

DAFTAR ISI VOLUME 16

Nomor 2

Oktober 2018

Analisis Ramuan Obat Tradisional untuk Wasir di Pulau Jawa; Studi Etnofarmakologi RISTOJA 2015 Peristiwa Ridha Widhi Astana, Ulfatun Nisa	115-123
Pengaruh Suplementasi Vitamin A pada Pengobatan Pasien TB Paru terhadap Percepatan Konversi Dahak pada Fase Intensif Di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota Alexander Parlindungan Marpaungi, Parluhutan Siagian, Dina Keumala Sari.....	124-130
Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo (<i>Manilkara zapota</i> (L.) Van Royen) Melzi Octaviani, Syafrina	131-136
Aktivitas Antibiotik Isolat Bakteri Kp13 dan Analisa Kebocoran Sel Bakteri <i>Escherichia coli</i> Alfian Syarifuddin, Nanik Sulistyani, Kintoko.....	137-144
Isolasi Senyawa Polifenol <i>Black Garlic</i> dan Uji Toksisitasnya Terhadap Larva Udang (<i>Artemia salina</i> Leach) Santi Nur Handayani, Lidya Cahyo Bawono, Diana Pramesti Ayu, Hesti Nurrizqi Pratiwi.....	145-149
Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Tirosinase <i>In-vitro</i> Krim Ekstrak Akar Manis (<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.) Siti Umrah Noor, Faridah, Pamela Magdalena.....	150-158
Sintesis Senyawa N-(2-Klorobenzoil)-N'-Fenilurea dan Uji Aktivitas Anti Kanker terhadap Sel HeLa Bambang Tri Purwanto	159-165
Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Buah Naga Putih (<i>Hylocereus undatus</i>) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Darah pada Mencit (<i>Mus musculus</i>) Mellova Amir, Juliana Irem Adriana Purukan.....	166-171
The Role of Medicine Pricing Policy for Improving the Aff ordability of Medicines Yusi Anggriani	172-181
Uji Aktivitas Analgesik dan Anti-Inflamasi Sediaan Infusa dan Dekokta Akar <i>Eurycoma longifolia</i> pada Mencit Wina Susana, Indriyani Permatasari, Jessy Florensia, Monita Natalia Siregar, Phebe Hendra	182-187

**JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA
TERAKREDITASI SESUAI SK MENDIKBUD NO. 040/P/2014**

DAFTAR ISI

VOLUME 16

Nomor 2

Oktober 2018

Antidepressant Activity of Some Fractions of the Basil Leaves (<i>Ocimum basilicum</i> L.) on the Swiss Webster Male Mice Muharam Priatna, Yedy Purwadi Sukmawan, Hendy Suhendy	188-193
Efek Serbuk Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) terhadap Jumlah Sel CD4 pada Sukarelawan Sehat Dini Mardhiyani, Endang Darmawan, Akrom	194-199
Pharmacoeconomic Analysis of Using Cephalosporin Group as Prophylactic Antibiotic in Appendicitis in Rumah Sakit Umum Daerah Subang Yulia Wardati, Dytha Andri Deswati, Zainal Muttaqin	200-205
Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (<i>Psychotria viridiflora</i> Reinw. ex. Blume) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa Arlina Ismaryani, Salni, Arum Setiawan, Triwani	206-213
Karakterisasi dan Uji Aktivitas Protein Susu Kerbau (<i>Bubalus bubalis</i>) Fermentasi sebagai <i>Angiotension Converting Enzyme</i> (ACE) <i>Inhibitor</i> Sri Yadi Chalid, Siti Nurbayti, Andhika Fajar Pratama	214-224
Uji Aktivitas Antiinflamasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein Yunahara Farida, Deni Rahmat, Agi Widia Amanda	225-230
Efek Gel Putih Telur terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Lucia Hendriati, Iwan Sahrial Hamid, Teguh Widodo, Chintya Wandasari, Putu Mirah Rista.....	231-237
Efek <i>Spirulina platensis</i> terhadap Analisis Kadar, Gambaran Histopatologi, Ekspresi Insulin dan Glut-4 pada Tikus Wistar yang Diinduksi Streptozotosin Rifqi Ferry Balfas, Nura Ustrina, Kintoko, Sitarina Widyarini, Ayu Shabrina, Adhi Gunawan, Lintang Cahya Saputri, Anandhita Nurwijayanti, Fajar Slamet Riana, Neni Tri Anggraini.....	238-247

Hustrasi pada sampul halaman depan:
Gambar 1 (Hendriati *et al*) halaman 234

JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA
TERAKREDITASI SESUAI SK MENDIKBUD NO. 040/P/2014

Analisis Ramuan Obat Tradisional untuk Wasir di Pulau Jawa; Studi Etnofarmakologi RISTOJA 2015

(Analysis of Traditional Medicine Formula for Hemorrhoid In Java Island; Ethnopharmacology Study RISTOJA)

PERISTIWAN RIDHA WIDHI ASTANA^{1*}, ULFATUN NISA¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tumbuhan Obat dan Obat Tradisional

JL. Raya Lawu No. 11 Tawangmangu Karanganyar

Diterima 10 September 2018, Disetujui 5 Oktober 2018

Abstrak: Penggunaan obat tradisional di masyarakat sudah diakui dan menjadi potensi yang besar bagi negara kita untuk dikembangkan. Salah satu penyakit yang sering diobati menggunakan obat tradisional adalah hemoroid yang dikenal oleh masyarakat sebagai penyakit wasir. Berdasarkan data Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (RISTOJA) tahun 2015 di pulau jawa, terdapat beberapa ramuan yang digunakan penyehat tradisional (HATTRA) untuk menangani keluhan wasir (hemoroid). Untuk melihat potensi pengembangan ramuan dilakukan studi deskriptif meliputi penggunaan ramuan serta kajian ilmiah terhadap ramuan identifikasi tumbuhan obat dan studi literatur. Tumbuhan penyusun ramuan dianalisis untuk menentukan seberapa penting, nilai kegunaan untuk keluhan wasir (hemoroid). Kajian ilmiah dilakukan untuk menilai potensi keamanan dan kemanfaatan melalui data toksisitas dan manfaat hasil penelitian yang telah dilakukan. Hasil yang didapat adalah 37 spesies tumbuhan obat dalam 25 famili yang digunakan dalam ramuan obat tradisional untuk hemoroid. Berdasarkan nilai Frekuensi Sitasi (FC), Nilai Kegunaan (UV) dan studi literatur, *Graptophyllum pictum (L.) Griff.*, *Curcuma longa L.*, *Aloe vera (L.) Burm.f.*, dan *Musa balbisiana* memiliki bukti ilmiah yang cukup banyak untuk dikembangkan lebih lanjut.

Kata kunci: ramuan, pulau jawa, etnofarmakologi, wasir.

Abstract: The using of traditional medicine among community has being accepted and become huge potency to be developed by our country. One of disease which is often treated with traditional medicine is hemorrhoid or in bahasa as known as “wasir”. According to the result of ethopharmacology research of traditional medicine and *jamu* (RISTOJA) 2015 in java island, there are several formulas used by traditional healers to treat hemorrhoid. In order to find potential formulas to be developed, a descriptive study was conducted involving identification of medicinal plant and also literature study about its benefit and toxicity evidences. The plants which named in formula’s ingredient were analyzed to see how important and utility value for hemorrhoid treatment. Literature study was conducted to assess potential benefit and toxicity. The result said there were 37 species of medicinal plant in 25 family used in traditional medicine formula for hemorrhoid. Based on Frequency Citation(FC), Utility Value (UC) and literature study, *Graptophyllum pictum (L.) Griff.*, *Curcuma longa L.*, *Aloe vera (L.) Burm.f.*, and *Musa balbisiana* have enough scientific evidence to be studied further development.

Keywords: formula, java island, ethnopharmacology, hemorrhoid .

*Penulis korespondensi, HP 081220684181
e-mail: drwidhiastana@gmail.com

PENDAHULUAN

ORGANISASI kesehatan dunia (WHO) telah mengakui dan mendukung penggunaan obat tradisional dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit⁽¹⁾. Indonesia dengan segala keanekaragamannya memiliki modal potensial untuk mengembangkan obat tradisional. Dengan adanya ribuan etnis termasuk yang ada di pulau Jawa, terdapat banyak sekali tumbuhan obat yang berpotensi untuk digunakan sebagai obat tradisional⁽²⁾. Pembuatan ramuan obat tradisional oleh penyehat tradisional umumnya didasarkan pada akumulasi pengetahuan lokal dan kebijakan yang telah dipatuhi sebagai tradisi dan hukum adat yang diwariskan dari pendahulu. Pemilihan tumbuhan obat yang digunakan, seringkali hanya berdasarkan pengetahuan turun-temurun dan atau kebiasaan di dalam lingkungan masyarakat⁽³⁾.

Salah satu penggunaan obat tradisional adalah untuk mengobati penyakit hemoroid atau lebih dikenal di masyarakat sebagai wasir. Hemoroid sebenarnya bukanlah termasuk penyakit yang berbahaya, sehingga banyak masyarakat yang melakukan pengobatan sendiri atau menggunakan pengobatan alternatif berupa obat tradisional⁽⁴⁾. Namun karena gejala yang dirasakan oleh penderita wasir terkadang sangat mengganggu, beberapa penyehat tradisional memiliki ramuan tersendiri untuk keluhan ini. Hemoroid sendiri pada dasarnya merupakan pelebaran pleksus vaskular arteri vena yang mengelilingi bagian distal rektum dan kanal anal⁽⁵⁾. Penyakit ini sering dijumpai pada orang dewasa yang berkaitan dengan faktor pekerjaan, asupan makanan yang kurang mengandung serat, obesitas, dan kehamilan⁽⁶⁾. Data menunjukkan bahwa sepuluh juta orang di Indonesia dilaporkan menderita hemoroid. Di RSCM (Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo) Jakarta, hemoroid mendominasi sebanyak 20% dari pasien kolonoskopi⁽⁷⁾.

Dalam riset etnofarmakologi Riset Tumbuhan Obat dan Jamu (RISTOJA) 2015, di pulau Jawa terdapat beberapa ramuan yang digunakan oleh penyehat tradisional untuk menangani keluhan wasir (hemoroid). Di era sekarang, pemakaian tumbuhan obat dalam ramuan tentunya harus didukung dengan bukti ilmiah, supaya penggunaannya menjadi rasional dan dapat diterima di kalangan pengobatan modern^(8,9). Ramuan-ramuan tersebut merupakan suatu potensi untuk dapat dikembangkan lebih jauh. Untuk mendukung hal tersebut, diperlukan studi literatur dan verifikasi mengenai khasiat dan keamanan tumbuhan obat yang digunakan dalam ramuan yang digunakan oleh hattra.

METODE

Sumber data yang digunakan dalam kajian ini didapatkan dari data sekunder hasil RISTOJA 2015 yang disimpan oleh Tim Manajemen Data (Mandat) Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. RISTOJA tahun 2015 di pulau Jawa dilakukan di 6 provinsi meliputi Jawa Barat, DKI Jakarta, Banten, Jawa Tengah, DI Yogyakarta, dan Jawa Timur. Informasi ramuan dan tanaman obat diperoleh dari informan yang merupakan penyehat tradisional yang memiliki keahlian dan kemampuan dalam menggunakan tumbuhan untuk menangani keluhan klien. Untuk menjadi informan, seorang penyehat tradisional harus diakui oleh komunitasnya baik dalam hal pengetahuan maupun keterampilannya lalu ditentukan menggunakan metode purposive sampling berdasarkan informasi tokoh masyarakat, kepala suku, kepala desa, kepala kampung, tokoh informal, dinas kesehatan, puskesmas dan sumber terpercaya lainnya. Jika dalam satu wilayah terdapat lebih dari 1 orang maka penyehat tradisional (hattra) yang dipilih sebagai informan adalah hattra yang paling terkenal, paling ampuh (pasien banyak yang merasa sembuh), dan atau memiliki jumlah pasien paling banyak.

Analisis Tumbuhan Obat. Dari data ramuan untuk wasir yang didapat dari tim Mandat, dilakukan pendataan tumbuhan obat yang menjadi penyusunnya, berikut bagian tanaman yang digunakan. Untuk mengetahui seberapa penting dan tingkat kepercayaan penggunaan tumbuhan tersebut dalam menangani wasir, dilakukan penghitungan frekuensi sitasi (FC) dan nilai kegunaan (UV)⁽¹⁰⁾.

Frekuensi sitasi(FC) untuk setiap tumbuhan obat dihitung menggunakan rumus :

$FC = \frac{\text{jumlah berapa kali tumbuhan obat disebut}}{\text{jumlah total seluruh spesies tumbuhan obat yang disebutkan}} \times 100$ ⁽¹¹⁾.

Sedangkan nilai kegunaan (UV) merupakan metode kuantitatif yang menunjukkan seberapa pentingnya spesies yang dikenal secara lokal⁽¹²⁾. Nilai kegunaan merupakan interpretasi interaksi penduduk terhadap tumbuhan lokal untuk mengobati suatu penyakit tertentu⁽¹¹⁾. Perhitungannya menggunakan rumus :

$UV = U/n$

U adalah jumlah spesies yang disebutkan oleh informan. n adalah jumlah keseluruhan informan yang diwawancarai.

Studi Literatur. Studi literatur dilakukan pada tumbuhan yang memiliki FC lebih tinggi dari 2% dan UV lebih tinggi dari 0,050. Studi dilakukan secara sistematis pada literatur ilmiah yang diterbitkan sebelum Januari 2018, dengan menggunakan mesin pencarian elektronik Pubmed, DOAJ, Scopus dan Google Scholar. Tumbuhan yang dicari mengenai referensi khasiat dan keamanan hanya yang memiliki FC lebih tinggi dari 2% dan UV lebih tinggi dari 0,050. Kata Kunci yang digunakan antara lain: *folk used for hemorrhoid, ethnopharmacology hemorrhoid, traditional method hemorrhoid, effect and toxicity* masing-masing tumbuhan dan lain-lain yang terkait dengan tumbuhan obat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari penyehat tradisional yang menjadi informan di pulau Jawa, terdapat 25 hattra yang mempunyai ramuan khusus untuk mengatasi wasir. Berdasarkan demografinya, sebagian besar informan adalah laki-laki. Mayoritas informan berusia 41 – 60 tahun. Tingkat pendidikan informan bervariasi, mayoritas tidak bersekolah atau tamatan SD-SMP. 12 orang dari 25 informan sudah berpraktek selama 10-20 tahun. Berdasarkan Tabel 1, jumlah rata-rata pasien dalam satu bulan adalah 96,2 pasien.

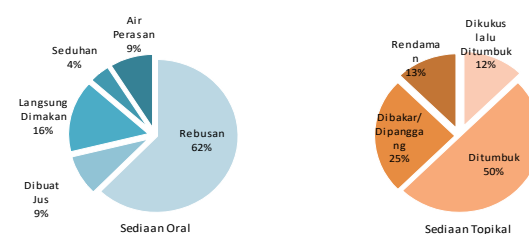
Tabel.1 Sosiodemografi yang berhubungan dengan hattra.

Variabel	Jumlah Hattra
Jenis Kelamin	
- Laki-laki	19
- Perempuan	6
Pengalaman (tahun)	
- < 5 tahun	1
- 5 – 10 tahun	7
- 11 – 20 tahun	12
- > 20 tahun	5
Jumlah rata-rata pasien perbulan	96,2
Tingkat pendidikan	
- Tidak sekolah	10
- SD-SMP	9
- SMA	5
- Perguruan Tinggi	1
Usia	
- ≤ 40 tahun	4
- 41 – 60	15
- > 61	6

Lama seorang penyehat tradisional berpraktek sangat mempengaruhi kemampuannya dalam menentukan jenis penyakit. Sedangkan jumlah pasien dalam satu bulan yang banyak menandakan masyarakat sekitar percaya dan yakin akan kualitas dan kemampuan penyehat tradisional tersebut. Semakin tinggi kualitas penyehat tradisional semakin valid juga datanya digunakan dalam suatu riset etnofarmakologi^(10,11). Berdasarkan data RISTOJA, tidak semua informan

memiliki ramuan khusus untuk hemoroid. Sebaliknya ada beberapa informan yang memiliki ramuan untuk hemoroid lebih dari satu yaitu ID Hattra 41, 44, 47, 51, 53, 57, dan 58. Data yang didapat menyebutkan terdapat 30 ramuan obat tradisional yang digunakan untuk mengobati hemoroid. Dari 30 ramuan tersebut, 13 diantaranya menggunakan kombinasi paling tidak 2 jenis tumbuhan obat sedangkan sisanya memakai tumbuhan tunggal. Mayoritas ramuan dipakai 2-3 kali sehari. Dilihat dari cara penggunaannya, mayoritas informan memberikan ramuan tersebut dengan cara oral/diminum (81,5%). Sebanyak 8 ramuan memiliki cara penggunaan secara topikal. Cara pembuatan ramuan sesuai yang terlihat di gambar 1, 62% sediaan oral dibuat dengan cara direbus menggunakan air. Sedangkan pada sediaan topikal, 4 ramuan dibuat dengan cara menumbuk tumbuhan obat sampai lumat kemudian ditempelkan di dubur/anus.

Beberapa penyehat tradisional memberikan terapi untuk hemoroid dalam bentuk obat luar/topikal. Sediannya dapat berupa tumbukan, minyak, krim, maupun terapi berendam atau rattus. Menurut referensi, hemoroid derajat ringan dapat dilakukan menggunakan medikamentosa baik oral, per-rektal, maupun topikal⁽⁵⁾. Pemakaian sediaan rektal maupun topikal dapat mengurangi kemungkinan efek samping karena langsung diserap di lokasi lesi.



Gambar 1. Cara pembuatan ramuan obat tradisional sediaan oral dan topikal.

Dari tabel 2, diperoleh informasi bahwa ada 37 jenis spesies tumbuhan obat penyusun ramuan obat tradisional yang digunakan informan untuk mengobati hemoroid. Hasil perhitungan nilai FC lebih dari 2,0 dan UV lebih dari 0,050 terdapat pada tumbuhan *Aloe vera (L.) Burm.f.*, *Carica papaya L.*, *Curcuma longa L.*, *Graptophyllum pictum (L.) Griff.*, *Musa balbisiana*, *Piper crocatum Ruiz & Pav.*, dan *Tradescantia spathacea*. Dilihat dari familia, 37 spesies tumbuhan tersebut masuk dalam 25 Familia. Lima familia terbanyak yang disebutkan informan adalah *Zingiberaceae*, *Acanthaceae*, *Arecaceae*, *Compositae*, dan *Euphorbiaceae*. Berdasarkan Tabel 3., bagian tumbuhan yang paling banyak digunakan

dalam ramuan adalah daun (53%), diikuti dengan rimpang dan herba (13%).

Pemakaian daun adalah yang paling umum dilakukan oleh penyehat tradisional. Pertimbangan mereka memakai daun bukan berdasarkan presentase kadungan zat aktif di dalamnya. pada umumnya, mereka memilih daun karena udah diperoleh, dapat diperoleh adalah jumlah yang banyak, dapat beregenerasi, tidak mematikan tumbuhan, mudah dikeringkan, dan mudah dalam penentuan dosis. Penggunaan rimpang terutama pada tumbuhan empon-empon. Sedangkan herba untuk tumbuhan perdu yang mudah tumbuh⁽¹³⁾.

Dalam memilah spesies tumbuhan obat yang layak dianalisis dalam penelitian ini, digunakan perhitungan nilai frekuensi sitasi(FC) dan nilai kegunaan(UV). semakin tinggi nilai FC dan UV suatu tumbuhan, semakin mecerminkan bahwa tumbuhan tersebut umum dan sering digunakan oleh informan untuk mengobati penyakit tertentu⁽¹⁰⁾.

Terdapat 7 tumbuhan yang memiliki nilai FC > 2% dan UV > 0,050. Tumbuhan tersebut adalah *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., *Curcuma longa* L., *Aloe vera* (L.) Burm.f., *Musa balbisiana*, *Carica papaya* L., *Piper crocatum* Ruiz & Pav., dan *Tradescantia spathacea*. Literatur yang ditinjau meliputi penggunaan

Tabel 2. Ramuan obat tradisional yang digunakan informan di pulau jawa untuk menangani wasir.

No ID Hattra	No Ramuan	Daerah	Pema-kaian	Frekuensi pemakaian	Tumbuhan Obat Penyusun Ramuan	
					Nama Latin	Nama Lokal/Daerah
36	021	DKI Jakarta	Oral	1 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu
37	022	Jawa Barat	Oral	1 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu
38	005	Jawa Barat	Oral	2 x sehari	<i>Hemigraphis alternata</i> (Burm.f.) T.Anderson	Sambang Getih
39	003	Jawa Barat	Oral	3 x sehari	<i>Carica papaya</i> L.	Pepaya
40	009	Jawa Barat	Oral	3 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu
41	022	Jawa Tengah	Topikal	1 x sehari	<i>Arenga pinnata</i> (Wurmb) Merr. <i>Ipomoea sp</i> <i>Solanum lycopersicum</i> Lam.	Aren Kangkung Tomat
41	023	Jawa Tengah	Oral	1 x sehari	<i>Curcuma longa</i> L. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Kunyit Adas
42	015	Jawa Tengah	Oral	2 x sehari	<i>Euphorbia tithymaloides</i> L. <i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Sig Sag Handeuleum, Daun ungu
44	010	Jawa Tengah	Topikal	lainnya	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) de Wit	Lamtoro
44	031	Jawa Tengah	Oral	3 x sehari	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	Lidah Buaya
45	001	Jawa Tengah	Topikal	2 x sehari	<i>Carica papaya</i> L.	Pepaya
46	005	Jawa Tengah	Oral	3 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff. <i>Oldenlandia corymbosa</i> L.	Handeuleum, Daun ungu Rumput Mutiara
47	004	D.I. Yogya	Oral	2 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu
47	014	D.I. Yogya	Topikal	2 x sehari	<i>Musa balbisiana</i> Colla	Pisang Batu
48	005	Jawa Timur	Oral, Topikal	2 x sehari	<i>Curcuma longa</i> L.	Kunyit
49	022	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. <i>Curcuma longa</i> L. <i>Musa × paradisiaca</i> L. <i>Salacca zalacca</i> (Gaertn.) Voss	Nanas Kunyit Pisang Salak
50	006	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Kaempferia galanga</i> L. <i>Zingiber officinale</i> Roscoe <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Roscoe ex Sm.	Kencur Jahe Lempuyang Gajah
51	010	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f.) Nees <i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Sambiloto Handeuleum, Daun ungu
51	010	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Gynura pseudochina</i> (L.) DC. <i>Bryophyllum pinnatum</i> (Lam.) Oken <i>Musa balbisiana</i> Colla <i>Psidium guajava</i> L.	Daun Dewa Cocor Bebek Pisang Batu Jambu Biji
52	016	Jawa Timur	Topikal	3 x sehari	<i>Physalis minima</i> L.	Ciplukan
53	006	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Curcuma zanthorrhiza</i> Roxb. <i>Tamarindus indica</i> L. <i>Tradescantia spathacea</i> Sw.	Temulawak Asam Jawa Nanas Kerang
53	007	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr. <i>Tamarindus indica</i> L. <i>Tradescantia spathacea</i> Sw.	Sambung Nyawa Asam Jawa Nanas Kerang
54	023	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Euphorbia thymifolia</i> L.	Patikan Cina
55	023	Jawa Timur	Oral	1 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu
56	006	Jawa Timur	Oral	2 x sehari	<i>Aloe vera</i> (L.) Burm.f.	Lidah Buaya
57	018	Jawa Timur	Topikal	1 x sehari	<i>Cocos nucifera</i> L. <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.	Kelapa Sirih Merah
57	017	Jawa Timur	Oral	3 x sehari	<i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl. <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav.	Mahota Dewa Sirih Merah
58	008	Jawa Timur	Oral	3 x sehari	<i>Graptophyllum pictum</i> (L.) Griff.	Handeuleum, Daun ungu

58	008	Jawa Timur	Oral, Topikal	3 x sehari	<i>Piper betle L.</i>	Sirih
58	008	Jawa Timur	Topikal	3 x sehari	<i>Tinospora crispa (L.) Hook. f. & Thomson</i>	Brotowali
59	038	Banten	Oral	2 x sehari	<i>Graptophyllum pictum (L.) Griff.</i>	Handeuleum, Daun ungu
60	017	Banten	Oral	2 x sehari	<i>Annona muricata L.</i>	Sirsak

etnofarmakologi terhadap penyakit hemoroid secara regional maupun internasional. Selain itu, literatur penelitian baik secara *in vitro*, *in vivo* maupun efek samping yang pernah dilaporkan menggunakan data base elektronik hasilnya dapat dilihat pada Tabel 4. Berdasarkan studi literatur, *Graptophyllum pictum (L.) Griff.*, *Curcuma longa L.*, *Aloe vera (L.) Burm.f.*, dan *Musa balbisiana* memiliki bukti ilmiah yang cukup banyak mengenai penggunaannya untuk penyakit hemoroid. Bukti tersebut meliputi etnofarmakologi, *in vitro* dan *in vivo*, serta keamanan/toksitas. Ramuan obat tradisional yang mengandung tumbuhan-tumbuhan di atas memiliki potensi untuk terus dikembangkan. Ramuan tersebut yaitu ramuan dengan nomor ID Hattra-nomor ramuan : (36-021), (37-022),

(40-009), (46-005), (47-004), (51-010), (55-023), (58-008), (59-038), (41-023), (48-005), (49-022), (44-031), (56-006), (47-014), dan (51-010).

Meskipun tumbuhan yang lain tidak memiliki cukup bukti mengenai penggunaan empiris untuk hemoroid, namun bukti adanya efek-efek yang mendukung pengobatan hemoroid dapat menjadi pertimbangan dalam pengembangan ramuannya. Suatu terapi penyakit hemoroid diharapkan dapat efektif jika terdapat efek farmakologis yang berguna untuk mengurangi gejala dan tanda-tanda klinis. Efek farmakologis yang diharapkan muncul yaitu antara lain memperlancar buang air besar, mengurangi nyeri dan inflamasi serta mengurangi perdarahan⁽⁵⁰⁾.

Tabel 3. Tumbuhan obat yang digunakan untuk hemoroid, kelompok famili dalam taksonomi, bagian yang digunakan dan nilai kegunaan dari masing-masing tumbuhan

Nama Latin	Familia	Bagian yang Digunakan	Frekuensi disebut	FC	UV
<i>Aloe vera (L.) Burm.f.</i>	<i>Xanthorrhoeaceae</i>	daun	2	3,226	0,080
<i>Ananas comosus (L.) Merr.</i>	<i>Bromeliaceae</i>	buah	1	1,613	0,040
<i>Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees</i>	<i>Acanthaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Annona muricata L.</i>	<i>Annonaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Arenga pinnata (Wurmb) Merr.</i>	<i>Arecaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Bryophyllum pinnatum (Lam.) Oken</i>	<i>Crassulaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Carica papaya L.</i>	<i>Caricaceae</i>	daun	2	3,226	0,080
<i>Cocos nucifera L.</i>	<i>Arecaceae</i>	buah	1	1,613	0,040
<i>Cordyline fruticosa (L.) A.Chev.</i>	<i>Asparagaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Curcuma longa L.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	rimpang	3	4,839	0,120
<i>Curcuma zanthorrhiza Roxb.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	rimpang	1	1,613	0,040
<i>Euphorbia thymifolia L.</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	herba	1	1,613	0,040
<i>Euphorbia tithymaloides L.</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	herba	1	1,613	0,040
<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>	<i>Apiaceae</i>	biji	1	1,613	0,040
<i>Graptophyllum pictum (L.) Griff.</i>	<i>Acanthaceae</i>	daun	12	19,355	0,400
<i>Gynura procumbens</i>	<i>Compositae</i>	daun	3	4,839	0,040
<i>Gynura pseudochina (L.) DC.</i>	<i>Compositae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Hemigraphis alternata (Burm.f.) T.Anderson</i>	<i>Acanthaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Ipomoea sp</i>	<i>Convolvulaceae</i>	heba	1	1,613	0,040
<i>Kaempferia galanga L.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	rimpang	1	1,613	0,040
<i>Leucaena leucocephala (Lam.) de Wit</i>	<i>Leguminosae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Musa × paradisiaca L.</i>	<i>Musaceae</i>	buah, batang	1	1,613	0,040
<i>Musa balbisiana Colla</i>	<i>Musaceae</i>	buah, batang	2	3,226	0,080
<i>Oldenlandia corymbosa L.</i>	<i>Rubiaceae</i>	herba	1	1,613	0,040
<i>Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.</i>	<i>Thymelaeaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Physalis minima L.</i>	<i>Solanaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Piper betle L.</i>	<i>Piperaceae</i>	daun	1	1,613	0,040

<i>Psidium guajava L.</i>	<i>Myrtaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Salacca zalacca (Gaertn.) Voss</i>	<i>Arecaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Sericocalyx crispus (L.) Bremek</i>	<i>Acanthaceae</i>	daun	1	1,613	0,040
<i>Solanum lycopersicum Lam.</i>	<i>Solanaceae</i>	buah, daun	1	1,613	0,040
<i>Tamarindus indica L.</i>	<i>Leguminosae</i>	daun	2	3,226	0,040
<i>Tinospora crispa (L.) Hook. f. & Thomson</i>	<i>Menispermaceae</i>	batang	1	1,613	0,040
<i>Tradescantia spathacea Sw.</i>	<i>Commelinaceae</i>	herba	4	6,452	0,100
<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	<i>Zingiberaceae</i>	rimpang	1	1,613	0,040
<i>Zingiber zerumbet (L.) Roscoe ex Sm.</i>	<i>Zingiberaceae</i>	rimpang	1	1,613	0,040

Tabel 4. Daftar 7 tumbuhan obat dengan nilai tertinggi nilai kegunaan (UV) dan frekuensi sitasi (FC).

Spesies tumbuhan	Terdapat pada ramuan (No ID Hattra-No Ramuan)	Etnofarmakologi tumbuhan obat spesifik untuk hemoroid	Studi secara invitro dan invivo pada beberapa sumber referensi	Efek samping dan toksisitas tumbuhan untuk hemoroid sesuai referensi
<i>Graptophyllum pictum (L.) Griff.</i>	(36-021) (37-022) (40-009) (46-005) (47-004) (51-010) (55-023) (58-008) (59-038)	Philippines ⁽¹⁴⁾ , Indonesia ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ , India ⁽¹⁷⁾ , Thailand ⁽¹⁸⁾	Memiliki efek anti hemoroid ⁽¹⁹⁾ , efek anti inflamasi. ⁽¹⁷⁾ Meningkatkan elastisitas pembuluh darah, sehingga dapat mengurangi pendarahan. ⁽⁴⁾	infusa daun ungu hingga dosis 800 mg/100 g bb yang diberikan per oral setiap hari selama 6 bulan tidak menimbulkan kelainan organ. ⁽²⁰⁾
<i>Curcuma longa L.</i>	(41-023) (48-005) (49-022)	India, ⁽²¹⁾ Thailand, ⁽¹³⁾ Indonesia ⁽²²⁾	Memiliki efek anti inflamasi. ⁽²³⁾ Aktivas analgetik. ⁽²⁴⁾	Tidak ditemukan adanya tanda toksisitas pada pemberian per oral dosis tunggal ekstrak etanol rimpang kunyit pada dosis 0,5, 1 atau 3 g/kg bb pada mencit atau serbuk kunyit pada 2,5 g/kg bb atau ekstrak etanol pada dosis 300 mg/kg bb pada 45 tikus, marmut dan monyet. Dosis per oral kurkumin pada dosis 1-5 g/kg bb tidak menimbulkan efek toksik pada tikus ⁽²⁵⁾
<i>Aloe vera (L.) Burm.f.</i>	(44-031) (56-006)	India ⁽²⁶⁾ , Malaysia ⁽²⁷⁾	Efek penyembuhan luka, efek antimikroba ^(27,28) meningkatkan absorpsi usus. ^(29,30)	Tidak ada kejadian yang tidak diinginkan selama penelitian klinis menggunakan lidah buaya. Penggunaan lidah buaya pada manusia secara umum dapat ditoleransi. ⁽²⁹⁾
<i>Musa balbisiana Colla</i>	(47-014) (51-010)	Thailand, ⁽¹³⁾ India, ⁽³¹⁾ Malaysia, ⁽³²⁾	Aktivitas anti ulkus, ⁽³³⁾ efek anti bakterial, ⁽³⁴⁾ efek anti inflamasi. ⁽³⁵⁾	Uji toksisitas akut <i>Musa balbisiana</i> pada tikus dengan dosis maksimal 2000mg/kgBB tidak didapatkan kematian atau kejadian tidak diinginkan ⁽³⁶⁾ pada studi toksisitas akut ekstrak daun pepaya 2000 mg/kgBB secara oral pada tikus tidak didapatkan kematian atau kejadian tidak diinginkan akut. ⁽³⁸⁾
<i>Carica papaya L.</i>	(39-003) (45-001)	Tidak terdapat referensi yang menyebutkan kegunaan untuk hemoroid	Efek penyembuhan luka, efek antimikroba, efek anti inflamasi. ⁽³⁷⁾	

<i>Piper crocatum</i> <i>Ruiz & Pav.</i>	(57-017) (57-018)	Tidak terdapat referensi yang menyebutkan kegunaan untuk hemoroid	Aktivitas anti inflamasi ^(39,40) , antibakterial ⁽⁴¹⁾ , anti kanker ⁽⁴²⁾	Tidak terjadi toksisitas klinis, perubahan parameter hematologi, biokimia, maupun kerusakan sel hati dan ginjal pada uji toksisitas pemberian sirih merah. ⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ ekstrak sirih merah aman bagi mukosa lambung ⁽⁴⁶⁾
<i>Tradescantia</i> <i>spathacea Sw</i>	(53-006) (53-007)	Tidak terdapat referensi yang menyebutkan kegunaan untuk hemoroid	Mempunyai efek anti bakteri, anti oksidan ⁽⁴⁷⁾ , anti inflamasi ⁽⁴⁸⁾ , anti tumor ⁽⁴⁹⁾	Belum ada referensi toksisitas <i>Tradescantia spathacea</i>

SIMPULAN

Ramuan obat tradisional yang di dalamnya terdapat tumbuhan penyusun *Graptophyllum pictum* (L.) Griff., *Curcuma longa* L., *Aloe vera* (L.) Burm.f., dan *Musa balbisiana* mempunyai potensi besar untuk dikembangkan dan digunakan karena didukung banyak bukti ilmiah mengenai manfaat dan keamanannya.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjut yang lebih spesifik mengenai pemakaian ramuan obat tradisional pada jenis hemoroid interna atau eksterna.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terima kasih kepada Kepala Manajemen Data Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan dan Kepala Balai Besar Tanaman Obat dan Obat Tradisional atas data mengenai penelitian RISTOJA.

DAFTAR PUSTAKA

- Desak MM, Madihah, Joko K, Fitri K, Johan I. Ethnobotanical study of medicinal plants in karangwangi, district of Cianjur, West Java. Biosaintifika. 2017;9(2):345–56.
- Siswanto S. Sainifikasi jamu sebagai upaya terobosan untuk mendapatkan bukti ilmiah tentang manfaat dan keamanan jamu. Bul Penelit Sist Kesehat [Internet]. 2012;15(2 Apr):203–11. Available from: <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/hsr/article/view/2994>
- Nurrani L, Tabbas S, Mokodompit HS. Kearifan lokal dalam pemanfaatan tumbuhan obat oleh masyarakat di sekitar taman nasional Aketajawe Lolobata, Provinsi Maluku Utara. J Penelit Sos dan Ekon Kehutan. 2015;12(3):163–75.
- Astana PRW, Ardiyanto D, Triyono A, Mana TA. Uji keamanan dan manfaat ramuan jamu untuk hemoroid dibandingkan dengan diosmin hisperidin. Media Penelit dan Pengemb Kesehat. 2017;27(1):57–64.
- Lohsiriwat V. Hemorrhoids: from basic pathophysiology to clinical management. World J Gastroenterol. 2012;18(17):2009–17.
- Sun Z, Migaly J. Review of hemorrhoid disease: presentation and management. Clin Colon Rectal Surg. 2016;29(1):22–9.
- Riss S, Weiser FA, Schwameis K, Riss T, Mittlböck M, Steiner G, et al. The prevalence of hemorrhoids in adults. Int J Colorectal Dis. 2012;27(2):215–20.
- Neilwan A. Views and attitudes of association executives in Indonesia for medical use of traditional/complementary health services. J Med Planta [Internet]. 2011;1(4):82–8. Available from: <http://majour.maranatha.edu/index.php/jmp/article/view/861>
- Sholikhah EN. Indonesian medicinal plants as sources of secondary metabolites for pharmaceutical industry. J Med Sci [Internet]. 2016;48(4):226–39. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Eti_Sholikhah2/publication/312271498_Indonesian_medicinal_plants_as_sources_of_secondary_metabolites_for_pharmaceutical_industry/links/5919ca45aca2722d7cfe6834/Indonesian-medicinal-plants-as-sources-of-secondary-metabo.
- Hoffman B, Gallaher T. Importance indices in ethnobotany. Ethnobot Res Appl. 2007;5:201–18.
- Jaradat NA, Zaid AN, Al-Ramahi R, Alqub MA, Hussein F, Hamdan Z, et al. Ethnopharmacological survey of medicinal plants practiced by traditional healers and herbalists for treatment of some urological diseases in the West Bank/Palestine. BMC Complement Altern Med. 2017;17(1):1–18.
- Bolson M, Hefler SR, Dall'Oglio Chaves EI, Gasparotto Junior A, Cardozo Junior EL. Ethnomedicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. J Ethnopharmacol. 2015;161:1–10.
- Neamsuvan O, Tuwaemaengae T, Bensulong F, Asae A, Mosamae K. A survey of folk remedies for gastrointestinal tract diseases from Thailand's three southern border provinces. J Ethnopharmacol [Internet]. 2012;144(1):11–21. Available from: <http://>

- dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.043
14. Balinado LO CM. An ethnomedicinal study of plants and traditional health care practices in district 7 , Cavite , Philippines. In: Proceeding of International Conference on Chemical, Agricultural, Biological and Medical Sciences, Manila January 23-24 2017. 2017. p. 131–43.
 15. Widiyastuti Y, Adi MBS, Widayat T. Ponorogo Jawa Timur medicinal plants species in Sigogor nature reserve Ponorogo, East Jawa. 2017;10(2):78–87.
 16. Habibah S. Etnobotani tumbuhan obat oleh masyarakat kecamatan Sreseh kabupaten Sampangan Madura [Tesis]. Malang: Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim; 2014.
 17. Singh P, Khosa RL, Mishra G JK. Pharmacognostical evaluation of aerial parts of *graptophyllum pictum* (L.) Griff. (Syn: *Justicia picta* Linn.): a well-known folklore medicinal plant. *Anc Sci Life J*. 2015;34(4):223–9.
 18. Jiangseubchatveera N, Liawruangrath S, Teerawutgulrag A, Santiarworn D, Pyne SG, Liawruangrath B. Phytochemical screening , phenolic and flavonoid contents , antioxidant and cytotoxic activities of *graptophyllum pictum* (L.) griff. *Chiang Mai J Sci*. 2017;44(1):193–202.
 19. Sya'haya S, Iyos RN. Pengaruh pemberian ekstrak daun ungu (*graptophyllum pictum* griff) terhadap penyembuhan hemoroid. *Majority*. 2016;5(5):155–60.
 20. Ogonnia SO, Coker H a B, Ukpo GE. Blood glucose lowering effect of aqueous extract of *graptophyllum pictum* (linn) griff. on alloxan-induced diabetic rats and its acute toxicity in mice. *African J Biotechnol*. 2011;10(6):1039–43.
 21. Naher S, Ferdous B, Datta T, Faria Rashid U, Nahian Tasnim T, Akter S, et al. Ayurvedic influences in folk medicine: a case study of a folk medicinal practitioner of Jhalokathi in Barisal district, Bangladesh. *Am J Sustain Agric*. 2013;7(4):333–43.
 22. Mulyani H, Widiyastuti S, Ekowati V. “Tumbuhan herbal sebagai jamu pengobatan tradisional terhadap penyakit dalam serat primbon jampi jawi jilid I.” *J Penelit Hum*. 2016;21(2):73–91.
 23. Chandrasekaran C V, Sundarajan K, Edwin JR, Gururaja GM. Immune stimulatory and anti inflammatory activities of curcuma longa extract and its polysaccharide fraction. 2013.
 24. Saji KMKCMJ. Safety and efficacy of curcuma longa extract in the treatment of painful knee osteoarthritis: a randomized placebo controlled trial. 2013;129–36.
 25. Balitbangkes. Vademekum tanaman obat. Jakarta: Badan Litbangkes. Kemenkes RI; 2010.
 26. Jayakrishna, C., Karthik, C., Barathi, S., Kamalanathan, D. and Indra Arulselvi P. In vitro propagation of *aloe barbadensis miller*; a miracle herb. *Res Plant Biol*. 2011;1(5):22–6.
 27. Gantait S, Sinniah UR, Das PK. Aloe vera: a review update on advancement of in vitro culture. *Acta Agric Scand Sect B Soil Plant Sci*. 2014;64(1):1–12.
 28. Agarry OO, Olaleye MT, Bello-Michael CO. Comparative antimicrobial activities of aloe vera gel and leaf. *Afr J Biotechnol*. 2005;4(12):1413–4.
 29. Radha MH, Laxmipriya NP. Evaluation of biological properties and clinical effectiveness of aloe vera: a systematic review. *J Tradit Complement Med*. 2015;5(1):21–6.
 30. Orendu Attah M, Watson Jacks T, Jacob A, Eduitem O, John B. The effect of aloe vera (linn) on cutaneous wound healing and wound contraction rate in adult rabbits. *Nov J Med Biol Sci [Internet]*. 2016;5(3):1–8. Available from: <http://nova-jmbs.com/index.php/jmbs/article/view/104>
 31. Sharma R, Sharma HK. Ethnomedicines of Sonapur, Kamrup district, Assam. *Indian J Tradit Knowl*. 2010;9(1):163–5.
 32. Kodoh J, Mojiol AR. Traditional knowledge on the uses of medicinal plants among the ethnic communities in Kudat, Sabah, Malaysia. 2017;5:79–85.
 33. Prahlad A, Memorial DA. Assessment of anti ulcer potential of unripe fruit extract of *musa balbisiana* in stress induced ulcer. 2018;7(8):1328–36.
 34. Tin HS, Padam BS, Vairappan CS, Abdullah MI, Chye FY. Effect of preparation and extraction parameters of banana (*musa balbisiana* cv. *saba*) inflorescence on their antibacterial activities. *Sains Malaysiana*. 2015;44(9):1301–7.
 35. Mathew NS, Negi PS. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of wild banana (*musa acuminata colla*): a review. *J Ethnopharmacol [Internet]*. 2017;196:124–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.009>
 36. Kalita H, Boruah DC, Deori M, Hazarika A, Sarma R, Kumari S, et al. Antidiabetic and antilipidemic effect of *musa balbisiana* root extract: A potent agent for glucose homeostasis in streptozotocin-induced diabetic rat. *Front Pharmacol*. 2016;7(MAY):1–11.
 37. Vij T, Prashar Y. A review on medicinal properties of *carica papaya linn*. *Asian Pacific J Trop Dis [Internet]*. 2015;5(1):1–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60617-4](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60617-4).
 38. Halim SZ, Abdullah NR, Afzan A, Rashid BAA, Jantan I, Ismail Z. Acute toxicity study of carica papaya leaf extract in sprague dawley rats. *J Med Plants Res [Internet]*. 2011;5(xx):1867–72. Available from: <http://www.academicjournals.org/JMPR>
 39. Laksmiawati DR, Widiyastuti A, Karami N, Afifah E, Rihibiha DD, Nufus H, et al. Anti-inflammatory effects of *anredera cordifolia* and *piper crocatum* extracts on lipopolysaccharide stimulated macrophage cell line. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017;12(1):35–40.
 40. Fitriyani A, Winarti L, Muslichah S, Nuri N. Uji antiinflamasi ekstrak metanol daun sirih merah (*piper crocatum ruiz & pav.*) pada tikus putih. *Maj Obat Tradis*. 2011;16(1):34–42.
 41. Agung SRI, Kusuma F, Tjitraresmi AMI, Susanti G. Antibacterial effect of red piper betle leaf ethanolic extracts to *lactobacillus acidophilus* and *lactobacillus bifidus* growth inhibition. *Asian J Pharm Clin Res [Internet]*. 2017;(Iii):65–8. Available from: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/>

viewFile/19490/11507

42. Anugrahwati M, Purwaningsih T, Rustina, Manggalarini JA, Alnavis NB, Wulandari DN, et al. Extraction of ethanolic extract of red betel leaves and its cytotoxicity test on hela cells. *Procedia Eng* [Internet]. 2016;148:1402–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.569>
43. Safithri M, Yasni S, Bintang M, Ranti AS. Toxicity study of antidiabetics functional drink of *piper crocatum* and *cinnamomum burmannii*. *Hayati J Biosci* [Internet]. 2012;19(1):31–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1978301916301292>
44. Rachmawaty FJ, Nugraha ZS, Fidianingsih I, Amalina M, Widira D. P9 The effect of ethanolic extract of red betel vine leaves (*piper crocatum*) to the livers and kidneys of DDY mice in acute and subchronic toxicity study. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017;139:127. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295217303337>
45. Kusuma SAF, Sumiwi SA, Riska DAM. Effect of red piper betle leaf (*piper crocatum ruiz & pav.*) ethanolic extract on plasma biochemical and hematological parameters in vivo. *J Pharm Res*. 2017;11(11):9–12.
46. Agung S, Kusuma F, Sumiwi SA, Riska DAM. Study of red piper betle leaf (*piper crocatum ruiz & pav.*) ethanolic extract effect on gastric mucosa. *Int J Sci Eng Appl Sci* -. 2017;3(12):6–10.
47. Tan JBL, Lim YY, Lee SM. Antioxidant and antibacterial activity of rhoeo spathacea (swartz) stearn leaves. *J Food Sci Technol*. 2015;52(4):2394–400.
48. Pérez G. RM. Antiinflammatory activity of ambrosia artemisiaefolia and rhoeo spathacea. *phytotherapy*. 1996;3(2):163–7.
49. Rosales-Reyes T, de la Garza M, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola M, Fattel-Fazenda S, Arce-Popoca E, et al. Aqueous crude extract of rhoeo discolor, a Mexican medicinal plant, decreases the formation of liver preneoplastic foci in rats. *J Ethnopharmacol*. 2007;115(3):381–6.
50. Sudarsono DF. Diagnosis dan penanganan hemoroid. *J Major*. 2015;4(6):31–4.

Pengaruh Suplementasi Vitamin A pada Pengobatan Pasien TB Paru terhadap Percepatan Konversi Dahak pada Fase Intensif Di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota

(Influence of Vitamin A Supplementation in Medication of Pulmonary TB Patients on Acceleration of Sputum Conversion in Intensive Phase in The Working Area of Medan Kota Sub District Puskesmas)

ALEXANDER PARLINDUNGAN MARPAUNG^{1,2*}, PARLUHUTAN SIAGIAN³, DINA KEUMALA SARI⁴

¹Program Studi Magister Ilmu Kedokteran Tropis, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Methodist Indonesia

³Departemen Ilmu Penyakit Paru, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara

⁴Departemen Ilmu Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatera Utara

Diterima 5 Juli 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

Abstrak: Indonesia merupakan negara dengan peringkat kedua untuk penderita kasus TB di dunia setelah India. Di Indonesia diperkirakan terdapat 1 juta kasus baru setiap tahun. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota. Desain studi uji klinis pendekatan studi eksperimental dengan metode Quasi Eksperimen. Sampel penelitian berjumlah 30 pasien, terdiri dari 15 orang kelompok perlakuan dan 15 orang kelompok kontrol. Sampel adalah penderita berusia ≥ 18 tahun, mengkonsumsi OAT kategori I dengan teratur dan BMI $\geq 18,5$. Analisis statistik menggunakan uji *Mann-Whitney* pada taraf kepercayaan 95% ($p < 0,05$). Kelompok perlakuan, mayoritas berumur (18-27 tahun) 40,0%, berjenis kelamin laki-laki 73,3%, mayoritas mahasiswa 26,7%, konversi BTA minggu ke-2 80,0% dan rata-rata konversi sputum adalah 2,4 minggu. Kelompok kontrol mayoritas berumur 18-27 tahun 33,3%, berjenis kelamin laki-laki 80,0%, mayoritas mahasiswa dan wiraswasta masing-masing 20,0%, konversi BTA minggu ke-4 80,0% dan rata-rata konversi sputum adalah 4,1 minggu. Ada pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif ($p = < 0,001$) $<$ ($\alpha = 0,05$). Ada pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota.

Kata kunci: Vitamin A, konversi, fase intensif, TB paru.

Abstract: Indonesia is the second rank for the most TB (Tuberculosis) cases in the world after India. It's estimated there are a million cases per year in Indonesia. The objective of the research was to find out the influence of Vitamin A supplementation in the medication of pulmonary TB on the acceleration of sputum conversion time at intensive phase in the Working Area of Puskesmas in Medan Kota Subdistrict. This research applied clinical testing design with experimental approach and Experimental Quasi method. The samples were 30 newly diagnosed pulmonary TB patients consisting of 15 patients in the treatment group and 15 patients in the control group. They were ≥ 18 years old, regularly consumed category I OAT with BMI ≥ 18.5 . The statistical data were analyzed by Mann-Whitney statistical testing at reliability rate 95% ($p < 0.05$). The results of the research on the treatment group discovered that they were mostly 18-27 years old 40.0%, male 73.3%, mostly university students 26.7%, had BTA conversion in the second week 80.0%; and the sputum conversion time was 2.4 weeks in average. The results of the research on the control group demonstrated that they were mostly 18-27 years old 33.3%, male 80.0%, mostly university students and entrepreneurs 20.0%, had BTA conversion in the second week 80%; and the sputum conversion time was 4.1 weeks in average. Vitamin A supplementation in the medication of pulmonary TB patients had some influence on the acceleration of sputum conversion at intensive phase ($p = < 0.001$) $<$ ($\alpha = 0.05$). Vitamin A supplementation in the medication of pulmonary TB patients had some influence on the acceleration of sputum conversion at intensive phase in the Working Area of Puskesmas in Medan Kota Subdistrict.

Keywords: White egg gel, burns, fibroblast, macrophage, collagen density, wound healing time.

* Penulis korespondensi, Hp.081264943000
e-mail: alexmarpaung83@yahoo.com

PENDAHULUAN

TUBERKULOSIS (TB) adalah suatu penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, yang dapat menyerang berbagai organ terutama paru-paru. Penyakit ini bila tidak diobati atau pengobatannya tidak tuntas dapat menimbulkan komplikasi berbahaya hingga kematian. TB diperkirakan sudah ada di dunia sejak 5000 SM, namun kemajuan dalam penemuan dan pengendalian penyakit TB baru terjadi dalam dua abad terakhir⁽¹⁾. Indonesia merupakan negara dengan peringkat kedua untuk penderita kasus TB di dunia setelah India. Di Indonesia diperkirakan terdapat 1 juta kasus baru pertahun, dua kali lipat dari perkiraan sebelumnya untuk kasus insiden jika dibandingkan pada tahun 2014⁽²⁾.

Pada tahun 2015 dilaporkan bahwa Sumatera Utara merupakan provinsi tertinggi keempat untuk kasus TB Baru setelah Jawa Barat, Jawa Timur dan Jawa Tengah. Jumlah kasus baru penderita TB paru (BTA) (+) yang mendapat pengobatan di Sumatera Utara sebesar 16.946 orang, dengan keberhasilan pengobatan sebanyak 15.774 orang (93,1%)⁽³⁾. Berdasarkan data laporan tiga tahun terakhir untuk penyakit TB paru dari Dinas Kesehatan Kota Medan, dilaporkan pada tahun 2013 tercatat sebanyak 1586 kasus BTA (+). Dengan kasus terbesar ada di wilayah kerja puskesmas kecamatan Medan Kota yaitu sebanyak 200 penderita. Dan dilaporkan pada tahun 2014 tercatat sebanyak 1650 kasus BTA (+). Dengan kasus terbesar ada di wilayah kerja puskesmas kecamatan Medan Kota yaitu sebanyak 220 penderita. Selanjutnya dilaporkan pada tahun 2015 tercatat sebanyak 1576 kasus BTA (+). Dengan kasus terbesar ada di wilayah kerja puskesmas kecamatan Medan Kota sebesar 197 penderita⁽⁴⁾.

Pada penelitian Sekarindah tahun 1992 diharapkan pemberian vitamin A sejumlah 2 x 200000IU pada penderita TB paru dengan OAT dapat meningkatkan imunitas seluler. Tujuan penelitian ini adalah menilai pengaruh pemberian vitamin A pada penderita tuberkulosis paru yang sedang mendapat OAT terhadap jumlah limfosit total, limfosit T total, sub populasi limfosit T, kadar retinol plasma, dan keadaan klinik penderita. Kesimpulannya adalah pemberian vitamin A 2 x 200000 IU dalam 8 minggu mampu meningkatkan kadar vitamin A⁽⁵⁾.

Kekurangan vitamin A telah umum diamati pada pasien TB. Tingkat serum retinol yang rendah kembali ke normal setelah dilakukan pengobatan anti tuberkulosis. Kekurangan vitamin A diamati pada pasien TB mungkin telah berkontribusi untuk

perkembangan penyakit tuberkulosis didalamnya atau kekurangan merupakan hasil dari hilangnya nafsu makan, kurangnya penyerapan usus, peningkatan kehilangan vitamin A dalam urin atau reaksi fase akut di TB⁽⁶⁾.

Hasil penelitian Pakkasi *et al* di Indonesia pada tahun 2010, salah satu hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa kelompok pasien yang diberikan suplemen vitamin A mengalami percepatan konversi dahak rata-rata pada 2,1 minggu, dan untuk kelompok pasien yang diberikan plasebo mengalami percepatan konversi dahak rata-rata pada 2,5 minggu⁽⁷⁾.

Salah satu indikator yang digunakan dalam memantau pengobatan tuberkulosis paru adalah dengan *conversion rate* (angka konversi). *Conversion Rate* (angka konversi) adalah persentase pasien baru TB paru terkonfirmasi bakteriologis yang mengalami perubahan menjadi BTA (Bakteri Tahan Asam) negatif setelah menjalani masa pengobatan tahap awal⁽⁸⁾.

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka peneliti berminat untuk meneliti pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif di wilayah kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota.

METODOLOGI PENELITIAN

RANCANGAN PENELITIAN. Penelitian menggunakan jenis penelitian uji klinis dengan pendekatan studi eksperimental dengan metode Quasi Eksperimen. Penelitian dilaksanakan pada Bulan Mei 2017 sampai Oktober 2017 di Puskesmas Wilayah Kerja Kecamatan Medan Kota.

Populasi dan Sampel: Populasi pada penelitian adalah pasien TB Paru dengan BTA (+) yang mengkonsumsi OAT Kategori 1 yang berusia diatas 18 tahun. Sampel dalam penelitian ini adalah pasien TB Paru dengan BTA (+) yang memenuhi kriteria inklusi, dibagi menjadi dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Sampel berjumlah 30 orang pasien yang terdiri dari 15 orang pasien kelompok kontrol dan 15 orang pasien kelompok perlakuan.

Kriteria Inklusi. Penderita usia ≥ 18 tahun, laki-laki dan perempuan. Didiagnosis sebagai penderita TB paru dengan hasil pemeriksaan sputum BTA (+) dengan pengobatan OAT kategori 1. Belum pernah mendapat pengobatan OAT sebelumnya. Bersedia ikut penelitian dan mengkonsumsi obat secara teratur selama penelitian ini. Penderita TB dengan IMT $\geq 18,5$.

Kriteria Eksklusi. Wanita hamil, penderita TB paru dengan DM, penderita yang mengalami efek samping berat dalam mengkonsumsi obat selama

penelitian, penderita dengan penyakit gagal ginjal.

Variabel Penelitian. Terdiri dari Variabel dependen yaitu Konversi BTA, dan Variable independent yaitu OAT Kategori 1 dan OAT Kategori 1 ditambah Vitamin A.

Prosedur Kerja. Bahan pemeriksaan penelitian adalah dahak (sputum) dari sampel yang dicurigai menderita TB Paru kategori 1. Dahak ditampung di pot dahak dengan metode yang baik dan menggunakan teknik pengambilan dahak SPS (Sewaktu Pagi Sewaktu). Pemeriksaan dahak dilakukan di laboratorium menggunakan metode pewarnaan *Ziehl Neelsen*. Hasil pewarnaan *Ziehl Neelsen* diperiksa secara mikroskopis untuk mendeteksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil pengamatan mikroskopis dihitung menggunakan Skala IUATLD (*International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*).

Pasien yang menderita TB Paru kategori 1 yang memenuhi kriteria inklusi, di awal penelitian diberikan penjelasan tentang tujuan penelitian, prosedur penelitian dan manfaat penelitian. Pasien yang bersedia untuk ikut dalam penelitian diminta mengisi dan menandatangani lembar *inform consent*, lembar persetujuan meminum obat secara teratur, dan bersedia mengisi chek list meminum obat secara teratur.

Pasien yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia ikut dalam penelitian dibagi dalam dua kelompok. Kelompok pertama adalah kelompok kontrol yang diberikan pengobatan OAT kategori 1. Kelompok kedua adalah kelompok perlakuan yang diberikan OAT kategori 1 ditambah vitamin A 6000 IU. Kedua kelompok diamati selama dua bulan pertama pengobatan TB paru kategori 1 (fase intensif). Pengobatan OAT kategori 1 kepada kedua kelompok disesuaikan dengan ketentuan dosis fase intensif Depkes RI, dan pemberian vitamin A 6000 IU dengan dosis satu tablet perhari pada kelompok perlakuan dilakukan selama fase intensif atau sampai batas pemeriksaan sputum telah mengalami konversi (negatif).

Pengamatan dilakukan dengan pemeriksaan dahak secara berkala, pemeriksaan berkala dilakukan satu kali per-dua minggu selama fase intensif (minggu 2, minggu 4, minggu 6 dan minggu 8). Bila hasil pemeriksaan dahak secara berkala pada setiap penderita masing-masing kelompok telah mengalami konversi, maka pengobatan OAT tetap dilanjutkan sesuai dengan ketentuan Depkes RI, tetapi pemberian Vitamin A 6000IU dihentikan. Pada saat dahak sudah mengalami konversi, maka kembali dilakukan pemeriksaan Indeks Massa Tubuh (IMT) penderita Analisis data secara komputerisasi dengan bantuan

aplikasi SPSS 21 menggunakan uji *Mann Whitney* pada tingkat kepercayaan 95% dan dianggap bermakna bila $p < 0,05^{(9)}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Umur. Hasil penelitian didapat umur terbanyak 18-27 pada kelompok perlakuan sebanyak 6 orang (40,0%) dan pada kelompok kontrol sebanyak 5 orang (33,3%). Menurut laporan Kemenkes RI (2012) sekitar 75% pasien TB adalah kelompok usia yang paling produktif secara ekonomis (15-50 tahun). Hal ini diketahui bahwa kelompok umur produktif sangat rentan terkena penularan penyakit TB Paru, dimana pada usia produktif ini tingkat mobilitas sangat tinggi dan sering berinteraksi dengan orang lain di sekitarnya⁽¹⁰⁾. WHO (2013) menyatakan bahwa 75% dari semua kasus TB adalah di antara orang-orang yang berusia 15-54 tahun⁽¹¹⁾.

Jenis Kelamin. Hasil penelitian kelompok perlakuan mayoritas laki-laki 11 orang (73,3%) dan perempuan sebanyak 4 orang (26,7%), sedangkan untuk kelompok kontrol laki-laki sebanyak 12 orang (80,0%) dan perempuan sebanyak 3 orang (20,0%). Hal ini sesuai dengan laporan WHO (2015) diperkirakan ada 9,6 juta kasus baru TB paru yang terdiri dari proporsi laki-laki (56,2%) lebih banyak dari perempuan yaitu (33,3%) dengan 3,2 juta kasus diantaranya adalah perempuan. Terdapat 1,5 juta kematian karena TB dimana 480.000 kasus adalah perempuan⁽²⁾.

Hasil penelitian ini sama dengan laporan Kemenkes RI (2013) bahwa prevalensi TB paru pada laki-laki lebih besar jika dibandingkan dengan perempuan (0,4 : 0,3)⁽¹²⁾. Hal ini diketahui bahwa laki-laki sebagai kepala keluarga dan pencari nafkah yang lebih sering beraktifitas diluar rumah lebih rentan terhadap penularan penyakit TB Paru. Menurut jenis kelamin, jumlah perlakuan pada laki-laki lebih tinggi dari pada perempuan yaitu 1,5 kali dibandingkan pada perempuan⁽³⁾.

