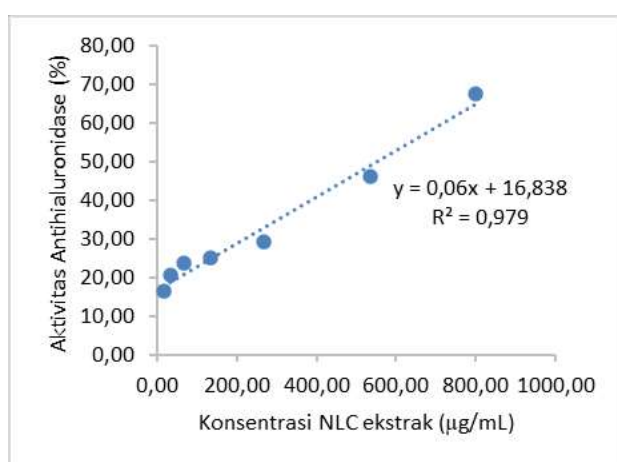
Aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak memberikan hasil IC_{50} sebesar 552,75 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 2 dan Gambar 4). Hialuronidase merupakan enzim yang dapat mendegradasi asam hialuronat, menyebabkan timbulnya kerutan pada kulit karena kandungan air menjadi berkurang. Inhibisi hialuronidase merupakan salah satu cara untuk dapat mencegah timbulnya kerutan pada kulit, karena dapat menghambat degradasi air. Pengujian secara *in vitro* dilakukan dengan mengukur fragmen asam hialuronat yang merupakan hasil yang terbentuk akibat penguraian asam hialuronat oleh hialuronidase. Setelah ditambahkan larutan asam albumin, sampel yang mengandung fragmen-fragmen kecil asam hialuronat akan semakin keruh yang dapat diukur serapannya secara kolorimetri menggunakan *ELISA reader*.

SIMPULAN

NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dalam pelarut etanol 70% memiliki aktivitas antihialuronidase dengan IC_{50} sebesar 552,75 $\mu\text{g/mL}$. NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* memenuhi karakterisasi nanopartikel dengan ukuran partikel 171,3 nm, indeks polidispersitas 0,37, dan potensial zeta -26,8 mV dengan morfologi nanopartikel adalah sferis. NLC ekstrak rimpang *Alpinia zerumbet* dapat di formulasi ke dalam sediaan topikal, berpotensi sebagai antihialuronidase dengan kemampuan mengurangi kerutan pada kulit.

Tabel 2. Analisis data aktivitas antihialuronidase NLC ekstrak.

Sampel	Konsentrasi akhir ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas antihialuronidase (%)			Rata-rata	SD	RSD	IC ₅₀ rata-rata	R ²
		1	2	3					
NLC ekstrak	800,00	65,00	69,38	68,13	67,50	2,25	3,34	552,75	0,98
	533,33	46,56	45,63	45,94	46,04	0,48	1,04		
	266,67	30,00	27,50	30,63	29,38	1,65	5,63		
	133,33	24,38	23,44	27,81	25,21	2,30	9,14		
	66,67	23,44	24,69	23,13	23,75	0,83	3,48		
	33,33	22,50	20,31	19,06	20,63	1,74	8,44		
	16,67	15,94	18,13	15,00	16,35	1,60	9,81		



Gambar 4. Grafik efek berbagai konsentrasi NLC ekstrak terhadap penghambatan hialuronidase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung oleh dana penelitian Hibah Internal Universitas Pancasila.

DAFTAR PUSTAKA

- Farage, MA, Miller, KW, Maiba, HI. Textbook of Aging Skin. 2nd ed. Berlin: Springer; 2017. p. 331, 1055
- Papakonstantinou E, Roth M, Karakiulakis G. Hyaluronic acid: A key molecule in skin aging. From Basel, Switzerland. Journal Dermato Endocrinology. 2012; 4(3):253-8.
- Lee A, Grummer SE, Kriegel D, Marmur E. Hyaluronidase. Dermatologic Surg. 2010;36:1071-7.
- Kumud, M, Sanju, N. In-vitro evaluation of antioxidant, anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase activities of Safranal and determination of its sun protection factor in skin photoaging. Bioorg Chem. 2017;77:159-67. doi:https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.12.030
- Elzaawely AA, Xuan TD, Tawata S. Changes in essential oil, kava pyrones and total phenolics of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt. & R.M. Sm. leaves exposed to copper sulphate. Environ Exp Bot. 2007; 59(3):347-53.
- Lim TK. *Alpinia zerumbet*. Edible medicinal and non-medicinal plants. Springer International Publishing; 2016, p. 196-213
- Murakami S, Li W, Matsuura M, Satou T, et al. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. Nat Med; 2009; 204-8.
- Chompoo J, Upadhyay A, Fukuta M, Tawata S. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. BMC Complement Altern Med. 2012; 12(1):106.
- Azwanida, NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med Aromat Plants. 2015;4(3). doi:https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196
- Lacerda, SP, Cerize, NNP, Re, MI. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. International Journal of Cosmetic Science. 2011; 33:112-21. doi:https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2010.00626
- Lason, E, Sikora, E, Ogonowski, J. Influence of proses parameters on properties of NLC formulation. Acta Biochimica Polonica (ABP), 2013;60(4):773-7. doi:https://doi.org/10.18388/abp.2013_2056
- Chaudary, H, Jadhav, K, Kadam, VJ. Formulation and evaluation of nanostructured lipid carriers containing glipizide. World Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. 2016;5(4):1424-37. doi:https://doi.org/10.20959/wjpps20164-6398
- Tu PTB, Tawata S. Antioxidant, antiaging, and antimelanogenic properties of the essential oils from two varieties of *Alpinia zerumbet*. MDPI Journal. 2015; 20(9):16723-40
- Joseph, E., & Singhvi, G. Multifunctional nanocrystals for cancer therapy: a potential nanocarrier. Nanomaterials for Drug Delivery and Therapy. 2019;91-116. doi:https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816505-8.00007-2

Pengaruh Pemberian Aspartam Secara Oral Terhadap Kadar AST dan ALT Serum dan Gambaran Histopatologi Hati Tikus Putih

(Effect Of Aspartame Oral Administration to AST and ALT Serum Levels and White Rat's Histopatology Description Liver)

ROS SUMARNY, SONDANG KHAIRANI*, MOHAMAD REGA SATRIA RAMADHAN

**Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan, Indonesia,
12640**

Diterima: 13 Agustus 2019, Disetujui 18: Oktober 2019

Abstrak: Aspartam merupakan pemanis rendah kalori yang dapat dimetabolisme menjadi asam aspartat, metanol dan fenilalanin, metanol menyebabkan kerusakan pada organ hati. Tujuan dari penelitian ini mengetahui efek pemberian aspartam pada tikus secara oral selama 90 hari terhadap parameter biokimia, yaitu kadar AST, ALT dan gambaran histopatologi hati. Tikus dibagi secara acak menjadi empat kelompok yaitu kelompok kontrol normal, kelompok dosis 126, 252, dan 504 mg/kgBB. Sampel darah diambil pada hari ke-0, 30, 60 dan 90 untuk diukur kadar AST dan ALT pada hari ke-90 dilakukan pengambilan organ hati untuk dilihat gambaran histopatologi hati. Pengukuran AST dan ALT menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan panjang gelombang 340 nm. Kadar AST dan ALT hari ke-90 kelompok normal 41,55 dan 48,40 UI/L. Kelompok Dosis 126, 252, dan 504 mg/kgBB berturut-turut yaitu 54,62 dan 57,72 UI/L, 66,88 dan 70,47 UI/L, 77,50 dan 80,03 UI/L. Gambaran histopatologi hati pada tikus menunjukkan adanya hemorhagi. Dapat disimpulkan aspartam dapat meningkatkan kadar AST dan ALT pada serum darah tikus serta menyebabkan kerusakan hati.

Kata kunci: aspartam, AST, ALT, histopatologi, hati.

Abstract: Aspartame is low calorie sweetener metabolized into aspartic acid, phenylalanine and methanol, methanol cause damage to the liver. The purpose this study to determine the effect rats of oral aspartame administration for 90 days on biochemical parameters AST, ALT and liver histopathology. Rats were divided randomly into four groups: normal control, dose groups 126, 252, 504 mg/kgBW. Blood samples were taken on the 0th, 30th, 60th and 90th days to measure AST, ALT levels and 90th day to see liver histopathology. AST and ALT measurements using UV-VIS spectrophotometry with a wavelength of 340 nm. The levels of AST and ALT on the 90th day in the normal group 41,55 and 48,40 UI/L. Dose groups 126, 252, and 504 mg / kgBW were low doses 54,62 and 57,72 UI/L, 66,88 and 70,47 UI/L, 77,50 and 80,03 UI/L. Rats histopathology liver of aspartame showed hemorrhage. Concluded aspartame can increase of AST and ALT levels in rats blood serum and liver damage.

Keywords: aspartame, AST, ALT, histopatology, liver.

*Penulis korespondensi
E-mail: sondang.khairani@univpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

KONSUMSI pemanis buatan semakin meningkat karena pandemik dari penyakit diabetes dan obesitas yang semakin meningkat pula. Rasa manis yang kuat tersebut membuat penggunaannya hanya dalam jumlah yang sangat sedikit, bahkan dibawah dosis aman berdasarkan nilai Acceptable Daily Intake (ADI)⁽¹⁾. Penelitian Hassan dan Agarwal menunjukkan 4-18% minuman ringan yang mengandung pemanis buatan dikonsumsi oleh anak-anak^(2,3) yang dapat memicu penyakit baru akibat penggunaan pemanis buatan. Menurut Peraturan Kepala BPOM nomor 4 tahun 2014, aspartam memiliki nilai ADI sebesar 0-40 mg/kg berat badan⁽⁴⁾.

Aspartam sudah digunakan sebagai zat tambahan makanan dan minuman dalam berbagai produk. Lebih dari 6000 produk mengandung bahan tambahan aspartam, seperti minuman berkarbonasi, minuman berenergi, permen kunyah, jeli, pudding, yoghurt dan beberapa sediaan farmasi seperti vitamin dan sirup obat batu⁽⁵⁾. Aspartam (Aspartil-Fenilalanin Metil Ester) ketika dikonsumsi akan terhidrolisis di dalam usus menjadi dua asam amino (Asam Aspartat dan Fenilalanin) bersama dengan sejumlah metanol bebas. Fenilalanin dan asam aspartat merupakan asam amino yang diproduksi oleh tubuh secara alami.

Telah dilaporkan bahwa konsumsi aspartam dikaitkan dengan gangguan neurologis dan perilaku, tetapi sebagian besar penelitian menunjukkan hasil yang kurang meyakinkan. Jumlah aspartam yang relatif kecil dapat meningkatkan kadar metanol secara signifikan dalam tubuh. Metanol dikenal sebagai zat yang dapat merusak sel hati, dimana metanol teroksidasi menjadi formaldehid dan kemudian menjadi format. Formaldehid dapat menyebabkan stres oksidatif dan juga kerusakan sel pada berbagai organ, termasuk hati^(6,7).

Keracunan metanol dikaitkan dengan kerusakan mitokondria dan peningkatan proliferasi mikrosomal, yang menghasilkan kelebihan oksigen radikal. Hal tersebut, bersamaan dengan berlebihannya formaldehid selama paparan metanol menyebabkan peningkatan reaksi peroksidasi lipid. Pengonsumsi aspartam, akan menyebabkan kerusakan jaringan dikarenakan konsentrasi dari metabolitnya meningkat dalam darah akibatnya, beberapa enzim di dalam sel keluar menuju peredaran darah karena adanya peningkatan permeabilitas membran sel. Enzim aspartat aminotransferase (AST), alanin aminotransferase (ALT), laktat dehidrogenase (LDH) dan gamma glutamyl transpeptidase (GGT) merupakan parameter untuk pengukuran hal tersebut. Pengukuran dari enzim-enzim tersebut dalam cairan tubuh dapat digunakan untuk mengukur derajat

toksitas zat kimia terhadap organ⁽⁸⁾.

Penelitian yang dilakukan oleh Saeed A. Alwaleedi menunjukkan pemberian aspartam dengan dosis 50 mg/kg selama 60 hari pada tikus dapat menurunkan aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) serta meningkatkan kadar Malondialdehid (MDA), AST, ALT, alkaline phosphatase (ALP) dan GGT. Perubahan metanol menjadi formaldehid yang kemudian menjadi format, diikuti dengan produksi hidrogen peroksida (H₂O₂) dan Superoksida Anion (O₂⁻). Penelitian tersebut menunjukkan peningkatan reaksi peroksidasi lipid secara signifikan setelah 30 dan 60 hari pemberian aspartam secara oral. Peroksidasi lipid merupakan proses yang meliputi degradasi lipid menyebabkan kehancuran membran sel yang selanjutnya mengarah pada kerusakan sel⁽⁹⁾.

Pada penelitian ini dilakukan pemberian aspartam secara oral selama 90 hari terhadap hewan coba tikus dengan dosis 20 mg/kg BB yang masih aman dikonsumsi manusia, dosis 40 mg/kg BB yang dapat dikonsumsi oleh manusia dan dosis 80 mg/kg BB yang sudah melampaui dosis maksimal yang boleh dikonsumsi⁽⁴⁾.

Berdasarkan pernyataan di atas, penelitian ini perlu dilakukan untuk memastikan pengaruh aspartam terhadap kadar AST dan ALT dalam serum, serta gambaran histopatologi organ hati pada tikus. Penelitian ini penting untuk dilakukan karena aspartam sudah banyak tersedia dalam berbagai macam produk makanan dan minuman.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Aspartam, NaCl fisiologis, aqua destilata, NBF (*Neutral Buffered Formalin*) 10%, reagen kit AST dan reagen kit ALT merk Biolabo. Hewan percobaan yang digunakan adalah Tikus jantan galur *Sprague dawley* berumur 2 bulan dengan berat badan 190-220 g yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor (IPB).

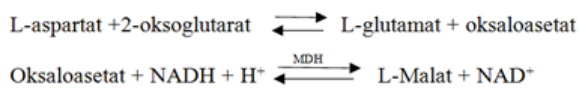
Alat. Perlengkapan pemeliharaan tikus (kandang, tempat makan dan minum), timbangan hewan, timbangan analitik, jarum suntik oral, alat bedah (pisau, gunting, pinset), alat sentrifugasi, Microlab 300, tabung Eppendorf.

METODE. Penetapan Dosis Aspartam. Nilai *Accaptable Daily Intake* (ADI) untuk aspartam adalah 40 mg/kg BB manusia. Oleh karena itu pada penelitian ini, digunakan setengah dosisnya, yaitu 20 mg/kg BB, dosis pada nilai ADI, yaitu 40 mg/kg BB dan dosis dua kalinya, yaitu 80 mg/kg BB. Dosis ini dikonversi ke dalam dosis tikus dengan faktor konversi 0,018. Sehingga didapatkan dosis 126 mg/kg BB tikus, dosis 252 mg/kg BB tikus dan dosis 504 mg/kg BB tikus.

Pelaksanaan Percobaan. Sebanyak 24 ekor tikus sehat dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok normal yang diberikan aquades, dosis rendah yang diberi aspartam dosis 126 mg/kg BB tikus, dosis sedang yang diberi aspartam 252 mg/kg BB tikus dan dosis tinggi yang diberi aspartam dosis 504 mg/kg BB, dimana masing-masing kelompok terdiri dari 6 tikus.

Selama 7 hari, tikus diaklimatisasi untuk penyesuaian lingkungan, kontrol kesehatan dan berat badan. Tikus diberikan aspartam sesuai kelompok dosis selama 90 hari. Pada hari ke-0, 30, 60, dan 90 dilakukan pengambilan darah melalui sinus orbitalis tikus dan dimasukkan ke tabung Eppendorf. Selanjutnya darah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil serumnya untuk pengukuran AST dan ALT. Setelah perlakuan selama 90 hari, tikus dibunuh dengan euthanasia menggunakan kloroform dan dilakukan pembedahan untuk mengambil organ hatinya. Organ hati dipisahkan dari jaringan lainnya, kemudian dicuci dengan NaCl fisiologis untuk menghilangkan darah yang menempel pada hati. Setelah bersih, organ hati dimasukkan ke dalam wadah yang berisi larutan NBF untuk dibuat preparat histopatologi yang dilakukan di Balai Besar Penelitian Veteriner (BBALITVET), Bogor. Preparat jaringan hati yang telah dibuat dilihat menggunakan mikroskop dan dianalisis.

Penetapan Kadar AST. Reagen dalam AST kit dipipet sebanyak 1000 µL reagen ke dalam kuvet kemudian ditambah dengan sampel serum non-hemolisis sebanyak 100 µL, dicampurkan dan diukur menggunakan alat microlab pada panjang gelombang 340 nm dan dicatat hasil kadar AST yang terukur. Metode reaksi dikembangkan oleh Karmen dan Al, dan dioptimasi oleh Henry. Skema reaksi sebagai berikut :



Penurunan absorbansi karena konversi NADH menjadi NAD⁺, dan proposional aktivitas AST dalam spesimen, diukur pada panjang gelombang 340 nm.

Penetapan Kadar ALT. Reagen dalam ALT kit dipipet sebanyak 1000 µL reagen ke dalam kuvet kemudian ditambah dengan sampel serum non-hemolisis sebanyak 100 µL, dicampurkan dan diukur menggunakan alat microlab pada panjang gelombang 340 nm dan dicatat hasil kadar ALT yang terukur. Metode reaksi dikembangkan oleh Wroblewski dan LaDue, dioptimasi oleh Henry dan Bergmeyer. Skema reaksi sebagai berikut:



Penurunan absorbansi karena konversi NADH menjadi NAD⁺, dan proposional aktivitas ALT dalam spesimen, diukur pada panjang gelombang 340 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Pengaruh Aspartam Terhadap Kadar AST dalam Serum. Hasil Pada pengukuran kadar AST didapatkan rata-rata kadar AST yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 dan Gambar 1 memperlihatkan terjadinya peningkatan kadar AST pada kelompok hewan coba tikus yang diberikan aspartam. Semakin tinggi dosis aspartam yang diberikan, maka semakin tinggi kadar AST yang terukur dalam serum dan semakin lama pemberian aspartam pada tikus maka semakin tinggi kadar AST yang terukur dalam serum.

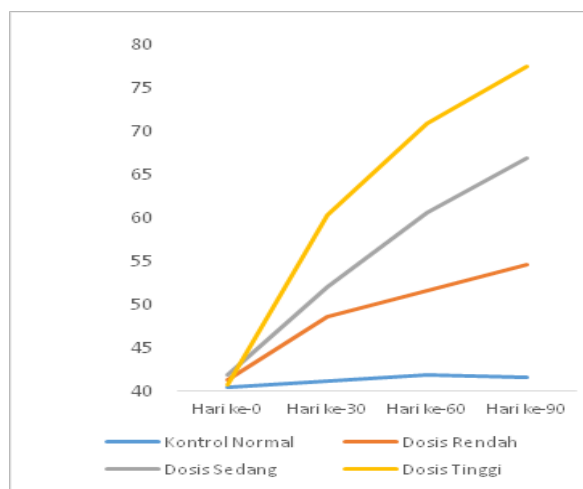
Selain itu, pengaruh pemberian aspartam terhadap kadar AST juga dapat dilihat dari perhitungan DDK (Daerah Di bawah Kurva). Semakin besar nilai DDK, maka semakin besar pengaruh aspartam terhadap peningkatan kadar AST dalam serum.

Perhitungan DDK yang didapat dilanjutkan ke uji statistik. Hasil dari uji statistik didapat hasil data dari setiap kelompok perlakuan terdistribusi normal dan tidak homogen, dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dimana terdapat perbedaan bermakna dan kemudian dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney. Hasil dari uji Mann-Whitney dapat dilihat pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 1. Rata-rata kadar AST (UI/L).

Kelompok	Rata-rata kadar AST (UI/L)			
	Hari ke-0	Hari ke-30	Hari ke-60	Hari ke-90
I	40,5	41,2	41,9	41,6
II	41,3	48,7	51,6	54,6
III	41,9	52,1	60,7	66,9
IV	40,8	60,4	70,9	77,5

Keterangan: I = Kontrol normal
II = 126 mg/kg BB
III = 252 mg/kg BB
IV = 504 mg/kg BB



Gambar 1. Grafik hasil pengukuran kadar AST.

Tabel 2. Hasil uji statistik DDK kadar AST.

DDK	I	II	III	IV
I				
II	*			
III	*	*		
IV	*	*	-	

*Terdapat perbedaan bermakna

Tabel 2 memperlihatkan ada atau tidaknya perbedaan antara masing-masing kelompok terhadap kadar AST yang telah diuji secara statistik. Pada DDK I menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK II, III dan IV. Pada DDK II menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK III dan IV. Pada DDK III tidak menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK IV.

Pengujian Pengaruh Aspartam Terhadap Kadar ALT dalam Serum. Hasil pada pengukuran kadar ALT didapatkan rata-rata kadar ALT yang dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3 dan Gambar 2 memperlihatkan terjadinya peningkatan kadar ALT pada kelompok hewan coba tikus yang diberikan aspartam. Semakin tinggi dosis aspartam yang diberikan, maka semakin tinggi kadar ALT yang terukur dalam serum dan semakin lama pemberian aspartam pada tikus maka semakin tinggi kadar ALT yang terukur.

Selain itu, pengaruh pemberian aspartam terhadap kadar ALT juga dapat dilihat dari perhitungan DDK. Semakin besar nilai DDK, maka semakin besar pengaruh aspartam terhadap peningkatan kadar ALT dalam serum.

Tabel 3. Hasil uji statistik DDK kadar AST.

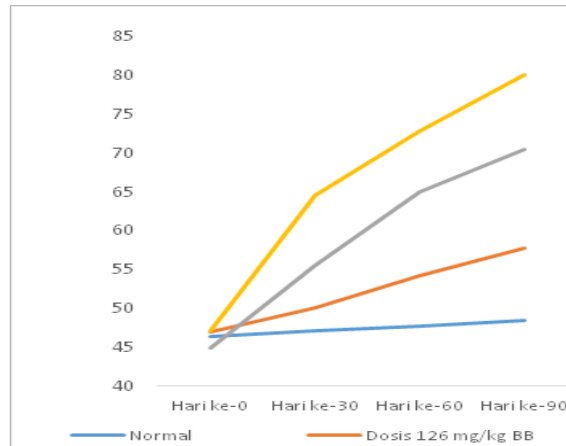
Kelompok	Rata-rata kadar ALT (UI/L)			
	Hari ke-0	Hari ke-30	Hari ke-60	Hari ke-90
I	46,4	47,1	47,7	48,4
II	46,9	50,0	54,2	57,7
III	44,9	55,6	65,0	70,5
IV	47,1	64,6	72,9	80,0

Keterangan: I = Kontrol normal

II = Dosis 126 mg/kg BB

III = Dosis 252 mg/kg BB

IV = Dosis 504 mg/kg BB



Gambar 2. Grafik hasil pengukuran kadar ALT.

Perhitungan DDK yang didapat, akan dilakukan uji statistik. Hasil dari uji statistik didapatkan bahwa tidak terdistribusi normal dan pada uji homogenitas menunjukkan data tidak homogen, dilanjutkan dengan

uji Kruskal-Wallis dimana terdapat perbedaan bermakna dan kemudian dilanjutkan ke uji Mann-Whitney. Hasil dari uji Mann-Whitney dapat dilihat pada tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Hasil uji statistik DDK kadar ALT.

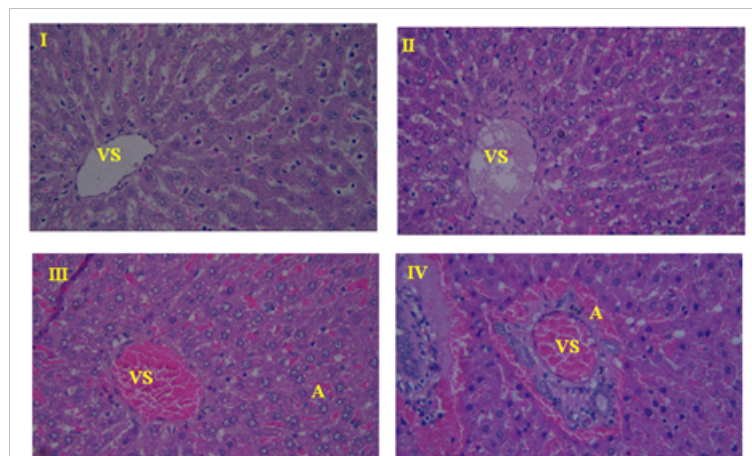
DDK	I	II	III	IV
I				
II	*			
III	*	*		
IV	*	*	*	

*Terdapat perbedaan bermakna

Tabel 4 memperlihatkan ada atau tidaknya perbedaan antara masing-masing DDK kadar ALT yang telah diuji secara statistik. Pada DDK I menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK II, III dan IV. Pada DDK II menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK III dan IV. Pada DDK III menunjukkan perbedaan bermakna dibandingkan dengan DDK IV. Hal ini

menunjukkan semakin tinggi dosis aspartam yang diberikan pada hewan coba, maka semakin tinggi kadar ALT yang terukur.

Pengujian Pengaruh Aspartam Terhadap Gambaran Histopatologi Hati. Hasil dari pengujian gambaran histopatologi hati tikus dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Histopatologi hati tikus setelah hari ke- 90 pada perbesaran 400x.

Keterangan: I = Kontrol normal; II = Dosis 126 mg/kg BB; III = Dosis 252 mg/kg BB dan IV = Dosis 504 mg/kg BB
 A = Hemorhagi VS = Vena Sentralis

Pada penelitian ini, diambil 4 hati tikus dari masing-masing kelompok hewan uji dan dilihat terjadinya hemorhagi pada hati yang diuji. Setelah dianalisis, dilakukan skoring terhadap gambaran histopatologi untuk menilai tingkat keparahan hemorhagi yang didapatkan. Hasil skoring dapat dilihat pada Tabel 5. Setelah itu hasil skoring dilakukan pengujian statistik non parametrik menggunakan SPSS Statistic 22. Dari hasil uji kenormalan dan homogenitas menunjukkan data skoring gambaran histopatologi hati tidak terdistribusi normal dan tidak bervariasi homogen. Dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis dimana terdapat perbedaan bermakna dan kemudian dilanjutkan ke uji Mann-Whitney. Hasil dari uji Mann-Whitney dapat dilihat pada Tabel 6.

Berdasarkan Gambar 3 pada gambaran histopatologi hati hewan coba tikus pada kelompok I tidak terlihat adanya hemorhagi, pada kelompok II tidak terlihat adanya hemorhagi, pada kelompok III terlihat adanya hemorhagi dan pada kelompok IV terlihat adanya hemorhagi.

Tabel 6 memperlihatkan ada atau tidaknya perbedaan antara masing-masing kelompok terhadap gambaran histopatologi hati yang telah diuji secara statistik. Pada kelompok I tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok II, namun menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok III dan IV. Pada kelompok II menunjukkan perbedaan

bermakna terhadap kelompok III dan IV. Pada kelompok III tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap kelompok IV.

Tabel 5. Hasil skoring gambaran histopatologi hati.

Dosis	Tikus ke	Hemorhagi
I	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
II	1	0
	2	0
	3	0
	4	0
III	1	2
	2	1
	3	1
	4	2
IV	1	2
	2	2
	3	2
	4	3

Keterangan:

I = Kontrol normal; II = Dosis 126 mg/kg BB; III = Dosis 252 mg/kg BB dan IV = Dosis 504 mg/kg BB

0 = Tidak ada; 1 = Tidak parah; 2 = Parah dan 3 = Sangat parah

Tabel 6. Hasil uji statistik gambaran histopatologi hati antar kelompok.

Kelompok	I	II	III	IV
I				
II				
III	*	*		
IV	*	*		

*Terdapat perbedaan bermakna

PEMBAHASAN

Aspartam terdapat dalam lebih dari 6000 produk makanan dan minuman di seluruh dunia. Namun, sebagian besar konsumen tidak mengetahui tentang keamanan dari metabolit aspartam yang masih kontroversial. Efek merugikan aspartam berasal dari metanol yang dihasilkan oleh metabolisme aspartam. Kadar metanol meningkat dalam plasma tikus setelah pemberian aspartam jangka panjang pada dosis tinggi dan. Metabolisme metanol dalam tubuh menghasilkan formaldehid, dimana formaldehid merupakan senyawa yang lebih beracun daripada metanol⁽¹⁰⁾.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Seniwati Dali menunjukan bahwa beberapa minuman yang dijual

kepada anak-anak sekolah dasar (SD) mengandung aspartam sesuai kadar yang ditetapkan dalam Peraturan Kepala BPOM nomor 14 tahun 2014, yaitu 600 mg/kg dihitung terhadap produk siap konsumsi. Pada penelitian tersebut kadar tertinggi dari sampel yang didapatkan adalah 258,08 mg/kg, sehingga pengonsumsi dari beberapa produk minuman tidak boleh lebih dari 3 kemasan^(4,11).

Penelitian ini menggunakan hewan uji dengan galur, jenis kelamin, umur, berat badan, makanan, dan minuman yang sama untuk menghindari adanya variasi biologis yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Hewan uji yang digunakan adalah tikus dengan galur Sprague-Dawley. Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan, hal ini bertujuan untuk

mengurangi variasi biologi yang diakibatkan oleh keadaan fisiologis, seperti perubahan hormon. Variasi biologis tersebut dapat mempengaruhi parameter biokimia seperti AST dan ALT.

Pengambilan sampel darah pada penelitian ini melalui sinus orbitalis. Pengukuran kadar AST dan ALT menggunakan serum darah. Serum darah tidak boleh mengalami hemolisis karena dapat mempengaruhi hasil pengukuran. Hemolisis adalah pecahnya eritrosit sehingga hemoglobin bebas ke dalam medium disekelilingnya. Lisisnya serum dapat menyebabkan enzim AST dan ALT keluar menuju cairan ekstraseluler sehingga pada pengujian menunjukkan peningkatan enzim tersebut dari nilai yang sebenarnya. Hal ini dapat dicegah dengan pengambilan darah yang relatif cepat, salah satunya dengan pengambilan melalui sinus orbitalis⁽¹¹⁾.

Aspartam dimetabolisme oleh tubuh menjadi asam aspartat (50%), fenilalanin (40%) dan metanol (10%). Metanol dapat dimetabolisme oleh tubuh menjadi formaldehid, dimana formaldehid merupakan senyawa yang lebih toksik dibandingkan dengan metanol⁽¹⁰⁾.

Pada kelompok tikus yang diberikan aspartam, terdapat peningkatan kadar AST dan ALT yang signifikan bila dibandingkan dengan kelompok normal. Semakin tinggi dosis aspartam yang diberikan, maka semakin tinggi pula kadar AST dan ALT yang terukur. Terjadi pula peningkatan kadar AST dan ALT yang signifikan setelah pemberian aspartam selama 30, 60 dan 90 hari dibandingkan dengan hari ke-0. Semakin lama pemberian aspartam pada hewan coba, semakin tinggi pula kadar AST dan ALT yang terukur dalam serum. Hasil tersebut sama halnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Isabela Finamor yang menunjukkan bahwa pemberian aspartam dapat meningkatkan kadar AST dan ALT pada serum mencit⁽¹⁰⁾.

Hal ini dapat disebabkan karena pemberian aspartam menyebabkan penurunan kadar glutathione dan aktivitas enzim antioksidan lainnya seperti superoksida dismutase, katalase, glutathione-s-transferase dan glutathione peroksidase serta peningkatan jumlah radikal bebas yang berasal dari proses metabolisme metanol menjadi formaldehid. Penurunan kadar GSH dan peningkatan jumlah radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya kerusakan hati. Kerusakan hati yang terjadi menyebabkan peningkatan permeabilitas membran hepatosit sehingga AST dan ALT masuk ke dalam darah dan terukur dalam serum⁽¹²⁾.

Tikus yang diberikan aspartam dosis sedang dan tinggi mengalami perubahan pada gambaran histopatologi hati yang ditandai dengan pecahnya dinding pembuluh darah hati sehingga memasuki

sinusoid pada jaringan hati yang disebut hemorrhagi. Hemorrhagi ditandai dengan adanya warna merah muda sampai merah dengan pewarnaan⁽¹³⁾.

Hal ini menunjukkan bahwa aspartam dapat menyebabkan kerusakan jaringan hati yang disebabkan oleh metanol yang dihasilkan oleh aspartam. Metanol yang dihasilkan menyebabkan peningkatan radikal bebas yang dapat merusak jaringan hati dan dapat merubah gambaran histopatologi hati⁽¹⁰⁾.

SIMPULAN

Pemberian aspartam pada dosis 126; 252 dan 504 mg/kg BB selama 90 hari secara oral dapat meningkatkan kadar AST dan kadar ALT dalam serum tikus secara signifikan. Pemberian aspartam pada dosis 126 mg/kg BB selama 90 hari secara oral tidak mempengaruhi gambaran histopatologi hati tikus secara signifikan serta pada dosis 252 mg/kg BB dan 504 mg/kg BB dapat mempengaruhi gambaran histopatologi hati tikus secara signifikan.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemberian aspartam terhadap kerusakan hati dengan parameter hati lain seperti GGT, LDH dan ALP. Perlu dilakukan penelitian pengaruh pemberian aspartam terhadap aktivitas Superoksida dismutase (SOD) dan kadar Malondialdehid (MDA). Perlu dilakukan penelitian pengaruh pemberian aspartam terhadap organ lain seperti otak, pankreas dan ginjal. Perlu dilakukan penelitian mengenai survival untuk melihat adanya regenerasi sel hati tanpa perlakuan apapun setelah 90 hari pemberian aspartam.

DAFTAR PUSTAKA

1. D EPR, Yerizel E. Artikel Penelitian Pengaruh Pemberian Aspartam terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Diabetes Melitus Diinduksi Aloksan. 2014;3(3):370–5.
2. Hassan M, Hassan MI. Low Intake of Aspartame Induced Weight Gain and Damage of Brain & Liver Cells in Weanling Syrian Hamsters Low Intake of Aspartame Induced Weight Gain and Damage of Brain & Liver Cells in Weanling Syrian Hamsters. *J Food Nutr Reserch*. 2016;4 (3)(April):152–6.
3. Agarwal A, Gutch M, Kumar S, Mohd SR, Kumar GA, Kumar KG. Nonnutritive sweeteners : Pros and cons. 2016:4–9.
4. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Peraturan Kepala Badan Pegawai Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 4 Tahun 2014 Tentang Batasan Maksimum Penggunaan Bahan

- Tambahan Pangan Pemanis. 2014:1–28.
5. Lebedev I, Park J, Yaylaian R. Popular Sweeteners and Their Health Effects. 2010:28–9.
 6. Mourad M. Effect of Aspartame on Some Oxidative Stress Parameters in Liver and Kidney of Rats. 2011;5(June):678–82.
 7. Avenue N. Oxidative Damage Caused by Air Formaldehyde Exposure in Organ of Mice. 2005:3813–6.
 8. Prokić MD, Paunović MG, Matić MM, Đorđević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ, et al. Effect of aspartame on biochemical and oxidative stress parameters in rat blood. *Arch Biol Sci.* 2015;67(2):535–45.
 9. Alwaleedi SA. Alterations in Antioxidant Defense System in Hepatic and Renal Tissues of Rats Following Aspartame Intake. *J Appl Biol Biotechnol.* 2016;4(2):46–52.
 10. Finamor I, Pérez S, Bressan CA, Brenner CE, Rius-pérez S, Brittes PC, et al. Redox Biology Chronic aspartame intake causes changes in the trans-sulphuration pathway , glutathione depletion and liver damage in mice. *Redox Biol* [Internet]. 2017;11(January):701–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.019>
 11. Dali S, Kusuma AT, Anar AW. Analisis Kandungan Aspartam yang Terdapat pada Minuman Jajanan Anak Sekolah yang Beredar di Makassar dengan Metode HPLC. 2013;5(2):162–8.
 12. Adaramoye OA, Akanni OO. Effects of Long-term Administration of Aspartame on Biochemical Indices, Lipid Profile and Redox Status of Cellular System of Male Rats. 2016;27(1):29–37.
 13. Silbernagl S, Lang F. *Teks & Atlas Berwarna Patofisiologi.* Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2007

Profil Proliferasi Sel Limfosit Benalu Batu (*Begonia medicinalis*) Asal Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah (Lymphocyte Cell Proliferation Profile of *Begonia medicinalis* from North Morowali Regency Central Sulawesi Province)

AKHMAD KHUMAIDI^{1*}, AGUSTINUS WIDODO¹, ARSA WAHYU NUGRAHANI¹, EDIATI SASMITO², NANANG FAKHRUDIN³

¹Jurusan Farmasi, FMIPA Universitas Tadulako, Palu, 94118, Indonesia

²Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

³Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281, Indonesia

Diterima: 21 Oktober 2019, Disetujui: 17 April 2020

Abstrak: Benalu batu (*Begonia medicinalis*) asal Morowali Utara secara empiris telah digunakan sebagai obat antikanker. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil proliferasi sel limfosit ekstrak dan fraksi benalu batu serta mengukur korelasi kadar flavonoid total terhadap indeks stimulasi proliferasi sel limfosit. Ekstraksi simplisia dilakukan secara maserasi menggunakan metanol. Partisi cair-cair digunakan dalam fraksinasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan air secara berurutan. Uji proliferasi sel limfosit menggunakan metode MTT *reduction* dengan seri konsentrasi 10, 20, 50, dan 100 µg/mL. Kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi ditetapkan berdasarkan metode kolorimetri. Indeks stimulasi digunakan dalam pengukuran aktivitas proliferasi sel limfosit. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit pada seluruh konsentrasi uji. Konsentrasi 100 µg/mL memiliki indeks stimulasi tertinggi pada setiap sampel uji dan nilai indeks stimulasi dari fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, ekstrak metanol, dan fraksi air adalah 10,12; 6,56; 4,82; dan 4,17 secara berturut-turut. Kadar flavonoid total dan indeks stimulasi memiliki korelasi yang sangat rendah ($r=0,082$) dan konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi tertinggi ($r^2=0,18$). Hasil penelitian menunjukkan fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat dapat dikembangkan sebagai bahan imunostimulansia meskipun memiliki korelasi yang sangat rendah terhadap kadar flavonoid.

Kata kunci: *Begonia medicinalis*, Morowali Utara, proliferasi sel limfosit, indeks stimulasi.

Abstract: Benalu batu (*Begonia medicinalis*) from northern Morowali is empirically used as an anticancer. This study aims to determine the lymphocyte cell proliferation profile of extract and fractions benalu batu as well as to measure the correlation of total flavonoids content against stimulation index proliferation. Maceration is done using methanol. Liquid-liquid partitions are used in fractionation with hexane, ethyl acetate, and water solvents sequentially. Lymphocyte cell proliferation test is using the MTT reduction method with concentration series 10, 20, 50, and 100 µg/mL. The total flavonoid content in extract and fractions are determined by the colorimetric method. The stimulation index is used in measuring the lymphocyte cell proliferation activity. Based on the results, all samples are increasing lymphocyte cell proliferation. The concentration of 100 µg/mL has the highest stimulation index and the stimulation index value of hexane fraction, ethyl acetate fraction, methanol extract, and water fraction are 10.12, 6.56, 4.82, and 4.17, respectively. Total flavonoids content and stimulation index have very low correlation ($r = 0.082$) and concentration of 10 µg/mL have the highest correlation coefficient ($r^2 = 0.18$). The results showed the hexane and ethyl acetate fractions can be developed as immunostimulant material.

Keywords: *Begonia medicinalis*, North Morowali, lymphocyte cell proliferation, stimulation index.

*Penulis korespondensi

E-mail: akhmadkhumaidipalu@gmail.com

PENDAHULUAN

BENALU batu (*Begonia medicinalis*) adalah spesies baru dari familia Begoniaceae (Gambar 1). Tumbuhan ini secara empiris telah digunakan oleh masyarakat suku Wana di Kabupaten Morowali Utara Provinsi Sulawesi Tengah sebagai obat antikanker⁽¹⁾. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol benalu batu memiliki aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker leher rahim dan sel kanker payudara⁽²⁾. Hasil *docking* molekuler senyawa glikosida steroid, glikosida flavonoid, glikosida triterpenoid, dan senyawa alkaloid dari tumbuhan benalu batu terhadap ligan erlotinib memiliki potensi yang tinggi untuk dapat dikembangkan sebagai agen antikanker⁽³⁾.

Berdasarkan hal tersebut, ekstrak atau senyawa aktif dari benalu batu memiliki potensi untuk dapat dikembangkan menjadi sediaan farmasi dalam pengobatan penyakit kanker. Namun di sisi lain, penggunaan ekstrak dalam suatu pengobatan dapat memberikan risiko menurunkan sistem imunitas tubuh⁽⁴⁾. Efek ekstrak dalam menurunkan sistem imunitas tubuh merupakan efek yang tidak diharapkan dalam pengobatan penyakit kanker^(5,6).

Hasil-hasil studi menyatakan bahwa penggunaan ekstrak atau fraksi dari suatu tumbuhan dapat mempengaruhi mekanisme pertahanan atau sistem imunitas tubuh baik berupa imunitas spesifik maupun non spesifik. Pengaruh tersebut dapat bersifat meningkatkan respons imun (menstimulasi) atau bersifat menurunkan (mensupresi) respons imun⁽⁷⁾. Hal ini juga didukung oleh penelitian yang menunjukkan bahwa subfraksi-subfraksi yang berasal dari ekstrak bahan alam yang sama (ekstrak etil asetat) dapat bersifat imunostimulator sedangkan subfraksi yang lainnya bersifat immunosupresor⁽⁸⁾. Oleh sebab itu, banyak penelitian saat ini difokuskan pada tumbuhan yang memiliki efek dapat memodulasi respons imun yang jelas yang selanjutnya dapat digunakan untuk



Gambar 1. *Begonia medicinalis*.

mengurangi resiko berbagai penyakit antara lain mengurangi reaksi inflamasi sampai kanker⁽⁹⁾.

Berdasarkan hal itu, sangatlah penting untuk mengetahui secara pasti bagaimana pengaruh pemberian suatu ekstrak/fraksi dari bahan alam terhadap respons imunitas tubuh melalui aktivitas proliferasi sel limfosit. Oleh karenanya penelitian ini bertujuan untuk melakukan eksplorasi aktivitas proliferasi sel limfosit dari ekstrak dan fraksi benalu batu secara *in vitro* serta mengukur korelasi kadar flavonoid total terhadap indeks stimulasi proliferasi sel limfosit.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Media RPMI-1640 (Gibco, Amerika Serikat), hepes (N-2- hidroksietilpiperazin - N'-2 - etansulfonat) (Sigma-Aldrich, Jerman), natrium bikarbonat (Sigma-Aldrich, Jerman), *fetal bovine serum* (FBS) (Gibco, Amerika Serikat), penstrep (Sigma-Aldrich, Jerman), fungison (Gibco, Amerika Serikat), *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Merck, Jerman), Tween 80 (Merck, Jerman), MTT (3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difeniltetrazolium bromida) (Merck, Jerman), vaksin hepatitis B (Havrix® Glaxo Smith Kline, Inggris), dapar tris amonium klorida (Merck, Jerman).

Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan galur BALB/c usia 8-12 minggu dengan berat 20-30 g yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.

METODE. Pembuatan Ekstrak Metanol. Sampel benalu batu asal Morowali Utara terlebih dahulu dilakukan pencucian dan perajangan lalu dikeringkan. Selanjutnya rajangan simplisia kering benalu batu dengan berat 168,84 g dimaserasi dengan pelarut metanol sebanyak 9 liter selama 3 x 24 jam dan dilakukan remaserasi satu kali. Sari metanol yang diperoleh diuapkan dengan *rotary evaporator*; kemudian ekstrak dikeringkan.

Partisi Ekstrak Metanol. Ekstrak metanol benalu batu (15 g) dibuat menjadi fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan metode partisi cair-cair. Fraksi n-heksana dibuat dengan cara ekstrak metanol dilarutkan dengan metanol 70% lalu dimasukkan ke dalam corong pisah. Selanjutnya dilakukan partisi cair-cair menggunakan n-heksana dengan perbandingan 1 : 1 dengan cara dikocok secara terus menerus ± 10 menit, lalu didiamkan sampai terpisah sempurna antar kedua pelarut. Bagian n-heksana ditampung dalam cawan porselin dan bagian metanol dipartisi lagi dengan n-heksana secara berulang kali

sampai pada bagian n-heksana terlihat bening dan tidak menunjukkan sisa ketika diuapkan. Bagian yang larut n-heksana diuapkan hingga n-heksana menguap seluruhnya dan bagian ini disebut sebagai fraksi n-heksana. Partisi selanjutnya dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat yang selanjutnya akan menyisakan (menghasilkan) fraksi air.

Pengujian Aktivitas Imunomodulator (in vitro). Kultur sel dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Metode isolasi sel limfosit serta uji proliferasi sel limfosit menggunakan metode MTT *reduction*^(8,10).

Suspensi Sampel Uji. Pembuatan suspensi induk dibuat dengan cara sebanyak 2 mg masing-masing sampel ditambahkan 1 mL larutan 0,5% Tween 80 (dilakukan sentrifugasi panas dengan suhu 40-60°C). Selanjutnya diaduk sampai homogen kemudian ditambahkan 1 mL (1 mg/mL) dengan larutan RPMI komplit (mengandung FBS 10% v/v) dan divortex sampai homogen. Diperoleh konsentrasi suspensi 1 µg/µL, disebut sebagai suspensi induk. Kemudian dibuat suspensi dengan dosis 10, 20, 50 dan 100 µg/mL.

Isolasi Sel Limfosit. Mencit yang dianestesi dengan ketamin : xylasin (10 : 1) secara intraperitoneal sebanyak 100 µL, selanjutnya dilakukan dislokasi bagian leher (Rekomendasi Persetujuan Etik Nomor : 103/SR/KEPK/UA-FK/V/2017 oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Alkhairaat). Selanjutnya kulit bagian perut dibuka dan dibersihkan selubung peritoneumnya dengan alkohol 70%. Limpa diambil dan diletakkan dalam cawan petri diameter 50 mm yang berisi 10 mL media RPMI. Media RPMI dipompakan ke dalam limpa sehingga limfosit ikut keluar bersama media. Suspensi sel dimasukkan dalam tabung sentrifus 10 mL dan disentrifus pada 1.500 rpm 4 °C selama 10 menit.