Pekerjaan. Berdasarkan pekerjaan, subjek penelitian secara keseluruhan pasien, mayoritas adalah mahasiswa sebanyak 7 orang (23,3%). Untuk kelompok perlakuan sebanyak 4 orang (26,7%) dan untuk kelompok kontrol sebanyak 3 orang (20,0%). Hasil penelitian ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Kemenkes RI (2013) bahwa prevalensi TB paru paling besar pada pasien yang tidak bekerja (11,7)⁽¹²⁾. Seorang pasien TB dewasa akan kehilangan rata-rata waktu kerjanya 3 sampai 4 bulan. Hal tersebut berakibat kehilangan pendapatan tahunan rumah tangganya sekitar 20-30%⁽¹⁰⁾.

Tabel 1. Distribusi umur, jenis kelamin dan pekerjaan pasien TB paru pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol di wilayah kerja Puskesmas kecamatan Medan Kota.

Karakteristik Pasien	Perlakuan (n)	Persentase (%)	Kontrol (n)	Persentase (%)
Umur				
18-27 tahun	6	40,0	5	33,3
28-37 tahun	3	20,0	3	20,0
38-47 tahun	1	6,7	3	20,0
48-57 tahun	4	26,7	3	20,0
58-67 tahun	1	6,7	1	20,0
Total	15	100	15	100
Jenis Kelamin				
Laki-laki	11	73,3	12	80,0
Perempuan	4	26,7	3	20,0
Total	15	100	15	100
Pekerjaan				
Mahasiswa	4	26,7	3	20,0
Kepling	1	6,7	0	0
Karyawan	3	20,0	2	13,3
IRT	2	13,3	1	6,7
Supir	1	6,7	2	13,3
Pedagang	2	13,3	1	6,7
Tukang Becak	1	6,7	0	0
Wiraswasta	1	6,7	3	20,0
Pensiunan	0	0	1	6,7
Buruh	0	0	1	6,7
Pekerja Bengkel	0	0	1	6,7
Total	15	100	15	100

Pemeriksaan BTA dan Rata-rata Konversi.

Berdasarkan pemeriksaan BTA dikelompokkan menjadi, 1+, 2+, 3+. Hasil pemeriksaan BTA pasien kelompok perlakuan mayoritas 3+ sebanyak 9 orang (60,0%) dengan rata-rata konversi 2,7 minggu. Kelompok kontrol mayoritas hasil pemeriksaan BTA pasien adalah 3+ sebanyak 9 orang (60,0%) dengan rata-rata konversi 4,4 minggu. Pada penelitian ini didapati baik kelompok perlakuan maupun kontrol, sampel terbanyak adalah TB paru dengan pemeriksaan BTA 3+. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian

Tsani (2011) yang mendapatkan hasil dari 140 penderita TB paru, mayoritas hasil pemeriksaan BTA adalah 3+ sebanyak 95 penderita⁽¹³⁾.

Konversi BTA dan Rata-rata Waktu Konversi.

Hasil penelitian pada kelompok perlakuan (pemberian suplemen vitamin A) hasil konversi BTA mayoritas pada minggu ke-2 sebanyak 12 orang (80,0%), pada kelompok kontrol (tanpa pemberian suplemen vitamin A) mayoritas hasil konversi BTA pada minggu ke-4 sebanyak 12 orang (80,0%). Pada kelompok perlakuan diperoleh rata-rata konversi

Tabel 2. Hasil pemeriksaan BTA pasien TB paru dan rata-rata konversi pada kelompok perlakuan dan kontrol di wilayah kerja Puskesmas kecamatan Medan Kota.

BTA	Perlakuan		Konversi BTA (Minggu ke)				Kontrol		Konversi BTA (Minggu ke)			
	n	%	2	4	6	Rata-rata	n	%	2	4	6	Rata-rata
1+	4	26,7	4	0	0	2,0	3	20,0	1	2	0	3,3
2+	2	13,3	2	0	0	2,0	3	20,0	0	3	0	4,0
3+	9	60,0	6	3	0	2,7	9	60,0	0	7	2	4,4
Total	15	100					15	100				

2,4 minggu dan pada kelompok kontrol rata-rata 4,1 minggu. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Pakkasi *et al* di Indonesia pada tahun 2010 bahwa kelompok pasien yang diberikan suplemen vitamin A mengalami percepatan konversi dahak rata-rata pada 2,1 minggu⁽⁷⁾. Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian Ahmad *et al* di India pada tahun 2012 bahwa suplemen vitamin A mengalami percepatan terbaik konversi dahak rata-rata pada 4,3 minggu. Hasil penelitian membuktikan bahwa pasien TB paru yang mendapat pengobatan OAT kategori I dan

diberi suplemen vitamin A lebih cepat mengalami konversi BTA jika dibandingkan dengan pasien tanpa pemberian suplemen vitamin A yang hanya mendapat pengobatan OAT kategori I⁽¹⁴⁾.

IMT Pasien. Kelompok perlakuan mayoritas hasil perbandingan IMT sebelum dan setelah konversi menunjukkan kenaikan dengan rata-rata IMT sebelum pengobatan adalah 21,39, rata-rata IMT setelah konversi 21,62 dan rata-rata kenaikan IMT adalah 0,23. Kenaikan IMT yang paling besar ada pada pasien dengan nomor responden 13 yaitu

Tabel 3. Konversi BTA dan rata-rata waktu konversi pada pasien TB paru kelompok perlakuan dan kontrol di wilayah kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota.

Konversi BTA Perlakuan		Persentase (%)	Konversi BTA Kontrol		Persentase (%)
	(n)			(n)	
Minggu ke-2	12	80,0	Minggu ke-2	1	6,7
Minggu ke-4	3	20,0	Minggu ke-4	12	80,0
Minggu ke-6	0	0	Minggu ke-6	2	13,3
Minggu ke-8	0	0	Minggu ke-8	0	0
Total	15	100	Total	15	100
Jumlah nilai konversi Perlakuan	36		Jumlah nilai konversi Kontrol	62	
Rata-rata Konversi	36/15 = 2,4 minggu		Rata-rata Konversi	62/15 = 4,1 minggu	

Tabel 4 IMT Pasien TB Paru sebelum Pengobatan dan setelah Konversi pada Kelompok Perlakuan dan Kontrol di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota

No	Perlakuan				Kontrol			Ket
	IMT sebelum Pengobatan	IMT setelah Konversi	Hasil	Ket	IMT sebelum Pengobatan	IMT setelah Konversi	Hasil	
1	21,64	21,95	0,31	Naik	20,03	20,54	0,51	Naik
2	19,87	20,16	0,29	Naik	24,03	24,64	0,61	Naik
3	23,57	23,82	0,25	Naik	21,07	21,33	0,26	Naik
4	23,91	24,11	0,20	Naik	20,33	21,20	0,87	Naik
5	20,77	20,98	0,21	Naik	24,21	24,49	0,28	Naik
6	20,00	19,91	-0,09	Turun	19,83	20,60	0,77	Naik
7	26,26	26,52	0,26	Naik	21,02	21,47	0,45	Naik
8	18,93	19,15	0,22	Naik	18,78	19,33	0,55	Naik
9	23,12	23,36	0,24	Naik	19,05	19,79	0,74	Naik
10	18,78	18,99	0,21	Naik	25,81	26,21	0,40	Naik
11	19,59	19,75	0,16	Naik	22,70	23,42	0,72	Naik
12	21,52	21,60	0,08	Naik	22,27	22,35	0,08	Naik
13	22,70	23,37	0,67	Naik	24,14	24,69	0,55	Naik
14	21,29	21,51	0,22	Naik	20,36	20,80	0,44	Naik
15	18,97	19,15	0,18	Naik	22,69	23,07	0,38	Naik
Jumlah	320,92	324,33	3,41		326,32	333,93	7,61	
Total sampel	15	15	15		15	15	15	
Rata-rata IMT	320,92/15 = 21,39	324,33/15 = 21,62			326,32/15 = 21,75	333,93/15 = 22,26		
Rata-rata selisih IMT			3,41/15 = 0,23				7,61/15 = 0,51	

sebesar 0,67. Pada kelompok kontrol mayoritas hasil perbandingan IMT sebelum pengobatan dan setelah konversi menunjukkan kenaikan dengan rata-rata IMT sebelum pengobatan 21,75, rata-rata IMT setelah konversi 22,26 dan rata-rata kenaikan IMT 0,51. Kenaikan IMT paling besar pada pasien nomor responden 4 sebesar 0,87.

Adanya hubungan kausal dua arah yang jelas antara kekurangan gizi dan TB aktif, penilaian dan pengelolaan nutrisi merupakan hal yang integral dari komponen pengobatan dan perawatan TB. TB membuat kurang gizi dan kekurangan gizi memperlemah kekebalan tubuh, sehingga meningkatkan kemungkinan TB laten akan berkembang menjadi penyakit aktif. Kebanyakan individu dengan TB aktif berada dalam keadaan katabolik dan mengalami penurunan berat badan dan beberapa tanda menunjukkan kekurangan vitamin dan mineral saat diagnosis. Penurunan berat badan diantara mereka yang menderita TB bisa disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya mengurangi asupan makanan akibat kehilangan nafsu makan mual dan sakit perut, kehilangan gizi akibat muntah dan diare. Indeks massa tubuh rendah (BMI) (lebih rendah dari 18,5 kg/m²) dikaitkan dengan peningkatan risiko kematian, kambuh kembali dan dapat menjadi indikasi keparahan TB. Terapi TB yang efektif akan memperbaiki status gizi dengan meningkatkan nafsu makan dan asupan makanan dan meningkatkan efisiensi metabolisme⁽¹¹⁾.

Indeks massa tubuh (BMI) di bawah 18,5 meningkatkan risiko TB sebanyak 2-3 kali. Sebaliknya, kenaikan berat badan akan menurunkan risikonya. Rata-rata IMT meningkat pada pasien yang sembuh pada akhir pengobatan jika dibandingkan dengan

Puskesmas Kecamatan Medan Kota. Dengan semakin cepatnya terjadi konversi BTA dari pasien maka akan diikuti dengan angka kesembuhan yang tinggi pula dan tingkat penularan yang semakin berkurang. Penelitian ini sejalan dengan penelitian Pakkasi tahun 2009 bahwa ada korelasi rendahnya vitamin A terhadap keparahan TB dengan nilai $P = 0,000$ ⁽¹⁶⁾.

Penelitian Karyadi dkk (2002) bahwa suplemen vitamin A dan zink memperbaiki efek terapi TB setelah 2 bulan⁽¹⁷⁾.

Telah banyak diketahui, status nutrisi yang rendah ditemukan lebih sering terjadi pada penderita tuberkulosis aktif dibandingkan orang sehat. Tuberkulosis dapat menyebabkan berat badan dibawah normal dan defisiensi mikronutrien (multivitamin dan mineral) karena terjadinya malabsorpsi, meningkatnya kebutuhan energi, terganggunya proses metabolik dan berkurangnya asupan makanan karena penurunan nafsu makan dan dapat mengarah terjadinya kondisi wasting. Defisiensi mikronutrien telah dilaporkan pada penderita tuberkulosis, termasuk juga mereka yang dengan koinfeksi HIV. Penelitian-penelitian secara *cross sectional* mengindikasikan defisiensi vitamin A, tiamin, vitamin B6, folat dan vitamin E sering terjadi pada penderita TB aktif. Defisiensi vitamin A, vitamin E, tiamin, riboflavin, vitamin B6 dan vitamin C lebih umum terjadi penderita TB dengan HIV. Defisiensi mikronutrien dan status gizi umum yang jelek pada penderita TB aktif dapat menekan sistem imun cell-mediated yang merupakan pertahanan utama host untuk melawan bakteri *Mycobacterium*⁽¹⁸⁾.

Defisiensi vitamin A menyebabkan berkurangnya nafsu makan. Hal ini karena perubahan pada jonjot rasa pada lidah. Vitamin A juga berpengaruh

Tabel 5. Analisis pengaruh suplementasi vitamin A terhadap konversi BTA pada pasien TB Paru dengan pengobatan OAT kategori I

	n	Median (min-maks)	Probabilitas
Konversi BTA pasien TB Paru pada kelompok pemberian vitamin A	15	2 (2-4)	< 0,001
Konversi BTA pasien TB Paru pada kelompok tanpa pemberian vitamin A	15	4 (2-6)	

pasien yang tidak sembuh pada akhir pengobatan⁽¹⁵⁾

Pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak fase intensif. Hasil uji statistik *Mann-Whitney* diperoleh nilai p sebesar < 0,001 yang masih dibawah nilai tingkat kemaknaan alpha sebesar 0,05, artinya ada pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif di Wilayah Kerja

terhadap fungsi kekebalan tubuh manusia. Retinol tampaknya berpengaruh terhadap pertumbuhan dan diferensiasi limfosit B (leukosit yang berperan dalam proses kekebalan humoral). Disamping itu kekurangan vitamin A menurunkan respon antibodi yang bergantung pada sel-T (limfosit yang berperan pada kekebalan selular). Sebaliknya infeksi dapat memperburuk kekurangan vitamin A⁽¹⁹⁾.

SIMPULAN

Waktu rata-rata konversi sputum pasien TB paru usia ≥ 18 tahun, pengobatan OAT kategori 1 dengan IMT $\geq 18,5$ pada kelompok pemberian vitamin A 6000 IU + OAT kategori I adalah 2,4 minggu, sedangkan pada kelompok yang hanya diberikan OAT kategori I, waktu rata-rata konversi sputum adalah 4,1 minggu. Ada pengaruh suplementasi vitamin A pada pengobatan pasien TB paru usia ≥ 18 tahun, pengobatan OAT kategori 1 dengan IMT $\geq 18,5$ terhadap percepatan konversi dahak pada fase intensif di Wilayah Kerja Puskesmas Kecamatan Medan Kota. Pasien TB paru usia ≥ 18 tahun, pengobatan OAT kategori 1 dengan IMT $\geq 18,5$ mayoritas berumur 18-27 tahun, berjenis kelamin laki-laki, pekerjaan adalah mahasiswa, pemeriksaan BTA pasien adalah 3+, pada kelompok perlakuan konversi BTA pada minggu ke-2 dan pada kelompok kontrol konversi BTA pada minggu ke-4.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kemenkes RI. Pusat data dan Informasi. Tuberkulosis, temukan, obati sampai sembuh. Jakarta. 2015. Hal: 1.
2. WHO. Global Tuberculosis Report 2015. 20th edition. Geneva, Switzerland. 2015. p. 2, 5.
3. Kemenkes RI. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2015. Jakarta. 2016. Hal: 161, 365, 368.
4. Dinas Kesehatan Kota Medan. Laporan Kasus TB Paru 2013-2015.
5. Sekarindah T. Pengaruh pemberian vitamin A terhadap profil imun pasien tuberkulosis paru dengan terapi obat anti tuberkulosis [abstrak]. Perpustakaan Universitas Indonesia. Jakarta. 1992.
6. Marthur ML. Role of vitamin a supplementation in the treatment of tuberculosis [abstract]. India. 2007. Jan-Feb;20(1):16-21.
7. Pakasi TA, Elvina K, Suratih NMD, Salean M, Darmawidjaja N, Bor H, et al. Zinc and vitamin a supplementation fails to reduce sputum conversion time in severely malnourished pulmonary tuberculosis patients in Indonesia. Nutrition Journal 2010. 9:41.
8. Kemenkes RI. Pedoman nasional penanggulangan tuberkulosis. Jakarta. 2014. Hal: 128.
9. Dahlan MS. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. Penerbit Salemba Merdeka. Edisi Kelima. Jakarta. 2011.
10. Kemenkes RI. Standart prosedur operasional pemeriksaan mikroskopis TB. Direktorat Jenderal Bina Upaya Kesehatan, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.. Jakarta. 2012. Hal: 7.
11. WHO. Guideline: nutritional care and support for patients with tuberculosis. Geneva. 2013. p. 8-10.
12. Kemenkes RI. Riset Kesehatan dasar (Riskesdas). Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta. 2013. Hal: 70.
13. Tsani RM, Kasno. Gambaran klinis tuberkulosis paru di RSUP Dr. Kariadi Semarang Periode Januari-Juni 2011. Semarang. 2011. Hal: 37.
14. Ahmad I, Kushwaha R, Kant S, Natu SM, Singh SK, Usman K, et al. Role of vitamin a and zink supplementation on sputum conversion time in pulmonary tuberculosis patients. Erstwhile King George's Medical University. Journal Of Recent Advances In Applied Sciences (JRAAS) 28:63-68.
15. Nagpal M, Devgun P, Chawla N. A study on nutritional status and change in body mass index with treatment outcome in smear-positive pulmonary tb patients on dots in Amritsar City. India. 2014. International Journal of Medical Science and Public Health Vol 4 Issue 4. 454-457.
16. Pakasi TA, Karyadi E, Dolmans WM, Vandermeer JW, Vandervelden K, et al. Malnutrition and socio-demographic factors associated with pulmonary tuberculosis in Timor and Rote islands, Indonesia. Int J Tuberc Lung Dis 2009;13(6):755-9.
17. Karyadi E, West Ce, Schultink W, Nelwan Rh, Gross R, Amin Z, et al. A double-blind, placebo-controlled study of vitamin a and zinc supplementation in persons with tuberculosis In Indonesia: Effects On Clinical Response And Nutritional Status, American Society for Clinical Nutrition. USA. Am J Clin Nutr.75:720-7.
18. Lettow V, Harries M, Kumwenda AD, Zijlstra JJ, Clark EE, Taha TD. micronutrient malnutrition and wasting in adults with pulmonary tuberculosis with and without HIV coinfection in Malawi. 2004. BMC Infect Dis, 4 (1). p. 61. ISSN 1471- 2334 DOI:10.1186/1471-2334-4-61.
19. Almatsier S. Prinsip dasar ilmu gizi. Gramedia. Jakarta. 2013. Hal: 160.

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun dan Kulit Batang Sawo (*Manilkara zapota* (L.) Van Royen)

(Antibacterial Activity of Etanol Extract From Leaves and Bark of Sapodilla (*Manilkara zapota* (L.) Van Royen))

MELZI OCTAVIANI^{1*}, SYAFRINA¹

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru 28928, Indonesia

Diterima 7 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Sawo (*Manilkara zapota* (L.) van Royen) merupakan tanaman yang hidup di daerah tropis, berbuah sepanjang tahun dan penyebarannya cukup luas di Indonesia. Kandungan metabolit sekunder pada daun dan kulit batang sawo yaitu flavonoid, fenolik dan saponin yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Penelitian ini dilakukan dengan metode difusi cakram dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol daun dan kulit batang masing-masing dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125%, serta kontrol positif klindamisin dan kontrol negatif DMSO. Diameter zona hambat yang terbentuk pada pengujian ekstrak etanol daun sawo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi 50% masing-masing adalah 14,18±0,13 mm dan 15,33±0,25 mm. Sedangkan diameter zona hambat yang terbentuk pada pengujian ekstrak etanol kulit batang sawo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi 50% masing-masing adalah 14,22±0,15 mm dan 18,30±0,23 mm. Hasil analisis data menggunakan statistik ANOVA satu arah menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara variasi konsentrasi ekstrak. Hasil pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*.

Kata kunci: Antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, ekstrak etanol, sawo.

Abstract: Sapodilla (*Manilkara zapota* (L.) van Royen) is a plant that grows in a tropical climate, fruit all year round and the distribution is in the widespread in Indonesia. The contents of secondary metabolites in the leaves and the bark sapodilla are flavonoids, phenols and saponins are known to inhibit the growth of bacteria. The purpose of this research is to know the antibacterial activity of ethanol extract leaves and bark Sapodilla against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* bacteria. The study was performed by disc diffusion method with the variation concentrations of ethanol extract from the leaves and bark with a concentration of 50%, 25%, 12.5%, 6.25% and 3.125% respectively and the positive control is clindamycin and the negative control is DMSO. The diameter of the inhibition zone formed on the ethanol extract test of the leaves sapodilla against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* at a concentration of 50% was 14.18 ± 0.13 mm and 15.33 ± 0.25 mm, respectively. While the diameter of the inhibition zone formed on the ethanol extract test of the bark against *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* at a concentration of 50% was 14.22±0.15 mm and 18.30±0.23 mm, respectively. The results of the data statistical analysis using one-way ANOVA, it shown a significant difference ($p < 0.05$) between the variation of the concentration of the extract. The test results shown that the antibacterial activity ethanol extract of the leaves and bark of Sapodilla had activity for inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes* bacteria.

Keywords: Antibacterial, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, etanol extract, sapodilla.

* Penulis korespondensi, Hp. 081378029796
E-mail: melzioctaviani@stifar-riau.ac.id

PENDAHULUAN

SAWO (*Manilkara zapota* (L.) van Royen) termasuk tanaman keluarga Sapotaceae dan merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan dalam pengobatan tradisional. Secara tradisional masyarakat menggunakan buah sawo yang muda untuk mengatasi diare⁽¹⁾. Biji sawo digunakan sebagai pencegah edema karena dapat bersifat sebagai diuretik dan dapat mencegah pembentukan batu ginjal maupun batu kemih. Pasta dari biji sawo digunakan untuk mengurangi peradangan dan rasa sakit akibat sengatan dan gigitan hewan. Rebusan kulit dan buah digunakan untuk demam dan diare, serta teh kulit kayu digunakan untuk disentri⁽²⁾.

Sawo dapat memberikan efek farmakologi karena kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada tanaman tersebut. Senyawa metabolit aktif yang terkandung pada sawo yaitu senyawa alkaloid, flavonoid, tannin, triterpenoid, saponin dan glikosid^(2,3). Berdasarkan literatur senyawa metabolit aktif seperti fenolik, saponin, terpenoid, flavonoid, dan glikosid dilaporkan memiliki aktivitas sebagai antimikroba⁽⁴⁻⁷⁾.

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo dilakukan terhadap beberapa bakteri penyebab infeksi, khususnya pada kulit. Bakteri uji yang digunakan yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* merupakan bakteri yang memiliki peran dalam terjadinya *Acnes vulgaris*⁽⁸⁾. *Acnes vulgaris* merupakan suatu penyakit inflamasi kronik pada unit polisebaseus yang sering terjadi khususnya pada remaja dan dewasa muda⁽⁹⁾. Penelitian antibakteri terhadap sawo, khususnya di Indonesia masih terbatas, sedangkan penyebaran tanaman sawo cukup luas di Indonesia. Selain itu secara tradisional tanaman sawo sudah digunakan untuk pengobatan penyakit infeksi. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan ekstrak etanol kulit batang sawo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Sehingga dapat memberikan informasi di bidang farmasi dan dapat berguna dalam pengembangan sediaan farmasi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Nutrien Agar (NA), *Potato Dextrosa Agar* (PDA), disk klindamisin 10 µg, larutan dimetil

sulfoksida (DMSO), NaCl fisiologis, etanol 96%, kloroform, akuades, larutan besi (III) klorida 1%, logam magnesium, asam klorida pekat, norit, pereaksi *Liebermann-Burchard* (LB), kloroform amoniak, asam sulfat 2 N, pereaksi Mayer. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dan kulit batang sawo (*Manilkara zapota* (L.) van Royen).

METODE. Pembuatan Ekstrak Etanol.

Sampel sawo diambil dari Kelurahan Lembah Sari, Kecamatan Rumbai Pesisir, Pekanbaru. Bagian yang digunakan adalah daun dan kulit batang sawo (*Manilkara zapota* (L.) van Royen). Sampel dibersihkan dahulu dari kotoran yang melekat, lalu dikering anginkan, kemudian dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan kotoran yang masih tertinggal selama proses pengeringan, dipotong kecil-kecil dan ditimbang. Serbuk simplisia daun dan kulit batang sawo diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Serbuk simplisia daun dan kulit batang sawo dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap secara terpisah. Kemudian simplisia direndam menggunakan pelarut etanol selama 5 hari dan sesekali dikocok kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi ulang, pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali. Filtrat yang terkumpulkan kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Skrining Fitokimia. Skrining fitokimia secara kualitatif dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak etanol daun serta kulit batang sawo untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam simplisia dan ekstrak tersebut. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji fenolik, uji flavonoid, uji saponin, uji terpenoid, uji steroid dan uji alkaloid.

Pengujian Aktivitas Antibakteri. Bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* diremajakan terlebih dahulu, kemudian dibuat suspensi bakteri. Ekstrak etanol daun dan kulit batang masing-masing dibuat larutan dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125% dengan menggunakan pelarut DMSO. Sebanyak 0,3 mL suspensi bakteri uji dimasukkan ke dalam cawan Petri kemudian ditambahkan 15 mL media NA ke dalam cawan petri, dihomogenkan lalu dibiarkan memadat. Media inokulum yang telah disiapkan, ditanami cakram dengan menggunakan pinset steril, masing-masing cakram direndam dengan larutan uji pada setiap konsentrasi, cakram direndam DMSO sebagai kontrol negatif. Pada media juga diletakkan disk klindamisin 10 µg sebagai kontrol positif. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk bakteri *Staphylococcus aureus* dan selama 48 jam untuk bakteri *Propionibacterium acnes*. Pertumbuhan

bakteri uji diamati, diukur diameter hambatan pertumbuhan yang terbentuk dengan jangka sorong.

Analisis Data. Analisis data aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur diameter daerah hambat menggunakan jangka sorong pada masing-masing konsentrasi. Kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) satu arah dan uji *Tukey* menggunakan program SPSS.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk melihat aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo (*Manilkara zapota* (L.) van Royen) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Ekstraksi daun dan kulit batang dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% menghasilkan nilai rendemen ekstrak daun sebesar 27,53% dari 400 g sampel, dan rendemen ekstrak kulit batang yaitu sebesar 25,11% dari 120 g sampel. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun memiliki kandungan senyawa fenolik dan flavonoid, sedangkan ekstrak etanol kulit batang memiliki kandungan flavonoid, fenolik dan saponin.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia simplisia daun dan ekstrak etanol daun sawo.

Metabolit sekunder	Hasil		Hasil Pengamatan
	Simplisia Daun	Ekstrak Etanol Daun	
Alkaloid	-	-	Tidak Terbentuk endapan/kabut putih
Flavonoid	+	+	Memberikan warna merah muda sampai kemerahan
Fenolik	+	+	Memberikan warna biru sampai kehitaman
Saponin	-	-	Tidak Ada busa
Steroid	-	-	Tidak memberikan warna hijau
Terpenoid	-	-	Tidak memberikan warna jingga sampai kemerahan

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia simplisia kulit batang dan ekstrak etanol kulit batang sawo.

Metabolit sekunder	Hasil		Hasil Pengamatan
	Simplisia Kulit Batang	Ekstrak Etanol Kulit Batang	
Alkaloid	-	-	Tidak Terbentuk endapan/kabut putih
Flavonoid	+	+	Memberikan warna merah muda sampai kemerahan
Fenolik	+	+	Memberikan warna biru sampai kehitaman
Saponin	+	+	Tidak Ada busa
Steroid	-	-	Tidak memberikan warna hijau
Terpenoid	-	-	Tidak memberikan warna jingga sampai kemerahan

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia simplisia kulit batang dan ekstrak etanol kulit batang sawo.

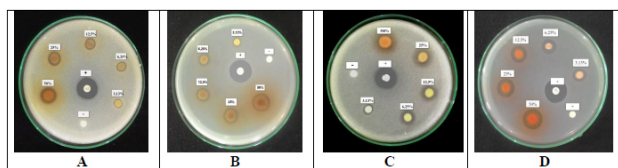
Metabolit sekunder	Hasil		Hasil Pengamatan
	Simplisia Kulit Batang	Ekstrak Etanol Kulit Batang	
Alkaloid	-	-	Tidak Terbentuk endapan/kabut putih
Flavonoid	+	+	Memberikan warna merah muda sampai kemerahan
Fenolik	+	+	Memberikan warna biru sampai kehitaman
Saponin	+	+	Tidak Ada busa
Steroid	-	-	Tidak memberikan warna hijau
Terpenoid	-	-	Tidak memberikan warna jingga sampai kemerahan

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo dilakukan dengan membuat seri konsentrasi tiap ekstrak menggunakan pelarut DMSO, dengan seri konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25% dan 50% b/v. Setiap seri konsentrasi diteteskan pada kertas cakram steril sebanyak 10 μ L, kemudian kertas cakram yang telah ditetesi sampel diletakkan pada media agar uji yang telah memadat. Pemilihan pelarut DMSO yang digunakan karena DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa, baik polar maupun nonpolar dan DMSO tidak memberikan zona hambat pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan⁽¹⁰⁾.

Kontrol positif yang digunakan dalam pengujian

antibakteri yaitu klindamisin 10 µg. Klindamisin aktif terhadap bakteri uji dan klindamisin merupakan antibiotik topikal yang dapat mengurangi jumlah mikroba dalam folikel *acnes vulgaris*⁽⁹⁾. Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO.

Hasil pengujian antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan bakteri *Propionibacterium acnes*, hal ini dapat dilihat adanya diameter hambat di sekitar cakram yang telah diberi ekstrak (Gambar 1).



Gambar 1. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo.

Keterangan :

A = Uji aktivitas ekstrak daun sawo terhadap *Staphylococcus aureus*

B = Uji aktivitas ekstrak daun sawo terhadap *Propionibacterium acnes*

C = Uji aktivitas ekstrak kulit batang sawo terhadap *Staphylococcus*

aureus

D = Uji aktivitas ekstrak kulit batang sawo terhadap *Propionibacterium acnes*

Hasil pengujian diameter hambat ekstrak etanol daun sawo dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50% b/v terhadap bakteri *S. aureus* berturut-turut yaitu sebesar 7,03 mm, 9,07 mm, 10,13 mm, 12,52 mm dan 14,18 mm. Terhadap bakteri *P. acnes* sebesar 8,08 mm, 9,39 mm, 10,89 mm, 13,07 mm dan 15,33 mm. Sedangkan hasil pengujian diameter hambat ekstrak etanol kulit batang dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50% b/v terhadap bakteri *S. aureus* berturut-turut yaitu sebesar 8,91 mm, 11,03 mm, 12,07 mm, 12,95 mm dan 14,22 mm. Terhadap bakteri *P. acnes* sebesar 9,78 mm, 11,67 mm, 14,38 mm, 16,2 mm dan 18,3 mm (Tabel 3 dan Tabel 4). Daya hambat yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi, semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula zona hambat yang dihasilkan⁽¹¹⁾.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun sawo.

Bakteri	Perlakuan	Diameter Hambat (mm)				Kategori Daya Hambat
		R1	R2	R3	Rata-rata ± Standar Deviasi	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrol positif	20,82	20,42	20,75	20,66 ± 0,21	Sangat kuat
	Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak ada
	3,13%	7,35	6,8	6,95	7,03 ± 0,28	Lemah
	6,25%	9,2	8,95	9,07	9,07 ± 0,13	Lemah
	12,50%	10,1	9,8	10,5	10,13 ± 0,35	Sedang
	25%	12,9	12	12,65	12,52 ± 0,47	Sedang
	50%	14,31	14,05	14,18	14,18 ± 0,13	Sedang
<i>Propionibacterium acnes</i>	Kontrol positif	21,63	21,54	21,29	21,49 ± 0,18	Sangat kuat
	Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak ada
	3,13%	8,1	7,85	8,3	8,08 ± 0,23	Lemah
	6,25%	9,61	9,04	9,51	9,39 ± 0,30	Lemah
	12,50%	10,9	10,75	11,02	10,89 ± 0,14	Sedang
	25%	13,4	13,05	12,75	13,07 ± 0,33	Sedang
	50%	15,6	15,1	15,3	15,33 ± 0,25	Kuat

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol kulit batang sawo.

Bakteri	Perlakuan	Diameter Hambat (mm)				Kategori Daya Hambat
		R1	R2	R3	Rata-rata ± Standar Deviasi	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Kontrol positif	20,72	20,45	19,85	20,34 ± 0,45	Sangat kuat
	Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak ada
	3,13%	8,75	8,85	9,12	8,91 ± 0,19	Lemah
	6,25%	10,9	11,15	11,05	11,03 ± 0,13	Sedang
	12,50%	11,95	12,2	12,05	12,07 ± 0,13	Sedang
	25%	12,7	13,2	12,95	12,95 ± 0,25	Sedang
	50%	14,12	14,4	14,15	14,22 ± 0,15	Sedang
<i>Propionibacterium acnes</i>	Kontrol positif	21,23	21,52	21,1	21,28 ± 0,22	Sangat kuat
	Kontrol negatif	0	0	0	0	Tidak ada
	3,13%	10	9,85	9,5	9,78 ± 0,26	Lemah
	6,25%	11,2	11,5	12,3	11,67 ± 0,57	Sedang
	12,50%	14,75	14,4	14	14,38 ± 0,38	Sedang
	25%	16,4	16	16,2	16,20 ± 0,20	Kuat
	50%	18,35	18,05	18,5	18,30 ± 0,23	Kuat

Aktivitas antimikroba dari ekstrak etanol daun dan ekstrak kulit batang sawo dapat dihubungkan dengan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tanaman tersebut. Hasil pengujian skrining fitokimia yang telah dilakukan, didapatkan bahwa sawo memiliki kandungan senyawa flavonoid, fenolik dan saponin. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler^(12,13). Selain berperan dalam inhibisi pada sintesis DNA-RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat, flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energi. Senyawa ini akan mengganggu metabolisme energi dengan cara yang mirip dengan menghambat sistem respirasi, karena dibutuhkan energi yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul⁽¹⁴⁾.

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar⁽¹³⁾. Senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian

sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida⁽¹⁵⁾.

Hasil analisis uji statistik *One way ANOVA (Analysis of Variance)* untuk mencari nilai perbandingan rata-rata yang signifikan antar diameter hambat pada konsentrasi yang berbeda. Analisa statistik dilakukan dengan derajat kepercayaan 95% (=0,05) dengan menggunakan program SPSS. Berdasarkan hasil uji statistik *one-way ANOVA* menunjukkan nilai $p < 0,05$ ($p = 0,000$) yang berarti seluruh konsentrasi menunjukkan adanya perbedaan signifikan antar seluruh kelompok perlakuan.

SIMPULAN

Penelitian uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo di atas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. Diameter zona hambat yang terbentuk pada pengujian ekstrak etanol daun dan kulit batang sawo terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes* dengan konsentrasi 50% menunjukkan daya hambat dengan kategori sedang sampai kuat. Uji statistik *One-way ANOVA* didapatkan nilai $p < 0,05$ yaitu $p = 0,000$, sehingga dapat disimpulkan bahwa seluruh konsentrasi menunjukkan perbedaan diameter

hambat yang signifikan antar seluruh kelompok perlakuan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau yang telah memberikan dukungan finansial terhadap penelitian ini melalui hibah penelitian SPP/DPP STIFAR.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arsyad M dan Ayu RA. Konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak etanol buah sawo (*Achras zapota L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Jurnal Ilmiah Ibnu Sina. 2016. 1(2):211-8.
2. Milind P and Preeti. Chickoo: a wonderful gift from nature. Int J. Res Ayurveda Pharm. 2015. 6(4):544-50.
3. Bhargavi S, Buthapalli K, Dantu KS, Buchiraju R, Sreekanth N. An evaluation of the antibacterial activity of root extracts of *Manilkara zapota* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. International Journal Of Phytopharmacology. 2013. 4(3):171-3.
4. Ganguly A and Abdur R. Evaluation of the cytotoxic, antimicrobial, antioxidant, anthelmintic and CNS depressant activities of *Manilkara zapota* leaf (Sapotaceae). World Journal Of Pharmaceutical Research. 2014. 4(1):272-83.
5. Osman MA, Abdul A, Rowshanul H and Rezaul K. Antimicrobial investigation on *Manilkara zapota* (L.) P. Royen. International Journal Of Drug Development And Research. 2011. 3(1):185-90.
6. Djamil R dan Zaidan S. Isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak metanol daun katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), *Euphorbiaceae*. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2016. 14(1):57-61.
7. Ratna YRD, Ardani US, Fathiana Z, Rahmatillah A dan Trisharyanti I. Daya antibakteri ekstrak dan fraksi-fraksi daun jambu mete (*Anacardium occidentale L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sensitif dan multiresisten. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2016. 14(1):103-10.
8. Movita T. *Acnes vulgaris*. Continuing Medical Education. 2013. 40(4):269-22.
9. Afriyanti RN. *Acne vulgaris* pada remaja. J Majority. 2015. 4(6):102-9.
10. Identifikasi senyawa aktif antibakteri dengan metode bioautogravi KLT terhadap ekstrak etanol tangkai daun alas (*Colocasia esculenta* (L.) Schott. Prosiding Penelitian Spesia Unisba, Bandung 18-19 Agustus, 2015:583-90.
11. Nazri NA, Ahmat A, Adnan SA, Syed M, Syaripah R. In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. African Journal Of Biotechnology. 2011. 10(30):5728-35.
12. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 1999. 12(4): 564-82.
13. Nuria MC, Faizatun A, Sumantri. Uji antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* TCC 1408. Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian. 2009. 5(2): 26-37.
14. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. 2005. 26:343-56.
15. Lorent JH, Quetin-Leclercq J, Mingeot-Leclercq MP. The amphiphilic nature of saponins and their effects on artificial and biological membranes and potential consequences for red blood and cancer cells. Org Biomol Chem. 2014. 12(44):8803-22.

Aktivitas Antibiotik Isolat Bakteri Kp13 dan Analisa Kebocoran Sel Bakteri *Escherichia coli*

(Activity of Antibiotic Bacterial Isolate Kp13 and Cell Leakage Analysis of *Escherichia coli* Bacteria)

ALFIAN SYARIFUDDIN^{1*}, NANIK SULISTYANI², KINTOKO²

¹Program Studi S1 Farmasi, Universitas Muhammadiyah Magelang, Magelang, Indonesia

²Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia.

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Bakteri merupakan mikroorganisme yang dapat memproduksi metabolit sekunder, salah satunya antibiotik. Isolat KP13 adalah bakteri yang diisolasi dari rizosfer tanaman Kayu Putih. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibiotik fraksi teraktif isolat KP13 terhadap bakteri *Escherichia coli* dan kemampuan menyebabkan kebocoran pada sel bakteri *Escherichia coli*. Ekstraksi antibiotik menggunakan pelarut etil asetat dan dilakukan fraksinasi dengan gradien pelarut *n*-heksan-etilasetat dan pelarut metanol. Hasil fraksinasi dilakukan KLT untuk mengelompokkan kelompok fraksi berdasarkan nilai Rf nya. Kelompok fraksi dibandingkan aktivitas antibiotiknya dilanjutkan pengujian Kadar Hambat Minimum (KHM). Spektrofotometri UV digunakan untuk menguji kebocoran substansi sel bakteri meliputi asam nukleat dan protein serta Spektrofotometri Serapan Atom (SSA) untuk menguji pengeluaran kadar ion K⁺ dan Ca²⁺. Hasil menunjukkan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah fraksi nomor 1 dengan nilai kadar hambat minimal (KHM) 5% dan dengan diameter zona hambat 7,33±0,58 mm.

Kata kunci: Ekstrak etil asetat Isolat KP13, *Escherichia coli*, fraksi teraktif, kebocoran sel.

Abstract: A bacterium is one of microorganisms that can produce secondary metabolite, such as antibiotic. KP13 isolate is a bacterium isolated from *Melaleuca leucadendron* L rhizosphere. The aim of this study is to know the effect of the most active fraction antibacterium of KP13 isolate toward *Escherichia coli* bacterium and the ability to caused cell leakage. Extraction of antibiotic was conducted by ethyl acetate. Extract is fractioned with a *n*-hexan-ethylacetate solvent gradient another uses a solvent methanol. Each fraction is done by KLT and grouped based on RF value. A fraction group is compare by inhibition effectiveness. Then, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) from the most active group is tested. Cell leakage analysis was performed using UV spectrophotometry to detect the release of nucleic acid and protein. Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS) was used to detect ion release of K⁺ and Ca²⁺ from. cell of bacteria. The results showed that the most active fraction against *Escherichia coli* was the fraction number 1 with MIC value of 5% and inhibition zone of 7.33±0.58 mm.

Keywords: Ethyl acetate extract KP13 isolate, an active fraction, cell leakage, *Escherichia coli*.

*Penulis korespondensi: Hp :081804255898
Email: alfiansyarifuddin08@gmail.com

PENDAHULUAN

EKSPLORASI antibiotik dari metabolit sekunder dari suatu bakteri banyak dilakukan dan antibiotik tersebut mempunyai mekanisme penghambatan berbeda-beda. Salah satu mekanisme penghambatan yaitu adanya kerusakan membran sitoplasma, yaitu terjadinya kebocoran kandungan sitoplasma seperti ion K^+ , dan peningkatan K^+ diluar sel merupakan tanda kerusakan permeabilitas membran⁽¹⁾. Ion Ca^{2+} mempengaruhi kestabilan dinding bakteri dan dengan adanya keluarnya ion tersebut dari sel menyebabkan kestabilan dinding sel terganggu yang sehingga dapat mengakibatkan kematian bakteri.

Mekanisme lain yang mungkin terjadi yaitu masuknya zat antibiotik ke dalam sel kemudian menempel pada organel sehingga mengganggu proses metabolisme seluler pada bakteri *Escherichia coli*. Permeabilitas membran yang tidak berfungsi dengan baik dapat mengakibatkan kebocoran sel dan keluarnya komponen sel⁽²⁾. Selain itu proses transkripsi dan translasi dapat terhambat dengan cara interkalasi senyawa aktif terhadap DNA/RNA. Kebocoran protein dan asam nukleat dapat terjadi melalui mekanisme interkalasi tersebut⁽³⁾.

Isolasi mikroorganisme dari rizosfer tanaman Kayu Putih sebagai penghasil antibiotik dan mendapatkan isolat aktif sebagai antibiotik, yaitu KP13. Penelitian tersebut juga melakukan ekstraksi hasil kultur isolat dengan menggunakan pelarut etil asetat yang aktif dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ekstraksi Antibiotik dari mikroorganisme di tanah dengan menggunakan pelarut etil asetat dan dilakukan analisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang menghasilkan 2 spot pada plat silica gel 7,6 x 2,4 cm⁽⁴⁾. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktifitas antibiotik fraksi teraktif dan menganalisis kebocoran sel menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan *Atomic Absorbance Spectrophotometer* (AAS). Analisa kebocoran sel dapat menunjukkan mekanisme aksi zat antibiotik tersebut dan tempat aksinya.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan yang digunakan adalah media SNB, media Mueller Hinton, NaCl 0,9%, BHI, standard Mc Farland (108 CFU/mL), gliserol 25%, NaCl, KNO_3 , K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, *E.coli* ATCC 25922, *n*-heksan, etil asetat, etanol 70%, metanol, dan kloroform..

METODE. Pembuatan Kultur Bakteri, Ekstraksi, dan Fraksinasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Isolat bakteri hasil isolasi

dari rizosfer tanaman kayu putih (isolat KP13). Pembuatan starter dilakukan dengan cara mengambil seperempat bagian plate isolat KP13 dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL yang berisi media SNB steril sebanyak 50 mL⁽⁵⁾. Inkubasi pada suhu kamar selama 5 hari dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer*⁽⁶⁾. Dilakukan kultur bertingkat hingga volume 3 liter. Kultur uji yang sudah diinkubasi selama 14 hari disaring menggunakan corong *buchner*, kemudian dipekatkan pada suhu 50 °C dan diekstraksi menggunakan etil asetat⁽⁴⁾. Pelarut yang digunakan dalam fraksinasi yaitu campuran *n*-heksan, etil asetat dengan perbandingan berturut-turut 9:1 (v/v), 8:2 (v/v), 7:3 (v/v), 6:4 (v/v), 5:5 (v/v) dan sebaliknya serta etil asetat:metanol 1:1 (v/v) dan metanol 100%. Hasil KLT masing masing fraksi dengan profil pemisahan yang sama dikelompokkan.

Pembuatan Media MHA. Sebanyak 19 g serbuk media MHA dilarutkan dalam akuades sebanyak 500 mL dengan dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Setelah itu dituang pada cawan petri dan ditunggu sampai agar memadat.

Pembuatan Suspensi Bakteri. Mengambil 100 μ L stok bakteri dimasukkan dalam 1 mL BHI, diinkubasi selama 18-24 jam kemudian mengambil 100 μ L dimasukkan ke dalam BHI 1 mL, diinkubasi selama 3-5 jam di dalam inkubator. Kemudian mengambil 100 μ L bakteri diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhan sama dengan standar Mc Farland 108 CFU/mL⁽⁷⁾.

Pembuatan Larutan Uji Ekstrak. masing masing kelompok fraksi dibuat dalam konsentrasi 40% sebanyak 100 μ L replikasi 3 kali dengan kontrol negatif DMSO 10 % dan kontrol positif kloramfenikol 0,1%.

Uji Kadar Hambat Minimum (KHM). Fraksi teraktif ditentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dengan kadar yang digunakan antara lain :40%, 30%, 20%, 10%, 5% dan 2,5%. Setiap lubang sumuran diisi larutan uji dengan konsentrasi yang sudah ditentukan sebanyak 50 μ L dengan menggunakan mikropipet lalu dibiarkan selama 2 jam, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 °C.

Analisis Kebocoran Sel dengan Spektrofotometer Uv-Vis. Suspensi bakteri uji umur 18-24 jam sebanyak 10 mL *disentrifuse* dengan kecepatan 3500 rpm selama 15-20 menit sehingga diperoleh biomassa sel berupa endapan. Endapan biomassa sel bakteri tersebut dicuci dengan *buffer phospat* pH 7,4 dan diulang sebanyak 2 kali. Endapan tersebut kemudian disuspensikan ke dalam 4 mL larutan *buffer phospat* pH 7,4. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya substansi yang terdapat pada supernatan bakteri uji setelah dikontakkan

dengan fraksi teraktif ekstrak etil asetat antibiotik dari isolat bakteri KP13 pada konsentrasi 5% dan 10% Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Analisis Kadar Ion Logam K^+ dan Ca^{2+} dengan Atomic Absorbance Spectrophotometer (AAS). Preparasi sampel seperti pada pengamatan kebocoran sel dengan spektrofotometri Uv-Vis. Kebocoran dinyatakan dengan terukurnya ion-ion logam K^+ dan Ca^{2+} yang dideteksi dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorption Spectrometer*).

Analisis Data. Data zona hambat pada uji Kadar Hambat Minimum dan data kebocoran sel diuji homogenitas dengan uji *Kolmogorov-smirnov* dan uji normalitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *one way* Anova dan LSD dengan taraf kepercayaan 95%, kemudian dilakukan uji korelasi dengan uji Pearson. Jika data tidak terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann-Whitney*, kemudian dilakukan uji korelasi dengan uji *Spearman*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi. Kultur sebanyak 3 liter selama 14 hari dengan 3 kali perlakuan⁽⁸⁾. Kultur disaring dan filtrat diekstraksi menggunakan etil asetat (1:1) dan mendapatkan rendemen 15,82 g. Ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dari 1 L kultur mendapatkan ekstrak etil asetat sebanyak 350 mg⁽⁹⁾.

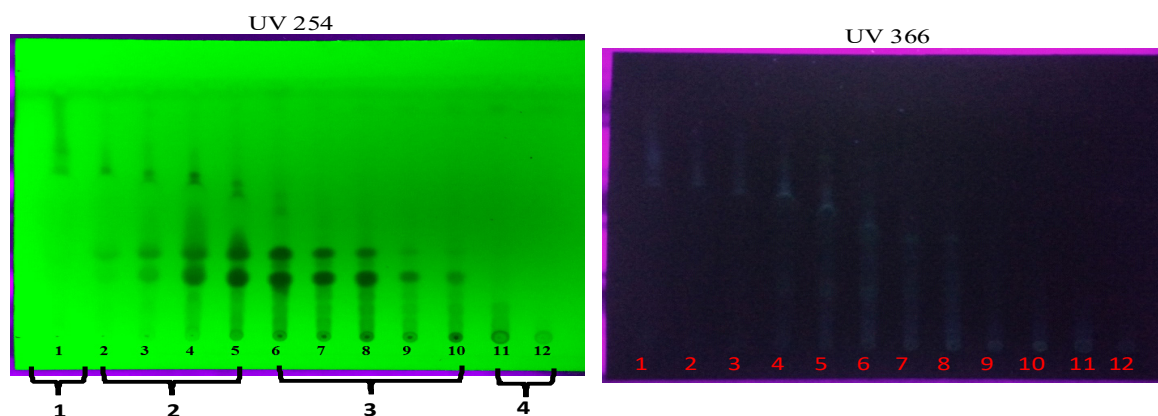
Ekstrak etil asetat yang diperoleh selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan gradien pelarut (*n*-heksan:etilasetat), dilanjutkan menggunakan perbandingan pelarut etilasetat:metanol (1:1) dan metanol. Proses fraksinasi dengan pelarut organik yang berbeda tingkat kepolarannya dapat mempengaruhi

jenis dan kadar senyawa yang tersari di dalamnya⁽¹⁰⁾. Fraksinasi ekstrak etil asetat isolat KP13 ini menggunakan metode partisi padat-cair. Ekstrak etil asetat sebanyak 8387,3 mg. Masing-masing pelarut yang digunakan 100 mL dengan masing-masing 3 kali pengulangan, setiap pengadukan selama 1 jam.

Setelah diperoleh berat kering dari hasil fraksinasi, melakukan KLT dengan cara masing-masing fraksi yang dihasilkan dengan konsentrasi 40% ditotolkan pada plat KLT silika gel F254 yang sebelumnya telah diaktifkan pada oven dengan suhu 105 °C selama ±10 menit. Masing-masing fraksi ditotolkan sebanyak 10 µL menggunakan pipa kapiler 5 µL. Profil spot yang terbentuk mempunyai karakteristik sama yang ditinjau dari nilai R_f nya dikelompokkan menjadi satu kelompok, sehingga diperoleh 4 kelompok fraksi. Masing-masing mempunyai karakteristik yang sama seperti pada Gambar 1.

Fraksi kelompok 1 menunjukkan adanya potensi aktivitas antibiotik yang ditunjukkan adanya zona bening di sekitar lubang sumuran yang menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan sebesar 12,33±0,28 mm, sedangkan kelompok fraksi 2 juga menunjukkan adanya potensi aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 7,67±0,58 mm. Kelompok fraksi nomor 3 dan 4 tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan Tabel 1, dapat disimpulkan, kelompok fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* adalah kelompok fraksi nomor 1 dengan nilai rata-rata diameter zona hambat 12,33±0,28 mm.

Analisis statistiknya pada pengujian untuk menentukan kelompok fraksi teraktif dengan uji *One Sampel Kolmogrov-Smirnov Test* terdistribusi normal tetapi tidak homogen pada uji homogenitas yang



Gambar 1. Fase diam silika gel GF 254 dan fase gerak kloroform : etil asetat : metanol (4 : 1 : 0,5), hasil elusi KLT dilihat pada UV 254 nm dan 366 nm.

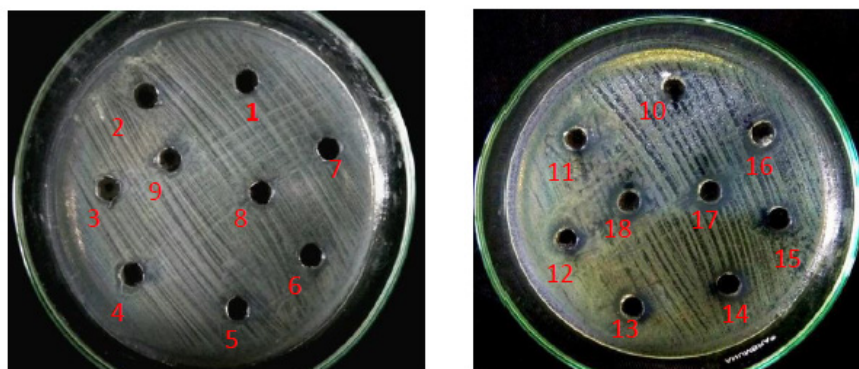
Tabel 1. Rata-rata zona hambat uji aktivitas kelompok fraksi terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Kelompok fraksi	Replikasi	Zona hambat (mm)	Rata-rata zona hambat (mm)±SD
Kelompok 1 40% 50µL (20mg)	1	12,50	12,33±0,28*
	2	12,00	
	3	12,50	
Kelompok 2 40% 50µL (20mg)	1	8,00	7,67±0,58
	2	8,00	
	3	7,00	
Kelompok 3 40% 50µL (20mg)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kelompok 4 40% 50µL (20mg)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kontrol negatif (DMSO 10%)	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	
Kontrol positif (kloramfenikol 0,1%)	1	35,3	37,06±2,17
	2	39,5	
	3	36,4	

ditandai dengan nilai sig=0,001, sehingga <0,005. Oleh karena itu diuji non parametrik dengan dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Berdasarkan uji *Kruskal-Wallis* diperoleh *mean rank* dari keempat kelompok fraksi, fraksi kelompok 1 menduduki nilai *mean rank* pertama dari keempat kelompok fraksi, sehingga dapat ditarik kesimpulan kelompok fraksi teraktif adalah fraksi kelompok 1 yang digunakan untuk pengujian tahap berikutnya.

Uji Kadar Hambat Minimum (KHM). Fraksi teraktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

Escherichia coli diuji untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), yaitu dari kelompok fraksi nomor 1 dengan menggunakan metode sumuran (*Cup-plate technique*), dengan cara memasukkan kelompok fraksi nomor 1 dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%, 20%, 30% dan 40% sebanyak 50 µL dalam lubang sumuran yang berdiameter 6 mm⁽¹⁾. Dari hasil pengujian KHM tersebut, didapatkan nilai Kadar Hambat Minimum kelompok fraksi nomor 1 terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi 5% yang ditunjukkan pada Gambar 2, dan mempunyai rata-rata

Gambar 2. Hasil uji kadar hambat minimum fraksi teraktif terhadap *Escherichia coli*.

Keterangan :

1-3 = 2,5% 50µL (1,25 mg); 4-6 = 5% 50µL (2,5 mg); 7-9 = 10% 10µL (5 mg); 10-12 = 20% 50µL (10mg); 13-15 = 30% 50µL (15mg); 16-18 = 40 % 50µL (20mg).

Tabel 2. Rata-rata zona hambat uji kadar hambat minimum kelompok fraksi teraktif terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Konsentrasi (%)	Replikasi	Zona hambat (mm)	Rata-rata zona hambat (mm)±SD
40	1	12,00	12,08±0,14
	2	12,25	
	3	12,00	
30	1	11,75	11,42±0,38
	2	11,50	
	3	11,00	
20	1	10,00	10,58±0,52
	2	11,00	
	3	10,75	
10	1	8,00	7,33±0,58
	2	7,00	
	3	7,00	
5	1	8,00	7,33±0,58*
	2	7,00	
	3	7,00	
2,5	1	6,00	6,00±0,00
	2	6,00	
	3	6,00	

diameter zona hambat sebesar 7,33±0,58 mm yang ditunjukkan pada Tabel 2.

Penelitian mengenai aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri oleh *Actinomycetes* dari tanah di India terhadap bakteri *Escherichia coli*, metabolit sekunder ekstra selulernya mulai menunjukkan aktivitas antibiotiknya pada konsentrasi 0,06 mg/mL⁽¹²⁾.

Analisis statistik menunjukkan bahwa diameter zona hambat pada pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) dengan analisis *One sample Kolmogorov-smirnov* terdistribusi normal, tetapi pada uji homogenitas mendapatkan hasil tidak homogen. Hasil analisis tidak homogen perlu dilakukan uji *Kruskall-Wallis* yang mendapatkan nilai p-value 0,002<0,005 dapat ditarik kesimpulan perlakuan penambahan fraksi kelompok 1 memberikan pengaruh bermakna terhadap zona hambat yang ditimbulkan.

Ditinjau dari *mean rank*, pada penambahan konsentrasi 2,5% mempunyai nilai yang sama terhadap kontrol negatif. Sedangkan nilai dari penambahan konsentrasi 5% mempunyai nilai *mean rank* lebih tinggi dibanding dengan kontrol negatif dan penambahan fraksi kelompok 1 dengan konsentrasi 2,5%, tetapi nilai *mean rank* yang ditimbulkan pada penambahan konsentrasi 5% sama dengan

penambahan 10% fraksi kelompok 1. Hasil pengujian dengan uji *Mann-Whitney* pada penambahan 2,5% fraksi kelompok 1 tidak ada perbedaan bermakna diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan dengan nilai p>0,05, sedangkan hasil uji *Mann-Whitney* konsentrasi 5% mempunyai nilai p<0,05 jadi sudah mulai terjadi perbedaan bermakna pada penambahan 5% fraksi kelompok 1. Uji korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi sempurna dengan nilai sig<0,05 dan mempunyai nilai koefisien korelasi 0,969. Nilai koefisien korelasi tersebut berada pada rentang 0,75-0,99.

Fraksi kelompok 1 tidak ada perbedaan bermakna diameter zona hambat yang dihasilkan ditunjukkan dengan nilai p>0,05, sedangkan hasil uji *Mann-Whitney* konsentrasi 5% mempunyai nilai p<0,05 jadi sudah mulai terjadi perbedaan bermakna pada penambahan 5% fraksi kelompok 1. Uji korelasi Spearman menunjukkan adanya korelasi sempurna dengan nilai sig<0,05 dan mempunyai nilai koefisien korelasi 0,969. Nilai koefisien korelasi tersebut berada pada rentang 0,75-0,99.

Analisis Kebocoran Sel Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis dan Atomic Absorbance Spectrophotometer (AAS). Mikroba bersifat sensitif apabila pertumbuhan bakteri dan kematian mikroba

tersebut terhambat. Mekanisme penghambatan atau kematian mikroba terhadap paparan senyawa aktif dapat diketahui dengan adanya kebocoran sel, gangguan metabolisme, dan perubahan morfologi sel.

Peningkatan nilai absorbansi pada sel yang diukur mengindikasikan peningkatan jumlah isi sel yang dikeluarkan dari sel. Komponen isi sel yang bocor keluar sel dapat diukur pada panjang gelombang 260 nm adalah DNA meliputi purin, pirimidin, dan ribonukleotida, sedangkan pada panjang gelombang 280 nm dapat mengukur tirosin dan triptopan⁽¹³⁾. Hasil perhitungan kebocoran sel bakteri diperlihatkan pada Tabel 3.

Metode untuk mengoreksi adanya asam nukleat bisa dikembangkan dengan mengukur rasio absorbansi pada 280 dan 260 nm. Rasio tersebut dapat digunakan untuk memperkirakan jumlah protein yang juga terdapat kandungan asam nukleat. Terdapat ketetapan rasio yang mengindikasikan jumlah protein. Konsentrasi DNA genom dan RNA dihitung berdasarkan rumus yang dikembangkan oleh⁽¹⁴⁾.

Analisis statistik menunjukkan bahwa data kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel terdistribusi normal tetapi tidak homogen. Pada uji analisis *Kruskal-Wallis* kadar DNA dan RNA pada penambahan konsentrasi 5% dan 10% fraksi kelompok 1 menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga memberikan pengaruh bermakna terhadap kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel. Uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa penambahan fraksi kelompok 1, 5% dan 10% keduanya memberikan nilai $p < 0,05$ pada kadar DNA dan RNA sehingga menunjukkan perbedaan kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel. Uji korelasi Spearman menunjukkan

nilai koefisien korelasi kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel masuk pada rentang 0,75-0,99 yang menunjukkan ada korelasi positif yang sangat kuat, sehingga dengan peningkatan pemberian konsentrasi fraksi kelompok 1, maka semakin tinggi kadar DNA dan RNA pada kebocoran sel.

Struktur dinding sel bakteri gram negatif *Escherichia coli* terdiri dari tiga lapisan yaitu membran sitoplasma, membran luar, dan lapisan diantara keduanya, yaitu lapisan tipis peptidoglikan. Membran luar sel terdiri dari lipopolisakarida, fosfolipid, dan lipoprotein. Kekompakan lapisan lipopolisakarida (LPS) distabilkan oleh interaksinya dengan ion Ca^{2+} serta ion divalen lainnya. Kestabilan permeabilitas membran sel bakteri ini juga dipengaruhi oleh konsentrasi ion K^+ pada cairan sitoplasma⁽¹⁵⁾.

Fraksi kelompok 1 dari ekstrak etil asetat isolat KP13 telah menunjukkan aktivitas antibiotik terhadap bakteri *Escherichia coli*. Selain itu, telah ditentukan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM). Mengacu potensi aktivitas antibiotik tersebut dapat diketahui dampak yang terjadi terhadap mekanisme kematian sel bakteri *Escherichia coli*. Analisa kebocoran sel tersebut dengan menggunakan alat AAS (*Atomic Absorption Spectrophotometer*). Adanya ion K^+ dan Ca^{2+} yang terbaca pada Spektrofotometri Serapan Atom menunjukkan bahwa terjadi pengeluaran ion K^+ dan Ca^{2+} pada sampel kelompok fraksi 1 terhadap bakteri *Escherichia coli*. Penambahan kelompok fraksi 1 terhadap bakteri uji menggunakan 3 konsentrasi, yaitu 0%, 5% dan 10%. Hasil kebocoran ion diperlihatkan pada Tabel 4.