Pelet yang diperoleh disuspensikan dalam 5 mL dapar tris amonium klorida untuk melisiskan eritrosit. Sel dicampur hingga homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit atau sampai warnanya berubah menjadi agak kekuningan. Selanjutnya ditambahkan media RPMI hingga 10 mL, disentrifugasi pada 1.500 rpm 4°C selama 10 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang didapat dicuci 2 kali dengan media RPMI untuk menghilangkan eritrosit yang ada sehingga diperoleh pelet yang berwarna putih. Setelah itu, pelet yang mengandung sel limfosit disuspensikan dengan media RPMI komplit. Sel dihitung dengan hemositometer sehingga diperoleh 1,5x10⁶ sel/mL. Sel limfosit siap untuk diuji aktivitasnya dan dikultur dalam inkubator CO₂ suhu 37 °C.

Uji Proliferasi Sel Limfosit dengan Metode MTT Reduction. Sebanyak 100 µL sel limfosit (1,5 x10⁶/mL) didistribusikan ke dalam sumuran mikroplat 96-wells sesuai dengan kelompok perlakuan, kemudian ditambahkan vaksin hepatitis B sebanyak 10 µL/sumuran dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator CO₂ dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37°C. Setelah inkubasi ditambahkan sampel uji sebanyak 10 µL/sumuran dengan masing-masing konsentrasi, diinkubasi lagi selama 48 jam dalam inkubator dengan aliran 5% CO₂ pada suhu 37 °C. Setelah inkubasi 48 jam, setiap sumuran ditambahkan larutan 10 µL MTT 5 mg/mL. Selanjutnya diinkubasi lagi 4 jam pada suhu 37 °C. Sel yang hidup akan bereaksi dengan MTT membentuk kristal formazan. Reaksi dengan MTT dihentikan dengan menambah larutan SDS 10 % dalam asam klorida 0,01 N sebanyak 50 µL pada tiap sumuran. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan mikroplat *reader* dengan panjang gelombang 550 nm. Data absorbansi kemudian dikonversi menjadi data indeks stimulasi (IS) proliferasi sel limfosit menurut persamaan berikut⁽¹¹⁾:

$$IS \text{ proliferasi} = \frac{\text{Absorbansi (Sampel - Kontrol Medium)}}{\text{Absorbansi (Kontrol Normal - Kontrol Medium)}}$$

Kadar Flavonoid Total dan Korelasinya dengan Indeks Stimulasi. Total flavonoid dari ekstrak/fraksi dihitung berdasarkan metode kolorimetri⁽¹²⁾. Kuersetin digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Dari larutan kuersetin induk (dalam metanol) dibuat seri konsentrasi 5, 10, 20, 40, dan 80 ppm. Larutan standar kuersetin selanjutnya diambil 1 mL lalu ditambahkan 3 mL metanol; 0,1 mL AlCl₃ 10%; 0,1 mL kalium asetat; dan 2,8 mL akuadestilata. Larutan kemudian disimpan 30 menit pada tempat gelap dengan suasana suhu kamar, absorbansinya diukur pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (430 nm). Metode yang sama digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total ekstrak/fraksi. Total flavonoid sampel dihitung ekuivalen dengan gram kuersetin/100 gram sampel. Data dibuat tiga kali replikasi. Korelasi antara kadar flavonoid total dengan indeks stimulasi proliferasi sel limfosit dianalisis dengan menggunakan korelasi Pearson dan regresi⁽¹³⁾.

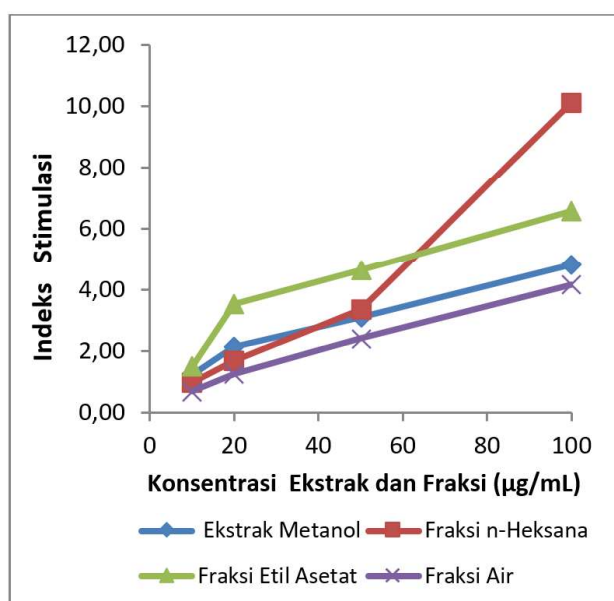
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi. Hasil maserasi simplisia benalu batu asal Morowali Utara yang telah teridentifikasi sebagai *Begonia* spesies baru diperoleh ekstrak metanol seberat 22,77 g dengan persen rendemen sebesar 13,49%. Hasil partisi (ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah) ekstrak metanol

yang disuspensikan dengan metanol 70 % diperoleh fraksi n-heksana seberat 9,47 g dengan persen rendemen 63,13%, fraksi etil asetat seberat 3,69 g dengan persen rendemen 24,6%, dan fraksi air seberat 1,47 g dengan persen rendemen 9,8%.

Hasil perlakuan dengan menggunakan corong pisah tersebut diperoleh persen *recovery* sebesar 97,53%. Hal ini menunjukkan bahwa hanya sedikit senyawa yang hilang dari proses partisi yang dapat dimungkinkan dari masih adanya pelarut ekstrak metanol tersisa dari ekstrak metanol yang dipartisi. Dari persen rendemen yang diperoleh dapat diketahui bahwa kecenderungan senyawa yang dikandung oleh *Begonia medicinalis* lebih larut ke dalam pelarut n-heksana. Ini menggambarkan *Begonia medicinalis* lebih banyak mengandung senyawa-senyawa yang bersifat nonpolar daripada yang polar. Hasil partisi dengan menggunakan pelarut n-butanol yang telah dilakukan (sebelumnya) menghasilkan sangat sedikit fraksi n-butanol sehingga akan menyulitkan dalam proses pengujian, maka fraksi tersebut digabung dengan fraksi yang larut ke dalam pelarut air.

Proliferasi Sel Limfosit. Profil aktivitas proliferasi masing-masing sampel uji dapat dilihat pada grafik (Gambar 2). Grafik indeks stimulasi proliferasi sel limfosit tersebut memberikan gambaran bahwa dengan menambahkan ekstrak metanol maupun fraksi n-heksana, etil asetat, dan fraksi air dapat memicu aktivitas proliferasi sel limfosit dengan r^2 masing-masing 0,979; 0,962; 0,898; dan 0,996 secara berurutan. Semua aktivitas yang dihasilkan bersifat meningkatkan proliferasi sel

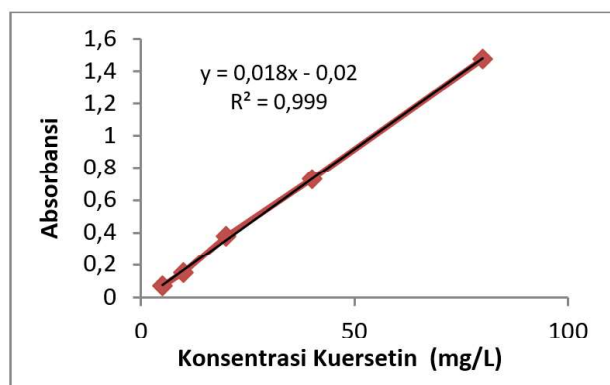


Gambar 2. Grafik hubungan konsentrasi sampel uji dengan indeks stimulasi.

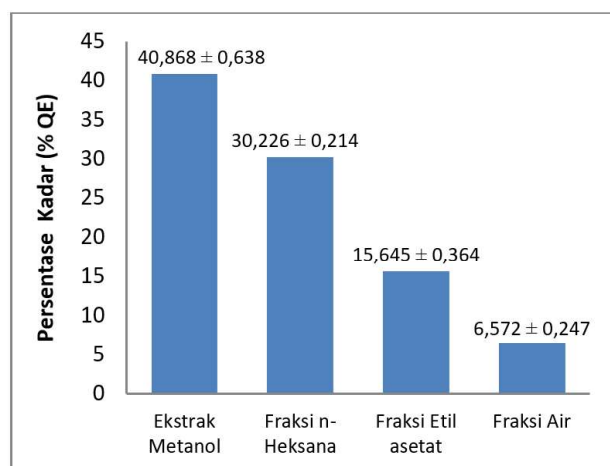
limfosit (imunostimulator) dan tidak ada yang bersifat mensupresi sel limfosit.

Melalui grafik pada Gambar 2, diketahui pada konsentrasi 10, 20, hingga 50 µg/mL fraksi etil asetat lebih cenderung memberikan stimulasi tertinggi pada sel limfosit jika dibandingkan sampel uji yang lainnya. Namun, pada konsentrasi 100 µg/mL fraksi n-heksana memberikan indeks stimulasi tertinggi diantara semua sampel uji. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi tertentu (konsentrasi relatif lebih besar) memberikan stimulasi yang lebih baik yang dapat dikaitkan dengan semakin tingginya konsentrasi senyawa yang memberikan kontribusi terhadap aktivitas proliferasi sel limfosit, maka aktivitas peningkatan proliferasi juga semakin tinggi.

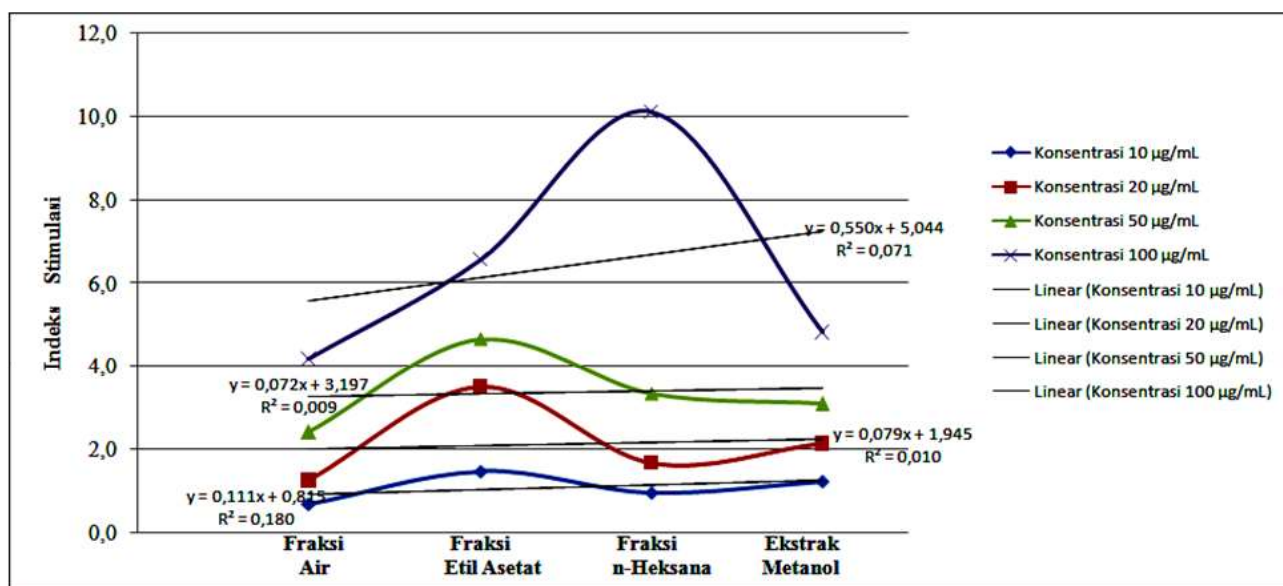
Kadar Flavonoid Total dan Korelasinya dengan Indeks Stimulasi. Penentuan kadar flavonoid total sampel (ekstrak/fraksi) benalu batu mengikuti persamaan pada Gambar 3. Berdasarkan kurva kalibrasi tersebut, diperoleh kadar flavonoid ekstrak dan fraksi benalu batu seperti pada Gambar 4. Berdasarkan Gambar 4, diketahui bahwa ekstrak metanol sebagai *crude* ekstrak memiliki kadar



Gambar 3. Kurva kalibrasi kuersetin.



Gambar 4. Diagram kadar flavonoid total sampel (QE : Quercetin Equivalent).



Gambar 5. Diagram hubungan kadar flavonoid total sampel vs indeks stimulasi.

flavonoid total yang lebih besar jika dibandingkan dengan hasil fraksinasi. Kadar flavonoid total fraksi n-heksana menunjukkan kadar flavonoid total yang lebih besar jika dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi air. Fakta ini menunjukkan adanya pengaruh pelarut metanol 70% dalam membantu melarutkan senyawa flavonoid yang ada pada *crude* ekstrak⁽¹⁴⁾. Meskipun hasil ini berbeda dengan hasil fraksinasi yang umumnya lebih banyak pada fraksi etil asetat⁽¹⁵⁾.

Korelasi antara kadar flavonoid total dan indeks stimulasi untuk setiap konsentrasi uji dapat dilihat pada Gambar 5. Berdasarkan analisis, nilai korelasi Pearson yang diperoleh memiliki korelasi positif yang ditunjukkan dengan nilai r sebesar 0,082. Nilai ini menggambarkan korelasinya masuk dalam kategori yang sangat rendah atau bahkan cenderung dapat diabaikan^(16,17). Hasil analisis regresi pada konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi 0,18. Hal ini menunjukkan bahwa 18% aktivitas proliferasi sel limfosit adalah hasil kontribusi dari senyawa flavonoid, sedangkan 82% lainnya hasil kontribusi dari senyawa lain selain flavonoid⁽¹⁸⁾.

Koefisien-koefisien korelasi pada konsentrasi 20, 50, dan 100 µg/mL adalah sebesar 1%; 0,9%; dan 7,1% secara berturut-turut. Hasil ini sejalan dengan penelitian Chiang *et al.* (2003), senyawa flavonoid dengan konsentrasi di bawah 20 µg/mL dapat memberikan efek meningkatkan proliferasi sel limfosit⁽¹⁹⁾. Hal ini berbeda dengan Ilina *et al.* (2019) yang menyatakan bahwa ekstrak dengan kandungan flavonoid tertinggi memberikan aktivitas yang tinggi terhadap proliferasi sel limfosit⁽²⁰⁾.

Aktivitas proliferasi sel limfosit dari sampel uji dipengaruhi oleh kandungan kimia yang terdapat dalam setiap sampel (ekstrak/fraksi). Pada fraksi n-heksana hasil uji komponen kimia secara kromatografi lapis tipis menunjukkan hasil yang positif mengandung golongan senyawa steroid dan flavonoid (data KLT tidak ditampilkan), sedangkan pada fraksi etil asetat dengan cara yang sama, positif mengandung senyawa terpenoid dan flavonoid (data KLT tidak ditampilkan). Senyawa triterpenoid pentasiklik seperti asam oleanolat (asam 3-hidroksi, 12(13)-en, 28-oleanolat) dengan rumus molekul $C_{30}H_{48}O_3$ dapat menstimulasi peningkatan proliferasi sel limfosit^(21,22). Selain itu, hasil penelitian Cholakova *et al.* (2002) menyatakan bahwa senyawa terpenoid dan flavonoid dapat meningkatkan proliferasi sel limfosit⁽²³⁾.

Disisi lain, terdapat golongan senyawa triterpen yang memiliki aktivitas yang kuat dalam menghambat proliferasi sel limfosit manusia serta mengurangi pertumbuhan kanker pada manusia^(3,24,25). Fakta ini mengindikasikan secara kuat untuk mempelajari lebih lanjut mengenai aktivitas subfraksi (hasil fraksinasi lanjutan dari fraksi) dan isolat yang berasal dari *Begonia medicinalis* guna mengidentifikasi senyawa yang memiliki efek toksik pada sel kanker dan efek sitoprotektif dalam sel normal serta yang bertanggung jawab terhadap stimulasi proliferasi sel limfosit yang ditunjukkan pada hasil penelitian ini.

Berdasarkan kajian literatur, senyawa flavonoid baicalin dan baicalein dapat memberikan efek meningkatkan proliferasi sel limfosit, namun senyawa flavonoid lain seperti luteolin justru bersifat menghambat proliferasi sel limfosit⁽²⁶⁾. Flavonoid

dapat mempengaruhi aktivitas protein tirosin kinase, tetapi protein tirosin kinase dari sumber seluler yang berbeda tidak secara seragam dipengaruhi oleh berbagai flavonoid⁽²⁷⁾. Selain itu, senyawa flavonoid dapat menekan aktivitas mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) dalam sel Th (sel T *helper*) dengan cara menginduksi sel Treg sehingga justru dapat menekan respons imun.

Secara umum senyawa flavonoid dapat memodulasi respons imun, meskipun mekanisme molekuler yang tepat yang terlibat dalam perubahan ini belum dipahami dengan baik^(28,29). Peran yang berbeda juga ditunjukkan oleh senyawa steroid seperti cucurbitacin yang lebih bersifat immunosupresif baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, namun mekanisme yang mendasarinya belum sepenuhnya dipahami^(30,31).

SIMPULAN

Ekstrak metanol, fraksi n-heksana, etil asetat, dan air *Begonia medicinalis* memberikan peningkatan terhadap proliferasi sel limfosit (imunostimulator) dan tidak ada yang bersifat mensupresi sel limfosit. Ekstrak dan fraksi pada konsentrasi 100 µg/mL memberikan indeks stimulasi tertinggi. Kadar flavonoid total dan indeks stimulasi memiliki korelasi yang sangat rendah ($r=0,082$) dan konsentrasi 10 µg/mL memiliki koefisien korelasi tertinggi ($r^2=0,18$).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi atas pendanaan penelitian ini dan Pimpinan/Staf Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada tempat dilaksanakannya penelitian serta Bapak Wisnu Handoyo Ardi pada Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI atas identifikasi tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardi WH, Zubair SM, Ramadanil & Thomas DC. *Begonia medicinalis* (Begoniaceae), a new species from Sulawesi, Indonesia. *Phytotaxa*. 2019;423(1):041-5. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.423.1.5>.
- Anam S, Yuliet, Ritna A, Dwimurti F, Rismayanti D, Zubair, MS. Aktivitas sitotoksik ekstrak metanol benalu batu (*Begonia* sp.) : ethnomedicine Suku Wana Sulawesi Tengah. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2014;12(1):10-6. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/176>.
- Zubair MS, Anam S, Khumaidi A, Susanto Y, Hidayat M, & Ridhay A. Molecular docking approach to identify potential anticancer compounds from *Begonia* (*Begonia* sp). *AIP Conference Proceedings*. 2016; 1755(1):1-7. <https://doi.org/10.1063/1.4958513>.
- Venkatesha SH, Astry B, Nanjundiah SM, Kim HR, Rajaiah R, Yang Y, Tong L, Yu H, Berman BM, Moudgil KD. Review : Control of autoimmune arthritis by herbal extracts and their bioactive components. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*. 2016;11(2):301-7. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2016.02.003>.
- Zhang H, Chen J. Current status and future directions of cancer immunotherapy. *Journal of Cancer*. 2018; 9(10):1773-81. doi: 10.7150/jca.24577.
- Ménétrier-Caux C, Ray-Coquard I, Blay JY & Caux C. Lymphopenia in cancer patients and its effects on response to immunotherapy: an opportunity for combination with cytokines?. *Journal for Immuno Therapy of Cancer*. 2019;7(1):1-15. <http://dx.doi.org/10.1186/s40425-019-0549-5>.
- Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, & Ameer MA. Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*. 2004;59(7-8):468-76. <http://doi.org/10.1515/znc-2004-7-803>.
- Khumaidi A, Hertiani T, & Sasmito E. Analisis korelasi antara efek proliferasi limfosit dengan kandungan fenolik dan flavonoid subfraksi etil asetat *Myrmecodia tuberosa* (Non Jack) Bl. secara *in vitro* pada mencit BALB/c. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2015; 13(1): 102-7. <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/132>.
- Huang CF, Lin SS, Liao PH, Young SC, & Yang CC. The immunopharmaceutical effects and mechanism on herb medicine. *Cellular & Molecular Immunology*. 2008;5(1):23-31. <http://www.cmi.ustc.edu.cn/5/1/23.pdf>.
- Hertiani T, Sasmito E, Sumardi, & Ulfah M. Preliminary studi on immunomodulatory effect of sarang semut tubers *Myrmecodia tuberosa* and *Myrmecodia pendens*. *On Line Journal of Biological Sciences*. 2010;10(3):136-41. doi : 10.3844/ojbsci.2010.136.141. <https://thescipub.com/abstract/10.3844/ojbsci.2010.136.141>.
- Saraphanchotiwitthaya A, Ingkaninan K, & Sripalakit P. 2007. Immunomodulating activity of thai rejuvenating plants. *Naresuan University Journal*. 2007;15(3):149-57.
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, & Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002;10(3):178-82.
- Munawaroh R, Siswadi, Setyowati EP, Murwanti R, & Hertiani T. Correlation between total flavonoid contents and macrophage phagocytosis activity of

- fractions from faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br.) barks ethanolic extract in vitro. *Traditional Medicine Journal*. 2018;23(1):47-55. <https://doi.org/10.22146/mot.30882>.
14. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, & Ju Y. 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(3):296-302. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2013.11.001>.
 15. Nastiti K, Sudarsono, & Nugroho AE. Evaluation of in vitro immunomodulatory effect of fractions of *Ficus septica* Burm. F. and their total flavonoid and phenolic contents. *International Food Research Journal*. 2014;21(5):1981-7.
 16. Schober P, Boer C, & Schwarte LA. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesthesia & Analgesia*. 2018;126(5):1763-8. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>.
 17. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish Journal of Emergency Medicine*. 2018;18(3):91-3. <https://doi.org/10.1016/j.tjem.2018.08.001>.
 18. Rohman A, Riyanto S, & Hidayati NK. Aktivitas antioksidan, kadar fenolik total, dan flavonoid total daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Agritech*. 2007;27(4):147- 51.
 19. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, & Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. *Planta Med*. 2003;69(7):600-4.
 20. Ilina T, Kashpur N, Granica S, Bazytko A, Shinkovenko I, Kovalyova A, Goryacha O, & Koshovyi O. Phytochemical profiles and in vitro immunomodulatory activity of ethanolic extracts from *Galium aparine* L. *Plants*. 2019;8(12):541-53. <https://doi.org/10.3390/plants8120541>.
 21. Ayatollahi AM, Ghanadian M, Afsharypour S, Abdella OM, Mirzai M, & Askari G. Pentacyclic triterpenes in *Euphorbia microsciadia* with their T-cell proliferation activity. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2011;10(2): 287-94.
 22. Rios JL. Effect of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010;128(1):1-14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.045>.
 23. Cholakova M, Christov V, Dimitrova D, Evstatieva L, Alexandrova R, Nikolova E. Flavonoid and terpenoid isolated from *Loranthus europaeus* with stimulatory effect on lymphocyte proliferation. *Experimental Pathology and Parasitology*. 2002;5(9):45-8.
 24. Moiteiro C, Justino F, Tavares R, Marcelo Curto MJ, Florencio MH, Nascimento M, Pedro M, Cerqueira F, Pinto MM. Synthetic secofriedelane and friedelane derivatives as inhibitor of human lymphocyte proliferation and growth of human cancer cell lines in vitro. *Journal of Natural Products*. 2001;64(10): 1273-7.
 25. Arokiyaraj S, Perinbam K, Agastian P, Balaraju K. Immunosuppressive effect of medicinal plants of kolli hills on mitogen-stimulated proliferation of the human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Indian Journal of Pharmacology*. 2007;39(4):180-3. doi: 10.4103/0253-7613.36535.
 26. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, & Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of plantago species. *Planta Med*. 2003;69(7):600-4. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41113>.
 27. Middleton JRE, Kandaswami C, & Theoharides TC. Review : the effect of plant flavonoids on mammalian cells : implication for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. 2000;52(4):673-751.
 28. Hosseinzade A, Sadeghi O, Biregani AN, Soukhtehzari S, Brandt GS, & Esmailzadeh A. Immunomodulatory effects of flavonoids: possible induction of T CD4+ regulatory cells through suppression of mTOR pathway signaling activity. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(51):1-12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00051>.
 29. Saxton RA, & Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell*. 2017;168(6): 960-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>.
 30. Wang L, Li C, Lin Q, Zhang X, Pan H, Xu L, Shi Z, Ouyang D, & He X. Cucurbitacin E suppresses cytokine expression in human Jurkat T cells through down-regulating the NF-κB signaling. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2015;47(6): 459–65. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmv030>.
 31. Rasheed A, & Qasim M. A review of natural steroids and their applications. *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*. 2013;4(2): 520-31. [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(2\).520-31](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(2).520-31).

Sifat Fisikokimia dan Aktivitas Antioksidan *Crude* Fukoidan Hasil Ekstraksi dari *Sargassum cinereum*

(Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Crude Fucoidan extracted from *Sargassum cinereum*)

LILIEK NURHIDAYATI^{1*}, YASHINTA FITRIAINI¹, SYAMSUDIN ABDILLAH¹, ESTI
MUMPUNI¹, MOHAMAD RAFI²

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta 12640

²Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian
Bogor, Dramaga, Bogor 16680

Diterima: 29 Januari 2020, Disetujui: 27 Maret 2020

Abstrak: Rumput laut coklat telah dikenal sebagai sumber fukoidan yang memiliki berbagai aktivitas biologi. Fukoidan bisa diperoleh dengan berbagai cara ekstraksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengekstraksi, mengkarakterisasi dan menguji aktivitas antioksidan *crude* fukoidan hasil ekstraksi dari *Sargassum cinereum*. Ekstraksi *crude* fukoidan dilakukan dengan merefluks pada suhu 100 °C dengan lama waktu 4 dan 5 jam kemudian diendapkan dengan etanol. Hasil ekstraksi berupa serbuk coklat kehitaman. Rendemen dengan lama ekstraksi 4 jam sebesar 2,78% yang tidak berbeda bermakna dengan lama ekstraksi 5 jam. Penapisan fitokimia terhadap *crude* fukoidan menunjukkan bahwa selain fukoidan, terdapat senyawa golongan flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, dan tannin. Hasil ekstraksi 4 jam dan 5 jam memiliki kadar sulfat sebesar 16,31% dan 11,22%, kadar karbohidrat total 22,94 % dan 22,85%, dan pada spektrum FTIR menunjukkan pita serapan OH dari karbohidrat, fukosa, sulfat, dan asam uronat. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1- difenil 2-pikrihidrazil) menghasilkan nilai IC₅₀ untuk ekstrak 4 jam dan 5 jam sebesar 721,9 µg/ml dan 749,9 µg/ml. Dapat disimpulkan bahwa *crude* fukoidan *Sargassum cinereum* memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

Kata Kunci : *Sargassum cinereum*, ekstraksi, fukoidan, fisikokimia, antioksidan.

Abstract: Brown seaweed has been known as a fucoidan source that has various biological activities. Fucoidan could be obtained by various extraction methods. This study aims to extract, characterize and to evaluate the antioxidant activity of crude fucoidan extracted from *Sargassum cinereum*. Extraction was carried out by refluxing at 100 °C for 4 and 5 hours and then precipitated with ethanol. The crude fucoidan was brown powder. The yield with 4 hours extraction time was 2.78% which did not differ significantly from the 5 hours extraction time. Phytochemical screening of crude extract showed that beside fucoidan there were flavonoids, saponins, steroids, triterpenoids, and tannins. The extraction with duration of 4 hours and 5 hours had sulfate content of 16.31% and 11.22%, total carbohydrate content were 22.94% and 22.85%, and in the FTIR spectrum showed OH absorption bands of carbohydrates, fucose, sulfates and uronic acid. Testing of antioxidant activity using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhyrazyl) free radical inhibition method produced IC₅₀ values of 721.9 µg/ml and 749.9 µg/ml respectively and it was concluded that crude fucoidan of *Sargassum cinereum* had weak antioxidant activity.

Keywords: *Sargassum cinereum*, extraction, fucoidan, physicochemical, antioxidant.

*Penulis korespondensi
E-mail: liliek_nurhidayati@yahoo.com

PENDAHULUAN

RUMPUT laut merupakan salah satu sumber daya hayati yang sangat melimpah di perairan Indonesia yaitu sekitar 8,6% dari total biota laut. Pemanfaatan rumput laut coklat (*Phaeophyceae*) masih sangat terbatas. Rumput laut coklat ini masih dianggap sebagai limbah yang mengotori pantai, harganya relatif murah serta belum dimanfaatkan secara luas⁽¹⁾.

Salah satu jenis rumput laut coklat yang potensial adalah *Sargassum*. *Sargassum* mengandung alginat dan fukoidan. Fukoidan merupakan polisakarida tersulfatasi yang terdapat pada matriks dinding sel dari alga coklat dan tersusun oleh L-fukosa dan sulfat. Fukoidan hanya ditemukan pada rumput laut coklat dan timun lau⁽²⁾. Dalam beberapa tahun terakhir, fukoidan yang diisolasi dari berbagai spesies telah dipelajari secara luas karena memiliki beragam aktivitas yaitu antikoagulan, menurunkan lemak dalam darah, dan antioksidan⁽³⁾. Fukoidan yang berasal dari rumput laut coklat dapat digunakan sebagai antioksidan alami⁽⁴⁾.

Kondisi ekstraksi sangat mempengaruhi nilai rendemen dan mutu *crude* fukoidan. Kondisi tersebut meliputi pelarut, suhu dan waktu ekstraksi. Selain pengaruh asam, pemanasan juga mempengaruhi rendemen fukoidan. Pemanasan dapat membantu menghancurkan talus rumput laut coklat untuk mengeluarkan polisakarida yang berada pada dinding sel. Fukoidan dalam *Sargassum* bisa diekstraksi dengan cara sederhana⁽⁵⁾ dan ekstraksi bertahap⁽⁶⁾. Pada penelitian ini dipilih cara ekstraksi sederhana menggunakan pelarut air pada suhu 100 °C⁽⁵⁾ dengan variasi waktu 4 dan 5 jam. Hasil ekstraksi dievaluasi aktivitas antioksidannya dengan metode peredaman radikal bebas 1,1- difenil 2-pikrihidrazil (DPPH).

Tujuan dari penelitian ini adalah mengekstraksi, mengarakterisasi dan menguji aktivitas antioksidan *crude* fukoidan hasil ekstraksi sederhana *Sargassum sp* yang berasal dari daerah.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rumput laut coklat jenis *Sargassum sp* diambil pada bulan Desember 2017 dari pantai Cilurah, Banten yang memiliki koordinat posisi 6°16' LS dan 105°49' BT. Fukoidan komersial dari *Okinawa mozuku* (Meiji), 1,1- difenil 2-pikrihidrazil (DPPH) (Sigma D9132), vitamin C (Asean reference standar), metanol (Merck, Darmstadt, Jerman), etanol (Merck, Darmstadt, Jerman), bahan kimia yang lain bermutu *pro-analysis* dari Merck, Darmstadt, Jerman. ma.

METODE. Ekstraksi dan penetapan parameter mutu *crude* fukoidan dari *S. cinereum*. Rumput laut coklat yang sudah dideterminasi di Laboratorium

Fakultas Biologi dan Kelautan Universitas Indonesia disortasi, dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan pasir dan pengotor yang melekat pada bahan. Pengerinan dilakukan pada suhu kamar (25 °C) dengan cara diangin-anginkan, diserbukkan menggunakan blender dan diayak dengan pengayak 4/18.

Ekstraksi *crude* fukoidan dilakukan menurut cara Junaedi⁽⁵⁾ dengan dimodifikasi. Sebanyak lebih kurang 150 g serbuk rumput laut coklat direfluks dengan air (1:10) pada suhu 100 °C selama 4 jam dan 5 jam. Selanjutnya ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil filtratnya. Ke dalam filtratnya ditambahkan CaCl₂ 4M, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan diambil bagian supernatan. Ke dalam supernatan ditambahkan etanol 70% dalam jumlah yang sama dengan jumlah filtrat, disimpan selama 24 jam pada suhu 4 °C. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan diambil endapannya. Endapan yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan metode *freeze drying* pada tekanan 1 atm dan suhu -35°C selama 30 jam. Ekstrak yang diperoleh diamati warna, bentuk, bau, dan susut pengeringan. Penetapan Susut Pengeringan ditetapkan dengan cara memanaskan sampai bobot konstan⁽⁷⁾ menggunakan *moisture analyzer Precisa HA60*.

Penapisan Fitokimia. Pada penelitian ini, karena tanpa pemurnian lebih lanjut, dilakukan juga penapisan fitokimia terhadap *crude* fukoidan. Identifikasi kandungan alkaloid, triterpenoid, steroid, flavonoid, fenol, saponin, kuinon, tannin, dan tannin katekuat dilakukan menurut cara *Phytochemical Screening Fansworth*⁽⁸⁾. Penapisan fitokimia tersebut dilakukan terhadap simplisia dan *crude* fukoidan.

Pembuatan Spektrum Inframerah. Untuk identifikasi gugus fungsi, dibuat spektrum inframerah dari *crude* fukoidan hasil ekstraksi 4 jam dan 5 jam dengan pembanding fukoidan komersial. Sebanyak lebih kurang 1-2 mg masing-masing zat padat tersebut digerus sampai halus, dimasukkan ke dalam *simple pan* untuk dibuat spektrum inframerah pada bilangan gelombang 4000-500 cm⁻¹ menggunakan spektrofotometer FTIR *Agilent Cary 630*.

Penetapan Kadar Karbohidrat Total. Penetapan kadar karbohidrat total dilakukan menurut cara Dubois⁽⁹⁾. Sejumlah lebih kurang 2 mg ekstrak dilarutkan dalam 5 mL akuades, ditambahkan 0,5 mL fenol 0,3% dan 5 mL asam sulfat pekat(p). Didinginkan pada suhu lebih kurang 15°C dengan menggunakan es selama 30 menit. Setelah 30 menit sampel dihomogenkan dengan vortex. Untuk blanko digunakan akuades dengan perlakuan yang sama

seperti baku pembanding dan sampel. Serapan diukur pada panjang gelombang (λ) = 490 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV 1800. Kadar karbohidrat dihitung menggunakan baku pembanding glukosa dengan konsentrasi 40, 60, 80, 100 dan 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁽⁹⁾.

Penetapan Kadar Sulfat. Penetapan kadar sulfat dilakukan menurut cara Dogson⁽⁹⁾. Sejumlah lebih kurang 2 mg sampel ekstrak *Sargassum* dilarutkan dalam air 2 mL, kemudian ditambahkan TCA 4% sebanyak 2 mL dan 2 mL BaCl_2 -gelatin, diaduk dan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV 1800 pada panjang gelombang 420 nm, menggunakan air sebagai blanko. Kadar dihitung menggunakan persamaan garis regresi yang diperoleh dari kurva baku natrium sulfat dengan konsentrasi 100, 150, 200, 250, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Uji Aktivitas Antioksidan. Ke dalam larutan ekstrak ditambahkan 1,0 mL DPPH 0,4 mM dan metanol *pro analysis* sampai tanda 5,0 mL untuk mendapatkan konsentrasi 75, 100, 125, 150, 175 dan 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dihomogenkan dan mulut tabung ditutup. Pembuatan larutan uji dilakukan 3 kali (triplo). Larutan diinkubasi pada suhu 37 °C di ruang gelap selama 30 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum (λ) 516,0 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV 1800 menggunakan blanko larutan DPPH 0,4 mM dalam metanol. Sebagai kontrol positif digunakan vitamin C dengan konsentrasi 1,2,3,4,5, dan 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

% Peredaman radikal bebas dengan rumus :
Peredaman radikal bebas(%) = $\{(Ab-As)/Ab\} \times 100\%$

Keterangan ;

Ab = Serapan larutan DPPH dalam metanol

As = Serapan larutan DPPH setelah bereaksi dengan larutan sampel

Analisis Data. Semua percobaan dilakukan sebanyak tiga kali, semua perbandingan statistik dilakukan menggunakan ANOVA satu arah menggunakan statistik signifikan p value 0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman. Hasil determinasi tanaman yang dilakukan menunjukkan bahwa rumput laut coklat yang digunakan pada penelitian ini adalah dari spesies *Sargassum cinereum*. Bahan diambil pada kedalaman 2 meter dari permukaan laut, dan waktu pengambilan bulan Desember 2017 yang bertepatan dengan musim hujan. Rumput laut coklat yang digunakan dalam penelitian ini adalah rumput

laut coklat yang memiliki panjang thallus 1-2 cm, daun berbentuk lonjong kecil dengan tepi bergerigi berwarna coklat kehijauan.

Ekstraksi Crude Fukoidan. Cara ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah refluks. Refluks dipilih karena proses pengerjaannya sederhana serta dengan adanya pemanasan dapat mempermudah penarikan senyawa yang diinginkan dan mempercepat penghancuran dinding sel dari rumput laut coklat. Rendemen yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan dengan cara dingin. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut akuades dipilih karena, mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan menggunakan pelarut asam. Ekstraksi dengan menggunakan air dapat mempertahankan bioaktivitas dari fukoidan karena air tidak mendekomposisi struktur fukoidan, serta lebih ramah lingkungan dan sederhana⁽⁵⁾.

Hasil ekstraksi dengan variasi lamanya waktu ekstraksi dengan menggunakan suhu dan pelarut yang sama didapatkan rendemen ekstraksi selama 4 jam dan 5 jam berturut-turut sebesar 2,78% dan 2,77% yang tidak berbeda bermakna. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Junaidi dengan variasi waktu ekstraksi yang berbeda didapatkan rendemen fukoidan tertinggi pada waktu ekstraksi 4 jam⁽⁵⁾. Tingginya rendemen *crude* fukoidan tersebut kemungkinan disebabkan adanya senyawa lain yang ikut terekstraksi seperti alginat dan laminaran⁽¹⁰⁾. Alginat merupakan polisakarida yang merupakan salah satu komponen penyusun dinding sel rumput laut coklat dengan komposisinya tinggi di dalam rumput laut coklat berkisar 30-40 % sedangkan fukoidan hanya 2-4 % per berat kering rumput laut⁽¹¹⁾.

Penapisan Fitokimia. Penapisan fitokimia merupakan metode pengujian kandungan kimia suatu simplisia secara kualitatif dan dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam serbuk maupun ekstrak simplisia. Dari hasil penapisan fitokimia terhadap serbuk simplisia menunjukkan *Sargassum cinereum* mengandung flavonoid, saponin, kuinon, fenol, steroid triterpenoid serta tanin sedangkan pada hasil ekstraksi, selain fukoidan menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin, steroid triterpenoid dan tanin galat. Senyawa- senyawa golongan ini ikut tersari saat direfluks dengan air karena terdapat dalam bentuk glikosida dengan komponen karbohidrat dari rumput laut coklat (Tabel 1).

Senyawa flavonoid merupakan golongan fenol terbesar yang senyawanya terdiri dari C6-C3-C6 dan sering ditemukan di berbagai macam tumbuhan dalam bentuk glikosida atau gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih gugus hidroksil fenolik. Senyawa flavonoid mempunyai potensi sebagai sumber

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia.

Uji fitokimia	Serbuk simplisia	Crude fukoidan 4 jam	Crude fukoidan 5 jam
Alkaloid			
a. Dragendroff	-	-	-
b. Meyer	-	-	-
c. Kertas Saring	-	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	+	+
Kuinon	+	-	-
Fenol	+	-	-
Steroid dan Triterpenoid	+	+	+
Tanin			
a. FeCl ₃ 1 %	+	+	+
b. Gelatin 1 %	+	+	+
c. Katekuat	+	-	-

Keterangan : (+) memberikan reaksi positif ; (-) memberikan reaksi negatif

Tabel 2. Organoleptik serbuk simplisia dan crude fukoidan.

Sampel	Warna	Bentuk	Bau
Serbuk Simplisia	Coklat kehijauan	Padat, serbuk kering	Berbau khas laut, menyengat
Ekstrak	Coklat kehitaman	Serbuk	Tidak berbau

antioksidan dan dapat digunakan sebagai tabir surya karena memiliki kemampuan dalam menyerap sinar ultraviolet dan sebagai proteksi terhadap cuaca ekstrim, kemampuan tersebut karena adanya ikatan rangkap tunggal pada senyawa flavonoid. Senyawa fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau 2 gugus hidroksil. Fenol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida, seperti diketahui senyawa fenol mempunyai aktivitas sebagai antioksidan, antibiotik dan mempunyai serapan kuat terhadap sinar ultraviolet. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia, senyawa fenol tidak ditemukan pada *crude* fukoidan.

Senyawa saponin adalah glikosida triterpenoid dan sterol yang banyak terdapat pada jenis tumbuhan tinggi. Adanya saponin ditandai dengan pembentukan busa pada saat mengekstraksi tumbuhan maupun memekatkan ekstrak. Berdasarkan penapisan, dalam simplisia maupun *crude* ekstrak terkandung saponin yang dibuktikan dengan terbentuknya busa pada saat proses ekstraksi.

Steroid merupakan golongan triterpenoid. Pada penelitian ini, baik simplisia maupun *crude* fukoidan mengandung steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa *Sargassum* sp. mengandung senyawa-senyawa aktif steroid⁽¹⁰⁾. Tanin adalah salah satu golongan senyawa polifenol yang juga banyak ditemukan pada tanaman. Tanin yang terdapat pada

serbuk simplisia memiliki peranan biologis karena fungsinya sebagai pengkelat logam. Kuinon hanya terdapat pada serbuk simplisia, dan tidak terdapat pada ekstrak hal ini dapat dipengaruhi oleh kelarutan dari senyawa kuinon tersebut yaitu senyawa kuinon sedikit larut dalam air dan lebih banyak larut dalam lemak, oleh karena itu pada ekstrak tidak terdeteksi senyawa kuinon.

Penetapan parameter mutu *crude* fukoidan. Hasil pengamatan organoleptik serbuk simplisia dan *crude* fukoidan disajikan pada Tabel 2. Berdasarkan tabel tersebut dapat dilihat perbedaan organoleptik antara serbuk simplisia dengan *crude* fukoidan. Ekstraksi dan pengeringan bisa mengubah warna dan bau.

Penetapan susut pengeringan dilakukan untuk mengetahui kadar air dan senyawa yang menguap dalam ekstrak setelah dilakukannya proses pengeringan, adapun senyawa yang dimaksud yaitu senyawa volatil, senyawa termolabil dan air. Hasil penetapan susut pengeringan pada *crude* ekstrak dengan waktu ekstraksi 4 dan 5 jam berturut-turut adalah 24,24% dan 27,69%.

Penetapan Kadar Sulfat. Hasil perhitungan kandungan sulfat menggunakan persamaan $Y = 0,004063x - 0,0255$ diperoleh kandungan sulfat pada ekstrak 4 dan 5 jam yaitu sebesar 16,31 % dan 11,22% Kandungan sulfat dari ekstrak air tinggi disebabkan oleh perlakuan ekstraksi yang menggunakan pelarut air sehingga memungkinkan

untuk mempertahankan kandungan sulfat di dalam fukoidan tersebut. Dari hasil uji aktivitas antioksidan, walaupun kedua hasil ekstraksi memiliki aktivitas antioksidan yang lemah, tetapi crude fukoidan dengan waktu ekstraksi 4 jam memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah daripada hasil ekstraksi 5 jam. Diduga bahwa kandungan sulfat mempengaruhi bioaktivitas dari fukoidan.

Penetapan Kadar Karbohidrat Total. Kandungan total karbohidrat ini ditetapkan menggunakan metode fenol sulfat. Di antara banyak metode kolorimetri, metode fenol sulfat merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk penentuan karbohidrat, metode fenol sulfat umum digunakan karena sederhana dan sensitif⁽¹²⁾. Hasil penetapan kadar karbohidrat pada ekstraksi 4 dan 5 jam berturut-turut adalah 22,94% dan 22,85%. Kandungan total karbohidrat yang tinggi disebabkan oleh ekstraksi dengan menggunakan pelarut air sehingga, dapat mempertahankan struktur dari fukoidan dan tidak mendegradasi rantai fukoidan.

Spektrum Inframerah. Data spektrum inframerah bermanfaat untuk mengetahui jenis gugus fungsi spesifik yang ada dalam molekul suatu senyawa. Spektrum inframerah ekstrak fukoidan dari rumput laut coklat *Sargassum cinereum* dan spektrum fukoidan komersial Okinawa mozuku dapat dilihat pada Gambar 1.

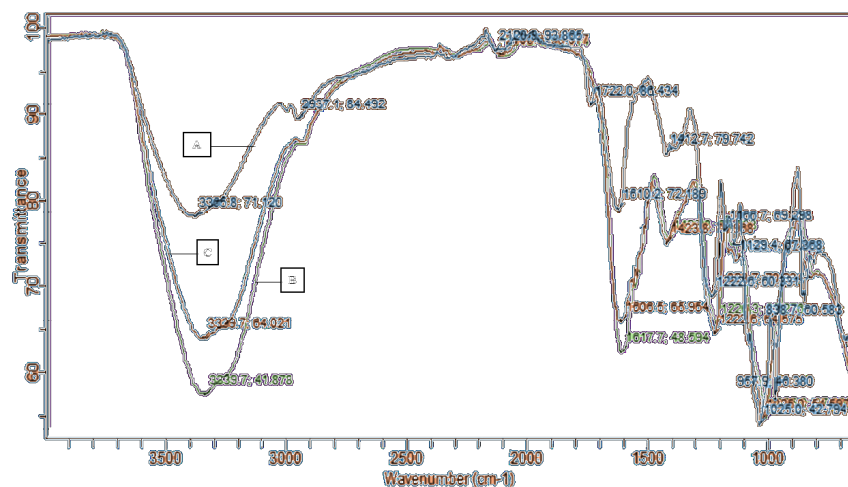
Hasil perekaman spektrum FTIR yang dilakukan pada bilangan gelombang 4000–650 cm^{-1} menunjukkan bentuk atau pola spektrum yang sama antara fukoidan perbandingan dengan crude fukoidan yang diekstraksi dengan waktu yang berbeda, membuktikan bahwa dalam ekstrak air terdapat fukoidan. Spektrum A (fukoidan komersial) menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 3365,80 cm^{-1} dan pada pola spektra sampel B dan C, menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 3339,70 cm^{-1} .

Pita melebar dan spesifik pada bilangan gelombang 2750-3500 diduga merupakan vibrasi gugus fungsi O-H peregangan dari karbohidrat.

Pola spektrum A menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 2937,10 cm^{-1} dan pola spektra B dan C menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 2500 cm^{-1} . Pita kuat dengan lebar medium pada bilangan gelombang 2850-3000 cm^{-1} menunjukkan vibrasi C-H peregangan dari karbohidrat⁽¹²⁾. Pola spektrum A menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 1610,20 cm^{-1} dan pola spektra B dan C menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 1617,70 cm^{-1} dan 1606,50 cm^{-1} . Pita kuat dengan lebar medium pada bilangan gelombang 1600-1820 cm^{-1} merupakan regangan dari C=O dari ester yang diduga merupakan vibrasi dari asam uronat⁽¹³⁾.

Pita pada bilangan gelombang 1412,70 cm^{-1} (spektrum A), dan pita pada 1423,80 cm^{-1} (spektra B dan C) menunjukkan peregangan gugus C-H dari fukosa dan indikasi gugus sulfat yang terikat pada C2 dan C4 dari fukosa. Pita serapan pada kisaran 1470-1400 cm^{-1} mengindikasikan vibrasi dari CH₂ (galaktosa dan mannososa)⁽¹⁴⁾. Pada pola spektrum A menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 1129,40 cm^{-1} dan 1222,60 cm^{-1} , dan pada pola spektra B dan C menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang 1226,30 cm^{-1} dan 1222,60 cm^{-1} . Pita serapan dari seluruh spektra menunjukkan vibrasi CH dari fukosa dan indikasi terdapat fukosa sulfat (S=O), fukosa sulfat memiliki serapan kuat pada bilangan gelombang 1200-1050 cm^{-1} ⁽¹²⁾.

Pita pada bilangan gelombang 1025,10 cm^{-1} pada spektra A, B dan C menunjukkan adanya gugus C-O. Puncak kuat antara 957,90 – 1129,40 cm^{-1} karakteristik dari fukosa dan indikasi vibrasi perengangan S=O terikat pada posisi aksial C-4, dimana gugus S=O



Gambar 1. Spektrum FTIR (A) fukoidan komersial, (B) Fukoidan 4 jam, (C) Fukoidan 5 jam.

aksial memiliki serapan pada bilangan gelombang 910,34-1126,35 cm^{-1} . Pita serapan pada 838,70 cm^{-1} merupakan pita gugus sulfat C-O-S.

Pada semua spektra secara keseluruhan menghasilkan pola yang serupa. Ciri khas fukoidan dilihat dari spektrum FTIR dibuktikan dengan adanya serapan pada bilangan gelombang sekitar 1200 dan 800 cm^{-1} . Posisi sulfat ekuatorial (C-O-S) ditentukan adanya pita serapan 820 cm^{-1} dan yang aksial pada 840 cm^{-1} (15).

Aktivitas Antioksidan. Pengujian antioksidan pada vitamin C bertujuan untuk memeriksa hasil pengujian dengan mengamati respon positif vitamin C terhadap radikal DPPH. Hasil positif dari pengujian antioksidan vitamin C ditandai dengan perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning, perubahan warna tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer yang dinyatakan dengan % peredaman lalu diplotkan terhadap konsentrasi. Nilai IC_{50} kemudian dihitung dari regresi linear yang diperoleh. Digunakan vitamin C sebagai larutan pembanding karena vitamin C merupakan antioksidan yang sangat kuat dan sering digunakan sebagai larutan pembanding dalam pengukuran aktivitas antioksidan.

Kemampuan antioksidan dari *crude* fukoidan diukur pada menit ke – 30 dengan melihat penurunan serapan DPPH (hilangnya warna ungu DPPH) akibat adanya penambahan larutan uji. Nilai serapan DPPH sebelum dan sesudah penambahan larutan uji tersebut dihitung sebagai persen peredaman. Penggunaan metode radikal DPPH untuk pengujian aktivitas antioksidan dipilih karena, DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan banyak digunakan sebagai model untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dalam waktu yang relatif singkat dibandingkan metode lain.

Hasil analisis peredaman radikal bebas oleh ekstrak fukoidan pada konsentrasi 75-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi ekstrak maka semakin meningkat aktivitas peredaman DPPH, karena semakin banyak atom hidrogen dari ekstrak fukoidan yang berpasangan dengan elektron pada radikal bebas DPPH sehingga serapan semakin menurun, jika serapan semakin rendah maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. Peningkatan persen peredaman DPPH ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak fukoidan. Aktivitas antioksidan dari fukoidan berdasarkan mekanisme interaksi antara antioksidan dengan DPPH, dimana radikal bebas DPPH diredam oleh antioksidan melalui transfer elektron maupun donor hidrogen terhadap DPPH membentuk molekul DPPH-H yang stabil. DPPH akan memiliki kelebihan gugus OH yang akan digantikan oleh gugus $\text{OSO}_3\text{-H}$ dan menghasilkan radikal bebas yang stabil. Suatu senyawa bersifat sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang

dari 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dari hasil perhitungan didapatkan IC_{50} *crude* fukoidan dengan lama ekstraksi 4 jam dan 5 jam adalah 721,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 749,9 721,9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nilai IC_{50} *crude* fukoidan berbeda jauh dengan nilai IC_{50} dari vitamin C yakni sebesar 5,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak fukoidan memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

Penelitian mengenai kemampuan fukoidan sebagai antioksidan menunjukkan hasil yang beragam, mulai dari aktivitas yang sangat kuat hingga tidak memiliki aktivitas antioksidan. Pada ekstraksi fukoidan dari *Sargassum tenerrimum* didapatkan hasil bahwa perbedaan konsentrasi pelarut tidak berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan, tetapi aktivitas antioksidan dapat dipengaruhi dari kandungan sulfat dan fukosa. Semakin tinggi rendemen yang didapat semakin tinggi pula kandungan sulfat serta fukosa. Rendemen tertinggi dihasilkan dengan menggunakan pelarut NaCl dengan konsentrasi 1,5 M yaitu sebesar 43,66% diikuti dengan jumlah sulfat dan fukosa yaitu 16,36 % dan 54,7%, sedangkan rendemen yang didapat dengan menggunakan pelarut NaCl dengan konsentrasi 0,5 M menghasilkan rendemen sebesar 33,4% dengan jumlah sulfat dan fukosa sebesar 11,23% dan 43,55%.

Pada fraksi yang menggunakan pelarut NaCl dengan konsentrasi 1 M menghasilkan rendemen sebesar 20,86% dengan kandungan sulfat dan fukosa sebesar 5,1% dan 32,8%. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dan radikal superoksida menghasilkan aktivitas antioksidan yang kuat. Yang memiliki nilai persen peredaman sebesar 83,66% adalah pada konsentrasi 6 mg/mL , sedangkan nilai persen peredaman dengan menggunakan radikal superoksida menghasilkan aktivitas maksimum yang kuat sebesar 81,73% pada konsentrasi 0,4 mg/mL (13). Hasil pada penelitian ini dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH, *crude* fukoidan dari rumput laut coklat *Sargassum cinereum* memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena mempunyai IC_{50} lebih dari 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dengan metode yang sama, fukoidan dari *Laminaria japonica* menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} 3,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lebih tinggi dari antioksidan sintetik yaitu butil hidroksi anisol(4).

Dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH, fukoidan dari *Undaria pinnatifida* dengan konsentrasi sampel 100 – 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih lemah dari vitamin C. Vitamin C mampu meredam aktivitas radikal bebas sebesar 90% sedangkan ekstrak fukoidan agar mendapatkan persen penghambatan sebesar 76,61% memerlukan konsentrasi sampel mencapai 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (16). Kemampuan menangkal radikal bebas

berhubungan dengan kandungan sulfat, semakin tinggi kandungan sulfat, maka makin tinggi pula kemampuan peredaman radikal bebas⁽⁴⁾.

SIMPULAN

Crude fukoidan hasil ekstraksi sederhana berupa serbuk coklat kehitaman dengan rendemen 2,78% yang tercampur dengan senyawa golongan flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid, dan tannin. Hasil ekstraksi dengan lama refluks 4 jam memiliki kadar sulfat sebesar 16,31% dan karbohidrat total 22,94%. Aktivitas antioksidan fukoidan dalam ekstrak rumput laut coklat jenis *Sargassum cinereum* yang berasal dari Banten memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kadi A. Potensi rumput laut di beberapa perairan pantai Indonesia. *Oseana*. 2004.29(4):25–36.
2. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucooidan: structure and bioactivity. *Molecules*. 2008.13:1671–95.
3. Prabu DL, Sahu NP, Pal AK, Narendra A. Isolation and evaluation of antioxidant and antibacterial activities of fucooidan rich extract from Indian brown seaweed, (*Sargassum wightii*). 2013.7(1):9–16.
4. Wang J, Zhang Q, Zhang Z, Song H, and Li P. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucooidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *Intern. J. Biol Macromol*. 2010.46(1):10.
5. Junaidi L. Simple extraction and molecular weight characterization of fucooidan from *Sargassum sp*. *Biopropal Ind*. 2013.4(2):49–57.
6. Fletcher HR, Biller P, Ross AB, Adams JMM. The seasonal variation of fucooidan within three species of brown macroalgae. *Algal Res*. 2017.22:79–86
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia*. Ed V. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2010
8. Putranti R. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak rumput laut *Sargassum duplicatum* dan *Turbinaria ornata* dari Jepara (tesis): Program Studi Magister Manajemen Sumberdaya Pantai Universitas Diponegoro. 2013.
9. Sinurat E, Saepudin E, Qosthalani FA. Effect of hydrolyzed fucooidan from the brown seaweed *Sargassum binderi* Sonder towards human breast cancer T47D cell lines. *Squalen Bull Mar Fish Postharvest Biotechnol*. 2017.12(2):49–55.
10. Pakidi CS, Suwoyo HS. Potensi dan pemanfaatan bahan aktif alga coklat *Sargassum sp*. *Octopus*. 2017.6(1):551–62
11. E. Sinurat and R. Kusumawati. Optimasi metode ekstraksi fucooidan kasar dari rumput laut coklat *Sargassum binderi* Sonder, JBP Kelaut dan Perikan. 2017.12(2):125–34.
12. Puspita M. Enzyme-assisted extraction of phlorotannins from *Sargassum* and biological activities (disertasi). Semarang: Universitas Diponegoro. 2017:127-36.
13. Marudhupandi T, Ajith Kumar TT, Lakshmana Senthil S, Nanthini Devi K. In vitro antioxidant properties of fucooidan fractions from *Sargassum tenerrimum*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2014.17(3):402–7.
14. MT Ale, JD Mikkelsen, and AS Meyer. Important determinants for fucooidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucoose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar. Drugs*. 2011.(9):2106–30.
15. Choi J, Gu Lee S, Jong Han S, Cho M, Cheon Lee P. Effect of gamma irradiation on the structure of fucooidan. *Radiat Phys Chem*. 2014.100:54–8.
16. Mak WWF. Extraction, characterization and antioxidant activity of fucooidan from New Zealand *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Auckland University of Technology [tesis], New Zealand; 2012.

Formulasi Nanoemulsi Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) dan Uji Aktifitas Antikolesterol secara In-vitro

(Nanoemulsion Formulation of Ethanol Extract Okra (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench.) Fruit and Anticholesterol Activity In Vitro Test)

RATNA DJAMIL^{1*}, SARAH ZAIDAN³, VERA BUTAR-BUTAR⁴,
DIAH KARTIKA PRATAMI¹

¹Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, 12640, Indonesia

²Laboratorium Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, 12640,
Indonesia

³Laboratorium Farmakologi, Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, 12640, Indonesia

⁴Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Jakarta, 12640, Indonesia

Diterima: 31 Januari 2020, Disetujui: 30 Maret 2020

Abstrak: Buah okra kaya dengan kandungan senyawa flavonoid, phytosterol, pektin yang berkhasiat sebagai antikolesterol. Efektifitas farmakologi dari ekstrak etanol 70% buah okra (EEBO) dapat ditingkatkan dengan pembentukan nanoemulsi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuat ekstrak etanol 70% dan nanoemulsi EEBO serta membuktikan penghambatan kolesterol secara *in vitro* EEBO lebih kecil dibandingkan bentuk nanoemulsi EEBO. Buah okra diekstraksi secara maserasi kinetik, dilakukan uji penapisan fitokimia, kemudian diuji penghambatan kolesterolnya secara *in vitro* dengan menggunakan pereaksi Lieberman Burchard. Nilai penghambatan kolesterol ditunjukkan dari nilai IC₅₀. Nanoemulsi EEBO yang dibuat dengan metode emulsifikasi spontan menggunakan capmul (glyceryl caprylat), propilenglikol, gliserin dengan perbandingan (1 : 2,5 : 2 mL). Hasil penapisan fitokimia simplisia buah okra dan EEBO memiliki kandungan flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin dan kumarin. Nanoemulsi yang dihasilkan memiliki diameter 134,7 nm dengan nilai zeta potensial yang memenuhi persyaratan yaitu -26,72 mV. Nilai IC₅₀ EEBO dan nanoemulsi EEBO masing-masing sebesar 764,11 µg/mL dan 712,50 µg/mL. Terbukti metode nanoemulsi dapat meningkatkan nilai IC₅₀ antikolesterol karena dapat menembus celah antar sel sehingga penghantaran dan ketersediaan hayatinya lebih tinggi.

Kata kunci: *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench, antikolesterol, buah okra, nanopartikel.

Abstract: Okra fruit has a flavonoid, phytosterol and pectin content, which is potential as an anticholesterol agent. The pharmacological activity of ethanol extract 70% of okra fruit (EEOF) can be improved by forming nanoemulsion. This study aimed to prepare an ethanol extract 70% and nanoemulsion of okra fruit and to prove the cholesterol inhibition in vitro EEOF is smaller than the nanoemulsion of EEOF. The okra fruit was extracted by kinetic maceration, the EEOF was analyzed by a phytochemical screening test and cholesterol inhibition assay in vitro using Liebermann-Burchard reagent. The anticholesterol activity was expressed as IC₅₀ values. Nanoemulsion of EEOF prepared by spontaneous emulsification method using capmul, propylenglycol, glycerin (1 : 2.5 : 2 mL). The result of phytochemical screening of okra fruit simplisia and EEOF were contained flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, and coumarin. The resulting nanoemulsion has a 134.7 nm in diameter with a potential zeta value of -26.72 mV. EEOF has IC₅₀ of 764.11 µg/mL and nanoemulsion of EEOF have IC₅₀ of 712.50 µg/mL. Nanoemulsion can improve anticholesterol IC₅₀ value because it was penetrated the gap between cells so that the delivery and bioavailability were higher..

Keywords: *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench., anticholesterol, nanoparticles, okra fruit.

PENDAHULUAN

POLA gaya hidup mengkonsumsi makanan yang mengandung kolesterol tinggi dan sedikit nutrisi, kebiasaan merokok, serta kurangnya aktivitas fisik berisiko terkena penyakit degeneratif, seperti penyakit jantung koroner, kardiovaskuler, dan hiperkolesterolemia. Survei yang dilakukan WHO pada tahun 2014 menyatakan penyakit jantung koroner dan pembuluh darah menduduki peringkat kedua dan sebanyak 17,3 juta orang di tahun 2008 meninggal akibat penyakit kardiovaskuler yang disebabkan oleh kelebihan kolesterol dan angka tersebut terus meningkat mencapai 23,2 juta pada tahun 2030⁽¹⁾.

Hiperkolesterolemia umumnya diderita oleh orang kelebihan berat badan atau lanjut usia, tetapi tidak menutup kemungkinan gangguan metabolisme ini dapat terjadi pada orang yang memiliki berat badan normal atau di usia muda^(1,2). Hiperkolesterolemia merupakan kondisi gangguan metabolisme lemak ditandai dengan tingginya kadar kolesterol total dalam darah. Dalam jangka panjang gumpalan lemak dalam pembuluh darah berisiko terjadi aterosklerosis. Pada penderita penyakit jantung yang disebabkan aterosklerosis, dapat terjadi hambatan aliran darah yang kaya oksigen menuju jantung karena penyempitan dan pengerasan pembuluh darah.

Pengobatan hiperkolesterolemia dengan obat kimia menyebabkan efek samping yang tidak diinginkan. Oleh karena itu dikembangkan obat tradisional agar meminimalkan efek samping. Pada penelitian yang dilakukan oleh Ngoc TH et al., (2008) ekstrak metanol buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) dapat menurunkan kadar kolesterol pada tikus⁽³⁾. Penelitian yang dilakukan Sabitha, V (2011) ekstrak kulit buah dan biji *Abelmoschus esculentus* (L) Moench memiliki efek antihiperlipidemia dan antidiabetik pada tikus diabetes⁽⁴⁾. Hal ini menunjukkan buah okra memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai obat antikolesterol, dengan adanya kandungan metabolit sekunder seperti flavonoid kuersetin, fitosterol dan pektin.

Salah satu upaya untuk meningkatkan efektifitas dari buah okra adalah dengan membentuk nanoemulsi⁽⁵⁾. Dimana pelarut yang digunakan adalah capmul (glyceryl caprylat), propilenglikol dan gliserin⁽⁶⁾. Komponen tersebut merupakan pelarut yang bersifat non-toksik, biodegradable, biocompatible, serta tingkat imunogenitas yang rendah dan dapat dipreparasi menjadi nanopartikel, sehingga sangat sesuai untuk sistem penghantaran obat⁽⁷⁾. Partikel dengan ukuran nano dapat meningkatkan terjadinya distribusi yang lebih baik pada tubuh serta dapat memperluas permukaan kontak partikel^(8,9).

Metode pengukuran kadar kolesterol secara *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu metode kolorimetri dari Rudel-Morris dan Zak ($\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$) dan metode fotometri dengan mereaksikan larutan kolesterol dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang dideteksi secara spektrofotometri^(10,11). Penelitian kali ini dilakukan untuk melihat potensi ekstrak kental etanol 70% dari buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) (EEBO) dan nanoemulsi EEBO yang berpotensi dalam menurunkan kadar kolesterol dengan menggunakan metode Liebermann-Burchard. Metode Liebermann-Burchard dipilih karena kemudahan alat, bahan, akurasi dan cara pengerjaan sederhana.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balitro), Bogor. NaOH, NH_4OH , natrium asetat, kloroform, HCl, amilalkohol, besi (III) klorida, eter, asam asetat anhidrat, H_2SO_4 , lempeng Mg, etanol, aquadest, propilenglikol, capmul dan gliserin dibeli dari PT. Merck Indonesia. Pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, pereaksi stiasny diperoleh dari Q-Lab Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer ultraviolet – cahaya tampak (Shimadzu UV 1800), *rotary vacuum evaporator* (BUCHI R-220), timbangan analitik, maserator (IKA), kertas saring, lumpang alu, pengayak No.14, pengayak No.18, magnetic stirrer (IKA C-MAG HS7), alat-alat gelas (Pyrex), dan Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.), Transmission Electron Microscope (JEOL 1010), dan Particle sizer Analyser (DelsaNanoTM).

METODE. Determinasi Tanaman. Dilakukan determinasi terhadap buah okra (*Abelmoschus esculentus* (L) Moench) yang bertujuan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan. Determinasi dilakukan di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, Bogor.

Ekstraksi Buah Okra. Penyediaan simplisia dilakukan dengan cara menggiling buah okra kering menjadi serbuk dengan derajat halus 4/18 seperti yang dipersyaratkan oleh Materia Medika Indonesia (MMI). Serbuk buah okra diekstraksi dengan cara maserasi kinetik sebanyak 6 kali menggunakan pelarut etanol 70%. Kemudian maserat yang diperoleh dipekatkan dengan vacuum rotavapor dengan suhu 40° C, tekanan 175 mmHg, dan 60 rpm hingga diperoleh ekstrak kental EEBO.

Penapisan Fitokimia. Identifikasi golongan

senyawa kimia dari simplisia dan ekstrak buah okra dilakukan menurut metode *Phytochemical Screening* Farnsworth, meliputi identifikasi alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, kuinon, steroid/terpenoid, kumarin dan minyak atsiri^(12,13).

Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Kental Buah Okra. Sebanyak 100 mg EEBO dilarutkan dalam campuran pelarut capmul (glyceryl caprylat), propilenglikol, gliserin (1 : 2,5 : 2 mL). Kemudian ditambahkan air murni ad 10 mL hingga diperoleh konsentrasi sebesar 1%. Kemudian dihomogenkan hingga diperoleh nanoemulsi. Kemudian diamati kestabilan emulsi nanopartikel ekstrak kental buah okra selama 5 hari yang meliputi warna, kekeruhan, dan endapan⁽¹⁴⁾.

Evaluasi Nanoemulsi Ekstrak Buah Okra. Analisis nanoemulsi EEBO menggunakan metode pada penelitian yang dilakukan oleh Deni R et al (2013) dengan sedikit penyesuaian⁽⁸⁾. Dilakukan pemeriksaan ukuran dan distribusi partikel dengan Particle sizer Analyser DelsaNano™. Pemeriksaan zeta potensial nanopartikel dengan menggunakan alat pengukur zeta potensial dari Malvern. Pemeriksaan morfologi partikel nanoemulsi dengan menggunakan Transmission Electron Microscope JEOL 1010 di Laboratorium TEM dan Histologi Lembaga Eijkman.

Uji Aktivitas Antikolesterol. Uji aktivitas antikolesterol dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Daksha. A et al., (2010) dengan beberapa modifikasi⁽¹⁵⁾. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan membuat seri konsentrasi 125-375 µg/mL ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard dengan perbandingan 5 : 3. Kemudian dibuat seri konsentrasi EEBO dan nanoemulsi EEBO 375-875 µg/mL ditambahkan pereaksi Liebermann Burchard dengan perbandingan 5 : 3 dan didiamkan sesuai *operating time*-nya hingga terbentuk perubahan warna menjadi hijau. Dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali. Hasil warna yang diperoleh, dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 675 nm. Sebagai blanko digunakan methanol-kloroform. Pada kontrol negatif yang digunakan berupa larutan kolesterol 375 µg/mL.

Nilai serapan larutan baku kolesterol dan sisa serapan larutan baku kolesterol setelah direaksikan dengan ekstrak yang diperoleh dari pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk menghitung % inhibisi kolesterol dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100 \% \quad (1)$$

Ab = serapan larutan baku kolesterol

As = serapan baku kolesterol setelah bereaksi dengan ekstrak

Nilai IC₅₀ diperoleh dari persamaan $y = a + bx$, dimana y adalah 50 dan x adalah IC₅₀. Persamaan $y = a + bx$ tersebut didapat dari hubungan konsentrasi ekstrak dengan % IC⁽¹⁵⁾.

Nilai IC₅₀ EEBO dan nanoemulsi EEBO diperoleh dari 3 seri dengan konsentrasi yang sama ditambah dengan perhitungan standar deviasi. Kemudian dianalisis statistik Independent Sample T – Test (Uji T Tidak Berpasangan) antara EEBO dengan nanoemulsi EEBO untuk mengetahui perbedaan bermakna uji penghambatan reaksi Liebermann-Burchard terhadap kolesterol.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman. Hasil determinasi di Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi, LIPI Cibinong, Bogor berdasarkan Surat No. 591/IPH.1.01/lf.07/III/2018 menunjukkan bahwa tanaman okra yang digunakan adalah benar *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. dari suku Malvaceae.

Penetapan Pengukuran Derajat Halus Serbuk Simplisia. Hasil penetapan derajat halus serbuk simplisia buah okra melalui ayakan No. 4 sebesar 101,12 % dan melalui ayakan No. 18 sebesar 23,96%. Dari hasil pengukuran derajat halus 4/18 diperoleh hasil serbuk memenuhi persyaratan ukuran serbuk menurut Materia Medika Indonesia, yaitu semua serbuk 100% dapat melewati pengayak no. 4 dan tidak lebih dari 40 % dapat melewati pengayak no. 18⁽¹⁶⁾.

Tujuan dari pembuatan serbuk 4/18 adalah agar serbuk mudah terbasahi oleh pelarut yang digunakan, sehingga mempermudah dan memberikan hasil yang maksimal pada proses ekstraksi, karena serbuk simplisia dengan ukuran partikel kecil memiliki luas permukaan total yang lebih besar dari serbuk dengan ukuran partikel besar. Namun, jika serbuk simplisia terlalu halus, maka akan mempersulit dan menyumbat pori-pori kertas saring pada saat proses penyaringan ekstrak (17).

Pembuatan Ekstrak Kental. Hasil ekstraksi diperoleh rendemen sebesar 9,97 % dan DER-native 10,0305. Penggunaan metode maserasi kinetik (cara dingin) dimaksudkan agar tidak ada senyawa yang rusak atau hilang saat proses ekstraksi⁽¹⁸⁾.

Penapisan Fitokimia. Hasil identifikasi kandungan metabolit sekunder serbuk simplisia buah okra dan EEBO dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa serbuk simplisia dan EEBO mengandung metabolit sekunder flavonoid, saponin, steroid dan kumarin. Pada skrining fitokimia yang dilakukan Saha (2011) ekstrak etanol dan air dari buah okra mengandung karbohidrat, gum, musilago,

protein, fitosterol, flavonoid, tannin, senyawa polifenol, dan minyak atsiri⁽¹⁹⁾.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia.

Nama senyawa	Hasil pengamatan	
	Serbuk simplisia	Ekstrak kental
Alkaloid	-	-
Flavonoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	-	-
Kuinon	-	-
Steroid/Triterpenoid	+/-	+/-
Kumarin	+	+
Minyak Atsiri	-	-

Pembuatan Nanoemulsi Ekstrak Buah Okra.

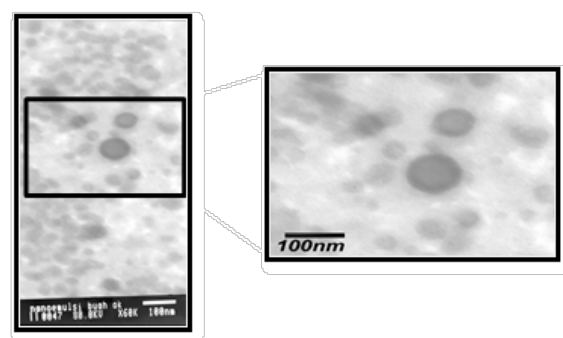
Hasil pengamatan nanoemulsi EEBO sampai hari ke-5 stabil diperoleh warna kuning coklat bening, dengan kekeruhan stabil, dan tidak ada endapan. Pembuatan nanoemulsi EEBO dibuat dengan menggunakan metode emulsifikasi spontan, dimana pada prinsipnya yaitu terjadi pencampuran antara fase organik dan fase air⁽²⁰⁾. Pada penambahan capmul (glyceryl caprylat) memiliki kemampuan dalam melarutkan komponen organik dengan baik yaitu dengan propilenglikol dan gliserin, juga dapat bercampur dengan etanol 70% sehingga dapat membuat ekstrak tersebut menjadi lebih larut⁽²¹⁾. Karena proses difusi spontan dari pelarut menyebabkan terjadinya turbulensi antarmuka antara dua fase sehingga ukuran dari partikel yang dihasilkan semakin kecil.

Hasil Uji Evaluasi Nanoemulsi EEBO.

Pemeriksaan ukuran partikel larutan nanoemulsi EEBO menggunakan alat Delsa™ Nano diperoleh rata-rata diameter partikel 134,7 nm dan indeks polidispersiti 0,512. Secara ukuran partikel memenuhi kriteria ukuran nanopartikel 50-500 nm⁽²¹⁾. Hasil indeks polidispersitas menunjukkan nilai distribusi partikel yang homogen.

Dari hasil pengujian potensial zeta, didapatkan nilai sebesar -26,72 mV menggunakan alat Malvern. Nilai zeta potensial berasal dari adanya gugus hidroksil flavonoid kuersetin yang memiliki muatan (-)⁽²²⁾. Terjadi aksi tolak menolak dengan pelarut capmul (glyceryl caprylat), propilenglikol dan gliserin yang tidak memiliki muatan (nonionik), Sehingga hasil zeta potensial yang diberikan adalah bermuatan (-), sehingga dapat mencegah terjadinya pengendapan nanoemulsi ekstrak. Nilai potensial kurang dari -30 mV, nanoemulsi yang dihasilkan relatif stabil karena muatan listrik droplet cukup kuat untuk menolak antara droplet dominan dalam sistem emulsi⁽²³⁾.

Hasil morfologi nanopartikel EEBO di Laboratorium TEM dan Histologi Lembaga Eijkman dapat dilihat pada Gambar 1. Nanoemulsi EEBO dapat terbentuk dengan baik, globul memiliki bentuk yang sferis dengan ukuran 100 nm dan distribusi aliran cukup merata⁽²⁴⁾.



Gambar 1. Hasil uji morfologi nanoemulsi EEBO dengan perbesaran 60.000 kali.

Hasil Uji Penghambatan Kolesterol. Pada pengukuran kurva baku kolesterol diperoleh persamaan regresi $y = 0,0184x + 0,0016824$. Pada pengujian menggunakan pereaksi Liebermann-Buchard terjadi mekanisme ketika asam sulfat ditambahkan ke dalam campuran yang berisi kolesterol, maka molekul air berpindah dari gugus C3 kolesterol, kolesterol kemudian teroksidasi membentuk 3,5-kolestadiena. Produk ini dikonversi menjadi polimer yang mengandung kromofom yang menghasilkan warna hijau.

Berdasarkan hasil data, rata-rata nilai IC_{50} EEBO dari 3 seri dengan konsentrasi yang sama adalah sebesar $764,11 \pm 5,31 \mu\text{g/mL}$. Sedangkan nanoemulsi EEBO dari 3 seri dengan konsentrasi yang sama adalah sebesar $712,50 \pm 6,51 \mu\text{g/mL}$. Hasil yang diperoleh nanoemulsi EEBO memiliki IC_{50} yang lebih rendah dibandingkan dengan EEBO sehingga dapat dikatakan nanoemulsi memiliki aktivitas antikolesterol lebih baik daripada bentuk ekstraknya. Berdasarkan hasil analisis statistik Independent Sample T – Test (Uji T Tidak Berpasangan) antara EEBO dengan nanoemulsi EEBO terdapat perbedaan bermakna uji penghambatan reaksi Liebermann-Burchard terhadap kolesterol. Data perhitungan uji T yang dihasilkan adalah normal dan homogen dengan taraf nyata 0,05.

Capmul berfungsi sebagai co-surfaktan yang dapat meningkatkan kelarutan dan kemampuannya dalam melarutkan komponen-komponen organik, juga dapat bercampur dengan etanol 70%. Propilenglikol berfungsi sebagai co-surfaktan yang juga dapat meningkatkan kelarutan. Sedangkan gliserin berfungsi sebagai co-emulsi, dari ketiga pelarut yang digunakan dalam pembuatan emulsi nanopartikel

dapat diperoleh hasil nanopartikel yang baik, sehingga pada kestabilannya lebih dapat mencapai target dan memiliki bioavailabilitas yang lebih baik dalam menghambat kolesterol secara *in vitro* dengan menggunakan pereaksi Liebermann Burchard dibandingkan dengan ekstrak yang tanpa dibuat nanopartikel.

Senyawa yang bertanggungjawab memberi aktivitas antikolesterol diduga berasal dari flavonoid kuersetin yang memiliki kemampuan mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoprotein* (LDL) dengan cara menangkap radikal bebas, sehingga lebih baik untuk menurunkan kadar kolesterol⁽²²⁾. Kuersetin juga memperlihatkan aktivitas sebagai penurun kolesterol total, LDL dengan menghambat peroksidasi lemak. Selain itu pektin juga dapat mengikat kolesterol LDL dan VLDL yang menyebabkan plak pada pembuluh darah⁽²⁵⁾. Sebaliknya, HDL positif yang bertanggung jawab atas pengangkatan sedimentasi (plak) dari pembuluh darah dan arteri, tidak terikat dan tetap berada didalam tubuh. Fitosterol dapat menurunkan kolesterol karena memiliki struktur kimia yang sama dengan kolesterol sehingga memiliki kemampuan dalam berkompetisi dengan kolesterol dalam penyerapannya di usus, dan jumlah kolesterol jahat yang diserap oleh tubuh menjadi berkurang⁽²⁶⁾.

SIMPULAN

Nanoemulsi EEBO dapat dikembangkan menjadi obat antikolesterol. Nanoemulsi EEBO memiliki ukuran partikel 134,7 nm dengan zeta potensial sebesar -26,72 mV dengan IC_{50} 764,1104 μ g/mL lebih besar dari IC_{50} EEBO.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan untuk Laboratorium Penelitian Dosen Fakultas Farmasi Universitas Pancasila dan dukungan dana hibah internal dari Universitas Pancasila.

DAFTAR PUSTAKA

- Rahajoe AU. The Collaboration In Fighting Hypertension and Its Complications Cardiologist's Prespective. Indonesia Society of Hypertension. World Health Organization (WHO); 2013.
- Listiana L, TY P. Kadar kolesterol total pada usia 25-60 tahun. Electron J UM Surabaya. 2010;5(1):36-40.
- Ngoc TH, Ngoc QN, Tran A, Phung NV. Hypolipidemic effect of extracts from *Abelmoschus esculentus* L.(Malvaceae) on Tyloxapol-induced hyperlipidemia in mice. J Pharm Sci. 2008;35:42-6.
- Sabitha V, Ramachandran S, Naveen KR, Panneerselvam K. Antidiabetic and antihyperlipidemic potential of *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench. in streptozotocin-induced diabetic rats. J Pharm bioallied Sci. 2011;3(3):397.
- Lovelyn C, Attama AA. Current state of nanoemulsions in drug delivery. J Biomater Nanobiotechnol. 2011;2(05):626.
- Pawar KR, Babu RJ. Lipid materials for topical and transdermal delivery of nanoemulsions. Crit Rev Ther Drug Carr Syst. 2014;31(5).
- Martien R, Adhyatmika A, Irianto IDK, Farida V, Sari DP. Perkembangan teknologi nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Maj Farm. 2012;8(1):133-44.
- Rahmat D, Müller C, Shahnaz G, Leithner K, Laffleur F, Khan MI, et al. HEC-cysteamine particles: influence of particle size, zeta potential, morphology and sulfhydryl groups on permeation enhancing properties. Drug Dev Ind Pharm. 2013;39(9):1338-45.
- Suh WH, Suslick KS, Stucky GD, Suh Y-H. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. Prog Neurobiol. 2009;87(3):133-70.
- Rudel LL, Morris MD. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. J Lipid Res. 1973;14(3):364-6.
- Musa WJA, Situmeang B, Sianturi J. Anti-cholesterol triterpenoid acids from *Saurauia vulcani* Korth. (Actinidiaceae). Int J Food Prop. 2019;22(1):1439-44.
- Djamil R, Anelia T. Penapisan fitokimia, uji BSLT, dan uji antioksidan ekstrak metanol beberapa spesies Papilionaceae. J Ilmu Kefarmasian Indones. 2009;7(2):65-71.
- Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J Pharm Sci. 1966;55(3):225-76.
- Djamil R, Rahmat D, Zaidan S, Latifah MN. Anticholesterol Activity of Okra Fruit Extract (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench) and Its Nanoemulsion in Vivo. Pharmacogn J. 2020;12(2):1-5.
- Daksha A, Jaywant P, Bhagyashree C, Subodh P. Estimation of sterols content in edible oil and ghee samples. Electron J Environ Agric Food Chem. 2010;9:1593-7.
- Ditjen POM, Depkes RI. Materia Medika Indonesia. Ed kelima, Jakarta Dep Kesehat RI Hal. 1995;32-6.
- Devahastin S. Panduan Praktis Mujumdar untuk Pengerangan Industrial. IPB Press; 2001.
- Depkes RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Jakarta Dep Kesehat Republik Indones. 2000;3-30.
- Saha D, Jain B, Jain VK. Phytochemical evaluation and characterization of hypoglycemic activity of various extracts of *Abelmoschus esculentus* Linn. fruit. Int J Pharm Pharm Sci. 2011;3(2):183-5.
- Diba RF, Yasni S, Yuliani S. Nanoemulsifikasi spontan ekstrak jintan hitam dan karakteristik produk enkapsulasinya. J Teknol dan Ind Pangan. 2014;25(2):134.
- Sahu GK, Sharma H, Gupta A, Kaur CD. Advancements

- in microemulsion based drug delivery systems for better therapeutic effects. *Int J Pharm Sci Dev Res* 1 008. 2015;15(008).
22. Seiva FRF, Chuffa LGA, Braga CP, Amorim JPA, Fernandes AAH. Quercetin ameliorates glucose and lipid metabolism and improves antioxidant status in postnatally monosodium glutamate-induced metabolic alterations. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(10):3556–61.
 23. Mungure TE, Roohinejad S, Bekhit AE-D, Greiner R, Mallikarjunan K. Potential application of pectin for the stabilization of nanoemulsions. *Curr Opin food Sci.* 2018;19:72–6.
 24. Mardikasari SA, Jufri M, Djajadisastra J. Formulasi dan Uji Penetrasi In-Vitro Sediaan Topikal Nanoemulsi Genistein dari Tanaman *Sophora japonica* Linn. *J Ilmu Kefarmasian Indones.* 2017;14(2):190–8.
 25. Sriamornsak P. Chemistry of pectin and its pharmaceutical uses: A review. *Silpakorn Univ Int J.* 2003;3(1–2):206–28.
 26. Marangoni F, Poli A. Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacol Res.* 2010;61(3):193–9.

Aktivitas Daya Hambat Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca Catechu L.*) Terhadap Isolat Bakteri Gigi

(Inhibition Activity Of Ethanol Extract Of *Areca Catechu L.* Against Isolation Of Tooth's Bacteria)

MEIRIZA DJOHARI* , ARMON FERNANDO, ANNISA SAFITRI

Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau; Jalan Kamboja, Simpang Baru Panam, 28292

Diterima: 5 April 2019, Disetujui: 26 Maret 2020

Abstrak: Biji pinang secara tradisional digunakan masyarakat untuk menguatkan gigi. Biji pinang mempunyai kandungan alkaloid, flavonoid, dan terpenoid sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis-jenis bakteri gigi hasil isolat dan mengetahui aktivitas daya hambat ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap hasil isolat bakteri gigi. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dengan konsentrasi ekstrak etanol biji pinang 10%, 20% dan 30%. Hasil penelitian menunjukkan bakteri gigi hasil isolat yang didapat *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, *Streptococcus sp.* Ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) lebih bagus menghambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei* dibandingkan dengan *Branhamella catarrhalis* dan *Streptococcus sp* dengan kategori sedang sampai lemah. Hasil uji Anova dua arah terhadap diameter zona hambat menyatakan terdapat perbedaan antara kelompok konsentrasi 10%, 20%, 30%, kontrol positif dan kontrol negatif dan terdapat perbedaan aktivitas daya hambat bakteri *Lactobacillus casei* dibandingkan dengan *Branhamella catarrhalis* dan *Streptococcus sp* tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan pada aktivitas daya hambat terhadap bakteri *Branhamella catarrhalis* dengan *Streptococcus sp.*

Kata Kunci: Antibakteri, indentifikasi bakteri isolat , ekstrak etanol biji pinang

Abstract: Areca nut is traditionally used by the community to strengthen teeth. Areca nuts contain alkaloid, flavonoid, and terpenoid as antibacterials. This study aims to determine the types of dental bacteria resulting from isolates and determine the effect of the administration of ethanol extract of areca nut (*Areca catechu L.*) on the results of isolates of dental bacteria. Antibacterial activity testing using disc diffusion method with the concentration of areca nut ethanol extract 10%, 20% and 30%. The results showed that bacteria of the tooth are *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, *Streptococcus sp.* Ethanol extract of areca nut (*Areca catechu L.*) is better to inhibit the growth of *Lactobacillus casei* compared to *Branhamella catarrhalis* and *Streptococcus sp* in the medium to weak category. Two Way ANOVA test results on inhibitory zone diameter stated that there were differences between the concentration groups of 10%, 20%, 30%, positive control and negative controls and there were differences in the inhibitory activity of *Lactobacillus casei* compared to *Branhamella catarrhalis* and *Streptococcus sp* but there were no significant differences on the inhibitory activity of *Branhamella catarrhalis* with *Streptococcus sp.*

Keywords: Antibacterial, Identification of bacterial isolates, Areca nut ethanolic extract

*Penulis korespondensi
E-mail: meirizadj@gmail.com

PENDAHULUAN

PENYAKIT gigi dan mulut merupakan penyakit masyarakat yang dapat menyerang semua golongan umur. Hasil studi morbiditas Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) yang dilaporkan oleh Kementerian Kesehatan Nasional Indonesia tahun 2013 menunjukkan dari prevalensi 10 (sepuluh) kelompok penyakit yang dikeluhkan masyarakat, penyakit gigi dan mulut menduduki urutan pertama dengan angka prevalensi 60% penduduk. Penyakit gigi dan mulut menduduki peringkat ke-8 dari sepuluh besar penyakit rawat jalan. Selain itu survei menunjukkan bahwa 70% menderita karies gigi dan gingivitis (peradangan gusi) dan pada orang dewasa ditemukan sebanyak 73% yang menderita karies gigi⁽¹⁾.

Karies gigi terjadi karena adanya plak pada gigi. Penyebab utama terbentuknya plak gigi karena adanya bakteri. Adapun bakteri yang diyakini menyebabkan karies gigi adalah *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* dan *Staphylococcus aureus* ⁽²⁾. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Muhtar dkk., (2017) mengenai identifikasi dan uji sensitifitas bakteri pada plak gigi pasien di Puskesmas Ranotana Weru Manado terhadap antibiotik golongan penisilin dan kuinolon ditemukan bakteri penyebab plak gigi yaitu *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Actinomyces sp.*, *Veillonella sp.*, *Actinobacillus sp.*, *Escherichia sp.*⁽³⁾.

Indonesia adalah negara yang memiliki potensial dalam mengembangkan tanaman obat. Salah satu tanaman obat yang memiliki potensi untuk dikembangkan yaitu pinang. Data empiris menunjukan pinang telah banyak di manfaatkan oleh masyarakat Indonesia sejak dulu, khususnya buah digunakan untuk campuran makan sirih, air rebusan digunakan untuk obat kumur yang diyakini berkhasiat untuk menguatkan gigi ⁽⁴⁾.

Secara sosial, penggunaan biji pinang dan daun sirih telah diterima di semua lapisan masyarakat melalui aktivitas menyirih. Menyirih memiliki efek terhadap gigi, gingival, dan mukosa mulut. Kepercayaan tentang menyirih dapat menghindari penyakit mulut seperti mengobati gigi yang sakit dan nafas yang tidak sedap. Efek menyirih terhadap gigi adalah dapat menghambat pembentukan karies gigi⁽⁵⁾. Hasil skrining fitokimia menunjukkan biji buah pinang (*Areca catechu L.*) mengandung senyawa alkaloid, tanin, kuinon, terpenoid, saponin dan flavonoid yang diketahui memiliki khasiat sebagai antibakteri ^(6,7).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Afni dkk., (2015) mengenai uji aktivitas antibakteri pasta gigi ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap *Streptococcus mutans* memiliki daya hambat

sebesar 11,37 mm pada konsentrasi 4,5% dimana daya hambat ini tergolong daya hambat yang memiliki aktivitas antibakteri kuat sedangkan pengujian aktivitas antibakteri pasta gigi ekstrak biji pinang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* memiliki daya hambat dengan kategori kuat dengan daya hambat sebesar 20,03 mm pada konsentrasi 4,5% ⁽⁸⁾. Chamina (2012) menunjukkan bahwa inhibisi ekstrak biji pinang mempengaruhi pelepasan ion fosfor pada proses demineralisasi gigi yang distimulasi *Streptococcus mutans* dengan pelepasan ion fosfor sebesar 15,48 ppm ⁽⁹⁾. Mayanti (2017) mengenai pengaruh pemberian infusa biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada gigi dan gusi menunjukkan rata-rata penurunan jumlah koloni pada gigi setelah pemberian infusa biji pinang sebanyak 104,4 koloni pada konsentrasi 30%⁽¹⁰⁾.

Masyarakat pengguna obat-obatan tradisional lebih banyak menggunakan air sebagai pelarut dalam pengolahan biji pinang, hal ini dikarenakan cara yang sederhana dan mudah dilakukan. Taihuttu (2017) dalam penelitiannya membandingkan penghambatan minimum ekstrak air biji pinang dengan ekstrak etanol biji pinang terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji pinang lebih efektif pada konsentrasi 0,005% sampai dengan konsentrasi 0,5% dibandingkan dengan ekstrak air biji pinang yang tidak memperlihatkan adanya zona penghambatan. Anisah dkk., (2014) juga membuktikan bahwa ekstrak dengan pelarut etanol lebih berpotensi memiliki aktivitas antibakteri dibandingkan dengan ekstrak air. Pada penelitian yang dilakukan oleh Nursidika dkk., (2014) ekstraksi dengan menggunakan etanol dapat menarik sebagian besar senyawa polar dan juga sebagian kecil senyawa nonpolar ^(11,12,13).

Oleh karena itu, peneliti tertarik melakukan uji identifikasi bakteri dan menentukan aktivitas daya hambat ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap pertumbuhan koloni bakteri pada usapan gigi dengan menggunakan metode difusi cakram dan untuk melihat jenis-jenis bakteri yang terdapat pada gigi dari hasil identifikasi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. *Aquadest*, bakteri dari apusan gigi, media NA (Nutrient Agar), NaCl fisiologis 0,9%, etanol 96%, obat kumur Chlorheksidine, HCl pekat, FeCl₃, kloroform, kloroform amoniak, H₂SO₄, media Blood Agar, Endo Agar, pereaksi meyer, *lebermen burchard*, kristal violet, alkohol, *iodine*, safranin, strip oksidase, media glukosa, media sukrosa, media maltose, H₂O₂.

Alat. Cawan petri, pisau, wadah, tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik digital (Shimadzu®), oven listrik (Mettler®), autoklaf (GEA®), hot plate, *Laminar Air Flow* (JSCB-900SL®), Erlenmeyer, batang pengaduk, *cotton bud steril*, masker, Bunsen burner, inkubator, *vortex* (Azone®), kertas label, gelas beker, mikro pipet, spidol, perkamen, kapas, kain kasa, benang jagung, gunting, blender, tisu, spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu®), jarum Ose, *rotary evaporator*, pipet tetes, pipet mikro (Nesco®), jangka sorong, plat tetes, kaca objek, kertas cakram (Whatmann® No.42), kuvet, penggaris.