Tabel 3. Hasil perhitungan kebocoran isi sel bakteri *Echerichia coli* akibat penambahan fraksi kelompok 1 isolat KP13 yang terbaca pada panjang gelombang 260 dan 280 nm.

Parameter	0%	5%	10%
OD280/260	0,723±0,046	0,759±0,001	0,825±0,002
Asam Nukleat (%)	9,333±2,309	8,00	6,00±0,000
Faktor koreksi	0,506±0,075	0,550	0,630±0,000
Protein (µg/ml)	0,002±0,001	0,097±0,001	0,225±0,003
Konsentrasi DNA (µg/ml)	2,667±0,577	232±1.000*	433.333±7.572*
Konsentrasi RNA (µg/ml)	2,133±0,461	185.600±0.8*	346.667±6.057*

Keterangan: * signifikan ($p \text{ value} < 0,05$) terhadap konsentrasi 0%.

Tabel 4. Hasil uji kebocoran ion Ca^{2+} dan K^+ *Escherichia coli* akibat penambahan kelompok fraksi nomor 1 dari ekstrak etil asetat isolat KP13.

Konsentrasi	Parameter	Hasil pengukuran kadar ion logam (ppm)			Rata-rata(Ppm)
		I	II	III	
0%	Ca^{2+}	0,148	0,170	0,148	0,155±0,013
	K^+	792,026	783,395	792,026	789,149±4,983
5%	Ca^{2+}	0,459	0,459	0,481	0,466±0,012*
	K^+	766,132	783,395	774,764	774,764±8,63*
10%	Ca^{2+}	0,281	0,304	0,259	0,281±0,022*
	K^+	731,607	740,238	740,238	737,361±4,983*

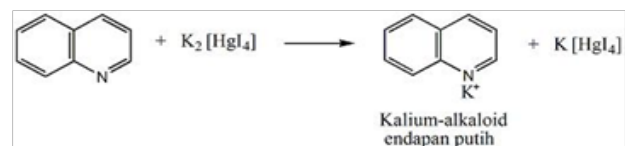
Keterangan: * signifikan (p value<0,05) terhadap konsentrasi 0%.

Ion Kalium (K^+) merupakan kation utama yang terkandung dalam sitoplasma pada sel yang sedang tumbuh dan mempengaruhi kestabilan permeabilitas membran sel bakteri⁽¹⁵⁾. Ion K^+ memiliki peran penting dalam mengaktivasi enzim sitoplasma untuk menjaga tekanan turgor serta mengatur stabilitas pH dalam sitoplasma. Ion K^+ pada bakteri memiliki peranan penting dalam fungsinya menjaga kesatuan ribosom. Keberadaan ion logam K^+ dalam sel mempunyai peran penting dalam stabilisasi RNA. Sehingga, keluarnya ion logam dari sel dapat mempengaruhi permeabilitas membran dan atau dinding sel bakteri⁽¹⁶⁾. Kerusakan yang terjadi pada membran sitoplasma ditandai dengan terjadinya kebocoran isi dari sitoplasma, seperti ion K^+ , sehingga terjadi peningkatan ion K^+ diluar sel mengindikasikan terjadi kerusakan permeabilitas membran sel bakteri⁽¹⁾.

Kebocoran ion logam K^+ diindikasikan dengan peningkatan konsentrasi K^+ terdapat kebocoran sel, tetapi pada penelitian kali ini berbanding terbalik. Dengan adanya peningkatan konsentasi fraksi kelompok 1 yang diberikan terjadi penurunan konsentrasi ion logam K^+ .Kemungkinan pada senyawa aktif terdapat senyawa yang dapat mengikat dan mengendapkan ion K^+ , yaitu alkaloid. Senyawa alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam⁽¹⁷⁾. Nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ membentuk kompleks kalium-alkaloid kemudian mengendap⁽¹⁸⁾. Sebagai pendekatan oleh hasil ion K^+ berbanding terbalik oleh konsentrasi sampel yang ditambahkan, yaitu pada uji alkaloid dengan pereaksi mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ membentuk kompleks kalium-alkaloid kemudian mengendap⁽¹⁹⁾. Persamaan reaksi diperlihatkan pada Gambar 3 berikut:

Pada reaksi menggunakan reagen *Dragendroff*,

ion logam K^+ membentuk ikatan kovalen koordinasi dengan alkaloid sehingga membentuk kompleks



Gambar 3. Reaksi K^+ terhadap senyawa alkaloid dengan pereaksi mayer.

kalium-alkaloid yang mengendap⁽¹⁹⁾. Persamaan reaksi diperlihatkan pada Gambar 4 berikut:

Oleh karena itu, dengan adanya peningkatan konsentrasi fraksi kelompok 1 yang dipaparkan, maka senyawa alkaloid juga meningkat, sehingga



Gambar 4. Reaksi K^+ terhadap senyawa alkaloid dengan pereaksi Dragendroff.

pembentukan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap juga meningkat antara fraksi kelompok 1 dengan ion logam K^+ , sehingga ion logam K^+ pada supernatan sampel yang terbaca oleh Spektrofotometri Serapan Atom juga menurun.

Ion logam Ca^{2+} terdapat di bagian sitosol yaitu cairan sitoplasma dan juga ditemukan pada dinding sel yang ikut berperan dalam aktivitas enzim⁽²⁰⁾. Ion Ca^{2+} tersebut berfungsi menghubungkan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri gram negatif sehingga berfungsi untuk menjaga kestabilan dinding bakteri. Keluarnya ion dari sel yang disebabkan karena ada paparan senyawa lain dari luar dapat mempengaruhi kestabilan dinding sel yang kemudian dapat mengakibatkan kematian bakteri. Hasil penelitian dapat disimpulkan

oleh bahwa adanya peningkatan kadar logam K^+ yang berada di luar sel mengindikasikan adanya kerusakan permeabilitas membran, sedangkan dengan adanya peningkatan ion logam Ca^{2+} menandakan rusaknya dinding sel⁽²¹⁾.

SIMPULAN

Fraksi Kelompok 1 isolat KP13 dapat menyebabkan kebocoran sel *Escherichia coli* yang ditandai dengan kebocoran sel yang terabsorpsi pada 260 dan 280 nm (asam nukleat, protein, DNA, RNA) dan dengan kebocoran ion Ca^{2+} .

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih saya ucapkan kepada Dr. Nanik Sulistyani, M. Si., Apt. dan Dr. Kintoko, M. Sc., Apt. yang telah membimbing penelitian ini dan pihak-pihak yang menunjang penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. S. Cox, C. Mann, J. Markham, J. Gustafson, J. Warmington, Dan S. Wyllie, "Determining the antimicrobial actions of tea tree oil," *Molecules*, Vol. 6, No. 12, 2001. Hlm. 87–91.
2. A. Giacometti, O. Cirioni, M.S. Del Prete, F. Barchiesi, Dan G. Scalise, "Short-term exposure to membrane active antibiotics inhibits *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture," *antimicrob. Agents Chemother.*, Vol. 44, No. 12. 2000. Hlm. 3473–75.
3. H. Engelberg-Kulka, S. Amitai, I. Kolodkin-Gal, Dan R. Hazan, "Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria," *Plos Genet.*, Vol. 2, No. 10. 2006. Hlm. E135.
4. Department Of Microbiology, Hindushtan College Of Arts And Science, Coimbatore-28, India Dan H. N, "Purification of secondary metabolites from soil actinomycetes," *Int. J. Microbiol. Res.*, Vol. 3, No. 3. 2011. Hlm. 148–156.
5. J. Widada Dan W. Asmara, "Antifungal production of a strain of *Actinomycetes* Spp isolated from the rhizosphere of cajuput plant: selection and detection of exhibiting activity against tested fungi," Hlm. 10.
6. X. Wang, L. Huang, Z. Kang, H. Buchenauer, Dan X. Gao, "Optimization of the fermentation process of *Actinomycete* strain Hhs.015 T," *J. Biomed. Biotechnol.*, Vol. 2010, Hlm. 1–10.
7. Mulyadi Dan N. Sulistyani, "Aktivitas cairan kultur 12 isolat *Actinomycetes* terhadap bakteri resisten," *J. Kesehat. Masy. J. Public Health*, Vol. 7, No. 2. 2013.
8. L.S. Singh, H. Sharma dan NC. Talukdar, "Production of potent antimicrobial agent by *Actinomycete*, *Streptomyces sannanensis* strain Su118 isolated from Phoomdi in Loktak lake of Manipur, India," *Bmc Microbiol.*, Vol. 14, No. 1. 2014.
9. H. Rante Dan Y.B. Murti, "Purifikasi dan karakterisasi senyawa anti-bakteri dari *Actinomycetes* asosiasi Spons terhadap bakteri patogen resisten". 2010. Hlm. 8.
10. V.T. Suratmo Dan Rurini Retnowati, "Fraksi semi polar dari daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm)," *Kim. Stud. J.*, Vol. 1, No. 1. 2015. 778–84.
11. Pratiwi ST, Mikrobiologi farmasi. Fakultas Farmasi Ugm, Yogyakarta: Erlangga; 2008.
12. A. Pandey, I. Ali, K.S. Butola, T. Chatterji, V. Singh, D. Division. Isolation and characterization of *Actinomycetes* from soil and evaluation of antibacterial activities of *Actinomycetes* against pathogens. Hlm. 9.
13. P. S. Park. J Dan Park H.W., "Inactivation kinetics of food poisoning microorganisms by carbon dioxide and high hydrostatic pressure," *J Foodsci*, Vol. 68, No. 3. 2003. 976-81.
14. L.Vazquez, A.MJ, Rueda. Quantification of DNA, Dalam Isaac, G., Ingram, D.S., (Eds.). *Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals*. Chapman And Hall: London. Weinheim, New York. Tokyo. Melbourne. Madras; 1998. 18-21.
15. M.E. Madigan, J. Parker, "Brock biology of microorganisms", 9th ed. p. 6.
16. B. Butel, J.SG. F., J. Morse, S.A, A. Melnick. Mikrobiologi kedokteran. 23rd ed. Diterjemahkan Hartanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran Egc, 2007.
17. J. M. R.C Fay, Chemistry, Edisi Keempat. Belmont: Pearson Education International, 2004.
18. D. Dillasamola. Perbandingan pengaruh pemberian ekstrak etanol *defatting* dan ekstrak etanol daun Benalu Kopi *Scurrula ferruginea* (Jack) Danser terhadap kadar glukosa darah. 2015. 5(2):7.
19. S.D. Marlina, V. Suryanti, S. Suyono, "The phytochemical screenings and thin layer chromatography analysis of chemical compounds in ethanol extract of Labu Siam fruit (*Sechium edule* Jacq. Swartz.)," *Biofarmasi J. Nat. Prod. Biochem*. 2005. 3(1):26–31.
20. A. Ultee, "Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*: a case study of a novel approach to mild food preservation," s.n., S.l., 2000.
21. S. Aziz. Aktivitas antibakteri ekstrak etanolik daun dan umbi *Crinum asiaticum* L. terhadap bakteri penyebab jerawat. 2010. 6.

Isolasi Senyawa Polifenol *Black Garlic* dan Uji Toksisitasnya Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach)

(Isolation of Polifenol Black Garlic and Toxicity Assay toward *Artemia salina* Leach)

SANTI NUR HANDAYANI^{1*}, LIDYA CAHYO BAWONO¹, DIANA PRAMESTI AYU¹, HESTI NURRIZQI PRATIWI¹

¹Jenderal Soedirman University, Chemistry Departement, Faculty of Mathematic and Natural Science

Diterima 7 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Kanker adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh pembelahan sel yang tidak terkendali. Kanker serviks merupakan kanker yang diderita oleh banyak wanita. Pengobatan alternatif penyakit kanker adalah menggunakan bawang putih hitam. Bawang putih hitam adalah hasil dari pengolahan bawang putih dengan suhu dan kelembaban tinggi tanpa penambahan zat lain. Dalam proses itu terjadi reaksi *Maillard* yang menyebabkan perubahan warna, bau, dan rasa asli pada bawang putih. Reaksi seperti itu juga menyebabkan peningkatan beberapa senyawa bioaktif seperti *S-allyl cysteine* (SAC), asam amino, flavonoid, dan polifenol. Guna menentukan sifat racun dari ekstrak bawang putih hitam, perlu dilakukan isolasi senyawa polifenol dan uji toksisitas terhadap *Artemia salina leach*. Penentuan nilai LC_{50} dengan aplikasi SPSS yang diperoleh dari ekstrak bawang putih hitam pada variasi waktu proses penuaan 30 hari dan 40 hari menunjukkan konsentrasi 682,433 dan 572,403 ppm.

Kata kunci: Reaksi *Maillard*, polifenol, bawang putih hitam, dan BSLT.

Abstract: Cancer is one of diseases caused by cell division that is uncontrollable. Cervical cancer is a cancer that suffered by many women. Alternative medicine of cancer disease is use black garlic. Black garlic is the result of processing the garlic with high temperature and humidity without addition of other substances. In that process occur *Maillard* reaction that cause changes in the color, smell, and taste of the original on the garlic. Such reaction also lead to an increase some bioactive compounds such as *S-allyl cysteine* (SAC), amino acids, flavonoids, and polyphenols. To determine the toxic properties of black garlic extract, it is necessary to do isolation of polyphenolic compounds and toxicity test against *Artemia salina leach*. When calculated by SPSS application, the obtained LC_{50} values of black garlic extract on the aging prossess time variations of 30 days and 40 days showed concentration of 682.433 and 572.403 ppm.

Keywords: *Maillard* reaction, polifenol black garlic dan BSLT.

* Penulis korespondensi, HP 08164244957
e-mail: santinurhandayani@yahoo.com

PENDAHULUAN

KANKER merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh pembelahan sel yang tidak terkontrol dan tidak terkendali. Hal itu mampu menyebabkan kerusakan pada suatu jaringan tersebut dan jaringan di sekitarnya. Salah satu penyakit kanker yang masih banyak memakan banyak korban terutama pada kaum wanita adalah kanker serviks. Menurut Tim *Cancer Help* (2010), setiap hari di Indonesia diperkirakan terdapat 40-45 kasus baru dan sekitar 20-25 wanita meninggal dikarenakan kanker serviks. Beberapa upaya tim medis untuk menumpas penyakit tersebut saat ini seperti kemoterapi, penyinaran, dan operasi pembedahan masih banyak membawa dampak negatif bagi tubuh manusia. Oleh karena itu perlu adanya pengobatan alternatif untuk menghambat pertumbuhan sel kanker dengan meminimalkan efek samping yang terjadi. Salah satu bahan yang dapat digunakan adalah *black garlic*.

Black garlic merupakan hasil pengolahan terhadap bawang putih dengan suhu dan kelembapan yang tinggi tanpa penambahan zat lain dan prosesnya dinamakan proses aging. Suhu yang ideal untuk membuat *black garlic* adalah 70 °C^(1, 2). Pada proses aging tersebut terjadi suatu reaksi yang bernama reaksi *Maillard*. Reaksi *Maillard* dapat menyebabkan perubahan warna, bau, serta rasa asli pada bawang putih. Perubahan karakteristik yang terjadi pada proses tersebut adalah perubahan warna bawang putih menjadi hitam, rasa bawang menjadi manis serta bau menyengat pada bawang sudah tidak lagi tercium. Selain perubahan warna, reaksi tersebut juga menyebabkan peningkatan beberapa senyawa bioaktif seperti *S-allyl cysteine* (SAC), amino asam, flavonoid, polifenol, dll. Apabila dibandingkan dengan bawang putih segar, *black garlic* menunjukkan antioksidan kuat dan kemampuan menangkap aktivitas radikal bebas⁽³⁾. Salah satu kandungan dalam *black garlic* yang akan diujikan adalah senyawa metabolit sekunder polifenol.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Il Sook Choi *et al*⁽⁴⁾ menyatakan bahwa *black garlic* memiliki aktivitas antiradikal yang kuat dalam uji penangkapan aktivitas radikal bebas terhadap hewan dan manusia. Kekuatan antiradikal pada *black garlic* lebih kuat dibandingkan pada bawang putih segar. Salah satu senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan adalah polifenol. Proses aging menyebabkan peningkatan senyawa polifenol yang terkandung didalam *black garlic*. Proses aging pada bawang putih memicu peningkatan fraksi bebas asam fenolik, sedangkan menurunkan fraksi ester, glikosida

yang menyebabkan peningkatan bentuk fenol bebas. Proses aging ini menyebabkan perubahan senyawa bioaktif pada bawang putih seperti polifenol yang dapat digunakan sebagai antikanker⁽⁵⁾.

Berdasarkan penjelasan tersebut maka perlu dilakukan isolasi senyawa polifenol serta uji toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

BAHAN. Bawang putih lanang, etanol, larva udang *Artemia salina* Leach, air laut, ragi, tween 60, dan asam galat.

ALAT. Mortar, tabung reaksi, *rice cooker*, Erlenmeyer, alat-alat gelas, *rotary evaporator*, mikropipet, lampu, dan spektrofotometer UV-Vis.

METODE. Proses Aging Black Garlic⁽⁶⁾. Bawang putih yang digunakan adalah jenis lanang. Bawang tersebut dilakukan proses aging dengan temperatur 70 °C dan kelembapan 75% dengan variasi waktu 30 dan 40 hari. Selama proses aging tidak dilakukan penambahan bahan apapun. Bawang putih akan berubah warna dari putih menjadi abu-abu kemudian hitam setelah satu bulan kemudian. *Black garlic* yang dihasilkan lunak tidak berbau khas bawang yang menyengat dan rasanya manis dengan sedikit asam.

Ekstrak Black Garlic. *Black garlic* sebanyak 100 g dihaluskan dengan menggunakan mortar untuk diekstraksi, larutan yang telah diekstraksi kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder polifenol untuk uji toksisitas terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach).

Penentuan Kadar Polifenol Total dengan Spektrofotometer UV-Vis. Tahap pertama adalah membuat larutan standar asam galat yang kemudian diujikan dengan spektrofotometer UV-Vis untuk diperoleh persamaan regresi. Persamaan regresi tersebut akan digunakan untuk menentukan kadar senyawa polifenol total dalam *black garlic*. Tahap kedua adalah melarutkan 10 mg ekstrak *black garlic* ke dalam 10 mL etanol untuk digunakan sebagai larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan induk tersebut kemudian dibuat variasi konsentrasi 500 ppm, 300 ppm, 250 ppm, dan 100 ppm untuk diujikan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Uji Toksisitas Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Tahap pertama adalah pembiakkan larva udang *A. salina*. Air laut dimasukkan ke dalam suatu tempat kecil yang sudah dibagi menjadi dua kamar menggunakan sekat jaring. Telur udang *A. salina* dimasukkan secukupnya ke dalam salah satu ruang

yang atasnya di tutup dengan papan agar ruangan tersebut gelap. Bagian wadah yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik udang yang menetas melalui lubang sekat, sehingga larva dapat dipisahkan dari bagian telur dan udang yang tidak sehat.

Telur udang *A. salina* akan menetas menjadi udang kecil setelah dua hari (2 x 24 jam) dan siap untuk dilakukan uji. Sebanyak 50 mg ekstrak *black garlic* diambil dan dilarutkan dengan 25 mL air laut. Ekstrak ditambahkan dengan tween 80 pada konsentrasi 250 ppm untuk membantu melarutkan dengan sempurna dalam air laut. Beberapa larutan utama ekstrak *black garlic* diambil menggunakan mikropipet dan diencerkan menjadi beberapa variasi konsentrasi. Setiap tabung diisi dengan sepuluh larva udang dan air laut, diberikan dua tetes ragi (3 mg/mL air laut) sebagai nutrisi mereka. Tabung diberikan sampel uji dalam jumlah tertentu dan diencerkan dengan air laut hingga 5 mL, hingga diperoleh konsentrasi akhir masing-masing yaitu 1000; 750; 500; 250; 125; dan 62,5 ppm. Tabung kontrol adalah konten yang sama dengan tabung uji tetapi tanpa sampel. Tabung reaksi dan tabung kontrol diinkubasi secara terbuka dan diberi cahaya selama 24 jam. Jumlah larva hidup untuk masing-masing konsentrasi dihitung dan dicatat untuk menentukan persentase kematian udang serta LC_{50} . Jika ada larva mati dalam larutan kontrol, jumlah larva yang mati dalam larutan kontrol dikurangi dengan jumlah larva yang terbunuh dalam larutan uji. Berdasarkan, persentase kematian dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ Kematian larva udang} = (\Sigma \text{ larva hidup kontrol} - \Sigma \text{ larva hidup perlakuan}) / (\Sigma \text{ larva hidup kontrol}) \times 100\%$$




HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Proses Aging. Berdasarkan data di bawah perubahan bawang putih selama proses aging. Perubahan warna bawang putih menjadi hitam dikarenakan adanya reaksi *Maillard* dimana kandungan gula dan asam amino membentuk senyawa melanoidin (substansi yang mengubah bawang putih menjadi hitam)^(3,7). Selain itu, proses aging tersebut dapat mengurangi rasa dan bau yang menyengat menjadi rasa manis dan sedikit asam, hal ini dikarenakan terjadinya penurunan pH dari 6 menjadi 3,8^(7,8).

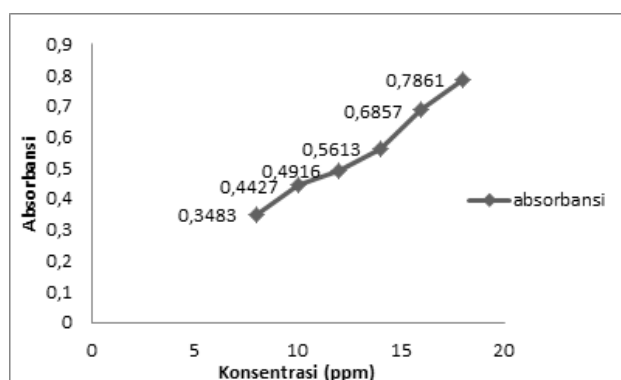
Analisis Kadar Polifenol. Pada penetapan kadar polifenol total dilakukan dengan menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* 10% untuk membentuk larutan berwarna yang dapat diukur absorbansinya. Pereaksi *Folin-Ciocalteu* akan menginduksi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (Fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat di dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* menjadi suatu kompleks *molibdenum-tungsten*. Senyawa fenolik hanya dapat bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* pada saat suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat, maka dilakukan penambahan Na_2CO_3 7,5%. Gugus hidroksil pada senyawa fenolik akan bereaksi dengan reagen *Folin-Ciocalteu* membentuk kompleks *molibdenum-tungsten* berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis⁽⁹⁾.

Pada penentuan kadar polifenol total digunakan asam galat sebagai larutan standar acuan, dan hasilnya dinyatakan sebagai persen ekuivalen asam galat (EAG) yang kemudian dibuat kurva baku asam galat dengan melarutkan asam galat dengan variasi konsentrasi 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm, 14 ppm, dan 18 ppm. Dari kurva baku tersebut diperoleh persamaan regresi linier yang kemudian digunakan untuk menentukan

Tabel 1. Hasil perubahan bawang putih setelah proses *aging*.

Gambar	Lama proses <i>aging</i> (hari)	Rasa	Warna	Tekstur	Bau
	0	Khas bawang putih	Putih kekuning-kuningan	Keras, dan lengket	Bau khas bawang putih
	30	Manis, asam sedikit pahit	Hitam	Kenyal, dan kering	Bau bawang sudah tidak tercium
	40	Manis, asam sedikit pahit	Hitam	Keras dan kering	Bau bawang sudah tidak tercium

kadar polifenol dalam *black garlic*. Pada penelitian persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 0,0427x - 0,0022$ dan nilai $R^2 = 0,982$.



Grafik 1. Persamaan regresi asam galat.

Dari data tersebut dapat diperoleh kadar polifenol total dalam *black garlic* sebagai berikut :

Tabel 2. Kadar senyawa polifenol total dalam *black garlic*.

Lama Proses Aging (hari)	Kadar Polifenol Total (ppm)
0	3,5
30	39,79
40	57,38

disajikan pada Tabel 3. Tabel tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak *black garlic* yang diuji, maka persentase kematian larva *A. salina Leach* semakin tinggi, sedangkan dalam kontrol tidak terdapat ekstrak *black garlic* tidak ditemukan larva yang mati. Hal ini dikarenakan dalam tabung kontrol tidak terdapat ekstrak sampel yang bersifat toksik. Menurut Carballo⁽¹¹⁾, kematian larva *A. salina Leach* disebabkan oleh komponen-komponen bioaktif dari ekstrak sampel, bukan disebabkan kelaparan sehingga dilakukan perbandingan antara perlakuan dan kontrol.

Dengan menggunakan perhitungan aplikasi SPSS, diperoleh nilai LC_{50} ekstrak *black garlic* pada variasi lama waktu fermentasi 30 hari dan 40 hari berturut-turut menunjukkan konsentrasi 682,433 dan 572,403 ppm. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak *black garlic* bersifat toksik terhadap larva *A. salina Leach*.

SIMPULAN

Selama proses aging terjadi reaksi *Maillard* yang menyebabkan perubahan warna bawang putih. Selain itu, reaksi *Maillard* juga menyebabkan berkurangnya bau khas bawang putih yang menyengat serta rasanya

Tabel 3. Data primer BSLT

No	Lama Proses Aging (hari)	Konsentrasi ekstrak (ppm)	Larva hidup rata-rata	% kematian	Log Konsentrasi	Nilai Probit
1	40	1000	1	90	3,106	2,950
2	40	750	3,3	67	2,827	2,708
3	40	500	7,33	27	2,529	2,266
4	40	250	9	10	2,409	2,045
5	40	125	9,66	4	2,282	1,802
6	40	62,5	10	0	0	0
7	30	1000	1,67	83,3	3,053	2,918
8	30	750	5	50	2,834	2,711
9	30	500	8	20	2,615	2,331
10	30	250	9	10	2,500	2,086
11	30	125	10	0	0	0
12	30	62,5	10	0	0	0

Berdasarkan data hasil uji menunjukkan bahwa semakin lama proses aging pada *black garlic* maka kadar senyawa polifenol akan semakin meningkat. *Black garlic* dengan lama proses aging 40 hari memiliki konsentrasi tertinggi yaitu sebesar 57,38 mg/10 mL. Hal itu sesuai dengan pernyataan Sato *et al.*⁽¹⁰⁾ yaitu proses fermentasi meningkatkan kandungan polifenol lebih baik dibandingkan bawang segar.

Uji Toksisitas Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Berdasarkan uji BSLT yang dilakukan terhadap sample ekstrak *black garlic*, diperoleh data

menjadi manis sedikit asam. Lamanya proses aging mempengaruhi kadar senyawa polifenol total. Semakin lama proses fermentasi maka akan semakin tinggi pula kadar senyawa polifenol total yang terkandung di dalam *black garlic*. Uji Toksisitas menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari suatu ekstrak maka akan semakin tinggi pula persentase kematian larva *A. salina Leach*. Hal ini dikarenakan kandungan komponen bioaktif di dalamnya.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kami ucapkan terimakasih kepada Kementrian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah memberi kami fasilitas berupa dana hibah PKM-PE sehingga kami dapat melaksanakan penelitian ini dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Choi, S., H.S. Cha and Y.S. Lee. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules*. 2014. 19: 16811-23.
2. Kimura, S, Y.C. Tung, M.H. Pan, N.W Su, Y.J. Lai, K.C. Cheng. Black garlic: a critical review of its production, bioactivity, and application. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017. 25(1) : 62-70.
3. Kim JH, Nam SH, Rico CW, Kang MY. A comparative study on the antioxidative and anti-allergic activities of fresh and aged black garlic extracts. *Int J Food Sci Tech*. 2012. 47(6):1176-82.
4. Choi, Duk Ju., et al. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum*). *J Korean Soc. Food Nutr*. 2008. 37(4) : 465-71.
5. Xu, G., Ye X., Chen J., Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *J. Agric. Food Chem*. 2007. 55(2): 300-5.
6. Danan W, Yonghui F, Jun L, Jianzhong Y, Meiru W, Jin-ichi S, Changlong L. Black garlic (*Allium sativum*). *J Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*. 2010. 4(1) : 37-40.
7. Villalón, A.L. G., S. Amor, L. Monge, N. Fernández, M. Prodanov, M. Muñoz, A.M. Inarejos-García, M. Granada. In vitro studies of an aged black garlic extract enriched in S-allylcysteine and polyphenols with cardioprotective effects. *Journal of functional foods*. 2016. 27: 189–200
8. Lu, X., N. Li., X. Qiao., Z. Qiu, and P. Liu. Composition analysis and antioxidant properties of black garlic extract. *Journal of food and drug analysis*. 2016. 1-10
9. Hari S, Riza Alfian. Determination of total phenolic content of methanolic extracts red rosell (*Hibiscus sabdariffa* Linn) calyxes in variation of growing area by spectofotometry. *J. Ilmiah Kefarmasian*. 2012. 2(1) : 73-80.
10. Sato, Y. . “Does black garlic a day keep the doctor away.” 2014. Accessed April 23, 2014. www.Discoverjapannow.wordpress.com/does-black-garlic-a-day.
11. Carballo, J.L., Zaira L. H., Pilar P., Maria D.G. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural product. *BMC Biotechnol* 10. 2002. 1186/1472-6750; 2:17.

Uji Aktivitas Inhibisi Enzim Tirosinase *In-Vitro* Krim Ekstrak Akar Manis (*Glycyrrhiza glabra* L.)

(*In Vitro* Enzyme Tyrosinase Inhibitory Activity Test on Liquorice Root Extract Cream (*Glycyrrhiza glabra* L.))

SITI UMRAH NOOR*, FARIDAH, PAMELA MAGDALENA

Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta 12640

Diterima 5 oktober 2018, Disetujui 26 Oktober 2018

Abstrak: Ekstrak akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.) mengandung senyawa isoflavon glabridin yang berkhasiat sebagai pemutih kulit. Tujuan penelitian untuk menentukan potensi terbaik krim pemutih kulit menggunakan kontrol positif asam kojat. Diformulasi 1 formula blangko, 3 formula krim menggunakan variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% akar manis (0,01; 0,11; 1,01)% berdasarkan konsentrasi inhibisi tirosinase *in-vitro* dari ekstrak. Digunakan metode secara spektrofotometri dengan mengukur serapan dopakrom menggunakan *microplate reader* diinkubasi suhu 37 °C, λ 490 nm, 20 menit. Krim M/A dibuat dengan mencampurkan ekstrak bersama basis bersuhu 70-75 °C, 400 rpm, 25 menit. Uji stabilitas dilakukan 4 minggu pada penyimpanan suhu kamar dan 40 °C, dievaluasi mutu fisiknya. Hasil IC_{50} asam kojat sebesar 20,88 $\mu\text{g/mL}$; IC_{50} variasi ekstrak berturut-turut sebesar (126,75; 1130,90; 10092,41) $\mu\text{g/mL}$. Krim berwarna putih susu-putih kekuningan; beraroma bunga; lembut; homogen; tidak terjadi pemisahan; bertipe M/A; sifat alir tiksotropik plastis; viskositas, kemampuan sebar, ukuran globul, pH semakin meningkat berturut-turut sebesar (455000- 620000)cPs, (2695,82-3545,83) mm^2 (54,66-66,27) μm , (4,44-5,04); aktivitas inhibisi tirosinase formula 1, 2 dan 3, penyimpanan minggu 0, 2 dan 4 berturut-turut sebesar (1,78;-25,74;22,04)%, (6,74;6,12;4,49)%, (- 28,78;53,06;20,32)%. Dapat disimpulkan formula krim dengan konsentrasi ekstrak akar manis 1,01% merupakan formula terbaik sehingga dapat digunakan sebagai pemutih kulit.

Kata kunci: Ekstrak akar manis, tirosinase, *microplate reader*, krim pemutih.

Abstract: Liquorice root extract (*Glycyrrhiza glabra* L.) contains glabridin, an isoflavone substance that can be used as skin whitening. The study was carried out to determine the potential of the best skin whitening cream using positive control of kojic acid. Formulated 1 blank formula, 3 cream formulas using various concentrations of ethanol extract 70% liquorice roots of (0.01, 0.11, 1.01)% based on the value of tyrosinase inhibition activity *in vitro* from extracts. Spectrophotometric method is used to measure the absorption of dopacrome by a microplate reader which was incubated at 37 °C at λ 490 nm for 20 minutes. Oil in water cream was prepared by mixing extract with cream base at a temperature of 70-75°C at a speed of 400 rpm for 25 minutes. Stability test was carried out for 4 weeks at room temperature storage and a temperature of 40 °C, evaluated for physical quality. The results of determination of IC_{50} of kojic acid was 20.88 $\mu\text{g} / \text{mL}$; IC_{50} of extract variation were (126.75; 1130.90; and 10092.41) $\mu\text{g/mL}$ respectively. Cream has milky white- yellowish color; smell of flowers; soft texture; homogeneous; there is no separation; has type M/A; plastic thixotropic flow properties; has an increasing value including viscosity, spreadability, globule size, and pH, which are respectively (455000-620000)cPs, (2695.82-3545.83) mm^2 , (54.66-66.27) μm , and (4.44-5.04); tyrosinase inhibition activity in formula 1, 2 and 3 were stored at weeks 0, 2nd and 4th were respectively (1.78;-25.74; 22.04)%, (6.74; 6, 12; 4.49)%, and (-28.78; 53.06; 20.32)%. It can be concluded that the cream formula containing liquorice root extract with a concentration of 1.01% is the best formula so it can be used as skin whitening.

Keywords: Liquorice root extract, tyrosinase, microplate reader, whitening cream.

* Penulis korespondensi, Hp. 08161404198
e-mail siti_umrahnor@yahoo.co

PENDAHULUAN

NODA cokelat dan warna kulit yang semakin gelap disebabkan oleh proses penuaan atau sengatan matahari. Noda cokelat pada kulit merupakan hasil pembentukan melanin yang berlebihan. Melanin merupakan pigmen warna cokelat yang dapat melindungi jaringan kulit dari penghamburan sinar ultraviolet (UV). Jika melanin diproduksi berlebihan maka terjadi hiperpigmentasi. Melanin merupakan hasil oksidasi L-tirosin menjadi L-DOPA yang secara alami dikatalis oleh enzim tirosinase dan sinar UV⁽¹⁾.

Salah satu cara mencerahkan warna kulit adalah dengan menghambat pembentukan melanin melalui penghambatan enzim tirosinase. Zat pemutih bertindak sebagai penghambat produksi melanin dan dikenal sebagai inhibitor kompetitif tirosinase. Berbagai inhibitor tirosinase banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah asam hialuronat, arbutin, asam kojat, merkuri dan hidrokuinon. Senyawa ini memiliki daya pemutih sangat besar, namun merkuri dan hidrokuinon bersifat karsinogenik^(2,3). Berdasarkan hal tersebut diperlukan bahan alami yang memiliki daya pemutih yang sama besar atau lebih besar dari senyawa-senyawa tersebut dan aman bila digunakan.

Saat ini banyak bahan alam yang sudah diteliti sebagai zat pemutih kulit salah satunya adalah akar manis^(4,6). Akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.) merupakan bahan alam yang memiliki kandungan glabridin, glabrin, isoliquiritigenin licurasida, isoliquiritin, and licochalcon yang dapat menghambat produksi enzim melanin melalui penghambatan enzim tirosinase⁽⁷⁻¹⁰⁾.

Berdasarkan penelitian, telah dilakukan pembuatan ekstrak akar manis yang diekstraksi menggunakan etanol⁽¹¹⁾. Untuk membuktikan aktivitas ekstrak akar manis sebagai zat pemutih maka dilakukan uji inhibisi tirosinase yang diperoleh nilai IC₅₀ (*Inhibitory concentration*). Dari hasil uji aktivitas, ekstrak divariasikan berdasarkan nilai IC₅₀, IC₇₅ dan IC₁₀₀ dan diformulasikan dalam bentuk krim kosmetika tipe M/A^(12,13). Krim tipe M/A dipilih karena mudah dicuci, dihilangkan dari kulit dan pakaian, tidak berminyak, selain itu basis krim mengandung air dalam jumlah banyak sedangkan sel hidup biasanya lembab sehingga akan mempercepat pelepasan obat dan dapat memelihara kelembaban sel kulit^(14,15).

Emulgator dan bahan tambahan lain dalam basis krim akan menurunkan tegangan permukaan kulit sehingga absorpsi lebih cepat⁽¹⁶⁾. Krim M/A nyaman digunakan, tidak menyebabkan rasa lengket pada wajah dan memberikan dispersi obat yang baik pada permukaan kulit^(16,17). Tujuan penelitian untuk

menentukan potensi terbaik krim pemutih kulit yang mengandung ekstrak akar manis melalui uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase secara *in-vitro*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Akar manis (*Glycyrrhiza glabra* L.), asam kojat (Thornhill, Kanada), L-DOPA (SIGMA-Aldrich, USA), Tyrosinase from Mushroom (SIGMA-Aldrich, USA), kalium dihidrogen fosfat, NaOH, sudan III, biru metilen, natrium metabisulfid (Aditya Birla), asam stearat triple press (Shanghai Fuxin, Cina), setil alkohol (BASF, Jerman), stearil alkohol (Ecogreen, Singapura), lanolin anhidrat (Wuxi, Cina), paraffin cair (Sonneborn, Belanda), gliseril monostearat (DANISCO, Cina), polisorbitat 80 (KAO Corporation, Jepang), propilen glikol (Dow Chemical Co., Kanada), metil dan propil paraben (Ueno Fine Chemicals, Jepang), butil hidroksi toluen (Sterlitamak Petrochemical Plant, Rusia).

Alat. Rotary vacuum evaporator, microplate reader ELx 800, 96 well-microtiter plate, timbangan analitik (AND tipe GR 200), microbalance (Mettler MT 5), micropipette, water bath (Mettmert), viskometer (Brookfield tipe RV), lemari pendingin, oven (Mettmert), stirrer (Eurostar), pH meter (Metrohm tipe 620), alat ukur kemampuan sebar, mikroskop optik (Olympus), kaca objek, cover glass, sentrifugator (Kokusan H 103-N).

METODE. Penyediaan Bahan Penelitian. Bahan utama yang digunakan adalah akar manis yang diperoleh dari Herbaltama-Jogjakarta.

Pembuatan Ekstrak Akar Manis. Akar manis dibersihkan, dikeringkan dengan cara dijemur langsung di bawah sinar matahari pagi, dihaluskan sampai berupa serbuk dengan ukuran 4/18. Sebanyak kurang lebih 1 kg akar manis, direndam dengan etanol 96% sebanyak 10 liter, diaduk selama 4 jam lalu biarkan terendam selama 24 jam. Untuk memisahkan ampas, filtrat disaring. Ampas diremaserasi, disaring kembali sampai diperoleh filtrat yang jernih tidak berwarna, diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum (*rotary vacuum evaporator*) pada suhu ± 50 °C, tekanan 100mmHg, dan kecepatan 70 rpm sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang, dikemas dan disimpan pada lemari pendingin⁽¹¹⁾.

Karakterisasi Ekstrak Akar Manis. Karakterisasi akar manis meliputi pemeriksaan rendemen ekstrak, organoleptic, pH dan ketercampuran dengan pelarut. Pemeriksaan organoleptic meliputi warna, bau dan rasa. Dilakukan pemeriksaan ketercampuran ekstrak akar manis dengan air, propilen glikol, larutan dapar fosfat dan DMSO 1%.

Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase Secara *In Vitro*. Penyiapan Bahan Kimia.

1). Pembuatan dapar fosfat 0,1 M dengan pH sebesar 6,8. Kalium dihidrogen fosfat (BM: 136,09) ditimbang seksama sebanyak 1,3609 gram, kemudian dilarutkan dengan aquadest 100 mL. Larutan tersebut ditambahkan larutan NaOH 0,2 N sebanyak 22,4 mL dan ditambahkan akuades hingga mencapai 200 mL; 2). Pembuatan larutan substrat L-DOPA. L-DOPA (BM: 197,19) ditimbang seksama sebanyak 39,438 mg, kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M, pH=6,8) dalam labu tentukur sampai 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 20 mM. Dibuat juga seri konsentrasi 10; 5; 2,5; 1,25; dan 0,625 mM. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan ini dihindarkan dari cahaya dengan cara menutup vial dengan alumunium foil; 3). Pembuatan larutan tirosinase. Tirosinase ditimbang seksama sebanyak 0,0859 mg kemudian dilarutkan dengan larutan dapar fosfat dalam labu ukur 10,0 mL sehingga didapatkan konsentrasi 496 U/mL. Larutan tersebut diencerkan sehingga mencapai konsentrasi 310, 155, dan 75 U/mL. Pada saat preparasi hingga uji penghambatan tirosinase dilakukan, larutan ini dihindarkan dari cahaya dengan cara menutup vial dengan alumunium foil⁽⁹⁾.

Uji Pendahuluan. 1) optimasi panjang gelombang maksimum. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA 5 mM, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang 405, 450, 490 dan 630 nm; 2). Optimasi waktu inkubasi. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA 5 mM, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310, 155 dan 75 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Larutan diinkubasi selama 10,20, 30 dan 40 menit pada suhu 37°C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum; 3. Optimasi konsentrasi enzim tirosinase. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing- masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat dua macam yaitu 10,5 dan 2,5 mM yang kemudian masing- masing konsentrasi ditambahkan ke dalam larutan enzim konsentrasi 310, 155, dan 75 U/mL. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

4). Optimasi konsentrasi substrat L-DOPA. Sebanyak 120 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase 310 U/mL dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing- masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Konsentrasi substrat dibuat enam macam yaitu 20; 10; 5; 2,5; 1,25 dan 0,625 mM yang kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan ke dalam larutan enzim dengan konsentrasi optimum. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase (IC_{50}) dari Baku Pembanding Asam Kojat. Pembuatan larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif. Serbuk asam kojat ditimbang seksama 5 mg dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8) dalam labu ukur 10,0 mL sehingga diperoleh konsentrasi 500 µg/mL. Kemudian larutan dipipet 2,0 mL dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL dan diencerkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8). Kemudian larutan asam kojat diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan asam kojat 50; 20; 10; 5 dan 2,5 µg/mL.

Pengujian larutan sampel asam kojat sebagai kontrol positif. Sejumlah 80 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan asam kojat, 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dengan konsentrasi optimum dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Pengujian juga dilakukan terhadap larutan kontrol dan blanko kontrol. Larutan kontrol terdiri dari 120 µL LDF, 40 µL L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase sedangkan larutan blanko kontrol terdiri dari bahan yang sama dengan kontrol tanpa enzim. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan *microplate reader* ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase (IC_{50}) Ekstrak Akar Manis. Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Akar Manis. Ekstrak akar manis ditimbang sejumlah 200 mg dan dilarutkan dengan larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8) dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian larutan ekstrak diencerkan sehingga diperoleh konsentrasi larutan ekstrak akar manis 4000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 dan 25 µg/mL.

Pengujian Larutan Sampel Ekstrak Akar Manis. Sejumlah 80 µL larutan dapar fosfat (0,1 M; pH 6,8), 40 µL larutan ekstrak, 40 µL larutan L-DOPA, dan 40 µL larutan enzim tirosinase dengan konsentrasi optimum dimasukkan ke dalam 96 *well-microtiter plate*. Masing-masing sampel dibuat blanko di mana

tidak ditambahkan larutan enzim tirosinase. Pengujian juga dilakukan terhadap larutan kontrol dan blangko kontrol. Larutan kontrol terdiri dari 40 μL DMSO 1%, 80 μL LDF, 40 μL L-DOPA, dan 40 μL sedangkan larutan blangko kontrol terdiri dari bahan yang sama dengan kontrol tanpa enzim. Larutan diinkubasi selama waktu optimum pada suhu 37 °C. Serapan diukur menggunakan microplate reader ELx 800 pada panjang gelombang maksimum.

Pemeriksaan bahan tambahan. Pemeriksaan bahan tambahan sediaan krim meliputi natrium metabisulfit, asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat, polisorbat 80, propilen glikol, metil paraben, propil paraben, butil hidroksi toluen, asam sitrat, air suling dan parfum dilakukan pemeriksaan berdasarkan monografi masing-masing bahan

Formula sediaan krim. Komponen sediaan krim terdiri dari ekstrak akar manis, Na. metabisulfit, asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat, metil paraben, propil paraben, butil hidroksi toluene, polisorbat 80, propilen glikol, pewangi, dan aquadestilata⁽¹⁴⁾.

Cara pembuatan sediaan krim. a). Fase minyak: asam stearat, setil alkohol, stearyl alkohol, lanolin anhidrat, paraffin cair, gliseril monostearat dilebur di atas tangas air pada suhu 70-75 °C. Kemudian ditambahkan antioksidan butil hidroksi toluen dan diaduk sampai larut. b). Metil paraben dan propil paraben dilarutkan dalam propilen glikol. c). Fase air: polisorbat 80, larutan metil paraben dan propil paraben dalam propilen glikol, aquadest suhu 70-75 °C dicampurkan lalu suhu dijaga 70-75 °C di atas penangas air. d). Basis krim dibuat dengan cara fase air dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam fase minyak kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum. Pencampuran dilakukan pada suhu 70-75°C. e). Ekstrak akar manis dicampurkan dengan sisa propilen glikol untuk melarutkan glabridin kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit ke dalam basis krim dalam keadaan hangat (± 50 °C) kemudian diaduk dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum hingga homogen. f). Parfum ditambahkan ke dalam sediaan pada suhu hangat (± 40 °C) kemudian diaduk dengan *stirrer* pada kecepatan dan waktu optimum hingga homogen⁽¹⁴⁾.

Uji stabilitas krim. Uji stabilitas dilakukan terhadap empat formula krim ekstrak akar manis yang diformulasikan yaitu formula blangko, formula 1, 2 dan 3 selama empat minggu. Setiap formula dilakukan replikasi sebanyak dua kali. Perbedaan dari keempat formula tersebut terdapat pada variasi konsentrasi ekstrak. Uji stabilitas krim ekstrak akar manis meliputi organoleptik, homogenitas krim, tipe krim, viskositas

dan sifat alir, kemampuan menyebar, ukuran partikel dan pH⁽¹⁶⁾.

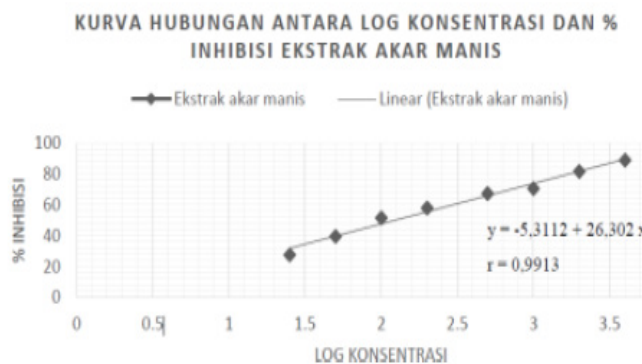
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada Ekstrak Akar Manis secara *In Vitro*. Inhibisi tirosinase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan pengukuran senyawa berwarna jingga yaitu *dopakrom* yang merupakan hasil oksidasi L-DOPA oleh tirosinase. Adanya inhibitor menyebabkan produksi *dopakrom* menurun yang ditandai dengan penurunan intensitas warna jingga. Berdasarkan teori *lock and key*, enzim hanya dapat berikatan dengan substrat spesifik sehingga substrat yang digunakan harus tepat karena akan mempengaruhi hasil reaksi. Terdapat dua substrat yang berperan dalam reaksi pembentukan *dopakrom* yaitu L- tirosin dan L-DOPA.

Berdasarkan reaksi, bila digunakan substrat L-tirosin maka akan dihasilkan dua produk, L-DOPA dan *dopakrom*. Nilai serapan *dopakrom* dapat diukur dengan metode spektrofotometri sedangkan L-DOPA tidak dapat diukur dengan metode spektrofotometri pada λ 490 nm. Pada penelitian substrat yang dipilih adalah L- DOPA karena berdasarkan reaksi, dihasilkan produk *dopakrom* dimana nilai serapan dapat diukur dengan metode spektrofotometri UV-VIS. Seluruh proses ini melibatkan reaksi enzimatis dimana semua reaksi berjalan pada kondisi optimum. Semua pengujian diukur dengan alat *microplate reader* ELX 800 dan diinkubasi pada suhu 37 °C karena merupakan suhu optimum bagi kerja enzim tirosinase.

Pada uji aktivitas inhibisi dilakukan pengukuran terhadap 4 larutan yaitu kontrol, blangko kontrol, sampel dan blangko sampel. Larutan kontrol dibuat sebagai pembanding nilai serapan antara tanpa adanya senyawa penghambat dan dengan senyawa penghambat. Blangko kontrol maupun blangko sampel digunakan sebagai factor koreksi. Dalam preparasi sampel ekstrak akar manis, ekstrak dilarutkan dengan pelarut DMSO 1%. Sehubungan dengan hal tersebut, larutan kontrol dan blangko kontrol juga harus ditambahkan DMSO 1% agar tidak mempengaruhi nilai IC_{50} .

Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak akar manis secara *in vitro* disajikan pada Gambar 1. Pengukuran IC_{50} dari ekstrak akar manis dilakukan dengan membuat seri konsentrasi ekstrak akar manis 4000, 2000, 1000, 500, 200, 100, 50 dan 25 ppm. Seri konsentrasi ini akan digunakan untuk membuat persamaan linear untuk menentukan nilai IC_{50} ekstrak. Dari hasil diperoleh nilai IC_{50} ekstrak akar manis 126,7548 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Nilai IC_{50} ini akan digunakan dalam formulasi sediaan krim. Dari hasil



Gambar 1. Grafik hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase ekstrak akar manis.



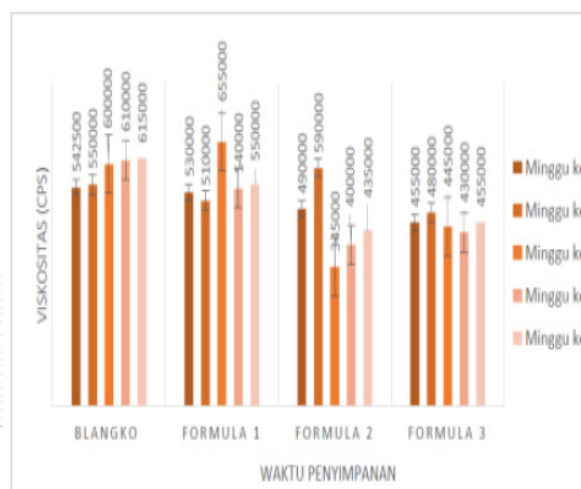
Gambar 2. Grafik hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase asam kojat.

diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak akar manis lebih besar dibanding asam kojat. Hal ini disebabkan karena dalam pengujian digunakan *crude extract* yang dapat mengganggu aktivitas inhibisi tirosinase.

Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada Asam Kojat secara *in vitro*. Asam kojat digunakan sebagai kontrol positif karena merupakan senyawa inhibitor tirosinase yang sering digunakan pada sediaan kosmetik dan asam kojat menghambat enzim tirosinase secara nonkompetitif. Pada uji aktivitas dilakukan pengukuran terhadap 4 larutan yaitu kontrol, blangko kontrol, sampel dan blangko sampel. Larutan kontrol dibuat sebagai pembandingan antara nilai serapan tanpa adanya senyawa penghambat dan dengan senyawa penghambat. Blangko kontrol maupun blangko sampel digunakan sebagai faktor koreksi. Pengukuran IC₅₀ dari larutan sampel asam kojat dilakukan pada lima seri konsentrasi yaitu 50; 20; 10; 5 dan 2,5 µg/mL. Seri konsentrasi ini akan digunakan untuk membuat persamaan linear untuk menentukan nilai IC₅₀. Dari hasil diperoleh nilai IC₅₀ asam kojat 20,8815 µg/mL. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase pada asam kojat secara *in vitro* disajikan pada Tabel 1 dan Gambar 2.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase asam kojat.

Zat uji	Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas inhibisi (%)	Persamaan regresi	IC ₅₀ (µg/mL)
Asam Kojat	50	70,2663	y = -9,4054 + 45,0122 x r = 0,9927	20,8815
	20	45,8580		
	10	33,1361		
	5	23,0769		
	2,5	10,0592		



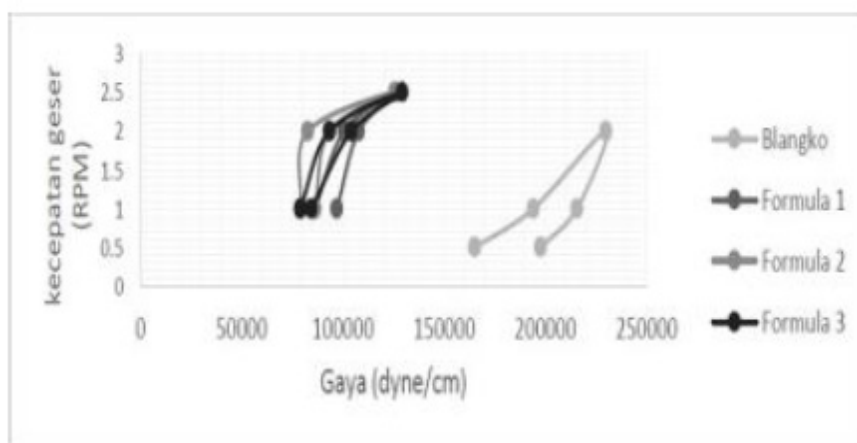
Gambar 3. Grafik hubungan viskositas terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C selama 4 minggu.

Hasil Uji Stabilitas Organoleptik Krim. Dari hasil uji organoleptik diperoleh formula blangko dan formula 1, 2, 3 pada penyimpanan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40 °C tidak mengalami perubahan warna dan bau, sehingga dapat dikatakan bahwa krim ekstrak akar manis stabil.

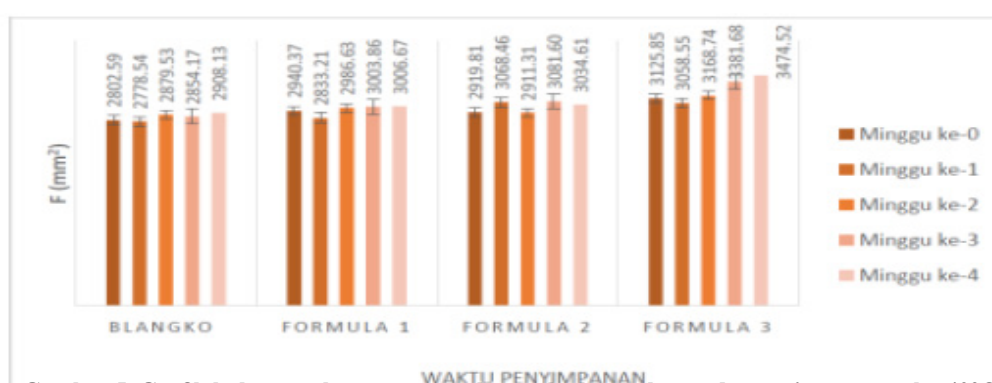
Hasil Uji Stabilitas Homogenitas Krim. Berdasarkan hasil uji homogenitas krim pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3, krim tetap homogen setelah disimpan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40°C.

Hasil Uji Stabilitas Tipe Krim. Berdasarkan hasil uji tipe krim pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3, krim tidak mengalami inversi fase setelah disimpan selama empat minggu pada suhu kamar dan 40°C yaitu krim ekstrak akar manis memiliki tipe minyak dalam air.

Hasil Uji Stabilitas Viskositas dan Sifat alir Krim. Berdasarkan Gambar 3, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai viskositas yang lebih rendah dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan viskositas menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Suhu penyimpanan mempengaruhi viskositas. Viskositas pada suhu



Gambar 4. Rheogram sifat alir krim.



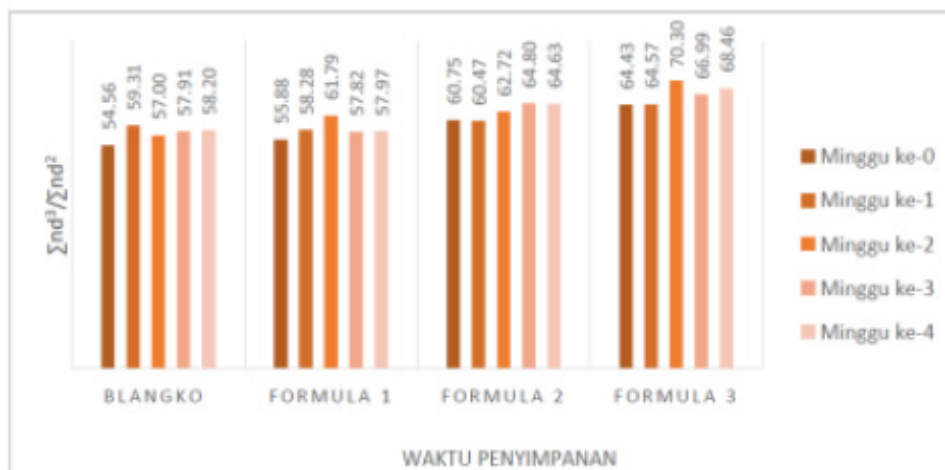
Gambar 5. Grafik hubungan kemampuan sebar terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C.

kamar cenderung lebih tinggi dibandingkan pada suhu 40 °C karena kenaikan temperatur menyebabkan kenaikan fluiditas yang merupakan kebalikan dari viskositas. Formula 3 yang disimpan selama 4 minggu pada suhu kamar memiliki viskositas yang cenderung meningkat tetapi bila disimpan pada suhu 40 °C memiliki viskositas yang cenderung stabil. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula dan waktu terhadap viskositas.

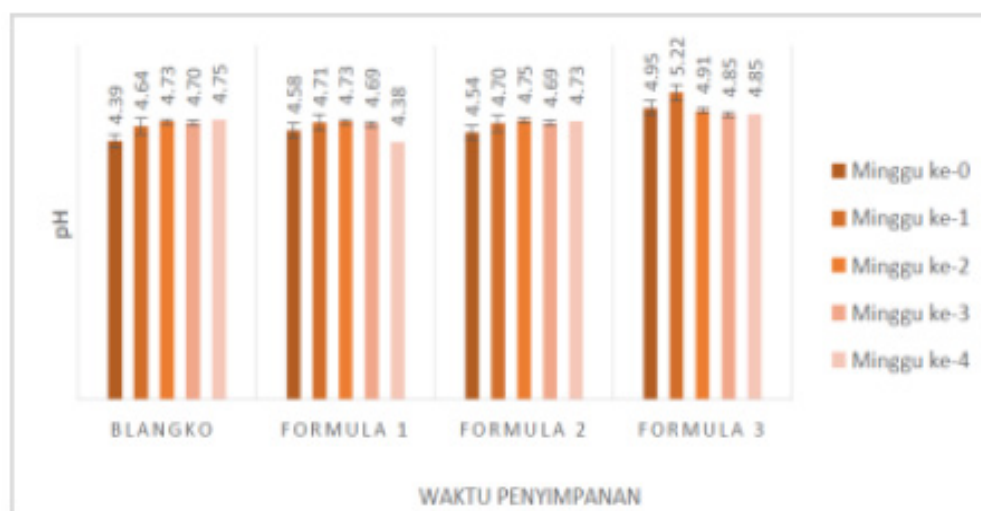
Pada Gambar 4 formula 1, 2, 3 diperoleh sifat alir tiksotropi plastis, dan formula blangko diperoleh sifat alir tiksotropi pseudoplastis dimana kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik. Hal tersebut menunjukkan bahwa pada setiap harga kecepatan geser menurun, formula ini memiliki viskositas yang lebih rendah dibandingkan kurva menaik. Pada tiksotropik pseudoplastis yaitu menunjukkan bentuk kurva menurun terdapat di sebelah kiri kurva menaik yang menunjukkan bahwa krim memiliki konsistensi yang lebih rendah pada setiap harga kecepatan geser yang menurun dibandingkan dengan kurva menaik. Tiksotropi dapat didefinisikan sebagai pemulihan yang isotherm dan lambat pada pendiaman suatu bahan yang kehilangan konsistensinya karena *shearing*. Sifat

alir tiksotropi merupakan sifat alir yang diinginkan dalam suatu sistem farmasetis, terutama dalam sediaan krim karena memiliki keuntungan daya penetrasi yang baik jika diaplikasikan ke kulit, dapat dengan mudah tersebar, dan mempunyai konsistensi dalam wadah. Kurva aliran plastis tidak melalui titik (0, 0) tapi memotong sumbu *shearing stress* jika bagian lurus dari kurva diekstrapolasikan ke sumbu pada suatu titik tertentu (*yield value*). Pada grafik dapat dilihat bahwa kurva menurun memiliki tahanan geser (gaya) yang lebih kecil dari kurva menaik karena pada awal pengukuran dibutuhkan tahanan geser yang lebih besar untuk memecah globul-globul yang bersatu selama pendiaman.

Hasil Uji Stabilitas Kemampuan Sebar Krim. Pada Gambar 5, disajikan hasil evaluasi kemampuan sebar krim yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki nilai kemampuan menyebar berturut-turut sebesar (2693,77; 2733,37; 2963,85; 3086,70)mm² pada penyimpanan suhu kamar dan (2908,13; 3006,67; 3034,61; 3474,52) mm² pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai kemampuan menyebar yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan kemampuan menyebar semakin meningkat seiring



Gambar 6. Grafik hubungan ukuran globul terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40°C.



Gambar 7. Grafik hubungan pH terhadap waktu pada penyimpanan suhu 40 °C.

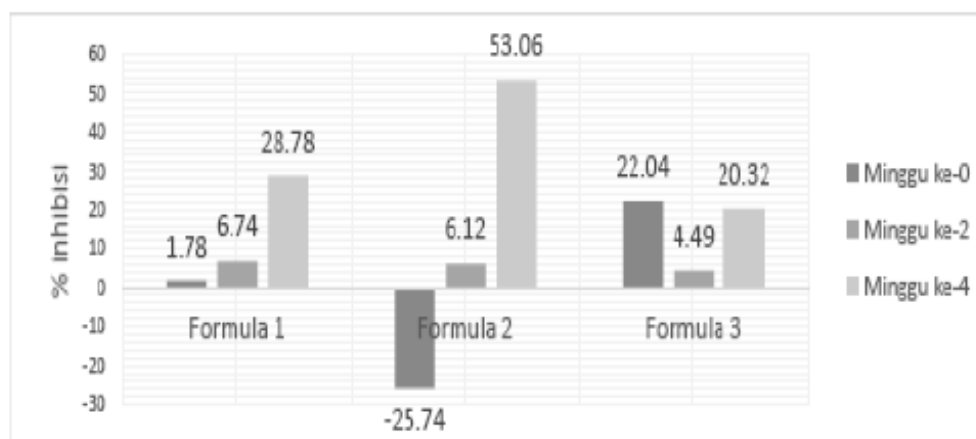
dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis yang semakin meningkat dapat menurunkan viskositas sehingga nilai kemampuan menyebar semakin besar. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap kemampuan menyebar pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu kamar namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu 40 °C. Pada suhu kamar, waktu tidak mempengaruhi kemampuan menyebar namun pada suhu 40 °C, waktu mempengaruhi kemampuan menyebar.

Hasil Uji Stabilitas Ukuran Globul Krim.

Pada Gambar 6 disajikan hasil evaluasi ukuran globul yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki ukuran globul berturut-turut sebesar (51,28;

58,33; 62,11; 62,51)µm pada penyimpanan suhu kamar dan (58,2; 61,79; 64,63; 68,46)µm pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai ukuran globul yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan ukuran globul semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis yang semakin meningkat dapat menurunkan viskositas sehingga ukuran globul semakin besar. Berdasarkan hasil analisa statistik ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap ukuran globul pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap ukuran globul pada suhu kamar namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap ukuran globul pada suhu 40 °C.

Hasil Uji Stabilitas Sentrifugasi Krim. Hasil evaluasi sentrifugasi menunjukkan bahwa tidak terjadi



Gambar 8. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase krim ekstrak akar manis pada minggu ke-0, minggu ke-2 dan minggu ke-4.

pemisahan pada formula blangko, formula 1, 2 dan 3 setelah disimpan selama satu bulan pada suhu kamar dan 40 °C. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa krim stabil.

Hasil Uji Stabilitas pH Krim. Pada Gambar 7 disajikan hasil evaluasi pH yang menunjukkan formula blangko, formula 1, 2, 3 memiliki pH berturut-turut sebesar (4,89; 4,93; 4,77; 5,04) pada penyimpanan suhu kamar dan (4,75; 4,73; 4,75; 4,85) pada penyimpanan suhu 40 °C. Berdasarkan hasil tersebut, formula yang mengandung ekstrak memiliki nilai pH yang lebih besar dibandingkan dengan formula tanpa ekstrak dan pH semakin meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena konsentrasi ekstrak akar manis memiliki pH 4,63–5,07 sehingga akan meningkatkan pH krim ketika ekstrak dicampurkan ke dalam basis krim. Ekstrak akar manis mengandung senyawa polifenol dan saponin yang mengandung banyak gugus OH⁻ sehingga menyebabkan pH sediaan cenderung meningkat. Berdasarkan hasil analisa ANOVA 2 arah dengan asas kepercayaan 5%, diperoleh kesimpulan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara formula terhadap pH pada suhu kamar dan suhu 40 °C dan tidak terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap kemampuan menyebar pada suhu 40 °C namun terdapat perbedaan bermakna antara waktu terhadap pH pada suhu kamar. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan bahwa pada suhu yang lebih tinggi tidak mempengaruhi pH krim.

Hasil Uji Aktivitas Inhibisi Tirosinase pada krim ekstrak akar manis secara *in vitro*. Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak akar manis terbukti memiliki aktivitas inhibisi tirosinase dengan dengan konsentrasi 0,01% mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 126,7548 ppm, dengan konsentrasi 0,11% sebesar 1130,9036 ppm dan dengan konsentrasi 1,01% sebesar 10092,4050 ppm. Untuk mengetahui apakah krim akar manis memiliki

aktivitas sebagai pemutih kulit, maka dilakukan uji inhibisi tirosinase terhadap sediaan krim. Uji inhibisi tirosinase secara *in vitro* dilakukan berdasarkan pengukuran senyawa berwarna jingga yaitu dopakrom yang merupakan hasil oksidase L- DOPA oleh tirosinase. Pengukuran dilakukan pada setiap formula pada minggu ke 0, 2 dan 4. Dilakukan pula pengukuran pada kontrol dan blangko kontrol. Pada kontrol dan blangko kontrol terdapat larutan krim blangko, hal ini bertujuan untuk menghindari pengaruh bahan tambahan yang terdapat dalam formula krim. Bahan tambahan seperti antioksidan BHT dapat bereaksi dan menghambat aktivitas tirosinase sehingga akan mempengaruhi hasil pengujian. Pada preparasi sampel, larutan krim diekstraksi dengan etanol 96% lalu disentrifugasi pada kecepatan 3800 rpm selama 15 menit agar supernatan terpisah. Supernatan diambil, serapannya diukur diukur dengan alat *microplate reader* ELX 800 dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit pada panjang gelombang 490 nm. Hasil uji aktivitas inhibisi tirosinase pada krim ekstrak akar manis secara *in vitro* disajikan pada Gambar 8.

Pada Gambar 8 disajikan bahwa hasil % inhibisi formula 1, 2, 3 pada minggu ke 0, ke 2 dan ke 4 berturut-turut sebesar (1,78; -25,4; 22,04)%; (6,74; 6,12; 4,49)%; dan (-28,78; 53,06; 20,32)%. Berdasarkan hasil penelitian diperoleh hasil inhibisi krim ekstrak akar manis yang menurun. Hal ini disebabkan karena ekstrak akar manis mengandung senyawa glikosida, saponin, tannin dan flavonoid yang memiliki stabilitas yang berbeda. Adanya efek sinergis antara total flavonoid dan total polifenol dapat mempengaruhi aktivitas krim dalam penghambatan enzim tirosinase. Pada *Crude extract* terdapat konstituen lain seperti senyawa flavon yang dapat menginduksi melanogenesis sehingga dapat menghambat aktivitas inhibisi tirosinase. Berdasarkan hasil tersebut, Formula 3 merupakan formula terbaik

karena mempunyai persentase inhibisi tertinggi (53,06%) yang disimpan selama 2 minggu.

SIMPULAN

Ekstrak akar manis yang mengandung glabridin memiliki potensi sebagai pemutih melalui uji aktivitas inhibisi enzim tirosinase *in-vitro* dengan nilai IC₅₀ sebesar 126,7548 µg/mL. Ekstrak akar manis dengan variasi konsentrasi 0,01%, 0,11%, dan 1,01% dapat diformulasikan ke dalam sediaan krim tipe M/A yang memenuhi parameter mutu fisik. Formula 3 dengan konsentrasi ekstrak 1,01% merupakan formula terbaik. Krim yang diperoleh diperoleh homogen, berwarna putih kekuningan, memiliki aroma bunga dengan tekstur yang sangat lembut bertipe M/A, sifat alir tiksotropi plastis dengan viskositas 520000 cPs, kemampuan sebar 3086,70 mm², ukuran globul 62,51 µm dan pH 5,04 serta memiliki aktivitas inhibisi tirosinase sebesar 20,32% setelah disimpan selama 4 minggu.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saag KG, Choi H. Epidemiology, risk factors and Heinrich M, Barnes J, Gibbons S., Williamson EM. Farmakognosi dan fitoterapi. Diterjemahkan oleh Hadinata AH. Jakarta: Penerbit buku kedokteran: EGC; 2005. h. 230
2. Jennifer C, Stephie CM. A review on skin whitening property of plant extracts. Bangalore. Int J. Pharm Bio Sci. 2012.3(4):332 – 47.
3. Zuidhoff HW and Van Rijsbergen JM. Whitening efficacy of frequently used whitening ingredients. C&T. 2001.116(1): 53-9.
4. Hosseinzadeh H., Nassiri M. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. Wiley InterScience. 2008.22: p. 709–24.
5. Vispute S, Khopade A. *Glycyrrhiza glabra* Linn IJPBS. 2011.2: p. 43.
6. Zadeh JB, Kor ZM, Gofar MK. Licorice (*Glycyrrhiza glabra* Linn) As a valuable medicinal plant. International Journal of Advance Biological and Biomedical Research. 2013.1(10):1281-8.
7. Tian M., Yan H., Row KH. Extraction of *Glycyrrhizic acid* and glabridin from Licorice. International Journal of Molecular Sciences. ISSN 1422-0067. 2008.
8. Zongping Z. Isolation and structural elucidation of tyrosinase inhibitors from five plant extracts [thesis]. Hongkong: The University of Hongkong; 2011.
9. Chang, T.S. An updated review of tyrosinase inhibitors. Department of Biological Science and Technology. National University Tainan Taiwan; 2009.
10. Batubara I, Darusman LK, Mitsunaga T, et al. Potency of Indonesian medicinal plants as tyrosinase inhibitor and antioxidant agent. J. Bio. Sci. 2010.10(2): 138-44.
11. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Jakarta. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 2000. h. 5,10-11.
12. Barel AO, Poye M, Maibach HI. Handbook of cosmetic science and technology. New York: Marcel Dekker, Inc; 2002.
13. Harry RG. Stability modern cosmeticology. Edisi VIII. New York: Chemical Publishing Co, Inc; 2000.
14. Ansel HC. Pengantar bentuk sediaan farmasi. Edisi keempat. Diterjemahkan oleh: Ibrahim F. Jakarta: UI Press; 2008: h.376-89.
15. Rowe C, Sheskey J, Quinn E. Handbook of pharmaceutical excipients sixth Edition. London: American Pharmaceutical Association; 2009. p. 75, 155, 283, 290-91, 378-9, 441-2, 445-6, 549-52, 592, 596, 766.
16. Sinko PJ. Farmasi fisik dan ilmu farmasetika martin, edisi kelima. Diterjemahkan oleh Djajadisastra J. dari Martin's physical pharmacy and pharmaceutical science. Jakarta: UI Press; 2011.
17. The Department of Health of Great Britain. British pharmacopeia. London: The Stationary Office; 2009. p. A27, 962, 1334, 1557, 1658, 1729-30, 1922, 1942, 2154.

Sintesis Senyawa *N*-(2-Klorobenzoil)-*N'*-Fenilurea dan Uji Aktivitas Anti Kanker terhadap Sel HeLa

(Synthesis and Anti cancer Activity Test against HeLa Cells from *N*-(2-Chlorobenzoyl)-*N'*-Phenylurea)

BAMBANG TRI PURWANTO*

Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Kampus B Universitas Airlangga, Jl. Darmawangsa Dalam, Surabaya

Diterima 3 Agustus 2018, Disetujui 25 September 2018

Abstrak: Beberapa senyawa turunan urea masih terus dikembangkan dalam upaya pencarian senyawa antikanker yang poten dengan efek samping minimal. Berkaitan dengan hal di atas ingin dikembangkan satu turunan urea yaitu senyawa *N*-(2-klorobenzoil)-yang merupakan turunan *N'*fenilurea. Metode sintesis adalah *Schotten-Baumann* yang telah di modifikasi, uji kemurnian dengan kromatografi lapis tipis menggunakan 3 macam pelarut eluasi yang berbeda. Karakterisasi struktur dengan menggunakan metode spektrofotometri UV dan IR, kemudian spektrometri ¹H-NMR dan MS. Uji aktivitas antikanker terhadap sel Hella menggunakan metode MTT *assay* dan diperoleh nilai IC₅₀. Rendemen senyawa *N*-(2-klorobenzoil)-*N'*fenilurea sebesar 80,47 % berupa kristal jarum berwarna putih. Uji kemurnian secara kromatografi lapis tipis dengan 3 pelarut eluasi berbeda (heksan:etil asetat:metanol = 2:3:1; heksan:aseton = 4:2; heksan:etilasetat = 4:2) diperoleh satu noda tunggal yang berbeda harga Rf nya dibanding dengan senyawa asal *N*-fenilurea. Titik Lebur senyawa adalah 149°C berbeda dengan senyawa asalnya *N*-fenilurea. Uji aktivitas antikanker dengan metode MTT *assay* menggunakan sel Hella diperoleh hasil IC₅₀ 2100 mg/mL atau 8,52 mM sedang IC₅₀ dari senyawa hidroksi urea sebagai pembanding 7537 mg/mL atau 99,10 mM. Senyawa *N*-(2-klorobenzoil)-*N'*fenilurea telah berhasil di sintesis dan dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai senyawa anti kanker.

Kata kunci: Sintesis *N*-(2-klorobenzoil)-*N'*fenilurea, aktivitas anti kanker, sel HeLa.

Abstract: Several the urea derived compounds are still being developed in an effort to find the potent anti cancer compounds with the minimal side effects. In connection with the above matter, we want to develop an urea derivative, namely the compound is *N*-(2-chlorobenzoyl)-*N'*-phenylurea which is a derivative of the *N*-phenylurea. The synthesis method is the modified *Schotten-Baumann*, the purity test using thin layer chromatography using 3 different types of eluent solvents. Structure characterization using UV and IR spectrophotometry methods, then ¹H-NMR spectrometry and MS. Anticancer activity test for the Hella cells using MTT assay method and obtained IC₅₀ value. The yield of *N*-(2-chlorobenzoyl)-*N'*-phenylurea compound is 80.47% on the form of white needle crystals. The purity test by thin layer chromatography with 3 different eluent solvents (hexan:ethyl acetate:methanol = 2:3:1; hexan:acetone = 4:2; hexan:ethylacetate = 4:2) obtained a single stain which is different from the Rf value compared with the original *N*-phenylurea compound. The melting point of the compound is 149 °C which is different from the original compound *N*-phenylurea. Anticancer activity test with MTT assay method using the Hella cells obtained IC₅₀ 2100 mg/ mL or 8.52 mM and IC₅₀ of hydroxy urea as the standard compound is 7537 mg/mL or 99.10 mM. *N*-(2-chlorobenzoyl)-*N'*-phenylurea compound has been successfully synthesized and can be further developed as an anticancer compound.

Keywords: Synthesis of *N*-(2-chlorobenzoyl)-*N'*-phenylurea; anticancer activity, HeLa cells.

* Penulis korespondensi, Hp. 08123536513
e-mail bambangsutony@gmail.com ; bambang-t-p@ff.unair.ac.id

PENDAHULUAN

KANKER adalah salah satu penyakit penyebab utama kematian di negara berkembang dan juga di seluruh dunia. Dari 58 juta kematian di seluruh dunia dalam tahun 2005, tercatat 7,6 juta (13%) diantaranya disebabkan oleh kanker. Kematian yang disebabkan oleh penyakit kanker diperkirakan akan terus meningkat di tahun 2015 dan 11,4 juta orang di tahun 2030. Di Indonesia, kanker menjadi penyumbang kematian ketiga terbesar setelah penyakit jantung⁽¹⁾. Hingga kini masih terus dilakukan usaha untuk menemukan obat antikanker baru karena obat-obat yang sudah lama digunakan lambat laun menjadi kurang efektif dan ada kecenderungan resistensi⁽²⁾.

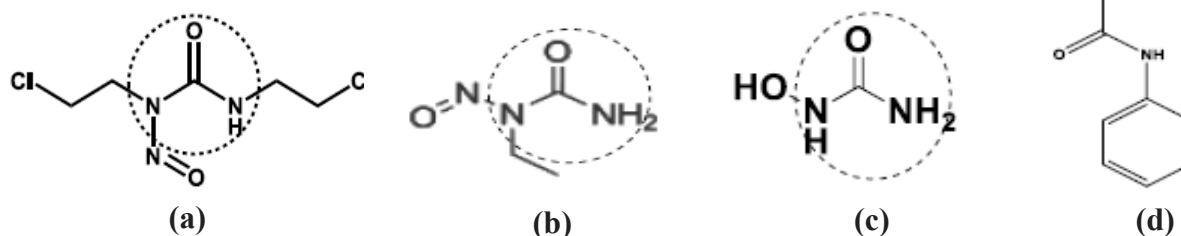
Obat anti kanker klasik yang digunakan dalam kemoterapi antara lain adalah golongan senyawa pengalkil, anti metabolit, antibiotika antrasiklin, alkaloida tanaman, inhibitor topoisomerase. Obat-obat golongan tersebut menghambat pembelahan sel atau sintesis dan fungsi DNA dengan beberapa cara. Obat anti kanker baru tidak mempengaruhi DNA secara langsung, tetapi mempengaruhi molekul target spesifik yang diperlukan untuk karsinogenesis dan pertumbuhan sel kanker; dikenal dengan istilah *molecularly targeted therapy*⁽³⁾. Anti kanker yang termasuk golongan ini adalah inhibitor tirosin kinase (*small molecule tyrosine kinase inhibitor*) dan antibodi monoklonal. Tirosin kinase inhibitor yang telah menjadi obat antikanker antara lain: imatinib, gefitinib, dan erlotinib. Ahli onkologi meyakini bahwa terapi molekul target adalah kemoterapi masa depan⁽⁴⁾.

Pengembangan obat modern dilakukan melalui proses yang panjang serta memakan biaya yang tinggi, karena pada awalnya bersifat coba-coba (*trial and error*). Untuk meminimalkan sifat coba-

coba, dilakukan rancangan obat (*drug design*), yaitu mengembangkan obat yang telah diketahui struktur molekul dan aktivitas biologisnya, atas dasar penalaran yang sistemik dan rasional⁽⁵⁾ dengan metode Hubungan Kuantitatif Struktur dan Aktivitas (HKSA). Dalam era komputer masa kini pendekatan hubungan struktur dan aktivitas dapat dilakukan secara lebih cepat dan terarah dengan "pemodelan molekul" (*molecular modeling*)⁽⁶⁾.

Langkah pertama dalam rancangan obat adalah menentukan senyawa penuntun (*lead compound*) yang akan di modifikasi strukturnya untuk memperoleh aktivitas yang dikehendaki, meningkatkan aktivitas atau selektivitasnya, atau menurunkan toksisitasnya⁽⁵⁾. Urea adalah salah satu dari *lead compound* yang menjadi induk dari sekian banyak turunan yang potensial sebagai anti kanker. Obat anti kanker turunan urea yang dikenal antara lain adalah karmustin atau BCNU (*bis-chloroethylnitrosourea*) dan ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea*) yang termasuk senyawa pengalkil, serta hidroksiurea yang bekerja dengan menghambat enzim ribonukleotida reduktase (7). ENU dapat menginduksi mutasi dan juga toksik pada dosis tinggi. Struktur senyawa-senyawa tersebut ditampilkan pada Gambar 1.

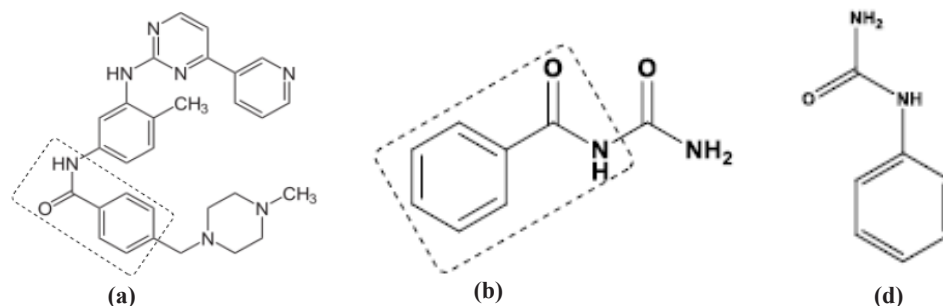
Siswandono (1999) telah melakukan sintesis senyawa baru turunan benzoilurea yang mempunyai aktivitas pada sistem saraf pusat berupa gangguan gerak pada mencit⁽⁸⁾. Susilowati dan Diyah (2011) melaporkan bahwa *N-benzoilurea*, *N-4-metoksibenzoilurea*, dan *2-klorobenzoilurea* menunjukkan efek sitotoksik berdasarkan BST (*Brine Shrimp Lethality Test*), sehingga berpotensi sebagai antikanker⁽⁹⁾. Aktivitas sitotoksik senyawa tersebut lebih tinggi daripada hidroksiurea yang telah dikenal sebagai obat antikanker.



Gambar 1. Struktur Karmustin (a), ENU (b), hidroksiurea (c), dan N-fenilurea (d).

Hidroksiurea dan turunan asam hidroksamatnya dilaporkan bekerja dengan mempengaruhi target enzim spesifik yang terlibat dalam perkembangan kanker seperti histon deasetilase, matriks metaloproteinase

(MMP), dan RNR⁽¹⁰⁾. Hardjono (2011) telah melakukan modifikasi struktur urea dengan mensintesis 9 turunan 1-(benzoiloksi)urea dan menyimpulkan bahwa ada hubungan linear antara aktivitas sitotoksik *in-vitro*



Gambar 2. Struktur Imatinib (a), N-benzoylurea (b), dan N-fenilurea (d)

terhadap se HeLa dengan prediksi aktivitas secara *in silico* melalui pemodelan molekul. Aktivitas sitotoksik turunan 1-(benzoyloksi)urea lebih tinggi dibanding hidroksiurea⁽¹¹⁾.

Dalam usaha mendapatkan senyawa antikanker baru dilakukan dilakukan modifikasi struktur urea. Struktur senyawa anti kanker mengandung gugus NH-CO-NH yang merupakan gugus farmakoforik. Pada beberapa senyawa, farmakofor tersebut berada dalam cincin heterosiklik aromatik atau dalam heterosiklik nonaromatik, sebagai -NH atau -N-⁽¹²⁾. Dengan mempertahankan farmakofor -NH-CO-NH- serta menambahkan gugus halogen berupa klorida dan gugus aromatik, akan dibuat senyawa turunan fenilurea (Gambar 2).

Untuk optimasi aktivitas anti kanker, dilakukan modifikasi struktur senyawa fenilurea berdasarkan perubahan sifat lipofilik, sterik, dan elektronik senyawa. Modifikasi sifat lipofilik dan elektronik dilakukan menurut model *Topliss*⁽¹³⁾, yaitu memasukkan substituen pada cincin benzena yang diprediksi akan menghasilkan senyawa dengan aktivitas lebih tinggi daripada senyawa induk. Substituen metil (-CH₃) yang non polar akan meningkatkan sifat lipofilik, sedangkan substituen yang elektronegatif seperti metoksi, kloro, dan trifluorometil akan mengubah sifat elektronik senyawa. Modifikasi sifat sterik dihasilkan dari perubahan ukuran gugus benzoyl yang telah disubstitusi⁽¹⁴⁾. Senyawa, turunan fenilurea dapat disintesis melalui reaksi antara senyawa fenilurea dengan turunan benzoyl klorida berdasarkan metode *Schotten-Baumann*⁽¹⁵⁾.

Untuk menguji aktivitas antikanker dilakukan penentuan aktivitas hambatan pertumbuhan sel secara *in vitro*⁽¹⁶⁾. Kultur sel tumor yang digunakan adalah sel karsinoma serviks (Sel HeLa). Aktivitas hambatan pertumbuhan sel dinyatakan dalam IC₅₀, yaitu kadar obat yang dapat mengakibatkan kematian 50 % sel tumor⁽¹⁷⁾.

Dari penelitian ini akan diperoleh senyawa baru turunan N-fenilurea yang dapat dimanfaatkan sebagai obat anti kanker.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Fenilurea, 2-klorobenzoyl klorida, piridin, berbagai pelarut organik (aseton, etil asetat, n-heksana, kloroform, etanol, dan metanol dengan kualitas pro analisa), Kieselgel 60 F254, DMSO-d₆. Bahan untuk uji aktivitas : Senyawa hasil sintesis, kultur sel HeLa, Media Kultur DMEM, DMSO, dapar fosfat salin (PBS), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida), SDS 10% dalam 0,1 N HCl.

Alat. Alat gelas di laboratorium, Spektrofotometer UV-vis Shimadzu HP, 8452 A, Spektrofotometer Jasco FT-IR 5300, Spektrometer, NMR Hitachi R-1900, *Electrothermal* Mel-Temp, Corning Hot Plate P 351, Neraca analitik Shimadzu LM-20. Alat untuk uji sitotoksik : Mikropipet 200, 1000 μ L dan tip, tabung reaksi, *microplate*, *Conical tube*, ELISA-Reader.

METODE. Prosedur Sintesis Senyawa N-(2-klorobenzoyl)-N'fenilurea. Pada labu alas bulat 200 mL; 0,03 mol fenilurea dicampur dengan 40 mL tetrahidrofuran dan 4 mL piridin. Pada suhu 5 °C ditambahkan larutan 2-klorobenzoyl klorida 0,01 mol dalam 20 mL tetrahidrofuran, sedikit-sedikit sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Setelah larutan 2-klorobenzoyl klorida habis, campuran direfluks dan diaduk selama 3 jam.

Setelah reaksi dihentikan, tetrahidrofuran diuapkan pada rotavapor. Pada hasil reaksi ditambahkan larutan natrium bikarbonat jenuh sambil diaduk sampai tidak terjadi gelembung udara (buih). Hasil disaring dengan corong *Buchner*, zat padat dicuci dengan 50 mL air 2 kali, kemudian dicuci dengan 10 mL etanol 2 kali. Dilakukan rekristalisasi dengan cara melarutkan zat padat dengan etanol secukupnya sambil diaduk di atas pemanas (*hot plate*). Larutan disaring dalam keadaan panas, filtrat dibiarkan dalam suhu kamar sampai dingin dan dibiarkan semalam. Kristal yang terbentuk disaring dengan corong *Buchner*, dicuci dengan 10 mL etanol 2 kali. Tergantung senyawa hasil sintesis yang diperoleh, rekristalisasi dapat dilakukan dengan pelarut lain yang sesuai, seperti aseton-air. Kristal

yang terbentuk dipindahkan ke cawan petri, kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C sampai berat konstan⁽¹⁸⁾.

Uji Kemurnian dan Identifikasi Struktur Senyawa. Uji kemurnian senyawa-senyawa hasil sintesis dilakukan dengan kromatografi lapisan tipis, dengan fase diam lempeng aluminium Silika gel GF₂₅₄ E. Merck dan penampak noda lampu UV. Penentuan titik lebur dilakukan dengan *Electrothermal melting point apparatus*. Identifikasi struktur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan spektrofotometer ultra-violet (UV) dan infra merah (IR), spektrometer resonansi magnet inti (¹H-NMR) dan spektrometer massa (MS)⁽¹⁹⁾.

Uji Aktivitas Anti kanker. Aktivitas anti kanker atau uji sitotoksik secara in vitro dengan sel kanker menggunakan metode MTT. Disiapkan larutan induk dari 10 senyawa uji dengan kadar 5000 µg/mL dalam pelarut DMSO. Dari masing-masing larutan induk dibuat satu seri larutan baku kerja konsentrasi 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL; dengan cara pengenceran. Juga dibuat larutan obat antikanker standar (hidroksiurea) sebagai kontrol positif dan blanko pelarut sebagai kontrol negatif.

Disiapkan kultur sel kanker (sel HeLa) dan sel normal berupa suspensi sel dengan kepadatan 10⁵– 2x10⁶. Kemudian sel dimasukkan ke dalam sumuran *Microplate*, masing-masing 100 µL, kecuali sumuran yang digunakan sebagai kontrol media. Sebanyak 0,2 mL dari masing-masing baku kerja, kontrol positif dan kontrol negatif dimasukkan dalam sumuran microplate. Untuk tiap konsentrasi larutan baku kerja dibuat replikasi 3. *Microplate* diinkubasi dalam inkubator 5% CO₂ selama 24 jam pada suhu 37 °C dan pH 7,4-7,7. Disiapkan reagen MTT untuk perlakuan (0,5 mg/mL) dengan mengencerkan 1 mL stok MTT (50 mg MTT dalam 10 mL PBS) dengan

media secukupnya.

Setelah inkubasi, media sel dibuang dan sel dicuci PBS kemudian ditambahkan reagen MTT 100 µL ke setiap sumuran, termasuk kontrol media (tanpa sel). Plate diinkubasi 2 – 4 jam dalam inkubator CO₂. Setelah terbentuk formazan ditambahkan 100µL SDS 10% dalam 0,1 N HCl. *Plate* dibungkus dengan kertas aluminium dan inkubasikan di tempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Selanjutnya absorbansi masing-masing sumuran diamati dengan *ELISA reader* pada 595 nm. Makin banyak sel yang hidup, absorbansi makin besar. IC₅₀ dari senyawa uji ditentukan dengan analisis regresi probit. Prosedur yang sama dilakukan pula untuk sel normal^(20, 21).

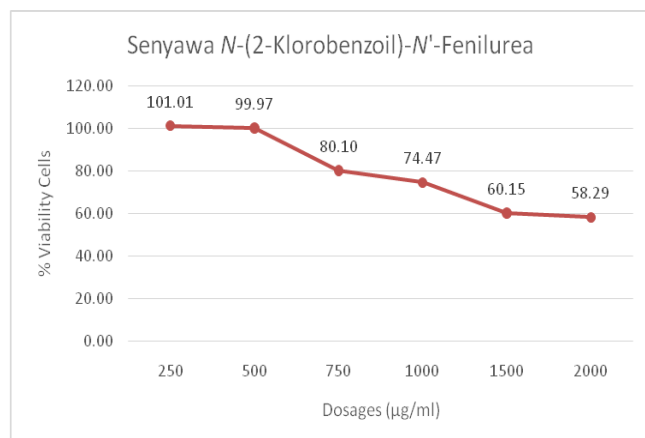
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea. Hasil sintesis senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea berupa kristal berwarna putih bentuk seperti jarum dengan rendemen sebesar 80,47%.

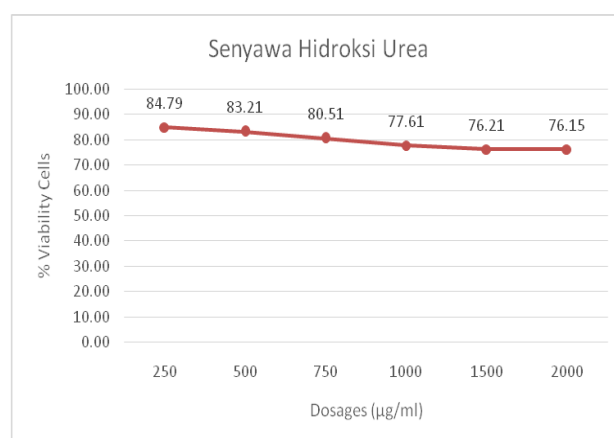
Struktur Karakterisasi Senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea. N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea, λ max (nm) = 262, 300, 304; IR, 3444 cm⁻¹ (NH sekunder), 1787 cm⁻¹ (-CO karbonil), 1592 cm⁻¹ (C=C arom); ¹H-NMR (DMSO-d₆), 7,00 – 8,40 ,m, (C₆H₅); 10,80, s, (NH); 10,97,s, (NH); MS (EI)(m/e) , 274 (M)⁺, 112 (C₁₀H₅)⁺, 120 (C₆H₅CONH)⁺, 139 (C₁₀H₅COH)⁺.

Uji Aktivitas Anti Kanker Senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea. Setelah dilakukan uji antikanker terhadap sel HeLa dari senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dengan menggunakan metode MTT *assay* dan hasilnya dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.

Untuk melakukan sintesis senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dilakukan dengan cara



Gambar 3. Kurva aktivitas anti kanker senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea terhadap sel HeLa.



Gambar 4 : Kurva aktivitas anti kanker senyawa pembanding hidroksi urea terhadap sel HeLa.

mereaksikan antara gugus amina primer dari N-fenilurea dengan gugus benzoil dari senyawa 2-klorobenzoil klorida. Beberapa peneliti telah melakukan beberapa metode reaksi antara gugus amina primer dengan turunan benzoil klorida, Reksohadiprodjo (1981) dan Tjiptasurasa (1991) telah melakukan reaksi asilasi antara turunan urea dengan asil klorida, metode yang digunakan adalah dengan melakukan pencampuran dan pemanasan pada suhu 60 – 80 °C. Ternyata hasil yang diperoleh memiliki rendemen yang relatif kecil (9-31%), hal ini dapat disebabkan kurangnya kontak antar senyawa karena tidak adanya media pelarut yang digunakan.

Metode diatas digunakan oleh peneliti karena turunan urea memiliki sifat kelarutan yang berbeda dengan turunan asil klorida, turunan urea merupakan senyawa yang mudah larut air sedangkan turunan asil klorida sebaliknya. Pada pelaksanaan reaksi asilasi ini dihindari adanya air karena dapat bereaksi dengan turunan benzoil klorida dan akan membentuk asam benzoat begitu pula pelarut alkohol sebaiknya tidak digunakan karena akan membentuk senyawa ester bila bereaksi dengan turunan benzoil klorida. Pada reaksi asilasi, turunan benzoil klorida dapat bereaksi dengan cepat dan sempurna dengan senyawa amina primer, sekunder ataupun tersier pada penggunaan pelarut piridin dan memberikan prosentase hasil yang relatif cukup baik^(22, 23).

Pada reaksi asilasi antara senyawa urea dengan turunan asil klorida, secara teoritis kedua gugus amina primer dapat bereaksi dengan turunan asil klorida, tetapi dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Reksohadiprodjo (1987) dan Tjiptasurasa (1991) menunjukkan bahwa hanya satu gugus amina primer dari senyawa urea yang bereaksi dengan turunan asil klorida.

Hal tersebut disebabkan adanya pengaruh halangan ruang dari inti aromatis sehingga akan mengganggu reaksi selanjutnya. Pada reaksi asilasi tersebut akan dilepaskan HCl yang dapat mengganggu jalannya reaksi, karena gugus amida yang terbentuk akan dapat dipecah kembali, oleh karena itu dapat diatasi dengan penambahan 2 ekivalen senyawa amina. Cara lain untuk mengatasi masalah diatas adalah dengan menetralkan HCl yang terbentuk dengan penambahan basa kuat seperti larutan natrium hidroksida atau kalium hidroksida. Reaksi antara senyawa amin dengan asil klorida yang menggunakan pelarut organik dikenal dengan reaksi *Schotten-Baumann*^(22, 23).

Siswandono (1999), telah melakukan reaksi asilasi antara senyawa urea dengan turunan benzoil klorida, ternyata reaksi ini mengalami kesukaran disebabkan senyawa urea larut dalam pelarut polar sedang turunan benzoil klorida larut dalam pelarut non polar, oleh

karena itu digunakan pelarut tetrahidrofuran yang akan membentuk suspensi dengan senyawa urea kemudian direaksikan dengan turunan benzoil klorida yang dilarutkan dalam tetrahidrofuran pula⁽⁸⁾.

Pada pembentukan senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea, reaksi juga dilakukan dengan cara mereaksikan antara senyawa N-fenilurea dengan turunan 2-klorobenzoil klorida menggunakan pelarut reaksi tetrahidrofuran, dan direfluks selama 8 jam. Setelah reaksi selesai kemudian ditambahkan larutan natrium karbonat jenuh untuk menetralkan HCl dan turunan asam benzoat yang terbentuk. Langkah selanjutnya adalah melakukan pencucian dengan air untuk menghilangkan sisa-sisa garam HCl yang ada, kemudian dilakukan pencucian dengan metanol untuk menghilangkan sisa senyawa 2-klorobenzoil klorida atau hasil hidrolisisnya yaitu turunan asam benzoat. Tahap berikutnya adalah melakukan rekristalisasi dengan metanol panas, karena senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea larut dalam metanol panas tapi tidak larut dalam kondisi dingin. Pada umumnya hasil rekristalisasi dari senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea berupa kristal jarum kecil mengkilat atau keping mengkilat.

Senyawa-senyawa hasil sintesis yang sudah terbentuk kemudian diuji kemurniannya dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan tiga fasa gerak yaitu campuran heksan:etil asetat : metanol (2:3:1), campuran heksan:aseton (4:2) dan heksan :etil asetat (4:2). Hasil KLT menunjukkan bahwa pada berbagai fasa gerak yang dipergunakan diatas noda yang ada hanya satu, hal ini berarti bahwa kemungkinan senyawa hasil sintesis merupakan senyawa tunggal.

Tahap selanjutnya adalah melakukan uji kemurnian dengan penentuan jarak lebur dari senyawa-senyawa hasil sintesis. Hasil penentuan jarak lebur senyawa hasil sintesis menunjukkan bahwa jarak lebur nya relatif kecil yaitu berkisar dua derajat celcius, hal ini berarti senyawa-senyawa hasil sintesis murni.

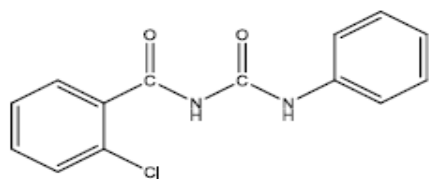
Identifikasi Struktur Senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea. Pada penentuan panjang gelombang senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dengan menggunakan spektrofotometer UV dapat terlihat bahwa senyawa hasil sintesis menunjukkan 2 panjang gelombang maksimum yaitu 204 nm dan 232 nm, diduga senyawa hasil sintesis memiliki gugus kromofor ikatan rangkap terkonyugasi atau sistem aromatik dan gugus auksokrom. Dari spektra UV juga terlihat adanya pergeseran panjang gelombang maksimum.

Pada bahan reaksi N-fenilurea menunjukkan 2 panjang gelombang yaitu 204 nm dan 238 nm, sedang senyawa hasil sintesis juga menunjukkan 3 panjang

gelombang maksimum yaitu 262 nm, 300 nm dan 304 nm, hal ini menunjukkan bahwa terjadi penambahan gugus kromofor pada struktur benzoil sehingga bisa dikatakan bahwa reaksi asilasi antara senyawa N-fenilurea dan senyawa 2-klorobenzoil klorida telah berlangsung seperti yang diharapkan.

Pada spektrum IR senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea terlihat adanya pita didaerah 3444 cm^{-1} yang menunjukkan gugus amina sekunder dari senyawa amin aromatis, hal ini didukung pula oleh spectra $^1\text{H-NMR}$ dengan adanya dua pita tajam didaerah 10,80 dan 10,97 ppm yang menunjukkan adanya masing-masing 1 atom H singlet dari gugus amina sekunder (gugus CONH). Adanya dua gugus karbonil terlihat pada spektrum IR pada bilangan gelombang 1787 dan 1676 cm^{-1} , sedang untuk gugus $-\text{C}=\text{C}-$ terlihat pada bilangan gelombang 1592. Hal ini diperkuat spektrum $^1\text{H-NMR}$ yang menunjukkan multiplisitas yang multiplet dengan 10 atom H dari dua inti aromatis pada pergeseran kimia 7,00 – 8,40 ppm.

Dari analisis spektrum-spektrum di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa adalah N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dengan rumus struktur kimia sebagai berikut:



N-2-klorobenzoil-N'fenilurea.

Dari data aktivitas anti kanker terhadap sel HeLa, senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea memiliki aktivitas anti kanker yang lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa hidroksi urea yang dapat dilihat dari IC_{50} nya, IC_{50} senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea: 2100 mg/mL atau 8,52 mM, sedangkan senyawa hidroksi urea sebagai senyawa pembanding: 7557 mg/mL atau 99,10 mM. Aktivitas yang lebih tinggi karena adanya gugus fenil pada senyawa fenilurea yang akan meningkatkan nilai parameter lipofiliknya ($\log P$: 3,02) sehingga akan meningkatkan kemampuan senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dalam penembusan ke dalam membran biologis sel HeLa, selain itu adanya penambahan gugus benzoil pada senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea diperkirakan akan meningkatkan interaksi senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea dengan reseptornya sehingga aktivitas anti kanker terhadap sel HeLa semakin tinggi. Adanya gugus klorida pada posisi orto yang terikat langsung dengan inti benzen juga

akan meningkatkan sifat lipofilik dari senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea sehingga akan memperkuat penembusan kedalam membran biologis juga, yang akan berakibat terjadinya peningkatan aktivitas anti kankernya.

SIMPULAN

Senyawa N-(2-klorobenzoil)-N'fenilurea telah berhasil di sintesis dan memiliki aktivitas anti kanker terhadap sel HeLa yang lebih tinggi dibanding senyawa hidroksi urea, sehingga dapat dikembangkan sebagai senyawa baru dengan aktivitas anti kanker.

DAFTAR PUSTAKA

1. DepKes RI. Departemen Kesehatan Bentuk Subdirektorat Kanker. TEMPO Interaktif. 2006: diakses pada 14 Maret 2010.
2. Kar A. Medicinal chemistry. 4th ed. New Delhi: New Age International Ltd Publishers; 2007. pp. 794 – 810
3. Zhukov NV, Tjulandin SA. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. *Biochemistry Mosc.* 2008.73(5): 605–18.
4. Avendano C and Menendes JC. Amsterdam: Medicinal chemistry of anticancer drugs, Elsevier; 2008. 13-18.
5. Siswandono dan Soekardjo, B. Kimia Medisinal I & II, Surabaya: Airlangga University Press; 2000.
6. Abraham, DJ. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. Sixth Edition, Volume 1. New York: Drug Discovery, John Wiley and Sons; 2003.
7. Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N. Engl. J. Med.* 2008. 358(13):1362–9.
8. Siswandono. Sintesis senyawa baru turunan asil dan Benzoil-N-Urea untuk optimasi aktivitas penekan sistem saraf pusat. Jakarta: Laporan Penelitian Riset Unggulan Terpadu VI, Kementerian Ristek RI, LIPI; 1999.
9. Susilowati R, Diyah NW, Sulistiawan A, Lestari YM. Aktivitas sitotoksik turunan N-Benzoilurea. Surabaya: Laporan Penelitian Fakultas Farmasi Unair; 2011.
10. Saban N, Bujak M. Hydroxyurea and hydroxamic acid derivatives as antitumor drugs. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009.64:213 – 21.
11. Hardjono. Modifikasi struktur 1-(Benzoiloksi)urea dan hubungan kuantitatif struktur aktivitas sitotoksiknya [disertasi]. Surabaya: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga; 2011.
12. Moreau E, Fortin S, Lacroix J, Patenaude A. N-Phenyl-N0-(2-chloroethyl)ureas (CEUs) as potential antineoplastic agents. Part 3: Role of carbonyl groups in the covalent binding to the colchicine-binding site. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2008.16:1206–17.
13. Taylor JB, Kennewell PD. Modern medicinal Chemistry. Chichester: Ellis Horwood Limited; 1993. pp 272-5.
14. Diyah NW, Purwanto, Siswandono, Hardjono, S,

- Purwanto BT, Susilowati R. The structure modification and analgesic activities of o-benzoylsalicylic acid derivatives. Penang: USM–UNAIR First Collaborative Conference; 2007.
15. Clayden G, Warren, Wothers. Organic chemistry. New York: Oxford University Press; 2001. 279-303.
 16. Fortin S, Moreau E, Patenaude A, Desjardins M, Lacroix J, Rousseau JLC, and Rene' C-Gaudreault R. Optimized N-phenyl-N0-(2-chloroethyl)ureas as potential antineoplastic agents: Synthesis and growth inhibition activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2005.13:6703–12.
 17. Lie JN, Song D, Lin YH, Hu QY, Yin L, Bekesi, G, *et al*. Inhibition of microtubule polymerization by 3-Bromopropionylaminobenzoylurea (JIMB01), a new cancericidal tubulin ligand. *Biochemical Pharmacology*. 2003.65:1691–99.
 18. Mc Murry JM. Organic chemistry. Belmont: Broke/Cole; 2008. pp 263-89; 779-851.
 19. Silverstein RM, Webster FX, and Kiemle DJ. Spectrofotometric identification of organic compound. 7th ed. New York: John Wiley and Sons; 2005.
 20. Al-Amin M & Rabiul IM. Cytotoxicity study of some ketone schiff bases and heterocyclic compounds. *Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005.4(1).
 21. McLaughlin JL. Crown gall tumour on potato discs and brine shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. London: Academic Press Limited; 1991.
 22. Reksohadiprodjo MS. Transformation of fusel oil from Indonesian alcohol factories into products of higher value [unpublished dissertation]. Yogyakarta: Gadjah Mada University; 1981. pp. 134, 145-152.
 23. Tjiptasurasa. Komponen minyak fusel Indonesia, isolasi dan oksidasinya, sintesis dan evaluasi farmakokimia beberapa senyawa turunannya [unpublished Dissertation]. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada; 1991.

Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Buah Naga Putih (*Hylocereus undatus*) terhadap Penurunan Kadar Asam Urat Darah pada Mencit (*Mus musculus*)

(The Effectiveness of Ethanol Extract of White Dragon Fruit (*Hylocereus undatus*) on the Reduction of Blood Uric Acid Levels in Mice (*Mus musculus*))

MELLOVA AMIR*, JULIANA IREM ADRIANA PURUKAN

**Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Institut Sains dan Teknologi Nasional
Jl. Moh. Kahfi II, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan**

Diterima 5 Juli 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

Abstrak: Buah naga putih (*Hylocereus undatus*) mengandung flavonoid yang dapat menghambat kerja enzim xantin oksidase yang dapat mengurangi kadar asam urat. Penelitian bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol buah naga putih dalam menurunkan kadar asam urat darah pada mencit yang diinduksi kafein secara oral dengan dosis 15,6 mg/kgBB. Sampel buah naga putih diambil saat berumur 50-55 hari setelah muncul bunga. Pada uji efektivitas, hewan coba mencit dibagi menjadi lima kelompok perlakuan dan diinduksi dengan kafein yaitu kelompok kontrol negatif yang hanya diinduksi kafein, kelompok kontrol positif diberikan allopurinol 10,4 mg/kgBB, kelompok dosis 18,2 mg/kgBB, kelompok dosis 36,4 mg/kgBB, kelompok dosis 72,8 mg/kgBB ekstrak etanol buah naga putih. Pengukuran kadar asam urat darah dilakukan sebelum induksi (hari ke 1), sesudah induksi atau sebelum pemberian ekstrak (hari ke 6) dan sesudah pemberian ekstrak pada (hari ke 9, 12 dan 15). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah naga putih dosis 72,8 mg/kgBB dapat menurunkan kadar asam urat darah pada mencit secara bermakna dibandingkan dengan dosis 18,2 mg/kgBB dan dosis 36,4 mg/kgBB, tetapi tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif (allopurinol) dengan presentase penurunan sebesar 92,16%.

Kata kunci: Ekstrak buah naga putih, asam urat darah, kafein, allopurinol.

Abstract: White dragon fruit (*Hylocereus undatus*) contains flavonoids that can inhibit the action of xanthine oxidase enzymes that can reduce uric acid levels. The aim of this research is to know the effectiveness of white dragon ethanol extract in decreasing uric acid level in caffeine-induced mice with dose 15.6 mg/kgBW (body weight). White dragon fruit samples taken at the age of 50-55 days after the flower appeared. In the effectiveness test, animals were divided into five groups of treatments and induced by caffeine i.e. negatively control group induced only by caffeine, positive control group given allopurinol 10.4 mg/kgBW, group of dose 18.2 mg/kgBW, group of dose 36.4 mg/kgBW, group of dose 72.8 mg/kgBW ethanol extract of white dragon fruit. Measurements of blood uric acid levels were performed before induction (day 1), after induction or before administration of the extract (day 6) and after administration of the extract on (days 9, 12 and 15). The results showed that ethanol extract of white dragon fruit dose 72.8 mg/kgBW could significantly lower blood uric acid levels in mice compared to dose 18.2 mg/kgBW and dose 36.4 mg/kgBW, but not significantly different with positive control (allopurinol) with percentage decrease of 92.16%.

Keywords: White dragon fruit extract, blood uric acid, caffeine, allopurinol.

* Penulis korespondensi, Hp. 082125779916
e-mail mellova.masrizal@gmail.com:

PENDAHULUAN

PERKEMBANGAN zaman dan globalisasi telah membawa banyak perubahan terhadap gaya hidup dan kebiasaan makan yang tidak sehat di masyarakat⁽¹⁾ yang dapat menimbulkan berbagai penyakit degeneratif diantaranya adalah gangguan asam urat atau gout. Produksi asam urat yang berlebihan dan berkurangnya ekskresi asam urat melalui ginjal, serta gabungan dari dua gejala tersebut dapat menimbulkan penyakit gout^(2,3).

Peningkatan kadar asam urat dalam darah diatas batas normal (hiperurisemia) dapat terjadi pada kondisi patologis, dimana pada wanita di atas 6 mg/dL dan pada pria di atas 7 mg/dL. Nilai asam urat normal pada wanita adalah 2,4-6,0 mg/dL dan pria 3,0-7,0 mg/dL^(4,5). Menurut hasil Riskesdas 2012 prevalensi penyakit sendi Indonesia adalah 11,9%⁽⁶⁾.

Studi epidemiologi menunjukkan bahwa pasien dengan hiperurisemia sering memiliki kelainan sindrom metabolik diantaranya resistensi insulin, obesitas dan hiperlipidemia⁽⁷⁾. Adanya sindrom metabolik pada pasien dengan hiperurisemia harus dikontrol komponennya seperti obesitas, tekanan darah tinggi dan lainnya sehingga mengurangi risiko penyakit kardiovaskular⁽⁸⁾. Studi menunjukkan bahwa gout dihubungkan dengan resiko kematian yang tinggi pada semua kasus dari semua penyebab dan penyakit kardiovaskular⁽⁷⁾.

Berbagai usaha dapat dilakukan untuk mengobati penyakit asam urat, diantaranya dengan mengonsumsi obat-obatan. Kelompok obat yang dapat digunakan untuk terapi penyakit gout yaitu obat yang mempengaruhi kadar asam urat (urikostatik) atau obat yang menghentikan proses inflamasi (urikosurik) akut. Obat golongan urikostatik diantaranya allopurinol yang bekerja menghambat kerja enzim xantin oksidase yang mengubah hipoxantin menjadi xantin, dan berikutnya mengubah xantin menjadi asam urat⁽⁹⁾.

Allopurinol didalam tubuh mengalami metabolisme menjadi oksipurinol (alozantin) yang juga bekerja sebagai penghambat enzim xantin oksidase dan mengurangi produksi asam urat tanpa mengganggu biosintesa purin⁽⁹⁾. Manajemen obat untuk menurunkan kadar asam urat harus diperhitungkan dengan tepat, karena dengan pemberian allopurinol dapat menimbulkan efek samping berupa hipersensitivitas allopurinol sindrom (AHS), diantaranya reaksi nyeri kepala, alergi kulit dan lainnya⁽¹⁰⁾.

Obat tradisional sebagai obat alternatif banyak dikembangkan untuk pengobatan berbagai penyakit, sebagai upaya menghindari efek samping yang ditimbulkan oleh obat kimia. Banyak obat alam yang secara empiris telah terbukti aman digunakan dalam

jangka panjang, sehingga perlu banyak studi agar dapat dikembangkan menjadi obat nutrasetikal.

Tanaman jenis kaktus merupakan salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat. Buah naga (*Dragon fruits*) adalah salah satu jenis kaktus yang dikenal di Indonesia⁽⁹⁾. Buah naga merah mempunyai aktifitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan buah naga putih^(11,12), mengandung vitamin C dan likopen yang dapat menurunkan resiko kanker dan penyakit jantung⁽¹³⁾.

Buah naga sudah banyak yang dibudidayakan diantaranya buah naga berdaging buah berwarna putih (*Hylocereus undatus*), berwarna merah (*Hylocereus polyhisus*), berwarna super merah (*Hylocereus costaricensis*) dan buah naga berkulit kuning dengan warna daging buah putih (*Selenycereus megulanthus*)⁽¹⁴⁾. Tumbuhan buah naga daging putih (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) mengandung senyawa kimia yaitu flavonoid dan mineral. Penurunan kadar asam urat dilaporkan oleh Devina dari hasil penelitiannya secara *in-vitro* dengan penambahan ekstrak buah naga 3,5 g/dL atau pada dosis 35 mg/kgBB⁽¹⁵⁾.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol buah naga putih secara *in-vivo* dalam menurunkan kadar asam urat darah pada mencit yang diinduksi kafein secara oral dengan dosis 15,6 mg/kgBB.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah daging buah naga putih segar (*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose) suku Cactaceae, yang diambil dari Taman Buah Mekar Sari Cileungsi Jonggol, Bogor. Buah naga putih diambil saat berumur 50-55 hari setelah muncul bunga dengan warna kulit buah hijau kemerahan. Bahan uji dibuat 3 variasi dosis ekstrak buah naga putih dengan dosis 18,2 mg/

Tabel 1. Perlakuan terhadap kelompok hewan uji (mencit) yang diinduksi dengan kafein 15,6 mg/kgBB dalam larutan Na-CMC 0,5%.

Kelompok	Jumlah mencit	Perlakuan
I	5	Kontrol negatif
II	5	Kontrol positif, Allopurinol 10,4 mg/kgBB
III	5	Ekstrak uji 18,2 mg/kgBB
IV	5	Ekstrak uji 36,4 mg/kgBB
V	5	Ekstrak uji 72,8 mg/kgBB

kgBB; 36,4 mg/kgBB; dan 72,8 mg/kgBB mencit. Data pembagian kelompok dan perlakuan dapat dilihat pada Tabel 1.

Kontrol positif allopurinol diberikan 10,4 mg/kgBB mencit. Dosis ini didapatkan berdasarkan dosis efektif oral pada manusia yang dikonversikan ke dosis mencit. Pemberian bahan uji dilakukan satu kali sehari peroral dengan menggunakan jarum gavage lambung.

Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) galur Wistar umur 4 minggu dengan berat rata-rata 25 gram diperoleh dari Institut Pertanian Bogor.

METODE. Pembuatan Ekstrak. Ekstrak buah naga dibuat dengan cara maserasi. Daging buah naga putih segar sebanyak 500 g diblender, kemudian dikeringkan dengan *freeze dryer (Millrock)* selama 6 hari. Serbuk kering buah naga ditambahkan pelarut etanol 70%, dimasukkan ke dalam wadah, ditutup dan dibiarkan selama dua hari terlindung dari cahaya sambil diaduk, dan setelah itu disaring. Ampasnya dimaserasi lagi dengan etanol 70% hingga diperoleh maserat yang jernih. Semua maserat etanol diuapkan dengan menggunakan alat penguap *rotary evaporator (Buchi)* pada temperatur ± 40 °C sampai diperoleh ekstrak etanol kental⁽¹⁶⁾.

Penapisan Fitokimia. Penapisan fitokimia dilakukan terhadap golongan alkaloid, flavonoid, tannin, kuinon, steroid/triterpenoid berdasarkan *Materia Medika Indonesia (1995)*⁽¹⁶⁾ dan *Harborne (1998)*⁽¹⁷⁾.

Pemeriksaan Bebas Etanol dalam Ekstrak Buah Naga Putih. Untuk pemeriksaan bebas etanol dalam ekstrak buah naga putih dilakukan dengan cara ekstrak sebanyak 1 gram ditambahkan NaOH 1 N sebanyak 1 mL perlahan-lahan setelah itu didiamkan selama 3 menit, kemudian tambahkan secara perlahan iodium 0,1 N sebanyak 2 mL⁽¹⁸⁾.

Kadar Air. Ekstrak etanol 70% buah naga putih sejumlah lebih kurang 5 g ditimbang seksama dalam botol timbang tertutup dan dikeringkan selama 30 menit pada suhu 105 °C. Ekstrak dimasukkan kedalam botol timbang tersebut, kemudian ekstrak diratakan dalam botol timbang dengan menggoyangkan botol sehingga ekstrak menjadi rata, kemudian dimasukkan kedalam oven dengan keadaan dibuka tutupnya. Ekstrak etanol buah naga putih dipanaskan pada suhu 105°C selama 5 jam. Pada saat oven dibuka, botol segera ditutup dan dibiarkan dalam desikator sampai suhunya mencapai suhu ruangan sebelum ditimbang⁽¹⁹⁾.

Uji Efektivitas. Uji efektivitas ekstrak etanol 70% buah naga putih (*Hylocereus undatus (Haw.) Britton & Rose*) dilakukan secara *in-vivo* terhadap penurunan

kadar asam urat pada darah mencit (*Mus musculus*) dimana kadar asam urat mencit dinaikkan dengan menggunakan kafein yang merupakan komponen alkaloid derivat xantin yang mengandung gugus metil yang akan dioksidasi membentuk asam urat sehingga dapat meningkatkan kadar asam urat dalam darah⁽²⁰⁾. Sebagai kontrol negatif digunakan Na-CMC karena tidak mempunyai pengaruh terhadap hewan uji dan tidak memiliki efek terhadap asam urat. Selanjutnya pemeriksaan kadar asam urat pada darah mencit dilakukan menggunakan metode tes strip asam urat.

Hewan uji sebanyak 25 ekor mencit jantan galur Wistar diaklimatisasi dalam ruang percobaan selama ± 2 minggu diberi pakan pellet dan air minum sesuai kebutuhan. Hewan uji dibagi menjadi 5 kelompok secara acak, masing-masing 5 ekor mencit yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif dan tiga variasi dosis ekstrak buah naga, dapat dilihat pada Tabel 1. Kelompok kontrol positif dan negatif digunakan untuk membandingkan nilai signifikansi dari setiap kelompok hewan uji. Kontrol positif diberikan allopurinol yang telah terbukti khasiatnya dapat menurunkan kadar asam urat darah.

Pada uji efektivitas, sebelum perlakuan mencit diukur kadar asam urat darahnya untuk meyakinkan mencit yang digunakan dalam keadaan normal dan tidak hiperurisemia. Selanjutnya, pada hari pertama, mencit diinduksi dengan kafein 15,6 mg/kgBB selama enam hari berturut-turut sebelum perlakuan. Kadar asam urat darah mencit dikontrol dan diukur pada hari ke-6 untuk meyakinkan bahwa kafein dengan dosis tersebut menyebabkan kondisi mencit hiperurisemia, kemudian semua mencit diistirahatkan di dalam kandang masing-masing dan diberi makan dan minum. Pada hari ke-7 dilakukan pemberian perlakuan berdasarkan kelompoknya masing-masing setiap hari selama 9 hari percobaan. Pengukuran kadar asam urat darah dilakukan pada hari ke 0, ke 6 (sebelum perlakuan), hari ke-9, ke-12 dan ke-15 (setelah pemberian sampel uji). Pemberian sampel uji dilakukan satu kali per hari secara oral dengan menggunakan jarum *gavage* lambung.

Prosedur Pengambilan Darah. Sebelum pengambilan darah, mencit dimasukkan kedalam kandang kecil sedemikian rupa hingga tidak dapat bergerak. Kemudian ekor mencit dibersihkan dengan alkohol 70%. Selanjutnya ujung ekor mencit digunting kurang lebih 0,2 cm dari ujung ekor, dilakukan pemijatan perlahan terhadap ekor agar darah keluar.

Pengukuran Kadar Asam Urat Darah. Pengukuran kadar asam urat darah dilakukan dengan menggunakan alat tes strip asam urat. Alat tes strip *Multicheck Unesco* dirancang untuk pengukuran kuantitatif dari tingkat asam urat dalam darah.

Pengukuran ini berdasarkan penentuan perubahan arus yang disebabkan oleh reaksi asam urat dengan reagen pada elektroda dari strip tersebut. Ketika sampel darah menyentuh area target sampel strip, darah secara otomatis ditarik ke dalam zona reaksi dari strip. Hasil tes akan tampil pada layar setelah 20 detik.