Pembuatan Serbuk Halus Biji Pinang. Sebanyak 12 kg buah pinang tua yang telah dikumpulkan, dilakukan sortasi basah terhadap kotoran, sampah dan daun-daunan yang menempel pada buah, kemudian dicuci dengan air dan dikupas untuk memisahkan bagian kulit dengan bijinya. Biji buah pinang tersebut dirajang dengan kehalusan 2 mm dan dikeringkan di oven selama 4 hari pada suhu 30°C-50°C untuk menghilangkan kadar airnya. Biji pinang yang sudah kering dihaluskan dan disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat⁽¹⁴⁾.

Pembuatan Ekstrak Etanol Biji Pinang. Serbuk simplisia biji pinang sebanyak 1.050 kg diekstraksi dengan pelarut etanol 96% menggunakan metode maserasi. Serbuk dimasukkan ke dalam botol gelap kemudian ditambahkan pelarut etanol 96%, ditutup dan dibiarkan selama 5 x 24 jam pada suhu ruang sambil berulang-ulang diaduk agar zat aktif terekstraksi sempurna. Setelah 5 hari ekstrak disaring, kemudian residu diekstraksi kembali dengan pelarut etanol. Perlakuan ini dilakukan sebanyak tiga kali. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotary evaporator untuk memisahkan pelarut dengan zat aktifnya sehingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh ditimbang untuk mengetahui berat dan persentase ekstrak.

Skrining Fitokimia Ekstrak. Pemeriksaan fitokimia yang dilakukan meliputi pemeriksaan alkaloid, terpenoid, flavonoid, steroid dan saponin.

Pembuatan Media Biakan Bakteri. Media Nutrient Agar (NA) dibuat dengan cara melarutkan 10 gram nutrient agar, dimasukkan ke dalam erlemeyer lalu ditambahkan aquadest 500 mL. Media dipanaskan di atas hot plate sambil diaduk hingga larut sempurna dan cairan berwarna kekuningan dan mendidih. Mulut erlemeyer ditutup dengan penyumbat kapas, kemudian disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1,5 atm selama 15-30 menit.

Media Blood Agar dibuat dengan cara melarutkan 2 gram media *Blood Agar* dalam 100 ml aquadest, kemudian dipanaskan sampai mendidih dan homogen. Selanjutnya media disterilisasi menggunakan

autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C.

Pengambilan Apusan Gigi. Pengambilan apusan gigi diambil dari 5 sampel Mahasiswa STIFAR Program Studi Strata I semester delapan. Sebelum pengambilan apusan bakteri gigi, responden terlebih dahulu mengisi formulir tanda bersedia menjadi sampel. Responden yang telah mengisi formulir persetujuan, kemudian diberikan arahan dalam pengambilan apusan bakteri gigi. Pertama responden dianjurkan sarapan pada pukul 08:00 pagi dengan sarapan yang sudah disiapkan dari si peneliti. Setelah itu responden berpuasa selama 2 jam dengan tidak menggosok gigi dan memakan makanan lain. Setelah 2 jam berpuasa pada pukul 10:00 dilakukan pengambilan sampel apusan bakteri gigi. Pengambilan apusan bakteri gigi dilakukan dengan menggunakan *cotton bud steril*. Apusan gigi diambil dari masing-masing sampel dengan cara mengusap apusan pada gigi bagian atas, bawah, kanan, dan kiri.

Pemurnian Bakteri. Apusan gigi yang sudah dilarutkan ke dalam vial yang berisi NaCl dikultur pada media NA dengan metode tuang dan kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang muncul pada masing-masing media dilakukan pemisahan supaya mendapatkan koloni yang terpisah dan murni pada media NA dengan metode streak (gores), kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C untuk diidentifikasi lebih lanjut.

Identifikasi Bakteri Gigi.

1. Pewarnaan Gram

Sediaan bakteri difiksasi/direkatkan di atas gelas preparat dan diwarnai dengan karbol kristal ungu, biarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dan dibilas. Sediaan ditambahkan dengan larutan iodine dan didiamkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir. Ditambahkan alkohol dan didiamkan selama 50 detik. Sediaan dicuci dengan air dan diwarnai dengan safranin selama 30 detik lalu sediaan dicuci, dikeringkan, dan diperiksa di bawah mikroskop⁽¹⁵⁾.

2. Uji Katalase

Jarum Ose dibakar lalu diambil bakteri dari media kemudian diletakan dikaca objek. Lalu diteteskan 1 tetes H₂O₂. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk gelembung udara yang ditandai dengan adanya buih. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri memiliki enzim katalase yang berfungsi menguraikan H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂ sedangkan hasil negatif tidak ada gelembung udara dan tidak adanya buih⁽¹⁵⁾.

3. Uji Oksidase

1 Ose koloni bakteri digoreskan ke strip oksidase. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi ungu⁽¹⁵⁾.

4. Uji Fermentasi Karbohidrat

Satu Ose koloni bakteri disuspensikan ke dalam masing-masing media glukosa, sukrosa, manitol dan maltosa lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Diamati reaksi yang terjadi, hasil positif bila terjadi perubahan warna medium yang semula ungu menjadi kuning dan hasil negatif bila tidak terjadi perubahan warna pada media ⁽¹⁶⁾.

5. Uji Indol

Satu Ose koloni bakteri diinokulasikan ke dalam media SIM dan MIO, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam ⁽¹⁶⁾.

Pembuatan Suspensi Bakteri. NaCl fisiologis diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 6 mL. Bakteri uji sebanyak 4 Ose dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi NaCl fisiologis tadi. Dihomogenkan, diukur transmittan bakteri dengan menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 580 nm.

Pembuatan Konsentrasi Uji. Konsentrasi ekstrak etanol biji pinang yang digunakan 30%, 20% dan 10%, Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol biji pinang untuk konsentrasi 30% dengan cara ekstrak etanol biji pinang ditimbang sebanyak 0,6 gram dilarutkan dengan pelarut etanol sampai 2 mL. Untuk konsentrasi 20% dipipet sebanyak 1,33 mL ditambahkan pelarut etanol sebanyak 0,67 mL. Untuk konsentrasi 10% dipipet sebanyak 1 mL dari konsentrasi 20% dan ditambahkan pelarut etanol sebanyak 1 mL.

Uji Aktivitas Antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sebanyak 3 kali pengulangan. Suspensi bakteri dipipet sebanyak 0,3 mL dimasukkan ke dalam cawan petri. Media agar dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 10-15 mL dan dibiarkan mengeras. Kertas cakram steril ditetesi sebanyak 10 µl ekstrak etanol biji pinang pada masing-masing konsentrasi yang telah diencerkan (10%, 20%, 30%) dikering anginkan, kemudian diletakkan diatas media *Nutrien Agar*. Sebagai kontrol negatif digunakan etanol sedangkan kontrol positif yang digunakan 500 µl Chlorhexidine 0,2%. Diinkubasi

pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter hambatan diukur menggunakan jangka sorong.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Skrining Fitokimia. Pengujian skrining fitokimia dilakukan pada sampel segar dan ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*), dimana perbedaan pengerjaannya adalah pada pengujian biji segar sampel harus dihaluskan terlebih dahulu dan dilakukan pemanasan dengan menggunakan etanol untuk mengambil kandungan senyawa metabolit di dalam biji pinang, pemanasan ini sampai mendidih dan dilakukan pendinginan sebelum filtrat diambil dan dilakukan pengujian skrining fitokimia, berbeda dengan sampel ekstrak dalam pengujian skrining fitokimia sudah langsung bisa dilakukan pengujian tanpa harus dilakukan pemanasan menggunakan pelarut terlebih dahulu sebelum dilakukan pengujian.

Dari hasil skrining fitokimia (tabel 1) yang dilakukan didapatkan hasil yang sama pada biji pinang segar dan ekstrak etanol biji pinang, yaitu sama-sama mengandung alkaloid, flavonoid, dan terpenoid.

Positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih dikarenakan terbentuknya kompleks kalium-alkaloid dari reaksi antara pereaksi Mayer dengan senyawa alkaloid, positif terpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah setelah direaksikan dengan pereaksi *Liebermann-Burchard*, sementara positif flavonoid ditandai dengan adanya reaksi perubahan warna membentuk warna jingga merah yang disebabkan reduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur flavonoid.

Isolasi dan identifikasi Bakteri Gigi. Dari hasil isolasi bakteri pada 5 responden didapatkan 3 koloni bakteri isolat yaitu koloni G1 (Krem), koloni G2 (Putih), dan koloni G3 (Kuning), seperti yang terlihat pada gambar 1, yang selanjutnya dilakukan uji identifikasi menggunakan perwarnaan Gram dan uji biokimia.

Hasil pewarnaan Gram pada tabel 2 menunjukkan

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia biji pinang segar dan ekstrak etanol biji pinang.

Sampel	Senyawa metabolit	Hasil	Hasil pengamatan
Biji Segar	Alkaloid	+	Endapan putih
	Terpenoid	+	Merah
	Flavonoid	+	Merah
	Saponin	-	Tidak terbentuk busa
	Steroid	-	Tidak berwarna biru
Ekstrak Etanol Biji Pinang	Alkaloid	+	Endapan putih
	Terpenoid	+	Merah
	Flavonoid	+	Merah
	Saponin	-	Tidak terbentuk busa
	Steroid	-	Tidak terbentuk warna biru

koloni G1 merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk basil, koloni G2 merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk *diplococcus*, koloni G3 merupakan bakteri gram positif dan berbentuk *coccus*.

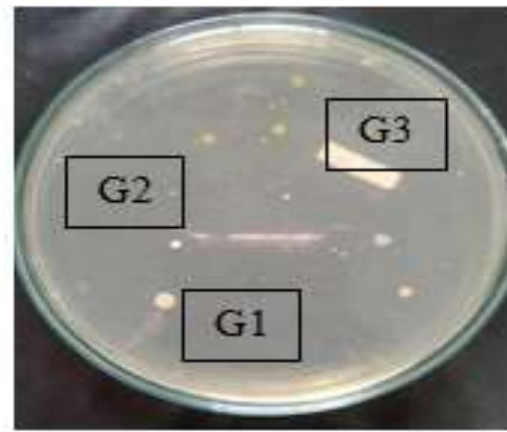
Pengujian katalase menunjukkan koloni G1 dan G3 memberikan hasil yang negatif untuk uji katalase. Katalase dikatakan negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gelembung gas, berarti koloni ini bersifat anaerobik fakultatif. Koloni G2 memberikan hasil positif untuk uji katalase. Uji katalase dikatakan positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas. Gelembung gas ini terbentuk dari hasil pemecahan hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan oksigen (O_2). Dimana enzim katalase melindungi bakteri dari H_2O_2 yang dapat terakumulasi selama proses aerobik, jika H_2O_2 terakumulasi maka dapat menjadi toksik bagi mikroorganisme⁽¹⁷⁾.

Pengujian oksidase menunjukkan koloni G1 memberikan hasil negatif pada uji oksidase, berarti koloni G1 tidak menghasilkan enzim sitokrom oksidase. Koloni G2 dan G3 memberikan hasil positif untuk uji oksidase. Dimana uji oksidase dikatakan positif dengan terbentuknya biru violet pada strip oksidase⁽¹⁸⁾.

Pengujian fermentasi karbohidrat berupa uji glukosa, maltose, manitol dan sukrosa. Dimana untuk koloni G1 uji laktosa, sukrosa dan manitol memberikan hasil positif yang ditandai dengan terjadinya perubahan warna pada media dari ungu menjadi kuning, yang berarti koloni G1 memiliki kemampuan dalam melakukan fermentasi karbohidrat. Sedangkan untuk koloni G2 uji glukosa, maltose dan sukrosa memberikan hasil negatif, yang ditandai dengan tidak terjadi perubahan warna pada media glukosa, maltose dan sukrosa (tetap berwarna ungu). Hal ini menandakan bakteri tidak memiliki kemampuan dalam melakukan fermentasi terhadap karbohidrat tersebut⁽¹⁹⁾.

Uji indol digunakan untuk mengetahui adanya enzim triptofanase pada bakteri yang dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat. Asam amino triptofan merupakan asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber energinya⁽¹⁹⁾. Hasil pengamatan menunjukkan koloni G1 tidak terbentuk indol yang ditandai dengan tidak terbentuk cincin merah dibagian permukaan agar, dengan demikian koloni G1 tidak mampu menggunakan asam amino triptofan sebagai energi selnya.

Dari hasil pengujian identifikasi didapatkan 3 jenis bakteri gigi yaitu G1 merupakan *Lactobacillus casei*, G2 merupakan *Branhamella catarrhalis*, dan G3



Gambar 1. Hasil isolasi bakteri gigi.

Tabel 2. Hasil identifikasi bakteri gigi.

Pengamatan	G1	G2	G3
Pewarnaan Gram	Positif	Negatif	Positif
Bentuk Sel	<i>Bacillus</i>	<i>Diplococcus</i>	<i>Coccus</i>
Uji Katalase	-	+	-
Uji Oksidase	-	+	+
Uji Indol	-	*	*
Uji Laktosa	+	*	*
Uji Glukosa	*	-	*
Uji Maltosa	*	-	*
Uji Sukrosa	+	-	*
Uji Manitol	+	*	*

Keterangan:

+ : Hasil Positif / ada pertumbuhan bakteri

- : Hasil Negatif / tidak ada pertumbuhan bakteri

*: Tidak dilakukan pengujian

merupakan *Streptococcus sp.*

Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Pinang (*Areca catechu L.*) terhadap Hasil Identifikasi Bakteri Gigi. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, 30% dan kontrol positif Chlorheksidin 0,2% menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, dan *Streptococcus sp.* Hasil penelitian menunjukkan bahwa kontrol negatif tidak memberikan zona hambatan. Hal ini membuktikan bahwa respon daya hambat yang terjadi benar-benar disebabkan oleh ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) atau senyawa sebagai komponen aktif dan bukan dari pelarut yang digunakan.

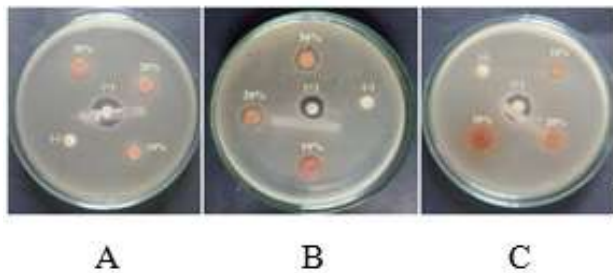
Hasil rata-rata diameter daerah hambat pada bakteri *Lactobacillus casei* dikaitkan dengan aktivitas diameter hambatnya maka pada ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) dengan konsentrasi 30%, 20%, dan 10% berturut-turut diperoleh nilai rata-rata diameter daerah hambat masing-masing sebesar 13,10 mm, 11,57 mm dan 10,20 mm termasuk pada kategori sedang. Pada bakteri *Branhamella catarrhalis*

dengan konsentrasi 30%, 20%, dan 10% berturut-turut diperoleh nilai rata-rata diameter daerah hambat masing-masing sebesar 11,40 mm, 10,27 mm dan 9 mm termasuk pada kategori sedang sampai lemah. Sedangkan pada bakteri *Streptococcus sp* dengan konsentrasi 30%, 20%, dan 10% berturut-turut diperoleh nilai rata-rata diameter daerah hambat masing-masing sebesar 11,67 mm, 11,40 mm dan 9,33 mm termasuk pada kategori sedang sampai lemah.

Hasil uji Anova dua arah yang dilakukan terhadap diameter zona hambat menyatakan terdapat perbedaan antara kelompok konsentrasi 10%, 20%, 30%, kontrol positif dan kontrol negatif dan terdapat perbedaan aktivitas daya hambat bakteri *Lactobacillus casei* dibandingkan dengan *Branhamella catarrhalis* dan *Streptococcus sp* tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan pada aktivitas daya hambat terhadap bakteri *Branhamella catarrhalis* dengan *Streptococcus sp*.

Ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri gigi hasil identifikasi yang disebabkan karena metabolit

sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*). Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) mengandung senyawa terpenoid, flavonoid dan alkaloid. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Afni, dkk (2015) mengenai uji aktivitas antibakteri pasta gigi ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap *Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus* yang menyatakan bahwa ekstrak etanol biji pinang memiliki aktivitas antibakteri yang berasal dari senyawa yang terkandung didalamnya. Sutrisno (2014) juga mengatakan dalam penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* bahwa aktivitas penghambatan *S.aureus* ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) disebabkan karena metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*)⁽²⁰⁾. Pelczar dan Chan (2008) menyatakan bahwa sebagai antibakteri flavonoid bekerja dengan menghambat perkembangan mikroorganisme karena mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen yang menyebabkan terjadinya kematian bakteri. Mekanisme alkaloid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel⁽²²⁾. Sedangkan mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan protein transmembran membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya protein⁽²³⁾.



Gambar 2. Zona hambat pada pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, dan *Streptococcus sp*.

Keterangan :

A : Zona hambat *Lactobacillus casei*

B : Zona hambat *Branhamella catarrhalis*

C : Zona hambat *Streptococcus sp*.

SIMPULAN

Isolat mengandung 3 jenis bakteri gigi yaitu *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, dan

Tabel 3. Hasil pengamatan uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap hasil identifikasi bakteri gigi.

Bakteri uji	Konsentrasi b/v%	Diameter daerah hambat (mm)			Rata-rata±SD	Kategori zona hambat
		1	2	3		
<i>Lactobacillus casei</i>	K(+)	14.8	16.1	14.8	15.23±0.75	Kuat
	K(-)	6.0	6.0	6.0	6±0	Lemah
	30%	13.4	13.1	12.8	13.10±0.30	Sedang
	20%	11.1	12.3	11.3	11.57±0.64	Sedang
	10%	10.1	10.3	10.2	10.20±0.10	Sedang
<i>Branhamella catarrhalis</i>	K(+)	13.4	13.1	12.8	13.10±0.30	Sedang
	K(-)	6.0	6.0	6.0	6±0	Lemah
	30%	11.3	11.3	11.6	11.40±0.17	Sedang
	20%	10.1	9.9	10.8	10.27±0.47	Sedang
	10%	9.2	9.0	8.8	9±0.20	Lemah
<i>Streptococcus sp</i>	K(+)	13.8	13.6	12.4	13.27±0.76	Sedang
	K(-)	6.0	6.0	6.0	6±0	Lemah
	30%	11.3	11.9	11.8	11.67±0.32	Sedang
	20%	11.1	11.6	11.5	11.40±0.26	Sedang
	10%	9.7	9.4	8.9	9.33±0.40	Lemah

Streptococcus sp. Ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) dalam variasi konsentrasi 10, 20 dan 30% berpengaruh terhadap peningkatan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Lactobacillus casei*, *Branhamella catarrhalis*, dan *Streptococcus sp* dan berbanding terbalik dengan kontrol negatif yang tidak memberikan zona hambat disekitar kertas cakram. Bakteri hasil isolat yang lebih baik dihambat pertumbuhan oleh ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) adalah bakteri *Lactobacillus casei* dibandingkan dengan bakteri *Branhamella catarrhali*, dan *Streptococcus sp.*

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. Profil kesehatan Indonesia 2012. Jakarta: Kemenkes RI. 2013.
- Hongini. Kesehatan gigi dan mulut . Bandung: Pustaka Reka Cipta. 2016.
- Muhtar, R., Fatimawali, dan Bodhi, W. Identifikasi dan uji sensitifitas bakteri pada plak gigi pasien di Puskesmas Ranotana Weru Manado terhadap antibiotik golongan genisilin dan uinolon. Jurnal Ilmiah Farmasi Pharmacon. 2017.6(3): 37-45.
- Yulineri, T., Kasim, E., dan Nurhidayat, N. Selenium dari ekstrak biji dan akar pinang (*Areca catechu L.*) yang difermentasi dengan konsorsium *Acetobacter-Saccharomyces* sebagai antiseptik obat kumur. Biodiversitas . 2005. 7(1): 18-20.
- Agoes, A. Tanaman obat Indonesia . Jakarta : Salemba Medika. 2010.
- Djohari, M., Lestari, R., Hasti, S. Identifikasi dan uji aktivitas daya hambat ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap isolat bakteri gusi. Jurnal Penelitian Farmasi Indonesia, 2018. Vol 7 (2): 61-69
- Djohari, M., Putri, W. Y., Pratiwi, E. Isolasi dan uji aktivitas daya hambat ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap bakteri pada lidah. Jurnal Riset Kefarmasian Indonesia. 2019. Vol 1(3); 177-188
- Afni, N., Said, N., dan Yuliet. Uji aktivitas antibakteri pasta gigi ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap *Staphylococcus mutans* dan *Stahylococcus aureus*. Galenika Journal Of Pharmacy. 2015. 1(1): 48-58
- Chamima, A. R. Inhibisi ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap pelepasan ion fosfor pada proses demieralisasi gigi yang distimulasi *Streptococcus mutans*. Skripsi. Jember: UNIJEM.2012.
- Mayanti, I. Pengaruh pemberian infusa biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada gigi dan gusi. Karya Tulis Ilmiah. Pekanbaru: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau. 2017.
- Taihuttu, Y. M. Daya hambat ekstrak biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap pertumbuhan streptococcus mutans secara *in vitro*. Molucca Medica. 2017. 10(1): 127-138.
- Anisah, Khotimah, S., dan Yanti, A. H. Aktivitas antibakteri ekstrak rimpang jeringau (*Acorus calamus L.*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Protobiont. 2017. 3(3):1-5.
- Nursidika, P., saptarina, O., dan Rafiqua, N. Aktifitas antimikroba fraksi ekstrak etanol buah pinang (*Areca catechu L.*) pada bakteri *Methicillin Resistent Staphylococcus aureus* . Jurnal MKB. 2014. 46(2): 94-99.
- Handayani, F., Sundu, R., dan Karapa, H. N. Uji aktivitas ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap penyembuhan luka bakar pada kulit punggung mencit putih jantan (*Mus musculus*). Jurnal Ilmiah Manuntung. 2016. 2(2): 154-160
- Radji, M. D. Buku ajar mikrobiologi panduan mahasiswa farmasi dan kedokteran . Jakarta: EGC. 2011.
- Harti, A. S. Mikrobiologi kesehatan. Yogyakarta: ANDI. 2015.
- Hadioetomo, R.S. Mikrobiologi dasar dalam praktek teknik dan prosedur dasar laboratorium. Jakarta: PT Gramedia. 1990.
- Locke, T., Keat, S., Walker, A., dan Mackinnon, R. Microbiology and infectious diseases on the move. Terjemahan Dr. Rizqi Akbarini. Jakarta Barat : Permata Puri Media. 2013.
- Lay. B. W. Analisis mikroba di laboratorium. Jakarta: PT Raja Grafindo Persada. 1994.
- Sutrisno, J. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pinang (*Areca catechu L.*) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Skripsi. Pontianak : Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura. 2014.
- Pelczar, M. J., dan Chan, E. Dasar-dasar mikrobiologi. Terjemahan Elements of Microbiology. Jakarta: UI Press. 2008.
- Robinson, T. Kandungan senyawa organik tumbuhan tinggi. Penerjemah Kosasih Padmawinata. Bandung: Penerbit ITB. 1995.
- Cowan, M. Plant Products as antimicrobial agent. Jurnal Microbiology. 1999. 12(4): 564-582.

Formulasi Gel Transfersom Limbah Kulit Bawang Merah (*Allium cepa. L*) Menggunakan Perbandingan Fosfolipid dan Surfaktan

(Formulation of Transfersome Gel Preparation of Waste Red Onion (*Allium cepa. L*) Tunic Using Phosfolipid and Surfactant)

WINDA PERMATA SARI*, SONIYA TAMARA, SHERLI PERMATASARI, DAN SEPTIA
ANDINI

Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Pakuan Jalan Tegallega, Kecamatan
Bogor Tengah, Kota Bogor, 16143, Jawa Barat, Indonesia

Diterima: 24 Oktober 2019, Disetujui: 20 April 2020

Abstrak: Kulit bawang merah mengandung kuersetin yang memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi. Sediaan anti inflamasi rute *transdermal* merupakan solusi terhadap efek samping gastrointestinal pada rute oral. Transfersom merupakan vesikel berukuran nano yang mampu meningkatkan penetrasi sediaan rute *transdermal*. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi transfersom limbah kulit bawang merah berdasarkan perbandingan fosfolipid dan surfaktan yang digunakan. Selanjutnya formula transfersom terbaik akan dibuat dalam bentuk sediaan gel dan dievaluasi ukuran partikelnya. Transfersom dibuat dalam 3 formula yaitu Formula 1 (F1) dengan perbandingan fosfolipid:surfaktan (90:10), F2 (85:15), dan F3 (70:30). Karakterisasi transfersom yang dilakukan meliputi distribusi ukuran partikel, zeta potensial, efisiensi penjerapan, indeks deformabilitas, dan morfologi vesikel. Formula transfersom terbaik selanjutnya diformulasi menjadi sediaan gel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa formula transfersom terbaik adalah F1 (90:10), dengan rata-rata ukuran partikel $357,9 \pm 6,3$ nm, zeta potensial $-24,9 \pm 0,9$ dan hasil efisiensi penjerapan mencapai 77,964%. Morfologi vesikel yang dihasilkan berbentuk *spheris* sesuai kriteria vesikel yang diharapkan. Tetapi pada sediaan gel, ukuran partikel tidak terdistribusi secara homogen.

Kata Kunci : Kulit bawang merah, transfersom, gel, inflamasi.

Abstract: Red onion tunic waste contains quercetin which has anti-inflammatory activity. The formulation of anti-inflammatory preparations with the transdermal route is a solution towards the effect of gastrointestinal in the oral route. Transfersome is a nano vesicle particle that can increase the penetration of transdermal formulation. This study aims to characterize red onion tunic waste transfersome based on the ratio of phospholipids and surfactants used. The formulation of the best transfersome will be made into gel based formulation and the particle will be evaluated. Transfersome is made in 3 formulas namely Formula 1 (F1) with a ratio of phospholipids:surfactant (90:10), F2 (85:15), and F3 (70:30). This characterization included particle size distribution, potential zeta, entrapment efficiency, deformability index, and vesicle morphology. The best transfersome formulas are then formulated into gel preparations. The results showed that the best transfersome formula was F1 (90:10), with an average particle size of 357.9 ± 6.3 nm, zeta potential of -24.9 ± 0.9 and the entrapment efficiency results reached 77.964%. The morphology of the vesicles produced is spherical according to the expected vesicle criteria, but in gel-based formulation, the particle size not distributed homogenously.

Keywords: Red onion tunic, transfersom, gel, inflammation.

*Penulis korespondensi
E-mail: winps066115124@gmail.com

PENDAHULUAN

WALAUPUN kulit bawang merah seringkali ditemukan sebagai limbah yang terbuang begitu saja, namun ternyata sebenarnya kulit bawang merah banyak mengandung metabolit sekunder yang sangat bermanfaat seperti flavonoid, polifenol, saponin, terpenoid, dan alkaloid⁽¹⁾. Flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat limbah kulit bawang merah adalah kuersetin⁽²⁾.

Menurut Soemari (2016), limbah kulit bawang merah yang diekstraksi dengan metode maserasi memiliki aktivitas sebagai anti inflamasi pada dosis 200mg/kgBB mencit⁽³⁾. Hal ini terkait kemampuan kuersetin untuk menghambat pembentukan mediator inflamasi seperti prostaglandin dan histamine⁽⁴⁾. Kuersetin dapat melindungi tukak lambung sehingga penggunaan kuersetin sebagai antiinflamasi lebih menguntungkan dibandingkan dengan obat golongan NSAID. Namun, kuersetin yang diberikan secara oral memiliki bioavailabilitas yang sangat rendah akibat first pass metabolisme, sehingga penggunaan oral menyebabkan hilangnya aktivitas kuersetin sebagai anti inflamasi^(5,6).

Rute transdermal dapat dijadikan pengganti rute peroral dan parenteral lainnya karena dapat menghindari first pass metabolisme dan meminimalisir rasa sakit⁽⁷⁾. Selain itu rute transdermal memungkinkan obat dilepaskan perlahan-lahan/ *sustain release* yang sangat baik untuk terapi inflamasi jangka panjang karena mampu meminimalisir efek samping obat yang diberikan secara peroral⁽⁷⁾. Namun hambatan terbesar rute transdermal adalah *stratum corneum*/ lapisan tanduk yang merupakan lapisan paling atas yang melindungi kulit⁽⁸⁾. Sifatnya yang sangat nonpolar karena tersusun atas lipid bilayer dan strukturnya yang kompak menyebabkan zat aktif sulit berpenetrasi ke dalam kulit⁽⁹⁾.

Penggunaan teknologi nanopartikel dapat menjadi solusi karena dapat meningkatkan penetrasi pada rute transdermal⁽¹⁰⁾. Selain itu, nanopartikel dapat meningkatkan ketersediaan hayati (*bioavailability*) dari obat yang memiliki kelarutan rendah pada saluran sistemik^(11,12). Transfersom adalah suatu teknologi nanovesikel yang mampu membawa zat aktif dengan rentang kepolaran yang luas, karena memiliki gugus hidrofilik dan hidrofobik. Selain itu, kemampuan deformabilitas transfersom dapat meningkatkan penetrasi karena memungkinkan zat aktif obat melalui pori yang lebih kecil dibandingkan ukuran droplet itu sendiri⁽¹³⁾. Penelitian ini dilakukan untuk memformulasi sediaan nanovesikel transfersom yang dijerap ke dalam gel berdasarkan perbandingan fosfolipid dan surfaktan yang digunakan sebagai

solusi dalam menghantarkan zat aktif kuersetin dari limbah kulit bawang merah dengan aktivitas sebagai anti inflamasi. Fosfolipid perlu divariasikan untuk mendapatkan formula transfersom yang paling stabil dengan efisiensi penyerapan obat yang tinggi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah limbah kulit bawang merah yang didapat dari rumah tangga produksi bawang goreng di Cibinong, Fosfatidilkolin kedelai/ Phospolipon 90H (pemberian GmbH Lipoid), Tween 80, methanol p.a (Emsure), etanol p.a (Emsure), aqua pro injeksi (IKA), Etil Asetat p.a (Emsure), N-heksan p.a (Emsure), *carbomer ultrace*, kalium dihidrogen posfat, 1-3 propandiol, trietanolamin fenoksietanol, Askorbil Palmitat, Kloroform p.a (Emsure).

Alat. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, mikro pipet, *vacuum van evaporator* (Ogawa[®]), *particle size analyzer/ zetasizer* (Malvern[®]), TEM/ *Transmission Electron Microscopy*, *freezer* (Dast[®]), *sonicator bath*, sentrifugator (Biohazard), *homogenizer*, viskometer Brookfield, pH meter, spektrofotometer UV-Vis (Jasco[®] V-730), oven, *Microwave oven*, *Rotary evaporator* (IKA[®]), spuit, membran filter (Axioa[®]), alat-alat gelas (Pyyrex[®]).

METODE. Pembuatan Ekstrak. Serbuk bawang merah dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan pelarut etanol 70% dengan perbandingan 1:10⁽¹⁵⁾. Erlenmeyer dimasukkan ke dalam *microwave oven* dengan daya 800 watt selama 6 menit. Diradiasi secara berkala (radiasi 1 menit dan 2 menit dimatikan) untuk menjaga suhu tidak naik 80 °C. Didiamkan hingga mencapai suhu kamar, lalu disaring dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga menjadi ekstrak kental⁽²⁾.

Fraksinasi Filtrat. Ekstrak pekat limbah kulit bawang merah dilarutkan dengan aquadest. Fase air ini difraksinasi terlebih dahulu dengan n-heksan sebanyak tiga kali sebagai fase organik. Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan corong pisah (ekstraksi cair-cair). Fase air setelah tiga kali pengulangan difraksinasi dengan n-heksan selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat sebanyak tiga kali dengan perbandingan 1:1. Fase organik etil asetat dikumpulkan. Selanjutnya dijadikan serbuk dengan menggunakan *vacuum van evaporator* untuk menghilangkan pelarut⁽²⁾.

Pembuatan Transfersom Limbah Kulit Bawang Merah. Optimasi formula transfersom dilakukan menggunakan phospolipon 90 H kedelai dan surfaktan tween 80. Digunakan berbagai variasi jumlah

surfaktan dan fosfolipon agar didapatkan formula terbaik sesuai ketentuan. Formulasi transfersom yang terbaik digunakan dalam formula gel (Tabel 1).

Tabel 1. Formula transfersom limbah kulit bawang merah.

Formula	Fosfatidilkolin : Surfaktan
1	90:10
2	85:15
3	70:30

Transfersom Dibuat dengan Menggunakan Metode Hidrasi Lapis Tipis. Dicampurkan fosfatidilkolin kedelai dan tween 80 sebagai surfaktan. Kemudian, campuran dilarutkan dengan pelarutnya yaitu kloroform dan metanol (2:1). Jumlah pelarut yang dimasukkan sebanyak dua puluh kali dari campuran fosfatidilkolin kedelai dan tween 80. Sebanyak 0,1g serbuk hasil fraksinasi dengan etil asetat dimasukkan ke dalam campuran fosfolipid dan tween 80. Dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 56 °C dengan kecepatan 75-130 rpm untuk menghilangkan pelarut organik. Selanjutnya, didiamkan selama 24 jam untuk menyempurnakan pembentukan vesikel. Lapisan tipis yang dihasilkan dihidrasi dengan menggunakan larutan dapar posfat pH 7,4 sebanyak 100 mL dengan suhu 56 °C kecepatan 75 rpm selama 30 menit. Kemudian, disonikasi dengan *sonicator* bath selama 30 menit^(17,18).

Distribusi Ukuran Partikel Transfersom dan Zeta Potensial. Digunakan alat PSA (*Particle Size Analyzer*) berdasarkan prinsip *light scattering* (pemendaran cahaya) pada suhu 25 °C untuk menentukan ukuran partikel dan zeta potensial dari transfersom yang terbentuk. Sebagai *base line* dimasukkan larutan aquadest kedalam *fluid tank*. Sampel dimasukkan tetes demi tetes ke dalam *fluid tank* hingga konsentrasi yang diharapkan. Pengukuran ini dilakukan sebelum dan sesudah sonikasi untuk melihat perbedaannya⁽¹⁹⁾.

Efisiensi penjerapan. Perhitungan kadar kuersetin dilakukan dengan menggunakan metode kurva kalibrasi Spektrofotometri UV-Vis. Kurva kalibrasi kuersetin dibuat dari kuersetin murni dengan deret 2,4,6,8, dan 10 ppm. Masing-masing deret konsentrasi diukur persamaannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum kuersetin yang didapatkan dari penetapan panjang gelombang maksimum, lalu diukur persamaan regresi liniernya. Kurva regresi dianggap linier jika nilai *r* mendekati 1. Pengujian efisiensi penjerapan (EP) dilakukan dengan menggunakan sentrifugator dengan

tujuan memisahkan fraksi kulit bawang merah yang tidak terjerap. Kecepatan diatur 3.400 rpm. Akan terbentuk supernatan dan endapan. Ekstrak kulit bawang merah yang bebas akan berada di dalam supernatan, selanjutnya diukur serapannya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Kadar obat ditentukan melalui data serapan yang diperoleh⁽¹⁹⁾.

Uji Deformabilitas. Dilakukan dengan metode ekstruksi. Membran filter yang digunakan berukuran pori 200nm. Setelah 5 menit, diukur volumenya⁽²⁰⁾.

Morfologi Bentuk Vesikel. Untuk melihat morfologi bentuk vesikel dari transfersom yang terbentuk digunakan TEM (*Transmission Electron Microscope*). Pengerjaan dilakukan dengan meneteskan satu tetes sampel pada *carbon coated copper grid* lalu dikeringkan pada suhu ruangan. Setelah kering, dianalisa dengan TEM⁽¹⁹⁾.

Pembuatan Sediaan Gel Transfersom. Gel transfersom dibuat dari formula transfersom yang memenuhi syarat berdasarkan karakterisasi transfersom. Formula gel terdapat pada tabel 2.

Tabel 2. Formula sediaan gel.

Bahan	Jumlah
Suspensi transfersom ekstrak	Setara dengan 0,2g
kulit bawang merah	ekstrak
<i>Carbomer ultrez</i>	0,6%
1,3 Propandiol	5%
Fenoksietanol	0,5%
Askorbil Palmitat	0,05%
Etanol	2%
TEA	1%
<i>Essence</i> lemon	3 tetes
Aqua bebas CO ₂	Sampai 100%

Pembuatan basis gel dengan cara membasahi *carbomer ultrez* dengan aquademineralisata bebas CO₂. Lalu ditambahkan dengan TEA sampai didapatkan konsistensi yang diharapkan dan diperhatikan pH. pH sediaan harus sesuai dengan kriteria pH untuk sediaan kulit yaitu pH antara 4,5-6,5. Fenoksietanol dan 1,3 propandiol ditambahkan ke dalam basis gel yang telah terbentuk. Askorbil palmitat dilarutkan dalam etanol secukupnya. Kedua campuran tersebut dicampurkan ke dalam campuran pertama. Ditambahkan dengan sisa aqua demineralisata bebas CO₂. Dihomogenisasikan dengan menggunakan *homogenizer* kecepatan maksimal 500 rpm yang ditingkatkan secara bertahap. Penggabungan transfersom ke dalam basis gel dilakukan dengan homogenizer dengan kecepatan pengadukan 500 rpm selama 30 menit. Penambahan *essence* lemon dilakukan secukupnya setelah semua campuran dicampurkan.

Evaluasi Sediaan Gel. Pengamatan organoleptis. Diuji secara organoleptis dari segi warna, bau, ada atau tidaknya pemisahan fase (sineresis). Homogenitas. Diletakan diantara dua kaca objek dan dilakukan dibawah cahaya untuk melihat ada atau tidaknya partikel yang tidak bercampur. Pengukuran pH. Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter yang dikalibrasi dengan menggunakan dapar standar pH 4 dan pH 7 pada suhu ruangan.

Penentuan Viskositas dan Sifat Alir. Dilakukan dengan menggunakan viskometer Brookfield. Pengukuran dilakukan dengan kecepatan yang diatur dari 0,5;2;4;10 dan 20 rpm, lalu dibalik 20;10;4;2;0,5 rpm. Data yang diperoleh diplotkan terhadap tekanan geser (dyne/cm²) dan kecepatan geser (/sec).

Penentuan Ukuran Partikel. Ukuran partikel dari sediaan gel transfersom diukur menggunakan *Particle Size Analyzer* untuk memastikan transfersom yang terbentuk tidak beragregasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Ekstrak. Limbah kulit bawang merah segar yang terkumpul sebanyak 6,5 kg. Randemen simplisia adalah 9,6% sehingga didapatkan simplisia serbuk sebanyak 625g.

Metode ekstraksi MAE memanfaatkan radiasi gelombang mikro sehingga ekstraksi dapat berlangsung dengan lebih cepat melalui pemanasan pelarut secara cepat dan efisien⁽²¹⁾. Pada saat ekstraksi dilakukan pengulangan atau re-MAE dengan tujuan untuk menarik lebih banyak senyawa flavonoid yang ada di dalam limbah kulit bawang merah. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70% mengikuti penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Sari et al., (2017) dan Malisa., (2018)^(13,15). Randemen ekstrak kental yang didapatkan adalah sebanyak 24%, yaitu ekstrak kental sebanyak 150g.

Pembuatan Transfersom Kulit Bawang Merah.

Transfersom limbah kulit bawang merah dibuat dengan tiga formula berdasarkan konsentrasi fosfolipid dan surfaktan yang digunakan. Dalam penelitian ini, dipilih Fosfolipid tipe H dan surfaktan Tween 80 sebagai penyusun utama dari vesikel transfersom.



Gambar 1. Suspensi transfersom limbah kulit bawang merah.

Perbandingan formula transfersom yaitu 90:10, 85:15, 70:30. Pertama-tama fosfolipid dan surfaktan sesuai perbandingan tersebut ditimbang dan dilarutkan dalam kloroform dan metanol dengan perbandingan 2:1. Pelarut yang digunakan adalah sebanyak dua puluh kali dari jumlah keseluruhan fosfolipid dan tween 80 yang ditimbang.

Distribusi Ukuran Partikel Transfersom.

Ukuran partikel dapat ditentukan berdasarkan volume, jumlah partikel, dan intensitas. Distribusi ukuran partikel paling baik diamati berdasarkan intensitas⁽²²⁾. Dari hasil pengukuran partikel didapatkan data berupa PDI dan Z-Average. PDI atau indeks polidispersitas menandakan kehomogenan dari distribusi ukuran partikel. Semakin kecil nilai PDI yang dihasilkan (mendekati nol) menandakan bahwa distribusi ukuran partikel seragam⁽²³⁾. Sementara Z-Average menandakan rata-rata ukuran partikel yang dihasilkan.

Berdasarkan data Z-Average setelah sonikasi, ukuran partikel terkecil didapatkan dari suspensi transfersom formula 3 yang mengandung surfaktan tween 80 paling banyak dibandingkan dengan formula 1 dan formula 2. Semua formula suspensi transfersom setelah tahapan sonikasi menunjukkan ukuran partikel yang berada pada rentang ukuran nanopartikel yaitu 1 - 1000 nm. Sementara sebelum tahapan sonikasi, ukuran partikel transfersom formula 2 berada pada ukuran mikro. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan dari tahapan sonikasi dalam pembuatan vesikel transfersom terhadap ukuran vesikel transfersom.

Pengamatan nilai PDI yang terbaik didapatkan pada formula 1 yang mengandung fosfolipid paling banyak dibandingkan formula 2 dan 3. Tahapan sonikasi juga memberikan pengaruh yang signifikan

Tabel 3. Ukuran partikel suspensi transfersom berdasarkan intensitas.

	Parameter	Formula 1 (nm)	Formula 2 (nm)	Formula 3 (nm)
Sebelum sonikasi	Ukuran partikel	896,3±96,9	1174,9±164,5	654±64,7
	PDI	0,666±0,11	0,738±0,90	0,502±0,07
Setelah Sonikasi	Ukuran partikel	357,9±6,3	339,9±3,1	303,5±3,6
	PDI	0,127±0,01	0,218±0,01	0,269±0,01

terhadap nilai PDI yang dihasilkan yang artinya sonikasi membuat ukuran vesikel transfersom yang dihasilkan terdistribusi homogen.

Zeta Potensial. Tujuan pengukuran Zeta Potensial adalah untuk mengetahui kemampuan dari partikel untuk beragregasi kembali. Hal ini perlu dilakukan karena agregasi partikel dapat menyebabkan ukuran partikel yang dihasilkan menjadi lebih besar dari ukuran awalnya. Zeta potensial ditentukan berdasarkan pergerakan elektroforesis yang disebabkan adanya muatan listrik. Jika zeta potensial kurang dari +/- 25mV maka akan menyebabkan kurangnya gaya tolak menolak antar partikel, sehingga partikel cenderung beragregasi. Sementara jika nilai zeta potensial lebih dari +/- 25mV maka partikel akan cenderung tolak menolak sehingga partikel tidak mudah beragregasi⁽²⁴⁾.

Berdasarkan data zeta potensial didapatkan hasil bahwa formula 1 baik sebelum dan sesudah sonikasi memiliki zeta potensial yang paling baik dan memenuhi syarat. Sesudah sonikasi nilai zeta potensial berada di atas -25mV. Akan tetapi data yang dihasilkan tidak konsisten, yaitu pada formula 2 hasil sesudah sonikasi lebih baik daripada sebelum sonikasi, sehingga tidak dapat disimpulkan secara langsung bahwa sonikasi mempengaruhi zeta potensial dengan mengurangi gaya tolak menolak antar partikel. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Zurcher (2018) pengaruh waktu dan suhu sonikasi dapat menyebabkan partikel yang mengalami perlakuan sonikasi memiliki kecenderungan untuk beragregasi kembali⁽²⁵⁾. Oleh karena itu perlu dilakukan optimasi terhadap waktu dan suhu optimum sonikasi untuk mengetahui lebih jauh pengaruh sonikasi terhadap kecenderungan partikel untuk tarik menarik (beraglomerasi kembali).

Efisiensi Penjerapan. Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin. Berdasarkan hasil serapan yang didapatkan dari deret konsentrasi standar tersebut, dibuat persamaan regresi linier untuk penetapan kadar flavonoid yaitu $y=0,067985x + 0,01878$ dengan nilai koefisien korelasi adalah 0,97. Persamaan regresi linier yang didapatkan telah memenuhi syarat linearitas yaitu nilai koefisien korelasi mendekati 1.

Penetapan kandungan flavonoid dalam suspensi transfersom. Untuk menetapkan kandungan flavonoid

Tabel 4. Zeta potensial suspensi transfersom.

Formula	Zeta Potensial (mV)	
	Sebelum	Sesudah
1	-37,60±1,1	-24,90±0,9
2	-13,70±0,6	-24,73±1,5
3	-19,23±1,8	-15,33±2,8

dalam suspensi transfersom, terlebih dahulu ditetapkan kadar flavonoid dalam serbuk fraksi etil asetat.

Tabel 5. Efisiensi penjerapan suspensi transfersom.

Formula	1	2	3
Dengan sonikasi	77,96%	65,29%	37,29%
Tanpa sonikasi	82,98%	69,24%	42,12%

Berdasarkan hasil penetapan kadar flavonoid dalam fraksi etil asetat didapatkan bahwa dalam 1g fraksi etil asetat mengandung sebanyak 529,19 mg flavonoid, dan persen kadar adalah 52,92%. Berdasarkan data kadar flavonoid dalam serbuk fraksi etil asetat kemudian ditetapkan kandungan flavonoid total dalam suspensi transfersom baik flavonoid yang telah terjerap dalam vesikel transfersom maupun flavonoid yang tidak terjerap. Kandungan flavonoid total ini yang akan ditetapkan sebagai kadar obat total dalam perhitungan efisiensi penjerapan. Kandungan flavonoid total dalam suspensi transfersom adalah 52,19 mg flavonoid dalam 100 mg serbuk fraksi etil asetat yang dimasukkan ke dalam suspensi transfersom. Uji Efisiensi penjerapan transfersom.

Hasil efisiensi penjerapan dapat dilihat pada tabel 5. Berdasarkan data hasil efisiensi penjerapan dapat disimpulkan bahwa formula 1 memiliki efisiensi penjerapan yang paling tinggi. Hal ini disebabkan formula 1 memiliki komposisi fosfolipid paling banyak dibandingkan dengan formula 2 dan 3, yaitu 90% komposisi penyusun vesikelnya adalah fosfolipid. Surfaktan memang memiliki peranan dalam fleksibilitas dari transfersom namun jika komposisi fosfolipid terlalu sedikit dan terlalu banyak surfaktan yang digunakan maka akan semakin mudah bocor vesikel yang terbentuk.