Perhitungan presentase penurunan kadar asam urat darah:

$$\text{Penurunan} = \frac{\text{Kadar pada saat Hiperurisemia} - \text{Kadar sampel (Hari)}}{\text{Kadar pada saat Hiperurisemia} - \text{Kadar Normal}} \times 100\%$$

Uji Statistik Kadar Asam Urat Darah. Metode statistika yang digunakan adalah uji ANOVA satu arah terhadap kadar asam urat darah. Sebelum dilakukan uji ANOVA terlebih dahulu dilakukan uji normalitas (*One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*) dan uji Homogenitas. Pengujian tersebut merupakan hal yang lazim dilakukan sebelum sebuah metode statistika diterapkan. Berdasarkan uji normalitas (*One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test*) menunjukkan kadar asam urat darah sebelum dan sesudah percobaan terdistribusi normal ($p \geq 0,05$) dan pada uji homogenitas menunjukkan bervariasi homogen ($p \geq 0,05$) sehingga dapat dilanjutkan dengan analisis uji ANOVA. Pada uji ANOVA satu arah bila ($p \leq 0,05$) maka harus dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan metode LSD.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil maserasi. Hasil maserasi serbuk kering buah naga diperoleh ekstrak sebanyak 21,3 g sehingga diperoleh rendemen ekstrak sebesar 14,2%. Kadar air ekstrak etanol didapatkan 1,83%. Penapisan fitokimia mendapatkan bahwa ekstrak buah naga putih mengandung flavonoid tetapi tidak mengandung alkaloid, saponin, tannin dan steroid/

triterpenoid. Ekstrak etanol buah naga putih telah memenuhi persyaratan organoleptik Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia⁽²¹⁾.

Hasil pemeriksaan bebas etanol dalam ekstrak buah naga putih ditunjukkan dengan tidak adanya bau iodium dan tidak adanya endapan kuning di dasar tabung sehingga menunjukkan tidak adanya lagi etanol dalam ekstrak⁽²¹⁾. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak sudah tidak mengandung etanol lagi.

Hasil Uji Efektivitas. Hasil uji pada hari pertama percobaan, sebelum diinduksi dengan kafein, kadar asam urat darah menciit seluruh kelompok menunjukkan hasil yang normal antara 2,26 mg/dL – 2,4mg/dL. Pada hari ke 6 setelah diinduksi kafein kadar asam urat meningkat pada kondisi hiperurisemia yaitu antara 6,24 – 6,98 mg/dL (Tabel 2).

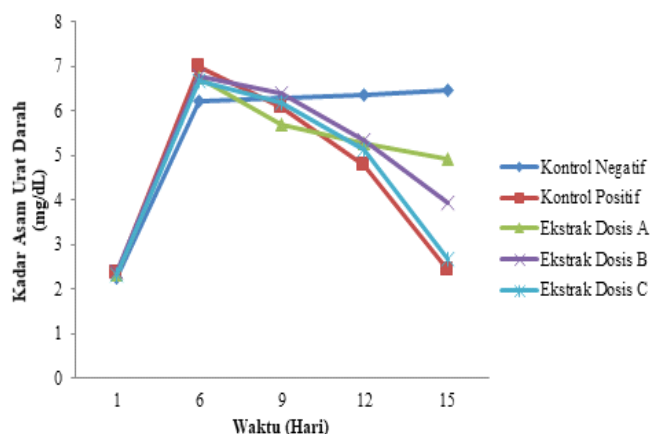
Mulai pada hari ke-7 dilakukan pemberian ekstrak buah naga berdasarkan kelompoknya masing-masing setiap hari, selanjutnya pengukuran kadar asam urat darah dilakukan pada hari ke-9, ke-12 dan ke-15. Pada hari ke-9 sudah mulai terjadi penurunan kadar asam urat darah pada semua kelompok kecuali kontrol negatif dan setelah dilakukan uji BNT hari ke-9 kadar asam urat seluruh kelompok hewan uji ekstrak dan kontrol positif menunjukkan berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$) dengan kontrol negatif.

Pada hari ke-12 kadar asam urat darah kelompok hewan uji ekstrak dan kontrol positif menunjukkan berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$) dengan kontrol negatif. Seluruh kelompok hewan uji yang diberi ekstrak buah naga menunjukkan perbedaannya tidak bermakna ($p \geq 0,05$) dengan kontrol positif yang diberi allopurinol sehingga dapat dinyatakan walaupun seluruh kelompok hewan uji ekstrak dan kontrol pembandingan kadar asam urat darahnya belum normal tetapi telah menunjukkan adanya penurunan kadar

Tabel 2. Rata-rata kadar asam urat darah menciit (mg/dL) yang diberi perlakuan kontrol negatif, kontrol positif dan ekstrak buah naga.

Perlakuan	Waktu (Hari) ke	Kadar asam urat darah menciit (mg/dL)				
		Kontrol negatif	Kontrol positif, (allopurinol 10,4 mg/kgBB)	Ekstrak buah naga, dosis 18,2 mg/kgBB	Ekstrak buah naga, dosis 36,4 mg/kgBB	Ekstrak buah naga, dosis 72,8 mg/kgBB
Awal	1	2,26 ± 0,13	2,36 ± 0,30	2,34 ± 0,20	2,40 ± 0,21	2,34 ± 0,18
Induksi Kafein	6	6,24 ± 0,36	6,98 ± 0,86	6,76 ± 0,95	6,80 ± 0,40	6,68 ± 0,98
	9	6,28 ± 0,32	6,08 ± 0,52*	5,68 ± 0,56*	6,40 ± 0,97*	6,20 ± 0,94*
Diberi perlakuan	12	6,38 ± 0,41	4,80 ± 0,61*	5,26 ± 0,45*	5,36 ± 0,76*	5,12 ± 0,99*
	15	6,48 ± 0,36	2,42 ± 0,08*	4,94 ± 0,42*	3,94 ± 0,56*	2,68 ± 0,19*

Keterangan: * = hari ke 9, ke 12 dan ke 15, kontrol negatif berbeda nyata dengan semua dosis perlakuan ($p \leq 0,05$).



Gambar 1. Kurva kadar asam urat darah (mg/dL) rata-rata hewan uji mencit selama percobaan, yang diinduksi dengan kafein 15,6 mg/kgBB pada hari pertama, dan pada hari ke 7 sampai hari ke 15 diberi perlakuan dengan dosis A 18,2 mg/kgBB, dosis B 36,4 mg/kgBB, dosis C 72,8 mg/kgBB pada sampel uji, kontrol positif diberi allopurinol 10,4 mg/kgBB, dan kontrol negatif tanpa penambahan apapun.

asam urat dibandingkan dengan kontrol negatif dan kerja semua ekstrak uji sebanding dengan kontrol positif (Gambar 1).

Data efektivitas penurunan kadar asam urat rata-rata pada hari ke-15 yang diperoleh dari setiap kelompok terlihat bahwa allopurinol (kontrol positif) memiliki kemampuan menurunkan kadar asam urat darah yang paling besar yaitu 98,72%. Efektivitas kedua yang dimiliki oleh kelompok ekstrak uji dosis 72,8 mg/kgBB yaitu 92,16%, dosis 36,4 mg/kgBB yaitu 65,0% dan kelompok dosis 18,2 mg/kgBB yaitu sebesar 41,17% (Tabel 3, Gambar 1).

Tabel 3. Presentase penurunan kadar asam urat darah rata-rata kelompok kontrol pembanding dan ekstrak uji pada hari ke 9, ke 12 dan ke 15 setelah perlakuan.

Kelompok perlakuan	Penurunan kadar asam urat (%) pada hari ke:		
	9	12	15
Kontrol Positif	19,48	46,98	98,72
Dosis 18,2 mg/kgBB	9,04	24,43	41,17
Dosis 36,4 mg/kgBB	9,09	32,72	65,00
Dosis 72,8 mg/kgBB	11,05	35,94	92,16

Pada hari ke-15 kadar asam urat seluruh kelompok ekstrak uji dan kontrol positif menunjukkan berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$) dengan kontrol negatif; ekstrak uji dosis 72,8 mg/kgBB menunjukkan tidak berbeda nyata ($p \geq 0,05$) dengan kontrol positif yang berarti efek yang dihasilkan oleh ekstrak uji adalah

sama dengan kontrol positif yang diberi allopurinol.

Hasil analisa statistik yang membandingkan antara masing-masing dosis ekstrak etanol buah naga putih menunjukkan perbedaan yang nyata. Itu artinya masing-masing dosis mempunyai kemampuan menurunkan kadar asam urat darah yang berbeda dimana semakin tinggi dosisnya, daya penurunannya juga semakin meningkat.

Ekstrak etanol buah naga putih dapat menurunkan kadar asam urat darah sesuai dengan penelitian karena adanya kandungan flavonoid dalam buah naga putih tersebut. Hasil penelitian ini memperkuat hasil yang telah pernah dilakukan oleh Devina, dengan penambahan ekstrak buah naga pada sejumlah tertentu asam urat secara in-vitro dapat menurunkan kadar asam urat. Flavonoid merupakan antioksidan yang berkerja dengan menghambat kerja enzim xanthin oksidase sehingga produksi asam uratpun dapat berkurang⁽²⁾.

Belum banyak publikasi penelitian tentang efek dari buah naga terhadap kondisi hiperurisemia. Hasil yang sudah banyak diteliti dan dilakukan uji metaanalisis adalah efek dari buah naga terhadap kecenderungan penurunan kadar glukosa darah pada prediabetes, sebagai upaya preventif⁽¹⁹⁾. Kandungan kimia dari buah naga yang kaya antioksidan alam, termasuk betacyanin, flavonoid, asam fenolik, vitamin C. dengan uji klinik terbukti memiliki efek anti-diabetes dengan regenerasi sel pankreas- β dan melemahkan *fibroblast growth factor-21* (FGF-21) resistensi^(22,23).

SIMPULAN

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% buah naga putih dosis 72,8 mg/kgBB

dapat menurunkan kadar asam urat darah pada mencit di hari ke 15 dengan presentase penurunan sebesar 92,16%. Angka tersebut berbeda nyata dibandingkan dosis 36,4 mg/kgBB dan 18,2 mg/kgBB, tetapi tidak berbeda dengan kontrol positif (allopurinol). Jadi ekstrak dosis 72,8 mg/kgBB sama efeknya terhadap mencit dengan pemberian allopurinol 10,4 mg/kgBB. Hasil penelitian ini memperlihatkan adanya potensi dari ekstrak etanol 70% buah naga putih (*Hylocereus undatus*) untuk menurunkan kadar asam urat darah pada kondisi hiperuresemia. Penelitian lebih lanjut dapat disarankan untuk isolasi, identifikasi komponen bioaktif buah naga putih yang berperan dalam menurunkan kadar asam urat didalam darah serta uji klinik terhadap pasien hiperurisemia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada para staf laboratorium kimia Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi ISTN, atas bantuannya dalam pelaksanaan kegiatan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saag KG, Choi H. Epidemiology, risk factors and lifestyle modifications for gout. *Arthrit Res & Ther.* 2006.8(1):1-7: diambil dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820041> diakses 26 Agustus 2018.
2. Richette P, Bardin T. Gout. *The Lancet.* 2010. 375:318–28: diambil dari doi:10.1016/s0140-6736(09)60883-7, diakses 26 Agustus, 2018
3. Dalimartha S. Resep tumbuhan obat untuk asam urat. Jakarta: Penebar Swadaya; 2011. p. 5, 7, 12, 58.
4. Neogi T, Jansen TLTA, Dalbeth N, Fransen J, Schumacher HR, Berendsen D, et al. Gout classification criteria: An american college of rheumatology/ european league against rheumatism collaborative initiative. *J Arthritis and Rheumat.* 2015.67(10): 2557-68.
5. Shaefer MS and Pierre AM. *Clinical pharmacy and therapeutics.* 5th edition. Maryland: William & Wilkins; 1992.507-18.
6. Kementerian Kesehatan RI. Hasil riset kesehatan dasar tahun 2013: diambil dari <http://www.depkes.go.id/resources/download/general/HasilRiskasdas2013>. diakses 26 Agustus 2018.
7. Kuo CF, See LC, Luo SF, Ko YS, Lin YS, Hwang JS, et al. Concise report gout: an independent risk factor for all-cause and cardiovascular mortality. *Rheumatology.* 2010.49:141–6.
8. Puig JG, Martínez MA. Hyperuricemia, gout and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Rheumatology.* 2008.20(2):187–91.
9. Astarti E. Pengaruh pemberian decocta daun dewa (*Gynura Pseudochina* (L) Dc) terhadap penurunan kadar asam urat serum pada mencit putih jantan galur *Balb-C* hiperurisemia [skripsi]. Surakarta: Univ Muhammadiyah Surakarta; 2008.
10. Dalbeth N, Bardin T, Doherty M, Liote F, Richette P, Saag KG, et al. Discordant American college of physicians and international rheumatology guidelines for gout management: Consensus statement of the gout, hyperuricemia and crystal associated disease network (G-CAN). November 2016: diambil dari <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2017.126>. diakses 26 Agustus 2018.
11. Chemah TC, Aminah A, Noriham A, Wan Aida WM. Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. *Intern Food Res J.* 2010.17:1003–10.
12. Choo WS, Yong WK. Antioxidant properties of two species of *Hylocereus* fruits. *Adv in Appl Sci Res.* 2011.2(3):418-25.
13. Jaafar RA, Rahman ARB, Mahmud NZC, Vasudevan R. Proximate analysis of dragon fruit (*Hylocereus polyhizus*). *American J Appl Sci.* 2009.6:1340–46.
14. Swastika S, dkk. Hama dan penyakit buah naga. 201: diambil dari URL: <http://riau.litbang.pertanian.go.id/ind/images/stories/PDF/naga.pdf>. diakses tanggal 5 April 2016.
15. Devina IA, dkk. Mineral dalam buah naga (*Hylocereus Undatus* (Haw.) Britt. & Rose) sebagai penurun asam urat secara in-vitro. *J Ilmiah Kesehatan.* 2013.5:26-30.
16. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Materia medika Indonesia.* Jilid VI. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
17. Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis.* 3rd ed. Springer Netherlands. 1998.
18. BPOM RI. *Monografi ekstrak tumbuhan obat Indonesia.* 2004.1:15-21.
19. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi IV.* Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan; 1995.p. 1033-36.
20. Kusuma AM, Wahyuningrum R, Widyati T. Aktivitas antihiperurisemia ekstrak etanol herba pegagan pada mencit jantan dengan induksi kafein. *Pharmacy.* 2014. 11(01): 62-74.
21. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia Edisi III.* Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1979.
22. Poolsup N, Suksomboon N, Paw NJ. Effect of dragon fruit on glycemic control in prediabetes and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* [serial online]. September 2017.12(9): e0184577: diambil dari <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184577> diakses 9 Agustus 2018.
23. Song H, Chu Q, Xu D, Xu Y, Zheng X. Purified betacyanins from *Hylocereus undatus* peel ameliorate obesity and insulin resistance in high-fat-diet-fed mice. *J Agric Food Chem.* 2015.64(1):236-44.

The Role of Medicine Pricing Policy for Improving the Affordability of Medicines

(Peranan Kebijakan Obat dalam Memperbaiki Keterjangkauan Obat)

YUSI ANGGRIANI

Faculty of Pharmacy, University of Pancasila, Jakarta 12640.

Submitted 7 May 2018, Accepted 10 September 2018

Abstract: Imperfect market characteristics was occurred on medicines and affects to the medicine price. It is important to regulate medicine prices. The objective of this review was to describe various medicine pricing policy interventions. Published articles regarding medicine price policies were collected and reviewed. The review results showed that medicine prices can be regulated in the medicine supply chain by the industry, importers, distributors and health facilities such as pharmacies, hospitals and medicine sellers. Developed and high income countries generally regulate the prices of medicines and are part of a health insurance system. Medicine pricing regulation in developing countries and Lower Middle Income Countries (LMIC) is not well established. The regulation of mark-ups in distribution channels is the most common strategy used by LMIC. Small country with only a few pharmaceutical facilities has a weak bargaining position. The application of cost-plus pricing is quite effective in a small country. In developing countries with a large market segment and adequate pharmaceutical industry facilities the price competition method is an effective strategy option to get lower prices. In conclusion, the application of medicine pricing policy is dynamic. The medicine pricing system can be changed or combined with other methods, depending on the evaluation of the policy implementation.

Key words: Medicine, price, policy.

Abstrak: Obat adalah produk farmasi yang memiliki karakteristik pasar yang tidak sempurna. Hal ini mempengaruhi keterjangkauan masyarakat, dan oleh karena itu perlu bagi pemerintah untuk mengatur harga obat. Harga obat dapat diatur dalam rantai pasokan obat oleh industri, importir, distributor dan fasilitas kesehatan seperti apotek, rumah sakit dan penjual obat-obatan. Negara-negara maju dan berpenghasilan tinggi umumnya mengatur harga obat dan merupakan bagian dari sistem asuransi kesehatan. Berbeda dengan situasi di negara maju, regulasi harga obat di negara berkembang dan *Lower Middle Income Countries* (LMIC) belum berkembang baik. Peraturan *mark-up* di rantai distribusi adalah strategi yang paling umum digunakan oleh LMIC. Negara kecil dengan hanya beberapa fasilitas farmasi memiliki posisi tawar yang lemah, umumnya pemerintah tidak dapat menetapkan harga. Penerapan harga biaya-plus cukup efektif jika diterapkan di negara kecil. Di negara berkembang dengan segmen pasar yang besar dan fasilitas industri farmasi yang memadai, metode kompetisi harga merupakan pilihan strategi yang efektif untuk mendapatkan harga yang lebih rendah. Dalam praktiknya, penerapan kebijakan harga obat bersifat dinamis. Sistem penetapan harga obat di suatu negara dapat diubah atau dikombinasikan dengan metode lain jika evaluasi tidak memberikan hasil yang optimal atau menghasilkan dampak yang tidak diinginkan.

Kata kunci: Obat, harga, kebijakan.

* Correspondence Author, Hp. 08122954935
Email: yusi1777@yahoo.com/yusi1777@univpancasila.ac.id

INTRODUCTION

MEDICINE is a pharmaceutical product that has imperfect market characteristics. Consumers or patients cannot directly determine their treatment options, since treatment was determined by the physician. In addition, the patient often does not obtain complete information regarding their treatment options and price. Because of these characteristics, medicine prices could be more expensive than they should be. This affects affordability to the community, and therefore it is necessary for the government to regulate medicine prices⁽¹⁾. Medicine prices have become an important topic in health care, because price affects the accessibility to medicine. Not only in developing countries, but also in developed countries such as the US, medicine price has become a critical discussion in parliament⁽²⁾. Therefore, many studies focus on medicine price as a research topic with an overview of various perspectives.

The main objective of the paper is to describes of medicine pricing policy intervention on the price, order to improve access to affordable medicines.

MATERIAL AND METHOD

Published articles regarding medicine price policies were collected and reviewed to describe the type of policy that implemented in other countries.

RESULTS AND DISCUSSION

Medicine Pricing Policy. Medicine pricing policy is a regulation to control medicine price to be better access to medicines⁽³⁾. Determining a “fair” price could be achieved by regulating medicine prices, but this is the most difficult part of the development of a medicine pricing policy. Medicine prices can be regulated in the medicine supply chain by the industry, importers, distributors and health facilities such as pharmacies, hospitals and medicine sellers. In practice, the government may use a combination of regulations in each chain. For example, the government sets the price at the pharmaceutical industry level and the maximum mark-up that can be taken by wholesalers or health care facilities^(1,4).

Price Regulation in the Production Stage. Price setting in this stage is conducted in the pharmaceutical industry or at the importer level. According to Rietveld and Haaijer-Ruskamp (2002), at this level there are five methods for setting medicine prices⁽⁴⁾, as follows:

a. Cost-plus

Pricing is set by calculating the cost of production, cost of raw materials, R&D and margin for

each product. Policymakers negotiate with the pharmaceutical industry to establish the margin for each product. This method complicates obtaining production cost information. The pharmaceutical industry is often not transparent and can manipulate the information provided⁽¹⁾. India has implemented a cost-plus pricing method for essential medicines whereby it cannot exceed twice the cost of their production⁽⁵⁾.

b. Profit ceilings/Profit-based pricing

Here, the government sets a maximum return on capital (ROC) and return on sales (ROS) to the pharmaceutical industry that sells their products to the government. The system implemented in the UK is termed the Pharmaceutical Price Regulation Scheme (PPRS)⁽⁶⁾. ROC or ROS are set individually by the pharmaceutical industry and reviewed every year. In 2009, the ROC was set at 21% and ROS at 6%⁽⁷⁾.

According to Mossialos (2006), the PPRS is an unique in its implementation, as the buyer’s power is very large. In this case, there is a unique relationship between the government and pharmaceutical industry, since the disclosure of information by the pharmaceutical industry might not be applied universally. Similar to the cost-plus pricing method, there is also the disadvantage of the manipulation of information by the pharmaceutical industry⁽¹⁾.

c. Price comparison

Pricing is set by comparing medicine prices within a country or with other countries⁽¹⁾. Internal/national reference pricing sets the price of one medicine for a group of medicines with the same therapeutic classes or that have the same function in a single country. Reference prices can be based on the average price or lowest price in the group. This method is commonly used to establish the reimbursement price of a medicine⁽⁸⁻¹⁰⁾. The pharmaceutical industry can set the price according to what they want, while the government or insurance provider only pays the reference price and the consumer must pay the difference⁽¹¹⁾. The implementation of national reference pricing in Norway, Germany, Sweden, South Africa and Canada has reduced the price of medicines⁽¹²⁻¹⁵⁾. New Zealand has also implemented internal reference pricing^(8,16).

Price setting by comparing the prices of the same medicine in other countries is called international/external reference pricing. In 2010, external reference pricing was widely used in 23 countries in Europe, except Denmark, Germany, Sweden and the UK. Reference baskets (other countries used for comparison) were used by the state in fewer than 10 countries from the same economic level. In general, EU countries use the average price of the reference country. Most

countries in Europe make external reference pricing the primary criteria for price setting, except in Belgium and Italy where it is used as supporting information^(17, 18). In 2012, the UK additionally performed an international price comparison in setting the ceiling profit of the PPRS⁽⁷⁾. Many studies show the reference price to be an effective method of reducing the price of generic medicines, but the reference pricing system is ineffective for medicines that are still under patent⁽¹⁹⁾.

d. Price negotiation

Pricing is set by negotiating medicine prices between the buyer (e.g., hospitals, health insurance or government) and the industry. It is usually implemented on the purchase of large volume or value. Therefore, buyers have a great bargaining position. Negotiations can be carried out centrally or at a local level⁽⁴⁾. This strategy has been used in Austria, France, Spain and Sweden⁽²⁰⁾.

e. Pharmacoeconomic evaluation

Price setting is carried out by evaluating the cost-effectiveness of a medicine. In general, pharmacoeconomic evaluation is used to determine the price of medicines in the insurance system that requires more consideration of the value for money. In principle, pharmacoeconomic evaluation can calculate the value of the benefits gained by the new medicine compared with established medicine⁽²¹⁾. The value then would be appraised for cost-effectiveness, usually by the use of a threshold (public willingness to pay for a gained in health benefit)⁽²²⁾. The value would increase with lower price or improved benefit. As such, the evaluation is commonly used to bargain for lower price in order to justify its value for reimbursement.

This method is applied in Australia and the Ontario province in Canada⁽²³⁾. EU countries such as Finland, the Netherlands⁽²⁴⁾, Sweden⁽²⁵⁾ and the UK (National Institute for Health and Clinical Excellence/NICE) had conducted economic evaluations to determine the medicines that provide "value of money". In addition to the UK and Canada, this system has also been implemented in France, Germany, Italy, Spain and Switzerland. There is a variation in the application of EU economic evaluation; this system is generally used for setting medicine prices for reimbursement. Furthermore, Finland, France, Norway and Sweden use economic evaluation guidelines for negotiations⁽²⁶⁾. In Asia, South Korea is the first Asian Countries which is implemented the economic evaluation to determine the price for reimbursement⁽²⁷⁾.

Regulation of Medicine Prices at the Distribution Level. Rietveld and Haaijer-Ruskamp (2002) classify price settings at the distribution level⁽⁴⁾:

1. Setting the price at the wholesaler or distributor level. Regulation is implemented by limiting the

distribution margin distributor or wholesaler. In addition to applying the external or internal price comparison system, 21 of the 27 countries in Europe also regulate wholesaler mark-ups⁽²⁸⁾. Other countries that regulate wholesaler mark-ups are Ecuador, Honduras, Panama and Paraguay⁽²⁹⁾.

2. Price setting at the pharmacy level

Price setting in pharmacies can be carried out from two perspectives: medicine/product-oriented and patient/services-oriented. There are three methods for setting prices based on the orientation of the product. First, in the Fixed Margin (Cost + fixed percentage) method, the amount of mark-up is fixed, e.g., the maximum mark-up that could be taken is 25%. Second, in the Mark-up Negotiation, the mark-up is set by negotiation between the distributor and buyer (e.g., health insurance, government or hospital). Third, the mark-up may be Digressive/Cost + declining percentage, where the mark-up is determined based on the proportion of the price. If the medicine price were high, then the mark-up allowed would be low, and vice versa.

Medicine prices based on services (patient-oriented) are set by co-payment and fixed fees per prescription. Co-payment methods are applicable in South Korea and are used to reduce medicine expenditure per patient and the per-unit price of medicines⁽³⁰⁾. The application of co-payment in Medicare Beneficiaries lowers the expenditure of medicines to 14% due to the increased use of generic medicines⁽³¹⁾. In addition to conducting pharmacoeconomic evaluations when pharmaceutical companies propose their medicines, the Pharmaceutical Benefits Scheme in Australia also regulates the price of medicines to patients using a co-payment system. The patient must pay the difference in price if he or she wants a medicine that exceeds the cost of the co-payment⁽³²⁾.

In Ireland, the pharmacist receives a fixed fee per prescription for patient services to members of general medical services and drug payment schemes. There are differences in determining the price of the medicine under both schemes. Under general medical services, medicine prices are in accordance with the prices set by the government and pharmacists cannot apply a profit mark-up. Under drug payment schemes, pharmacies can add a 50% mark-up from the medicine prices set by the government. For patients not under any schemes, medicine pricing is fully depends to the pharmacy⁽³³⁾.

Impact of the Implementation of Medicine Pricing Policies in the Pharmaceutical Industry. Medicine prices can be reduced by implementing a medicine pricing policy. However, such a policy may also provide unintended impacts. Along with

a decrease in medicine prices, the profit of the pharmaceutical industry will reduce⁽³⁴⁾, which can decrease a company's spending on innovation research^(35, 36).

The impact of medicine pricing policy is influenced by the size of the regulated market and the length of the policy applied. If the medicine pricing policy was applied to the previously non-regulated countries, then it would generate a big impact of revenue reduction on the pharmaceutical industry. In addition, the longer the policy is applied, the more the pharmaceutical industry's revenues will decrease. The decline in revenue to 16.8% occurred with the application of medicine pricing policies with direct price control methods, while the method of budget control and economic evaluation made about 6% lower revenue.

The impact of reduction in revenues was not significant on the application of medicine pricing policies using profit controls and reference pricing⁽³⁴⁾. For example, over a 19-year period (1986-2004) there was a decline in R&D spending in both countries that regulated medicine prices as in the EU and in countries that applied the free pricing system, such as the United States. However, the decline in R&D spending was greater in countries that implemented the regulation of medicine prices. In 1986, R&D spending in the EU was more than in the United States by 24%, while in 2004, R&D spending in the United States was 15% higher than in the EU countries⁽³⁶⁾. In New Zealand, the application of reference pricing can affect the patient's clinical outcomes. The determination of simvastatin as a medicine reference has failed to achieve success the outcome therapy. In patients previously using fluvastatin who then switched to simvastatin, an increase in total cholesterol, LDL cholesterol and triglyceride levels occurred⁽³⁷⁾.

Research on the Price of Medicines. Before 1990, studies of medicine prices were very limited and the methods used were diverse, making it difficult to compare the results of studies⁽³⁸⁾. In 1999, Health Action International (HAI) began conducting research on medicine prices in developing countries and in OECD nations and showed that the prices of LPG medicines in developing countries are more expensive than those in OECD countries⁽³⁹⁾. After researching the price of medicines in 1999, in 2001 the WHO and HAI started developing a standard method for measuring the price, availability and affordability of medicines. A pilot test was conducted in nine countries in 2001–2002. The first edition of the manual was launched in 2003⁽⁴⁰⁾.

Currently, the manual used is the second edition launched by WHO and HAI in 2008. The second edition manual contains methods for determining

price components and additional guidelines for making policy choices. Guidelines for the survey include facility, sector and medicine type. In addition, standardised data collection forms and worksheets are available for data analysis. All aspects are described in detail⁽⁴¹⁾. Until 2011, these methods were used for 53 surveys in 43 countries⁽⁴²⁾. Systematic and standardised methods allow us to determine the position of medicine prices in one country compared with others. The price of medicines is influenced by many factors, such as delivery of medicines, types of facilities that establish the medicine, route of distribution and patent status⁽⁴³⁾. Medicine prices are grouped into two categories: patient retail price and procurement price.

a. Patient Retail Prices

Patient retail price is the price that must be paid by the patient to receive the medicine. The findings consistently show that the patient retail price in the private sector is higher than that in the public sector^(42, 44-47). However, some countries show the opposite result; in Vietnam, the patient retail price (either LPG or IB) in the public sector is more expensive than that in the private sector⁽⁴⁸⁾. Further, in Tajikistan and three provinces in China (Hubei, Shandong and Shanghai), the prices of LPG medicine in the public sector are more expensive than those in the private sector⁽⁴⁹⁻⁵²⁾.

Variations in prices are also influenced by the types the medicines. Generally, the price of IB medicine is more expensive than that of LPG. A survey in Malaysia showed that in the private sector and other sectors, IB medicine prices are more expensive than LPG medicines. In addition, IB and LPG medicine prices are higher than the IRP⁽⁴⁶⁾. In the private sector in Thailand, IB medicine prices in the private sector are almost three times more expensive than LPG prices. All maximum retail prices (MRPs) of LPG and IB medicines are higher than the IRP. Consistent with other survey findings, the prices of median price ratio (MPR) medicines in the private sector are higher than those in the public sector. However, an interesting finding in Thailand is that the price difference of patients with procurement prices in the public sector is greater than the private sector, 32% and 19.96% respectively. Meaning that the public sector benefits more than the private sector⁽⁴⁷⁾. A comparison of medicine prices in ASIAN countries is shown in Table 1.

Among high income countries, medicine prices in the US are expensive compared with Japan, Europe (Sweden, Germany, Denmark, Italy, Switzerland, France and Spain), Canada, New Zealand and Singapore. Among European countries, Switzerland has the most expensive medicine prices. Medicine

Table 1. Comparison of MPRs in ASIAN countries.

Country	Public		Private	
	LPG	IB	LPG	IB
Indonesia (53)	2.54	21.8	2.78	22.78
Malaysia (46)	1.09	2.41	6.77	16.35
Thailand (47)	2.55	4.36	3.3	11.6
Philippines (54)	6.4	15.31	5.64	17.28
Vietnam (48)	11.41	46.58	8.3.	44.61
Shandong, China (51)	1.68		0.77	
Hubei, China (49)	1.04	11.25	0.68	19.94
Shanghai, China (50)	2.03	5.64	1.77	8.76
Shaanxi (55)	0.97		1.53	8.36
Tajikistan (52)	2.28		2.08	

prices in Japan are higher than those in European countries⁽⁵⁶⁾.

In 2009, HAI performed a snapshot survey on the price of ciprofloxacin in 66 countries. The cheapest ciprofloxacin LPG prices were found in Myanmar, Sri Lanka, Laos, Zimbabwe and Vietnam. The most expensive LPG medicine was in Switzerland, Austria and Australia. The price of IB ciprofloxacin medicine in Indonesia was ranked 44th of the 66 countries. The price of IB ciprofloxacin in Indonesia are the most expensive in Southeast Asia, while the LPG price of ciprofloxacin was ranked sixth cheapest of the 91 countries surveyed⁽⁵⁷⁾. In 2010, HAI conducted a second snapshot survey to measure insulin prices. The most expensive prices were found in Austria, the US, Costa Rica, Congo, Palestine and Indonesia⁽⁵⁷⁾. However, this snapshot did not provide an overview of the overall medicine price within a country.

b. Public Sector Procurement Prices

In addition to patient retail price, the WHO and HAI methodology determines public sector procurement prices. The efficiency of public sector medicine procurement was reached when the value of the MPRs ≤ 1 ⁽⁴⁵⁾. India and China have a public sector procurement price that was lower than the IRP^(49,58). The results of a recent study in India showed the same results, namely Delhi Assembly Government procurement prices (0.61) and the Central government (0.53)⁽⁵⁹⁾. In Indonesia, the medicine procurement price in the public sector is 1.74 times higher than the IRP⁽⁵³⁾. Efficient public procurement is also carried out by UNRWA to Palestinians. Here, the MPR procurement prices are equal to or less than the procurement prices of international NGOs such as MSH, JPD and IDA⁽⁶⁰⁾. Inefficient public sector procurement prices were shown in Indonesia, Tajikistan, Philippines Vietnam, and Thailand^(47, 48, 52-54).

c. Previous Medicine Pricing Studies In Indonesia

There are few studies of medicine prices and availability in Indonesia. In 2003, Firni and Suryawati conducted research on generic medicine prices in

Bengkulu. The study was performed in one province and the facilities studied were pharmacies. The findings of this study showed that the selling price of LPG medicine to the patient was 2.12 times more expensive than that for the IRP. Branded generic medicine prices were more expensive than LPG prices by 1.45– 7.97 times⁽⁶¹⁾.

In 2004, the availability and affordability of medicines have been examined by WHO and HAI in many countries including Indonesia, which carried out the survey in collaboration with the National Institute of Health Research and Development⁽⁵³⁾. The survey was conducted in six provinces representing four regions in Indonesia: South Sumatra, Jakarta, East Java, South Sulawesi, South Kalimantan and Papua. Similar to the findings in other countries, the availability of LPG medicines in the public sector is lower than that in the private sector (47% vs. 62%, respectively). The private sector often provides IB medicines (26%) compared with the government sector (6.7%). There are no differences in the availability of LPG medicines between provinces.

LPG medicine prices in both the public and private sectors are higher than the IRP. The median MPR of LPG medicines in the public sector is 2.54 times the IRP and 2.78 in the private sector. IB medicine prices are very expensive, 22–23 times higher than the IRP. Some medicines are almost 100 times higher than the IRP. The MPR public sector procurement price is 1.74. This shows that public sector procurement is inefficient⁽⁵³⁾.

The weakness of this study is that the medicines surveyed do not fully represent those used in Indonesia. This survey also used the first edition of the WHO and HAI methods. Forty medicines should have been surveyed: 26 medicines from the HAI and WHO core list and 16 supplementary medicines. Incompatibility in the medicine of choice is likely to occur in the core list of medicines that are not widely used in Indonesia. Medicine selection methods for the survey were revised for the second edition of the

survey manual⁽⁴¹⁾.

In 2006, NIHRD conducted a medicine price survey in four provinces in Indonesia. However, this study did not use the WHO and HAI methodology⁽⁶²⁾. Because medicine prices are not compared with the IRP, the patient retail price and public procurement price were compared with maximum retail price of MoH (MRP of MoH) in 2005. Surveyed facilities include health centres, hospitals, pharmacies, medical offices and distributors. The study showed that the majority of patient retail prices exceed the price set by the government. In general, the public sector

procurement price in all provinces concurred with the MoH procurement price. However, this research did not compare the price position in Indonesia with international prices.

Another finding of this study was the great variation in prices between LPG and branded generic medicines. There were no differences in price and availability between provinces. Interestingly, the region with low government finance did not have low medicine availability. Further, there was no price difference between regions⁽⁶²⁾.

Another study was conducted in Kendari in 2007

Table 2. Comparison of the findings of medicine price studies in Indonesia.

	Firni et al, ⁽⁶¹⁾	Siahaan et al, ⁽⁵³⁾	Siahaan et al, ⁽⁶²⁾	Suryawati et al, ⁽⁶³⁾	Anggriani et al, ⁽⁶⁴⁾
Number of provinces surveyed	One Province	Six provinces	Four Provinces	One province	Four Provinces
Province name	Bengkulu	Sumatera Selatan, Jakarta, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, Kalimantan Selatan, Papua	Jakarta, Pekanbaru, Banjarmasin, Papua	Kendari	Sumatera Selatan, DKI Jakarta, Jogjakarta, Sulawesi Selatan
Sector surveyed	Private	Public, Private	Public, Private	Private	Public, Private
Facilities surveyed	Pharmacies	Pharmacy, public hospital health center, District Health Offices	Pharmacy, public hospital, health center, District Health Offices	Pharmacies	Pharmacy, public hospital health center, District Health Offices
Indicator					
• MPR of LPGs vs. IRP					
• MPR of most sales vs. IRP					
• MPR of IBs vs. IRP	2.12	2.53 (private sector)	<ul style="list-style-type: none"> • Most of patient retailed price exceed than MoH-MRP 	14.53 (private sector)	
• Affordability to hypertension treatment (generic)		6.74 (private sector)	<ul style="list-style-type: none"> • In health centers, Procurement price of 40-50% exceed than MoH procurement price. 		2.0 (private sector)
• Affordability to hypertension treatment (IB)		2.2 days' wages (atenolol LPG)	<ul style="list-style-type: none"> • In district health offices, Procurement price of 30-30% medicines exceed than MoH procurement price 		32.15 (private sector)
• Variation in the price of branded generic compared with LPG	1.45 - 7.97	9 days wages (atenolol IB)		1.04	2.2 days' wages (atenolol LPG)
• Ratio MRP of MoH with IRP				5.4	
• Ratio patient retail price with MRP of MoH					

that evaluated the MoH-MRP and IRP. In addition, it also compared the patient retail price with the MoH-MRP. It found that the MPR of LPG medicine is similar to the IRP. However, the patient retail price in pharmacies was much more expensive than the MoH-MRP (5.4 times higher for LPGs)⁽⁶³⁾.

Unfortunately, both studies in Bengkulu and Kendari did not represent national conditions, as the survey was carried out in one province and with one type of facility. Moreover, these studies did not look into the availability. The study of Siahaan (2006) did not use the WHO and HAI survey. The study of Siahaan (2004) was considered comprehensive research and provides an overview of the availability, price and affordability of medicines in Indonesia. A summary of research into medicine prices in Indonesia is shown in Table 2.

Developed and high income countries generally regulate the prices of medicines and are part of a health insurance system. Most high income countries have implemented a combination of regulation systems for regulating medicine prices⁽¹⁸⁾. The United State is a rare example of a developed country that has implemented a free pricing system; medicine prices in the United State are expensive under this system^(36, 65). A medicine prices policy is generally applied in the developed countries and the methods used are varied⁽⁶⁶⁾.

Direct price control was the most commonly used method in the years 1992-2004. In general, the developed countries use this system, such as Denmark, which applied medicine prices in a cut/freeze system for six years (1994-2000), but since 2001 it has switched to international price comparisons. The Netherlands has used EPR since 1996. In addition to the United Kingdom, the use of budget control systems to regulate medicine prices is also applied in Spain, Hungary, France and Italy. Profit control is rarely used by OECD countries to regulate medicine prices. Spain applied this system in 1995 before using a budget control system and IRP.

The success of a profit control system as implemented in the UK is unknown. In fact, medicine prices in the UK are higher than in most other EU countries. The application of profit control systems in other countries is questionable because it is a monopsony purchaser and inefficient. The application of rate-of-return provision requires investment in the big pharmaceutical industry so as to affect the government's budget and ultimately the public welfare⁽¹⁹⁾.

The application of a reference pricing system is only effective when there is a competitive market. However, if the mechanisms are not transparent or

there is collusion, the reference pricing will not work^(11, 19). External reference pricing is an established method and the most widely used by countries in the EU. This method has proven to be effective in getting rational medicine prices⁽¹⁷⁾. Reference pricing succeeded in lowering the price of medicines but had no significant impact on medicine spending. Furthermore, in Spain, the implementation of reference pricing did not increase the market share of generic medicines. Another weakness of the reference pricing system is the possible increase in medicine prices which were previously cheaper than the reference price⁽⁶⁷⁾.

A tender system can lower medicine prices in the short term, but in the long term could affect the government income. The decline margin of pharmaceutical company can lead to reduce the pharmaceutical investment. Furthermore, income tax will be reduced. In addition, the impact of the tender system for ambulatory care is not yet clear⁽¹⁸⁾. A free pricing system causes the price of originator medicines whose patent has expired to remain high compared with the generic medicines⁽¹⁸⁾.

There was a lot of evidence showing that the application of pharmacoeconomic evaluations played an important role in directing health insurers to negotiate prices and choose medicines which is giving more benefit to the patient. However, to apply pharmacoeconomic evaluation in the health-care system, the issue of willingness to pay needs to be considered to get a reasonable price⁽⁶⁸⁾.

In contrast with the situation in developed countries, medicine pricing regulation in developing countries and LMIC is not well established. The regulation of mark-ups in distribution channels is the most common strategy used by LMIC. However, evidence on the regulation of medicine prices in LMIC is limited^(65, 69). In a small country with only a few pharmaceutical facilities, the country has a weak bargaining position, therefore generally the government cannot set prices. The application of cost-plus pricing is quite effective if it is implemented in a country that has few pharmaceutical industry facilities. In developing countries with a large market segment and adequate pharmaceutical industry facilities the price competition method is an effective strategy option to get lower prices⁽⁷⁰⁾.

CONCLUSION

In practice, the application of a medicine pricing policy is dynamic. The medicine pricing system in a country can be changed or combined with other methods if the evaluation does not provide optimal results or generates unintended impacts.

REFERENCES

1. WHO. Health reform and drug financing. WHO/DAP/98.3. Geneva: World Health Organization.1998.
2. Pearson LS. A need for government intervention? prescription drug prices and retail mark-ups [thesis] Blacksburk Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University; 2011.
3. Who Guideline on Country Pharmaceutical Pricing Policies [Internet]. World Health Organization. 2015. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21016en/s21016en.pdf>.
4. Rietveld AH, Haaijer-Ruskamp FM. Policy options for cost containment of pharmaceutical. In: Dukes MNG, Haaijer-Ruskamp FM, De Joncheere CP, Rietveld AH, editors. Drugs and money: price, affordability and cost containment. Amsterdam: IOS Press Ohmsa (Published on behalf of WHO Regional office Europe). 2002.
5. Kumar S. India to extend price controls on drugs. *BMJ*. 2004.329(7462):368.
6. Borrell JR. Pharmaceutical price regulation. A study on the impact of the rate-of-return regulation in the UK. *Pharmacoeconomics*. 1999.15(3):291-303. PubMed PMID: 10537436. eng.
7. Department of Health UK. The pharmaceutical price regulation scheme. Eleventh report to parliament. 2012. Available from: http://www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/@dh/@en/documents/digitalasset/dh_132793.pdf.
8. Huttin C. Experiences with reference pricing. In: Dukes MNG, Haaijer-Ruskamp FM, de Joncheere CP, Rietveld AH, editors. Drugs and money: price, affordability and cost containment. Amsterdam: IOS Press Ohmsa (Published on behalf of WHO Regional office Europe). 2002.
9. Danzon PM, Chao L-W. Cross-national price differences for pharmaceuticals: how large, and why? *Journal of Health Economics*. 2000.19(2):159-95.
10. Schneeweiss S. Reference drug programs: Effectiveness and policy implications. *Health Policy*. 2007.81(1):17-28.
11. Ghislandi S. Competition and the reference pricing scheme for pharmaceuticals. *Journal of Health Economics*. 2011.30(6):1137-49.
12. Brekke KR, Grasdal AL, Holmås TH. Regulation and pricing of pharmaceuticals: Reference pricing or price cap regulation? *European Economic Review*. 2009.53(2):170-85.
13. Pavenik N. Do pharmaceutical prices respond to potential patient out-of-pocket expenses? *Rand J Econ*. 2002.33(3):469-87. PubMed PMID: 12585303. eng.
14. Aronsson T, Bergman MA, Rudholm N. The impact of generic drug competition on brand name market shares evidence from micro data. *Review of Industrial Organization*. 2001.19(4):423-33.
15. Rothberg AD, Blignault J, Serfontein CB, Valodia B, Eekhout S, Pels LM. Experience of a medicines reference-pricing model. *S Afr Med J*. 2004.94(3):183-8. PubMed PMID: 15098277. eng.
16. Aaserud M, Dahlgren AT, Kosters JP, Oxman AD, Ramsay C, Sturm H. Pharmaceutical policies: effects of reference pricing, other pricing, and purchasing policies. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006.19(2). PubMed PMID: 16625648. eng.
17. Leopold C, Vogler S, Mantel-Teeuwisse AK, de Joncheere K, Leufkens HGM, Laing R. Differences in external price referencing in Europe—A descriptive overview. *Health Policy*. 2012.104(1):50-60.
18. Dylst P, Simoens S. Generic medicine pricing policies in Europe: Current status and impact. *Pharmaceuticals*. 2010.3(3):471-81. PubMed PMID: doi:10.3390/ph3030471.
19. Mossialos E, Brogan D, Walley T. Pharmaceutical pricing in Europe: Weighing up the options. *International Social Security Review*. 2006.59(3):3-25.
20. Mrazek FM. Comparative approaches to pharmaceutical price regulation in the European Union. *Croat Med J*. 2002.43(4):453-61. PubMed PMID: 12187524. eng.
21. Drummond M, Jonsson B, Rutten F. The role of economic evaluation in the pricing and reimbursement of medicines. *Health Policy*. 1997.40(3):199-215. PubMed PMID: 10168752.
22. McGuire A, Drummond M, Rutten F. Reimbursement of pharmaceutical in the European Union Open University. 2004: [cited 2010 12 February]. Available from: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0008/98432/E83015.pdf.
23. Bloor K, Maynard A, Freemantle N. Lessons from international experience in controlling pharmaceutical expenditure. III: Regulating industry. *Bmj*. 1996.313(7048):33-5. PubMed PMID: 8664771. eng.
24. Hoomans T, Severens JL, van der Roer N, Delwel GO. Methodological quality of economic evaluations of new pharmaceuticals in The Netherlands. *Pharmacoeconomics*. 2012.30(3):219-27. PubMed PMID: 22074610. Epub 2011/11/15 06:00. eng.
25. Lundkvist J. Pricing and reimbursement of drugs in Sweden. *The European Journal of Health Economics*. 2002.3(1):66-70. English.
26. Graf von der Schulenburg JM, Hoffmann C. Review of European guidelines for economic evaluation of medical technologies and pharmaceuticals. *HEPAC Health Economics in Prevention and Care*. 2000.1(1):2-8. English.
27. Yang BM, Bae EY, Kim J. Economic evaluation and pharmaceutical reimbursement reform in South Korea's National Health Insurance. *Health Aff (Millwood)*. 2008. 27(1):179-87. PubMed PMID: 18180493. Epub 2008/01/09 09:00. eng.
28. Vogler S, Habl C, Leopold C, Rosian-Schikuta, de Joncheere K, Thomsen T. Prescription pricing and reimbursement information (PPRI) report Vienna. 2008 [cited 2012 January]. Available from: http://ppri.oebig.at/Downloads/Publications/PPRI_InterimTechnicalReport.pdf.
29. Sarmiento AZ. Alternative drug pricing policies in

- the Americas Geneva: World Health Organization. Health Economics and Drug. DAP Series No1. WHO/DAP/95.6. 1995 [cited 2010 March]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16155e/s16155e.pdf>.
30. Lee I-H, Bloor K, Hewitt C, Maynard A. The effects of new pricing and copayment schemes for pharmaceuticals in South Korea. *Health Policy*. 2012.104(1):40-9.
 31. Gilman BH, Kautter J. Impact of multitiered copayments on the use and cost of prescription drugs among medicare beneficiaries. *Health Serv Res*. 2008.43(2):478-95. PubMed PMID: 18370964. eng.
 32. PBS. What you pay for PBS medicines: Pharmaceutical Benefit Scheme. 2012 [cited 2012 September]. Available from: http://www.pbs.gov.au/info/about-the-pbs#What_you_pay_for_PBS_medicines.
 33. Purcell D. Competition and regulation in the retail pharmacy market: The Policy Institute. Trinity College Dublin. 2004 [cited 2012 October]. Available from: http://www.tcd.ie/policy-institute/assets/pdf/BP14_Purcell.pdf.
 34. Sood N, De Vries H, Gutierrez I, Lakdawalla DN, Goldman DP. The effect of regulation on pharmaceutical revenues: experience in nineteen countries. *Health Aff (Millwood)*. 2009.28(1):125-37. PubMed PMID: 19088100. eng.
 35. Vogel RJ. Pharmaceutical pricing, price controls, and their effects on pharmaceutical sales and research and development expenditures in the European Union. *Clinical Therapeutics*. 2004.26(8):1327-40.
 36. Golec J, Vernon JA. European pharmaceutical price regulation, firm profitability, and R&D spending. : Working Paper 12676. 2006 [cited 2012 October]. Available from: <http://www.nber.org/papers/w12676>.
 37. Thomas MC, Mann J, Williams S. The impact of reference pricing on clinical lipid control. *N Z Med J*. 1998.111(1071):292-4. PubMed PMID: 9760953. eng.
 38. Andersson F. Methodological aspects of international drug price comparisons. *Pharmacoeconomics*. 1993.4(4):247-56. PubMed PMID: 10146914. eng.
 39. Bala K, Sagoo K. Patent and prices: Health Action International. 2000 [cited February 2009]. Available from: <http://www.haiweb.org/pubs/hainews/Patents%20and%20Prices.html>.
 40. Madden J. Comparing pilot survey results from different countries: WHO EDM No.33. World Health Organization. 2003 [cited 2010 January]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4941e/s4941e.pdf>
 41. WHO, HAI. Measuring medicine prices, availability, affordability and price components. Geneva: World Health Organization and Health Action International. 2008 [cited 2009 January]. 2nd:[Available from: <http://www.haiweb.org/medicineprices/manual/documents.html> .
 42. Cameron A, Ewen M, Auton M, Abegunde D. The world medicines situation 2011. Geneva: World Health Organization. 2011 [cited 2012 June]. Available from: http://www.who.int/nha/docs/world_medicine_situation.pdf.
 43. Myhr K. Measuring medicine price and availability: WHO EDM No.33. World Health Organization. 2003 [cited 2010 January]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4941e/s4941e.pdf>.
 44. Van Mourik MS, Cameron A, Ewen M, Laing RO. Availability, price and affordability of cardiovascular medicines: a comparison across 36 countries using WHO/HAI data. *BMC Cardiovasc Disord*. 2010.10(25):25. PubMed PMID: 20534118. eng.
 45. Gelders S, Ewen M, Noguchi N, Laing RO. Price, availability, and affordability: an international comparison of chronic disease medicine. Background report prepared for the WHO Planning meeting on the Global Initiative for Treatment of Chronic Diseases held in Cairo in December 2005. Cairo, Egypt: WHO/HAI, WHO's Regional Office for Eastern Mediterranean. 2006 [cited 2011]. Available from: <http://www.haiweb.org/medicineprices/08092008/EDB068final.pdf>.
 46. Babar ZU, Ibrahim MI, Singh H, Bukahri NI, Creese A. Evaluating drug prices, availability, affordability, and price components: implications for access to drugs in Malaysia. *PLoS Med*. 2007.4(3):e82. PubMed PMID: 17388660. eng.
 47. Sooksriwong C, Yoongthong W, Suwattanapreeda S, Chanjaruporn F. Medicine prices in Thailand: A result of no medicine pricing policy. *Southern Med Review*. 2009.2(2):10-4.
 48. Nguyen AT, Knight R, Andrea MA, Minh CQ, Auton M. Medicine prices, availability, and affordability in Vietnam. *Southern Med Review*. 2009.2(2):2-9.
 49. Yang H, Dib HH, Zhu M, Qi G, Zhang X. Prices, availability and affordability of essential medicines in rural areas of Hubei Province, China. *Health Policy Plan*. 2009.25(3):219-29. PubMed PMID: 19955093. eng.
 50. Ye L. Medicines price, availability and affordability in Shanghai China Amsterdam: Health Action International. 2006 [cited 2012 Januari]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/200609CNS/sdocs/summary_survey_report.pdf.
 51. Sun Q, Santoro MA, Meng Q, Liu C, Eggleston K. Pharmaceutical policy in China. *Health Aff (Millwood)*. 2008.27(4):1042-50. PubMed PMID: 18607039. eng.
 52. Anvarova J, Maqsudova N, Haknazarova M. Medicine prices in the Republic of Tajikistan. *Health action International*. 2005 [cited 2011 December]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/200502TJ/survey_report.pdf.
 53. Siahaan S, Putri AE, Tjahjono L, Budiharto M, Sundari S, Angkasawati T, et al. The prices people have to pay for medicines in Indonesia Jakarta. National Institute for Health Research and Development (NIHRD) Indonesia, World Health Organization,

- and Health Action International. 2004 [cited 2009 December]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/200408ID/survey_report.pdf.
54. Batangan DB. Medicine prices, availability, affordability and price component in Philippines Amsterdam. Health Action International. 2005 [cited 2012 January]. Available from: <http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/200502PH/sdocs/PhilippinesSummaryReportFINAL.pdf>.
 55. Shimin Y, Yu F. Medicine prices, availability and affordability survey in Shaanxi Province. Western China: Survey report. 2010 [updated October; cited 2012 October]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/201009CNX/sdocs/survey_report_shaanxi_Final.pdf.
 56. Sweeny K. Medicine prices in Australia: An international comparison: Working Paper. Pharmaceutical Industry Project. 2005 [cited 2011 January]. Available from: http://www.cfses.com/documents/pharma/29-Medicine_Prices_Australia_Sweeny.pdf.
 57. HAI. A one day snapshot of the price for a course of ciprofloxacin 500 mg tabs Amsterdam. Health Action International. 2009 [cited 2011 January]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/07072010/ciprofloxacin_500mg_tabs.pdf.
 58. Kotwani A, Ewen M, Dey D, Iyer S, Lakshmi PK, Patel A, et al. Prices & availability of common medicines at six sites in India using a standard methodology. *Indian J Med Res*. 2007.125(5):645-54. PubMed PMID: 17642500. eng.
 59. Kotwani A. Medicine prices, availability, affordability in NCT. Delhi: Survey report. Health Action International. 2011 [cited 2012 October]. Available from: http://www.haiweb.org/medicineprices/surveys/201107IND/sdocs/ReportFinal_Delhi%20Medicine%20Price%20Survey_KotwaniA_Web.pdf.
 60. Ewen M, Sakit MA, Saadeh R, Valentin CV, Seita A. UN relief and work agency for Palestine pefuge in Near East's medicine procurement processes and prices: a comparative performance assesment *TheLancet.com*. 2011 [cited 2012 October]. Available from: <http://download.thelancet.com/flatcontentassets/pdfs/palestine2012/palestine2012-9.pdf>.
 61. Firdi, Suryawati S. Evaluation of medicines price at private pharmacies in Bengkulu Province. *Health Management and Services*. 2003.06(02):25.
 62. Siahaan S. The evaluation of the rationale medicines price for basic health services in public sector. 2006.
 63. Suryawati S, Hasnah N, Rustamaji. Medicine price retailed pharmacies in Kendary. *Journal of Management of Health Services*. 2009.12:102-8.
 64. Anggriani Y, Ibrahim M, Sri S, Shafie A. Indonesian medicine pricing policies evaluation and the impact on medicines price, availability and affordability in Indonesia. University Sain Malaysia. 2013.
 65. Ball D. Pharmaceutical pricing policies and intervention. Working paper 3: The regulation of mark-up in the pharmaceutical supply chain: World Health Organization and Health Action International. 2011 [cited 2012 January]. Available from: <http://www.haiweb.org/medicineprices/05062011/Mark-ups%20final%20May2011.pdf>.
 66. Lauenroth VD, Stargardt T. Pharmaceutical pricing in Germany: How is value determined within the scope of AMNOG?. *Value in Health*. 2017.20(7):927-35.
 67. Mestre-Ferrandiz J. Reference prices and generic medicines: What can we expect? *Journal of Generic Medicines*. 2003.1(1):31-8.
 68. Drummond M. Twenty years of using economic evaluations for reimbursement decisions: What have we achieved? United Kingdom: Centre for Health Economics. University of York. 2012 [cited 2013 10 January]. Available from: http://www.york.ac.uk/media/che/documents/papers/researchpapers/CHERP75_Using_economic_evaluations_for_reimbursement_decisions.pdf.
 69. Nguyen TA, Knight R, Roughead EE, Brooks G, Mant A. Policy options for pharmaceutical pricing and purchasing: issues for low- and middle-income countries. *Health Policy and Planning*. 2015.30(2):267-80.
 70. Moon S, Jambert E, Childs M, von Schoen-Angerer T. A win-win solution?: A critical analysis of tiered pricing to improve access to medicines in developing countries. *Globalization and Health*. 2011.7(1):39. PubMed PMID: doi:10.1186/1744-8603-7-39.

Uji Aktivitas Analgesik dan Anti-Inflamasi Sediaan Infusa dan Dekokta Akar *Eurycoma longifolia* pada Mencit

(Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Infusion and Decoction of *Eurycoma longifolia* root in Mice)

WINA SUSANA, INDRIYANI PERMATASARI, JESSY FLORENSIA, MONITA NATALIA SIREGAR, PHEBE HENDRA*

Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta

Diterima 10 Januari 2018, Disetujui 28 September 2018

Abstrak: *Eurycoma longifolia* telah dikenal sebagai salah satu tanaman obat tradisional di Indonesia. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas analgesik dan anti-inflamasi sediaan infusa dan dekokta akar *Eurycoma longifolia* pada mencit. Efek analgesik diuji dengan menggunakan rangsang kimia (uji geliat) yang menginduksi nyeri perifer pada mencit. Mencit dibagi dalam 8 kelompok. Kelompok I merupakan kontrol negatif, sedangkan kelompok II merupakan kontrol positif yang diberikan asetosal. Kelompok III-V diberikan infusa akar *Eurycoma longifolia* dosis 0,83; 1,67; 3,33 g/kgBB. Kelompok VI-VIII diberikan dekokta akar *Eurycoma longifolia* dengan dosis yang sama. Lima menit kemudian, semua hewan uji diberikan asam asetat. Jumlah geliat dihitung selama 1 jam. Aktivitas antiinflamasi ditentukan dengan menginduksi edema pada mencit menggunakan karagenin. Pembagian kelompok perlakuan sama seperti uji analgesik, namun diklofenak digunakan sebagai kontrol positif. Tebal udema diukur selama 6 jam setelah injeksi karagenin. Pada uji analgesik, baik infusa dan dekokta akar *Eurycoma longifolia* mampu memberikan penurunan jumlah geliat secara signifikan pada mencit yang diinduksi asam asetat ($p < 0,05$). Penurunan tebal udema secara signifikan ($p < 0,05$) juga terlihat pada semua peringkat dosis baik infusa dan dekokta akar *Eurycoma longifolia*. Hasil penelitian menunjukkan akar *Eurycoma longifolia* mempunyai aktivitas analgesik dan antiinflamasi pada mencit.

Kata kunci: *Eurycoma longifolia*, dekokta, infusa, analgesik, anti-inflamasi.

Abstract: *Eurycoma longifolia* is one of the most well-known herbal medicine in Indonesia. This study was conducted to evaluate the analgesic and anti-inflammatory activities of infusion and decoction of *Eurycoma longifolia* root in mice. The analgesic effect was assessed using chemical stimuli (wrihting test) to induce peripheral pain in mice. Mice were divided into 8 groups. Group I as a negative control, while group II as positive control that was given acetosal. Groups III-V were given infusion of *Eurycoma longifolia* root with the following doses 0.83; 1.67; 3.33 g/kgBW respectively. Groups VI-VIII were given decoction of *Eurycoma longifolia* root with the same doses as the previous groups. After 5 min of treatment, all animals were administered with acetic acid. The total number of writhes was recorded for 1 h. The anti-inflammatory activity was determined using carrageenan-induced paw edema in mice. The procedure mentioned above was applied to a similar set of animals. However, diclofenac was administered in place of acetosal. The paw edema were measured using a digital caliper for 6 hours afterwards after carrageenan injection. In analgesic test, infusion and decoction of *Eurycoma longifolia* root significantly decreased the number of writhing in acetic acid-induced mice ($p < 0.05$). There were a significant ($p < 0.05$) reduction in paw edema at all doses of infusion and decoction of *Eurycoma longifolia* root. This study exhibits that infusion and decoction of *Eurycoma longifolia* root possesses analgesic and anti-inflammatory activities in mice.

Keywords: *Eurycoma longifolia*, decoction, infusion, analgesic, anti-inflammatory.

* Penulis korespondensi, Hp. 081904256888
e-mail: phebe_hendra@usd.ac.id

PENDAHULUAN

NYERI merupakan perasaan sensoris dan emosional yang tidak nyaman dan berkaitan dengan adanya kerusakan jaringan⁽¹⁾, sedangkan inflamasi merupakan respon protektif terhadap kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, agen kimia berbahaya, atau agen mikrobiologi⁽²⁾. Saat inflamasi berlangsung, terjadi proses penghancuran jaringan yang melibatkan produk-produk darah seperti protein plasma, cairan, dan leukosit ke dalam jaringan yang terganggu⁽³⁾.