Selain itu proses sonikasi juga berpengaruh terhadap efisiensi penjerapan. Proses sonikasi menyebabkan penurunan efisiensi penjerapan. Hal ini sama seperti penelitian yang dilakukan oleh Andreas (2014) dimana semakin lama sonikasi dilakukan semakin menurun efisiensi penjerapan nya⁽²⁶⁾. Oleh karena itu perlu dilakukannya optimasi waktu, suhu, dan waktu sonikasi yang optimum agar efisiensi penjerapan tetap sesuai yang diharapkan. Penurunan efisiensi penjerapan yang terjadi pada penelitian ini masih dapat ditoleransi karena nilai efisiensi penjerapan masih berada di atas 50%.

Uji Deformabilitas. Hasil uji deformabilitas dapat dilihat pada tabel 6. Berdasarkan data yang didapat, hasil uji deformabilitas terbaik didapatkan pada formula 1 yang memiliki kandungan fosfolipid

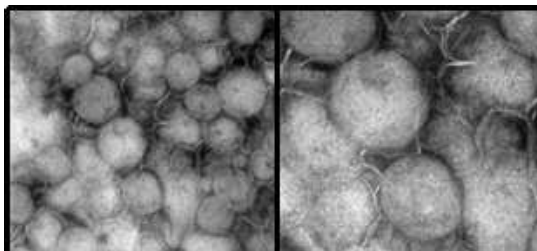
paling banyak dibandingkan dengan formula 2 dan 3. Fleksibilitas dari transfersom memang didapatkan dari kandungan surfaktan di dalamnya namun jika jumlah surfaktan yang dihasilkan terlalu banyak justru dapat menurunkan nilai indeks deformabilitas karena dapat menyebabkan terjadinya pembentukan misel. Nilai indeks deformabilitas yang semakin besar menandakan bahwa transfersom lebih mudah berpenetrasi melalui celah-celah pori yang lebih kecil⁽²⁸⁾.

Morfologi Vesikel Transfersom. Hasil yang diharapkan memang adalah sferis karena bentuk sferis adalah bentuk yang paling stabil untuk vesikel transfersom.

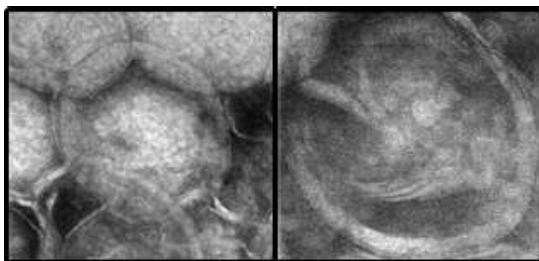
Tabel 6. Hasil uji deformabilitas.

Formula	Indeks Deformabilitas
1	2,098
2	1,762
3	1,105

Pembuatan Gel Transfersom. Gel transfersom dibuat dari suspensi transfersom formula 1 karena memiliki nilai efisiensi penyerapan yang paling tinggi yaitu 77,96%. Selain itu, pada formula 1 nilai indeks deformabilitasnya juga paling tinggi sehingga memungkinkan zat aktif untuk berpenetrasi lebih baik.



A B
Gambar 2. Pengamatan dengan TEM
Perbesaran 10.000 (A) dan 20.000 kali (B).



A B
Gambar 3. Pengamatan dengan TEM
Perbesaran 40.000 (A) dan 80.000 kali (B).

Pembuatannya dilakukan dengan mencampurkan suspensi transfersom ke dalam basis gel yang telah dibuat terlebih dahulu. Pencampuran dilakukan dengan menggunakan homogenizer dengan kecepatan 500rpm selama 30 menit. Kecepatan tinggi diperlukan dalam pencampuran suspensi transfersom dan basis gel agar tidak terjadi pemisahan antara suspensi transfersom dan basis gel.

Evaluasi Gel Transfersom. Pemeriksaan organoleptik. Sediaan gel yang dihasilkan berwarna putih kekuningan. Warna yang dihasilkan ini disebabkan oleh bahan aktif yang berasal dari bahan alam yaitu limbah kulit bawang merah. Aroma bawang dari sediaan gel tertutup oleh *essence* lemon yang digunakan. Penambahan *essence* dilakukan karena bau bawang merah yang sangat tidak enak pada aplikasi. Tidak terjadi pemisahan fase (*sineresis*) pada gel limbah kulit bawang merah.

Homogenitas. Hasil pemeriksaan homogenitas dari sediaan gel di bawah mikroskop dengan perbesaran 10 kali menunjukkan bahwa sediaan gel yang dihasilkan telah homogen karena tidak terlihat partikel yang belum terlarut. Adapun bulatan-bulatan yang masih nampak merupakan gelembung udara.



A B C
Gambar 4. Basis gel (A), gel tanpa transfersom (B), gel transfersom (C).

Pengukuran pH. Parameter pH yang memenuhi syarat untuk sediaan yang diperuntukan untuk penggunaan topikal adalah antara 4,5-6,5.29 Berdasarkan pemeriksaan pH sediaan gel menggunakan pH meter, sediaan gel berada pada pH 6,199 menunjukkan bahwa gel sesuai untuk penggunaan topikal.

Penentuan Viskositas dan Sifat Aliran. Penentuan viskositas dan sifat aliran dilakukan dengan menggunakan Viskometer Brookfield. Pengukuran viskositas penting untuk dilakukan karena menunjukkan resistensi zat cair untuk mengalir. Faktor-faktor yang mempengaruhi viskositas diantaranya adalah proses pencampuran atau pengadukan pada proses pembuatan sediaan, pemilihan bahan pengental dan surfaktan yang digunakan⁽³⁰⁾. Hasil dari pengukuran viskositas dan sifat aliran dari sediaan gel didapatkan bahwa tipe aliran sediaan gel transfersom adalah plastis tiksotropik dengan nilai viskositas 36.550 cps. Karakteristik sediaan dengan aliran plastis tiksotropik

adalah viskositasnya akan berkurang seiring dengan meningkatnya kecepatan geser. Perbedaan aliran ini dibandingkan dengan aliran pseudoplastis adalah pada aliran plastis tidak melalui titik 0,0. Aliran plastis berhubungan dengan adanya partikel-partikel yang tersuspensi. *Yield value* disebabkan oleh adanya kontak antar partikel-partikel yang berdekatan (disebabkan oleh gaya *van der Waals*), yang harus dipecah sebelum aliran dapat terjadi. Makin banyak suspensi yang terflokulasi, makin tinggi *yield value* nya.

Penentuan Ukuran Partikel. Ukuran partikel sediaan gel diukur untuk mengetahui adanya agregasi pada suspensi transfersom setelah dijerap ke dalam gel. Hasil pengukuran partikel adalah sebesar 248,5nm dengan nilai PDI (indeks polidispersitas) sebesar 0,57. Walaupun ukuran partikel yang dihasilkan masih dalam ukuran nanopartikel, namun nilai PDI dan jumlah puncak yang dihasilkan menunjukkan bahwa ukuran partikel tidak terdistribusi secara merata. Sementara nilai zeta potensial yang didapatkan lebih memenuhi syarat dibandingkan suspensi transfersom, yaitu sebesar -60,8 mV. Kenaikan nilai zeta potensial ini disebabkan kenaikan viskositas sediaan. Hal ini menunjukkan bahwa setelah dibuat dalam sediaan gel, partikel transfersom cenderung tidak beragregasi.

SIMPULAN

Suspensi transfersom limbah kulit bawang merah yang memenuhi syarat adalah formula 1 (90:10) dengan efisiensi penjerapan paling besar yaitu 77,96%. Gel transfersom yang dihasilkan memenuhi syarat evaluasi sediaan gel, namun distribusi ukuran partikelnya tidak homogen dengan nilai PDI sebesar 0,57. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui batas maksimum limbah kulit bawang merah yang dapat dijerap ke dalam transfersom, serta perlu dilakukannya uji penetrasi terhadap gel transfersom.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset dan Pendidikan Tinggi atas dana hibah penelitian yang telah diberikan melalui Program Kreativitas Mahasiswa (PKM). Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada GmbH Lipoid yang memberikan dukungan berupa bahan penelitian. Juga kepada PT. DKSH yang telah memberikan dukungan fasilitas alat penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Rahayu S, Kurniasih N, Amalia V. Ekstraksi dan identifikasi senyawa flavonoid dari bawang merah Sebagai antioksidan alami. *Al Kimia*. 2015.2(1):1-8.
2. Malisa N. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat limbah kulit bawang merah (*Allium cepa*. L) secara in vitro dan penambatan molekul ligan senyawa aktif [skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pakuan Bogor; 2018.
3. Soemari YB. Uji Aktivitas inflamasi kuersetin kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) pada mencit putih jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2016.1(2):163-72.
4. D'mello P, Gadhwal MK, Joshi U, Shetgiri P. Modelling of COX-2 inhibitory activity of flavonoids. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2011.3(4):33-40.
5. Chen YC, Shen SC, Lee WR, Hou WC, Yang LL, Lee TJ. *Journal Cell Biochem*. 2001.82(6):537-48.
6. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T, Kumazawa Y, Morikawa S. *Life Sci*. 2003.26(6):709-21.
7. RL Bronaugh., HIE Maibach. *Percutaneous absorption mechanism-metodology-drug delivery*. Marcel Dekker, New York, and Basel; 1989.
8. Saroha K, Yadav B, Sharma B. Transdermal patch, a discrete dosage form. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 2011.3(3):98-108.
9. Prabhakar D, Sreekanth J, Jayaveera KN. Transdermal drug delivery patch. A review. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 2013.3(4):213-21.
10. Ravichandran R. Nanoparticles in drug delivery; potential green nanobiomedicine application. *International Journal Green Nanotech. Biomed*. 2009.1(1):108-30.
11. Bhatia A, Shard P, Chopra D, Mishra T. Chitosan nanoparticles as carrier of immunorestoratory plant extract: synthesis, characterization and immunorestoratory efficacy. *International Journal of Drug Delivery*. 2011.3:381-5.
12. Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005.295:235-45.
13. Walve JR, Bakliwal SR, Rane BR, Pawar SP. Transfersomes: a surrogated carrier for transdermal drug delivery system. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. 2011.2(1).
14. Sari BL, Lusi AS, Lusi I, Jupersio. Penentuan kadar flavonoid ekstrak etanol 70% kulit bawang merah (*Allium cepa*. L) Dengan Metode Maserasi dan MAE (Microwave Assisted Extraction). *Jurnal Fitofarmaka*. 2017.7(2):15-22.
15. Quan PT, Han TV, Ha Nguyen H, De Nguyen X, Tuyen TN. Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. *Science and Technology Development*. 2006.9(8):69-75.

16. Farmakope Indonesia Edisi 4. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan; 1995.
17. Xu K, Liu B, Ma Y, Du J, Li G, Gao H, Ning Z. Physicochemical properties and antioxidant activities of luteolin-phospholipid complex. *Molecules*. 2009.14:3486-93.
18. Zaafarany GME, Awad GAS, Holayel SM, Mortada ND. Role of edge activators and surface charge in developing ultradeformable vesicles with enhanced skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010.397(1-2):164-72.
19. Prajapati TS, Patel CG, Patel CN. Transfersomes: a vesicular carrier system for transdermal drug delivery. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research*. 2011.1(2):507-24.
20. Maurya, Sho D, Shweta A, Vijay KT, Ram CD, Aklavya S, Ghansyam M. Enhanced transdermal delivery of idinavir sulfate via transfersomes. *Pharmacia Global International Journal of Comprehensive Pharmacy*; 2010.1(1):1-7.
21. Raffie ZSM, Jafari M, Alami K. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. 2011.21(4):738-45.
22. Guideline: Dynamic Light Scattering common terms defined Z-average size. Jakarta: Malvern. 2011.
23. Guideline: Dynamic light scattering common terms defined Z-average Size. Jakarta: Malvern. 2011.
24. Mohanraj VJ, Chen Y. 2006. Nanoparticles- a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2006.5(1): 561-73.
25. Zurcher R. Pengaruh variasi komposisi PEG-6000 dan waktu sonikasi terhadap karakteristik nano-fluida Fe_3SO_4 [skripsi]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara Medan; 2018.
26. Andreas E. Pengaruh metode ekstruksi dan sonikasi terhadap pengecilan ukuran liposom pada sediaan Gel yang Mengandung Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) [skripsi]. Fakultas Farmasi Universitas Indonesia Depok; 2014.
27. Kumavat SD, Chaudhary YS, Borole P, Duvvuri P, Bubera N. Transfersomes: a promising approach for transdermal drug delivery system. *Asia Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013.3(5):1-17.
28. Chaudhary H, Kohli K, Kumar V. Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013.454(1):367-80.
29. Anief M. Ilmu meracik obat dan praktek. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada Press; 2000.
30. Ansel C, Howard, Popovic JR, Loyd VA. Bentuk sediaan farmasetik dan sistem penghantaran obat edisi 9. Terj: Lucia Hendriati dan Kuncoro. Jakarta: EGC; 2013.

Phytochemical Investigation and Antibacterial Activity Ethanol Extract of Papaya Seeds (*Carica papaya* L.) Applied for Gel Product

(Tinjauan Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) diaplikasikan untuk Sediaan Gel)

WAHYUNING SETYANI*, JACINDA YAKUB, OCTAVIANUS YANDRI, VIOLA RESTI KAWAN, THERESIA JENNY HARYANTO, I MADE MYASA DARMIKA

Faculty of Pharmacy, Sanata Dharma University, Yogyakarta

Submitted: 29 September 2019, Accepted: 15 April 2020

Abstract: Papaya seeds has many benefits in medicine. One of the benefits that have been studied is it's antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. This study aims to determine the phytochemical compounds of papaya seed ethanol extract and their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* bacteria. The ethanol extract of papaya seeds was obtained through maceration method using 95% ethanol as a solvent. Maceration was carried out by weighing 85 g of simplicia powder, macerated using 500 mL of 95% ethanol then left for 4 days while stirring occasionally, then filtered to produce filtrate and residue. The remaining residue is then soaked again (remaserated) with 250 ml of 95% ethanol and left for 2 days. After 2 days, the sample is filtered to produce filtrate and residue. All filtrates were evaporated using a rotary evaporator to obtain a thick extract. Phytochemical screening results showed the presence of flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, and phenolic compounds in ethanol extracts of papaya seeds. The antibacterial activity test of papaya seed ethanol extracts towards *Staphylococcus aureus* was carried out through in vitro by disc diffusion method with several concentrations. Antibacterial test showed that concentrations of 2%, 4%, and 6% of papaya seeds ethanol extracts was moderate antibacterial activity and at concentrations of 8% and 10% the antibacterial activity was classified as strong against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Ethanol extract of papaya seeds (*Carica papaya* L.), *Staphylococcus aureus*.

Abstrak: Biji pepaya memiliki banyak manfaat dalam pengobatan. Salah satu manfaat yang telah dipelajari adalah aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa fitokimia dari ekstrak etanol biji pepaya dan aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak etanol biji pepaya diperoleh melalui metode maserasi menggunakan pelarut etanol 95%. Maserasi dilakukan dengan menimbang 85 g serbuk simplisia, dimaserasi menggunakan 500 mL etanol 95% kemudian dibiarkan selama 4 hari sambil diaduk sesekali, kemudian disaring untuk memperoleh filtrat dan residu. Sisa residu kemudian direndam kembali (diremaserasi) dengan 250 mL etanol 95% dan dibiarkan selama 2 hari. Setelah 2 hari, sampel disaring untuk memperoleh filtrat dan residu. Semua filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Skrining fitokimia menunjukkan adanya senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan fenolik pada ekstrak etanol biji pepaya. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pepaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi cakram pada beberapa konsentrasi. Pada konsentrasi 2%, 4%, dan 6% aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pepaya tergolong sedang dan pada konsentrasi 8% dan 10% aktivitas antibakterinya tergolong kuat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: Ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya* L.), *Staphylococcus aureus*.

*Correspondence author

E-mail: wahyuningsetyani@usd.ac.id

INTRODUCTION

PAPAYA (*Carica papaya* L.) is one of the plants originated from Central America and West Indies and even areas around Mexico and Costa Rica. Papaya is known by various names such as bal, betik, pisang pelo (Sumatra), gedang, katerla gantung, kates (Java), hango, kampaja, ketes (Nusa Tenggara). Papayas are widely planted, both in the tropics and subtropics, in wet and dry areas or in plains and mountains up to 1000 meters above sea level. Almost all parts of papaya plants can be used for various purposes⁽⁴⁾.

In some areas, papaya are used as traditional medicine such as intestinal worms, kidney stones, wound treatment, eczema (roots), antifever, abortivum, enlarged liver and spleen (seeds), hepatitis (flowers)⁽⁴⁾. As fresh fruit, papaya is consumed because of its good nutrition. The price is also relatively affordable compared to other fruits⁽⁸⁾. Papaya cultivation is increasing from year to year. Papaya cultivation is increasing in line with the amount of papaya seeds that are wasted.

Papaya seeds that become waste are still rarely used. In fact, papaya seeds are rich in benefits. Several studies have stated that papaya seeds have antibacterial benefits. The ethanol extract of ripe papaya seeds can be used to reduce the activity of *Staphylococcus aureus* with the highest inhibitory zone, which is 10 mm. In addition, research conducted by Torar *et al.*, states that at concentrations of 20%, 40%, 60%, and 80% ethanol extracts of papaya seeds have the activity of inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in the medium category⁽⁵⁾.

Papaya seeds extract (*Carica papaya* L.) extracted by maceration method using ethanol, chloroform, and benzene solvents contains secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, tannins, phenols and saponins⁽²⁾. The inhibition mechanism of each phytochemical compound is different, so it is expected that the inhibition result is wider. However, differences in varieties and conditions of papaya growth will affect the secondary metabolites produced. Therefore, this study will identify secondary metabolites of papaya seeds from the papaya plants cultivated in California varieties which can then be used for gel formulations to treat the bacterial infection of *Staphylococcus aureus*.

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS. Plant Materials. Wet papaya seeds (*Carica papaya* L.) was obtained from Pandowoharjo hamlet education tourism village, Yogyakarta, Central

Java, Indonesia.

Chemicals: All chemicals and solvents used were analytical grade. Sodium hydroxide 10%, ferric chloride, Mayer's reagent, Wagner's reagent, nutrient agar (Merck, Germany), and nutrient broth (Merck, Germany), micropipette (Pipetman Kit), autoclave, 10% DMSO, rotatory evaporator (buchi rotavator R-300) and nephelometer (poenix spec ref 440910).

METHODS. Phytochemical Screening Procedure (Qualitative). Test for flavonoids: Flavonoid test about 1 mL extract is added with a few drops of 10% NaOH. The appearance of orange shows the presence of flavonoids⁽³⁾.

Test for Tannins. The extract is boiled with 20 mL of water and then filtered. A few drops of FeCl₃ were added to the sample. Positive reaction if greenish-brown or black-blue color is formed which indicates tannin⁽⁷⁾.

Test for Saponin. The extract is boiled with 20 mL of water in a water bath. The filtrate is shaken and allowed to stand for 15 minutes. The formation of a stable foam showed positive samples containing saponins⁽³⁾.

Test for Alkaloids. Alkaloid test about 1 mL of extract was added 2 drops of Mayer's reagent solution. The appearance of formation of white or yellow lumpy deposits shows the presence of alkaloids⁽³⁾.

Test for Phenolic. The extract is diluted to 5 mL with distilled water. To that add a few drops of neutral 5% ferric chloride solution. The dark green color indicates the presence of phenolic compounds⁽⁵⁾.

Phytochemical Screening Procedure (Quantitative). TLC test of Flavonoid. Stationary phase: Silica Gel 60 F₂₅₄, mobile phase: hexane: ethyl acetate : formic acid (6:4:0,2), standard : Quercetin 10mg/1mL ethanol, detector : sitroborate.

TLC Test of Tannin. Stationary phase: Silica Gel 60 F₂₅₄, mobile phase: ethyl acetate: formic acid: toluene: aquadest (6:1,5:3:0,5), standard : tannin 10mg/1mL ethanol, detector : FeCl₃.

TLC Test of Phenolic. Stationary phase: Silica Gel 60 F₂₅₄, mobile phase: ethyl acetate: formic acid: toluene: aquadest (6:1.5:3:0.5), standard : gallic acid 10 mg/ 1mL ethanol, detector : FeCl₃.

TLC Test of Saponin. Stationary phase: Silica Gel 60 F₂₅₄, mobile phase: Chloroform: methanol: aquadest (64:50:1), standard: saponin 10mg/1mL ethanol, detector : Lieberman Burchard.






Antibacterial Activity Test. Testing the antibacterial activity of papaya seed ethanol extract to *S. aureus* was carried out using a 6 mm diameter paper disc. 0.1 mL culture of *S. aureus* in NB was added to 15 mL NA which was already solid. Ethanol extract

of papaya seeds as much as 20 µL was taken using micropipette on sterile paper discs with concentrations of 2%, 4%, 6%, 8% and 10% and then placed on NA media that had been inoculated with bacterial test. Incubation was carried out at 37 °C for 2 x 24 hours. The positive control used was 1% ampicillin disk while the negative control used was 10% Dimethyl sulfoxide. Observations were made on the formation of inhibitory zones around the paper disc⁽⁶⁾.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical screening of ethanol extract of papaya seeds showed the presence of flavonoids, alkaloids,

Table 1. Phytochemical screening results (qualitative).

Test	Observation	
	Visual	Result
Flavonoid		(+) Orange color
Alkaloid		(+) White lumpy deposits
Saponin		(+) Foam
Phenolic		(+) Dark green
Tannin		(+) Greenish brown

(+) = Proven To Contain Related Compounds

Table 2. Phytochemical screening results (quantitative) of flavonoid.

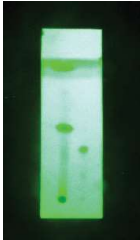

Observation	
Under UV (254 nm)	Under UV (254 nm)
	

Table 3. Phytochemical screening results (quantitative) of saponin.

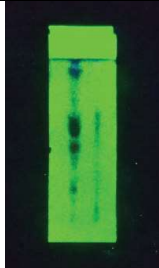

Observation	
Under UV (254 nm)	Under UV (254 nm)
	

Table 4. Saponin concentration (standard).

Saponin Concentration 50 mg/mL		
Standard	Level (mg/µL)	Abs
1	0.25	0.046
2	0.50	0.122
3	1.00	0.230
4	2.00	0.405

Table 5. Standard calibration of saponin.

Sample	Abs	Measured levels	Concentration (%)
1	0.498	2.4221	0.05
2	0.498	2.4221	0.05
3	0.498	2.4221	0.05

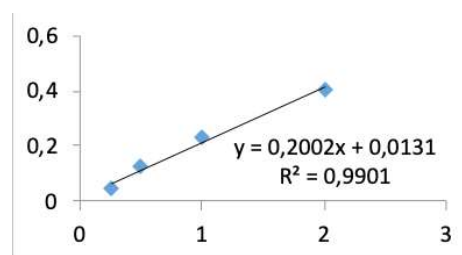


Figure 1. A standard curve of saponin.

Table 6. Phytochemical screening results (quantitative) of tannin.

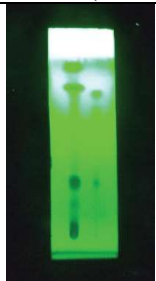

Observation	
Under UV (254 nm)	Under UV (254 nm)
	

Table 7. Phytochemical screening results (quantitative) of phenolic.

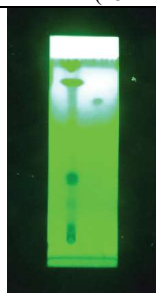

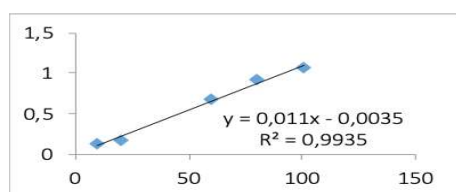
Observation	
Under UV (254 nm)	Under UV (254 nm)
	

Table 8. Phenolic concentration (standard).

Phenolic Concentration 10 mg/5mL		
Standard	Level (mg/ μ L)	Abs
1	1.001	0.123
2	2.002	0.179
3	6.006	0.682
4	8.008	0.914
5	10.01	1.065

Table 9. Standard calibration of phenolic.

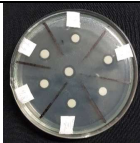
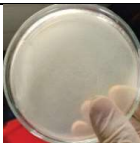

Sample	Abs	Measured levels	Concentration (%)
1	0.257	23.6818	2.30
2	0.257	23.6818	2.30
3	0.257	23.6818	2.30

**Figure 2. A standard curve of phenolic.**

saponins, tannins, and phenolic.

Phytochemical screening results showed that the ethanol extract of papaya seeds (*Carica papaya* L.) positively contained alkaloids, flavonoids, tannins, phenolic compounds and saponins. The results of phytochemical screening are in accordance with research conducted by Lohidas *et al.* which states that papaya seed ethanol extract contains secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, tannins, phenolic compounds and saponins. In addition, the results of phytochemical screening in this study are also in accordance with research conducted by Torar *et al.* which states that papaya seeds positive ethanol extract contains secondary metabolite compounds such as alkaloids, and flavonoids which are proven to have antibacterial activity.

Table 10. Antibacterial activity of papaya seed (*Carica papaya* L.) ethanol extract.

Picture (Documentation)	Inhibition Zone Average (mm)
	2% (7.67 mm) 4% (8.67 mm) 6% (9.33 mm) 8% (13.00 mm) 10% (16.50 mm)
	Ampicillin 1% (14 mm)
	DMSO 10% (0 mm) Bacterial growth according to McFarland II (6×10^8 CFU/mL) No Contamination

Antibacterial activity test of papaya seeds ethanol extract conducted by using the disc diffusion method. The concentration of ethanol extract of papaya seeds are 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% in order to know the increase in activity along with the increasing concentrations. In addition, the positive control used was ampicillin 1% which generally can be used to treat *Staphylococcus aureus* infection and the negative control was DMSO 10%. The results of the antibacterial activity test of papaya seed ethanol extract showed inhibition of the *Staphylococcus*

aureus bacteria which was shown by the irradiated inhibitory zone. The inhibition zone produced was classified as moderate at a concentration of 2%, 4%, and 6%, namely 7.67 mm; 8.67 mm; and 9.33 mm respectively, which were classified as strong at concentrations of 8% and 10%, which were 13 mm; and 16.5 mm. Positive control (Ampicillin 1%) was shown inhibition zone about 14 mm. Antibacterial activity test results in this study differed from previous studies, where previous studies stated that the ethanol extract of papaya seeds had moderate activity in inhibiting the activity of *Staphylococcus aureus*, the difference in these results can occur due to differences in the origin of papaya that is used so as to allow for differences in the amount of secondary metabolite content in the papaya.

The antibacterial activity of the extract comes from the content of phytochemical compounds. Flavonoids work by forming complex compounds with extracellular proteins that interfere with the integrity of the bacterial cell membrane⁽⁹⁾. Alkaloids function as antibacterial by disrupting the peptidoglycan constituent in bacterial cells, so that the cell wall layer is not formed intact and causes the death of these cells⁽⁹⁾. Saponins have soap-like properties which are strong surface active compounds, so they can reduce surface tension. Absorbing saponins on the cell surface will cause damage to cell membranes by increasing membrane permeability or cell leakage causing cell death due to loss of essential cell ingredients⁽⁹⁾. The antibacterial activity of tannins is based on their ability to shrink cell walls or cell membranes so that they interfere with bacterial cell permeability. Disruption of cell permeability results in cells not being able to carry out living activities so that their growth is stunted or even dies. Besides tannin also has antibacterial power by precipitating protein, because it has the same effect as phenolic⁽⁹⁾.

CONCLUSION

The phytochemical screening of papaya seeds ethanol extract, showed the presence of alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, and phenolic compounds. In addition, tested papaya seed ethanol extract has antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* which is classified as moderate at concentrations of 2%, 4%, and 6% and classified as strong at concentrations of 8% and 10%. The preliminary investigation and the antibacterial activity test of the papaya seed ethanol extract will be further help as basis for preparing of gel product formulation.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank to Research Institutions and Community Services of Sanata Dharma University.

REFERENCES

1. Davis, W.W., Stout, T.R., Disc plate method of microbiological antibiotic assay. II. Novel Procedure Offering Improved Accuracy. *Applied microbiology*. 1971. 22(4), p. 666–70.
2. Eke, O.N., Augustine, A.U., Ibrahim, H.F. Qualitative Analysis of phytochemicals and antibacterial screening of extracts of carica papaya fruits and seeds. *International Journal of Modern Chemistry*. 2014. 6(1), p. 48–56.
3. Ikalinus, R., Widyastuti, S., Luh, N., Setiasih, E. Skrining fitokimia ekstrak etanol kulit batang kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. 2015. 4(1), h. 71–9.
4. Kharisma, Y. Tinjauan pemanfaatan tanaman pepaya dalam kesehatan. *Universitas Islam Bandung*. 2017.1–14.
5. Lohidas, J., Manjusha, S., Jothi, G.G.G. Antimicrobial activities of *Carica papaya* L. *Plant Archives*. 2015. 15(2), p. 1179–86.
6. Muharni, Fitriya, Farida, S. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol tanaman obat suku Musi di kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2017.7(2), h. 127–35.
7. Patel, N., Meshram, D.B., Limited, G.B., Patel, P., Dhara, P. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Moringa oleifera*. *International Journal of Medicine and Pharmaceutical Sciences (IJMPS)*. 2014. 4(2), p. 27–34.
8. Setiaji, A. Efektifitas ekstrak daun pepaya *Carica papaya* L. untuk pencegahan dan pengobatan ikan lele dumbo *Clarias sp* yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilia*. *Institut Pertanian Bogor*. 2009.
9. Setyani, W., Setyowati, H., and Ayuningtyas, D. Pemanfaatan ekstrak terstandarisasi daun Som Jawa (*Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn) dalam sediaan krim antibakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 2016.13 (1), 48–9
10. Torar, G.M.J., Lolo, W.A., Citraningtyas, G. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2017.6(2), h. 14–22.

Uji Antidiare Granul dari Ekstrak Etanol Daun Kratom (*Mytragyna speciosa* Korth) Terhadap Mencit Putih Jantan (*Mus musculus* L)

(Granul Antidiare Test from Kratom Leaf Ethanol Extract (*Mytragyna speciosa* Korth) Again to Mice White Male (*Mus musculus* L))

SUHAIMI*, DIAN KARTIKASARI

Akademi Farmasi Yarsi Pontianak Jl. Panglima 'Aim No. 02 Pontianak Timur 78236 Kalimantan Barat

Diterima: 24 Oktober 2019, Disetujui: 27 Maret 2020

Abstrak: Tanaman obat Indonesia telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional (jamu), obat herbal terstandar ataupun fitofarmaka. Etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) memiliki aktivitas bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 5%. Granul ekstrak daun kratom. Ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) memiliki aktivitas terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus* L) sebagai antidiare dan mengetahui waktu yang digunakan untuk granul ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) dan dosis yang memberikan aktivitas terhadap mencit putih (*Mus musculus* L) sebagai antidiare. Sediaan granul ekstrak daun kratom di uji ke hewan mencit jantan putih dengan konsentrasi tanpa zat aktif (blanko) formula 1 sebagai kontrol negatif dan menggunakan zat aktif ekstrak daun kratom formula II menggunakan konsentrasi 0,4 %, Formula III konsentrasi 0,5 % dan formula IV dengan konsentrasi 0,6 % menggunakan loperamid HCL sebagai kontrol positif. Metode rancangan acak kelompok (*True Experimental Post Only Control Group*) waktu pengamatan 6 jam dengan variasi yang dilihat adalah organoleptis, konsistensi, frekuensi dan bobot feses. Granul ekstrak daun kratom 0,4 % memiliki aktivitas sebagai antidiare dengan waktu 330 menit.

Kata kunci: Ekstrak daun kratom, granul dan mencit putih jantan.

Abstract: Indonesian medicinal plants have been used as traditional medicine (herbal medicine), standardized herbal medicines or phytopharmaca. Kratom leaf ethanol (*Mitragyna speciosa* Korth) has *Escherichia coli* bacterial activity with a concentration of 5%. Kratom leaf extract granules. Ethanol extract of kratom leaf (*Mitragyna speciosa* Korth) has activity against male white mice (*Mus musculus* L) as antidiarrheal and know the time used for granules of kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) and the dosage which gives activity to white mice (*Mus musculus* L) as antidiarrheal and know the time used for granules of kratom leaf ethanol extract (*Mitragyna speciosa* Korth) and the dosage which gives activity to white mice (*Mus musculus* L) as antidiarrheal, Kratom leaf extract granule was tested to white male mice with a concentration without active substance (blank) formula 1 as a negative control and using active ingredient kratom leaf extract formula II using a concentration of 0.4%, Formula III concentration 0.5 % and formula IV with a concentration of 0.6% using loperamid HCL as a positive control Method of randomized block design (*True Experimental Post Only Control Group*) 6 hours of observation time with variations seen were organoleptic, consistency, frequency and stool weight. kratom 0.4% has antidiarrheal activity with a time of 330 minutes.

Keywords: Extracts of kratom leaves, granules and *Mus musculus* L.

*Penulis korespondensi
E-mail: emimo2041@gmail.com

PENDAHULUAN

INDONESIA memiliki hutan yang sangat luas dengan keanekaragaman jenis tumbuhan yang sangat tinggi, diantaranya 27.500 jenis tumbuhan berbunga, Dari seluruh jenis tumbuhan berbunga, 10% di dominasi oleh hutan hujan tropis basah. Keanekaragaman jenis yang sangat tinggi ini menyebabkan masih banyak jenis-jenis yang belum dimanfaatkan secara optimal akibat kurangnya informasi mengenai penyebaran jenis, manfaat dan potensi jenis tumbuhan tersebut⁽¹⁾.

Menurut jurnal penelitian oleh Anna H.⁽²⁾ mengatakan bahwa daun kratom mengandung senyawa kimia flavonoid, polifenol, alkaloid, tanin dan saponin. Penelitian sebelumnya oleh Rizka, 2016⁽³⁾ juga telah melakukan mengenai kandungan metabolit sekunder dari ekstrak etanol daun kratom yang tumbuh dikapuas hulu adalah alkaloid, flavonoid, fenol, terpenoid-steroid, saponin dan tannin.

Diare merupakan suatu gejala klinis dari gangguan saluran pencernaan yang ditandai dengan defekasi berulang-ulang disertai perubahan bentuk dan konsentrasi feses. Penyakit ini sering terjadi pada anak umur 6-12 tahun. Namun, dapat pula menyerang anak balita dan orang dewasa tergantung dari penyebabnya. Faktor yang dapat mengakibatkan diare antara lain alergi terhadap makanan dan minuman, gangguan gizi dan efek samping dari antibiotik. Diare yang paling sering terjadi adalah yang disebabkan oleh infeksi bakteri *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholera* dan *Clostridium perferingens*. *Escherichia coli* merupakan penyebab paling banyak dari infeksi saluran kecing dan juga menyebabkan diare, sepsis, dan meningitis (Jawetz et al., 2005). Berdasarkan penelitian Firlandi, 2017⁽⁴⁾ uji daya hambat ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* korth) terhadap pertumbuhan bakteri *escherichia coli* Ekstrak etanol daun kratom mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 5 % dengan diameter daya hambat sebesar 10,03 mm.

Berdasarkan sediaan yang digunakan sebagai antidiare yaitu granul mengingat bahwa granul lebih stabil jika disimpan dalam waktu jangka yang lama, meningkatkan aliran serbuk dengan jalan membentuknya menjadi aliran yang bulat-bulatan yang beraturan, kestabilan granul terhadap efek dari kelembapan udara karena luas permukaan granul yang lebih kecil dari pada serbuk, waktu mengosongkan dilambung tidak tergantung adanya makanan dilambung karena variasi absorbsinya rendah memiliki risiko yang rendah untuk terjadinya *dose dumping*, sifat alir baik. dan dalam hal tertentu relatif memiliki keuntungan dibandingkan bentuk sediaan lain. Pembuatan sediaan granul ekstrak etanol daun kratom menggunakan metode granulasi basah dengan menggunakan bahan aerosil dan avicel PH 101 sebagai bahan tambahan.

Granul tersebut diuji secara fisik dan kimia ke hewan yaitu mencit jantan putih (*Mus Musculus L*). Aerosil sebagai pengikat dan avicel PH 101 sebagai pengisi.

Berdasarkan uraian diatas maka disusun tujuan penelitian sebagai berikut :

Mengetahui granul ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) memiliki aktivitas terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus L*) sebagai anti diare dan mengetahui waktu yang digunakan untuk granul ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) dan dosis yang memberikan aktivitas terhadap mencit putih (*Mus musculus L*) sebagai anti diare.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Ekstrak etanol Daun kratom, etanol 96 %, mencit putih jantan (*Mus musculus L*), avicel PH 101, aerosil, aquadest, oleum racini dan loperamid HCL.

METODE. Desain penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium, *True Experimental Post Test Only Control Group Design*. lebih tepatnya rancangan penelitiannya adalah *post test with control group design*. Kelompok penelitian dibagi dengan konsentasi sediaan dan jenis objek penelitian yang diintervensikan pada mencit. Kemudian pengamatan dilakukan terhadap organoleptis, konsistensi, frekuensi dan bobot feses pada mencit putih jantan (*Mus musculus L*). Sampel penelitian ini adalah hewan coba mencit jantan putih (*Mus musculus L*) umur 2-3 bulan dan sehat.

Pembuatan Ekstrak Daun Kratom. Daun kratom yang diambil dilakukan sortasi basah, dibersihkan dari kotoran-kotoran yang menempel dengan cara mencucinya dengan air mengalir. Dilakukan perajangan terhadap daun kratom, selanjutnya dilakukan pengeringan menggunakan sinar matahari langsung. Dilakukan sortasi kering dan dihaluskan menjadi serbuk. Sebanyak 500 g serbuk dari daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) dimasukkan dalam bejana maserasi kemudian dituangi pelarut etanol 96 % hingga volumenya diatas permukaan serbuk hingga terendam 3-5 cm lalu ditutup dan dibiarkan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk. Selama 24 jam hasil maserasi disaring, ampas diperas sehingga diperoleh ekstrak cair (filtrat). Ekstrak cair dipekatkan menggunakan *Freeze Drying* hingga didapatkan ekstrak kering daun kratom.

Pelaksanaan Penelitian dengan Hewan.

1. Diadaptasikan selama 7 hari hanya diberi pakan standar) dan minum air dalam botol secara ad libitum.
2. Mencit *dipuasakan* dan dikelompokkan menjadi 4 dan diberikan *oleum ricini*.

Tabel 1. Kelompok perlakuan.

Kelompok	Perlakuan
Kontrol negatif(-)	Mencit diare dengan <i>oleum ricini</i> dan diberikan 0,20 ml suspensi loperamide HCL dosis 0,182/20 g BB mencit
Kontrol positif(+)	Mencit diare dengan <i>oleum racini</i>
Perlakuan 1 (P1)	Mencit diare dengan <i>oleum racini</i> diberi perlakuan granul tanpa ekstrak (blanko) mg/ 20 g BB mencit
Perlakuan 1 (P1)	Mencit diare dengan <i>oleum racini</i> diberi perlakuan granul ekstrak 0,4 % kratom mg/ 20 g BB mencit
Perlakuan 2 (P2)	Mencit diare dengan <i>oleum racini</i> diberi perlakuan granul ekstrak kratom dosis 0,5 % mg/ 20 g BB mencit
Perlakuan 3 (P3)	Mencit diare dengan <i>oleum racini</i> diberi perlakuan granul ekstrak 0,6 % kratom mg/ 20 g BB mencit

Adapun kelompok perlakuan hewan uji sebagai berikut :

3. Tiga puluh menit setelah pemberian *oleum ricini* (agar mencit diare) masing-masing kelompok diberi perlakuan sesuai. Kemudian granul dilarutkan dengan CMC yang telah dikembangkan kemudian dilarutkan dengan aquades hingga 100 ml menggunakan labu takar dengan konsentrasi 0,25, 0,5 dan 0,75. Semua perlakuan diberikan secara oral dengan sonde.
4. Pengamatan dilakukan selama 6 jam di amati setiap 30 menit meliputi mulai terjadinya diare, Organoleptis, konsistensi feses (berlendir/berair, lembek dan normal), frekuensi dan Bobot feses, lama terjadinya diare, waktu terjadinya feses normal dan total rentang waktu diare.

Cara Pengamatan Parameter Diare.

1. Diare ditandai dengan buang air besar dimana frekuensinya meningkat dari keadaan normal dan konsistensi feses yang lebih lembek atau cair.
2. Saat mulai terjadinya diare, caranya dengan mencatat waktu mula-mula terjadinya diare (dalam jam) setelah pemberian *oleum ricini*. Pengamatan dengan organoleptis dengan melihat menggunakan panca indera.
3. Konsistensi feses, caranya dengan melihat feses mencit apakah berdarah, berlendir/ berair, lembek dan normal.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini yang berjudul uji antidiare granul dari ekstrak etanol daun kratom (*mytragyna speciosa* korth) terhadap mencit putih jantan (*mus musculus* L). Pertama yang akan dilakukan dalam penelitian ini melakukan determinasi, pengolahan simplisia, pembuatan ekstrak, pembuatan granul di uji ke mencit putih jantan. Pada penelitian ini hewan uji dibuat menjadi diare dengan memberikan *oleum ricini* secara oral, alasan menggunakan *oleum ricini* tersebut karena minyak ini berkhasiat sebagai pencahar atau

laksansia. Minyak ini didalam usus halus mengalami hidrolisis dan menghasilkan asam risinoleat yang merangsang mukosa usus sehingga mempercepat gerakan peristaltik dan mengakibatkan pengeluaran isi usus dengan cepat. Diare merupakan suatu kondisi frekuensi defekasi melebihi frekuensi normal dengan konsistensi feses yang encer.

Hewan uji yang digunakan mencit putih jantan karena merupakan hewan mamalia yang secara biologis memiliki Faal tubuh yang hampir sama atau mirip dengan manusia, khususnya cara mengabsorpsi obat didalam tubuh. Selain itu hewan uji mencit ini lebih mudah penanganannya dan tidak memerlukan banyak tempat. Mencit yang digunakan yaitu mencit putih yang berkelamin jantan karena mencit jantan tidak mengalami siklus atau hormonal seperti yang dialami mencit betina sehingga diharapkan sampel maupun pembanding yang diberikan dapat bekerja dengan lebih baik tanpa pengaruh yang berarti dari hormon. Rute pemberian sampel granul ekstrak daun kratom dilakukan secara oral agar kondisi sama dengan pemberian loperamid HCL sebagai pembanding atau kontrol positif.

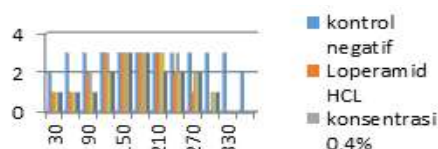
Determinasi Tanaman Daun Kratom. Pada penelitian ini yang berjudul uji aktivitas antidiare granul dari ekstrak etanol daun kratom (*mytragyna speciosa* korth) terhadap mencit putih jantan (*mus musculus* L). Determinasi tanaman terlebih dahulu, yang dilakukan oleh Febrianti (2016) di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Cibinong, Bogor. Hasil determinasi menunjukkan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kratom jenis *Mitragyna speciosa* (Korth.) dan suku *Rubiaceae*.

Penyiapan dan pembuatan simplisia. Penyiapan simplisia daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) diambil pada pagi hari sekitar jam 8-10 pagi, karena senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam daun kratom yaitu flavonoid merupakan golongan senyawa yang tidak tahan panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi. Tahap selanjutnya daun kratom dilakukan sortasi basah untuk memisahkan

daun kratom dari bahan asing atau bagian tanaman lain yang tidak digunakan, setelah melakukan sortasi basah selanjutnya dilakukan pencucian dengan air mengalir untuk membersihkan dari kotoran yang masih menempel pada daun kratom. Selanjutnya, daun kratom dilakukan pengeringan bahan baku dengan tujuan agar didapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dan mencegah agar simplisia tidak berjamur. Tahap selanjutnya yaitu melakukan sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan kotoran yang tertinggal pada simplisia kering dan diserbukkan agar proses ekstraksi lebih efektif. Tahap yang terakhir simplisia disimpan dalam wadah yang tertutup rapat untuk mencegah masuknya udara dan masuknya bakteri serta jamur yang akan menyebabkan simplisia menjadi lembab dan menjadi rusak. Berat simplisia kering yang diperoleh sekitar 600 g dan rasio pengeringan yang diperoleh sebesar 33 %. Perhitungan rasio pengeringan dapat dilihat pada lampiran

Ekstraksi. Setelah pembuatan simplisia selesai dilanjutkan dengan pembuatan ekstrak etanol daun kratom dengan menggunakan cara dingin yaitu metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Pelarut yang digunakan etanol 96% karena etanol merupakan pelarut yang selektif, sehingga dengan menggunakan etanol 96% diharapkan metabolit sekunder yang terdapat didalam simplisia sebagian besar terambil dan etanol juga tidak bersifat toksik. Metode maserasi dipilih karena untuk menghindari senyawa yang rusak pada suhu tinggi, relatif murah serta cara pengerjaan, peralatan yang digunakan lebih sederhana dan sesuai dengan sifat senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada daun kratom yaitu tidak tahan panas. Ekstraksi dilakukan selama 3x24 jam. Pelarut etanol dilakukan penyaringan dan diganti pelarutnya setiap 1x24 jam sebanyak 3 kali sambil sesekali diaduk. Pengadukan bertujuan agar pelarut mampu menarik senyawa yang terdapat pada simplisia merata. Penyaringan filtrat digunakan kertas saring agar tidak terjadi kontaminasi karena adanya etanol yang berdampak pada senyawa yang terkandung pada filtrat. Proses maserasi ini menghasilkan maserat yang berwarna hitam kehijauan. Setelah didapatkan filtrat hasil penyaringan simplisia dilanjutkan dengan proses pemekatan dengan menggunakan vakum *rotary evaporator* pada suhu 40 °C. Pengaturan suhu < 40 °C dilakukan untuk memperkecil resiko rusaknya senyawa aktif ekstrak yang tidak tahan terhadap pemanasan. Menurut Wijaya dkk (2018) rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal, semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan jumlah ekstrak yang diperoleh semakin banyak. Setelah didapatkan ekstrak kental daun kra-

tom dilanjutkan dengan proses metode *freeze drying*. Metode ini digunakan untuk mengeringkan ekstrak cair maupun ekstrak kental. Berat ekstrak kering yang diperoleh sebesar 71,29 g. Ekstrak kering daun kratom memiliki bentuk seperti serbuk, berwarna coklat dan berbau khas daun kratom. Selanjutnya ekstrak kering daun kratom diformulasikan menjadi sediaan granul dengan metode granulasi basah.