Pemanfaatan obat tradisional sebagai pengobatan merupakan salah satu upaya pemanfaatan dan optimalisasi dari keanekaragaman hayati yang dimiliki Indonesia⁽⁴⁾. Dalam menunjang situasi tersebut peran obat bahan alam Indonesia berpeluang untuk dipakai dalam pencegahan maupun pengobatan berbagai penyakit. Salah satu tanaman yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai pilihan pengobatan nyeri dan inflamasi, yaitu *Eurycoma longifolia* Jack. (*E. longifolia*) yang dikenal dengan nama pasak bumi di Indonesia. Varghese dkk. melaporkan bahwa ekstrak hidroalkohol akar *E. longifolia* mempunyai aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi secara *in vitro*⁽⁵⁾. Pada uji *in vivo* ekstrak metanol akar *E. longifolia* dilaporkan mempunyai aktivitas analgesik dan antiinflamasi⁽⁶⁾.

Kandungan bioaktif yang paling banyak terkandung di dalam akar *E. longifolia*, yaitu quassinoid⁽⁷⁾. Adanya kandungan kuasinoid yang terdiri dari *eurycomalactone*, *14,15 β -dihydroklaieanone*, dan *13,21-dehydroeurycomanone* pada akar *E. longifolia* dapat digunakan sebagai penghambat dalam jalur aktivasi NF- κ B⁽⁸⁾. Eurycomanone sebagai salah satu komponen quassinoid yang dominan dari akar *E. longifolia*⁽⁸⁾ terlibat sebagai regulator jalur sinyal dalam proliferasi, kematian sel, dan inflamasi dengan mencegah induksi dari NF- κ B dan MAPK oleh TNF α ⁽⁹⁾. Aktivitas NF- κ B dan sinyal dari TNF- α juga berperan penting dalam regulasi faktor-faktor lain yang berkontribusi dalam respon imun, nyeri, dan inflamasi⁽¹⁰⁾, sehingga kerap kali obat anti-inflamasi didesain dengan mekanisme penghambatan aktivitas NF- κ B⁽¹¹⁾.

Pada penelitian digunakan metode penyarian infusa dan dekokta dari akar *E. longifolia*. Pemilihan metode penyarian infusa dan dekokta karena kedua metode merupakan salah satu cara sederhana yang mirip dengan pembuatan sediaan herbal berupa perebusan oleh masyarakat. Selain itu, diharapkan senyawa quassinoid yang merupakan glikosida yang larut air dapat tersari secara optimal baik dalam bentuk sediaan infusa maupun dekokta⁽¹²⁾. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas

analgesik dan anti-inflamasi baik dari infusa maupun dekokta akar *E. longifolia* pada mencit.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Akar *E. longifolia* yang diperoleh dari CV Merapi Farma Yogyakarta, mencit jantan dan betina galur Swiss umur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 g yang diperoleh dari Laboratorium Imono Universitas Sanata Dharma, diklofenak (Norvatis Ind), karagenin (Sigma Chemical Co), asetosal (Merck), asam asetat glasial (Merck), CMC-Na (Dai-Ichi Seiyaku Co.,Ltd), akuades.

Alat. Ayakan nomor mesh 40 dan 50, alat-alat gelas (gelas ukur, *beaker glass*, labu ukur, batang pengaduk, dan pipet tetes), timbangan analitik (Mettler Toledo[®]), panci enamel, penangas air, kain flanel, termometer, *stopwatch*, *sputit*, *needle*, kotak kaca tempat pengamatan geliat dan jangka sorong Digital Caliper (Wipro[®]).

METODE. Pembuatan Infusan dan Dekokta *E. longifolia*. Akar *E. longifolia* yang telah diserbuk, selanjutnya diayak dengan menggunakan ayakan nomor 40 dan 50. Serbuk kering akar *E. longifolia* ditimbang 5 gram dan dimasukkan ke dalam akuades 50 mL, selanjutnya dipanasi pada suhu 90 °C selama 15 menit (untuk infusa) dan 30 menit (untuk dekokta). Perhitungan waktu 15 dan 30 menit dimulai ketika suhu campuran mencapai suhu 90 °C. Campuran diperas menggunakan kain flanel kemudian ditambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume sebanyak 50 mL⁽¹³⁾.

Pengujian Efek Analgesik. Percobaan untuk menentukan aktivitas analgesik akar *E. longifolia* dilakukan dengan metode rangsang kimia yang diinduksi dengan asam asetat^(14,15). Empat puluh ekor mencit betina dibagi secara acak menjadi 8 kelompok. Kelompok I merupakan kontrol negatif akuades 25 g/kgBB; Kelompok II merupakan kontrol positif asetosal 91 mg/kgBB; Kelompok III-V merupakan kelompok perlakuan infusa akar *E. longifolia* dengan 3 peringkat dosis berturut-turut 0,83; 1,67; 3,33 g/kgBB; Kelompok VI-VIII merupakan kelompok perlakuan dekokta akar *E. longifolia* dengan 3 peringkat dosis berturut-turut 0,83; 1,67; 3,33 g/kgBB.

Pemberian asam asetat 1% secara intra peritoneal dilakukan setelah 5 menit pemberian larutan peroral pada semua kelompok perlakuan. Respon jumlah geliat akibat induksi asam asetat diamati setiap 5 menit selama 1 jam^(15,16).

Pengujian Efek Anti-inflamasi. Mencit jantan dibagi acak menjadi 8 kelompok dengan masing-masing kelompok terdiri 5 mencit. Induksi udema dilakukan dengan pemberian karagenin 1% secara

subplantar.

Kelompok I merupakan kontrol negatif akuades 25 g/kgBB; Kelompok II merupakan kontrol positif diklofenak 4,48 mg/kgBB. Kelompok III-V merupakan kelompok perlakuan infusa akar *E. longifolia* dengan 3 peringkat dosis berturut-turut 0,83; 1,67; 3,33 g/kgBB; Kelompok VI-VIII merupakan kelompok perlakuan dekokta akar *E. longifolia* dengan 3 peringkat dosis berturut-turut 0,83; 1,67; 3,33 g/kgBB.

Pada semua kelompok perlakuan diberikan karagenin 1% secara subplantar pada telapak kaki kiri mencit setelah 15 menit pemberian larutan peroral. Pengukuran tebal edema telapak kaki belakang mencit dimulai dari menit ke-0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, dan 360 setelah terinduksi karagenin 1% dengan menggunakan jangka sorong⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

Semua prosedur eksperimental menggunakan hewan uji telah disetujui oleh Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta dengan nomor referensi KE/FK/841/EC/2016.

Analisis Data. Data yang diperoleh dari masing-masing pengujian disajikan dalam bentuk rerata dan standar eror. Pada pengujian analgesik dihitung dan dihitung persentase proteksi geliat dengan persamaan: (rerata kontrol negatif- rerata perlakuan)/rerata kontrol negatif X 100⁽¹⁴⁾. Pada pengujian anti-inflamasi tebal edema selama 360 menit dinyatakan dalam luas area dibawah kurva (AUC-Area Under Curve), selanjutnya dihitung persentase penghambatan inflamasi⁽¹⁹⁾. Selanjutnya dilakukan analisa statistik dengan dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian Aktivitas Analgesik IAEL dan DAEL.

Aktivitas analgesik IAEL dan DAEL pada mencit terinduksi asam asetat tersaji pada Tabel 1.

Pada kontrol positif asetosal dan semua kelompok perlakuan dosis (0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB) baik IAEL maupun DAEL memberikan jumlah kumulatif geliat yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif akuades. Ini berarti bahwa pada kontrol positif asetosal dan semua kelompok perlakuan dosis dengan bentuk sediaan infusa maupun dekokta *E. longifolia* mampu memberikan proteksi nyeri pada mencit terinduksi asam asetat.

Perlakuan IAEL 0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB memberikan jumlah kumulatif geliat yang lebih besar secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif asetosal. Hal ini menunjukkan walaupun perlakuan IAEL 0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB mampu memberikan proteksi nyeri pada mencit, namun kemampuan proteksi nyeri masih lebih rendah (persen proteksi berturut-turut 22,4; 28,0; 37,0%) dibandingkan kontrol asetosal (persen proteksi 72,2%). Hal yang serupa juga terlihat pada DAEL 0,83 dan 1,67 g/kgBB yang memberikan jumlah kumulatif geliat yang lebih besar secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif asetosal, namun jumlah kumulatif geliat DAEL 3,33 g/kgBB lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol positif asetosal. DAEL 0,83 dan 1,67 g/kgBB mampu memberikan proteksi nyeri, namun kemampuan proteksi masih rendah (persen proteksi berturut-turut 46,4; 46,6%) dibandingkan kontrol asetosal. DAEL 3,33 g/kgBB mampu memberikan proteksi nyeri dengan kemampuan proteksi nyeri yang lebih baik (persen proteksi sebesar 86,6%) daripada kontrol asetosal.

Pada penelitian ini menunjukkan baik sediaan infusa maupun dekokta *E. longifolia* memberikan aktivitas analgesik pada mencit terinduksi asam asetat. Hasil yang sama juga dilaporkan bahwa ekstrak metanol akar *E. longifolia* terbukti memiliki aktivitas analgesik⁽⁶⁾. Hal ini mengindikasikan, senyawa yang

Tabel 1. Jumlah geliat dan persen proteksi geliat mencit akibat perlakuan infusa dan dekokta akar *Eurycoma longifolia*.

Kelompok Perlakuan	Jumlah geliat	Persen proteksi geliat
Kontrol negatif (Akuades 25 g/kg BB)	58,2±1,0 ^b	0
Kontrol positif (Asetosal 91 mg/kg BB)	16,2±0,6 ^a	72,2
IAEL 0,83 g/kg BB	22,4±1,1 ^{a,b}	61,5
IAEL 1,67 g/kg BB	28,0±1,4 ^{a,b}	51,9
IAEL 3,33 g/kg BB	37,0±0,8 ^{a,b}	36,4
DAEL 0,83 g/kg BB	46,4±1,3 ^{a,b}	20,3
DAEL 1,67 g/kg BB	46,6±2,2 ^{a,b}	19,9
DAEL 3,33 g/kg BB	7,8±0,6 ^{a,b}	86,6

Keterangan:

IAEL : Infusa akar *E. longifolia*; DAEL : Dekokta akar *E. longifolia*

Nilai dinyatakan dalam bentuk rerata ± standar eror (n=5)

a: $p < 0,05$ dibanding kelompok kontrol negatif akuades

b: $p < 0,05$ dibanding kelompok kontrol positif asetosal

bertanggungjawab akan efek analgesik dapat tersari baik di pelarut metanol maupun air (infusa dan dekokta), yang merupakan senyawa yang polar.

Pada ketiga peringkat dosis IAEL maupun DAEL memberikan persen proteksi nyeri yang tidak tergantung dosis. Semakin besar dosis IAEL yang diberikan, kemampuan proteksi nyeri IAEL semakin rendah, sedangkan semakin besar dosis DAEL, kemampuan proteksi nyerinya semakin besar. Pada peringkat dosis yang sama, aktivitas analgesik yang diberikan berbeda baik pada sediaan infusa maupun dekokta. Pada sediaan infusa, dosis kecil (0,83 g/kgBB) memberikan aktivitas analgesik yang paling besar dibandingkan dosis lainnya. Pada sediaan dekokta, aktivitas analgesik yang paling besar ditunjukkan oleh dosis besar (3,33 g/kgBB). Pembuatan dekokta membutuhkan waktu pemanasan 30 menit, sedangkan infusa 15 menit.

Hal ini menunjukkan pada pemanasan yang lebih lama terjadi penurunan kemampuan aktivitas analgesik. Berdasarkan hal tersebut, maka terlihat bahwa lama pemanasan sediaan uji dapat mempengaruhi aktivitas yang muncul. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan kandungan senyawa yang terdapat dalam sediaan infusa maupun dekokta *E. longifolia*.

Pengujian Aktivitas Anti-inflamasi IAEL dan DAEL. Evaluasi aktivitas anti-inflamasi dilihat menggunakan metode induksi edema dengan karagenin 1% pada kaki belakang mencit. Karagenin sebagai zat inflamatorik merupakan senyawa iritan yang menginduksi inflamasi akut pada hewan uji tanpa menyebabkan kerusakan pada kaki hewan uji yang meradang. Mekanisme aksi karagenin sebagai senyawa penginduksi inflamasi sinergis dengan beberapa mediator inflamasi seperti bradikinin, serotonin, histamin, prostaglandin, leukotrien, dan agen kemotaktik. Karagenin menginduksi terjadinya edema melalui 2 fase yaitu: fase awal merupakan fase

pelepasan histamin, serotonin, dan bradikinin. Fase akhir dihubungkan dengan pelepasan prostaglandin dan adanya induksi *siklooksigenase* (COX) yang meningkatkan permeabilitas vaskular dan infiltrasi neutrofil yang menghasilkan radikal bebas yang dapat menimbulkan edema, terjadinya peradangan lokal atau sistemik dikaitkan dengan peningkatan sitokin pro-inflamasi tumor necrosis factor (TNF) dan interleukin (IL)⁽²⁰⁾.

Rerata tebal udem perlakuan IAEL dan DAEL dapat dilihat pada Tabel 2. Kontrol positif diklofenak dan semua kelompok perlakuan dosis (0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB) baik IAEL maupun DAEL memberikan rerata AUC yang lebih rendah secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol negatif akuades. Ini berarti bahwa pada kontrol positif diklofenak dan semua kelompok perlakuan dosis infusa maupun dekokta *E. longifolia* mampu memberikan penghambatan edema/inflamasi pada mencit terinduksi karagenin.

Semua perlakuan dosis IAEL dan DAEL (0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB) memberikan rerata AUC yang lebih besar secara signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan dengan kontrol positif diklofenak. Ini menunjukkan baik perlakuan IAEL maupun DAEL pada semua peringkat dosis memiliki kemampuan penghambatan inflamasi lebih rendah dibandingkan kontrol diklofenak (persen penghambatan inflamasi 42,7%).

Pada penelitian ini menunjukkan sediaan infusa dan dekokta *E. longifolia* memberikan aktivitas anti-inflamasi pada mencit terinduksi karagenin. Hasil yang sama juga dilaporkan bahwa ekstrak metanol akar *E. longifolia* terbukti memiliki aktivitas anti-inflamasi⁽⁸⁾. IAEL dosis 0,83; 1,67; dan 3,33 g/kg BB memberikan persentase penghambatan inflamasi berturut-turut 25,5; 21,9 dan 29,9%, sedangkan DAEL dosis sama menunjukkan persentase berturut-turut 25,5; 26,0 dan 26,2%. Berdasarkan persentase

Tabel 2. Nilai AUC dan persen penghambatan inflamasi mencit akibat pemberian infusa dan dekokta akar *Eurycoma longifolia*

Kelompok	AUC (mm.menit)	Persentase penghambatan inflamasi
Kontrol negatif (akuades 25 g/kg BB)	446,2 ± 2,6 ^b	0
Kontrol positif (diklofenak 4,48 mg/kg BB)	255,9 ± 7,5 ^a	42,7
IAEL 0,83 g/kg BB	334,9 ± 5,6 ^{a,b}	25,0
IAEL 1,67 g/kg BB	348,6 ± 6,2 ^{a,b}	21,9
IAEL 3,33 g/kg BB	312,7 ± 4,7 ^{a,b}	29,9
DAEL 0,83 g/kg BB	332,3 ± 1,6 ^{a,b}	25,5
DAEL 1,67 g/kg BB	330,2 ± 4,9 ^{a,b}	26,0
DAEL 3,33 g/kg BB	329,5 ± 1,9 ^{a,b}	26,2

Keterangan:

IAEL : Infusa akar *E. longifolia*; DAEL : Dekokta akar *E. longifolia*; Nilai dinyatakan dalam bentuk rerata ± standar eror (n=5); a: $p < 0,05$ dibanding kelompok kontrol negatif akuades; b: $p < 0,05$ dibanding kelompok kontrol positif diklofenak.

penghambatan inflamasi tersebut terlihat bahwa aktivitas anti-inflamasi yang dihasilkan tidak tergantung dosis. Adanya peningkatan dosis, tidak meningkatkan aktivitas anti-inflamasi pada mencit terinduksi karagenin. Ini menunjukkan bahwa perbedaan waktu pemanasan antara infusa dan dekokta tidak mempengaruhi aktivitas anti-inflamasi yang ditimbulkan. Hasil ini berbeda bila dibandingkan dengan aktivitas analgesik yang menggunakan bentuk sediaan infusa dan dekokta yang sama.

Keberadaan golongan kuasinoid (*eurycomalactone*, *14,15 β -dihidroklaienanone*, dan *13,21-dehydroeurycomanone*) dari *E. longifolia* merupakan senyawa yang berperan dalam penghambatan jalur aktivasi NF- κ B^(6,8). Faktor transkripsi NF- κ B terdiri dari homo- dan heterodimer dari keluarga protein Rel yang berbeda (p65, RelB, C-Rel, p52, dan p50) dan berperan penting dalam respon imun, penyakit peradangan, dan kematian sel. Semua subunit NF- κ B berbagi homologi domain rel yang penting untuk dimerisasi, interaksi dengan protein inhibitor NF- κ B, translokasi nukleus, dan pengikatan DNA. Adanya aktivasi oleh berbagai rangsangan seperti sitokin, maka NF- κ B akan terfosforilasi oleh NF- κ B kinase, kemudian terdegradasi oleh kompleks proteasome. Degradasi NF- κ B mengarah pada pelepasan NF- κ B dari perangkat yang kompleks dan kemudian translokasi ke dalam nukleus, yang terikat pada daerah promotor dari berbagai gen seperti sitokin diantaranya TNF, IL, COX-2(10). Penghambatan NF- κ B akan berdampak pada terhambatnya transmisi nosisepsi dan timbulnya rangsang nyeri.

Adanya aktivitas analgesik dan anti-inflamasi infusa dan dekokta *E. longifolia*, dapat menjadi dasar untuk pengembangan obat tradisional untuk menghilangkan nyeri dan inflamasi. Namun penelitian lanjutan diperlukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang bertanggung jawab dalam aktivitas analgesik maupun anti-inflamasi.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa infusa dan dekokta *E. longifolia* memiliki efek analgesik dan anti-inflamasi terhadap mencit.

DAFTAR PUSTAKA

- Baumann TJ, Herndon CM, Strickland JM. Pain management In: DiPiro, JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, Posey LM, editors. *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*, 9th Ed. New York: Mc. Graw Hill Medical; 2014. p. 5692-712.
- Kumar S, Bajwaa BS, Kuldeep S, Kalia AN. Anti-inflammatory activity of herbal plants: a review. *International Journal of Advances in Pharmacy. Biology and Chemistry*. 2013. 2: 272-81.
- Ashley NT, Weil ZM, Nelson RJ. Inflammation: mechanisms costs and natural variation. *The Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. 2012. 43: 385-406.
- Elfahmi, Woerdenbag HJ, Kayser O. Jamu: Indonesian traditional herbal medicine towards rational phytopharmacological use. *J Herbal Med*. 2014. 23: 1-24.
- Varghese CP, Ambrose C, Jin SC, Lim YJ, Keisaban T. Antioxidant and antiinflammatory activity of *Eurycoma longifolia* Jack a traditional medicinal plant in Malaysia. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 2012. 4(5): 1875-8.
- Han YM, Jang M, Kim IS, Kim SH, Yoo HH. Simultaneous quantitation of six major quassinoids in *Tongkat Ali* dietary supplements by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2015. 38: 2260-6.
- Rehman SU, Choe K, Yoo H. Review on a traditional herbal medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (*Tongkat Ali*): its traditional uses, chemistry, evidence-based pharmacology and toxicology. *Molecules*. 2016. 21(331): 1-31.
- Tran TV, Malainer C, Schwaiger S, Atanasov AG, Heiss EH, Dirsch VM, et al. NF- κ B Inhibitors from *Eurycoma longifolia* Jack. *J. Nat. Prod*. 2014. 77: 483-8.
- Hajjouli S, Chateauvieux S, Teiten MH, Orlikova B, Schumacher M, Dicato M, et al. Eurycomanone and Eurycomanol from *Eurycoma longifolia* Jack as regulators of signal pathways involved in proliferation, cell death and inflammation. *Molecules*. 2014. 19(9): 14640-6.
- Niederberger E and Geisslinger G. The IKK-NF-Kb pathway: a source for novel molecular drug targets in pain therapy. *The FASEB Journal*. 2008. 22: 3432-42.
- Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009. 1(6): 1-10.
- Doughari JH. Phytochemicals: Extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. *Phytochemical – A global perspective of their role in nutrition and health*. China. 2012: 1-32.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta: Direktorat Obat Asli Indonesia. 2010. hal. 8.
- Chaulya NC, Haldar PK, Mukherjee A. Anti-inflammatory and analgesic activity of methanol extracts of *Cyperus tegetum* Roxb. Rhizome. *Journal of PharmaSciTech* 2012. 1(2): 27-9.
- Mishra D, Ghosh G, Kumar PS, Panda PK. An experimental study of analgesic activity of selective COX-2 inhibitor with conventional NSAIDs. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011. 4(1): 78-81.

16. Rahayu L, Dewi RS, Ayu G. Uji efek anti-inflamasi dan analgesik infusa daun senggani (*Melastoma malabathricum* L.). Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2016.14 (1): 93-8.
17. Huang SS, Huang GJ, Peng WH, Ho YL, Chang MJ, Hung HJ, et al. Analgesic and antiinflammatory activities of an aqueous extract of *Hydrocotyle batrachium* hance in mice. Mid Taiwan J Med. 2008. 13: 179-185.
18. Nunes DC, Rodrigues RS, Lucena MN, Cologna CT, Oliveira AC, Hamaguchi A, et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom. Comparative Biochemistry and Physiology. 2011. 154(3): 226-33.
19. Tjandrawinata RR, Djunarko I, Fenty, and Hendra P. Anti-inflammation effects of bioactive fraction DLBS0533 containing *Phaleria macrocarpa* and *Nigella sativa* on animal Model. Int J Pharm Pharm Sci. 2015. 7(1): 408-11.
20. Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. Veterinarni Medicina. 2013. 58: 187-205.

Antidepressant Activity of Some Fractions of the Basil Leaves (*Ocimum basilicum* L.) on the Swiss Webster Male Mice

(Aktivitas Antidepresi Beberapa Fraksi Daun Selasih (*Ocimum basilicum* L.) pada Mencit Jantan Galur Swiss Webster)

MUHARAM PRIATNA¹, YEDY PURWANDI SUKMAWAN¹, HENDY SUHENDY^{2*}

¹Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Program Study of Pharmacy, Institute of Health Science Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya – 46115, West Java, Indonesia.

²Department of Pharmacognosy, Program Study of Pharmacy, Institute of Health Science Bakti Tunas Husada, Tasikmalaya – 46115, West Java, Indonesia.

Submitted 8 March 2018, Accepted 28 September 2018

Abstract: The objective of the study is to determine the antidepressant activity of some fractions of the leaves of *Ocimum basilicum* L. The experimental methods are using Force Swimming Test and Tail Suspension Test. The experiment was divided into seven groups. Negative control group (CMC 1%), Positive control group (fluoxetine 0.052 mg/20 g BW of mice), test I group (fraction of *n*-hexane 50 mg/Kg BW), test II group (fraction of ethyl acetate 50 mg/Kg BW), test III group (fraction of ethanol 50 mg/Kg BW), test IV group (combination of cyproheptadine 0.0208 mg/20 g BW of mice and Fluoxetine 0,052 mg/20 g BW of mice) and test V group (combination of cyproheptadine 0,0208 mg/20 g BW of mice and fraction of ethyl acetate 50 mg/Kg BW). The ethyl acetate fraction showed significant difference ($p < 0.05$) than negative control group and it had better time reduction than other groups. Serotonin receptors role may involve since cyproheptadine administration increase immobility time of the test V group. Ethyl acetate fraction showed the best antidepressant activity with possibility of serotonin receptors site action.

Keywords: Antidepressant, basil, leaves, force swimming test, tail suspension test.

Abstrak: Menentukan aktivitas antidepresi beberapa fraksi daun *Ocimum basilicum* L. Metode percobaan menggunakan *Force Swimming Test* dan *Tail Suspension Test*. Percobaan dibagi kedalam tujuh kelompok. Kelompok kontrol negatif (CMC 1%), kelompok kontrol positif (fluoxetine 0,052 mg/20 g BB mencit), kelompok uji I (fraksi *n*-heksana 50 mg/Kg BB), kelompok uji II (fraksi etil asetat 50 mg/Kg BB), kelompok uji III (fraksi etanol 50 mg/Kg BB), kelompok uji IV (kombinasi siproheptadin 0,0208 mg/20 g BB mencit dan fluoxetine 0,052 mg/20 g BB mencit) dan kelompok uji V (kombinasi siproheptadin 0,0208 mg/20 g BB mencit dan fraksi etil asetat 50 mg/Kg BB). Fraksi etil asetat menunjukkan perbedaan bermakna ($p < 0,005$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif dan memiliki waktu penurunan immobilitas yang paling baik dibandingkan kelompok yang lain. Aktivitas kerja kemungkinan direseptor serotonin karena pemberian siproheptadin meningkatkan waktu immobilitas pada kelompok uji V. Fraksi etil asetat memberikan aktivitas antidepresi paling baik dengan kemungkinan lokasi kerja pada reseptor serotonin.

Keywords: Antidepresi, selasih, daun, *force swimming test*, *tail suspension test*.

INTRODUCTION

PEOPLE sometimes experience painful state physically, mentally or socially. Illness caused by mental experience increase year to year due to the clashes in family life, society and economy. At present, the problems faced more difficult and the pressure is getting great⁽¹⁾. People who can't deal with this condition will develop into diseases such as hypertension, stroke, asthma, sleeplessness, fatigue, anxiety, depression, amenorrhea, and others⁽²⁾. One of the mental illness discussed in this study is depression. Depression is a heterogeneous state accompanied by some typical and repetitive bodily reaction⁽³⁾. The prevalence of depression in Indonesia is quite high around 6%, while in the world about 5-10% per year⁽⁴⁾.

Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI), Tricyclic Antidepressant (TCA), Serotonin Norephiperine Reuptake Inhibitor, Monoamine Oxidase Inhibitor (MAO-I), and Serotonin Dopamine Activity Modulator (SDAMs) are effective medications for depression. However, failure of the medications arises, caused not by clinical resistance but by medication noncompliance. This noncompliance related to tolerability and safety of the medication^(5,6).

Tolerability, fast action and high remission are ideal drugs for depression. Herbal medicine is known to have good tolerability and safety, with the general belief that "Natural is Better"^(7,8). *Ocimum basilicum* L. is one of medicinal plant known to have an antidepressant effect^(9,10). Many researches have been conducted about this activity, but the activity of some fractions of this plants is unknown. Therefore, we are conducting an assay of antidepressant activity of some fractions of the leaves of basil (*Ocimum basilicum* L.) against male swiss webster mice and determine the antidepressant mechanism possibility

MATERIALS AND METHODS

MATERIALS. Plant Material. Fresh leaves of *Ocimum basilicum* L. were collected from Manoko Bandung, Indonesia. Plant identification and authentication were done by the Herbarium of School of Life Sciences, Institut Teknologi Bandung, Indonesia.

Animals. Swiss webster strain of male mice weighing between 20-30 g were used and purchased from The Institute of Health Science Bakti Tunas Husada Tasikmalaya, West Java, Indonesia. The mice were housed in wire mesh cages under standard conditions (temperature, 25-30 °C, 12 h lights and 12 h dark cycles) and allowed to acclimatize for 5 days. The mice were fed with standard pellets diet and water

was given ad libitum. The animals treatment have been in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals. All efforts were conduct to minimize animal suffering.

METHODS. Preparation of Extract. The leaves were washed in tap water and shade-dried after which they were reduced to a fine powder by grinding. Extraction of the grinded *Ocimum basilicum* L. leaves as much as 90 grams is soaked using 96% ethanol solvent and stored in a place protected from sunlight while being shaken. The maceration was carried out in triplicate. The results of maceration are filtered and concentrated using a rotary evaporator. The extract is referred to as concentrated ethanolic extract. Then the process of fractionation use liquid-liquid extractions from concentrated ethanolic extracts is based on the difference of polarity of the organic solvent in. Ethanol concentrated extract was dissolved in a water-ethanol solvent (6: 4) then fractionated with *n*-hexane solvent in a 1:1 (v/v) ratio. The fractionation is done by separating funnel, so that two fractions of *n*-hexane fraction with ethanol-water fraction are obtained. The fractionations was continued between the ethanol-water fraction with the ethyl acetate fraction with a ratio of 1:1. Three fractions were obtained which are ethanol-water fraction, *n*-hexane fraction and ethyl acetate fraction. Moreover, each fraction is then concentrated using a rotary evaporator. Concentrated fraction then used as an fraction test for antidepressants activity.

Phytochemical Screening. Phytochemical screening is performed on simplicia and each fraction of ethanol-water, *n*-hexane and ethyl acetate to determine secondary metabolite content such as alkaloids, flavonoids, tannins, phenols, saponins, quinones, steroids/triterpenoids and monoterpene/sesquiterpen.

Forced Swimming Test. The experimental group was divided into 7 groups they are negative control group (CMC 1%), positive control group (fluoxetine 0.4 mg/Kg BW), test I group (fraction of *n*-hexane 50 mg/Kg BW), test II group (fraction of ethyl acetate 50 mg/Kg BW), test III group (fraction of ethanol 50 mg/Kg BW), Test IV group (cyproheptadine 0,0208 mg/20g BW, followed by fluoxetine 0,052 mg/20 g BW, 30 minutes apart) and Test V group (cyproheptadine 0,0208 mg/20 g BW, followed by ethyl acetate fraction 50 mg/Kg BW). The test performed after one hour at the last treatment for 6 minutes and counting after 2 minutes⁽⁷⁾.

Tail Suspension Test. The test performed after one hour at the last treatment for 6 minutes and counting after 2 minutes. The animals are suspended by their tails with tape, in such position that it cannot escape or hold on to neraby surfaces⁽⁷⁾.

Statistical Analysis. The results are presented in the mean \pm SE. Statistical analysis using ANOVA and followed with LSD (Least Significant Difference) using SPSS 16.0.

RESULT AND DISCUSSION

RESULT. Preliminary Phytochemical Screening.

Phytochemical screening is performed on simplicia and fractions to determine the presence of secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, tannins, phenols, quinones, saponins, steroids/triterpenoids, monoterpenes and sesquiterpenes.

Phytochemical screening of simplicia, *n*-hexane fraction and ethyl acetate fraction shown in the Table 1. The simplicia are contained flavonoids, steroids/triterpenoids and monoterpenes/sesquiterpen. The ethanol fraction showed the presence of flavonoids and saponins, while for *n*-hexane and ethyl acetate fraction positive for flavonoid, steroid/triterpenoid and monoterpene/sesquiterpene.

Forced Swimming Test. The ethyl acetate fraction showed significant difference ($p < 0.05$) than negative control group. Although the fraction of *n*-hexane and ethanol fraction did not give significant difference ($p > 0.05$), but they are able to decrease of immobility time at 20.1% and 24.7% respectively. Positive group (Fluoxetine) able to decrease the immobility time at 35.9%.

Administration add-on of Cyproheptadine decrease the effect of fluoxetine as indicated by an increase in immobility time at 42.7% than Fluoxetine alone. This results showed cyproheptadine able to block fluoxetine effectivity.

The test group of ethyl acetate fraction that previously given Cyproheptadine also gave the same pattern as in the Fluoxetine group. The ethyl acetate fraction activity was eliminated by the Cyproheptadine.

Tail Suspension Test. The test results of antidepressant activity with Tail Suspension Test method showed similar result with Forced Swimming Test method that showed that ethyl acetate fraction gave significant difference ($p < 0.05$) in decreasing of immobility time compared with negative control group and gave decreasing of immobility time better than the positive group, *n*-hexane fraction and ethanol fraction. Hexane fraction group and the positive group in the Tail Suspension Test method gave significant differences ($p < 0.05$) in decreasing immobility time compared to the negative control group. While in the ethanol fraction group did not give a significant difference ($p > 0.05$) compared to the negative control group, although when viewed by a numerous group of ethanol fraction gives time immobility decrease when compared with the negative control group equal to 7.9%.

In testing of cyproheptadine activity against fluoxetine with Tail Suspension Test method gives the same result as for Forced Swimming Test method where ethyl acetate fraction group previously given cyproheptadine gives an increase of immobility time compared with only giving ethyl acetate fraction alone of 33.3% Which originally gave significant difference ($p < 0.05$) to the negative group to no significant difference ($p > 0.05$).

Similarly, testing of the ethyl acetate fraction group was given cyproheptadine previously using the Tail Suspension Test method showed similar results as the Forced Swimming Test method. The ethyl acetate group previously gave cyproheptadine resulted in an increase in immobility time compared to the ethyl acetate group without cyproheptadine.

DISCUSSION. Testing of antidepressant activity against some fractions of the *Ocimum basilicum* plant that is *n*-hexane fraction, ethyl acetate fraction and ethanol fractions derived from the fractionation of the viscous extract from the ethanol extract is an

Table 1. Results of phytochemical screening.

No	Secondary metabolite	Simplisia	Hexane fraction	Ethyl acetate fraction	Ethanol fraction
1	Alkaloids	-	-	-	-
2	Flavonoids	+	+	+	+
3	Tannins	-	-	-	-
4	Phenols	-	-	-	-
5	Saponins	-	-	-	+
6	Quinones	-	-	-	-
7	Steroids/ Triterpenoids	+	+	+	-
8	Monoterpene/ sesquiterpenes	+	+	+	-

Table 2. Result of antidepressant activity test by force swimming test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	131.4±69.4
2	Positive control group (Fluoxetine 0.052/20 g BW mice)	84.2±59.4
3	Test I group/ n-hexane fraction (50mg/Kg BW)	105.0±23.6
4	Test II group/ ethyl acetate fraction (50mg/Kg BW)	37.0±43.2*
5	Test III group/ ethanol fraction (50mg/Kg BW)	99.0±60.0

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

Table 3. Results of cyproheptadine and fluoxetine combination against fluoxetine alone by force swimming test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	131±69.4
2	Positive control group (Fluoxetine 0.052/20 g BW mice)	84.3±59.4
3	Test IV group (combination of cyproheptadine 0,0208 mg/20 g BW of mice and fluoxetine 0,052 mg/20 g BW of mice)	147±29.7

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

Table 4. Results of cyproheptadine and ethyl acetate fraction combination against ethyl acetate alone by force swimming test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	131±69,4
2	Test II group/ ethyl acetate fraction (50mg/Kg BW)	37.0±43.2*
3	Test V group (combination of cyproheptadine 0,0208 mg/20 g BW of mice and fraction of ethyl acetate 50 mg/Kg BW)	81.0±39.0

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

Table 5. Results of antidepressant activity testing by tail suspension test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	216±35.7
2	Positive control group (Fluoxetine 0.052/20 g BW mice)	107.6±57.6*
3	Test I group/ n-hexane fraction (50mg/Kg BW)	138.6±24.4*
4	Test II group/ ethyl acetate fraction (50mg/Kg BW)	120.6±42.4*
5	Test III group/ ethanol fraction (50mg/Kg BW)	198.8±67.9

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

Table 6. Results of cyproheptadine and fluoxetine combination against fluoxetine alone by tail suspension test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	216.0±35.7
2	Positive control group (Fluoxetine 0.052/20 g BW mice)	107.6±57.6*
3	Cyproheptadine group (0.0208mg/20g BW mice) + Positive control group (Fluoxetine 0.052/20 g BW mice)	161.4±46.4

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

Table 7. Results of cyproheptadine and ethyl acetate fraction combination against ethyl acetate alone by tail suspension test method.

No	Group	Mean of immobility (s)
1	Negative control group (CMC 1%)	216,0±35,7
2	Test II group (50mg/Kg BW)	120,6±42,4*
3	Cyproheptadine group (0,0208mg/20g BW mice) + Test II group (50mg/Kg BW)	181,7±91,7

Exp: Tests were performed with 5 replications, * = showing significant differences when compared with negative groups.

effort to develop and search for new antidepressant drugs derived from natural materials. The search and development of this new antidepressant drug use a simple method of behavioral testing that is Forced Swimming Test and Tail Suspension Test as a first step before performing a complex test.

Forced Swimming Test and Tail Suspension Test are a method that has a good prediction validity, fast and economical to detect a substance that has activity as an antidepressant. In addition, both methods are also based on the same principle of determining the duration of immobility when test animals are exposed to an inescapable situation^(11,12).

The results of antidepressant activity testing using the two methods above showed that ethyl acetate fraction group (50 mg/Kg BW) gave the best and consistent result in decreasing immobility time when compared with the negative group, positive group, *n*-hexane fraction and ethanol fraction. Based on these results, the ethyl acetate fraction is continued to further testing intended to determine the general description of its mechanism by providing prior cyproheptadine to the ethyl acetate fraction group. Cyproheptadine is intended to determine the anti-serotonin effect of fluoxetine. Cyproheptadine is an anti-serotonin and antihistamine drug that has been shown to inhibit the effects of serotonin^(13,14,15).

Cyproheptadine administration using Forced Swimming Test method can decrease the effect of fluoxetine as indicated by the increase of immobility time compared with 42.7% of the fluoxetine alone. In addition, testing of cyproheptadine activity against fluoxetine by Tail Suspension Test method gave the same result as the Forced Swimming Test method where ethyl acetate fraction group previously gave cyproheptadine resulted in an increase in immobility time compared to only the fraction of ethyl acetate alone for 33.3%. This indicates that the effect of serotonin through increased serotonin concentrations produced by fluoxetine through resistance to the retrieval of serotonin neurotransmitters may be inhibited by cyproheptadine as an antiserotonergic by inhibiting serotonin to interact with its receptors^(14,16,17).

The ethyl acetate fraction which given cyproheptadine previously gives the same pattern as in fluoxetine group. The significant decrease of immobility time ($p < 0.05$) can be eliminated in the presence of cyproheptadine. In addition, ethyl acetate fraction group testing using Tail Suspension Test method showed the same result as Forced Swimming Test method. The ethyl acetate group previously gave cyproheptadine resulted in an increase of immobility time compared with ethyl acetate group without cyproheptadine of 33.62%. This provides a consistent result and as a confirmation that the ethyl acetate group in its activity decreases the time of immobility through the presence of the role of serotonin neurotransmitter, since cyproheptadine is known to inhibit serotonin receptors^(16,17).

However, further research is needed on the compound responsible for the immobility reduction activity, although flavonoids and terpenoids or essential oils are considered compounds that provide antidepressant activity, especially when involving interference with monoamine^(18,19,20). The ethyl acetate fraction proved to have a positive flavonoid and essential oil content (terpenoid) based on phytochemical screening results performed on the ethyl acetate fraction. According to⁽²¹⁾, *Ocimum basilicum* contains flavonoids such as luteo.6-arabinose.8-glucose, luteo.6-glucose.8-arabinose, apig.6-rhaminose.8-galactose, apig.6-rhaminose.8-glucose, apig.6-glucose.8-rhaminose, rutin, hesperidin, rosmarinic acid, apig.7-o-neohespiroside, apiginine-7-glucose, quercetin, naringenin, hesperidin, camphorol, apigenin. Naringenin has antidepressant activity through the serotonergic and noradrenergic system⁽¹⁸⁾. While linalool and 1.8 cineol are essential oils that are considered to have an effect as antidepressants and mood improvements^(15,22).

CONCLUSION

The three fractions of *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol showed that ethyl acetate fraction give the best result, consistent and give significant difference ($p <$

0.05) in decreasing time immobility with the mechanism of action may through the role of serotonin. However, more study are needed to find compound that give antidepressant activity from the ethyl acetate fraction.

ACKNOWLEDGMENT

Authors thanks to Dr. Ruswanto as a chief of research, development and community service of Institute of Health Science Bakti Tunas Husada for the support.

REFERENCES

- Priatna M, Kalpataru Y, Sukmawan YP. Uji efektifitas antidepresi infusa daun selasih (*Ocimum basilicum* Linn.) terhadap mencit jantan galur swiss webster. Tasikmalaya: STIKes BTH; 2010.
- Corwin JE. Patofisiologi. Jakarta: EGC; 2001.
- Ganiswara. Farmakologi dan terapi. Jakarta: UIP; 2005.
- Ministry Department of Health. Riset kesehatan dasar. Research and Health Development Agency Ministry Department of Health of Republic Indonesia; 2013.
- Jerry LH, Ravinder NB, Pascale MB, Louise BA, Rachel CL. 2016. Depression medication. [online] diambil dari <http://emedicine.medscape.com/article/286759-medication>. diakses 17 Juli 2017.
- Sweetman SC. Martindale the complete drug reference. 30th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- Zheng M, Li Y, Shi D, Liu C, Zhao J. Antidepressant-like effect of flavonoid extracted from *Apocynum venetum* leaves in mice: the involvement of monoaminergic system in mice. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2014; 8(29): 765-74.
- Sukandar E Y, Ridwan A, Sukmawan Y P. Vasodilatation effect of ethanolic extract of *Anredera cordifolia*, *Sonchus arvensis* L., and ursolic acid on isolated rabbit aortic and frog heart. Int J Pharm Pharm Sci. 2016; 8(2):145-9.
- Tewari D, Pandhey HK, Sah AN, Meena H, Chander V, Singh R et al. Phytochemical, antioxidant and antidepressant evaluation of *Ocimum basilicum*, *O. tenuiflorum*, *O. kilimandscharicum* Grown in India. TBAP 2015; 5(2):120-31.
- Apsera* L. Efek minyak atsiri daun kemangi *Ocimum basilicum* sebagai antidepresan pada tikus wistar: ditinjau dari immobility time dengan metode force swim test. Surabaya: Undip; 2010.
- Castagne V, Moser P, Roux, Porsolt RD. Rodent models of depression: forced UNIT 8.10A swim and tail suspension behavioral despair tests in rats and mice. Current Protocols in Neuroscience 8. 2011; 10A:1-8.
- Santosh P, Venugopl R, Nilakash AS, Kunjibhari S, Mangala L. Antidepressant activity of methanolic extract of passiflora foetida leaves in mice. Int J Pharm Pharm Sci. 2011; 3(1):112-5.
- Stone CA, Wenger HC, Ludden CT, Stavorski JM, Ross CA. Antiserotonin-antihistaminic properties of cyproheptadine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics January. 1961; 131(1):73-84.
- Lappin R and Auchincloss EL. Treatment of the serotonin syndrome with cyproheptadine. N Engl J Med. 1994; 331:1021-22.
- Rossi S. Australian medicines handbook. Adelaide: The Australian Medicines Handbook Unit Trust; 2013.
- Martin P, Waters N, Schimdt CJ, Carlsson A, Carlson ML. "Rodent data and general hypothesis : antipsychotic action extend through 5-HT_{2A} receptor antagonism is dependent in increased serotonergic tone". Journal of Neural Transmission. 1998; 105(4-5):365-96.
- Lindley C and Blower, P. Oral serotonin type 3-receptor antagonists for prevention of chemotherapy-induced emesis. American Journal of Health-System Pharmacy. 2000; 57 (18):1685-97.
- Yi LT, Li CF, Zhan X, Cui CC, Xiao F, Zhou LP, et al. Involvement of monoaminergic system in antidepressant-like effect of flavonoids naringenin in mice. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010; 34:1223-28.
- Fernandez et al. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. European Journal of Pharmacology. 2006; 539:168-76.
- Rabwani M, Sajjadi S E, Vaezi A. Evaluation of anxiolytic and sedative effect of essential oil and hydroalcoholic extract of *Ocimum basilicum* L. and chemical composition of its essential oil. Res Pharm Sci 2015; 10(6): 535-43.
- Hozayen WG, El-Desouky MA, Soliman HA, Ahmed RR, Khaliefa AK. Antiosteoporotic effect of *Petroselinum crispum*, *Ocimum basilicum* and *Cichorium intybus* L. in glucocorticoid-induced osteoporosis in rats. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2016; 16:165.
- Moss M and Oliver L. Plasma 1,8-cineole correlates with cognitive performance following exposure to rosemary essential oil aroma. Ther Adv Psychopharmacol. 2012; 2(3):103-13.

Efek Serbuk Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Jumlah Sel CD4 pada Sukarelawan Sehat

(The Effect of Rosella (*Hibiscuss sabdariffa* L.) Powder on CD4 Counts in Healthy Volunteers)

DINI MARDHIYANI^{1*}, ENDANG DARMAWAN¹, AKROM^{1,2}

¹Pascasarjana Farmasi, Fakultas Farmasi,

²Pusat informasi dan kajian obat Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta
Jl. Prof. Dr Soepomo, S.H. Janturan Yogyakarta 55164

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 22 September 2018

Abstrak: Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) memiliki kandungan antioksidan yang terbukti berkhasiat dan aman melalui uji klinis dan praklinik sebagai imunostimulan. Unsur antioksidan di dalam bunga Rosella yaitu antosianin, kuersetin, L-*ascorbic acid* dan *protocatechuic acid*. Penelitian uji klinik ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian serbuk bunga Rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* L.). Penelitian ini menggunakan desain *pre-post treatment*. Subjek penelitian terdiri dari 21 sukarelawan sehat yang telah memenuhi kriteria inklusi, eksklusi dan bersedia mengisi *informed consent*. Sukarelawan sehat diberikan perlakuan serbuk bunga Rosella dosis 500 mg sekali sehari selama 30 hari. Pemeriksaan jumlah limfosit dan sel CD4 dilakukan menggunakan *hematology analyzer* dan *flowcytometer*. Persentase sel CD4 adalah 30,85% (hari ke-0) dan 34,15% (hari ke-31). Rata-rata untuk jumlah *absolut* sel CD4 adalah 767,04 sel/mm³ (hari 0) dan 696,42 sel/mm³ (hari ke-31). Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh yang signifikan ($p > 0,05$) pada jumlah *absolut* sel CD4 dan ada pengaruh signifikan persentase CD4 ($P < 0,05$). Kesimpulan dari penelitian ini bahwa pemberian serbuk bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dosis 500 mg/hari selama 30 hari meningkatkan persentase sel CD4.

Kata kunci: Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.), antosianin, CD4, sukarelawan sehat.

Abstract: Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) have antioxidants which are proven to be beneficial and safe through clinical and preclinical testing as immunostimulants. Antioxidants in Roselle flower are hibiscus anthocyanin, quercetin, L-*ascorbic acid* and *protocatechuic acid*. The purpose of this clinical trial was to determine the effect of ethanol extract of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) to CD4 cell count. This study used pre-post treatment design. A total of 21 healthy volunteer were chosen according to inclusion and exclusion criteria and filled informed consent. Healthy volunteer were given Rosella powder in capsules form with 500 mg dose for 30 days. Analyzed CD4 cell count was conducted using hematology analyzer and flowcytometer. The percentage of CD4 cells was 30.85% (day 0) and 34.15% (day 31st). The average for the absolute number of CD4 cells was 767.04 cells/mm³ (day 0) and 696.42 cells/mm³ (day 31st). Results showed that there was no significant effect ($p > 0,05$) of CD4 cell absolute count and there was a significant effect of CD4 percentage ($p < 0,05$). This study concluded that 500 mg roselle petal ethanol extract powder (*Hibiscus sabdariffa* L.) given everyday for 30 days showed some effect on d increasing CD4 cell percentage.

Keywords: Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), anthocyanin, CD4, healthy volunteer.

*Penulis korespondensi: Hp :0822422309552/085265480830
Email: dinimardhiyani7@gmail.com

PENDAHULUAN

BUNGA Rosella (*Hibiscus sabdariffa* Linn) bermanfaat sebagai imunostimulan karena kandungan senyawa antosianin dan memiliki antioksidan yang tinggi⁽¹⁾. Unsur antioksidan di dalam bunga Rosella yaitu *hibiscus anthocyanin*, *quercetin*, *L-ascorbic acid* dan *protocatechuic acid* (PCA)^(2,3). Ekstrak metanol bunga rosella dengan konsentrasi 16,59 mg/mL memiliki aktivitas antioksidan yang cukup poten melalui 50% penghambatan radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH).

Potensi antioksidan yang dimiliki ekstrak bunga rosella dapat dimanfaatkan sebagai imunostimulator. Penggunaan ekstrak bunga Rosella sebagai imunostimulator dapat dilihat efeknya melalui parameter sistem imun, salah satunya dengan melihat jumlah limfosit. Limfosit terdiri dari tiga jenis sel yaitu limfosit T, limfosit B, dan sel *natural killer* (NK). Limfosit T merupakan sistem imun spesifik, salah satu diantaranya diperankan oleh sel T *Cluster of Differentiation 4* (CD4)⁽⁴⁾. CD4 adalah sebuah *marker* atau penanda yang berada di permukaan sel-sel darah putih manusia maupun hewan, terutama sel-sel limfosit.

Hal yang mendukung potensi serbuk bunga Rosella sebagai imunostimulator dengan adanya beberapa penelitian praklinik. Penelitian yang dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol bunga rosella dengan dosis 10, 50, dan 100 mg/kg BB selama 21 hari berpotensi untuk berkembang sebagai agen imunomodulator dengan efek peningkatan sekresi interleukin-10 (IL-10) dan interleukin-14 (IL-14)⁽⁵⁾.

Suatu tanaman yang berpotensi dijadikan fitofarmaka harus terbukti berkhasiat dan aman melalui uji praklinik dan uji klinik. Uji toksisitas akut ekstrak etanol bunga Rosella memiliki nilai *lethal dose* 50 (LD₅₀) sebesar 5000 mg/kgBB. Berdasarkan nilai LD₅₀ yang dimiliki ekstrak etanol bunga Rosella dikategorikan toksisitas ringan (5-15 g/kg)⁽⁶⁾ dan uji toksisitas subkronis dengan nilai *no observed effect level* (NOEL) 1,25g/kgBB⁽⁷⁾. Pada uji praklinik di atas diperlukan untuk melanjutkan ke fase uji klinik⁽⁸⁾ dengan tujuan melihat keamanan dan pengaruh kapsul bunga Rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari terhadap jumlah sel CD4.

BAHAN DAN METODE

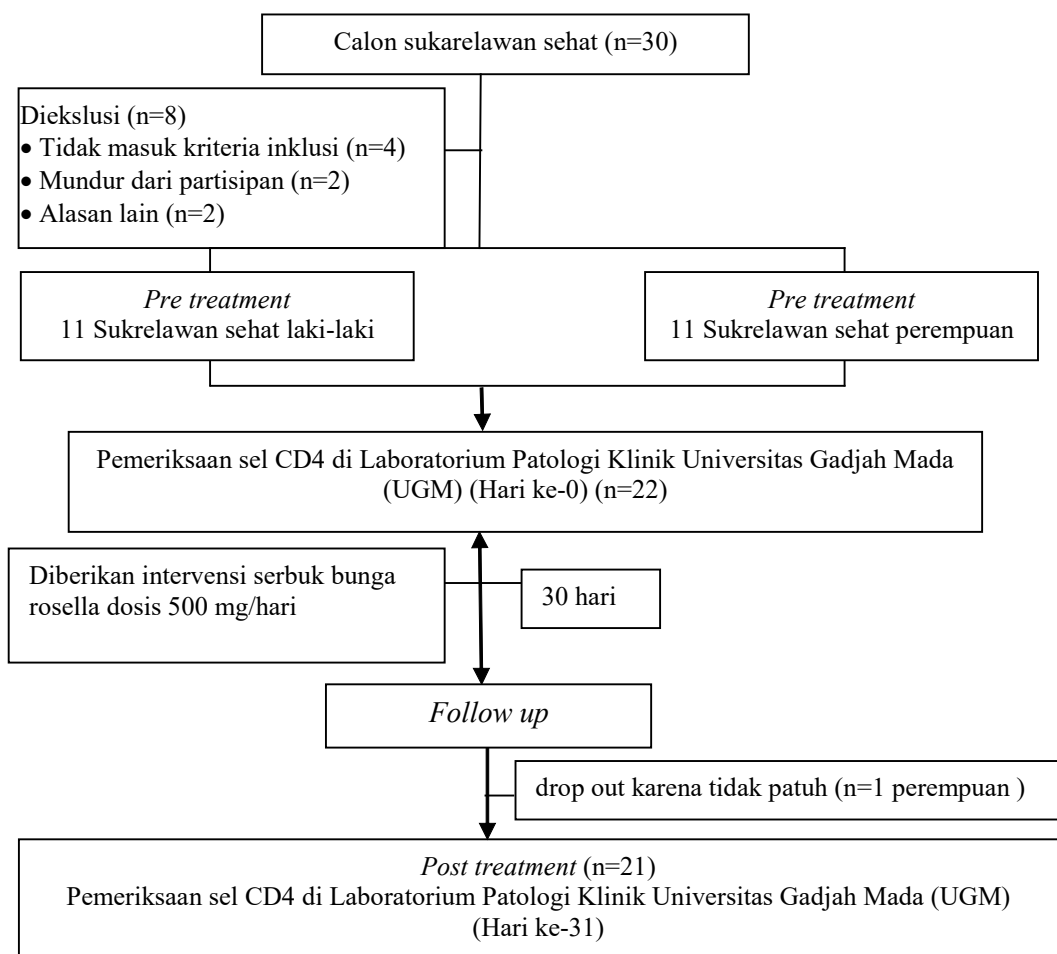
BAHAN. Serbuk bunga Rosella dari PT. Natura (Product code: 5055C, Batch: RH162703), tabung EDTA, reagen antibodi CD4-FITC dan larutan reagen FACS (*Propidium Iodide*:50 µg/mL, RNase : 20 µg/mL, Triton-X 100: 0.1 %), sampel darah sukarelawan sehat.

METODE. Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental *pre-post treatment*. Subyek penelitian sebanyak 21 orang terdiri dari 11 orang laki-laki dan 10 orang perempuan yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Serbuk bunga Rosella diproduksi dengan standarisasi pabrik PT. Natura dikemas dalam bentuk kapsul diberikan pada sukarelawan dengan dosis 500 mg 1 kali sehari selama 30 hari untuk melihat pengaruh pemberian serbuk bunga Rosella selama 30 hari. Skema penelitian ditampilkan pada Gambar 1.

Sampel darah sukarelawan diambil sebelum (hari ke-0) dan setelah 30 hari mengonsumsi serbuk bunga Rosella (hari ke-31) untuk melihat pengaruh pemberian serbuk ekstrak etanol bunga Rosella selama 30 hari.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi. Kriteria inklusi: laki-laki dan perempuan sehat berusia 18-50 tahun, sehat dinyatakan berdasarkan pemeriksaan klinis sukarelawan berupa *vital sign*, meliputi tekanan darah (TD), suhu tubuh, denyut nadi (*heart rate*, HR) dan tingkat pernapasan (*respiration rate*, RR) dan dinyatakan dalam surat keterangan sehat dengan didukung oleh pemeriksaan laboratorium klinis yang meliputi hematologi rutin, fungsi hati, fungsi ginjal, riwayat penyakit, dan pemeriksaan fisik, tidak merokok, indeks massa tubuh (IMT) berkisar antara 18-30 kg/m², tidak mengonsumsi vitamin atau suplemen kesehatan selama penelitian berlangsung. Kriteria eksklusi: wanita hamil, tidak minum obat sesuai interval dan petunjuk penggunaan obat, menggunakan herbal lain selama penelitian berlangsung.

Variabel. Variabel bebas pada penelitian ini adalah pemberian serbuk bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan dosis 500 mg, satu kali sehari selama 30 hari. Variabel terikat pada penelitian ini adalah CD4.



Gambar 1. Skema penelitian.

Pembuatan Pemeriksaan CD4. Darah sukarelawan sehat diambil pada bagian vena *median cubiti* atau *cephalica* dan dimasukkan kedalam tabung EDTA dan dikumpulkan untuk dilakukan pemeriksaan jumlah sel CD4 dengan alat *flow cytometer*. Sampel darah dipipet ke dalam tabung *falcon* sebanyak 50 μL . Ditambahkan 5 μL reagen antibodi CD4 FITC ke masing-masing tabung *falcon*. Campuran tersebut dicampur sampai homogen dengan *vortex mixer* selama 1 menit, kemudian diinkubasi 15 menit dengan suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ pada ruang gelap. Setelah masa inkubasi selesai, pada sampel ditambahkan 450 μL larutan reagen FACS (1x) yang sudah diencerkan. Diinkubasi lagi 15 menit dengan suhu 20-25 $^{\circ}\text{C}$ pada ruang gelap. Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan analisis dengan menggunakan alat FACS *flow cytometer*⁽⁹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan jumlah sel CD4 pada sampel darah sukarelawan sehat untuk melihat pengaruh serbuk bunga Rosella pada sistem imun spesifik selular dengan menggunakan metode *flowcytometry*. Dari hasil pemeriksaan sel CD4 pada 21 sukarelawan

sehat (Tabel 1) rata-rata hasil pemeriksaan jumlah persentase sel CD4 adalah 30,85% (hari ke-0), dan 34,15% (hari ke-31). Rata-rata untuk jumlah absolut sel CD4 (Tabel 1) adalah 767,04 sel/ mm^3 (hari ke-0) dan 696,42 sel/ mm^3 (hari ke-31).

Dari hasil pemeriksaan jumlah sel CD4, sebanyak 21 sukarelawan sehat yang mengikuti penelitian masih dalam rentang normal rata-rata jumlah CD4 manusia sehat populasi orang indonesia, yaitu 482,7-1023,3 sel/ mm^3 (753,3 \pm 270,3 sel/ mm^3) untuk absolut CD4 dan 24,9-40,3% (32,6 \pm 7,7%) untuk persentase CD4⁽¹⁰⁾.

Dari analisis statistik data, diketahui bahwa jumlah absolut sel CD4 dengan uji Wilcoxon (Tabel 1) tidak memperlihatkan perbedaan signifikan ($p > 0,05$) pada hari ke-31. Nilai $p = 0,230$. Sementara, hasil analisis terhadap jumlah persentase sel CD4 dengan uji t (Tabel 1) memperlihatkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) pada hari ke-31. Hal itu ditunjukkan dengan nilai $p = 0,003$. Perbedaan signifikan pada jumlah persentase sel CD4 secara statistik mengindikasikan adanya peningkatan jumlah rata-rata persentase sel CD4 pada hari ke-31. Adanya peningkatan jumlah rata-rata persentase sel CD4 pada hari ke-31 itu disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak yang dianggap bertanggung

Tabel 1. Hasil analisis rata-rata jumlah absolut dan persentase sel CD4 hari ke-0 dan hari ke-31 pada sukarelawan sehat (n=21).

Parameter	Rata-rata±Simpangan Baku		Nilai P	Nilai normal	Uji statistik
	Hari ke-0	Hari ke-31			
Absolut CD4 (sel/mm ³)	767,04±304,06	696,42±232,71	0,230	482,7-1023,3	<i>Wilcoxon</i>
Persentase CD4 (%)	30,85±5,90	34,15±5,59	0,003*	24,9-40,3	<i>Paired T test</i>

Keterangan : * = terdapat pengaruh signifikan

jawab.

Jadi, sebagaimana dilaporkan bahwa senyawa glikosida flavonoid dapat meningkatkan jumlah sel CD4 pada mencit yang tertekan sistem imunnya⁽¹¹⁾. Namun, perubahan jumlah persentase sel CD4 pada penelitian ini masih dalam rentang normal rata-rata jumlah sel CD4 manusia sehat populasi orang Indonesia. Secara klinis tidak terdapat perbedaan yang signifikan berdasarkan nilai selisih rata-rata jumlah persentase sel CD4.

Sel CD4 memiliki peran dalam regulasi pemeliharaan sistem imun dan mengontrol berbagai respons imun dengan mencegah atau membatasi respons imun yang disebut *regulatory T cells* (TR)⁽¹²⁾. Suatu imunostimulator dapat mengaktifasi sistem imun dengan berbagai cara, seperti meningkatkan jumlah aktivitas sel T, NK-cell, dan makrofag serta melepaskan interferon dan interleukin⁽¹³⁾. Sel CD4 yang dirangsang oleh antigen untuk mengeluarkan faktor supresi antigen spesifik akan merangsang sel sel T supresor (Ts) untuk menekan sel efektor. Antigen yang mengadakan bridging antara sel Ts dengan sel limfosit lain (sel B dan sel Th) akan menekan aktivasi sel B dan sel Th melalui Ts. Oleh sebab itu, sel CD4 yang terdapat di dalam tubuh dapat memberikan efek terhadap kontrol sistem imun pada sukarelawan sehat⁽¹⁴⁾.

Pada penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa pemberian ekstrak etanol bunga Rosella dosis 150 µg/mL dapat meningkatkan aktivitas makrofag⁽¹⁵⁾. Makrofag berperan penting dalam imunitas spesifik dan nonspesifik. Aktivasi makrofag akan mensekresi sitokin (IL-1, IL-6, IL-12, dan TNF-α) dan mengaktifasi sel T untuk mensekresi IFN-γ⁽¹⁶⁾. Sekresi IFN-γ dapat meningkatkan ekspresi MHC kelas II. MHC II yang mempersentasikan antigen memicu respons subset sel T CD4⁽¹⁷⁾.