Gambar 1. Grafik pengamatan organoleptis feses granul ekstrak daun kratom terhadap mencit jantan putih.

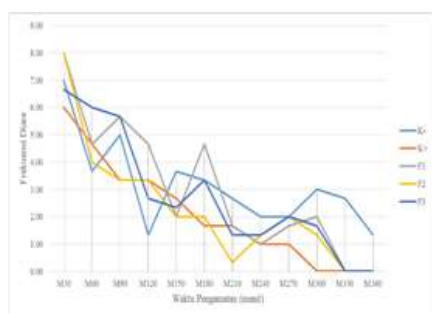
Pengamatan Organoleptis Feses Granul Ekstrak Daun Kratom Terhadap Mencit Jantan Putih. Adapun hasil Pengamatan Organoleptis feses granul ekstrak daun kratom terhadap mencit jantan putih. Dengan melihat menggunakan panca indera yaitu warna, bau dan bentuk feses

Grafik atas memperlihatkan bahwa setiap perlakuan memiliki organoleptis yang berbeda, untuk pemberian blanko (granul tanpa ekstrak) terhadap hewan uji yang kemudian diberikan *Oleum ricini* memiliki organoleptis feses yang berupa cair yang terus menerus selama pengamatan. Dibandingkan dengan loperamid HCL pergerakan berlawanan arah, untuk loperamid HCL pada menit ke-30 feses masih normal, namun pada menit ke-120 feses berubah berbentuk cair dan kembali normal kembali pada menit ke-240. hal ini disebabkan karena adanya daya proteksi terhadap *Oleum ricini*. sama halnya dengan (0,4 %), (0,5 %), dan (0,6 %) memiliki pergerakan yang menunjukkan bahwa sampel granul ekstrak daun kratom memiliki daya proteksi terhadap *Oleum ricini*.

Hasil Pengamatan Frekuensi Feses Granul Ekstrak Daun Kratom terhadap Mencit Jantan Putih. Pengamatan terhadap penurunan diare juga dapat dilihat dari persentase frekuensi terhadap penurunan diare dapat dilihat pada Gambar 2. Berdasarkan Tabel 2. dapat dilihat frekuensi rata-rata keluarnya feses untuk kontrol negatif terjadi dalam 30 menit sekali yaitu kontrol negatif mengalami diare, untuk loperamid HCL frekuensi rata-rata keluarnya feses sampai menit ke 270, kemudian untuk formula 1 0,4 %, formula 2 0,5%, formula 3 0,6% frekuensi rata-rata keluarnya feses sampai menit ke 300. hal ini menandakan bahwa Pada formula 0,4 dan 0,5 serta 0,6 % dapat memberikan aktivitas di menit ke 300.

Tabel 2. Hasil pengamatan frekuensi feses granul ekstrak daun kratom terhadap mencit jantan putih.

Kelompok pelakuan	Waktu (menit)											
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Kontrol negative	7 kali	3,6 kali	5 kali	1,3 kali	3,6 kali	3,3 kali	2,6 kali	2 kali	2 kali	3 kali	2,6 kali	1,3 kali
Loperamid HCL	6 kali	4,6 kali	3,3 kali	3,3 kali	2,6 kali	1,6 kali	1,6 kali	1 kali	1 kali	-	-	-
Formula 1 0,4 %	8 kali	4,6 kali	5,6 kali	4,6 kali	2 kali	4,6 kali	1,6 kali	1 kali	1,6 kali	1,3 kali	-	-
Formula 2 0,5 %	6,6 kali	6 kali	5,6 kali	2,6 kali	2,3 kali	3,3 kali	1,3 kali	2 kali	2 kali	1,6 kali	-	-
Formula 3 0,6 %	8 kali	4,6 kali	5,6 kali	4,6 kali	2 kali	4,6 kali	1,6 kali	1 kali	1,6 kali	1,3 kali	-	-

**Gambar 2. Grafik perbedaan rerata frekuensi diare.**

Hasil Pengamatan Konsistensi Feses Granul Ekstrak Daun Kratom Terhadap Mencit Jantan Putih. Selanjutnya pada menit ke 330 dan 360 tidak ada keluarnya feses, dengan membandingkan penurunan rata-rata keluarnya feses pada masing-masing perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa granul ekstrak daun kratom memiliki khasiat sebagai anti diare.

Pada Tabel 3. kontrol negatif yaitu blanko pada menit ke 30 konsistensi feses yang didapat adalah lembek cair yaitu dimana mencit sudah mengalami diare karena pada saat penelitian dilakukan habituasi selama satu minggu dan dipuaskan satu jam sebelum penyuntikan secara oral. Pengujian diare dimana mencit dibuat diare terlebih dengan begitu kita bisa melakukan pengujian antidiare nya, mencit dibiarkan 1 jam setelah diberikan sediaan oral, satu jam setelah dibiarkan semua mencit diberi 1,0 ml *oleum ricini* secara peroral respon diamati 1 jam setelah diinduksi *oleum ricini* diamati selang waktu 30 menit selama 6 jam. Pada menit ke 60, 90, 150, 270, 300, 330, 360 konsistensi feses yaitu cair, dikatakan cair yaitu mencit telah mengalami diare karena feses yang didapat tidak normal dan banyaknya kadar air dalam feses, kemudian pada menit 30, 120, 180, dan 240 konsistensi yang didapat ialah lembek cair yaitu dimana kondisi feses tidak normal karena feses cair dan lembek yang berarti telah terjadi diare dan untuk kontrol negatif itu sendiri

Tabel 3. Hasil pengamatan konsistensi feses granul ekstrak daun kratom terhadap mencit jantan putih.

Kelompok pelakuan	Waktu (menit)											
	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
Kontrol negative	LC	C	C	LC	C	LC	L	LC	C	C	C	C
loperamid	LC	LC	C	C	LC	C	C	LC	-	-	-	-
Formula 1 0,4 %	LC	C	LC	LC	C	C	LC	C	C	C	-	-
Formula 2 0,5 %	L	C	C	C	C	LC	LC	C	C	C	-	-
Formula 3 0,6 %	C	C	C	LC	C	C	LC	C	C	C	-	-

Keterangan : L = lembek; LC = lembek cair; C = cair

yaitu blanko tidak memiliki aktivitas sebagai antidiare. Selanjutnya pada kontrol positif yaitu loperamid HCL menit ke 90, 120, 180, dan 210 konsistensi yang didapat yaitu cair, kemudian pada menit ke 30, 60, 150 dan 240 konsistensi yang didapat yaitu lembek cair pada menit ini belum menunjukkan efektivitas kerja loperamid HCL yang baik, namun pada menit ke 270, 300, 330, dan 360 mencit sudah tidak mengeluarkan feses hal ini menunjukkan bahwa loperamid HCL memiliki aktivitas sebagai antidiare.

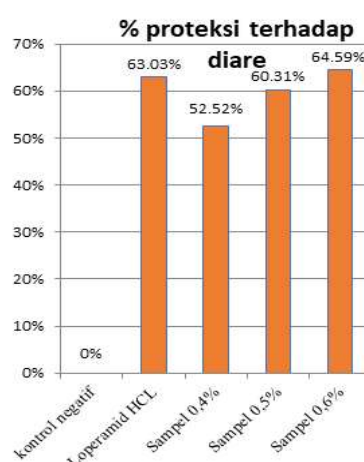
Kemudian untuk formula 1 0,4% pada menit ke 30, 90, 120, dan 210 konsistensi feses yang didapat yaitu lembek cair, selanjutnya pada menit ke 60, 150, 180, 240, 270, dan 300 konsistensi feses yang didapat yaitu cair hal ini menunjukkan bahwa mencit masih mengalami diare, Pada ekstrak 2 0,5% pada menit ke 30 konsistensi feses lembek yaitu kondisi feses sedikit tidak normal yang berarti telah menunjukkan terjadinya diare selanjutnya pada menit ke 180 dan 210 konsistensi yang didapat adalah lembek cair kemudian

pada menit ke 60, 90, 120, 150, 240, 270 dan 300 konsistensi yang didapat ialah cair. Pada formula 3 0,6 % pada menit ke 30, 60, 90, 150, 180, 240, 270 dan 300 konsistensi feses ialah cair selanjutnya pada menit ke 120 dan 210 konsistensi feses ialah lembek cair. Semakin cepat terbentuknya antidiare yang cair maka efek antidiare akan semakin lemah dan semakin cepat terjadi perubahan konsistensi ke arah normal artinya tidak lembek maka efek antidiare semakin kuat. Mencit yang mengalami diare ditandai dengan feses yang banyak mengandung cairan hingga lembek cair. Pada formula 1,2, dan 3 dengan konsentrasi 0,4, 0,5, dan 0,6 pada menit ke 330 dan 360 tidak adanya pengeluaran feses hal ini menunjukkan bahwa granul ekstrak daun kratom memiliki aktivitas antidiare setelah dibandingkan dengan Loperamid HCL. menurut tresiska 2008 serat pangan saat terjadi diare akan bertugas untuk menyerap air dalam usus dan terjadilengket sehingga membawa racun untuk di buang dalam bentuk feses. Rentang waktu diare ditentukan dari saat mulai terjadinya diare sampai terjadinya feses normal (feses tidak lembek dan cair) hal ini untuk mengetahui berapa lama diare terjadi setelah di induksikan oleh *oleum ricini* dan pemberian perlakuan semakin lama atau cepat efek diare pada mencit. Semakin ceap total rentang waktu diare yang dihasilkan maka semakin kuat efek antidiare. Pada perlakuan pemberian loperamid menunjukkan efek antidiare yang paling cepat karena sifat obat loperamid HCL bekerja langsung pada otot sirkuler dengan menurunkan prostaglandin, aktivitas otot sirkuler secara serentan diturunkan dengan mengaktifasi reseptor pada usus halus dari usus besar dan meningkatkan kontraksi dari segmen sehingga lintas usus dapat diperlambat dari waktu untuk absorpsi air yang lebih banyak (Tan Raharja, 2002) waktu paruh loperamid HCL sebagai obat diare yaitu 7–14 jam. Dalam terjadinya diare, usus banyak kehilangan banyak elektrolit sehingga air yang berada pada tidak mampu terserap oleh usus dan tidak bisa digunakan untuk memadatkan feses. Meskipun loperamid memiliki efek konstipasi dengan memperlambat motilitas saluran cerna melalui otot sirkuler serta akibat interaksi dengan reseptor opioid pada usus loperamid meperlama waktu transit usus yang laju pada aliran pada usus hingga menuju kolon serta meormalkan keseimbangan absorpsi cairan dan seksresi pada membran mukosa usus (Tjay dan Rahardja, 2007).

Hasil Pengamatan Proteksi Feses Granul Ekstrak Daun Kratom Terhadap Mencit Jantan Putih. Pengamatan terhadap penurunan diare juga dapat dilihat dari persentase proteksi terhadap penurunan diare. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan data yang diperoleh, persentasi daya proteksi dapat dilihat bahwa dari setiap sampel memiliki daya proteksi yang berbeda. Untuk sampel granul daun kratom memiliki daya proteksi terhadap *Oleum Ricini* yang tampak dengan peningkatan dari

setiap persen. Semakin tinggi konsentrasi granul daun kratom maka semakin besar juga daya proteksi terhadap diare. Dengan kata lain konsentrasi granul daun kratom berbanding lurus dengan proteksi terhadap diare. Perbedaan dari setiap perlakuan menunjukkan adanya daya proteksi yang berbeda. Pada grafik menunjukkan bahwa daya proteksi diare yang paling besar ditunjukkan oleh granul ekstrak daun kratom dengan konsentrasi 0,6% sebanyak 64,59%, yang kedua ditunjukkan oleh granul ekstrak daun kratom konsentrasi 0,5% sebanyak 60,31%, dan yang paling rendah ditunjukkan oleh granul ekstrak daun kratom konsentrasi 0,4% sebanyak 54,54%. Pada konsentrasi 0,4% dikatakan baik karena konsentrasi kecil sudah memberikan efek antidiare.



Gambar 3. Grafik persentase proteksi terhadap diare antar kelompok perlakuan.

Hasil Pengamatan Bobot Feses Granul Ekstrak Daun Kratom Terhadap Mencit Jantan Putih. Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan antidiare terhadap bobot feses granul ekstrak kratom terhadap mencit jantan putih dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Perbedaan rerata bobot feses setelah *treatment*.

Subjek	Setelah <i>treatment</i>	Bobot feses		Rerata tiap kelompok	SD	Nilai P
		3 Jam <i>follow up</i>	6 Jam <i>follow up</i>			
K-	0,92	0,19	0,11	0,26	0,25	0,01
K+	0,64	0,03	0,00	0,10	0,18	0,00
F1	0,59	0,06	0,00	0,11	0,17	0,00
F2	0,61	0,05	0,00	0,10	0,17	0,00
F3	0,57	0,04	0,00	0,09	0,16	0,00

Ket: Distribusi data tidak normal. P value (Shapiro-Wilk) < 0,05

Nilai P (Friedman Test) < 0,05, artinya signifikan

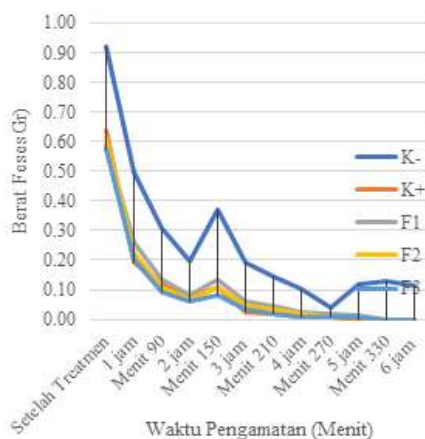
Ket:

K- = kontrol negatif (blanko)

K+ = Loperamid HCL 1 g

F1 = Granul menggunakan zat aktif dengan konsentrasi 0,4%

F2 = Granul menggunakan zat aktif dengan konsentrasi 0,5%
 F3 = Granul menggunakan zat aktif dengan konsentrasi 0,6%



Gambar 4. Hasil pengamatan bobot feces granul ekstrak daun kratom terhadap mencit jantan putih.

Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan bobot feces setelah Treatment menggunakan waktu 3 jam dan 6 jam dikarenakan data dari menit ke menit ketika di anova setelah treatment tidak ada perbedaan bermakna atau tidak lebih dari $< 0,05$. Pada kontrol (-) negatif di waktu 3 jam 0,19 dan waktu 6 jam 0,11 nilai P 0,01 mengalami penurunan bobot feces artinya bobot feces berkurang. Artinya pada konsentrasi granul ekstrak daun kratom dengan konsentrasi 0,4 % sudah dapat menghambat terjadinya diare pada hewan uji. Adanya penurunan diare menandakan di dalam granul ekstrak daun kratom terdapat senyawa yang berpotensi menurunkan frekuensi keluarnya feces senyawa yang terkandung di dalam ekstrak kering daun kratom adalah flavonoid, terpenoid, alkaloid, saponin dan tanin.

Dapat dilihat pada kontrol negatif yaitu hewan uji di induksi dengan oleum ricini dan diberi sediaan CMC 1 % secara oral, terlihat aktivitas *Oleum ricini* di mulai dari menit-30 pada waktu tersebut. Hewan uji banyak mengeluarkan feces pada menit ke-60 dengan bobot feces rata-rata 0,926 g. Pada kontrol positif yaitu suspensi Loperamid HCL di berikan secara oral terjadi diare yang bobot tidak terlalu jauh. tidak mengeluarkan feces pada menit ke 300. Tidak jauh berbeda dengan kontrol negatif hal ini disebabkan karena salah satu hewan uji dari 3 menit memiliki kondisi fisik yang kurang baik ketika di puasakan dan diberi perlakuan hewan tersebut banyak mengkonsumsi air sehingga menyebabkan pada menit ke-60 salah satu dari hewan uji dari kontrol positif lebih banyak mengeluarkan cairan dibandingkan dengan feces. Pada gambar tersebut kontrol positif pada menit ke 60 belum menunjukkan efektifitas kerja loperamid yang baik, disebabkan tidak diserap dengan baik melalui

pemberian oral dan penetrasi ke dalam otak. Ketika pada menit ke 240 dengan penurunan bobot feces dan konsistensi yang keluar dengan rata-rata 0,01 gram terlihat aktivitas loperamid HCL yaitu dengan penurunan bobot feces karena aktivitas dari loperamid HCL yang dapat bekerja di dalam tubuh hewan uji mengeluarkan feces yang normal hingga sampai menit ke 270 kadar puncak loperamid pada menit ke 270 pada waktu 330 menit kadar puncak loperamid didalam plasma di capai pada waktu 270 menit sesudah minum obat loperamid. Masa kerja lama ini di sebabkan oleh penghambatan motilitas saluran cerna dan karena obat mengalami sirkulasi enterohepatik. Loperamid memperlambat motilitas saluran cerna dengan mempengaruhi otot dan longitudinalis usus.

Dengan membandingkan penurunan frekuensi rata-rata keluarnya feces pada masing – masing perlakuan maka dikatakan bahwa adanya khasiat antidiare pada granul ekstrak daun kratom pada konsentrasi 0,4 % memiliki persen penurunan bobot feces paling baik karena dengan konsentrasi kecil dibandingkan 0,5 % rata-rata bobot feces di menit 300 0,01 gram dan 0,6 % pada menit ke 300 rata-rata bobot feces 0,006 gram. Untuk menghindari efek samping yang kecil disimpulkan pada granul ekstrak daun kratom pada konsentrasi 0,4 % dengan bobot feces rata-rata 0,02 % dan menunjukkan semakin tinggi konsentrasi zat aktif yaitu ekstrak kering daun kratom maka semakin sedikit feces yang dikeluarkan mendekati kontrol positif konsentrasi menunjukkan pada 0,4 % zat aktif pada sediaan granul ekstrak daun kratom menunjukkan aktivitas daya hambat diare yang lebih baik. Kenaikan bobot feces yang sangat sering terjadi pada waktu tertentu diakibatkan karena kondisi hewan uji yang mengalami diare.

Analisis untuk penurunan bobot feces terhadap masing-masing perlakuan dimulai dengan menguji data sampel dengan one way tarap kepercayaan 95 % dengan uji non parametrik dengan menggunakan uji *fredmen test* sampel terdistribusi perolehan terdistribusi normal kemudiandilanjutkan dengan uji ANOVA 19 satu arah untuk mengetahui perbedaan daya sediaan granul ekstrak daun kratom antara kelompok perlakuan dan pengaruh terhadap sediaan uji menunjukkan nilai F lebih kecil diantara kelompok perlakuan mempunyai perbedaan bermakna.

Berdasarkan data tersebut dapat dilihat bahwa bahwa organoleptis, daya proteksi, konsistensi dan bobot feces granul ekstrak daun kratom jika dibandingkan kontrol negatif menunjukkan perbedaan bermakna antara yang satu dengan yang lainnya. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa granul ekstrak daun kratom memiliki khasiat sebagai antidiare. Dapat dilihat pada granul ekstrak daun kratom pada konsentrasi 0,4 % yang tidak berbeda nyata dengan aktivitas loperamid HCL, sehingga dapat dikatakan granul ekstrak daun kratom pada konsentrasi 0,4% dan pada waktu 330 menit adalah konsentrasi dan

waktu yang baik untuk menghambat terjadinya diare dengan waktu pengujian selama 6 jam.

SIMPULAN

Granul ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) 4% memiliki aktivitas antidiare terhadap mencit putih jantan (*Mus musculus L*). Waktu pengujian yang digunakan untuk granul ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) yang memberikan aktivitas terhadap mencit putih (*Mus musculus L*) sebagai antidiare pada waktu 330 menit.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih peneliti kepada Akademi Farmasi Yarsi Pontianak dan dana Hibah dari RISTEKDIKTI tahun 2018 dan tim penelitian dosen fomula (PDP).

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenhut. ForPro. Majalah Ilmiah Populer Bidang Keteknikan Kehutanan dan Pengolahan Hasil Hutan, Vol.2, No.1, Edisi Juni 2013, ISSN:2301-8682. Pengembangan Produk HHBK Berbasis Tanaman Hutan. BPPK: Bogor, 2013. h. 24-5
2. Anna, H. Uji efek sedatif ekstrak N-Heksan dari daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth.) pada mencit jantan galur Balb/c. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjung Pura. Pontianak. 2013.
3. Febriani Rizka L. Penetapan parameter standar simplisia dan ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) yang tumbuh di kabupaten Kapuas Hulu dan kabupaten Melawi, Pontianak. Jurnal Insan Farmasi Indonesia Jilid I ISSN 2621-4032. Akademi Farmasi Yarsi.2018.
4. Firlandi. Uji daya hambat ekstrak etanol daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia Coli*. Karya Tulis Ilmiah. Pontianak, Akademi Farmasi Yarsi. 2017
5. Jawetz, Melnick., Adelberg. *Mikrobiologi Kedokteran* Edisi 23. Jakarta. E 2008
6. Seirots. *Mitragyna speciosa* Kratom Botany. <https://kratom.net/forum/articles/>. (Di akses senin, 2009. 21 November pukul 11.00 WIB)
7. Tjay, T. H., dan Rahardja, K. Obat-obat penting khasiat, penggunaan, dan efek-efek sampingnya. edisi ke VI. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo. 2007.h 312–13.
8. Malole, M.B.M. and Pramono, C.S.U. Pengantar hewan-hewan percobaan di laboratorium, Bogor : Pusat Antara Universitas Bioteknologi IPB. 1989.h 37.
9. Nurhlimah hanny, Wijayanti novita, Widyarningsoh td. Uji antidiare ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L) terhadap mencit jantan yang bakteri *Salmonella typhimurium*. Jurusan Teknologi Hasil pertanian FTP. Universitas Brawijaya Malang 2015.
10. Anas yancy, Hidayati devi nisa, dkk. Aktivitas antidiare ekstrak etanol daun nangka (*Artocarpus Heterophyllus Lam*) dan Daun Angsana (*Pterocarpus indicus Wild*) pada mencit jantan galur Wistar BABC. Program Studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang. 2016.
11. Nugraha indri Widia, Robyanto, Luliana sri. Aktivitas antinoseptif fraksi daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) pada mencit jantan Swiss. Fakultas Farmasi Universitas Tanjung Pura. 2018
12. Novindriana dini. Uji efek sedatif ekstrak etanolik daun kratom (*Mitragyna speciosa* Korth) Fakultas Kedokteran Universitas Tanjung Pura. 2013
13. Lachman, Lieberman, kanig. Teori dan praktek farmasi 2, edisi III, Penerjemah Siti Suyatmi. Jakarta: Universitas Indonesia Press. 1994-10, 1531
14. Kibbe, A.,H. Handbook of pharmaceutical excipients, Third, Edition, 442, Pharmaceutical press, UK. 2004
15. Depkes R.I. Farmakope Indonesia. Edisi III. Departemen kesehatan Republik Indonesia. 1979.
16. Nurhalimah hanny, Wijayanti novita. Efek antidiare ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap mencit jantan yang diinduksi bakteri *Salmonella Thypimurium*. 2015.

Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Sabrang (*Eleutherine americana*) Terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*

(Antibacterial Ability of Ethanol Extract Sabrang Onion (*Eleutherine americana*) on *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis*)

RIZQY DIMAS MONICA^{1*}, ACHADIYANI¹, ASTRID F. KHAIRANI¹, MICHAEL V.L TUMBOL²

¹Masters of Basic Medical Sciences, Padjadjaran University, Jl. Eyckman No. 38 Bandung, West Java

²Department of Medical Laboratory Engineering, Poltekkes Kemenkes Manado, Jl. R.W Mongisidi, Manado, North Sulawesi

Diterima: 1 Agustus 2018, Disetujui: 25 Maret 2020

Abstrak: Bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* merupakan bakteri gram negatif dalam famili *Enterobacteriaceae* penyebab gastroenteritis. Bawang sabrang (*Eleutherine americana*) adalah family *Iridaceae*, mengandung flavonoid, alkaloid dan saponin. Tujuan penelitian mengetahui daya antibakteri dan waktu kontak dari ekstrak etanol bawang sabrang terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Metode penelitian eksperimental laboratorium. Daya antibakteri bawang sabrang diukur dengan metode modifikasi difusi agar, sedangkan waktu kontak diukur berdasarkan nilai konsentrasi bunuh minimal *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Data penelitian dianalisis dengan *One way ANOVA*. Hasil penelitian ekstrak etanol bawang sabrang mempunyai daya antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*, terdapat korelasi antara konsentrasi ekstrak bawang sabrang terhadap diameter zona hambat. Waktu kontak terhadap *Shigella dysenteriae* menunjukkan ekstrak etanol bawang sabrang pada konsentrasi bunuh minimal dengan waktu kontak 8 jam mempunyai efek bakterisidal dengan hasil laju penurunan jumlah bakteri 1000 kali terhadap inokulum awal. Efek bakterisidal terhadap *Salmonella enteritidis* menunjukkan ekstrak etanol bawang sabrang pada konsentrasi bunuh minimal dengan waktu kontak 5 dan 10 menit. Ekstrak etanol bawang sabrang memiliki daya antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Terdapat perbedaan efek antibakteri ekstrak etanol bawang sabrang terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* pada waktu kontak yang sama dengan konsentrasi bunuh minimal yang berbeda.

Kata Kunci: Bawang sabrang (*Eleutherine americana*), daya antibakteri, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, waktu kontak

Abstract: The bacteria *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis* are gram-negative bacteria in the family *Enterobacteriaceae* that cause gastroenteritis. Sabrang onion (*Eleutherine americana*) is a family *Iridaceae*, containing flavonoids, alkaloids and saponins. The aims of this study was to determine the antibacterial ability and contact time of ethanol extracts sabrang onion on *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis*. Research methods of Laboratory experimental. The antibacterial ability of sabrang onions was measured by the agar diffusion modification method and contact time was measured based on the minimum kill concentration values of *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis*. Research data analyzed with *One way ANOVA*. The results of ethanol extract of Sabrang onion have antibacterial ability against *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis*, there is a correlation between the concentration of Sabrang onion extract on inhibition zone diameter. The contact time for *Shigella dysenteriae* showed ethanol extract of Sabrang on minimal kill concentration with an 8 hour contact time had a bactericidal effect with the result of a decrease in the number of bacteria 1000 times on the initial inoculum. The bactericidal effect on *Salmonella enteritidis* shows ethanol extract of Sabrang onions at a minimum kill concentration with contact time of 5 and 10 minutes. Ethanol extract of Sabrang onion has antibacterial ability against *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis*. There are differences in the antibacterial effects of ethanol extracts of Sabrang onions against *Shigella dysenteriae* and *Salmonella enteritidis* at the same contact time with different minimum kill concentration.

Keywords: Onion sabrang (*Eleutherine americana*), antibacterial ability, *Salmonella enteritidis*, *Shigella dysenteriae*, contact time

*Penulis korespondensi

E-mail: monicarizqydimas@yahoo.com

PENDAHULUAN

SHIGELLA adalah penyebab utama terjadi penyakit infeksi saluran pencernaan yaitu *shigellosis* atau disentri basiler yang ditandai dengan nyeri perut hebat, diare akut yang sering dengan volume tinja sedikit disertai dengan adanya lendir, darah dan nanah⁽¹⁾. Gejala akut *shigellosis* meliputi tenesmus, sepsis, perforasi usus, megacolon beracun, dehidrasi, hiponatremia, ensefalopati, sindrom uremik hemolitik dan pneumonia⁽²⁾.

Penyakit ini terjadi pada anak umur 1-10 tahun dengan penderita mengalami diare yang hebat hingga 20-30 kali sehari yang mengakibatkan terjadinya dehidrasi sampai terjadinya kematian⁽³⁾. Setiap tahun, diperkirakan ada sekitar 165 juta kasus diare yang disebabkan oleh bakteri *Shigella*, dan 100 juta di antaranya terjadi di negara berkembang⁽⁴⁾. Diperkirakan dari sekitar 140 juta kasus *shigellosis* pada anak dengan usia di bawah 5 tahun di dunia setiap tahunnya, sekitar 600.000 diantaranya meninggal dunia⁽⁵⁾.

Shigella dysenteriae merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang pendek atau basil tunggal, tidak berspora, tidak berflagel dan bersifat aerob, peptidoglikan tipis, membran terdapat didalam⁽⁶⁾. Bakteri ini menghasilkan eksotoksin yaitu racun yang menyebabkan kerusakan pada *host* dengan menghancurkan sel-sel atau mengganggu metabolisme sel yang normal dengan mempengaruhi usus halus, sehingga menyebabkan masuknya cairan secara berlebihan ke dalam rongga usus sehingga menyebabkan diare dan muntah-muntah. Eksotoksin ini mempunyai sifat neurotoksik sehingga anak-anak yang terjangkiti *shigellosis* dapat menderita konvulsi^(7,8).

Salmonella enteritidis merupakan salah satu bakteri genus *Salmonella* dari family *Enterobacteriaceae*⁽⁹⁾, bersifat gram negatif, berbentuk batang dan tidak berspora dengan flagella peritrikus, bersifat fakultatif anaerobik, katalase positif, oksidase negatif, mampu memfermentasi karbohidrat dengan menghasilkan asam dan gas serta dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Habitat utamanya berada dalam saluran pencernaan hewan ternak dan manusia. *Salmonella enteritidis* ditemukan pada spesies unggas dan dengan mudah dapat ditularkan ke manusia melalui telur atau daging ayam yang terkontaminasi. Infeksi bakteri ini pada hewan atau manusia dapat mengakibatkan penyakit dengan gangguan pada bagian saluran pencernaan atau gastroenteritis⁽¹⁰⁾.

Salmonellosis sering dilaporkan akibat mengkonsumsi makanan yang mengandung telur

mentah. Makanan mengandung telur yang dimasak kurang sempurna dapat bertindak sebagai sumber penularan *Salmonella enteritidis*⁽¹¹⁾. Prevalensi terinfeksi *Salmonella enteritidis* diseluruh dunia masih rendah namun infeksi *Salmonella enteritidis* dapat menyebabkan kejadian luar biasa karena infeksi ini ditularkan melalui produk yang berasal dari unggas^(12,13).

Penggunaan antibiotik spektrum luas dalam penanganan infeksi bakteri telah mengakibatkan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik tertentu. Survei di beberapa provinsi di Indonesia tahun 2010, menunjukkan *Shigella dysenteriae* masih sensitif terhadap siprofloksasin, fluorokuinolon dan resistensi terhadap antibiotik ampisilin 90%, khloramfenikol 83%⁽¹⁴⁾. Resistensi *Shigella dysenteriae* di India terhadap trimetoprim 64,3%, kanamisin 21,4%⁽¹⁵⁾.

Akibat resistensi bakteri terhadap beberapa antibiotik, maka pencarian senyawa aktif sebagai zat antimikroba yang berasal dari tumbuhan sangat diperlukan untuk alternatif pemecahan masalah resistensi. Obat tradisional menjadi alternatif karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dari pada antibiotik yang menyebabkan resistensi^(16,17). Sebagian tanaman obat merupakan sumber zat antimikroba yang kaya dan umumnya menghasilkan banyak metabolit sekunder yang merupakan sumber obat-obatan farmasi⁽¹⁸⁾. Tanaman masih menjadi sumber utama obat farmaseutikal dan agen yang digunakan dalam pengobatan tradisional^(19,20).

Bawang sabrang merupakan tanaman khas Provinsi Kalimantan Barat ini turun temurun dipergunakan masyarakat sebagai tanaman obat dan tumbuh subur di perkebunan dan pegunungan. Tanaman ini memiliki adaptasi yang baik dapat tumbuh dalam berbagai tipe iklim dan jenis tanah juga dapat diperbanyak dan dipanen dalam waktu yang singkat, sehingga dapat dengan mudah dikembangkan dalam skala industri^(21,22).

Potensi bawang sabrang mengandung senyawa aktif alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, dan tannin. Senyawa aktif saponin dan golongan tanin pada bawang sabrang diketahui memiliki sifat antibakteri. Beberapa penelitian menginformasikan bahwa bawang sabrang memiliki efek farmakologis sebagai antikanker, antioksidan, menurunkan tekanan darah, menurunkan kadar kolesterol dalam darah, antipiretik, anti inflamasi, anti bakteri, antiparasit dan antijamur⁽²³⁾. Flavonoid, saponin, alkaloid pada bawang sabrang merupakan zat aktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara *in vitro* antara lain *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

Stearothermophilus, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*⁽²³⁾.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui daya antibakteri ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana*) terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* dan pengaruh waktu kontak terhadap pertumbuhan bakteri.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan Penelitian adalah bawang sabrang diambil dari kebun yang tumbuh secara liar di daerah Arjasari. Tiap 1 siung bawang sabrang mempunyai panjang sekitar 2,8-4,3 cm dengan berat 0,65-1,3 gram (rata-rata 1 gram), dihaluskan dengan blender sampai berbentuk hancur, kemudian di ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Dosis yang diberikan 1 mg⁽¹²⁾.

Media dan Reagensia adalah Media cair Muller-Hinton, Media agar Muller-Hinton, Aquades, NaCl 0,9 %. Bakteri uji yang di gunakan adalah *Shigella dysenteriae* ATCC 12022 dan *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 yang diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Institut Teknologi Bandung.

Alat. Alat penelitian adalah cawan petri, inkubator, tabung reaksi, autoklaf, nefelometer standar Mc farland 0,5, labu Erlenmeyer 25 ml, 50 ml dan 250 ml, gelas ukur 10 ml, 50 ml, pipet mikro 100 µl, 250 µl, dan 1000 µl, alat suntik sekali pakai ukuran 1 cc, timbangan analitik, gelas ukur, tabung reaksi, ose ukuran 0,01 ml (10 µl), sarung tangan, spidol, kertas label, kaliper untuk mengukur diameter zona hambat.

METODE. Metode penelitian ini adalah eksperimen laboratorium dimana pada penelitian ini dilakukan uji daya antibakteri ekstrak bawang sabrang (*Eleutherine americana Merr*) terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* melalui pengamatan besarnya zona hambat, kadar bunuh minimal (KBM) dan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* pada agar Mueller-Hinton.

Prosedur Penelitian Pembuatan Ekstrak Etanol Bawang Sabrang (*Eleutherine americana Merr*). Bahan yang digunakan untuk pembuatan ekstrak adalah 3 kg bawang sabrang yang didapat dari pegunungan Arjasari lalu dihaluskan dengan menggunakan alat penghalus sampai berbentuk serbuk. Kemudian direndam dengan etanol 95% dalam suatu tempat yang disebut maserator selama 24 jam. Setelah di rendam selama 24 jam kran percolator dibuka dan ditampung cairan perkolatnya, proses maserasi dilakukan 3 kali (3x24 jam). Semua cairan perkolat di campur, kemudian dilakukan

proses penguapan zat pelarut (etanol 95 %) dengan menggunakan alat rotary evaporator dan dilakukan proses penguapan pengeringan yang menggunakan prinsip destilasi (pemisahan) dengan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Ekstrak berbentuk pasta yang diperoleh dimasukan dalam botol yang tertutup kemudian di simpan dalam lemari es (10-15°C) sebelum digunakan untuk penelitian.

Pemeriksaan Sterilitas Ekstrak Etanol Bawang Sabrang. Ekstrak tumbuhan yang digunakan untuk pengujian daya antibakteri harus steril. Sebanyak 2 tabung yang berisi 1 ml media cair Mueller Hinton steril dan diberi kode A dan B. Pada tabung A masukan 1 gram ekstrak etanol bawang sabrang, sedangkan pada tabung B hanya berisi media cair Mueller Hinton sebagai kontrol negatif, diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Setelah itu inokulasikan kembali masing-masing tabung pada media agar Mueller-Hinton, diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Amati adanya pertumbuhan koloni bakteri.

Persiapan Bakteri Uji. Bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* dikultur pada masing-masing 2 lempeng agar Mueller-Hinton. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Koloni yang tumbuh digunakan untuk pembuatan suspensi bakteri uji.

Pembuatan Suspensi Bakteri untuk Uji Daya Antibakteri, Nilai KBM dan Waktu kontak. Koloni *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* disuspensikan dengan 5,0 ml medium cair Mueller-Hinton dengan kekeruhan 0,5 MacFarland yang setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml, suspensi ini digunakan sebagai suspensi primer. Suspensi bakteri yang akan digunakan sebagai inokulum untuk uji daya hambat adalah 1 ml suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Suspensi bakteri yang akan digunakan sebagai inokulum untuk uji nilai KBM dan waktu kontak adalah 1×10^6 CFU/ml, terhadap jumlah volume pengujian yang diambil dari suspensi primer.

Penentuan Daya Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Sabrang dengan Metode Modifikasi Difusi Agar. Dibuat serial pengenceran dari ekstrak bawang sabrang dengan 8 konsentrasi yang berbeda yaitu 1%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 75% dan 100% dengan menggunakan media mueller-Hinton cair sebagai larutan pengencer. Pada cawan petri, masukkan 1 ml suspensi bakteri uji $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (0,5 Mc Farland) dan 30 ml agar Mueller-Hinton pada suhu 37°C selagi masih cair, campurkan suspensi bakteri dan agar Mueller - Hinton tersebut dengan cara menggoyang-goyangkan di atas permukaan yang rata hingga campuran homogen dan biarkan hingga mengeras. Tiap satu lempeng media agar Mueller - Hinton dibuat 3 sampai 4 sumur dengan kedalaman masing masing

sumur 5 mm dan diameter 8 mm. Sumur-sumur tersebut diisi dengan ekstrak bawang sabrang dari 8 serial konsentrasi, dengan volume masing-masing 250 µl. Kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Diamati dan diukur zona hambat yang terjadi pada setiap sumur dengan menggunakan kaliper.

Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM). Disiapkan 11 tabung reaksi yang bersih dan steril, kemudian masukan 1 ml ekstrak etanol bawang sabrang pada masing-masing tabung reaksi konsentrasi 1%, 5%, 10%, 15%, 25%, 50%, 75% dan 100% dengan menggunakan media cair Mueller-hinton sebagai larutan pengencer. Pada masing-masing tabung 1-11 ditambahkan 1 ml suspensi bakteri uji sekunder (1×10^6). Semua tabung 1-11 diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C. Kemudian amati hasil kekeruhan yang terjadi pada masing-masing tabung. Tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan (jernih) dilakukan subkultur pada media agar Mueller-hinton dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam. Nilai KBM ditentukan dengan melihat konsentrasi ekstrak terendah yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan pada media cari Mueller-Hinton dan tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada media agar Mueller-Hinton.

Penentuan Waktu Kontak Ekstrak Etanol Bawang Sabrang terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* secara *in vitro*. Pemeriksaan waktu kontak dilakukan berdasarkan hasil penentuan nilai KBM ekstrak etanol bawang sabrang terhadap masing-masing bakteri uji. Siapkan 12 tabung steril reaksi masing-masing diisi dengan 1 ml ekstrak etanol bawang sabrang dengan konsentrasi yang memberikan nilai KBM pada *Shigella dysenteriae* dan juga masing-masing tabung dimasukkan 1 ml suspensi *Shigella dysenteriae* dalam media cair Mueller Hinton dengan jumlah bakteri 1×10^6 CFU/ml. Untuk bakteri *Salmonella enteritidis*, dilakukan hal yang sama yaitu 12 tabung steril reaksi masing-masing diisi dengan 1 ml ekstrak etanol bawang sabrang dengan konsentrasi yang memberikan nilai KBM pada *Salmonella enteritidis* dan juga masing-masing tabung dimasukkan 1 ml suspensi *Salmonella enteritidis* dalam media cair Mueller Hinton dengan jumlah bakteri 1×10^6 CFU/ml. Kemudian semua tabung pengujian *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* di inkubasi pada suhu 37°C Pada jam ke 2, 4, 6 dan 8 setelah di inkubasi diambil masing-masing 3 tabung dari *Shigella dysenteriae* untuk ditanam pada media agar Mueller-Hinton dan dinkubasi kembali selama 20 jam. Untuk *Salmonella enteritidis* diinkubasi pada suhu 37°C dan pada menit ke 5, 10, 15 dan 20 setelah inkubasi diambil masing-masing 3 tabung dari

Salmonella enteritidis untuk ditanam pada media agar Mueller-Hinton selama 20 jam. Kemudian dihitung jumlah koloni pada masing-masing media agar Mueller-Hinton sesuai dengan nilai KBM dan waktu kontakanya dari tiap bakteri uji.

Interval waktu yang menunjukkan terjadinya penurunan jumlah koloni bakteri $\geq 99,9\%$ CFU/ml dari jumlah bakteri awal dinyatakan sebagai waktu kontak. Jumlah bakteri awal diperiksa dengan cara membuat pengenceran 150 kali dari 0,5 Mc Farland dengan menggunakan media cair Mueller-Hinton sebagai pengencernya, kemudian di inokulasikan pada plat media agar Mueller-Hinton, diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 jam dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh dengan satuan CFU/ml, pemeriksaan dilakukan dengan 4 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

HASIL. Data hasil pengujian aktifitas antibakteri dengan mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* oleh ekstrak bawang sabrang dengan metode modifikasi difusi agar (Lihat Tabel 1) menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* terjadi pada konsentrasi 25% sebesar $7,61 \pm 0,02$ mm dan semakin meningkat sampai pada konsentrasi 100% yaitu $18,21 \pm 0,07$ mm. Sedangkan pada *Salmonella enteritidis* zona hambat pertumbuhan terjadi pada konsentrasi 75% yaitu sebesar $11,13 \pm 0,02$ mm dan konsentrasi 100% sebesar $20,51 \pm 0,03$ mm.

Konsentrasi bunuh minimal (KBM) adalah konsentrasi ekstrak bawang sabrang terendah yang dapat membunuh bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* hingga terjadi penurunan jumlah bakteri $\geq 99,9\%$ dari jumlah bakteri awal. Data hasil penelitian menunjukkan (Lihat tabel 2), nilai KBM ekstrak bawang sabrang yang dapat membunuh bakteri *Shigella dysenteriae* pada konsentrasi 25%, sedangkan *Salmonella enteritidis* pada konsentrasi 75%.

Hasil analisis uji *one way anova* menunjukkan adanya perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* dengan nilai signifikansi p adalah 0,00 ($p < 0.05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Untuk melihat perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dilanjutkan dengan uji *post hoc* menunjukkan nilai p adalah 0,00 ($p < 0.05$) pada konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang 25%, 50%, 75% dan 100%. Sedangkan pada bakteri *Salmonella enteritidis* uji *post hoc* menunjukkan nilai p adalah 0,000 ($p < 0.05$)

Tabel 1. Perbandingan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* dan *Salmonella enteritidis* oleh berbagai konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang dengan metode modifikasi difusi agar.

Jenis bakteri	Konsentrasi ekstrak bawang sabrang	Rata-rata diameter zona hambat (mm)
<i>Shigella dysentriae</i>	1 %	0,00 ± 0,00
	10%	0,00 ± 0,00
	15%	0,00 ± 0,00
	25%	7,61 ± 0,02
	50%	8,69 ± 0,03
	75%	9,49 ± 0,05
	100%	18,21 ± 0,07
<i>Salmonella enteritidis</i>	1 %	0,00 ± 0,00
	10%	0,00 ± 0,00
	15%	0,00 ± 0,00
	25%	0,00 ± 0,00
	50%	0,00 ± 0,00
	75%	11,13 ± 0,02
	100%	20,51 ± 0,03

Tabel 2. Nilai konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol bawang sabrang terhadap pertumbuhan *Shigella dysentriae* dan *Salmonella enteritidis*.

Konsentrasi (%) ekstrak bawang sabrang	Pertumbuhan koloni bakteri	
	<i>Shigella dysentriae</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>
1 %	+	+
5%	+	+
10%	+	+
15%	+	+
25%	-	+
50%	-	+
75%	-	-
100%	-	-
Kontrol media	-	-
Kontrol media + ekstrak	-	-
Kontrol media + bakteri	+	+

Keterangan: (+) : terdapat pertumbuhan bakteri pada media MHA; (-) : tidak terdapat pertumbuhan pada media MHA

pada konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang 75% dan 100%.

Waktu kontak adalah waktu yang dibutuhkan ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana Merr*) yang pada konsentrasi tertentu mampu membunuh bakteri hingga terjadi penurunan bakteri $\geq 99,9\%$ dari jumlah bakteri awal. Pada penelitian ini penentuan waktu kontak digunakan berdasarkan nilai KBM sebagai tolak ukur konsentrasi awal ekstrak etanol bawang sabrang. Kemudian untuk melihat efek konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang terhadap daya bunuh bakteri dari nilai KBM dinaikan dengan kelipatan dua. Hasil penelitian menunjukkan pengaruh waktu kontak ekstrak bawang sabrang konsentrasi 25% terhadap pertumbuhan jumlah koloni (CFU) bakteri *Shigella dysentriae* (lihat tabel 3) mulai dari 2 jam dengan jumlah koloni adalah 293 CFU/ml dan nilai pertumbuhan ini terus mengalami penurunan sampai pada waktu kontak 8 jam yaitu 81 CFU/ml.

Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 50%, pada waktu kontak 4, 6 dan 8 jam sudah tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysentriae*. Hasil uji statistik *one way anova* pada konsentrasi 25% menunjukkan nilai signifikansi

p adalah 0.000 ($p < 0.05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Shigella dysentriae* terhadap variasi waktu kontak pada konsentrasi 25% ekstrak bawang sabrang. Pengujian dilanjutkan ke uji *post hoc* dan diperoleh nilai p adalah 0.00 ($p < 0.05$) pada waktu kontak 6 dan 8 jam.

Sedangkan hasil uji statistik *one way anova* terhadap *Shigella dysentriae* konsentrasi 50% menunjukkan nilai signifikansi p adalah 0.00 ($p < 0.05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Shigella dysentriae* terhadap variasi waktu kontak pada konsentrasi 50% ekstrak bawang sabrang. Pengujian dilanjutkan ke uji *post hoc* dan diperoleh nilai p adalah 0.00 ($p < 0.05$) pada waktu kontak 4, 6 dan 8 jam.