Peningkatan jumlah persentase sel CD4 diawali adanya antigen yang memicu sistem kekebalan tubuh. Pemicuan sistem dimulai dari pertahanan tubuh nonspesifik dengan cara memusnahkan antigen

serta pertahanan tubuh spesifik dengan membentuk pertahanan yang lebih kompleks melalui produksi antibodi ataupun dengan memproduksi berbagai sitokin⁽¹⁸⁾.

Peningkatan persentase sel CD4 pada penelitian ini dapat dipicu oleh adanya kandungan senyawa fenol dan flavonoid pada serbuk bunga Rosella yang berperan sebagai antigen atau mitogen. Dalam hubungan itu, makrofag mengubah antigen yang ditangkap menjadi peptida antigen kemudian diikat oleh molekul *major histocompatibility komplek* (MHC) dan dipresentasikan oleh antigen *presenting cell* (APC) yang selanjutnya dikenal oleh reseptor sel B maupun sel T melalui reseptor. Pengikatan peptida antigen oleh reseptor mengaktifasi G-protein yang kemudian memproduksi fosfolipase C. Enzim ini menghidrolisis *Phosphatidil Inositol Biphosphat* (PIP2) menjadi produk reaktif *Diasylglyserol* (DAG) dan *Inositol Triphosphat* (IP3). IP3 menstimulasi pelepasan Ca²⁺ ke dalam sitoplasma sehingga konsentrasi Ca²⁺ meningkat. Peningkatan Ca²⁺ berperan untuk menstimulasi kerja enzim protein kinase C dan 5-lipoxigenase. Protein kinase C menstimulasi produksi interleukin-2 (IL-2)⁽¹⁹⁾. IL-2 merangsang sistem kekebalan tubuh dan meningkatkan jumlah sel CD4⁽²⁰⁾.

Potensi peningkatan imun melalui jalur *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) oleh bunga Rosella⁽²¹⁾ termasuk salah satu mekanisme bunga Rosella dalam meningkatkan jumlah sel CD4. Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk memicu aktivitas MAPK yang dapat merangsang peningkatan IL-2⁽²²⁾. MAPK berperan dalam aktivasi imunokompeten sel dan menginduksi peningkatan sitokin IL-2. IL-2 menginduksi *proliferasi* sel T, khususnya sel T *helper*^(23,24). Terjadinya peningkatan IL-2 dibuktikan dengan peningkatan ekspresi FOXp3 karena adanya aktivasi interleukin-2 receptor (IL-2R) yang kemudian meningkatkan jumlah CD4CD25 Treg. Peningkatan itu diperlukan untuk menjaga homeostasis sistem imun^(25,26).

Terdapat peningkatan jumlah persentase sel CD4 pada pemberian serbuk bunga rosella pada sukarelawan sehat selama 30 hari. Oleh karena itu, pemberian dosis dan lama waktu penggunaannya sebagai suatu obat herbal untuk imunostimulan menjadi faktor penting⁽²⁷⁾. Penggunaan suatu imunostimulan dalam jangka waktu yang lama tidak memberikan keuntungan tambahan⁽²⁸⁾, bahkan dapat mengganggu sistem imunitas alami yang terjadi pada tubuh.

Sel CD4 yang dirangsang oleh antigen untuk mengeluarkan faktor supresi antigen spesifik akan merangsang sel Ts untuk menekan sel efektor. Antigen yang mengadakan *bridging* antara sel Ts dengan sel limfosit lain (sel B dan sel Th) akan menekan aktivasi sel B dan sel Th melalui Ts⁽¹⁴⁾. Oleh sebab itu, sel CD4 yang terdapat di dalam tubuh dapat memberikan efek terhadap kontrol sistem imun pada sukarelawan sehat.

SIMPULAN

Pemberian serbuk bunga Rosella selama 30 hari memiliki efek meningkatkan jumlah persentase sel CD4 pada sukarelawan sehat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Widyanto, Poppy and A. Nelistya. Rosella aneka olahan, khasiat dan ramuan. Depok : Penebar Swadaya. 2009. Hal 1-14.
2. Hirunpanich V, Utaipat A, Morales NP, Bunyaphatsara N, Sato H, Herunsalee A, et al. Antioxidant effects of aqueous extracts from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Roselle) in vitro using rat low-density lipoprotein (LDL). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2005. 28(3): 481-84.
3. Juniarka, I. Gede Agus dan Endang Lukitaningsih. Analisis aktivitas antioksidan dan kandungan antosianin total ekstrak dan liposom kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Diss. Universitas Gadjah Mada, 2012. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3).
4. Dharmana E, Susilaningih N, Widjayahadi N. Pengaruh pemberian tolak angin cair terhadap jumlah sel T, kadar IFN- γ , dan IL-4. 2007. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. Diambi dari URL:<http://eprints.undip.ac.id/23621/1/Narottama.pdf>. diakses tanggal 23 Juli 2017.
5. Nurkhasanah. The effect of Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) treatment on Il-10 And Il-14 secretion on dimethylbenz (A) anthracene (Dmba) induced rat. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* Vol 7, Issue 4, 2015 P.402-4.
6. Lu FC Kacew. S. Lu's. *Basic Toxicology : Fundamental, target organs*, 5th Ed. Informa Healthcare USA Inc., New York; 2009: 48-9.
7. Suwandi T. Pengembangan potensi antibakteri kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa* L. (rosela) terhadap *Streptococcus sanguinis* penginduksi gingivitis menuju obat herbal terstandar, [Disertasi], Universitas Indonesia, Jakarta. 2012. Hal 199.
8. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan. Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Herbal Nomor 13. Jakarta: BPOM. 2014. Hal 6.
9. Akrom, Nurani LN dan Hidayati T. Kajian aktivitas imunomodulator agen kemopreventif isolate aktif ekstrak *N. sativa* pada kanker payudara akibat paparan DMBA pada tikus putih, [Research report], LPP UAD, 2008. Yogyakarta.
10. Prasetyo AA and Khilyat UNZ. Establishing mean CD4+ t cell values among healthy javanese adults in indonesia, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2008. 46(4):662-8.
11. Chauhan PS, Satti NK, Suri KA, Amina M. Bani S. Stimulatory effect of *Cuminum cyminum* and flavonoid glycoside on cyclosporine-A and restraint stress induced immune-suppression in Swiss albino mice, *Chemico-Biological- Interaction*. 2010. 185(1):66-72.
12. Bluestone JA, Abbas AK. Opinion-regulatory lymphocytes: natural versus adaptive regulatory T cells. *Nature Reviews Immunology*. 2003. 3(3): 253.
13. Kusmardi, Shirly Kumala, Enif ET. 2007. Efek imunomodulator ekstrak daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.) terhadap aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag. *Makara Kesehatan*. 2007. 11(2): 50-3.
14. Asano Y and Hodes RJ. T cell regulation of B cell activation. An antigen-mediated tripartite interaction of Ts cells, Th cells, and B cells is required for suppression. *J. Immunol*. 1984. 133:2864-7.
15. Wulandari D, Puri PR. Efek imunostimulan ekstrak etanol kelopak bunga Rosella. *JFIONline| Print ISSN 1412-1107| e-ISSN 2355-696X*. 2014. 7(1).
16. Puspitasari, Rr.DA, Pratiwi T, Sri M. Efek imunostimulator ekstrak etanol Kayu Manis (*Cinnamomum Burmanii*) terhadap jumlah CD4, dan interferon gamma pada mencit BALB/c yang diinfeksi bakteri *Salmonella enteritidis*. Program Studi Kedokteran Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya. 2012. Hal 6.
17. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologi dasar*, Edisi ke 5, Elsevier, Saunders, Philadelphia. 2016.
18. Lehner MD. Immunomodulation by endotoxin tolerance in murine models of inflammation and bacterial infection, [Disertasi]. University of Konstanz. 2001. hal 3-53.
19. Roitt IM and PJ Delves. *Essential immunology*. 10th ed. Blackwell Science Ltd. London. 2001. 17-25, 75-81.
20. Rosidah. Analisis numerik untuk immunotherapy pada infeksi HIV-1 [Tesis]. Bogor: Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Bogor. 2010. hal 6-18.
21. Shen CY, Wen-Li Zhang, Jian-Guo, Jiang. Immune-enhancing activity of polysaccharides from *Hibiscus sabdariffa* Linn. via MAPK and NF-kB signaling

- pathways in RAW264.7 cells, *Journal of Functional Foods*. 2017. 34: 118–129.
22. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer, *pharmacology, the American society for pharmacology and experimental therapeutics*. 2000. 52:673-751.
 23. Kurniasih. Perilaku dinamik model matematika atas peran IL-2 (Interleukin-2), sel *helper* CD4+ dan sel T regulatori. Skripsi. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang. 2012. Hal 22-4.
 24. Dwijayanti DR, Muhaimin Rifa'I. *Gynura procumbens* ethanolic extract promotes lymphocyte activation and regulatory T cell generation in vitro, *The Journal Of Tropical Life Scienc*. 2015. 5(1):14-9.
 25. Zom E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H. IL-2 regulates FOXP3 expressions in human CD4CD25 regularity T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo, *Blood*. 2006. 108:1571-8.
 26. Lu L and Rudensky A. Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells, *Genes Dev*. 2009. 23:1270-82.
 27. Sakai M. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*. 1999.172: 63-92.
 28. Galeotti M. Some aspects of the application of immunostimulants and a critical review of methods for their evaluation, *J. Appl. Ichthyol*. 1998. 14: 189-99.

Pharmacoeconomic Analysis of Using Cephalosporin Group as Prophylactic Antibiotic in Appendicitis in Rumah Sakit Umum Daerah Subang

(Analisis Farmakoekonomi Penggunaan Golongan Cephalosporin sebagai Antibiotik Profilaksis pada Penderita Apendisitis di Rumah Sakit Umum Daerah Subang)

YULIA WARDATI^{1*}, DYTHA ANDRI DESWAT¹, ZAINAL MUTTAQIN¹

¹Pharmacy Department, Faculty of Mathematics and Natural Science, Universitas Al-Ghifari, Bandung, Indonesia.

Submitted 8 March 2018, Accepted 28 September 2018

Abstract: The administration of cephalosporin group antibiotics in patients with post-surgical appendicitis is necessary to prevent postoperative wound from infection. This pharmacoeconomic study was conducted retrospectively in the period of 1 January to 31 December 2015 in RSUD Subang for the purpose of determining the effectiveness of drugs and the cost of antibiotic (ceftriaxone, cefotaxime, and ceftizoxime injection) by Cost Effectiveness Analysis method. The subject consisted of 78 appendicitis patients. Based on Average Cost Effectiveness Ratio (ACER), ceftriaxone is the most effective (IDR 729,124/day). While the result of cost effectiveness plane was with cefotaxime as standard drug, ceftriaxone occupies quadrant IV (otomatically the drug is not selected) and ceftizoxime occupies quadrant I (need to be calculated ICER). It was concluded that the Incremental Cost Effectiveness Ratio (ICER) of ceftizoxime against cefotaxime is IDR 106,347/day, it indicates that ceftizoxime is cost effective than cefotaxime but it needs consideration of resources especially funds owned and should be selected if sufficient resources are available.

Keywords: Cost effectiveness, prophylactic antibiotics, appendicitis.

Abstrak: Pemberian antibiotik golongan cephalosporin pada pasien dengan apendisitis pasca bedah diperlukan untuk mencegah luka pasca operasi dari infeksi. Penelitian farmakokonomi ini dilakukan secara retrospektif pada periode 1 Januari hingga 31 Desember 2015 di RSUD Subang untuk tujuan menentukan efektivitas obat dan biaya antibiotik (ceftriaxone, cefotaxime, dan ceftizoxime injection) dengan metode *Cost Effectiveness Analysis*. Subyek terdiri dari 78 pasien apendisitis. Berdasarkan Rasio Efektivitas Biaya Rata-rata (ACER), ceftriaxone adalah yang paling efektif (IDR 729.124/hari). Sementara hasil dari diagram efektivitas biaya dengan sefotaksim sebagai obat standar, ceftriaxone menempati kuadran IV (secara otomatis obat tersebut tidak dipilih) dan ceftizoxime menempati kuadran I (perlu dihitung ICER). Disimpulkan bahwa Rasio Efektivitas Biaya Tambahan (ICER) ceftizoxime terhadap sefotaksim adalah IDR 106.347/hari, ini menunjukkan bahwa ceftizoxime lebih efektif-biaya daripada sefotaksim tetapi perlu pertimbangan sumber daya terutama dana yang dimiliki dan harus dipilih jika sumber daya yang cukup tersedia.

Kata kunci: *Cost effectiveness, prophylactic antibiotics, appendicitis.*

*Correspondence Author: Hp :08121476590
Email: yulwar@yahoo.com

INTRODUCTION

THE APPENDICITIS is an acute inflammation of the appendicitis vermiformis. The vermiform appendicitis has a length that varies from 7 to 15 cm⁽¹⁾ and is the most common cause of acute abdominal pain and requires immediate surgical intervention to prevent generally dangerous complications⁽²⁾.

Acute appendicitis is inflammation that requires surgical intervention, usually has a duration of no more than 48 hours, characterized by lower right quadrant, lower right abdominal pain with local tenderness and tenderness over, overlying muscle pain, and skin hyperesthesia⁽¹⁾.

The mortality rate of a cauted appendix is 22,000 inhabitants, where the male population is more than female. The incidence of appendicitis in Asia in 2004 was 4.8% of the population of the total population⁽³⁾.

In 2006, appendicitis was ranked fourth most of the disease after dyspepsia, gastritis, and duodenitis with the number of inpatients as many as 28,040 in Indonesia. In addition, in 2008 the incidence of the appendicitis in Indonesia is highest rank among inter-abdominal cases⁽⁴⁾.

Surveys in 12 provinces in Indonesia in 2008 showed the number of appendicitis patients treated in the hospital as many as 3,251 cases. This number increased dramatically compared to the previous year, which is 1,236 people. Beginning in 2009, there were 2,159 people in Jakarta who were hospitalized as a result of appendicitis⁽⁵⁾. The Ministry of Health considers the appendix a health priority issue at the local and national levels because it has a major impact on public health⁽⁴⁾.

Cases of appendicitis that occurred in RSUD Subang every year has increased. In 2013 there were 45 cases, in 2014 occurred as many as 163 cases, and in 2015 as many as 209 cases⁽⁶⁾.

In RSUD Subang various antibiotics are used as prophylactic for appendix surgery. The most commonly used antibiotics are ceftriaxone, cefotaxime and ceftizoxime. From the use of different antibiotics resulting in the cost of drugs issued by patients is varied. From the patient's perspective, the patient becomes burdened by the high cost of drug while from the hospital perspective provides its own advantages over the high cost of drug paid by the patient.

Therefore, it is necessary to conduct a pharmacoeconomic study considering clinical factors (effectiveness) as well as economic factors (cost) deadlock in Indonesia ranks the highest among inter-abdominal cases⁽⁴⁾.

In Indonesia the implementation of health insurance policy continues to change for the for better

health services which called the National Health Insurance (JKN) managed by BPJS. Implementation of the JKN system by BPJS this makes the researcher interested to conduct pharmacoeconomic studies as part from the perspective of the hospital and the need for this pharmacoeconomic program for BPJS as part of the evaluation by focusing more on what levers the community. Because from the perspective of the hospital there is an increase in the effectiveness of drug costs even at local hospitals at the end will have a significant impact on the efficiency of national health care costs.

In a pharmacoeconomic study one of the analytical methods that will be used by researchers is Cost Effectiveness Analysis (CEA). CEA is a method that compares two or more health interventions that provide different effects.

The purpose of the study is to determine the effectiveness of drugs and the cost of antibiotic (ceftriaxone, cefotaxime, and ceftizoxime injection) in RSUD Subang is pharmacoeconomic.

METHODS

METODE. Drug Criteria. The dosage of ceftriaxone is maximally administered intravenous dose of 1g/day in a single dose, while the dose of cefotaxime administered 1 g injection of 1 g per 12 h, may be increased to 12 g per day in 3-4 administrations. ceftizoxime dose used intra-vena 0.5-2 grams per day divided into 2-4 doses.

Patient Criteria. The inclusion criteria in this study are: medical record data used is the data of inpatient class III patients with diagnosis appendicitis accompanied by surgery, the medical record data used are readable and identifiable data or unreadable but identifiable data and the medical record data used were patient data using prophylactic antibiotics for the diagnosis of appendicitis.

Exclusion criteria in this research are: medical record data outside the specified period, medical record data of patients with initial diagnosis of appendix, but final diagnosis is not written and unreadable medical record data.

Research Outcome. The outcome to be selected is the Length of Stay (LOS) of appendicitis patients who undergo surgery, due to missing data on laboratory results.

Assessment Perspective. The assessment perspective is important in the pharmacoeconomic review, since the selected perspective determines the cost components that should be included for analysis. Perspectives to be selected by the researchers is the perspective of BPJS for the hospital (claim hospital

to BPJS).

Cost Component. The cost components to be analyzed by researchers as follows: drug cost, room cost, general practitioner general visited cost, specialist doctor visited cost, action cost.

Pharmacoeconomic Analysis. This research used CEA method. On this method is calculated Average Cost Effectiveness Ratio (ACER), statistical analysis, application of treatment alternative in Cost Effectiveness Plane, and ICER calculation. With ICER it is known that the additional cost for each one unit cost effectiveness change.

Sources of data in this study is patient data information derived from medical records (medical record) and financial records in surgical patients appendectomy who underwent hospitalization in third class RSUD Subang period January - December 2015.

Statistical hypothesis for outcome in this study is as follows: H0: there were no significant differences in medication using antibiotic injection against length of hospitalization; H1: there were significant differences in medication using antibiotic injection against length of hospitalization.

Decision making is determined if $\text{sig} > 0.05$ then H0 is accepted whereas if $\text{sig} < 0.05$ then H0 is rejected. From parametric statistic anova obtained $\text{sig} < 0.05$ then H0 rejected by conclusion that there is significant difference of medication use antibiotic injection to LOS.

Statistical hypothesis for cost in this study is as follows: H0: There were no significant differences in medication using antibiotic injection against cost; H1: There is a significant difference in medication using antibiotic injection against the length of the cost.

RESULT AND DISCUSSION

Based on the available data, patients diagnosed with acute appendicitis accompanied by surgery is 108 patients. From 108 patients, the most patients was BPJS class 3 patients (7.22%), therefore the patients selected for study were BPJS class 3 patients (Table 1).

More adult patients (60.26%) because they were not improper diet and decreased endurance (Table 2). While the result of patient grouping study based on the use of drugs obtained data as follows categories of children use ceftriaxone amounted to 6 frequency with percentage 85.71% from patient number 7 people, while the use of cefotaxime amounted to 1 frequency with percentage 14.29% and ceftizoxim in child category no (zero).

In the adolescent category the use of ceftriaxone amounted to 7 frequency with the percentage of 29.16%, the use of cefotaxime amounted to 13 frequency with the percentage 54.17% and the use of ceftizoxim amounted to 4 with a percentage of 16.67% of the number of patients 24 people. In the adult category, cefotaxim was more widely used (44.68%), because cefotaxim was first used in the hospital (Table 3).

Table 1. Distribution of appendicitis patients based on inclusion and exclusion criteria using ceftriaxone, cefotaxime, and seftizoxime injection period January - December 2015 in RSUD Subang.

Patient criteria	Frequency	Patient total	Percentage
Insurance	8	8	7.41
BPJS kelas 1	10	10	9.26
BPJS kelas 2	12	12	11.11
BPJS kelas 3	78	78	7.22
Total		108	100

Table 2. Distribution of appendicitis patients by age of use injection of Ceftriaxone, Cefotaxime, and Seftizoxim period January - December 2015 in RSUD Subang.

Age Category	Range (years)	Patient total	Percentage
Children	6 – 11	7	8.97
Teenager	12 – 25	24	30.77
Adult	26 – 45	47	60.26
Total		78	100

Table 3. Distribution of appendicitis patients by age and use of drugs using injection ceftriaxone, cefotaxime, and seftizoxim period January - December 2015 in RSUD Subang.

Usia	Ceftriaxone		Cefotaxime		Seftizoxim		Patient Total
	Frequency	Percentage	Frequency	Percentage	Frequency	Percentage	
Children	6	85.71	1	14.29	-	-	7
Teenager	7	29.16	13	54.17	4	16.67	24
Adult	13	27.66	21	44.68	13	27.66	47
Total	26	33.34	35	44.87	17	21.79	78

From the results of the study, the average LOS from the use of antibiotic treatment ceftriaxone injection is for 6 days, while the LOS use of cefotaxime injection antibiotics for 4 days and LOS of the use of antibiotic injection seftizoksime for 3 days. This may be due to the longest half life of ceftriaxone in plasma (385-480 minutes) than others (60-70 minutes)⁽⁸⁾ (Table 4).

Table 4. Average length of stay of inpatient patients using Ceftriaxone injection, Cefotaxime, and Seftizoxime the period of January-December 2015 in RSUD Subang.

	Ceftriaxone	Cefotaxime	Seftizoxime
Length of Stay (Days)	6	4	3

Ceftriaxone, cefotaxime and ceftizoxime are third generation cephalosporin antibiotics. Ceftriaxone and cefotaxime give an indication of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Ceftriaxone activity is greater against Gram negative than against Gram positive. Single doses of maximal dose of intravenous administration of 1 g/day dose, while dose of cefotaxime administered injection of 1 g per 12 hours, may be increased to 2 g per day in 3-4 administrations.

Seftizoxim gives a strong indication of Gram positive bacteria, and gives an indication of anaerobic bacteria, the dose used intravena 0.5-2 grams per day divided into 2-4 doses. Compared with ceftriaxone, cefotaxime, and ceftizoxime, the new third-generation cephalosporin class of drugs automatically becomes the best ceftizoxime to supplement the previous generation of drug deficiency, ceftriaxone and cefotaxime.

From the research result, the average cost incurred for appendix patient is obtained by data as following appendix patients who use ceftriaxone medicine cost IDR 41,778, the cost of action is IDR 3,687,300, the cost of doctor visite is IDR 103,307, visite cost of specialist doctor IDR 129,134 and class 3 inpatient costs of IDR 413,230 resulting in an average total

cost of IDR 4,374,751.

While appendicitis patients who used Cefotaxime drug cost IDR 77,236, the cost of action IDR 3,687,300, the cost of medical doctor visite Rp 69,943, specialist visite IDR 87,428 and the cost of inpatient class 3 of IDR 279,771 so the average total cost amounting to IDR 4,201,679. And appendicitis patients who use ceftizoxime drug cost amounted to IDR 450,046, the cost of action amounted to IDR 3,687,300, the cost of medical doctor visite IDR 55,000, visite cost of specialist doctor 68,750 and the cost of inpatient class 3 IDR 220,000 so the average total cost of IDR 4,481,096 (Table 5).

Based on Table 6, unit price of the cost component, seftriaxone injection drug is cheaper than cefotaxime injectable drug and ceftizoxime injectable drug. However, the average cost outcome in Table 7, of the most inexpensive therapeutic costs was obtained by cefotaxime injectable drugs when compared with seftriaxone and ceftizoxime injectable drugs. This is due to the difference in outcomes obtained from any therapeutic drugs that affect other cost components such as hospitalization and physician visite.

Based on research results obtained from medical record data, all appendicitis patients using ceftriaxone, cefotaxime, and ceftizoxime injectable antibiotics may be discharged if the physician's physical examination results are not a complication such as bleeding, infection of the surgical wound, or a pocketing pus, and no intestinal paralytic (lazy bowel work), and the results of lab tests on the leucocyte value of the patient. The Kolmogorov-Smirnof Normality test was performed on the patient's long hospitalization data and the patient's average cost and the following results were obtained.

From the test results, the data normality was used Kolmogorov-Smirnof test (data count > 50) with the significance level of 0.05, indicating that the significance value of patient data using ceftriaxone, cefotaxime, ceftizoxime for ceftriaxone injection, $p=0.117$ ($p > 0.05$), p value of cefotaxime $p=0.070$ (p

Table 5. Unit cost components.

Drug	Unit cost				
	Drug	Physician visite cost	Specialist physician visite cost	Action cost	Room cost
Ceftriaxone	6.875	17.000	21.250	3.687.300	68.000
Cefotaxime	12.513	17.000	21.250	3.687.300	68.000
Ceftizoxime	99.361	17.000	21.250	3.687.300	68.000

value > 0.05) and p value of ceftizoxime p=0.061 (p > 0,05) indicate that data is normally distributed. As shown in the table below. The Kolmogorov-Smirnof test (data count > 50) with a 0.05 significance level indicates that the significance value of patient data using ceftriaxone, cefotaxime, ceftizoxime, antibiotics for the patient's average cost of p-ceftriaxone p= 0.121 (p > 0.05), p value of cefotaxime p=0.077 (p value > 0.05) and p value of Ceftizoxime p=0.117 (p > 0,05) indicates that the data is normally distributed. The data obtained is normally distributed and therefore ANOVA Parametric Statistic Test is used to test three or more samples.

Decision making is determined if Sig > 0.05 then H0 is accepted whereas if Sig < 0,05 then H0 is rejected. From ANOVA Parametric Statistic Result obtained Sig < 005 then H0 is rejected with the conclusion that there is significant difference of medication using antibiotic injection to cost. From the results of ACER research, it can be seen that the

treatment of appendicitis patients using antibiotic injection ceftriaxone effectiveness cost of IDR 729,124, while the use of antibiotics cefotaxime injection cost effectiveness of IDR 1,050,419 and who use antibiotic injection seftizoksिम cost effectiveness that is equal to IDR 1,493,698.

The effectiveness of the use of injection antibiotics was determined based on the duration of hospitalization. The total cost of ceftriaxone is higher (IDR 4,374,749) but less effective than cefotaxime, as standard drug (6 days), it causes ceftriazone to occupy in quadrant IV on cost effectiveness plane. While the total cost of ceftizoxime is higher (IDR 4,481,096) but more effective than cefotaxime, as standard drug (3 days), it causes ceftizoxime to occupy in quadrant I on cost effectiveness plane. Because it is in quadrant I, this intervention needs to be calculated ICER. If an intervention is in quadrant I then it can be chosen but requires consideration of resources (Figure 1).

Table 6. Table average cost of appendicitis patients using Ceftriaxone, Cefotaxime, and Ceftizoxime injection January - December 2015 in RSUD Subang.

Cost components	Drugs	Ceftriaxone	Cefotaxime	Ceftizoxime
Drug cost (Rupiah)		41.778	77.236	450.046
Action cost (Rupiah)		3.687.300	3.687.300	3.687.300
Physical visite costs (Rupiah)		103.307	69.943	55.000
Specialist physical visite Cost (Rupiah)		129.134	87.428	68.750
Room cost class 3 (Rupiah)		413.230	279.771	220.000
Average total cost (Rupiah)		4.374.751	4.201.678	4.481.096

Table 7. Average cost effectiveness ratio with appendicitis using Ceftriaxone, Cefotaxime and Seftizoxime in January - December 2015 in RSUD Subang.

Injection	Average total costs (Rp)	Length of stay (days)	ACER (Rp/day)
Ceftriaxone	4,374,749	6	729,124
Cefotaxime	4,201,678	4	1,050,419
Ceftizoxime	4,481,096	3	1,493,698

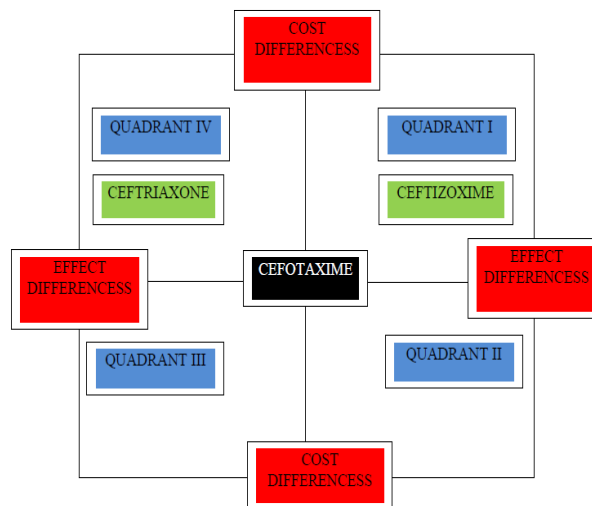


Figure 1. Cost effectiveness plane.

$$\begin{aligned} \text{ICER} &= (\text{Cost of Ceftizoxime} - \text{Cost of Cefotaxime}) / \\ &(\text{Effectiveness of Seftizoxime} - \text{Effectiveness of} \\ &\text{Cefotaxime}) = (4,481,096 - 4,374,749) / (3 - 4) \\ &= \text{IDR } 106,347/\text{day} \end{aligned}$$

Thus the cost to be added to switch from cefotaxime to ceftizoxime antibiotics is IDR 106,347/day. This cost is lower than the WHO Willingness to Pay (\$ 12,000 or IDR 165,624,000, assuming the rupiah exchange rate against the dollar is IDR 13,802).

CONCLUSION

Ceftriaxone is less effective than cefotaxime. Ceftizoxime is more effective than cefotaxime but need to increase cost of IDR 106,347/day. It requires consideration of resources and should be selected if sufficient resources are available.

REFERENCES

1. Dorland W. A. Newman. Dorland's illustrated medical dictionary. 29th ed. Translator: Huriawati Hartanto. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2011. p. 142.
2. Sjamsuhidayat, R, De Jong, W, Buku ajaran ilmu bedah. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2010. p. 105-19.
3. WHO. Global burden diseases. Diambil dari http://www.who.int/healthinfo/global_burden_diseases/BD_report_2004_update_Annex.pdf:2004; diakses 10 Maret 2016. 2015.
4. Ministry of Health, RI. Kasus appendisitis di indonesia. diambil dari <http://www.artikelkedokteran.com/arsip/kasus-appendisiti-di-indonesia-padatahun-2008.html>; diakses 7 Maret 2016; 2008.
5. Ummualya. Angka kejadian appendisitis; diambil dari <http://digilib.unimus.ac.id/files/disk/136/jtptunimus-gdll-trimuflikih-6753-1.pdf>; diakses pada tanggal 2 november 2012; 2008.
6. SIM-RSUD Subang. Data pasien usus buntu; 2016.
7. Ministry of Health. Pedoman penerapan kajian farmakoekonomi. 2013.
8. Mutschler. Dinamika obat. Bandung: Penerbit ITB; 2010.

Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi dan Penginduksi Apoptosis Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. ex. Blume) terhadap Sel Kanker Serviks HeLa

(Cytotoxic Activity, Antiproliferation and Induced Apoptosis of Salung Leaf (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) on Cancer Cell of Cervix HeLa)

ARLINA ISMARYANI¹, SALNI^{2*}, ARUM SETIAWAN², TRIWAN³

^{1,3}Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya.

^{2*}Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

Abstrak: Kanker serviks menduduki urutan kedua dari penyakit kanker yang menyerang perempuan di dunia dan urutan pertama untuk wanita di negara berkembang. Tumbuhan Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) telah dimanfaatkan secara turun temurun untuk mengobati berbagai macam penyakit. Tujuan penelitian untuk mengetahui aktivitas ekstrak dan fraksi daun salung sebagai agen sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa. Konsentrasi ekstrak dan fraksi yang diujikan adalah 640; 320; 160; 80; 40 µg/mL, sedangkan cisplatin 200; 100; 50; 25 µg/mL. Hasil penelitian didapatkan nilai IC₅₀ ekstrak 380,7 µg/mL, fraksi *n*-heksan sebesar 229,3 µg/mL, fraksi etil asetat sebesar 116,8 µg/mL, dan fraksi metanol air sebesar 562,8 µg/mL, berdasarkan nilai IC₅₀ fraksi etil asetat mempunyai aktivitas sitotoksik kategori cukup aktif. Hasil *doubling time* fraksi etil asetat menggandakan diri pada jam ke 58 lebih kecil dari cisplatin yang menggandakan diri pada jam ke 64,5 dan kontrol sel pada jam ke 41. Hasil *flowcytometry* menunjukkan fraksi etil asetat menginduksi apoptosis sebesar 72,82% sedangkan cisplatin sebesar 87,96%. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun salung berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

Kata kunci: Daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume), antiproliferasi, apoptosis.

Abstract: Cervical cancer ranks second of cancer that affects women in the world and the first order for women in developing countries. Plant Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) have been used for generations to treat various diseases. The purpose of the study to determine the effects of leaf extracts and fractions Salung as cytotoxic, antiproliferation and inducer of apoptosis in HeLa cervical cancer cells. The concentration of extracts and fractions of 640; 320; 160; 80; 40 µg/mL, while cisplatin using a concentration of 200; 100; 50; 25 µg/mL. The results showed IC₅₀ extract value 380.7 µg/mL. *n*-hexane fraction amounted to 229.3 µg/mL. ethyl acetate fraction of 116.8 µg/mL, and methanol-water fraction amounted to 562.8 µg/mL, so that the ethyl acetate fraction had enough categories active cytotoxic activity based on the IC₅₀. The ethyl acetate fraction has doubling time on the hour to 58 while the cisplatin on the hour to 64.5 and the control cell on the hour to 41. The flow cytometry showed that ethyl acetate fraction induced apoptosis by 72.82% while cisplatin of 87.96%. The fraction of ethyl acetate from leaf extract has the potential to be developed as an anticancer drug.

Keywords: Leaf Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume), antiproliferation, apoptosis.

* Penulis korespondensi: Hp : 081264943000
Email: salnibasir@yahoo.com

PENDAHULUAN

KANKER Serviks menduduki urutan kedua dari penyakit kanker yang menyerang perempuan di dunia dan urutan pertama untuk wanita di negara berkembang. Dari data badan kesehatan dunia diketahui terdapat 493.243 jiwa per tahun penderita kanker serviks baru di dunia dengan angka kematian karena kanker ini sebanyak 273.505 jiwa per tahun. Di Indonesia, terdapat 90-100 kasus kanker serviks per 100.000 penduduk. Kasus baru kanker serviks ditemukan 40-45 kasus per hari⁽¹⁾.

Pengobatan kanker serviks sering dilakukan dengan berbagai cara, antara lain, operasi atau pembedahan, penyinaran atau radiasi, kemoterapi serta yang sekarang berkembang adalah imunoterapi. Namun, terapi pembedahan tidak dapat dilakukan khususnya pada sel kanker yang telah menyebar, sedangkan kemoterapi dan radiasi juga memiliki beberapa keterbatasan. Kemampuan sinar yang biasa digunakan untuk radiasi mengalami penurunan efektivitas seiring peningkatan ukuran tumor, karena penambahan dosis yang diberikan melebihi batas toksisitasnya pada jaringan dan organ normal manusia. Penggunaan obat kimia seperti kemoterapi mengalami kegagalan untuk menginduksi kematian sel kanker secara terprogram⁽¹⁾. Berdasarkan fakta-fakta tersebut pengembangan obat antineoplastik baru menjadi isu kunci dan pilihan strategis untuk menggantikan pengobatan kanker lama atau sebagai usaha meningkatkan sensitivitas modalitas terapi yang telah ada sebelumnya. Salah satu alternatif pengobatan antikanker yang sudah dikembangkan adalah obat herbal⁽²⁾.

Penelitian antikanker telah dilakukan terhadap beberapa jenis familia Rubiaceae antara lain tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*), tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*), Gambir (*Uncaria gambir*), biji Kopi (*Coffea* sp.). Kandungan senyawa antikanker pada familia Rubiaceae bermacam-macam antara lain pada tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) mengandung senyawa flavonoid, tanin dan tokoferol⁽³⁾. Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung flavonoid, skopoletin, antrakuinon, dan alkaloid⁽⁴⁾. Tanaman Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid, dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro dan oksinya), katekin serta zat penyamak⁽⁵⁾. Biji Kopi (*Coffea* sp.) mengandung senyawa fenolik, flavonoid dan alkaloid⁽⁶⁾.

Penapisan aktivitas senyawa aktif antikanker dapat dilakukan dengan cara kemotaksonomi, yaitu didasarkan pada kemiripan kandungan kimia pada familia atau genus tumbuhan yang sama. Tumbuhan

Salung telah dimanfaatkan secara turun temurun untuk mengobati berbagai macam penyakit⁽⁷⁾. Tumbuhan Salung juga termasuk familia rubiaceae diduga mengandung unsur senyawa yang sama sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) sebagai sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Simplisia daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) diambil di desa Tebedak kecamatan Payaraman, Kabupaten Ogan Ilir, Sumatera Selatan, pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol, cisplatin, sel HeLa dari laboratorium parasitologi UGM, FBS (*Fetal Bovin Serum*) 10%, penisilin-streptomisin 1%, fungizone 0,5%, tripsin-EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) 0,25%, 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT), SDS (*Sodium Dodecyl Sulphate*) 10% dalam 0,01 N HCl, stok sampel (10 mg) dalam eppendorf, pelarut DMSO, Media Kultur (MK), *Phosphat Buffer Saline* (PBS), tripsin-EDTA 0,25%, RNase, *Propidium iodide*.

Alat. Blender, *rotary evaporator*, gelas ukur, labu pisah 1000 mL, penangas air, cawan petri, timbangan analitik, plat *silica*, mikropipet 10, 20, 200 dan 1000 μ L, botol duran 100 mL, *conical tube*, pipet pasteur steril atau mikropipet 1000 μ L, tabung reaksi kecil, rak tabung kecil, 96-well plate, 6-well plate, *conical tube*, dan ELISA reader dengan panjang gelombang 595 nm dan 550 nm, votex, tabung sentrifus 1,5 mL, rak tabung kecil, sentrifugator, inkubator CO₂, penangas air (37 °C) dan FACS-Calibur, Triton-X, buangan untuk media bekas dan PBS.

METODE. Penelitian menggunakan beberapa metode, ekstraksi dengan metode maserasi, simplisia daun Salung direndam dengan pelarut methanol selama 2 x 24 jam kemudian disaring, diulangi sampai 3 kali, ekstrak cair yang diperoleh diuapkan dengan rotapavor sampai didapatkan ekstrak kental. Fraksinasi dengan metode Fraksinasi Cair-Cair (FCC), Fraksinasi dilakukan dengan cara: ekstrak kental di larutkan dalam metanol air dengan perbandingan 3:7 (450 mL ekstrak: 1050 mL etanol air) sehingga didapatkan sebanyak 1500 mL fraksi metanol air, selanjutnya dimasukkan dalam labu pisah, ditambahkan 4 x 250 mL *n*-heksan, di kocok secara perlahan-lahan setelah itu didiamkan kemudian terjadi pemisahan antara *n*-heksan dan metanol air dengan menggunakan corong pisah, kemudian diulangi beberapa kali sampai larutan berwarna bening. Setelah didapatkan fraksi *n*-heksan, dilanjutkan dengan fraksinasi etil

asetat dengan proses yang sama seperti fraksinasi *n*-heksana untuk mendapatkan fraksi etil asetat cair sisanya merupakan fraksi methanol air. Selanjutnya fraksi *n*-heksan cair, fraksi etil asetat cair, dan fraksi metanol air diuapkan dengan alat *rotary evaporatory* sampai berbentuk pasta.

Preparasi dan Panen Sel. Sel diambil dari tangki nitrogen cair, kemudian dicairkan dalam penangas air 37 °C. Setelah itu disemprotkan dengan etanol 70%, sel dalam *cryotube* dimasukkan ke dalam LAF dan dipindahkan dengan menggunakan mikropipet ke dalam tabung conikel yang berisi suspensi sel, disentrifuge pada 600 rpm selama 5 menit, lalu supernatan dibuang. Selanjutnya ditambahkan media yang baru kedalam konikel yang berisi pelet dan disuspensikan hingga homogen. Suspensi sel ditumbuhkan dalam *tissue culture dish* yang diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37 °C. Kondisi sel selanjutnya diamati dibawah mikroskop kemudian diinkubasi pada inkubator CO₂ 5%. Setelah 24 jam dilakukan penggantian media kultur. Sel ditumbuhkan sampai konfulen dan jumlahnya cukup untuk perlakuan. Setelah konfulen dilakukan panen sel dengan cara membuang media kultur lalu dicuci dengan PBS 2x untuk melepas sel dari dasar *culture dish* ditambahkan tripsin-EDTA 0,25% kemudian diinkubasi selama 3 menit dalam inkubator CO₂, Tripsin-EDTA diinaktivasi dengan menambahkan media kultur kemudian suspensi sel diresuspendi lalu suspensi dipindahkan pada conical tube. Jumlah sel dihitung dengan menggunakan *hemocytometer* dan *cell counter*.

Pembuatan Larutan Stok Uji Ekstrak dan Fraksi. Sebelum dilakukan uji sitotoksik, terlebih dahulu dibuat larutan stok sampel dengan cara mencampur ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi etanol air dari daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) dengan media DMEM (*Dulbecco's Modification of Eagle Medium*). Larutan stok dibuat dengan cara menimbang ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n*-heksan dan fraksi metanol air dari daun Salung kemudian ditambah DMSO sebanyak 30 µL dan ditambahkan dengan media DMEM hingga 1000 µL, sehingga diperoleh konsentrasi tertentu. Dari konsentrasi larutan stok tersebut kemudian dibuat seri konsentrasi larutan uji, preparasi dilakukan dalam *Laminar Air Flow Cabinet* secara aseptis⁽⁸⁾.

Uji Sitotoksitas. Dari larutan stok sampel dibuat larutan uji dengan konsentrasi 320; 160; 80; 40 µL/mL untuk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, etanol air, serta *n*-heksan. Cisplatin diencerkan dengan DMEM dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25 µL/mL. Selanjutnya sel diberi perlakuan ekstrak

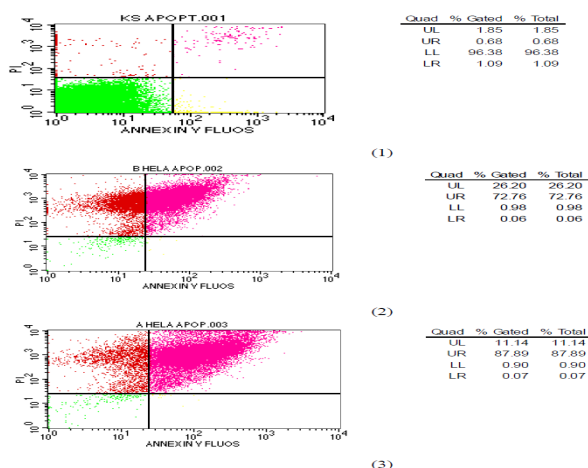
dan fraksi, setelah itu diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam, kemudian tiap sumuran diberi larutan MTT sejumlah 10 µL, empat jam kemudian dilanjutkan dengan pemberian reagen penghenti reaksi (SDS 10% dalam HCL 0,01 N). Kemudian *plate* dibungkus dengan kertas atau alumunium foil dan inkubasikan ditempat gelap pada temperatur kamar selama semalam. Setelah 24 jam *plate* dimasukkan ke dalam ELISA *reader*. Dibaca absorbansi masing-masing sumuran dengan panjang gelombang 550 nm. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 550 nm, yaitu panjang gelombang optimum agar diperoleh pengukuran yang peka dan spesifik⁽⁹⁾. Data dari uji sitotoksitas digunakan untuk menghitung kadar yang menyebabkan hambatan proliferasi sel 50% (IC₅₀) dengan analisa probit. Persentase sel hidup setelah perlakuan pada masing-masing kadar dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ kematian sel} = \frac{(\sum \text{sel hidup pada kontrol} - \sum \text{sel hidup pada sampel})}{\sum \text{sel hidup pada kontrol}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persen kematian sel pada masing-masing konsentrasi bahan uji, maka langkah selanjutnya adalah menentukan nilai IC₅₀ dengan menggunakan metode regresi linear untuk mendapatkan linearitas antara kadar konsentrasi dengan persen kematian sel. IC₅₀ adalah konsentrasi yang menyebabkan kematian 50% populasi sel, sehingga dapat diketahui potensi sitotoksitasnya. Uji sitotoksik ini digunakan untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan nilai kadar konsentrasi yang menghasilkan hambatan proliferasi sel 50% dan menunjukkan potensi ketoksikan suatu senyawa terhadap sel. Nilai ini merupakan patokan untuk melakukan uji pengamatan kinetika sel. Nilai IC₅₀ menunjukkan potensi suatu senyawa sebagai bahan toksik, semakin besar harga IC₅₀ maka senyawa tersebut semakin tidak toksik⁽¹⁰⁾.

Uji Antiproliferasi. Dilakukan dengan menentukan *doubling time* sel pada waktu inkubasi. Perhitungan dilakukan dengan cara: Konsentrasi Fraksi etilasetat yang diujikan ½ IC₅₀ yaitu sebesar 58,4 µg/mL dan cisplatin sebesar 23,6 µg/mL. Sel yang digunakan sejumlah 5 x 10³ sel/sumuran didalam 96 *plate well*. Setelah diberikan perlakuan maka sel di inkubasi dalam inkubator CO₂ 5% dengan suhu 37 °C pada 0 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan alat ELISA reader pada panjang gelombang 595 nm. Dari hasil yang didapat maka dibuat grafik antara log jumlah sel hidup dan lama waktu inkubasi kemudian ditentukan perbedaan waktu untuk mencapai jumlah 2 kali sel awal (mengetahui *doubling time*). Dari persamaan yang diperoleh maka dapat ditentukan nilai *doubling time*.

Uji Apoptosis. Sel HeLa dipanen sel sebanyak 5×10^5 sel/sumuran di tanam dalam 6 *plate well* masing-masing sebanyak 2000 μL Media Kultur (MK), kemudian di inkubasi hingga sel HeLa siap untuk diberi perlakuan. Sel diberi dosis perlakuan fraksi etil asetat 116,8 $\mu\text{g/mL}$, dan cisplatin 47,2 $\mu\text{g/mL}$. Kemudian sel di inkubasi selama 24 jam pada inkubator CO_2 5% dengan suhu 37°C . Setelah di inkubasi, media sel dimasukkan kedalam *conical* dan selanjutnya dipanen dengan penambahan tripsin-EDTA 0,25% sebanyak 150 μg /sumuran. Media kultur ditambahkan sebanyak 2000 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diresuspensi agar menjadi sel tunggal. Sel disentrifuge dengan kecepatan 200 rpm selama 5 menit dan supernatant dibuang, ditambahkan PBS sebanyak 100 μg dan dipindahkan ke dalam *cyrotube* lalu di sentrifuge kembali dengan kecepatan 600 rpm selama 3 menit. Kemudian supernatant dibuang dan ditambahkan dengan reagen annexin V dan PI (*Propidium Iodida*) lalu dibaca dengan menggunakan *flowcytometry*. Pengamatan induksi apoptosis dilakukan untuk mengetahui penyebab kematian sel baik apoptosis maupun nekrosis. Jika annexin V+ berarti ada apoptosis sedangkan kalau PI- berarti ada nekrosis. Analisis apoptosis diperoleh dari hasil pembacaan hasil *flowcytometry* yang di analisis menggunakan Microsoft excel. Kuadran R1 menunjukkan sel yang hidup, R2 menunjukkan *early* apoptosis, R3 menunjukkan *late* apoptosis, R4 menunjukkan nekrosis. Selain dari kuadran R1-R4 pembacaan apoptosis juga bisa dilakukan berdasarkan pewarnaan. Pada hasil *flowcytometry* didapatkan empat macam warna yang berbeda yaitu hijau (Annexin V- atau PI-) menunjukkan sel hidup, kuning (annexin V+ atau PI-) menunjukkan sel yang mengalami apoptosis awal, merah muda (annexin V+ atau PI+) menunjukkan sel yang mengalami apoptosis akhir, dan merah (annexin V- atau PI+) menunjukkan sel yang nekrosis⁽⁹⁾, hasil pembacaan *flowcytometry* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil analisis dengan *flowcytometry*.

Keterangan:

(1) kontrol sel; (2) fraksi etil asetat; dan (3) cisplatin.

Hijau (LL): Sel hidup; Merah muda (UR): Apoptosis

akhir; Kuning (LR) : Apoptosis awal; dan Merah (UL):

Nekrosis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi. Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak 45,7 g (18,28%) dari 250 g simplisia daun Salung. Ekstrak daun Salung sebanyak 31,8 g difraksinasi dengan metode FCC (Fraksi Cair-Cair) dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol air secara kesinambungan dengan sifat kepolaran pelarut yang berbeda-beda. Berat fraksi yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Fraksinasi daun salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume)

Pelarut	Berat (gram)	Persentase (%)
Fraksi <i>n</i> -heksan	4,7	14,8
Fraksi etil asetat	8,4	26,4
Fraksi metanol air	18,7	58,8
Total	31,8	100

Pada Tabel 1, dapat dilihat hasil fraksinasi ekstrak daun salung yang memiliki berat paling besar adalah fraksi metanol air 58,8% dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan etil asetat. Tingginya kadar fraksi metanol air menunjukkan banyaknya senyawa non polar dalam ekstrak daun salung. Berat fraksi yang didapatkan berbeda-beda tergantung dari pelarut yang digunakan, namun besar kecilnya kemampuan sitotoksik suatu fraksi tidak dipengaruhi oleh berat fraksi, kemudian ekstrak dan ketiga macam fraksi yang diperoleh di uji aktivitas antikankernya terhadap sel HeLa dengan metode MTT *assay*.

Uji Sitotoksik. Uji sitotoksik digunakan untuk memprediksi keberadaan obat sitotoksik dari bahan alam yang berpotensi sebagai antikanker. Hasil pembacaan ELISA *reader* menghasilkan nilai absorbansi dari enam ulangan pada masing-masing konsentrasi dan nilai rata-rata persentase kematian sel HeLa setelah diberi perlakuan. Hasil uji sitotoksik dari ekstrak dan fraksi daun salung dapat dilihat pada Tabel 2.

Dari Tabel 2, diketahui bahwa ekstrak dan fraksi daun salung mempunyai aktivitas antikanker terhadap sel HeLa. Nilai IC_{50} terbesar diberikan oleh fraksi metanol-air yaitu 562,8 $\mu\text{g/mL}$, hal ini menunjukkan bahwa fraksi metanol air mempunyai aktifitas sitotoksik yang paling lemah, sedangkan nilai IC_{50} terendah terdapat pada fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 116,8 $\mu\text{g/mL}$ sehingga dapat disimpulkan bahwa

fraksi etil asetat paling aktif dibandingkan dengan fraksi *n*-heksan dan fraksi metanol air. Fraksi etil asetat tergolong kedalam bahan antikanker cukup aktif. Berdasarkan klasifikasi aktivitas sitotoksik ekstrak terhadap sel kanker dapat digolongkan kategori sangat aktif jika nilai $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$, kategori aktif jika nilai IC_{50} 10-100 $\mu\text{g/mL}$, dan kategori cukup aktif jika nilai IC_{50} 100-500 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹¹⁾.

Pada kelompok kontrol positif (cisplatin) nilai IC_{50} yang dihasilkan sangat rendah yaitu 47,2 $\mu\text{g/mL}$ sehingga jauh lebih toksik dari ekstrak dan fraksi daun Salung, cisplatin merupakan obat sitotoksik dengan efektifitas tinggi dan digunakan secara luas namun efek samping penggunaannya juga tinggi. Efek samping cisplatin adalah nefrotoksisitas dimana persentase kejadian sebesar 20-30%⁽¹²⁾. Berbagai efek samping yang mungkin terjadi pada penggunaan cisplatin adalah ototoksisitas, gastrotoksisitas, supresi sumsum tulang reaksi alergi dan nefrotoksisitas⁽¹³⁾.

Fraksi etilasetat dari daun salung dengan nilai IC_{50} 116,8 $\mu\text{g/mL}$ lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak etanol buah Mengkudu yang memiliki potensi sebagai agent kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} yaitu 4.094 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁴⁾, dan fraksi etil asetat dari tanaman Sarang Semut memiliki nilai LC_{50} sebesar 938,003 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹⁵⁾. Berdasarkan nilai IC_{50} yang di dapat pada penelitian ini diketahui bahwa pada fraksi etil asetat nilai IC_{50} sebesar 116,8 $\mu\text{g/mL}$ lebih kecil dari fraksi yang lain dan ekstrak sehingga fraksi etil asetat merupakan fraksi aktif yang dilanjutkan pada uji antiproliferasi dan apoptosis.

Uji Antiproliferasi. *Cell cycle progression* merupakan parameter utama dalam mengukur sifat proliferative suatu sel kanker, penghambatan *cell cycle progression* dilakukan dengan uji *doubling time* menggunakan metode MTT. Konsentrasi larutan uji yang digunakan adalah dibawah nilai IC_{50}

Tabel 2. Hasil rata-rata absorbansi, persen kematian sel HeLa dan nilai IC_{50} .

Konsentrasi bahan uji ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata absorbansi	(%) Kematian sel HeLa	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak etanol	640	0,316	60,721
	320	0,411	48,912
	160	0,436	45,805
	80	0,512	36,358
	40	0,572	28,899
Fraksi <i>n</i> -heksan	640	0,267	66,812
	320	0,321	60,099
	160	0,440	45,308
	80	0,468	41,827
	40	0,477	40,709
Fraksi etil asetat	640	0,238	70,416
	320	0,329	59,105
	160	0,354	55,997
	80	0,421	47,669
	40	0,449	44,189
Fraksi methanol air	640	0,386	52,019
	320	0,465	42,200
	160	0,534	33,623
	80	0,561	30,267
	40	0,640	20,447
<i>Cisplatin</i>	200	0,226	71,908
	100	0,319	60,316
	50	0,378	53,014
	25	0,457	43,132

yang diperoleh pada uji sitotoksitas agar sel dapat diamati pertumbuhan serta morfologinya supaya sel tidak terlalu banyak yang mati. Apabila digunakan konsentrasi diatas IC_{50} dikhawatirkan sel terlalu banyak yang mati sebelum 72 jam inkubasi sehingga pengamatan kinetika proliferasi tidak dapat dilakukan. Pada penelitian ini hanya menguji fraksi aktif etil asetat dengan konsentrasi $\frac{1}{2} IC_{50}$ yaitu sebesar 58,4 $\mu\text{g/mL}$ dan cisplatin sebesar 23,6 $\mu\text{g/mL}$.

Tabel 3 dan 4 menunjukkan fraksi etil asetat memiliki *doubling time* 58 jam yang artinya pada jam ke 58 sel akan membelah diri menjadi dua, sedangkan pada kontrol sel membelah menjadi dua pada 41 jam. Dari nilai *doubling time* dapat diketahui penghambatan bahan uji terhadap kecepatan sel untuk berproliferasi dengan membandingkan nilai *doubling time control* dengan nilai *doubling time sampel*. Ini berarti fraksi etil asetat mengandung senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya *cell cycle arrest* sehingga menyebabkan kemampuan proliferasi sel menurun, dimana besarnya kemampuan antiproliferasi tergantung kadar konsentrasi fraksi aktif yang diberikan. Berdasarkan hal tersebut dapat disimpulkan semakin tinggi kadar konsentrasi fraksi aktif etil asetat semakin tinggi pula terjadinya antiproliferasi pada pertumbuhan sel HeLa melalui mekanisme penundaan waktu penggandaan. Kemampuan ini diduga karena adanya kandungan alkaloid dan flavonoid dalam daun salung.

Senyawa alkaloid dapat menghambat proliferasi melalui inhibisi proses oksidatif yang dapat menyebabkan inisiasi kanker. Mekanisme ini diperantarai penurunan enzim Xanthin Oksidase Siklooksigenase (COX) dan Lipooksigenase (LOX) yang diperlukan dalam proses prooksidasi sehingga menunda siklus sel⁽¹⁶⁾. Senyawa alkaloid juga mampu mengikat tubulin (protein penyusun mikrotubulus) sehingga dapat menghambat polimerase protein sehingga mengganggu proliferasi sel⁽¹⁷⁾.

Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat melawan *peroxy radical* dibandingkan dengan vitamin C dan E. Zat flavonoid dapat menurunkan resiko terjadinya kanker paru. Flavonoid dapat menstimulasi aktivitas enzim sehingga menginduksi apoptosis, menghambat siklus sel, mengatur fungsi dari imun tubuh dan menghambat inflamasi, antiproliferasi dan angiogenesis sel kanker⁽¹⁸⁾. Mekanisme kerja flavonoid dalam mencegah bahkan mengobati kanker yang telah terungkap adalah inaktivasi karsinogen, antiproliferasi, penghambatan siklus sel, induksi apoptosis, diferensiasi, dan inhibisi angiogenesis⁽¹⁹⁾.

Uji Aktivitas Apoptosis. Hasil uji apoptosis dengan *flowcytometry* dapat dilihat pada Gambar

1. Empat warna yang terbentuk disebabkan oleh sel yang memancarkan epi-fluoresensi oleh ikatan anexin V atau PI lalu ditangkap oleh sinar UV. Data hasil pengukuran *flowcytometry* dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 1. Pada Tabel 5 tersebut menunjukkan bahwa fraksi daun salung memiliki aktivitas apoptosis yang cukup baik, hal ini terlihat bahwa persentase apoptosis pada fraksi etil asetat sebesar 72,82% sedangkan pada cisplatin menunjukkan persentase apoptosis sebesar 87,96%. Ini berarti fraksi etil asetat daun salung memiliki efektivitas untuk meningkatkan apoptosis terhadap sel HeLa. Potensi fraksi etil asetat daun salung dalam memacu apoptosis kemungkinan disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi yaitu senyawa alkaloid dan flavonoid.

Pengendalian siklus sel dilakukan agar siklus sel berjalan normal. *Cyclin dependent kinase* (Cdk) bersama dengan siklin adalah pengendali utama siklus sel, yang menyebabkan pergerakan dari fase G1 ke fase S atau dari fase G2 ke fase M. *Maturation Promotion Factor* (MPF) bersama Cdk dan siklin menjadi pencetus progresivitas siklus sel. Protein p53 berfungsi menghambat siklus sel bila terjadi kerusakan DNA, dan bila kerusakan cukup berat dapat menyebabkan apoptosis⁽²⁰⁾. Sedangkan protein p27 adalah protein yang mengikat siklin dan Cdk, sehingga terjadi hambatan menuju fase S21. Selanjutnya fraksinasi daun mengkudu menunjukkan adanya kenaikan persen kematian sel alami (apoptosis) seiring dengan kenaikan kadar protein terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} yang rendah yaitu 6,9 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²¹⁾.

Beberapa penelitian antikanker pada familia rubiaceae yang telah dilaporkan seperti tanaman Sarang Semut (*Myrmecodia pendans* Merr & Perry) mengandung flavonoid dan tanin yang memiliki aktivitas antiproliferasi dan antikanker⁽³⁾. Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung flavonoid, skopoletin, antrakuinon, dan alkaloid memiliki efek terapi yang luas termasuk aktivitas antikanker, dalam praktik klinis dan percobaan pada hewan model di laboratorium⁽⁴⁾. Gambir (*Uncaria gambir*) mengandung senyawa flavonoid dan sejumlah alkaloid (tanin, turunan dihidro-dan oksonya), katekin serta zat penyamak yang bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis⁽⁵⁾. Senyawa fenolik, flavanoid, dan alkanoid dari biji Kopi (*Coffea* sp.) bersifat antiproliferasi dan menginduksi apoptosis⁽⁶⁾.

Belum ada publikasi yang melaporkan mengenai aktivitas antikanker dari ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora*) namun berdasarkan penelitian sebelumnya pada tumbuhan sefamalia rubiaceae yaitu daun Mengkudu menunjukkan adanya kenaikan persen kematian sel alami (apoptosis)

seiring dengan kenaikan kadar protein terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} yang rendah yaitu 6,9 $\mu\text{g/mL}$ ⁽²²⁾ dan ekstrak etanol buah mengkudu memiliki potensi sebagai agen kemopreventif melalui mekanisme sitotoksik terhadap sel kanker serviks HeLa dengan nilai IC_{50} yaitu 4.094 $\mu\text{g/mL}$ ⁽¹³⁾, fraksi

etil asetat dari tanaman sarang semut memiliki nilai LC_{50} sebesar 938,003 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa fraksi ini mempunyai aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker⁽¹⁴⁾.

Tabel 3. Hasil rata-rata absorbansi, hasil viabilitas sel dan log jumlah sel hidup.

Konsentrasi bahan uji ($\mu\text{g/mL}$)	Waktu inkubasi	Rata-rata absorbansi	Viabilitas sel (%)	Jumlah sel	Log sel
Fraksi Etil Asetat 58,4 $\mu\text{g/mL}$	0 jam	0,222	95,58	4779	3,679
	24 jam	0,543	88,96	8788	3,943
	48 jam	0,607	78,04	9822	3,992
	72 jam	0,665	65,99	10484	4,020
Cisplatin 23,6 $\mu\text{g/mL}$	0 jam	0,318	93,98	4699	3,672
	24 jam	0,473	75,55	7463	3,872
	48 jam	0,566	71,85	9042	3,956
	72 jam	0,639	62,99	10009	4,001
Kontrol Sel	0 jam	0,273	100	5000	3,698
	24 jam	0,302	100	9878	3,994
	48 jam	0,341	100	12585	4,099
	72 jam	0,426	100	15888	4,201

Tabel 4. Hasil doubling time dari persamaan regresi linear.