Pada pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella enteritidis* terhadap waktu kontak ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana Merr*), hasil penelitian menunjukkan (Lihat tabel 4) pada konsentrasi 75% dimulai waktu kontak 5 menit sampai dengan jumlah pertumbuhan koloni 147 CFU/ml terus mengalami penurunan sampai pada waktu kontak 20 menit dengan jumlah pertumbuhan koloni 38

Tabel 3. Pengaruh waktu kontak dan konsentrasi ekstrak bawang sabrang terhadap pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Shigella dysenteriae*.

Waktu (jam)	Jumlah koloni (CFU/ml) bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	
	Konsentrasi ekstrak	Konsentrasi ekstrak
	25%	50%
2	293	119
4	217	0
6	156	0
8	81	0
Nilai p	0,00	0,00

Keterangan: $p > 0.05$ tidak terdapat perbedaan yang signifikan; $p < 0.05$ terdapat perbedaan yang signifikan

Tabel 4. Pengaruh waktu kontak dan konsentrasi ekstrak bawang sabrang terhadap pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Salmonella enteritidis*.

Waktu (menit)	Jumlah koloni (CFU/ml) bakteri <i>Salmonella enteritidis</i>	
	Konsentrasi ekstrak	Konsentrasi ekstrak
	75%	100%
5	147	42
10	104	31
15	76	0
20	38	0
Nilai p	0,00	0,00

Keterangan: $p > 0.05$ tidak terdapat perbedaan yang signifikan; $p < 0.05$ terdapat perbedaan yang signifikan

CFU/ml sedangkan pada konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang 100% pada waktu kontak 15 dan 20 menit tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella enteritidis*. Hasil uji statistik *one way anova* pada jumlah koloni pertumbuhan *Salmonella enteritidis* terhadap ekstrak etanol bawang sabrang konsentrasi 75% menunjukkan nilai signifikansi p adalah 0.00 ($p < 0.05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Salmonella enteritidis* terhadap variasi waktu kontak pada konsentrasi 75% ekstrak etanol bawang sabrang. Pengujian dilanjutkan ke uji *Post Hoc* dan diperoleh nilai p adalah 0.000 ($p < 0.05$) pada semua waktu kontak.

Sedangkan hasil uji statistik *one way anova* pada jumlah koloni pertumbuhan *Salmonella enteritidis* terhadap konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang konsentrasi 100% menunjukkan nilai signifikansi p adalah 0.00 ($p < 0.05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan pertumbuhan jumlah koloni (CFU/ml) bakteri *Salmonella enteritidis* terhadap variasi waktu kontak pada konsentrasi 100% ekstrak bawang sabrang.

PEMBAHASAN. Pengujian aktifitas antibakteri dengan menggunakan metode modifikasi difusi agar bertujuan untuk memperlihatkan adanya aktifitas penghambatan pertumbuhan bakteri yang terjadi

saat ekstrak etanol bawang sabrang ditempatkan pada sumur yang dibuat di media MHA. Difusi ekstrak bawang sabrang pada berbagai konsentrasi akan menunjukkan besarnya zona hambat tersebut yang diukur diameternya dalam satuan milimeter. Kemampuan berdifusi ekstrak bawang sabrang pada media MHA menunjukkan sifat absorpsi dan distribusi yang baik pada media MHA. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin besar pula zona hambat yang ditunjukkan. Data pada Tabel 1 menunjukkan pada konsentrasi minimal 25% ekstrak bawang sabrang sudah terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri. Hal ini berbeda dengan zona hambat yang terjadi pada pertumbuhan bakteri *Salmonella enteritidis*, dimana zona hambat pertumbuhan bakteri terjadi pada konsentrasi 75% dan 100%. Hal yang serupa juga teramati pada penentuan nilai KBM ekstrak bawang sabrang terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Tabel 2 menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* terjadi mulai pada konsentrasi ekstrak bawang sabrang 25% sedangkan bakteri *Salmonella enteritidis* terjadi pada konsentrasi lebih tinggi yaitu 75%.

Bawang sabrang mengandung fenol, sterol, flobatanin, protein, steroid, tanin dan gula tereduksi yang memiliki aktifitas antibakteri kuat⁽²⁴⁾. Adanya perbedaan konsentrasi zona hambat pada bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* disebabkan perbedaan sifat biokimia dari kedua bakteri tersebut. Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa tetapi menghasilkan asam tanpa menghasilkan gas, sedangkan *Shigella dysenteriae* tidak menghasilkan gas H_2S ⁽²⁵⁾. Aktifitas penghasil asam yang dilepaskan ke media MHA tanpa menghasilkan gas dari bakteri *Shigella dysenteriae* yang dapat meningkatkan penetrasi ekstrak bawang sabrang ke media sehingga meningkatkan aktifitas antibakteri. Sedangkan bakteri *Salmonella enteritidis* tidak menghasilkan asam tetapi menghasilkan gas H_2S yang dapat bereaksi dengan komponen fitokimia dalam ekstrak bawang sabrang sehingga mempengaruhi aktifitas antibakterinya⁽²⁵⁾.

Ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana Merr*), juga mengandung flavonoid yang memiliki efek antibakteri⁽²²⁾. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Kemungkinan lain adalah flavonoid berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi sel mikroorganisme dan penghambatan siklus sel bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*⁽²⁶⁾. Flavonoid menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelas atau

ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA⁽²⁶⁾.

Waktu kontak ekstrak etanol bawang sabrang juga dapat mempengaruhi aktifitas penghambatan pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Pada Tabel 3 dan Tabel 4 menunjukkan semakin lama waktu kontak ekstrak bawang sabrang maka semakin tinggi daya hambat pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*. Semakin lama waktu kontak ekstrak bawang sabrang dengan koloni pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* akan semakin meningkatkan efek antibakterinya hal ini disebabkan meningkatnya penetrasi senyawa-senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak bawang sabrang ke dalam sel bakteri, khususnya sel bakteri yang sedang bertumbuh.

Kandungan flavonoid, saponin, alkaloid pada ekstrak bawang sabrang merupakan zat aktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara *in vitro*⁽²²⁾. Senyawa alkil yang terdapat pada alkaloid dapat berinteraksi dengan membran sel bakteri, menyebabkan terjadinya mekanisme difusi elektrolit keluar menyebabkan bakteri lisis⁽²⁷⁾. Mekanisme saponin sebagai antimikroba adalah saponin akan membentuk ikatan kompleks irreversible dengan kolesterol atau sterol yang terdapat pada membran bakteri, menyebabkan terjadinya perubahan tegangan permukaan sel bakteri yang menyebabkan sel bakteri lisis⁽²⁸⁾. Flavonoid merupakan senyawa yang dapat masuk ke dalam sel bakteri gram negatif melalui porin dengan mekanisme difusi pasif, kemudian flavonoid akan berikatan dengan enzim dihidrofolat reductase (DHFR) yang akan menghambat aktivitas enzim girase. Adanya hambatan pada aktivitas enzim girase mengakibatkan sintesis asam nukleat dan mekanisme metabolisme energi bakteri terhambat⁽²⁷⁾.

Mekanisme yang terjadi adalah alkaloid dan saponin akan merusak permeabilitas dinding sel bakteri secara spontan yang mengakibatkan elektrolit bakteri keluar sel, keluarnya elektrolit bakteri mengakibatkan terjadinya perbedaan tekanan osmotik sehingga cairan dari luar bakteri sel akan terus masuk ke dalam bakteri melalui dinding sel menyebabkan terjadinya pemasukan cairan berlebih ke dalam sel bakteri yang pada akhirnya bakteri menjadi lisis dan mati⁽²⁵⁾, sehingga bila konsentrasi ekstrak bawang sabrang semakin tinggi, maka kerja alkaloid dan saponin sebagai zat antibakteri akan lebih dominan dibandingkan dengan kerja flavonoid yang menghambat kerja enzim girase ketika bakteri mengalami mekanisme pembelahan sel, sedangkan bila konsentrasinya rendah kerja flavonoid sebagai antibakteri akan lebih dominan dibandingkan dengan

alkaloid dan saponin. Hal ini dibuktikan bahwa pada pemeriksaan uji daya antibakteri metode dilusi dalam waktu 4 jam, 8 jam bersifat bakterisidal dan *Salmonella enteritidis* dalam waktu 5 menit, 10 menit juga bersifat bakterisidal, artinya terdapat interval waktu antara mekanisme bakterisidal, sehingga dapat dikatakan bahwa :

1. Alkaloid, saponin dan flavonoid bekerja secara sinergis, artinya untuk bakteri yang tidak melakukan pembelahan sel (tidak berkembang baik) akan mati oleh kerja alkaloid dan saponin, sedangkan untuk bakteri yang aktif melakukan perkembangbiakan (pembelahan sel) akan mati oleh kerja flavonoid. Pada konsentrasi rendah kerja alkaloid dan saponin sebagai zat antibakteri lebih dominan dibandingkan kerja flavonoid, sedangkan pada konsentrasi tinggi kerja flavonoid sebagai zat antibakteri lebih dominan dibandingkan alkaloid dan saponin⁽²⁵⁾.
2. Ekstrak bawang sabrang mempunyai efek bakteristatik atau bakterisidal terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis*, tergantung dari konsentrasi dan waktu kontak yang digunakan^(27,28).
3. Efek ekstrak bawang sabrang dapat berubah dari bakteristatik menjadi bakterisidal pada konsentrasi tinggi terhadap *Shigella dysenteriae* (50%) dan *Salmonella enteritidis* (100%) bila masing-masing menggunakan waktu kontak 20 menit.

Perbedaan nilai KBM dari ekstrak bawang sabrang terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol bawang sabrang mempunyai sifat bakterisidal pada konsentrasi yang berbeda terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* walaupun masih dalam satu famili *Enterobacteriaceae*.

Pada uji aktivitas mikroba, ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana* Merr) mempunyai efektivitas dalam menghambat pertumbuhan *E.coli* dengan nilai zona hambat 14,5 mm.31 Selanjutnya, di Thailand, Ekstrak etanol *Eleutherina americana* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap semua *Campylobacter Spp* yang menginfeksi manusia dan ayam⁽²²⁾.

SIMPULAN

Daya antibakteri ekstrak etanol bawang sabrang terhadap *Shigella dysenteriae* terjadi pada konsentrasi 25%-100%, sedangkan *Salmonella enteritidis* pada konsentrasi 75%-100%. Terdapat perbedaan daya antibakteri ekstrak etanol bawang sabrang pada jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae*

dan *Salmonella enteritidis* dengan penambahan waktu kontak. Diperlukan penelitian lebih lanjut pengaruh konsentrasi ekstrak etanol bawang sabrang (*Eleutherine americana* Merr) dan waktu kontak terhadap perubahan efek antibakteri dari bakteriostatik menjadi bakterisidal terhadap *Shigella dysenteriae* dan *Salmonella enteritidis* secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

4. Omore, Audia, Ogwel. Defining the burden and epidemiology of *shigellosis* in rural Asembo, Western Kenya, 2007-2014. American journal of tropical medicine and hygiene; USA : 2017
5. Agrawal R, Dharmesh S. An anti-*Shigella dysenteriae* bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* MTCC 5151 cheese isolate. Turkish Journal of Biology. 2012. 36 (2):177-85.
6. Orrett FA. Prevalence of *Shigella serogroups* and their antimicrobial resistance patterns in southern Trinidad. Journal of health, population and nutrition. 2008. 26(4):456.
7. Departemen Kesehatan RI Survei Kesehatan Nasional 2015. Laporan studi mortalitas pola penyakit penyebab kematian di Indonesia. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 2015
8. Bardhan P, Faruque A, Naheed A, Sack DA. Decreasing *Shigellosis*-related deaths without *Shigella spp.*-specific interventions, Asia. Emerging infectious diseases. 2010. 16(11):1718.
9. Prihantoro T, Indra R, Sumarno S. Efek antibakteri ekstrak kulit buah delima (*punica granatum*) terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Jurnal Kedokteran Brawijaya. 2013. 22(3):101-6.
10. Todar K. Bacterial resistance to antibiotics. Todar's online textbook of bacteriology. 2011. 4.p3
11. Singh K-KB, Ojha SC, Deris ZZ, Rahman RA. A 9-year study of *Shigellosis* in Northeast Malaysia: antimicrobial susceptibility and shifting species dominance. Journal of Public Health. 2011. 19(3):231-236.
12. Humphrey T. *Salmonella*, stress responses and food safety. Nature Reviews Microbiology. 2004. 2(6):504-509.
13. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. Clinical Infectious Diseases. 2010. 50(6):882-889.
14. Cattoir V, Weill F-X, Poirel L, Fabre L, Soussy C-J, Nordmann P. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007. 59(4):751-754.
15. Ifesan BO, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Assessment of anti-staphylococcal activity of partially purified fractions and pure compounds from *Eleutherine americana*. Journal of food protection. 2009. 72(2):354-9.
16. Chai SJ, White PL, Lathrop SL, Solghan SM, Medus C, McGlinchey BM, et al. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: increasing incidence of domestically acquired infections. Clinical Infectious Diseases. 2012. 54(suppl_5): S488-S97.
17. Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, Machpud N, Komalarini S, Santoso W, et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2003. 68(6):666-670.
18. Pavithra PS, Janani VS, Charumathi KH, Indumathy R, Potala S, Verma RS. Antibacterial activity of plants used in Indian herbal medicine. International Journal of Green Pharmacy (IJGP). 2010. 4(1).
19. Bartram T. Bartram's encyclopedia of herbal medicine. Hachette UK. 2013.
20. EL-Kamali HH, EL-Amir MY. Antibacterial activity and phytochemical screening of ethanolic extracts obtained from selected Sudanese medicinal plants. Current Research Journal of Biological Sciences. 2010. 2(2):143-146.
21. Sari LO. Pemanfaatan obat tradisional dengan pertimbangan manfaat dan keamanannya. Pharmaceutical Sciences and Research (PSR). 2012. 3(1):1-7.
22. Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation. Journal of general internal medicine. 2008. 23(6):854-9.
23. Oyekunle MA, Aiyelaagbe , Fafunso MA. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. African Journal of Biotechnology. 2006. 5(23).
24. Dharma AP. Tanaman obat tradisional Indonesia. Balai Pustaka; 2006.
25. Putra RY, Haryati H, Mawarni L. Respons Pertumbuhan Dan Hasil Bawang Sabrang (*Eleutherine Americana* Merr) Pada Beberapa Jarak Tanam Dan Berbagai Tingkat Pemetongan Umbi Bibit. Agroekoteknologi. 2013. 1(1).
26. Ifesan BO, Hamtasin C, Mahabusarakam W, Voravuthikunchai SP. Assessment of anti-staphylococcal activity of partially purified fractions and pure compounds from *Eleutherine americana*. Journal of food protection. 2009. 72(2):354-359.
27. Ali, Mir Naiman, Mazharuddin Khan Mohd, and Mohiuddin Majid. Ethanol fuel production through microbial extracellular enzymatic hydrolysis and fermentation from renewable agrobased cellulosic wastes. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011. 2(2).
28. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Text Book Medical Mikrobiologi. Geo F. Brooks; Edisi 25. 2012. p. 230-235
29. Taneja, Neelam. "Changing epidemiology of *shigellosis* and emergence of ciprofloxacin-resistant *Shigella* in India." Journal of Clinical Microbiology. 2007. 45(2): 678-679.
30. Mahon, Connie R., Donald C. Lehman, and George Manuselis. Textbook of diagnostic microbiology-E-

- Book. Elsevier Health Sciences. 2014.
31. Dewi, Intan Kusuma, Joharman Joharman, and Lia Yulia Budiarti. Perbandingan daya hambat ekstrak etanol dengan sediaan sirup herbal buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae in vitro*. Berkala Kedokteran. 2013. 9(2): 191-198.
 32. Eswarappa, Sandeepa M, "Differentially evolved genes of *Salmonella* pathogenicity islands: insights into the mechanism of host specificity in *Salmonella*." PLOS one 3.12. 2008. e3829.
 33. Indonesia, S. N. Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan. SNI, 7388. 2009.
 34. Insanu, Kusmardiyani and Hartati, R. Recent Studies on Phytochemicals and Pharmacological Effects of *Eleutherine americana Merr.* Procedia Chemistry, 13. 2008. p. 221-228.

Formulation and Activity of Gel Containing Nanoparticles of Javanese Turmeric Extract as Antiacne

(Formulasi dan Aktivitas Gel yang Mengandung Nanopartikel Ekstrak Temulawak sebagai Antiacne)

ANASTASYA, DENI RAHMAT*, ANARISA BUDIATI

Faculty Pharmacy, University Pancasila, Jalan Lenteng Agung Srengseng Sawah, Jagakarsa, Southern Jakarta City, 12630, Indonesian.

Submitted: 22 February 2019, Accepted: 27 March 2020

Abstract: Javanese turmeric is one of the Indonesia's authentic plant that has many benefits, antimicrobial effect is one of them. Curcuminoid and xanthorrhizol contents are responsible for its antimicrobial activity. Acne vulgaris is one of skin's disorder that caused by bacteria, the major cause is *Propionibacterium acnes*. This study aimed to compare antimicrobial activity difference between nanoparticle and extract gel. Javanese turmeric was extracted and then formulated into nanoparticles. Javanese turmeric extract and its nanoparticles were then formulated in gel preparation. Gel preparations were evaluated physically (organoleptic, homogeneity, spreadability, and viscosity and rheology), chemically (pH value), and tested for their antimicrobial activity. Gel evaluations showed that both formula (nanoparticle and extract gel formula) did not show any discoloration and still homogeny. Extract gel formula had viscosity about 1540–1600 Ps, while nano extract gel had viscosity in the range of 487.63–501.01Ps. Extract gel formula had spreadability in the range of 51.75-53.35 mm, while nano extract gel has viscosity in the range of 65.125-72.75 mm. Extract gel formula had pH value in the range of 5.98–6.02, while nano extract gel had pH value in the range of 5.88–5.93. Extract gel formula has inhibition zone in the range of 10.0 mm–10.3 mm, while nanoextract gel has inhibition zone in the range of 13.0 mm–13.4 mm. Based on statistical paired sample t-test analysis, nano extract gel formula was significantly different from extract gel formula in antimicrobial activity.

Keywords: nanoparticle, javanese turmeric, gel, antiacne, *Propionibacterium acnes*.

Abstrak: Temulawak adalah salah satu tanaman asli Indonesia yang memiliki banyak manfaat, salah satunya adalah efek antimikroba. Kandungan curcuminoid dan xanthorrhizol bertanggung jawab atas aktivitas antimikroba. Acne vulgaris adalah salah satu kelainan kulit yang disebabkan oleh bakteri, penyebab utamanya adalah *Propionibacterium acnes*. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan perbedaan aktivitas antimikroba antara nanopartikel dan ekstrak gel. Temulawak diekstraksi dan kemudian diformulasikan menjadi partikel nano. Ekstrak temulawak dan nanopartikelnya kemudian diformulasikan dalam sediaan gel. Sediaan gel dievaluasi secara fisik (organoleptik, homogenitas, spreadability, dan viskositas dan reologi), secara kimiawi (nilai pH), dan diuji aktivitas antimikroba nya. Evaluasi gel menunjukkan bahwa kedua formula (nanopartikel dan ekstrak ekstrak gel) tidak menunjukkan perubahan warna dan masih homogen. Formula gel ekstrak memiliki viskositas sekitar 1540–1600 Ps, sedangkan gel ekstrak nano memiliki viskositas pada kisaran 487,63-501,01Ps. Formula gel ekstrak memiliki daya sebar dalam kisaran 51,75-53,35 mm, sedangkan gel ekstrak nano memiliki viskositas pada kisaran 65,125-72,75 mm. Formula gel ekstrak memiliki nilai pH di kisaran 5,98-6,02, sedangkan gel ekstrak nano memiliki nilai pH di kisaran 5,88-5,93. Formula gel ekstrak memiliki zona hambat pada kisaran 10,0 mm - 10,3 mm, sedangkan nanoextract gel memiliki zona hambat pada kisaran 13,0 mm - 13,4 mm. Berdasarkan analisis uji-t sampel berpasangan statistik, formula gel ekstrak nano berbeda secara signifikan dari formula ekstrak gel dalam aktivitas antimikroba.

Kata Kunci: nanopartikel, temulawak, gel, antiacne, *Propionibacterium acnes*.

*Correspondence author

E-mail: mangnden78@yahoo.com

INTRODUCTION

THE USE of natural medicines has long been known and used by the people of Indonesia long before the introduction of modern medical systems. With the increasing price of chemical drugs and the increasing number of antibiotics that are resistant to many microbes, the public begins to look back to natural medicines which are considered to have a more affordable price and smaller side effects compared to chemical drugs, and can be used as an alternative to finding new antibiotics which is not resistant^(1,2).

Temulawak is one of the many medicinal plants found in Indonesia, and the only part of the plant that is used for treatment is the rhizome. According to several studies that have been carried out, ginger rhizome has potential as an active antimicrobial agent against several Gram-positive and Gram-negative bacteria, so it is interested in conducting further research on the antibacterial activity possessed by ginger rhizome⁽³⁾. Several studies have shown the phenol component in ginger to have antibacterial activity acting on the membrane and cell wall of bacteria.

Nanotechnology is technology that allows an object to be nano-sized. Today, nanotechnology is used as a sensor, delivering drugs to targets, and introducing gene systems⁽⁴⁾. The benefits of nanoparticles are mainly in the pharmaceutical world as drug delivery so that the drug will be absorbed in a specific place or directly to the expected target cell. Extract nanoparticles are extracts that are modified in such a way with certain carriers so that they have better properties, for example providing the desired therapeutic effect more quickly. Extract nanoparticles provide a solution to the problem of low drug efficacy due to the inability of the active substance to reach the therapeutic site of the organ^(5,6).

Acne vulgaris (acne) is one of the skin problems that is often experienced by humans, especially in adolescents and adults. The emergence of acne starts from inflammation of the skin, where the oil glands produce excess sebum and blockage of the oil gland and the formation of blackheads (whiteheads). When blackheads enlarge, open blackheads (blackheads) will form and emerge to the surface of the skin opening pores and then interact with the bacterias that cause acne, namely *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*.

Antibacterial activity of extracts and nanoparticles of Javanese turmeric (temulawak) extract were compared and then formulated into gel preparations on the basis of carbopol 940 so that it can be applied to treat acne and gel preparations were tested for their activity in inhibiting the growth of *Propionibacterium*

acnes. Temulawak extract concentration was chosen for gel preparations by 0.5%.

MATERIAL AND METHODS

MATERIAL. Javanese turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb), ethanol 96% and 70%, chitosan (Sigma Aldrich), natrium tripolyphosphate, carbopol 940, triethanolamine, propylenglicol, dinatrium EDTA, methyl paraben, propyl paraben, natrium metabisulfit, NaCl 0.9% steril solution, aquadest, bacteria of *Propionibacterium acnes*, chloramphenicol
Instrument. Glassware, analytical scales, socket number 4 and 18, macerator, filter paper, vacuum rotavapor, Transmission Electron Microscope (JEOL 1080), Particle Size Analyzer, Zetasizer, homogenizer, viskometer (Brookfield DV II+ PRO), pH meter (Hanna Instrument), inkubator (Mettler), vortex, autoclaf, anaerobic jar (Oxoid), LAF room, sterile disc paper, sterile swab.

METHODS. Javanese Turmeric Extract Preparation. Temulawak rhizome extract was prepared by maceration technique, using 96% ethanol solvent. A total of 900.80 grams of ginger rhizome simplicia powder macerated by stirring with 96% ethanol for the first 6 hours, then allowed to stand for 18 hours. The filtrate obtained was filtered then collected. The process was repeated 10 times then the collected filtrate was concentrated with a vacuum evaporator until a thick extract was obtained.

Nanoparticles Preparation. One gram of chitosan was dissolved in 100 mL of 1% glacial acetic acid using a magnetic stirrer to obtain a chitosan concentration of 1%. As much as 500 mg of temulawak ethanol extract added mixed solvent (5 mL Capmul, 10 mL 70% ethanol, 10 mL propylene glycol, 5 mL glycerin), 5 mL tween 80, and 5 mL aquadest. Then 5% chitosan solution was added as much as 5 mL so that the concentration of chitosan was 0.1%. The mixture is stirred using a magnetic stirrer for 10 minutes. Furthermore, dropping with 5 mL of 0.2% Na-TPP drops at a rate of 1 drop / 3 seconds with a burette and in a magnetic stirrer rpm 300 to form nanoparticles which are characterized by homogeneous turbidity. Then stay on the magnetic stirrer for 15 minutes to obtain a stable solution of temulawak extract nanoparticles.).

Formulation of Gel. Carbopol 940 was developed in 30 mL of distilled water for 24 hours, then added triethanolamine gradually while homogenized with a homogenizer to form a gel base. Methylparaben and propylparaben were dissolved in a portion of propylene glycol, then added with sodium EDTA and sodium metabisulphite which had previously

been dissolved in part of the aquadest, then put into a mixture of gel bases. Temulawak ethanol extract or the extract nanoparticles were added to the mixture

while stirring with homogenizer until homogeneous at a speed of 200 rpm. Formulation of gel shown in Table 1.

Table 1. Gel Formulation.

Excipient	Bobot (% b/b)		
	Blank gel	Formula with extract	Formula with nanoextract
Ethanol extract of Java turmeric	-	0.5	-
Nanoparticle Java turmeric extract*	-	-	50 mL
Carbopol 940	0.75	0.75	0.75
Propylen glikol	15	15	15
Triethanolamin	0.75	0.75	0.75
Natrium metabisulfit	0.1	0.1	0.1
Dinatrium EDTA	0.05	0.05	0.05
Metil paraben	0.03	0.03	0.03
Propil paraben	0.01	0.01	0.01
Aquadest ad	100	100	100

*50 mL of temulawak nano extract is equivalent to 0.5% of ginger extract

Gel Evaluation. The gel that has been made is evaluated at room temperature for 4 weeks of storage (0, 1, 2, 3, and 4 weeks), which includes: physical evaluation (organoleptic, homogeneity, viscosity dan rheology, spreading coefficient and pH).

Antiacne Activity Test of Gel Containing Javanese Turmeric Extract and Its Nanoparticles. The antimicrobial activity of extract gel and temulawak extract nanoparticle gel were carried out on *Propionibacterium acnes* test bacteria. The sterile swab was dipped in a bacterial suspension and then dried by attaching the swab to the tube wall, and swabbed to the blood agar. Furthermore, the test solution was made by weighing 1 gram of extract gel or ginger extract nanoparticles then dissolved in 3 mL sterile aquadest (equivalent to 0.5% extract). Sterile disc paper was immersed in the test solution. Disc paper that had been saturated with the test solution was placed on the surface of the media. After that, the media was incubated at 35-37 °C for 24 hours under anaerobic conditions. Observed and measured DDH formed. Observations were made by measuring the diameter of the inhibitory power (DDH) after incubation. The formation of DDH is marked by the formation of clear zones around the discs. From the data obtained a graph is made to see and compare the antibacterial power of the test sample in inhibiting bacterial growth⁽⁸⁾.

Data Analysis. The data obtained were analyzed by paired t-test (paired sample t test) using the SPSS program to determine the presence / absence of significant differences between the antiacne

activity of temulawak extract and temulawak extract nanoparticles when they were formulated into a gel preparation formulation.

RESULT AND DISCUSSIONS

Javanese Turmeric Extract Preparation. The produced extract was viscous with the characteristic as shown in Table 2.

Table 2. Identification of simplisia and extract Java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.).

Identification	Results
Foreign organic matter	0.46 %
Determination of the degree of fine powder simplisia	qualify
Rendemen	14.36 %
DER-native	6.96

Nanoparticles Preparation. Particle size measurements are carried out to ascertain whether nanoparticles have been made to have sizes that fall within the range of nanoparticle categories. Based on the results of the examination, the nanoparticles made have an average size of under 100 nm. Potential measurements are carried out to determine the load that is inside the nanoparticles where this value is related to the nanoparticle system that is formed. A nanoparticle system that is approved stable has many of the same charges as the particles will replace each other and no particle aggregation occurs. If in one

nanoparticle system has a different charge between the particles, there will be an aggregation that causes these particles to become unusable nanoparticles that can be combined with the formation of aggregate deposits. Based on the examination results, the nanoparticles made have a potential zeta with negative value. Most of these nanoparticles are more neutral, but nanoparticles that are formed are relatively stable in their formula composition containing many stabilizing

components.

Antiacne Activity Test. Based on the results of activity tests, ginger extract nanoparticles have better activity than temulawak extract. This is caused by nanoparticles that can diffuse better into the test microbes so that more microbes were inhibited which were marked by the clear zone produced. Antiacne activity test shown in Table 3.

Table 3. Antiacne activity test.

Sample	Average of inhibition zone diameter (mm)
sitif control (kloramfenikol)	15
Java turmeric extract	9.8
Java turmeric nanoparticle extract	11.23
Blank gel	0
Gel of Java turmeric extract	10.13
Gel of Java turmeric nanopartikel extract	13.27

Organoleptic Evaluation. Organoleptic evaluation and homogeneity for 0 until 4 weeks give formulation of gel still stable. The viscosity of the extract gel is lower than the blank gel because the extract gel contained curcuma extract dissolved in propylene glycol so that it can reduce the viscosity value. In addition, Java turmeric extract has an acidic pH (extract pH = 5) so that the resulting gel preparation will have a lower pH than the blank. Nano-extract gel has the lowest viscosity than the blank gel and gel extract because nano-extract in

liquid form was directly put into the gel preparation. For the gel flow characteristics, all three preparations have pseudoplastic – thixotropic flow properties. The greater the viscosity, the spread power decreases. The blank gel had the smallest dispersal power due to its high viscosity value so that its spread ability was relatively low. The pH of nano gel preparations has the lowest value compared to blank gel and gel extract. This matter was caused by the nano extracts are acidic because of the content of chitosan. Organoleptic evaluation shown in Table 4.

Table 4. Identification of gel formulations.

Identification	Blank gel	Gel of Java turmeric extract	Nanoparticle gel of Java turmeric extract
Organoleptic	Semisolid, colorless, odorless	Semisolid, light yellow, odorless	Semisolid, orange yellow, odorless
Homogenitas	Homogen	Homogen	Homogen
Viskositas dan Rheology	1566.67 ± 12.47 Ps	1543.33 ± 12.47 Ps	473.21 ± 15.11 Ps
Spreading coefficient	2075.46 ± 38.54 mm ²	2259.62 ± 35.84 mm ²	4030.47 ± 89.69 mm ²
pH	6.10 ± 0.02	6.10 ± 0.02	5.88 ± 0.04

CONCLUSIONS

Antiacne activity of temulawak nano extract was better than temulawak extract. Temulawak extract gel and temulawak extract nanoparticle gel have better antiacne activity compared to the extract and nanoparticle extract alone. Thereby, the gel is a great potential dosage form to be developed for both the extract and the nanoparticles.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdalla, Emad M. Plants: An alternative Source for Antimicrobial. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011;01(06): 16-20.
2. Harit J., et.al. Antimicrobial Activity of Rhizome of Selected *Curcuma* Variety. *International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research*.

3. Diastuti, Hartini, et.al. Antibacterial *Curcuma xanthorrhiza* Extract and Fraction. ITB Journal Publisher. 2014;46(3): 224-234.
4. Singh M, Singh S, Prasad S, Gambhir IS. 2008. Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles. Digest Journal of Nanoparticles and Biostructures 3: 115-122.
5. Sherwood L. Fisiologi manusia Dari sel ke sistem. Ed 6. Diterjemahkan oleh Pendit BU. Jakarta: Penerbit buku kedokteran EGC; 2009, hlm. 654-60, 675-77.
6. Tiyaaboonchai, Waree. Kitosan Nanoparticles: A Promising System for Drug Delivery. Naresuan University Journal 2003; 11(3): 51-66.
7. MM. Reiger. 2000. Harry's Cosmeticology, 8th ed. New York: Chemical Publishing Company.
8. Jawetz, E.L. dan E.A. Adelberg. 2001. Mikrobiologi Kedokteran buku ke 22 Terjemahan dari Medical Microbiology, Twenty Second Edition oleh bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salem Medika. h. 161-250.

Formulasi Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei Hasil Induksi dengan NAA dan BAP

(Formulation of NLC Gel from Callus Mulberry Leaf Extract Induced by NAA and BAP)

FAIZATUN*, ERLINDHA GANGGA, SARAH ANINDITA, TITIEK MARTATI, NUR MIFTAHURROHMAH

Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila Jalan Raya Lenteng Agung Srengseng Sawah, Jagakarsa, Kota Jakarta Selatan, 12630, Indonesia

Diterima: 14 Januari 2020, Disetujui: 24 April 2020

Abstrak: Daun Murbei (*Morus alba* L.) mengandung oxyresveratrol dan berpotensi sebagai pencerah kulit. Bentuk kalus daun Murbei hasil kultur jaringan belum diketahui aktivitasnya sebagai inhibitor enzim tirosinase. Tujuan penelitian untuk formulasi gel Nanostructured Lipid Carrier (NLC) dan menentukan aktivitas inhibisi enzim tirosinase ekstrak kalus daun Murbei. Kalus akar murbei diperoleh dengan metode kultur jaringan, eksplan daun ditumbuhkan dengan penambahan zat pengatur tumbuh NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm. Kalus daun murbei diekstraksi dengan maserasi-sonikasi. NLC dibuat menggunakan metode evaporasi pelarut, karakterisasi NLC meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan morfologi partikel. NLC terbaik dibuat menjadi gel dan dievaluasi organoleptik, viskositas, sifat alir, pH, dan uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase pada ekstrak dan gel NLC. Karakterisasi NLC meliputi ukuran partikel 189,8 nm-632,8 nm; indeks polidispersitas 0,387-0,582. Morfologi NLC bentuk sferis dan zeta potensial -7,37 mV. Gel NLC berupa semi padat, warna kuning kehijauan, homogen, viskositas 530000 cPs, sifat alir tiksotropik plastis, pH 5,26, dan aktivitas inhibisi enzim tirosinase ekstrak kalus daun Murbei dengan nilai IC_{50} sebesar 72,51 $\mu\text{g/ml}$ dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei IC_{50} sebesar 79,69 $\mu\text{g/ml}$. Disimpulkan ekstrak kalus daun Murbei dapat dibuat menjadi *Nanostructured Lipid Carriers* dan gel NLC memiliki potensi aktivitas pencerah kulit.

Kata kunci: Kalus, NAA, BAP, *nanostructured lipid carrier*, daun murbei.

Abstract: Mulberry Leaf (*Morus alba* L.) contains oxyresveratrol has potential as a skin lightener. The activity of mulberry leaf callus from tissue culture is unknown as an inhibitor of the tyrosinase enzyme. The aim of the study was to formulate the Nanostructured Lipid Carrier (NLC) gel and to determine the inhibitory activity of tyrosinase enzymes in mulberry leaf callus extracts. Callus was extracted by maceration-sonication. NLC is made by solvent evaporation method, NLC characterization including particle size, polydispersity index, zeta potential and particle morphology. The best NLC was made into a gel and evaluated organoleptic, viscosity, flow properties, pH, and tyrosinase enzyme inhibitory on extracts and NLC gels. The characterization of NLC includes particle size of 189.8 nm-632.8 nm; polydispersity index, 0.387-0.582. The morphology of NLC were spherical and zeta potential of -7.37 mV. NLC gel was semi-solid, greenish yellow, homogeneous, viscosity 530000 cPs, plastic thixotropic flow properties, pH 5.26, and inhibitory activity of tyrosinase enzymes (IC_{50}) of callus extract and NLC gel has 72.51 $\mu\text{g/ml}$ and 79.69 $\mu\text{g/ml}$, respectively. It can be concluded that callus extract of Mulberry leaf can be prepared into Nanostructured Lipid Carriers, NLC gels are physically and chemically stable and have the potential of lightening activity.

Keywords: Callus, NAA, BAP, *nanostructured lipid carrier*, mulberry leaf.

*Penulis korespondensi
E-mail: faizah2776@gmail.com

PENDAHULUAN

MURBEI (*Morus alba* L.) yang termasuk famili moraceae merupakan sumber senyawa fenol golongan stilben, termasuk turunan resveratrol (3,5,4'-trihidroksi-trans-stilben) dan oxyresveratrol (2,4,3',5'-tetrahidroksi-trans stilben) yang sangat potensial dalam bioindustri kosmetik. Oxyresveratrol telah diselidiki sebagai inhibitor tirosinase untuk menghindari produksi melanin secara berlebihan pada lapisan epidermal, sehingga digunakan dalam kosmetik sebagai pencerah kulit. Telah dilaporkan bahwa daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki kadar oxyresveratrol sebesar 144,5 µg/g. Oxyresveratrol pada ekstrak daun Murbei (*Morus alba* L.) memperlihatkan aktivitas yang tinggi sebagai inhibitor tirosinase^(1,2).

Proses pembentukan melanin pada kulit manusia terjadi dengan bantuan biokatalis (enzim) dan sinar ultraviolet (UV) dari sinar matahari. Tirosinase merupakan enzim yang berperan dalam pembentukan melanin. Enzim ini mengkatalisis dua reaksi utama dalam biosintesis melanin, yaitu hidrosilasi L-tirosin menjadi L-DOPA dan oksidasi L-DOPA menjadi dopakuinon. Senyawa dopakuinon mempunyai kereaktifan yang sangat tinggi sehingga dapat mengalami polimerisasi secara spontan membentuk dopakrom yang kemudian menjadi melanin. Untuk itu, salah satu cara yang dapat digunakan untuk menghambat pembentukan melanin adalah dengan menghambat aktivitas enzim tirosinase⁽³⁾.

Saat ini, bahan alam menjadi pusat perhatian dalam pengembangan produk kosmetik. Semakin berkembangnya zaman kebutuhan akan kosmetik dan obat-obatan semakin tinggi sehingga mengakibatkan eksplorasi tanaman yang di alam secara besar-besaran tanpa terkendali yang dapat mengakibatkan sumber daya alam terganggu. Oleh karena itu, dilakukan penelitian untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman asalnya. Salah satu cara untuk mendapatkan metabolit sekunder dengan cara cepat dan mudah yaitu dengan cara teknik kultur jaringan. Dibidang farmasi, teknik kultur jaringan sangat menguntungkan karena dapat menghasilkan metabolit sekunder untuk keperluan obat-obatan dalam jumlah besar dalam waktu yang singkat⁽⁴⁾. Hal ini dilihat pada beberapa industri farmasi, dalam pelaksanaan kultur jaringannya terbukti menghasilkan produk metabolit seperti alkaloid yakni kodein pada tanaman *Papaver somniferum* yang penggunaannya sebagai analgesik⁽⁵⁾.

Salah satu penerapan kultur jaringan tanaman adalah untuk memproduksi metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman. Pada penelitian ini akan dilakukan upaya kultur kalus tanaman dari daun Murbei (*Morus alba* L.). Keberhasilan kultur jaringan tanaman khususnya multiplikasi sangat dipengaruhi oleh zat pengatur tumbuh dari golongan auxin yang sering digunakan adalah NAA (*Napthalane Acetid Acid*) dengan kadar 0,1-50 ppm. Sedangkan zat pengatur tumbuh dari golongan sitokinin yang paling sering

digunakan adalah BAP (*Benzyl Amino Purin*) dengan kisaran konsentrasi 0,01-10 ppm⁽⁶⁾.

Pada penelitian ini digunakan dua media yaitu media MS₀ dan media MS dengan kombinasi zat pengatur tumbuh berupa NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm (media perlakuan). Golongan auksin dan BAP merupakan golongan sitokinin yang memiliki sifat lebih stabil karena tidak mudah terurai oleh reaksi enzim-enzim yang dihasilkan oleh tanaman dan tahan terhadap pemanasan pada proses sterilisasi dengan autoklaf pada tekanan uap 17,5 psi dengan temperatur 121°C (250°F). Proses mulai terjadinya kalus sampai diferensiasi berbeda-beda, tergantung jenis dan bagian tanaman yang dipakai sebagai eksplantat serta metode budidaya *in vitro* yang digunakan. Selain itu, juga zat-zat tanaman yang dibubuhkan pada medium dasar. Biasanya pada pertumbuhan dan organogenesis secara *in vitro* sangat tergantung pada interaksi antara zat pengatur tumbuh. Zat pengatur tumbuh didalam tanaman adalah senyawa organik yang bukan hara, yang dalam jumlah sedikit dapat mendukung, menghambat, dan dapat merubah proses fisiologi tumbuhan. Zat pengatur tumbuh didalam tanaman terdiri dari lima kelompok yaitu auxin, gibberellin, cytokinin, ethylene, dan inhibitor dengan ciri khas dan pengaruh yang berlainan terhadap proses fisiologis.

Pada penelitian ini dipilih zat pengatur tumbuh yang dapat menstimulir dan sekaligus menghambat yaitu auksin (NAA) dan sitokinin (BAP). Auksin sendiri merupakan hormon yang diproduksi dipucuk untuk pertumbuhan akar, sedangkan sitokinin merupakan hormon yang diproduksi di akar untuk pertumbuhan tunas.

Pada penelitian ini digunakan hasil ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) yang akan dibuat dalam bentuk *Nanostructured Lipid Carriers*. *Nanostructured Lipid Carriers* adalah suatu pembawa dengan ukuran nanopartikel berbahan campuran lemak padat dan lemak cair. Terdapat beberapa keuntungan preparasi nanopartikel menggunakan bahan lemak adalah meningkatkan kapasitas muat obat, stabilitas jangka panjang secara kimia dan fisika⁽⁶⁾.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah daun tanaman Murbei (*Morus alba* L.), larutan media MS, agar, gula pasir, myo-inositol, dan zat pengatur tumbuh : sitokinin (BAP) dan auksin (NAA), asam klorida, kalus daun murbei (*Morus alba* L.), baku pembanding asam kojat (Thornhill, Kanada), L-DOPA (SIGMA-Aldrich), tyrosinase from mushroom (SIGMA-Aldrich), larutan dapar fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium hidroksida, asam oleat, setil alkohol, tween 80, propilenglikol, carbomer 940, TEA, metil paraben, propil paraben, dan air murni.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ELISA reader (490 nm), timbangan

analitik (AND tipe GR 200), *hot plate* dengan magnetik stirrer, lampu alkohol, agar dispenser, microwave oven, botol kultur, rak kultur, *hand sprayer* untuk alkohol, lemari pendingin, *Laminar Air Flow Cabinet*, autoklaf, *Air Conditioner* untuk mengatur temperatur, rotavapor, lumpang dan alu, alat-alat diseksi (scalpel, pinset, spatula, gunting dan jarum), corong gelas, statif, klem corong, alat-alat gelas (Pyrex), alat – alat volumetrik (pipet volume, pipet skala, labu tentukur), *Water Bath*, *Particle Size Analyzer (PSA)*, *Zeta sizer*, *Transmission Electron Microscopy* (JEOL, JEM-1010 Electron Microscope), *Viscometer Brookfield*, stirrer (Eurostar), ultra turrax (IKA Ultra-Turrax, T25, Germany), pH meter (Ultra BASIC), kamera digital, cawan penguap, pipet tetes, aluminium foil, kertas saring, dan tissue.

METODE. Penumbuhan Kultur Kalus Daun Murbei (*Morus alba L.*). Tanaman yang digunakan sebagai sumber eksplan dikarantina. Proses karantina dilakukan setiap hari pada pagi dan sore hari dengan penyemprotan larutan fungisida, bakterisida, pupuk cair, hormon mata tunas, dan air pada tanaman Murbei (*Morus Alba L.*) dengan konsentrasi masing - masing larutan sebesar 1 g/L. Proses karantina ini bertujuan untuk meminimalisir kemungkinan kontaminasi yang mungkin terjadi selama pertumbuhan eksplan menjadi kalus pada tahap inkubasi. Eksplan yang digunakan yaitu daun yang telah melewati tahapan sterilisasi eksplan (bahan tanaman) secara umum baik di luar laminar maupun di dalam laminar. Laminar sudah dalam keadaan steril serta peralatan dan eksplan yang sudah disterilisasi sudah siap didalam laminar, selanjutnya alat diseksi (pinset dan scapel) didaun/digarang diatas api Bunsen, kemudian dimasukkan kedalam air steril. Selanjutnya eksplan yang sudah disterilisasi dimasukkan kedalam cawan petri. Jaringan

eksplan yang jelek atau rusak karena proses sterilisasi dibuang, lalu dipotong sesuai kebutuhan. Eksplan yang sudah dipotong ditanam dalam botol-botol yang berisi media perlakuan. Satu botol media perlakuan berisi satu eksplan. Setelah diisi eksplan, leher botol digarang kembali, dan ditutup dengan menggunakan plastik, serta diikat menggunakan karet gelang, dan dilapisi lagi dengan plastik wrap. Setiap botol kultur yang telah berisi eksplan kemudian diletakkan pada rak kultur yang diberi pencahayaan dengan intensitas 600 lux pada suhu 200 °C.

Penyiapan Ekstrak. Kalus daun murbei dimaserasi-sonikasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 kali bobot kalus selama 30 menit. Dilakukan tiga kali remaserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak cair yang diperoleh dikeringkan dengan menggunakan alat rotavapor.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Kalus Daun Murbei. NLC ekstrak kalus daun Murbei dibuat dengan metode evaporasi pelarut. Lemak padat (setil alkohol), minyak lemak (asam oleat) dilebur di waterbath pada suhu 70 °C, ekstrak etanol 96% kalus daun Murbei yang telah dilarutkan dengan aseton ditambahkan ke dalam leburan. Air murni dan surfaktan (tween 80) dipanaskan pada suhu 70°C. Fase leburan lemak dimasukkan ke dalam campuran fase air dengan diaduk menggunakan magnetik stirrer pada kecepatan 600 rpm. Emulsi diaduk dengan ultra turrax pada kecepatan 23.000 rpm selama 5 menit, kemudian hasil nanopartikel didinginkan dengan air pada suhu 2-5 °C dan diaduk secara cepat. Pembuatan nanopartikel dengan variasi konsentrasi surfaktan dan ko-surfaktan mengikuti Tabel 1. Karakterisasi nanopartikel pada Tabel 2. meliputi ukuran partikel, indeks polidispersitas, zeta potensial dan morfologi

Tabel 1. Formula NLC ekstrak kalus daun murbei.

Bahan	Jumlah (%)				
	I	II	III	IV	V
Ekstrak	1	1	1	1	1
Campuran lemak (Setil alkohol & Asam oleat)	2	2	2	2	2
Surfaktan (Tween 80)	3	4	5	4	4
Ko-surfaktan (Propilenglikol)	7	7	7	6	8
Aseton	12	12	12	12	12
Air murni	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL	ad 50 mL

Tabel 2. Karakterisasi NLC.

Formula	Organoleptik	Ukuran partikel (nm)	Indeks polidispersitas
I	Bentuk : Koloid	248,0	0,462
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
II	Bentuk : Koloid	189,8	0,578
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
III	Bentuk : Koloid	202,9	0,582
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
IV	Bentuk : Koloid	256,3	0,568
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		
V	Bentuk : Koloid	632,8	0,387
	Warna : Kuning kehijauan		
	Bau : Tidak berbau		

Pembuatan Gel Nanostructured Lipid Carrier Ekstrak Kalus Daun Murbei. Karbomer 940 (0,3 g) didispersikan di air murni sebanyak 30 kali dari bobotnya. Trietanolamin dengan bobot yang sama ditambahkan sedikit demi sedikit sambil dihomogenkan dengan pengaduk stirrer sampai terbentuk basis gel. Metil paraben dan propil paraben dimasukkan dalam basis gel. NLC ekstrak kalus daun murbei ditambahkan dalam campuran basis dan diaduk sampai homogen. Propilenglikol dan air murni ditambahkan dan dihomogenkan dengan pengaduk stirrer dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Evaluasi sediaan gel meliputi organoleptik, viskositas dan sifat alir, homogenitas, dan pH.

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak dan Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.) Secara *In Vitro*. Pada pengujian aktivitas inhibisi enzim, uji penghambatan aktivitas enzim tirosinase dilakukan pada konsentrasi enzim tirosinase 75 U/mL, pH 6,8, waktu inkubasi 30 menit, konsentrasi substrat 10 mM dan suhu 37°C. 4 jenis larutan yang diuji, yaitu larutan blanko sampel, sampel, blanko kontrol dan kontrol. IC_{50} adalah konsentrasi yang memberikan 50% hambatan aktivitas enzim tirosinase. Pengukuran IC_{50} penghambatan tirosinase asam kojat dilakukan pada lima konsentrasi yaitu 50, 20, 10, 5 dan 2,5 ppm. Larutan sampel terdiri dari larutan ekstrak kalus daun Murbei dan larutan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei yang telah dilarutkan dengan etanol 96% kemudian dibuat konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 µg/mL. Selama uji aktivitas, larutan uji diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit. Sejumlah 70 µL larutan sampel, 110 µL larutan L-DOPA, dan 30 µL larutan enzim tirosinase dimasukkan ke dalam 96-well microtiter plate. Masing-masing sampel dibuat blanko (tanpa larutan enzim tirosinase). Diinkubasi selama waktu inkubasi optimum 30 menit pada suhu 37 °C. Campuran diukur absorbansinya menggunakan

microplate reader pada panjang gelombang optimum.

Uji penghambatan enzim tirosinase ditentukan dengan mengukur absorbansi menggunakan microplate reader pada panjang gelombang optimum. Absorbansi yang terukur merupakan absorbansi pembentukan dopakrom. Dari absorbansi pengukuran ini dapat dihitung presentase inhibisi tirosinase menurut metode dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi tirosinase} = \frac{(B - S)}{B} \times 100$$

B = absorbansi kontrol dikurangi blanko kontrol ($B_1 - B_0$)

S = absorbansi sampel dikurangi blanko sampel ($S_1 - S_0$)

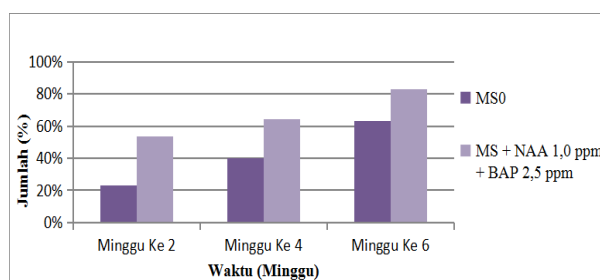
IC_{50} dihitung dengan menggunakan absorbansi persamaan regresi linier, konsentrasi sampel (dalam logaritma) sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan $y = a + bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} . Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultur Eksplan Daun Murbei. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa munculnya kalus berasal dari perlukaan saat penanaman dan penggunaan jenis media serta zat pengatur tumbuh yang dapat menstimulasi pembentukan kalus yakni ZPT NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm. Pertumbuhan kalus diawali dengan pembengkakan pada eksplan kemudian sayatan eskplan tersebut akan bergelombang (*swelling*), hal ini terjadi dikarenakan adanya rangsangan dan respon terhadap zat pengatur tumbuh pada bagian luka tanaman tersebut. Terbentuknya kalus berasal pula dari suplai hor-

mon alamiah atau buatan dari luar ke dalam eksplan. Prosentase hasil tumbuh kalus didapatkan dengan cara membandingkan jumlah kalus yang muncul pada penanaman pertama kali dengan menggunakan media MS_0 dan media MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm, masing-masing sebanyak 65 botol. Media tanpa ZPT (MS_0) digunakan sebagai blangko untuk membandingkan kecepatan induksi kalus dari eksplan daun Murbei dengan media dengan penambahan ZPT (MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm). Pada media MS_0 pada ming-

gu ke 2, 4, dan 6 didapatkan hasil eksplan daun Murbei yang tumbuh menjadi kalus secara berturut-turut yaitu 15, 26, 41 botol. Sedangkan pada media MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm pada minggu ke 2, 4, dan 6 didapatkan hasil eksplan daun Murbei yang tumbuh menjadi kalus secara berturut-turut yaitu 35, 42, 54 botol, lalu dijadikan dalam bentuk persen. Hasil pertumbuhan eksplan pada media MS_0 dan MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik pengaruh zat pengatur tumbuh pada induksi media inisiasi MS_0 dan MS + NAA 1,0 ppm + BAP 2,5 ppm.

Hasil menunjukkan bahwa prosentase kalus yang terinduksi pada perlakuan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm mampu menginduksi kalus tercepat yaitu pada hari ke 14 sebesar 53,58% pada seluruh sampel media kultur kalus. Sedangkan prosentase kalus yang terinduksi pada perlakuan media MS_0 dapat dilihat pada hari ke 14 hanya sebesar 23,18%. Prosentase yang sangat kecil dalam pertumbuhan kalus pada media MS_0 disebabkan karena tidak adanya penambahan hormon yang dapat merangsang meningkatnya proses pembelahan sel kalus.

Setiap bagian tanaman tertentu memiliki kadar kandungan auxin dan sitokinin yang berbeda-beda. Namun pada penelitian ini digunakan daun pada mata tunas ketiga dari pucuk karena berdasarkan penelitian Galston (1995) pada sel yang tua, aktivitas oksidasi meningkat, sehingga kandungan NAA dan BAP menurun, dalam waktu lama tidak akan terbentuk kalus, sebab kemampuan membentuk jaringan baru tidak ada. Namun sebaliknya pada bagian tanaman yang masih muda maka selnya akan aktif membelah karena NAA dan BAP masih banyak terkandung pada sel yang masih muda tersebut sehingga hasil kultur yang kita dapat sesuai dengan yang ingin kita dapat.

Prosentase yang besar dalam pertumbuhan kalus pada media MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm dapat disebabkan karena NAA merupakan hormon yang mampu berperan menginduksi terjadinya kalus karena memiliki aktivitas yang kuat untuk memacu proses embryogenesis, dediferensiasi sel, menekan organogenesis, mendorong proses morfogenesis kalus dan menjaga pertumbuhan kalus tanaman. Sedangkan BAP berfungsi untuk pembelahan

sel dan proliferasi kalus. BAP yang ditambahkan pada media kultur akan menaikkan laju sintesis protein sehingga mendorong pembesaran dan pembelahan sel secara cepat. Pada penggunaannya kombinasi konsentrasi media MS dengan penambahan ZPT harus optimal dan memiliki kesetimbangan sehingga dapat menginduksi kalus.

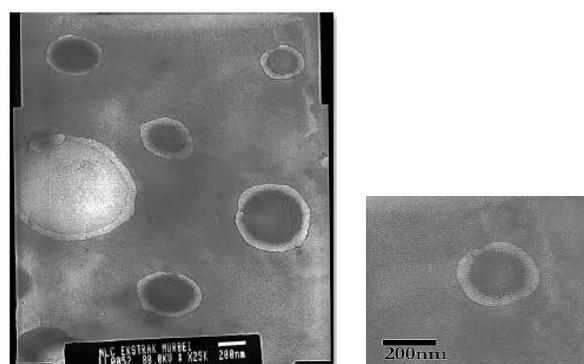
Biomassa yang terbentuk pada kalus menghasilkan pertumbuhan yang berbeda-beda setiap perlakuan. Pada penelitian ini biomassa yang terbentuk pada media MS_0 memiliki biomassa rata-rata sebesar 0,607 gram dan pada media MS dengan penambahan NAA 1,0 ppm dan BAP 2,5 ppm memiliki biomassa rata-rata sebesar 1,084 g. Berdasarkan hasil pengamatan kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) memiliki tekstur kalus yang kompak sehingga dapat mengakumulasi banyak metabolit sekunder didalamnya dan hasil pengamatan warna kalus berwarna kehijauan yang mengindikasikan terdapat banyak klorofil didalamnya pada awal pertumbuhan kalus tetapi seiring waktu berubah menjadi warna putih kecokelatan karena disebabkan adanya peningkatan kadar fenol di dalam kalus tersebut.

Pembuatan Nanopartikel Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.). Ukuran partikel NLC pada formula I, II, III, IV, dan V didapatkan ukuran partikel terkecil yaitu pada formula II sebesar 189,8 nm, namun pada formula V terdapat perbedaan ukuran yang jauh lebih besar yaitu sebesar 632,8 nm dibandingkan dengan ukuran partikel yang dihasilkan dari formula I-IV, ukuran partikel formula V memiliki ukuran partikel yang paling besar meskipun pada dasarnya ukuran partikel pada formula V masih memasuki

rat-rata diameter partikel NLC, seperti yang diketahui bahwa rata-rata diameter partikel NLC yaitu sebesar 10-1000 nm, besarnya ukuran partikel pada formula V dapat disebabkan oleh penambahan konsentrasi kosurfaktan yang lebih besar dibandingkan dengan empat formula lainnya. Hal ini dapat dikaitkan dengan besarnya rasio dari campuran surfaktan (tween 80) dengan kosurfaktan (propilenglikol). Pada formula NLC, ketika komponen campuran surfaktan dan kosurfaktan dinaikkan, maka akan menyebabkan ukuran partikel menjadi lebih besar. Sehingga dibutuhkan konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan yang tepat agar pada formulasi NLC yang dibuat ukuran partikel yang didapatkan dapat lebih kecil dan lebih seragam dengan formula lainnya⁽⁶⁾.

Indeks polidispersitas merupakan indeks distribusi ukuran nanopartikel. Rentang indeks polidispersitas berada pada 0 – 1, indeks polidispersitas mendekati nilai 0 menunjukkan ukuran nanopartikel terdistribusi homogen, atau tidak terjadi agregasi. Nilai indeks polidispersitas yang mendekati nilai 1 menunjukkan nanopartikel cenderung akan beragregasi karena perbedaan rentang ukuran nanopartikel cukup besar. Nilai indeks polidispersitas pada formula I, II, III, IV, dan V berada pada rentang 0,3-0,5, hal ini menunjukkan bahwa ukuran nanopartikel terdistribusi cukup homogen. Indeks polidispersitas dipengaruhi kecepatan pengadukan.

Foto morfologi nanopartikel formula II menggunakan TEM dapat dilihat pada Gambar 2 berbentuk sferis dan ekstrak terjerap pada NLC sesuai dengan pengukuran ukuran nanopartikel sebesar 189,8 nm menggunakan *particle size analyzer*.



Gambar 2. Foto hasil TEM NLC ekstrak kalus daun murbei formula II pada perbesaran 25000 x.

Didapatkan yield value dari basis gel sebesar 22440,20 dyne/cm³ dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei sebesar 17035,52 dyne/cm³. Angka tersebut menunjukkan bahwa yield value dari basis gel (blanko) lebih besar dibandingkan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei. Hal ini dikarenakan pada basis gel (blanko) hanya terdiri dari basis gel saja tanpa adanya tambahan NLC ekstrak kalus daun Murbei, Ini menunjukkan bahwa

Pembuatan Gel Nanostructured Lipid Carrier (NLC) Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.). Hasil menunjukkan bahwa gel berwarna kekuningan, semi padat dan tidak berbau. Gel blanko berwarna bening, semi padat dan tidak berbau. Gel blanko dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei membentuk gel yang homogen, tidak terjadi pemisahan antar basis gel maupun antara basis dengan NLC ekstrak kalus daun Murbei. Evaluasi viskositas dilakukan dengan menggunakan Viscometer Brookfield LV. Pengujian viskositas dilakukan pada basis gel dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei, sebanyak 3 kali pengulangan pada suhu kamar dengan spindle nomor 4. Dengan nilai kv sebesar 673,7 didapatkan rata – rata viskositas dari 3 kali pengulangan dengan menggunakan seri I, seri II, dan seri III sebesar 910000 cPs untuk basis gel dan 530000 cPs untuk gel NLC ekstrak kalus daun Murbei. Perbedaan ini dipengaruhi oleh penambahan *Nanostructured Lipid Carrier* ekstrak akar Murbei yang cair.

Evaluasi sifat alir menunjukkan gel memiliki sifat alir tiksotropik plastis yang ditunjukkan dengan garis kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik. Hal ini menunjukkan bahwa gel memiliki viskositas yang lebih rendah pada harga *rate of shear* yang menurun dibandingkan *rate of shear* pada kurva menaik. Sifat alir tiksotropi didefinisikan sebagai pemulihan isoterm dan lambat pada pendiaman suatu bahan yang kehilangan konsistensinya karena *shearing*. Grafik yang terbentuk pada basis gel dan gel NLC ekstrak kalus daun Murbei, tidak melewati titik sumbu (0,0) melainkan memotong sumbu *shearing stress*.

dengan penambahan NLC ekstrak kalus daun Murbei pada formula gel, dapat menurunkan nilai yield value dari basis gel (blanko) tersebut. Semakin besar nilai yield maka semakin sulit untuk dituang dan menyebar pada penggunaannya. Nilai yield sangat bergantung pada viskositas sehingga bila terjadi perubahan viskositas maka juga akan mempengaruhi nilai yield. Sehingga gel NLC ekstrak kalus daun Murbei lebih

mudah mengalir dari wadahnya dibandingkan basis gel (blanko) tanpa NLC ekstrak kalus daun Murbei.

Aktivitas Penghambatan Enzim Tirosinase Ekstrak dan Gel NLC Ekstrak Kalus Daun Murbei (*Morus alba* L.) Secara *In Vitro*. Hasil pengujian diperoleh nilai IC_{50} asam kojat 13,26 ppm dan termasuk dalam kriteria aktivitas penghambatan yang tinggi. Untuk pengujian aktivitas penghambatan enzim tirosinase ekstrak dan sediaan gel NLC menunjukkan bahwa kalus daun Murbei yang berumur 4 bulan dengan pemberian zat pengatur tumbuh NAA dan BAP dengan konsentrasi 1,0 ppm dan 2,5 ppm pada media perlakuan mempunyai aktivitas penghambatan enzim tirosinase dengan nilai IC_{50} sebesar 72,51 ppm. Aktifitas tersebut hampir sama dengan aktifitas pada ekstrak etanol 96% akar murbei dengan nilai IC_{50} sebesar 75,37⁽⁵⁾. Hal tersebut menunjukkan potensi kalus daun murbei sama besar dengan akar murbei dalam penghambatan aktifitas enzim tirosinase dan mempunyai potensi dalam pencerahan kulit.

Aktivitas penghambatan enzim tirosinase gel NLC ekstrak kalus daun Murbei memberikan hasil nilai IC_{50} sebesar 79,69 ppm. Terjadi penurunan nilai aktifitas penghambatan enzim tirosinase disebabkan pengaruh formulasi gel dimana komposisi atau polimer yang digunakan pada pembuatan gel mengurangi aktivitas penghambatan enzim.

SIMPULAN

Zat pengatur tumbuh NAA dan BAP menginduksi pertumbuhan kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) pada minggu ke-6 sebesar 83,18%. Ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dan Gel NLC ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat memberikan aktivitas inhibisi enzim tirosinase yang kuat IC_{50} 72,51 $\mu\text{g/ml}$ dan 79,69 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak kalus daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat dibuat menjadi *Nanostructured Lipid Carriers* dengan karakterisasi ukuran partikel sebesar 189,8 nm, dengan indeks polidispersitas sebesar 0,578, morfologi partikel berbentuk sferis, dan zeta potensial sebesar 7,37 mV. *Nanostructured Lipid Carriers* ekstrak daun Murbei (*Morus alba* L.) dapat dibuat menjadi sediaan gel dengan karakteristik kuning muda, berbentuk semi padat, tidak berbau, homogen, memiliki viskositas 530000 cPs, memiliki sifat alir tiksotropik plastis dan memiliki pH sebesar 5,26.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Universitas Pancasila atas dana hibah penelitian *In house* Universitas Pancasila.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hakim EH, syah YM, juliawati LD, mujahidin D. Aktifitas antioksidan dan inhibitor tirosinase beberapa stilbenoid dari tumbuhan Moraceae dan Dipterocarpaceae yang potensial untuk bahan kosmetik. Bandung: Institut Teknologi Bandung; 2008. 13(2): h.33-40
2. YZhou, J., *et al.* Variations in the Levels of Mulberroside A, Oxyresveratrol, and Resveratrol in Mulberries in Different Seasons and during Growth, *The ScientificWorld Journal*, 2013. Article ID 380692.
3. Hendaryono DPS, Wijayani A. Teknik kultur jaringan; pengenalan dan petunjuk perbanyakan tanaman secara vegetatif-modern. Yogyakarta: Kanisius. 1994. h.26-8, 31, 33,72.
4. Santoso B, Prayudyansih R, Rismawati A. Kultur jaringan BAP dan NAA tanaman Murbei (*Morus alba* L.) varietas KI 14 secara *in vitro*. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*. 2006;6(2): h.157-64.
5. Faizatun, Anwar E., Djajadisara J., Mardiyati E. The study of antioxidant and antityrosinase activity of extract from mulberry root (*Morus alba* L.). *J. Pharm. Sci. & Res.* Vol. 9(10). 2017. p. 2004-8.
6. Faizatun F. and Asto Dayu S. In vitro determination of sun protection factors on ethanol extract and nanostructured lipid carrier-based gel extract of mulberry root (*Morus Alba* L.). *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 11, Special issue 1, 2018. p. 138-40.

Potensi Minyak Atsiri Temu Kunci (*Kaempferia pandurata*) dan Komponennya sebagai Pelangsing Aromaterapi

(The Potency of Essential Oil and Components of *Kaempferia pandurata* as Slimming Aromatherapy)

IRMA H. SUPARTO^{1,2,3*}, RAHMI NUR WAHIDAH¹, IRMANIDA BATUBARA^{1,2}

¹Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor

²Pusat Studi Biofarmaka Tropika, Institut Pertanian Bogor

³Pusat Studi Satwa Primata, Institut Pertanian Bogor

Diterima: 25 Februari 2020, Disetujui: 22 April 2020

Abstrak: Temu kunci (*Kaempferia pandurata*) merupakan salah satu tanaman aromatik Indonesia yang mengandung minyak atsiri. Penelitian ini bertujuan memisahkan senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri temu kunci dan menganalisis potensi senyawa aktifnya sebagai pelangsing aromaterapi. Minyak atsiri diperoleh dari hasil distilasi uap rimpang temu kunci dan rendemen yang diperoleh sebesar 0,5% (v/b). Minyak atsiri difraksionasi menggunakan kromatografi kolom dan diperoleh 7 fraksi. Berdasarkan hasil analisis kromatografi gas-spektrometer massa, komponen utama minyak atsiri temu kunci adalah o-simena, sedangkan komponen utama pada fraksi 1 adalah limonena. Fraksi 1, kamfor, dan minyak atsiri diuji aktivitasnya sebagai pelangsing aromaterapi secara *in vivo* menggunakan tikus putih jantan dewasa *Sprague Dawley*. Inhalasi kamfor dan minyak atsiri menunjukkan kecenderungan respons peningkatan bobot badan tikus yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif (pakan tinggi kolesterol). Kelompok tikus yang diinhalasi fraksi 1 memberikan respons peningkatan bobot badan terendah walau tak berbeda nyata, yakni 47% (b/b) dengan konsumsi pakan terendah setiap minggunya ($P < 0,05$). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi 1 berpotensi sebagai pelangsing aromaterapi.

Kata kunci: Aromaterapi, inhalasi *in vivo*, *Kaempferia pandurata*, limonena, pelangsing.

Abstract: *Temu kunci (Kaempferia pandurata)* is one of the Indonesian aromatic plants containing essential oils. The objective of this study was to evaluate the potential compound in temu kunci essential oils that has activities as slimming aromatherapy. Essential oil was obtained from the rhizome by distillation then further fractionated using column chromatography and obtained 7 fractions. Based on the gas chromatography mass spectrometer, the main component of the essential oil of temu kunci was o-cymene, while the main component in fraction 1 was limonene. Fraction 1, camphor and the essential oils were tested *in vivo* as slimming aromatherapy using adult male Sprague Dawley rats given for 5 weeks. Animals received inhalation of camphor and essential oils showed a higher tendency to increase body weight compared to animals given fraction 1. Animals treated with fraction 1 showed the lowest body weight gain response (47%) eventhough not significant, however it gave the lowest total consumption per weekly ($P < 0.05$). Therefore, based on these results, fraction 1 that has limonene is potential as slimming aromatherapy agent.

Keywords: Aromatherapy, *in vivo* inhalation, *Kaempferia pandurata*, limonena, slimming.

*Penulis korespondensi
E-mail: irmasu@apps.ipb.ac.id

PENDAHULUAN

KEGEMUKAN atau obesitas didefinisikan sebagai akumulasi lemak berlebihan yang merupakan faktor risiko menyebabkan penyakit kronis, seperti diabetes, jantung, dan kanker⁽¹⁾. Berbagai upaya dilakukan untuk menurunkan bobot badan dengan cara olah raga, diet rendah kalori, konsumsi obat pelangsing modern maupun tradisional⁽²⁾. Eksplorasi obat-obatan tradisional atau dari tanaman obat makin meningkat dengan harapan lebih murah dan lebih aman.

Obat pelangsing umumnya diminum secara oral, sedangkan metode lainnya seperti metode aromaterapi belum banyak dikembangkan. Metode aromaterapi ini memanfaatkan komponen minyak atsiri dari tanaman obat. Komponen aroma dari minyak atsiri akan menstimulasi sistem olfactory saat dihirup dan memengaruhi saraf otonom yang berhubungan dengan lipolisis, produksi panas, nafsu makan, dan pada akhirnya dapat mempengaruhi bobot badan⁽³⁾. Respon aromaterapi bervariasi tergantung senyawa utama yang dikandungnya. Senyawa β -elemenona yang merupakan senyawa dominan pada minyak atsiri temulawak dilaporkan dapat menurunkan bobot deposit lemak pada tikus⁽⁴⁾. Demikian pula inhalasi fraksi senyawa sabinena dan fraksi 4-terpineol minyak atsiri bangle pada tikus *Sprague Dawley* menurunkan bobot badan tikus⁽⁵⁾. Minyak atsiri daun sirih merah yang mengandung golongan monoterpena dan seskuiterpena juga dapat menurunkan bobot badan pada tikus⁽⁶⁾. Minyak atsiri daun cengkih fraksi eugenol dengan kadar 1% telah dibuktikan menurunkan bobot badan tikus sampai 13%⁽⁷⁾.

Eksplorasi tanaman yang mengandung minyak atsiri dan berpotensi sebagai pelangsing aromaterapi perlu dilakukan dan dikembangkan, salah satu rimpang yang belum diteliti adalah temu kunci. Rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata*) merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki aroma yang khas. Rimpangnya mengandung minyak atsiri sebesar 1%⁽⁸⁾. Temu kunci dapat digunakan sebagai obat batuk, obat sakit perut, serta obat diuretik⁽⁹⁾. Yun *et al.*⁽¹⁰⁾ melaporkan panduratin A yang terdapat pada temu kunci berpotensi sebagai antikanker. Selain itu, dilaporkan pula bahwa rimpang temu kunci dapat dijadikan sebagai obat antiobesitas dengan cara mengaktivasi protein kinase teraktivasi-AMP⁽¹¹⁾. Oleh karena itu, perlu mengevaluasi kandungan senyawa rimpang temu kunci dan mempelajari senyawa yang dapat berperan sebagai aromaterapi pada uji *in vivo* tikus dewasa jantan *Sprague Dawley*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan-bahan yang digunakan adalah rimpang temu kunci, tikus jantan galur Sprague-Dawley sebagai hewan uji yang diperoleh dari Laboratorium Uji Pusat Studi Biofarmaka Tropika, Institut Pertanian Bogor, pakan tikus standar, pakan tinggi lemak, akuades. Rimpang temu kunci diperoleh dari Unit Konservasi dan Budidaya Biofarmaka Pusat Studi Biofarmaka Tropika Institut Pertanian Bogor

METODE. Preparasi dan Isolasi Minyak Atsiri Temu Kunci. Rimpang temu kunci dicuci dan dibersihkan, kemudian dikeringudarkan. Selama dikeringudarkan, rimpang temu kunci harus terhindar dari sinar matahari agar minyak atsiri yang terkandung di dalamnya tidak menguap. Setelah itu, rimpang temu kunci diiris halus. 3 kg rimpang temu kunci yang telah diiris halus dimasukkan ke dalam distilator *stahl*. Sebanyak 1 kg irisan tersebut dimasukkan ke dalam dandang besar lalu ditambahkan akuades dengan perbandingan sampel dan akuades adalah 1:2 (b:v). Setelah itu, dilakukan proses distilasi uap selama 6 jam dengan suhu berkisar 100-105 °C. Distilat yang diperoleh kemudian didiamkan selama 24 jam dan minyak yang terdapat dalam distilat dipisahkan menggunakan corong pisah.

Pemilihan Eluen Terbaik. Silika gel G₆₀F₂₅₄ digunakan sebagai pelat kromatografi lapis tipis (KLT), pada pelat, minyak atsiri temu kunci yang diperoleh ditotolkan sebanyak 25 μ L. Elusi langsung dilakukan dalam bejana kromatografi yang telah berisi eluen yang telah dijenuhkan ketika totolan sudah kering. Proses elusi minyak atsiri temu kunci dilakukan menggunakan enam jenis pelarut, yaitu n-heksana, aseton, metanol, kloroform, dietil eter, dan etil asetat. Noda yang dihasilkan diamati di bawah lampu UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm dan yang menghasilkan noda paling banyak serta terpisah secara baik dipilih sebagai eluen terbaik. Jika terdapat lebih dari satu eluen terbaik, maka eluen tersebut dicampurkan dengan perbandingan 9:1 hingga 1:9 sehingga diperoleh campuran eluen terbaik untuk pemisahan pada pelat KLT.

Fraksionasi dengan Kromatografi Kolom. Sebanyak 60 g silika gel dikemas dalam kolom dengan diameter dan tinggi kolom, yaitu 2 cm dan 60 cm untuk melakukan fraksionasi pemisahan 4 mL minyak. Jumlah silika gel adalah 15-20 kali jumlah ekstrak dengan perbandingan tinggi adsorben dan diameter kolom adalah 8:1. Minyak atsiri temu kunci dilarutkan dalam eluen terbaik. Komponen ini dipisahkan dengan kromatografi kolom sistem elusi *step gradient* (peningkatan kepolaran) menggunakan

eluen campuran. Eluat ditampung dalam tabung reaksi yang diberi nomor dan dipisahkan pada KLT kembali kemudian diamati di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Eluat yang memiliki faktor retensi (Rf) dan pola KLT yang sama digabungkan sebagai satu fraksi.

Penentuan Senyawa Fraksi Terpilih. Distilat kasar, fraksi dengan jumlah noda terbanyak, dan fraksi dengan jumlah noda sedikit yang diperoleh dari minyak atsiri temu kunci diinjeksikan ke dalam injektor GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) dengan gas pembawa helium. Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan spektrum massa yang terdapat dalam *library index* (MS Wiley Library). Komposisi persentase dihitung dari luas puncak kromatogram ion total hasil analisis dengan GC.

Uji In Vivo. Tikus putih jantan galur *Sprague Dawley* yang digunakan sebanyak 24 ekor yang dikelompokkan secara acak berdasarkan bobot badan menjadi 4 kelompok (n=6 ekor). Sebelum perlakuan, semua hewan melalui masa adaptasi selama 2 minggu dan mengonsumsi pakan standar 20 g/ekor/hari, serta minum secara *ad libitum*. Seluruh perlakuan pada hewan coba telah dievaluasi dan disetujui Komisi Etik Hewan Institusi.

Tahap Perlakuan Aromaterapi. Setelah melalui masa adaptasi, diberi perlakuan uji inhalasi distilat kasar minyak temu kunci, kamfor, dan fraksi 1 secara *in vivo* dilakukan selama 5 minggu. Hewan dikandangkan 2 ekor per kandang dan dipasang pipa yang tersambungkan pada botol yang berisikan minyak atsiri⁷⁾. Kelompok I sebagai kontrol positif, yaitu hewan yang hanya mengonsumsi pakan kolesterol tinggi tanpa inhalasi. Tikus kelompok II, III, dan IV diberi pakan kolesterol tinggi dan inhalasi aromaterapi secara berurutan, minyak atsiri temu kunci ekstrak kasar, fraksi 1, dan kamfor, masing-masing dengan dosis 0,1% (b/v). Hewan di kandangkan dengan Setiap kelompok tikus yang memperoleh pakan kolesterol tinggi diberikan PTU (propiltiourasil) dengan konsentrasi 0.1% dalam air minumnya. Bobot badan masing-masing tikus ditimbang setiap minggu dan sisa pakan ditimbang setiap hari. Bobot feses dan urin ditimbang setiap 3 hari sekali hingga akhir perlakuan.

Penentuan Bobot Deposit Lemak. Pada hari terakhir perlakuan (minggu ke-7), masing-masing tikus dibius dengan ketamin HCl (80 mg/kg bobot badan) dan *xylazine* (10 mg/kg bobot badan) secara intraperitoneal. Setelah hewan terbius, darah diambil sebanyak-banyaknya (eksanguinis) sampai hewan mati. Konfirmasi hewan mati dengan tidak ada denyut jantung dan pernapasan. Lemak tubuh dikumpulkan dari daerah sekitar samping perut dan kedua testiskuler kemudian ditimbang bobotnya.

Analisis Statistik. Data bobot pakan yang dikonsumsi, bobot badan, dan bobot deposit lemak dari setiap kelompok perlakuan dianalisis menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) dan ANOVA (*Analysis of Variance*) pada taraf kepercayaan 95%. Hasil yang berbeda nyata ($P < 0,05$) dilanjutkan dengan *Duncan's multiple range test* menggunakan program Statistica 6 (USA). Data disampaikan sebagai rerata \pm SD (standar deviasi).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi, Penentuan Eluen Terbaik dan Senyawa Minyak Atsiri. Hasil isolasi minyak atsiri temu kunci sebanyak 0,5% (v/b). Distilat yang dihasilkan berwarna kekuningan dan memiliki aroma yang khas. Minyak atsiri hasil distilasi difraksionasi dengan kromatografi kolom menggunakan eluen terbaik dari hasil KLT. Campuran n-heksana dan kloroform menghasilkan spot yang banyak akan tetapi kurang terpisah. Oleh karena itu, digunakan campuran n-heksana dan etil asetat yang menghasilkan pemisahan spot yang lebih baik walaupun spot yang dihasilkan lebih sedikit dari campuran n-heksana dengan kloroform. Campuran n-heksana dengan etil asetat sering digunakan dalam pemisahan minyak atsiri. Perbandingan campuran n-heksana dengan etil asetat yang digunakan adalah 7:0,25.

Campuran eluen ini menghasilkan 7 spot dengan pemisahan yang cukup baik. Eluen ini digunakan untuk fraksionasi menggunakan kromatografi kolom dengan sistem peningkatan kepolaran. Fraksi dengan jumlah spot terbanyak dan fraksi dengan jumlah spot sedikit dipilih untuk uji *in vivo* dan selanjutnya komponen yang terkandung di dalamnya dianalisis menggunakan GC-MS.

Fraksi 1 dan fraksi 7 dipilih karena fraksi 1 mengandung jumlah spot terbanyak, yakni 7 spot, sedangkan fraksi 7 dipilih karena memiliki jumlah spot paling sedikit, yakni 1 spot. Selain jumlah spot, fraksi 1 dipilih karena memiliki rendemen paling banyak dibandingkan fraksi lainnya, yakni sebesar 26,23% (%b/b). Fraksi-fraksi yang dipilih beserta minyak atsiri kasar temu kunci selanjutnya dianalisis menggunakan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS). Walaupun berdasarkan pemisahan KLT fraksi 7 memiliki 1 spot namun, hasil pemisahan menggunakan GC-MS menunjukkan jumlah komponen yang lebih dari 1.

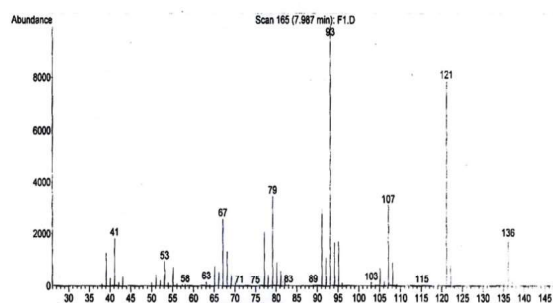
Senyawa yang terdapat pada minyak atsiri temu kunci memiliki kepolaran dan titik didih yang berbeda. Senyawa dengan titik didih lebih rendah akan lebih mudah menguap sehingga memiliki waktu retensi

yang lebih cepat dibandingkan senyawa lainnya yang memiliki titik didih lebih tinggi. Hasil pemisahan GC-MS ditunjukkan dalam bentuk kromatogram ion total yang merupakan hubungan waktu retensi dengan intensitas (Gambar 1).

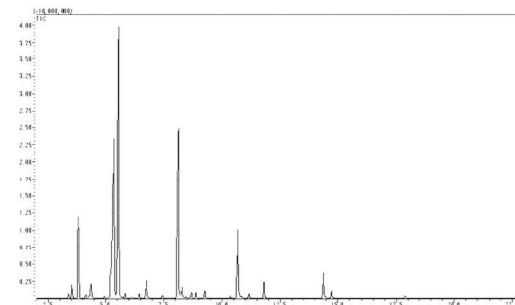
Puncak-puncak pada kromatogram kemudian ditentukan jenis senyawanya menggunakan spektrum massa tiap puncak dan senyawa berdasarkan perbandingan spektrum massa yang dihasilkan dengan spektrum pada *library* dirangkum pada Tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi terpenoid dalam minyak atsiri kasar, fraksi 1, dan fraksi 7.

Golongan	Nama senyawa	Minyak Kasar (%)	Fraksi 1 (%)	Fraksi 7 (%)
Monoterpena	Kamfena	8,00	31,21	0,24
	p-simena	-	9,47	-
	Limonena	-	44,94	-
	β -mirsena	-	2,91	-
	α -pinena	-	2,64	-
	o-simena	31,79	-	0,41
	β -pinena	6,38	-	-
	Kamfor	18,32	-	-
Monoterpena alkohol	1,8-sineol	24,07	-	1,43
	Geraniol	-	-	50,88
	Borneol	-	-	11,11
	α -terpineol	-	-	19,88
	Trans-linalol	-	-	1,32
	Oleil alkohol	-	-	2,83



(a)



(b)

Gambar 1. Kromatogram GC-MS (a) fraksi 1 dan (b) minyak atsiri temukunci.

Komponen utama minyak atsiri temu kunci terbagi menjadi 2 golongan, yakni golongan monoterpena (kamfena, o-simena, β -pinena, dan kamfor) dan golongan monoterpena alkohol (1,8-sineol) berdasarkan hasil GC-MS. Senyawa dominan pada minyak temu kunci adalah o-simena, yakni 31,79%. Fraksi 1 hanya mengandung golongan monoterpena (kamfena, p-simena, limonena, β -mirsena, dan α -pinena) dengan limonena sebagai senyawa dominan (45%). Fraksi 7 mengandung senyawa monoterpena alkohol (1,8-sineol, geraniol, borneol, α -terpineol, trans-linalool, dan oleil alkohol) dan sedikit monoterpena (kamfena dan o-simena).

Senyawa dominan pada fraksi ini adalah geraniol (50,88%). Komponen pada minyak atsiri temu kunci yang ditemukan pada penelitian ini mirip dengan yang telah dilaporkan Miksusanti et al., yaitu α -pinena, kamfena, o-simena, kamfor, geraniol, dan 1,8-sineol⁽¹²⁾.

Minyak atsiri temu kunci dan fraksi terpilih diinhalasi terhadap hewan uji untuk mengetahui aktivitasnya sebagai pelangsing aromaterapi. Fraksi terpilih yang diinhalasikan pada hewan uji adalah fraksi 1 dan kamfor. Pemilihan kamfor dikarenakan rendemen kamfor yang terkandung pada minyak atsiri temu kunci cukup besar sehingga efek inhalasi

distilat temu kunci, fraksi 1 yang tidak mengandung kamfor, dan kamfor dapat diketahui serta diharapkan memberikan respon yang berbeda.

Uji *In Vivo* Aromaterapi. Minyak atsiri temu kunci distilat kasar, fraksi 1, dan kamfor diinhalasikan terhadap tikus dewasa jantan jenis *Sprague Dawley* dengan konsentrasi 0,1% selama 5 minggu. Sebelum perlakuan, hewan uji diadaptasi terlebih dahulu selama 2 minggu guna mengondisikan lingkungan, nutrisi, dan fisiologis dari hewan uji. Efek inhalasi terhadap peningkatan bobot badan dan konsumsi pakan disajikan pada Tabel 2.

Bobot badan seluruh hewan baik tanpa perlakuan maupun dengan perlakuan tidak menunjukkan perbedaan baik sebelum maupun sesudah perlakuan selama 5 minggu ($P>0,05$). Hewan yang menghirup fraksi 1 ada kecenderungan memiliki bobot badan dan peningkatan bobot badan terendah dibandingkan kelompok lainnya, walaupun tak berbeda nyata ($P>0,05$). Hal ini didukung dengan total konsumsi pakan per ekor setiap minggunya, kelompok yang diberi aroma fraksi 1 secara signifikan menurun jumlah pakan yang dikonsumsi dibandingkan kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan lainnya.

Tabel 2. Rerata bobot badan, peningkatan bobot badan dan konsumsi pakan kelompok perlakuan hewan uji.

Kelompok	Bobot badan (g)		Peningkatan bobot badan (%) ($P>0,05$)	Konsumsi pakan (g) / ekor/minggu ($P<0,05$)
	Sebelum perlakuan ($P>0,05$)	Sesudah perlakuan ($P>0,05$)		
Kontrol positif (I)	170,67 ± 12,54	222,50 ± 13,56	51,83	157,70 ± 1,17b
Distilat kasar (II)	183,83 ± 9,45	237,67 ± 14,01	53,84	158,20 ± 6,30b
Fraksi 1 (III)	159,50 ± 5,78	206,67 ± 7,17	47,17	142,10 ± 7,67a
Kamfor (IV)	179,75 ± 11,51	238,00 ± 15,23	58,25	161,70 ± 2,80b

Angka yang diikuti oleh huruf superscripts yang sama tidak berbeda nyata pada taraf uji ($P<0,05$) (uji rentang berganda Duncan)

Berdasarkan hasil setelah diberikan perlakuan aromaterapi selama 5 minggu, kelompok yang memperoleh distilat kasar temu kunci dan kamfor cenderung mengalami peningkatan bobot badan yang lebih serta konsumsi pakannya dibandingkan yang memperoleh fraksi 1, walau tak berbeda nyata ($P>0,05$).

Fraksi 1 yang mengandung senyawa dominan limonena dapat menahan peningkatan bobot badan walaupun belum menunjukkan potensi sebagai pelangsing walaupun secara nyata menahan jumlah konsumsi pakan ($P<0,05$). Hal ini dibuktikan dengan fraksi 1 mengalami peningkatan terendah walaupun pada awal studi bobot badan terendah tetapi tak berbeda nyata ($P>0,05$). Hal ini kemungkinan fraksi 1 dapat menekan nafsu makan sehingga memiliki bobot badan yang rendah dibandingkan dengan kelompok yang diinhalasi dengan kamfor dan distilat kasar. Menurut Sun *et al.*, pemberian limonena secara oral dapat menurunkan bobot badan serta menurunkan kolesterol pada tikus⁽¹³⁾. Selain itu, telah dilaporkan juga bahwa inhalasi limonena, kompo-

nen utama pada minyak jeruk, dapat mengurangi nafsu makan dan menurunkan bobot badan⁽¹⁴⁾.

Hasil pengukuran bobot deposit lemak pada minggu ke-5 akhir perlakuan ditampilkan pada Tabel 3.

Bobot deposit lemak dari sekitar abdomen dan para-testikular dari seluruh kelompok hewan baik yang kontrol maupun yang menghirup aromaterapi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($P>0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa tidak terjadi suatu mobilisasi deposit lemak yang dapat mempengaruhi perubahan bobot badan. Hasil ini sesuai dengan bobot badan hewan yang tidak ada pengaruh setelah diterapi. Kemungkinan lama perlakuan selama 5 minggu terlalu singkat untuk berpengaruh terhadap penurunan bobot badan. Mursito menyatakan bahwa penurunan aktivitas motorik dapat menyebabkan deposit lemak pada tubuh menjadi lebih besar karena lemak yang dibakar menjadi lebih rendah⁽¹⁵⁾. Hal ini dapat juga dipengaruhi kondisi perkandangan yang kurang diberikan pengayaan lingkungan agar hewan coba dapat melakukan aktivitas motorik yang lebih alami⁽¹⁶⁾.

Tabel 3. Bobot deposit lemak tubuh seluruh kelompok pada akhir perlakuan ($P>0,05$).

Kelompok	Deposit lemak (g)
Kontrol positif (I)	3,20 ± 0,60
Distilat kasar (II)	3,22 ± 0,96
Fraksi 1 (III)	3,46 ± 0,33
Kamfor (IV)	4,54 ± 0,71

SIMPULAN

Fraksionasi minyak atsiri temu kunci dengan eluen terbaik n-heksana:etil asetat (7:0.25) menghasilkan sebanyak 7 fraksi. Berdasarkan hasil GC-MS, senyawa utama yang terdapat pada minyak atsiri temu kunci adalah o-simena, sedangkan pada fraksi 1 adalah limonena. Berdasarkan hasil uji in vivo pada tikus dewasa jantan Sprague Dawley yang diberi pakan tinggi lemak dan kolesterol selama 5 minggu menunjukkan fraksi 1 yang mengandung limonena berpotensi sebagai pelangsing aromaterapi dengan cara menurunkan konsumsi pakan walaupun belum cukup untuk menurunkan bobot badannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari payung penelitian aromaterapi yang telah memperoleh dana penelitian internal Pusat Studi Biofarmaka Tropika (TropBRC) Institut Pertanian Bogor terkonjugasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Lean M, Lara J, O'Hill J. ABC of Obesity: Strategies for preventing obesity. *J Brit Med.* 2006. 333. p. 959-62.
- Dachriyanus, Delpa O, Rika O, Olivia E, Suhatri, Mukhtar MH. Efek a-mangostin terhadap kadar kolesterol LDL darah mencit putih jantan serta penentuan letal dosis 50 (LD50). *J Sains Tek Far.* 2007. 12(2). h. 64-72.
- Batubara I, Suparto I, Sadiah S, Matsuoka R, Mitsunaga T. Effect of zingiber zerumbet essential oil and zerumbone inhalation on body weight of Sprague dawley rat. *Pak J Biol Sci.* 2013, 16(19). p. 1028-33.
- Batubara I, Anggraeni A, Darusman LK.. Inhalasi aroma temulawak terhadap bobot badan tikus. *Jurnal Bahan Alam Indonesia* . 2013. Vol 8(3): 187-91.
- Batubara I, Wulandari R, Djauhari E. Minyak atsiri bangle (*Zingiber purpurem*) dan senyawa aktifnya sebagai pelangsing aromaterapi secara in vivo. Pemenang III Kategori Peneliti Riset-MTIC Award. 2012.
- Darusman, L.K., Batubara, I. Utami, M.R. Fractionation of active components from piper cf. fragile essential oil as aromatherapy for anti-obesity. *Acta Hort. (ISHS).* 2014. 1023:23-8.
- Hasim F, Batubara I, Suparto IH, 2016. The potency of Clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil as slimming aromatherapy by in vivo assay. *International Journal of Pharma and Bio Science.* 7(1):110-6.
- Hayani E. Pemisahan komponen rimpang temukunci menggunakan kromatografi kolom. *J Teknik Pertanian.* 2007. 12. p. 35-7.
- Hariana A. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Jakarta:Penebar Swadaya. 2007.
- Yun JM, Kweon HJ, Hwang JK, Mukhtar H. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145. *J Carc Ad Acc* 2006. 27(7). p. 1454-64.
- Kim YD, Kim SM, Kim BM, Hwang JK, Sa KB. *Boesenbergia pandurata* attenuates diet-induced obesity by activating AMP-activated protein kinase and regulating lipid metabolism. *J Mol Sci Int.* 2012. 13(1). p. 994-1005.
- Miksusanti, Laksmi BS, Ponco B, Syarif R, Mulyadi GT, Yusuf S. Aktivitas antibakteri minyak atsiri temu kunci terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan aplikasinya dalam film edible pati sagu. *J Penelitian Sain.* 2007. 10(3). h. 345-54.
- Sun J. D-limonene: safety and clinical application. *J Alt Med.* 2007. 12(3) p. 259-64.
- Shen J, Nijima A, Tanida M, Horri Y, Maeda K, Nagai K. Olfactory stimulation with scent of grapefruit oil affects autonomic nerves, lipolysis and appetite in rats. *Neurosci Lett.* 2005. 380. p. 289-94.
- Mursito B. Ramuan untuk Pelangsing Tubuh. Jakarta:Penebar Swadaya. 2007.
- Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: Requirements of rodents, rabbits and research. *ILAR Journal.* 2005. 46(2). p. 162-70.