Bahan uji	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Persamaan garis waktu Inkubasi vs jumlah sel	Y	Doubling time (jam)
Kontrol sel		$y = 0,006X + 3,756$	4	41
Fraksi etil asetat	58,4	$y = 0,004X + 3,748$	3,98	58
Cisplatin	23,6	$y = 0,004X + 3,715$	3,973	64,5

Tabel 5. Hasil flowcytometry fraksi aktif daun salung.

Bahan uji	Sel hidup (%)	Sel apoptosis awal (%)	Sel apoptosis akhir (%)	Total apoptosis (%)	Sel nekrosis (%)
Kontrol sel	96,38	1,09	0,68	1,77	1,85
Fraksi etil asetat	0,98	0,06	72,76	72,82	26,20
Cisplatin	0,90	0,07	87,89	87,96	11,14

SIMPULAN

Dari penelitian efek ekstrak dan fraksi daun Salung (*Psychotria viridiflora* Reinw. Ex. Blume) sebagai sitotoksik, antiproliferasi dan penginduksi apoptosis pada sel kanker serviks HeLa dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

Ekstrak daun Salung memiliki nilai IC_{50} 380,7 $\mu\text{g/mL}$, fraksi *n*-heksan sebesar 229,3 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat sebesar 116,8 $\mu\text{g/mL}$, dan fraksi metanol air

sebesar 562,8 $\mu\text{g/mL}$, fraksi etil asetat mempunyai aktivitas sitotoksik dengan kategori cukup aktif.

Fraksi aktif etil asetat dari ekstrak daun Salung memiliki aktivitas antiproliferasi pada jam ke 58 lebih kecil dari cisplatin pada jam ke 64,5.

Fraksi aktif etil asetat daun Salung memiliki kemampuan menginduksi apoptosis sebesar 72,82% sedangkan cisplatin sebesar 87,96%. Fraksi etil asetat dari ekstrak daun salung berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat antikanker.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan pada Universitas Sriwijaya yang telah member dukungan dana penelitian Hibah kompetitif pada tahun 2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Pitkin, J., Peattie, A., Magowan, AB. *Obstetric and gynaecology an illustrated colour text*. London. 2003.
- Sudarsono. *Tumbuhan obat II*. Yogyakarta: Pusat Studio Obat Tradisional Universitas Gadjah Mada; 2002.
- Budiani DR, Setiawan Y, Wijono WY, Pesi RN. Pengaruh ekstrak batang Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*, Merr & Perry.) terhadap ekspresi protein p53 mutan galur sel kanker payudara T47D. Banjarmasin: PIT, IAPI; 2007.
- Hermansyah, Herlina, Sugiyama M, Harashima S. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* as model to identify Mengkudu (*Morinda citrifolia*) as an anticancer medicinal plants candidates with antiproliferative properties. Palembang: Chemistry Department; 2010.
- Fitri, Dini Mai. Uji aktivitas antiproliferasi senyawa (+)-2'-2'-episitokirin A dari jamur *Endofit diaporthes* Sp. yang diisolasi dari tumbuhan Gambir (*Uncaria gambier* Roxb.) terhadap beberapa sel kanker. Magister Tesis. Fakultas MIPA. 2008.
- Haqea MR, Ansaria SA, Rashikh A. *Coffea arabica* seed extract stimulate the celluler immune function and cyclophosphamide-induced immunosuppression in mice. Iranian J Phamaceutic. 2013.
- Salni. Eksplorasi bahan bioaktif antibakteri untuk mengobati infeksi penyakit kulit di Sumatera Selatan. Lembaga Penelitian Unsri. Indralaya. 2009.
- Utami, Dewi. Aktivitas sitotoksik isolat 5 fraksi etil asetat ekstrak petroleum eter daun *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. pada turunan sel kanker serviks manusia (HeLa). *Jurnal Ilmiah Kefarmasian* 1. 2011.
- CCRC. Standart operating procedure cancer chemoprevention research center. Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta. 2009.
- Anggraini P. Uji sitotoksik ekstrak etanol 70% buah Kumukus (*Piper cubeba* L.) terhadap sel HeLa. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. 2008.
- Weerapreeyakul N, Nonpunya A, Barusrux S, Thitimetharoch T and Sripanidkulchai B. Evaluation of the anticancer potential of six herbs against a hepatomacellline. *J. Chinese Medicine*. 2012. 7(15).
- Nissa CK, Oehadin A, Martakusumah AH, Dewi YA. Perbandingan akurasi berbagai formula untuk mengestimasi laju filtrasi glomerulus pada penderita karsinoma nasofaring stadium lanjut sebelum mendapat kemoterapi cisplatin. *MKB*. 2015.
- Kurniandari N, Susantiningsih T, dan Berawi KN. Efek ekstrak etanol kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai senyawa nefroprotektor terhadap gambaran histopatologis ginjal yang di induksi Cisplatin. *Majority*. 2015.
- Febriansah R. Kajian secara in vitro ekstrak etanolik buah *Morinda citrifolia* L. sebagai agent khemopreventif kanker payudara yang potensial. Magister Tesis. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah. Yogyakarta. 2010.
- Meyer BN, Ferrigni, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*. 1982.
- Roth A, Kuballa B, Bounthan P, Sevenet T, Beck JP, Anton R. Cytotoxic activity of polyindoline alkaloids of psychotria for steriana (Rubiaceae). *Universite Louis Pasteur. France*. 1986.
- Harborne. *Metode fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Ed II. Bandung: ITB; 2004.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure activity relationships. *Biochemistry*. 2002.
- Thippeswamy G and Salimath BP. Cricia aromatic extract indices apoptosis and inhibits angiogenesis in ehrlich ascites tumour cells in vivo. *My Science*. 2006.
- Brown JM and Wouters G. Apoptosis, p53. And Tumor Cell Sensitivity to Anticancer Agents. *Cancer Research* 59; 1999. 1391-99.
- Yulia. Uji penghambatan proliferasi sel HeLa dan sel raji oleh ekstrak etanol buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.). Tesis. Fakultas Farmasi: Universitas Pancasila. 2009.
- Saphiro, Geoffrey I, and Harper J, Wade. *Anticancer Drug Targets: Cell Cycle and Checkpoint Control*, J. Clin Invest. 1999.

Karakterisasi dan Uji Aktivitas Protein Susu Kerbau (*Bubalus bubalis*) Fermentasi sebagai *Angiotension Converting Enzyme (ACE) Inhibitor*

(Characterization and Angiotension Converting Enzyme ACE-inhibitory activity of Fermented Buffalo Milk (*Bubalus bubalis*)

SRI YADIAL CHALID^{1*}, SITI NURBAYTI², ANDHIKA FAJAR PRATAMA²

**Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
Jakarta, Jl. Ir. H. Djuanda No. 95. Ciputat, Tangerang Selatan 15412.**

Diterima 21 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Protein dan peptida tertentu bahan pangan dapat mencegah penyakit hipertensi melalui penghambatan aktivitas *Angiotensin Converting Enzyme (ACE)* atau sebagai ACE inhibitor. Susu kerbau fermentasi atau dadih berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional sebagai antihipertensi. Penelitian ini bertujuan menentukan waktu fermentasi yang optimum berdasarkan karakteristik fisik dan kualitas kimia yaitu keasaman, kadar protein, derajat hidrolisis dan aktivitas ACE inhibitor. Susu kerbau difermentasi secara spontan selama 0, 1, 2, 3, dan 4 hari, nol hari sebagai kontrol. Protein dadih diekstrak dengan etanol dan difraksinasi menggunakan membran ultrafiltrasi dengan bantuan sentrifugasi dan hasil fraksinasi diuji sebagai ACE inhibitor. Fraksi protein dengan aktivitas inhibitor ACE tertinggi dianalisa komposisi asam amino dengan menggunakan *ultra performance liquid chromatography*. Hasil yang didapatkan adalah waktu fermentasi terbaik adalah 1 hari dengan kadar protein terlarut adalah 912,73 ppm dan aktivitas inhibitor ACE sebesar 87,52% dan derajat hidrolisis 23,38%. Hasil fraksinasi berdasarkan bobot molekul didapatkan nilai ACE inhibitor tertinggi pada fraksi dibawah 3 kDa dengan kemampuan ACE inhibitor sebesar 99,3%. Komposisi asam amino yang didapatkan adalah treonin 0,0249%, prolin 0,039%, alanin 0,045%, fenil alanin kecil dari 0,012% dan asam glutamat 0,158%. Secara umum disimpulkan bahwa dadih mampu menghambat aktivitas ACE dan berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional.

Kata kunci: Dadih, fermentasi, ACE inhibitor, ultrafiltrasi.

Abstract: Specific food protein and peptides could prevent hypertension pass through mechanism of inhibition of enzyme activity of angiotensin converting enzyme (ACE) or ACE inhibition. Fermented buffalo milk or dadih has the potential to be developed into antihypertensive food. The purpose of this study was to investigate optimum fermentation time based on characteristics, measure the acidity of dadih, protein extraction, degree of hydrolysis, dissolved protein level and the activity of ACE inhibition. Protein extract was fractionated using ultrafiltration membrane assisted with centrifuge and then do the activity of ACE inhibition as ACE inhibitor. Buffalo milk was fermented for 0, 1, 2, 3 and 4 days, zero day as a control. Protein of dadih was extracted using alcohol solution then was fractionated. The fraction that has the highest the activity was analyzed their amino acid composition using ultra performance liquid chromatograph. The result are the best fermentation time during one day, dissolved protein levels was 912.73 ppm, and the highest ACE inhibitor activity was 87.52% and the degree of hydrolysis was 23.38%. Fractionation results based on molecular weight was below 3 kDa, this molecule have the highest ACE inhibitor activity was 99.3%. The amino acid composition that we got was threonine (0.0249%), proline (0.039%), alanine (0.045%), phenyl alanine smaller than 0.012% and glutamic acid 0.158% respectively. We conclude that dadih can inhibit ACE activity and it has the potential to be developed into functional food.

Keywords: Dadih, fermentation, ACE inhibitor, ultrafiltration.

*Penulis korespondensi: Hp :081380142169

Email: sri.yadial@uinjkt.ac.id

PENDAHULUAN

HIPERTENSI atau tekanan darah tinggi, termasuk penyakit kardiovaskuler yang banyak menelan korban yaitu sekitar 12,8% dari kematian seluruh dunia⁽¹⁾. Prevalensi hipertensi Nasional berdasarkan Riskesdas 2013 didapatkan sebesar 25,8%, dimana penderita tertinggi ditemukan pada Kepulauan Bangka Belitung (30,9%), sedangkan terendah di Papua sebesar (16,8%)⁽²⁾. Obesitas, jenis kelamin, riwayat merokok merupakan faktor yang meningkatkan kasus hipertensi⁽³⁾.

Penatalaksanaan hipertensi dapat dilakukan dengan menggunakan obat-obatan ataupun dengan cara modifikasi gaya hidup⁽²⁾. Pengobatan hipertensi dengan obat sintetik seperti hidroklorotiazid, kaptopril dan amlodipin merupakan langkah yang efektif, namun obat tersebut mempunyai efek samping seperti sakit kepala, edema pada pergelangan kaki, mual dan peningkatan air seni⁽⁴⁾. Pangan fungsional merupakan salah satu alternatif yang aman untuk menjaga tekanan darah tidak naik. Pangan fungsional antihipertensi banyak dikembangkan dari bahan pangan berbasis susu fermentasi⁽⁵⁾ dan kacang-kacangan⁽⁶⁾.

Penduduk Jepang memiliki usia terpanjang di dunia karena mereka menjaga diet seimbang. Sebagian besar penduduk Bulgaria berumur panjang karena kebiasaan mereka konsumsi yogurt sebagai pangan fungsional⁽⁷⁾. Klaim suatu pangan mempunyai sifat fungsional harus dibuktikan secara ilmiah baik secara *in vitro* dan *in vivo*⁽⁸⁾. Dadih atau susu kerbau fermentasi dapat dikembangkan menjadi pangan fungsional antihipertensi, namun harus dibuktikan dengan penelitian secara *in vitro* dan *in vivo*. Dadih merupakan kearifan lokal khas dari Sumatra Barat dan Riau.

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa dadih bebas lemak secara *in vitro* terbukti bersifat sebagai antioksidan yaitu dapat menangkal radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dengan konsentrasi 44,86 ppm⁽⁹⁾. Bakteri yang terlibat pada fermentasi susu kerbau adalah bakteri asam laktat (BAL) indigenus, dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang berasal dari tabung bambu dan daun pisang sebagai penutup dadih. *L. plantarum* dapat mengasimilasi kolesterol dan mendekonyugasi garam empedu, yaitu lebih besar dibandingkan BAL dari yoghurt. *L. plantarum* IS-10506 juga menunjukkan kemampuan menekan pertumbuhan bakteri patogen dengan signifikan sehingga BAL dadih berpotensi dimanfaatkan sebagai probiotik. Sebanyak 36 strain BAL ditemukan pada dadih berasal dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*^(10,11,12).

Sepuluh strain BAL dadih bersifat asam dan toleran terhadap asam empedu secara *in vitro* sehingga strain ini berpotensi sebagai antimutagenik dan hipokolesterolemik^(11,13). Penelitian terkait protein dan peptida bioaktif dari bahan pangan fermentasi seperti susu telah banyak dilakukan, dimana sifat fungsional susu ditemukan pada protein kasein dan *whey*^(14,15). Penelitian yang terkait dengan karakter protein atau peptida serta potensi dadih sebagai minuman fungsional antihipertensi belum ada yang melaporkan.

Sifat bioaktif peptida dari susu sebagai antihipertensi diperankan oleh protein kasein yang mempunyai aktivitas penghambatan *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Sekuen asam amino sebagai agent antihipertensi adalah Phe-Pro-Glu-Val-, Phe-Glu-Lys-, Asn-Leu-His-Leu-Pro-, Leu-Pro-Leu-Leu, Leu-Asn-Val-Pro-Gly dan glu- Ile-Val-glu⁽¹⁶⁾. Peptida antihipertensi bertindak sebagai inhibitor ACE, yaitu enzim sistem renin-angiotensin. ACE mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II, penghambatan ACE mempunyai efek antihipertensi melalui penurunan angiotensin II dan peningkatan bradikinin⁽¹⁷⁾.

Inhibitor ACE sintetik seperti Captopril® dan Lisinopril® dapat meningkatkan bradikinin dan mereduksi angiotensin II, namun penggunaan obat antihipertensi sintetik yang dikonsumsi secara rutin dalam jangka waktu lama memberikan efek samping seperti buang air kecil terlalu sering, tubuh terasa lemas dan ingin pingsan, serta denyut jantung yang abnormal⁽¹⁸⁾. Sebanyak 36% pasien mengeluhkan efek samping katopril dan sebanyak 45% untuk obat amlodipin⁽¹⁹⁾.

Bakteri asam laktat memiliki sistem proteolitik yang menghidrolisis protein susu menghasilkan peptida aktif sebagai ACE inhibitor⁽²⁰⁾. Peptida ACE inhibitor atau antihipertensi yang berasal dari susu biasanya mengandung 10 asam amino dan mayoritas bersifat sebagai ACE inhibitor sedang (moderat) dengan rentang IC₅₀ sebesar 100-500 µmol/L⁽²¹⁾, dan berasal dari strain spesifik⁽²²⁾. Penelitian ini untuk mengangkat dadih mejadi pangan atau minuman fungsional antihipertensi. Dadih merupakan kearifan lokal dari Sumatra Barat, klaim dadih sebagai minuman fungsional antihipertensi perlu didukung oleh data ilmiah secara *in vitro* dan *in vivo*.

Susu kerbau difermentasi secara spontan dalam tabung bambu dengan variasi waktu fermentasi 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Pemilihan waktu fermentasi pada penelitian ini didasarkan pada tradisi konsumsi dadih di daerah Bukittinggi dan bentuk fisik dadih (warna, rasa dan kekentalan). Umumnya masyarakat Sumatra Barat menyukai dadih yang difermentasi 1 sampai 6 hari. Warna dadih yang disukai adalah dadih

dengan warna putih-butek sampai kuning-butek. Warna dan kekentalan dadih untuk masing-masing waktu fermentasi berbeda-beda, begitu juga tingkat keasaman serta citarasa.

Tujuan penelitian ini adalah menentukan waktu fermentasi terbaik berdasarkan bentuk fisik meliputi warna dan bau, rasa dan kekentalan dilanjutkan mengukur tingkat keasaman, derajat hidrolisis, ekstraksi protein, penentuan kadar protein terlarut dan kemampuan ekstrak protein untuk menghambat ACE. Dadih dengan nilai ACE maksimal dilakukan uji proksimat yang meliputi analisa kadar air, abu, lemak dan protein, kemudian dilakukan fraksinasi protein dengan membran ultrafiltrasi untuk dadih dengan kadar protein dan derajat hidrolisis tertinggi.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu dari satu ekor kerbau betina yang berusia ± 4 tahun, kerbau berasal dari peternak kerbau di desa Gaduik, Bukittinggi, Sumatra Barat. Susu kerbau difermentasi secara spontan di dalam tabung bambu selama 1, 2, 3, 4 hari, dan nol hari sebagai kontrol. Bahan kimia yang digunakan adalah enzim *Angiotension Converting Enzyme* (ACE) dari paru-paru kelinci dari Sigma-Aldrich (EC 3.4.15.1, 1U/mg-1), *hippuryl-histidyl-leucine* (Hip-His-Leu) dari Sigma-Aldrich, hidrogen klorida (HCl), natrium hidroksida (NaOH) dari Merck, alkohol absolut dari Merck, *bovine serum albumin* (BSA) dari Sigma-Aldrich, *Trichloro Asetat Acid* (TCA), *coomasie brilliant blue G-250* dari Merck, α *Aminobutyric Acid* (AABA) dari Sigma-Aldrich. Bakteri asam laktat (BAL) yang terdapat pada dadih adalah bakteri indigenus dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 dan dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus*.

Alat. Peralatan yang digunakan adalah spektrofotometer UV-VIS (Parkin Elmer, tipe Lamda 25) *freeze dryer* alpha 1-2 Ldplus dari Martin Christ, *freezer-Hard-20 °C* tipe *upright* dari Lloyd, pH meter dari Sigma, timbangan analitik Ohaus model PA214, *vortex-mixer* 110 V MX-F, termometer air raksa, blender Philips HR 2116, membran filtrasi (Amicon Centricon Ultra 15 *cut-off* 100, 50, 30, 10 dan 5 kDa), alat gelas laboratorium, mikropipet 5 μ L hingga 1000 μ L dari Socorex, kertas saring Whatman No.1, kertas saring biasa, *shaking water bath* tipe SWBR17, evaporator, UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography* dari Waters dengan kondisi: kolom ACCQ-TagUltra C18, suhu 49 °C, fase gerak; sistem komposisi gradient dengan laju alir 0,7 mL/menit, detektor PDA panjang gelombang 260 nm dan

volume injeksi 1 μ L.

METODE. Penelitian ini terbagi menjadi empat tahap. Tahap pertama adalah fermentasi susu kerbau. Pemilihan waktu fermentasi terbaik berdasarkan karakter dadih dilakukan oleh 10 orang panelis tidak terlatih. Tahap kedua adalah pengukuran tingkat keasamaan dadih, ekstraksi protein. Tahap ketiga adalah uji derajat hidrolisis, uji proksimat untuk dadih dengan kadar protein tertinggi. Tahap keempat adalah uji ACE inhibitor, fraksinasi dengan membran ultrafiltrasi dan analisis komposisi asam amino.

Fermentasi Susu Kerbau. Susu kerbau diperah dari satu ekor kerbau betina yang sedang laktasi. Susu kerbau dituangkan ke dalam tabung bambu sebagai wadah dan difermentasi secara spontan (tanpa *starter* bakteri) masing-masing selama 0, 1, 2, 3, 4 hari (n=3). Sebanyak 180-200 mL susu kerbau (Tabel 1). Tabung bambu terlebih dahulu dibersihkan dengan kain bersih sebelum dimasukkan susu kerbau.

Tabel 1. Lama fermentasi dan volume susu kerbau dalam tabung bambu.

Lama fermentasi (hari)	Volume susu kerbau (mL)	Kode sampel
0	180 \pm 0,707	Kontrol (K)
1	180 \pm 1,414	S1
2	197 \pm 0,707	S2
3	200 \pm 0,707	S3
4	180 \pm 1,414	S4

Ket: K = kontrol, S= dadih

Pemerahan susu kerbau dilakukan setiap hari pada pukul 07.00-08.00 selama 5 hari berturut-turut. Ambing susu kerbau dibersihkan dengan kain bersih yang sudah dibasahi dengan air hangat. Pakan kerbau selama proses pemerahan adalah rumput dan daun jagung muda. Waktu fermentasi susu kerbau selama 0, 1, 2, 3 dan 4 hari. Hari ke-0 merupakan kontrol, yaitu tanpa fermentasi dimana susu kerbau perahan langsung disimpan ke dalam *freezer*. Susu kerbau yang difermentasi 1 hari dihentikan fermentasi tepat pada jam 08.00 keesokan harinya dengan cara menyimpan dadih ke dalam *freezer*. Sampel dengan variasi fermentasi 2 hari dan selanjutnya dilakukan dengan hal yang sama yaitu fermentasi dihentikan pada dua, tiga dan empat hari setelah susu dimasukkan ke dalam bambu. Masing-masing sampel diberi kode S dan K untuk kontrol.

Keasaman Dadih (AOAC 2005). pH sampel diukur menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan buffer pH 4,0 dan pH 7,0 sesuai kisaran yogurt. Ditimbang sebanyak 10

gram dadih dimasukkan ke dalam beker gelas dan tambahkan akudes mencapai volume 10 mL sambil dihancurkan. Elektroda pH meter dicelupkan ke dalam media dadih dan ditunggu hingga skala pH meter stabil untuk mendapatkan nilai keasaman yang akurat.

Analisis Komposisi Kimia Dadih (Uji Proksimat). Meliputi kadar air, abu, lemak dan protein⁽²³⁾.

Ekstraksi Protein Terdiri Dari Tahapan. Deffacting (Pembebasan Lemak). Penghilangan lipid dilakukan dengan cara merendam dadih dengan larutan *n*-heksan dengan perbandingan 1:5 (sampel:*n*-heksan) selama 1 jam pada suhu kamar sambil diaduk. Sampel disentrifugasi pada kecepatan 8000xg, selama 15 menit, suhu 4 °C. Supernatan dibuang dan endapan diulangi proses penambahan heksan sambil diaduk dan disentrifuse (8000xg, 15 menit, 4 °C). Tepung bebas lemak dikumpulkan dan dikering anginkan untuk membebaskan sisa heksan sehingga didapatkan tepung dadih⁽²⁴⁾.

Ekstraksi Protein. Ekstraksi protein dadih dilakukan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat. Tepung dadih bebas lemak sebanyak 5 g disuspensikan ke dalam 100 mL etil alkohol absolut dimana protein tidak larut dalam etanol absolut. Presipitat dikumpulkan melalui sentrifugasi pada 6000 g, selama 15 menit dan 4 °C. Presipitat disuspensikan kembali ke dalam 100 mL etil alkohol 70%, lalu divortek sampai larut dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 6000 g, selama 15 menit dan suhu 4 °C. Supernatan (fraksi larut etil alkohol 70%) dikumpulkan dan diuapkan dengan evaporator berputar, dikering bekukan sehingga didapatkan ekstrak atau hidrolisat protein dadih⁽²⁵⁾.

Penentuan Derajat Hidrolisis (DH). Derajat hidrolisis dihitung dengan metode SN-TCA⁽²⁶⁾. Sebanyak 20 mg hidrolisat dadih ditambahkan 20 mL TCA 10% (b/v) dan divortek. Campuran kemudian didiamkan selama 30 menit agar terjadi pengendapan, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 7.800 rpm, selama 15 menit. Supernatan dianalisis kadar nitrogen menggunakan metode Kjeldahl⁽²³⁾. Derajat hidrolisis

$$\text{Derajat Hidrolisis (\%)} = \frac{\text{Nitrogen terlarut dalam 10\% TCA}}{\text{Nitrogen total sampel}} \times 100\%$$

dihitung dengan rumus:

Uji Kadar Protein Terlarut. Sampel hidrolisat dadih 0,5 mg dilarutkan dengan 100 mL dengan akuades, divortek sampai larut dan disaring dengan kertas saring dan diambil filtrat. Sebanyak 100 µL filtrat protein ditambahkan dengan 5 mL reagen *Bradford*, diaduk dan biarkan selama 5 menit sampai 1 jam (warna biru stabil dalam range waktu ini). *Bovine*

serum albumin (BSA) digunakan sebagai standar⁽²⁷⁾.

Fraksinasi Protein. Hidrolisat protein dadih dengan kadar protein optimal difraksinasi dengan menggunakan membran ultrafiltrasi secara bertahap yaitu larutan protein dihomogenisasi terlebih dahulu dan disentrifuse dengan kecepatan 15.000xg selama 5 menit, 4 °C. Supernatan disaring dengan *amicon centricon ultra (cut-off 100 kDa)* dengan bantuan sentrifugasi pada kecepatan 13.000xg selama 30 menit dan suhu 4 °C. Supernatan yang melewati membran kemudian disaring dengan membran filter 0,45 dan 0,22 µm, sedangkan yang tertahan (permeat) dikumpulkan. Rententat dilanjutkan fraksinasi dengan membran ultrafiltrasi 50 kDa dengan bantuan sentrifugasi 13000xg selama 30 menit suhu 4 °C. Fraksi dengan berat molekul kecil dari 50 kDa dilanjutkan fraksinasi dengan 30, 10 dan 5 kDa dengan cara yang sama. Semua permeat dan rententat yang didapatkan dikumpulkan untuk dilakukan uji kadar protein terlarut dan uji ACE inhibitor^(28,29,30).

Uji Aktivitas ACE Inhibitor. Uji ini berdasarkan pembebasan asam hipurat dari substrat Hip-His-Leu yang dikatalisis oleh ACE. Protein dadih hasil ekstraksi dan fraksinasi sebanyak 15 µL ditambahkan dengan 125 µL *buffer* Na-borat 100 mM (pH 8.3) yang mengandung 7,6 mM Hip-His-Leu dan 608 mM NaCl, kemudian dipreinkubasi selama 5 menit pada suhu 37 °C. Reaksi dimulai dengan penambahan 50 µL enzim ACE 50 mU yang dilarutkan dalam air destilat. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C dan sebagai blanko digunakan air destilata sebanyak 50 µL. Reaksi dihentikan dengan penambahan 125 µL HCl 1N. Asam hipurat yang dilepaskan oleh ACE, diekstrak dengan menambahkan 750 µL etil asetat ke dalam campuran dan segera divorteks, disentrifugasi pada kecepatan 13760xg selama 10 menit. Sebanyak 500 µL lapisan atas dari supernatan (asam hipurat) dikumpulkan dan dikeringkan pada suhu 90 °C selama 30 menit di dalam oven. Asam hipurat yang didapatkan dilarutkan dengan 1 mL air destilat dan diukur absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 228 nm^(29,30). Aktivitas ACE inhibitor dihitung menurut persamaan:

% Aktivitas penghambatan = [(C-A) / (C-B)] x 100 %
Dimana: A= absorbansi sampel, B= absorbansi blanko, dan C=absorbansi kontrol.

Analisis Komposisi Asam Amino. Fraksi dengan nilai ACE inhibitor yang tertinggi dianalisis komposisi asam amino. Sampel hasil fraksinasi sebanyak 0,1 gram ditimbang dan dilarutkan dengan 5 mL larutan HCl 6 N. Larutan lalu dihidrolisis selama 22 jam pada suhu 110 °C. Larutan yang sudah dihidrolisis didinginkan dan dipindahkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditera dengan akuabides hingga

tanda batas. Larutan disaring dengan filter 0,45 μm . Sebanyak 500 μL larutan dipipet dan ditambah dengan 40 μL α Aminobutyric Acid (AABA) dan 460 μL akuabides sambil dihomogenisasi. Larutan yang telah homogen dipipet sebanyak 10 μL dan ditambahkan AccQ fluor borate serta 20 μL pereaksi Fluor A dan dihomogenkan kembali. Larutan didiamkan selama 1 menit dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 55 $^{\circ}\text{C}$. Sebanyak 10 μL sampel diinjeksikan ke alat UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*)⁽³¹⁾.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Dadih. Uji karakteristik dadih adalah uji organoleptik berdasarkan Standar Nasional Indonesia untuk *yogurt* yaitu SNI 2981:2009 karena standar untuk dadih belum ada. Karakter fisik yang diamati adalah warna, aroma, rasa, tekstur dan kekentalan. Uji organoleptik ini dilakukan oleh 10 orang panelis tidak terlatih namun terbiasa konsumsi dadih (Tabel 2). Kualitas kimia ditentukan dari uji kadar protein, lemak, air, tingkat keasaman dan abu (Tabel 3).

Hasil pengamatan fisik dadih adalah berwarna putih kekuning-kuningan, kental atau mengumpal

Tabel 2. Hasil pengujian organoleptik dadih variasi waktu fermentasi.

No	Kriteria penilaian	Waktu fermentasi (hari)				
		0	1	2	3	4
1	Warna	0	3	4	2	1
2	Aroma	1	2	3	2	2
3	Rasa	0	3	3	2	2
4	Tekstur	1	2	3	3	1
5	Kekentalan	0	2	2	4	2

Ket: Uji berdasarkan SNI 2981:2009

Tabel 3. Hasil uji proksimat susu kerbau fermentasi 1 hari (n=2).

Parameter	Kadar (%)
Air	76,05 \pm 1,21
Abu	0,83 \pm 0,09
Lemak	13,62 \pm 0,27
Protein	6,04 \pm 0,08

(*curd*). Warna dadih selama 3 dan 4 hari fermentasi lebih kuning daripada dadih yang difermentasi selama 1 atau 2 hari. Rasa dadih berbeda-beda untuk tiap waktu fermentasi. Dadih tanpa fermentasi atau nol hari memberikan rasa ambar atau rasa asli susu kerbau

sedangkan fermentasi selama 1 hari mulai terasa asam. Fermentasi selama 2 dan 3 rasa asam lebih kuat sedangkan fermentasi selama 4 hari rasa asam paling kuat (berasa lebih asam). Kami menyimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasi rasa asam semakin kuat atau semakin tajam. Panelis lebih menyukai warna, aroma, rasa, tekstur dan kekentalan susu kerbau yang difermentasi selama 2 hari.

Pembatasan lama fermentasi pada penelitian ini adalah hari ke-4 yaitu berdasarkan kebiasaan konsumsi dadih di daerah Bukittinggi. Konsumen lebih cenderung menyukai dadih yang difermentasi antara 2 sampai 4 hari. Panelis lebih banyak memilih warna dadih hasil fermentasi 2 hari yaitu warna kuning butek, warna dadih dengan waktu fermentasi 4 hari terlihat kuning kusam dan bau asam lebih tajam serta sensasi di mulut juga tidak se enak fermentasi 1, 2, dan 3 hari. Fermentasi memberikan banyak manfaat, antara lain untuk mengawetkan makanan, memberi cita rasa atau *flavour* yang disukai, menghasilkan produk dengan tekstur tertentu⁽³²⁾.

Lama fermentasi susu kerbau yang paling baik adalah selama 2 hari dan suhu 45 $^{\circ}\text{C}$ ⁽³³⁾. Umumnya masyarakat Sumatra Barat terutama daerah kabupaten Agam, Solok, Tanah Datar dan Lima Puluh Kota memeram susu kerbau selama 3 atau 4 hari, biasanya dijadikan bahan lauk-pauk sebagai pelengkap makan nasi. Dadih disajikan dengan cara memindahkan dadih ke dalam wadah atau piring yang telah ditaburi garam dan irisan bawang merah, diaduk sampai rata. Penyajian dadih dilengkapi dengan sambal cabe merah rebus yang digiling halus dan diasamkan dengan jeruk nipis atau dicampur dengan rebusan terong.

Beberapa daerah di Sumatra Barat menikmati dadih dengan cara mencampurkan dadih dengan beras emping yang terbuat dari beras pulut (ketan) dan ditambahkan air gula aren atau gula merah sebagai pemberi rasa manis. Secara tradisional konsumsi dadih saat pesta pernikahan dan sambil memberi yang terhormat pada Datuk atau kepala suku dan dianggap menambah nafsu makan sehingga sering dihidangkan untuk orang-orang yang selera makan berkurang atau baru sembuh dari sakit⁽³⁴⁾. Dadih juga merupakan makanan yang digemari pada waktu tertentu misalnya pada waktu lebaran atau libur sekolah dimana banyak para perantau Minang pulang ke kampung.

Pada penelitian ini kadar protein susu kerbau yang difermentasi 1 hari pada suhu ruang didapatkan sebesar 6,04%, nilai ini tidak berbeda jauh dengan penelitian⁽³³⁾ yang mendapatkan kadar protein susu kerbau fermentasi selama 1 hari adalah 6,34% namun fermentasi dilakukan pada suhu 45 $^{\circ}\text{C}$. Kadar protein dadih sedikit berbeda bila wadah fermentasi yang digunakan berbeda yaitu wadah bambu sebesar 6,81%

sedangkan wadah plastik sebesar 6,34%.

Semakin lama waktu fermentasi maka rasa, aroma, warna dan kesukaan juga menurun⁽³⁴⁾. Kadar protein susu kerbau diperkirakan dipengaruhi oleh pakan, umur kerbau, periode laktasi, iklim, musim, dan kondisi kesehatan kerbau. Menurut Surono, kerbau diberi makan dengan rumput alami, bebas dari antibiotik sehingga tidak ditemukan residu antibiotik pada susu kerbau, berkemungkinan memberikan efek penghambatan pada pertumbuhan starter dan penyebab kegagalan produk dadih⁽³⁵⁾. Komposisi kimia susu kerbau fermentasi 1 hari disajikan pada Tabel 3.

Tingkat Keasaman (pH). Bakteri asam laktat (BAL) adalah bakteri indogenus dari strain *Lactobacillus plantarum* IS-10506 yang didapatkan pada dadih, selain *L. plantarum* juga didapatkan 36 strain BAL dadih dari genus *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, dan *Lactococcus* yang mempunyai aktivitas sebagai pengurai gula laktosa menjadi asam laktat^(36,37,38). BAL dari genus *Lactobacillus* menghasilkan enzim yang dapat merombak gula susu menjadi asam laktat. Nilai pH dadih berkisar antara 5,5 sampai 4,4, dapat disimpulkan bahwa dadih bersifat asam (Tabel 4).

Suasana asam pada dadih ini diperkirakan berasal dari perombakan gula susu (laktosa) oleh enzim bakteri asam laktat menjadi asam laktat. Hal ini dikuatkan oleh pernyataan bahwa rasa asam pada susu dan produk susu berasal dari gula susu atau laktosa yang dirombak menjadi asam laktat (*lactic acid*) dengan bantuan enzim bakteri homofermentatif. Bakteri homofermentatif mampu memproduksi asam laktat dari glukosa sebanyak lebih dari 85-90%⁽³⁹⁾.

Hasil pengukuran tingkat keasaman dadih pada beberapa variasi waktu fermentasi dapat disimpulkan bahwa semakin lama waktu fermentasi semakin rendah nilai pH atau semakin tinggi konsentrasi asam atau konsentrasi ion hidrogen yang dihasilkan pada dadih.

Disimpulkan bahwa BAL yang terdapat di dalam dadih diperkirakan punya aktivitas tinggi mengubah laktosa menjadi asam laktat, ditandai dengan makin tingginya keasaman dadih. Hal ini juga berkemungkinan akibat terjadinya peningkatan kadar asam laktat yang diproduksi oleh BAL, dimana semakin lama waktu fermentasi maka makin banyak jumlah bakteri yang hidup dan semakin banyak produk asam laktat yang dihasilkan. Menurut Sunarlim perpanjangan waktu inkubasi atau waktu fermentasi dapat menurunkan nilai pH kefir dan penambahan konsentrasi gula dapat meningkatkan nilai pH kefir susu kambing⁽⁴⁰⁾.

Sepuluh strain BAL dadih bersifat asam dan

toleran terhadap asam empedu secara *in vitro* sehingga *strain* ini berpotensi sebagai antimutagenik dan hipokolesterolemik^{(39),(40)}. BAL dadih bersifat antimutagenik dan hipokolesterol yaitu menurunkan secara signifikan total kolesterol, LDL serum dan total asam empedu⁽³⁶⁾. Tikus yang diberi pakan kolesterol tinggi dan kemudian diberi pakan mengandung dadih ternyata mampu menurunkan kolesterol serum tikus sebesar 39,7%⁽⁴¹⁾.

Ekstrak Protein Dadih. Protein hasil ekstraksi dengan pelarut alkohol, disentrifuse dengan kecepatan 13.000 g selama 15 menit pada suhu 4 °C dan dihasilkan supernatan. Supernatan dikeringkan dengan cara *freeze drying* sehingga didapatkan tepung dadih atau hidrolisat. Hidrolisat protein dilarutkan dengan akuades, disentrifuse dan ditentukan kadar protein dengan metode *Bradford*. Kadar protein yang didapatkan dari penelitian ini cenderung meningkat sejalan dengan bertambah lamanya waktu fermentasi namun kadar protein optimal didapatkan pada fermentasi selama 1 hari (Tabel 4).

Peningkatan kadar protein susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari diperkirakan terjadi akibat aktivitas enzim protease yang dapat membuka lipatan-

Tabel 4. Hasil pengukuran nilai pH dadih pada berbagai waktu fermentasi (n=2).

Kode sampel	Lama fermentasi (hari)	Nilai pH
K	0	5,5 ± 0,43
S1	1	4,8 ± 0,00
S2	2	4,2 ± 0,56
S3	3	4,5 ± 0,28
S4	4	4,4 ± 0,21

Ket: K = kontrol, S= sampel dadih

lipatan struktur sekunder polipeptida atau memutuskan ikatan peptida di dalam molekul protein sehingga asam amino seperti residu asam amino dengan rantai samping aromatik (tirosin, triptofan, dan fenilalanin) atau bersifat basa (arginin, histidin, dan leusin) membentuk kompleks dengan pewarna commasie brilliant blue G-250. Asam amino ini membentuk kompleks berwarna biru, semakin banyak jumlah asam amino aromatik yang dihasilkan maka makin pekat warna biru yang terbentuk sehingga kadar protein juga meningkat. Hal yang sama juga didapatkan oleh Daswati, dimana waktu fermentasi selama 12, 24, 36 dan 48 jam menunjukkan peningkatan kadar protein yaitu 6,34:7,73:8,82 dan 9,96% untuk masing-masing waktu fermentasi sedangkan kadar air menurun dengan bertambah lamanya waktu fermentasi⁽³³⁾.

Peningkatan ini juga dapat terjadi karena BAL berfungsi sebagai sumber protein *single cell*. BAL

mampu melakukan biosintesis sumber asam amino eksogen seperti isoleusin, leusin, valin, histidin dan metionin atau peptida yang digunakan untuk pertumbuhan⁽⁴²⁾. Protein dari BAL dilepaskan ke dalam media pertumbuhan yaitu dadih, namun kadar protein menurun pada hari ke-2 sampai hari ke-4, hal ini diperkirakan karena kematian BAL sehingga tidak dapat menyumbangkan atau melepaskan protein lagi ke dalam media fermentasi. Kadar protein pada hari kedua sampai hari keempat turun, hal ini diduga karena protein dadih digunakan BAL sebagai sumber nutrisi.

Peningkatan nilai pH atau keasaman dapat menginaktivkan enzim protease sehingga jumlah protein yang dihidrolisis terhenti. pH optimal kerja enzim renin dan papain dari BAL pada media susu sapi adalah 5,45 dan 5,05⁽⁴³⁾, sedangkan pH dadih pada penelitian ini didapatkan 4,8: 4,2: 4,5 dan 4,4 masing-masing untuk fermentasi hari ke 1, 2, 3, dan 4. Nilai pH semakin rendah dengan semakin bertambahnya waktu fermentasi. Asam amino atau protein yang dihasilkan bakteri dilepaskan ke dalam susu sebagai media fermentasi sehingga berpotensi mempengaruhi nilai gizi dan nilai biologis produk fermentasi. Asam amino tidak secara langsung mempengaruhi rasa dan aroma susu fermentasi, namun bertindak sebagai prekursor untuk sejumlah reaksi yang menghasilkan senyawa karbonil⁽⁴⁴⁾.

Lactobacillus acidophilus merupakan kelompok BAL yaitu *friendly bacteria* yang merupakan kelompok bakteri yang banyak dimanfaatkan dalam industri fermentasi susu, baik dalam pembuatan *yogurt* maupun keju. Bakteri asam laktat mengekskresikan enzim proteolitik untuk menghidrolisis kasein susu. Aktivitas kerja enzim ekstraseluler dari *Lactobacillus acidophilus* berlangsung optimal pada pH 5,5⁽⁴⁵⁾. Peran proteinase BAL mendegradasi protein susu pada ikatan spesifik menghasilkan lebih dari seratus oligopeptida yang berbeda mulai 4-18 residu asam amino dengan sebagian besar mengandung 4-8 residu asam amino⁽⁴⁶⁾.

Aktivitas ACE Inhibitor Protein Dadih. Angiotensin-I converting enzyme (EC 3.4.15.1) merupakan enzim yang memainkan peran fisiologis penting dalam pengaturan tekanan darah yaitu mengubah angiotensin I menjadi angiotensin II, suatu vasokonstriktor kuat, oleh karena itu penghambatan aktivitas ACE merupakan target utama dalam pencegahan hipertensi. Pencarian inhibitor ACE alami telah dikembangkan sebagai alternatif obat sintetik yang diketahui mempunyai efek negatif. Senyawa baru yang berpotensi sebagai ACE inhibitor adalah protein, peptida, derivatif *chitooligosaccharide* (COS) dan *phlorotannins* dari organisme laut.

Kemampuan protein dadih menghambat aktivitas ACE pada variasi waktu fermentasi lain ditampilkan pada Tabel 5. Hasil pengujian kadar protein dan aktivitas ACE inhibitor dilakukan untuk semua ekstrak protein. Hasil uji penghambatan terhadap enzim ACE atau ACE inhibitor dari ekstrak protein susu kerbau fermentasi didapatkan nilai tertinggi sebesar 87,52%, nilai ini didapatkan pada susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari. Aktivitas penghambat ACE dari tepung *whey* yang dicerna oleh enzim papain didapatkan sebesar 86,5% dan 95,7% untuk enzim proteinase-K⁽⁴⁷⁾. Pada penelitian ini kadar protein terlarut tertinggi didapatkan sebesar 781,69 mg/L yaitu kadar protein pada susu kerbau yang difermentasi selama 1 hari. Data ini menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif antara aktivitas ACE inhibitor dengan kadar protein terlarut. Menurut Yurliansi penambahan kultur khamir 1% sebagai kultur sekunder terhadap nilai nutrisi dadih mampu meningkatkan kadar protein sebesar 14%⁽⁴⁸⁾.

Aktivitas ACE inhibitor protein dadih dipengaruhi oleh waktu fermentasi dan kandungan protein dadih (Tabel 5). Susu kerbau tanpa fermentasi (waktu nol hari) hanya mampu menghambat ACE sebesar 22,22%, ini menunjukkan bahwa susu kerbau non fermentasi mempunyai aktivitas antihipertensi. Susu tanpa hidrolisis dengan enzim protease mempunyai kemampuan menurunkan tekanan darah tikus *Spontaneously Hypertensive Rat* (SHR) sebesar 38% sedangkan penambahan enzim protease menunjukkan aktivitas penghambatan ACE sebesar 58,2%⁽⁴⁷⁾.

Fermentasi selama 1 dan 2 hari menghasilkan penghambatan ACE sebesar 87,52 dan 72,75%, namun untuk fermentasi selama 3 hari terjadi penurunan aktivitas penghambatan ACE, dimana besar penghambatan sebesar 69,35%, nilai ini diperkirakan enzim proteolitik bekerja tidak optimal pada fermentasi selama 3 hari. Besarnya aktivitas penghambatan ACE dari susu sapi yang difermentasi dengan BAL selama 24 jam adalah 87,6% dan 87,8% masing-masing tanpa pengaturan pH dan dengan pengaturan pH⁽⁴⁸⁾. Beberapa dekade terakhir terjadi peningkatan perhatian dan minat terhadap makanan olahan susu untuk mencegah penyakit hipertensi. Efek biologis ini terutama disebabkan oleh peptida bioaktif hasil pemecahan protein susu oleh bakteri asam laktat dan harus dibuktikan secara *in-vitro* dan *in-vivo*⁽⁴⁹⁾.

Derivatif penghambatan aktivitas ACE atau ACE inhibitor dapat dikembangkan sebagai nutrasetikal, obat-obatan dan pangan fungsional⁽⁵⁰⁾. Protein dan peptida makanan merupakan bahan pangan yang berpotensi sebagai ACE inhibitor, dapat dikemas menjadi pangan fungsional. Susu kerbau atau susu kerbau fermentasi merupakan salah satu produk

pangan yang dapat diaplikasikan sebagai pangan fungsional antihipertensi. Protein susu fermentasi terbukti sebagai antihipertensi yang strategis untuk penderita hipertensi⁽⁵¹⁾. Peptida atau protein dengan kemampuan penghambatan enzim ACE yang tinggi diharapkan mampu menjaga tekanan darah penderita hipertensi. Peptida bioaktif terbukti dapat menghambat enzim ACE secara *in vitro* dan dapat menurunkan tekanan darah pada tikus SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*)⁽⁴⁷⁾. Efek biologis ini disebabkan oleh peptida bioaktif yang dihasilkan dari protein susu selama fermentasi oleh BAL atau enzim saluran pencernaan⁽⁵²⁾. Peptida secara fungsional aktif diproduksi dari beberapa protein makanan selama pencernaan pada gastrointestinal⁽⁵³⁾

Konsumsi susu fermentasi terbukti dapat memenuhi kebutuhan gizi⁽⁵⁴⁾ terutama protein⁽⁵⁵⁾. Susu fermentasi mempunyai sifat fungsional probiotik dan prebiotik, peptida yang dihasilkan bersifat sebagai ACE inhibitor^(56,57). Saat ini banyak penelitian yang dikembangkan pada peptida bioaktif yang dapat mengurangi tekanan darah pada penderita hipertensi⁽⁵⁶⁾. Degradasi protein susu dengan proteinase dari *L. helveticus* menghasilkan peptida dengan aktivitas ACE inhibitor penting sebagai antihipertensi pada tikus hipertensi spontan (SHR). Efek yang sama juga diamati pada susu fermentasi yang mengandung *L. helveticus*⁽⁵⁸⁾.

Komposisi Asam Amino. Analisa asam amino dilakukan untuk mengetahui jenis dan kadar asam amino yang terdapat pada fraksi <3kDa dari protein

Tabel 5. Nilai kadar protein terlarut dan aktivitas ACE inhibitor protein dadih (n=2).

No	Waktu fermentasi (hari)	Kadar protein (mg/L)	Aktivitas penghambatan (%)
1	0	560,39 ± 2,16	22,22 ± 0,35
2	1	781,69 ± 1,48	87,52 ± 0,16
3	2	744,97 ± 1,84	72,75 ± 1,78
4	3	780,19 ± 1,22	69,35 ± 0,69
5	4	643,54 ± 1,00	71,53 ± 0,35

dadih fermentasi 1 hari. Hasil analisa komposisi asam amino fraksi dadih yang memiliki aktivitas ACE inhibitor tertinggi disajikan pada Tabel 6.

Berdasarkan hasil analisis dengan UPLC, didapatkan komposisi asam amino dadih fraksi <3 kDa yaitu threonin kecil dari 0,239%, prolin 0,387%, alanin 0,445%, fenilalanin kecil dari 0,117%, dan asam glutamat 1,581%, sebagai pembandingan didapatkan kandungan asam amino tertinggi pada dadih dan

dangke adalah asam glutamat yaitu sebesar 2,69% dari protein dadih dan yang terendah adalah glisin sebesar 0,29% dari keseluruhan protein dadih⁽⁵⁹⁾. Inhibitor ACE terbentuk pada susu selama fermentasi adalah peptida yang bertindak sebagai inhibitor kompetitif seperti Ile-Pro-Pro dan Val-Pro-Pro⁽⁶⁰⁾, Ile-Tyr⁽⁴¹⁾, Lys-Val- dan Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, Leu-Pro-Val-Pro⁽⁶¹⁾.

Beberapa penelitian *in vivo* telah membuktikan bahwa susu yang difermentasi dengan strain lactococcal dapat menurunkan tekanan darah sistolik pada tikus spontan hipertensi (SHR) setelah pemberian secara oral dengan cara sonde⁽⁴⁷⁾. Pengaruh yang hampir sama juga ditemukan pada konsumsi susu setiap hari pada pasien hipertensi selama 21 minggu⁽⁶²⁾. Susu yang difermentasi dengan 5 strain BAL dan diikuti dengan hidrolisis dengan enzim protease dari mikroba

Tabel 6. Hasil analisis kadar asam amino susu kerbau fermentasi 1 hari fraksi <3kDa.

Asam Amino	Kadar asam amino (%w/w)	Kadar asam amino (%w/w) ⁽⁴⁰⁾
Histidin	-	0,3
Threonin	< 0,024	0,56
Prolin	0,039	(tidak dianalisa)
Tirosin	-	0,64
Leusin	-	(tidak dianalisa)
Asam aspartat	-	0,96
Lisin HCl	-	0,95
Glisin	-	0,29
Arginin	-	0,33
Alanin	0,045	0,4
Valin	-	0,74
Isoleusin	-	1,12
Fenilalanin	< 0,012	0,64
Asam glutamat	0,158	2,69
Serin	-	0,67
Metionin	-	0,3
Sistin	-	(tidak dianalisa)
Triptofan	-	(tidak dianalisa)

Ket: pembandingan hasil penelitian⁽⁶⁰⁾.

menunjukkan peningkatan aktivitas penghambatan ACE dibandingkan dengan susu fermentasi hanya dengan BAL saja secara *in vitro*. Susu fermentasi yang bersifat antihipertensi ini dikemas dalam bentuk makanan konvensional, suplemen dan makanan fungsional⁽⁶³⁾.

SIMPULAN

Dadiah atau susu kerbau fermentasi secara spontan berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional yaitu minuman fungsional asli Indonesia yaitu minuman antihipertensi. Besarnya penghambatan ACE atau ACE inhibitor didapatkan sebesar 87,52%, kadar protein 781,69 mg/L untuk dadiah yang difermentasi selama 1 hari. Panelis lebih menyukai

susu kerbau fermentasi dibandingkan susu kerbau tanpa fermentasi. Dadih mengandung asam amino esensial dan nonessensial yaitu threonin, prolin, alanin fenilalanin dan asam glutamat sehingga dadih berpotensi dikembangkan menjadi pangan fungsional.

TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Rektor Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui dana bantuan Penelitian Berbasis Publikasi Nasional tahun 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- World Health Organization. A Global brief on hypertension: silent killer, global public health crisis. 2013. Diambil dari http://www.who.int/cardiovascular_diseases/publication/global_brief_hypertension/en/ diakses pada 2 Maret 2018. Pukul 18.48
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. Infodatin hipertensi. Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI, Jakarta. 2014. hal 4-8
- Lasianjayani T and Martini S. The relationship between obesity and smoking to hypertension incidence. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. 2014. 2(3):286-96.
- Guerra GM, Lopes HF, Freitas EO, Marciano F, Consolim-Colombo PSL, et al. Approach by health professionals to the side effects of antihypertensive therapy: strategies for Improvement of adherence. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2018. 6:340-9.
- Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova A, Vallejo-Córdova B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. *Journal of dairy science*, 2016. 99(6):4099-110.
- Zeng YW, Du J, Pu XY, Yang S M, Yang T, and Jia P. Strategies of functional food for hypertension prevention in China. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011. 5(24):5671-6.
- Hieda K, Sunagawa Y, Katanasaka Y, Hasegawa K and Morimoto T. Antihypertensive effects of foods. *World J Hypertension*. 2015. 5(2):53-62.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan. Peraturan kepala badan pengawas obat dan makanan Republik Indonesia tentang ketentuan pokok pengawasan pangan fungsional. 2005. hal 9-14.
- Chalid SY dan Hartiningsih F. Potensi dadih susu kerbau fermentasi sebagai antioksidan dan antibakteri. *Prosiding SEMIRATA BKS-MIPA*. Lampung 19-12 Mei, 2013:123-6
- Ngatirah A, Harmayanti ES dan Utami T. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. In *Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan*. PATPI (II): 2000. 63-70.
- Surono IS and Nurani D. Exploration of indigenous dadih lactic bacteria for probiotic and starter cultures. Domestic research collaborative grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Republic of Indonesia: Research Report. Directorate General of Higher Education, Ministry of Education and Culture. 2002.
- Pato U. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. *Jurnal Natur Indonesia*. 2003.5(2):162-6.
- Surono IS. Probiotik Susu Fermentasi dan Kesehatan. 2004. YAPMMI, Jakarta.
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: a prospectus. *J Dairy Sci*. 2000.83:1187-95.
- Phelan M, Aheme A, FitzGerald R and O'Brien N. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *International dairy journal*. 2009.19(11):643-54.
- Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics from Metchnik off to bioactives. *International Dairy Journal*. 2008. 18 (7):714-28.
- Meisel H. Multifunctional peptides encrypted in milk proteins. *BioFactors*. 2004. 21.55-61.
- Hameed MA, Tebbit L, Jacques N, Thomas M, and Dasgupta I. Non-adherence to antihypertensive medication is very common among resistant hypertensives: results of a directly observed therapy clinic. *Journal of human hypertension*. 2016. 30 (2):83-6.
- Putri K. Efektivitas dan efek samping penggunaan obat antihipertensi pada pasien hipertensi di puskesmas Kalirungkut Surabaya. *Calyptra: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas Surabaya*. 2015. 4(2).
- Amamoto N, Ejiri M, Mizuno S. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*. 2003. 9(16):1345
- Hayes M, Stanton C, Slattery H, O'sullivan O, Hill C, Fitzerld GF and Ross RP. Casein fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 contains a range of novel propeptide angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007. 73(14):4658-67.
- Donkor O N, Henriksson A, Vasiljevic T, Shah NP. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. *Lait*, 2007. 87. 21-38.
- Association Official Analytical Chemist'(AOAC) Authors. Official methods of analysis proximate analysis and calculations crude protein meat and meat products including pet foods. Association of Analytical Communities, Gaithersburg MD, 17th ed. 2006. Reference data: Method 992.15(39.1.16).
- Liu C, Wang H, Cui Z, He X, Wang X, Zeng and Ma H. Optimization of Extraction and Isolation for 11S and 7S Globulins of Soybean Seed Storage Protein. *Food Chemistry* 2007.102:1310-6.
- Ye, Ran, and Federico Harte. Casein maps: effect of ethanol, pH, temperature, and CaCl₂ on the particle size of reconstituted casein micelles. *Journal of dairy*

- science 2013. 96(2):799–805.
26. Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 1994. 59: 76-9.
 27. Bradford, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. Analytical of Biochemistry. 1976. 72: 248-54.
 28. Arakawa T, Ejima D and Akuta T. Protein aggregation under high concentration/density state during chromatographic and ultrafiltration processes. International journal of biological macromolecules. 2017. 95. 1153-1158.
 29. Cheung HS, Cushman D. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology. 1973. 293(2), 451-463.
 30. Arihara K, Nakashima Y, Mukai T, Ishikawa S, Itoh M. Peptide Inhibitors for Angiotensin I-converting Enzyme from Enzymatic Hydrolysates of Porcine Skeletal Muscle Proteins. Meat Science. 2001.57(3): 319-324.
 31. Lame ME, Chambers EE, Blatnik M. Quantitation of amyloid beta peptides A β 1–38, A β 1–40, and A β 1–42 in human cerebrospinal fluid by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical biochemistry. 2011.419 (2):133-139.
 32. Dinata DI, Bioteknologi Pemanfaatan Mikroorganisme & Teknologi Bioproses. EGC. Penerbit Buku Kedokteran.2012. p. 221-31
 33. Daswati, E.. Kualitas Dadih Susu Kerbau Dengan Lama Pemeraman Yang Berbeda. Jurnal Peternakan. 2009. 6(1).
 34. Sisriyenni D, Zurriyati Y. Kajian kualitas dadih susu kerbau di dalam tabung bambu dan tabung plastik. Jurnal Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian. 2014. 7(2).
 35. Surono IS, Indonesian Dadih Indigenous probiotics from Dadih. In: Puniya A, editor. Fermented Milk and Dairy Products. Boca Raton: CRC Press; pp. 377-395.
 36. Ngatirah A, Harmayanti ES dan Utami T. Seleksi bakteri asam laktat sebagai agensia probiotik yang berpotensi menurunkan kolesterol. In Prosiding Seminar Nasional Industri Pangan. PATPI (II): 2000. 63-70.
 37. Surono IS and Nurani D. Exploration of Indigenous Dadih Lactic Bacteria for Probiotic and Starter Cultures. Domestic research collaborative grant-URGE-IBRD World Bank Project 2000-2001. Republic of Indonesia: Research Report. Directorate General of Higher Education, Ministry of Education and Culture. 2002.
 38. Pato U. Potensi bakteri asam laktat yang diisolasi dari dadih untuk menurunkan resiko penyakit kanker. Jurnal Natur Indonesia. 2003. 5(2): 162 – 166.
 39. Surono, IS. (2004). Probiotik susu fermentasi dan kesehatan. YAPMMI, Jakarta. hal 145-55.
 40. Sunarlim, Roswita. Potensi *Lactobacillus* sp. asal dari dadih sebagai starter pada pembuatan susu fermentasi khas Indonesia. Buletin Teknologi Pasca Panen. 2016: 5.169-76.
 41. Lestari LA, Hannayani E, Marsono Y. Efek hipokolesterolemik yogurt yang disuplementasi probiotik indigenous pada tikus sprague dawley Rats. Agrosains. 2004. 17.
 42. Papadimitriou CG, Mastrojiannaki AV, Silva AV, Gomes AM, Malcata FX, Alichanidis E. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. Food Chem. 2007. 105:647-656.
 43. Miskiyah S, Usmiati, Mulyorini. Pengaruh enzim proteolitik dengan bakteri asam laktat probiotik terhadap karakteristik dadih susu sapi. JITV. 2011. 16(4): 304-311.
 44. Considine T, Healy A, Kelly AL, McSweeney PLH. Proteolytic specificity of elastase on bovine α 1-casein. Food Chem. 2000. 69:19-26.
 45. Putranto, Wendry S. Purifikasi dan karakterisasi protease yang dihasilkan *Lactobacillus acidophilus* dalam fermentasi susu sapi perah. Seminar Nasional Bioteknologi Capturing Opportunities through Biotechnology Pusat Penelitian Bioteknologi-LIPI. 2006 (Abstrak).
 46. Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konnigs WN. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 1996. (70):187-221.
 47. Abubakar A. Isolation of anti hypertensive peptides from milk protein. J.Indon. Trop. Anim. Agric. 2004. 29(3):121-8.
 48. Yurliansyah Y, Zakaria Y dan Usman Y. Nilai nutrisi dadih yang ditambahkan khamir asal dadih. Jurnal Agripet. 2014. 14(2):139-45.
 49. Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova A F, and Vallejo-Córdoba B. Invited review: fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of dairy science. 2016. 99(6):4099-110.
 50. Wijesekera I and Kim SK. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources prospects in the pharmaceutical industry. Review Mar. Drugs. 2010. 1080-93
 51. Campbell D.J. The renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems. The International Journal of Biochemistry Cell Biology. 2003. 35. 784-91.
 52. Beltrán-Barrientos LM, Hernández-Mendoza A, Torres-Llanez MJ, González-Córdova AF and Vallejo-Córdoba B. Invited review: Fermented milk as antihypertensive functional food. Journal of dairy science. 2016. 99(6):4099-110.
 53. Tamang JP, Shin DH, Jung SJ, Chae SW. Functional properties of microorganisms in fermented foods. Front Microbiol. Frontiers. 2016. 7. 578.
 54. Srianta I dan Trisnawati CY. Pengantar Teknologi pengolahan minuman. Pustaka Pelajar: 2015. 160-72.
 55. Chairunnisa H, Putranto W S dan Lepa S J. Characterization of fermented products made from caprine milk in combination with soy extract, corn

- extract or coconut extra. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 2010. 21(1):91.
56. Fitzgerald RJ, Murray BA. Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*. 2006. 59(2):118-25.
 57. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ and Tassou CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*. 2013. 33(2):282-91.
 58. Tuomilehto J, Lindström J, Hyyrynen J, Korpela R, Karhunen ML, Mikkola L, Nissinen, A. Effect of ingesting sour milk fermented using *Lactobacillus helveticus* bacteria producing tripeptides on blood pressure in subjects with mild hypertension. *Journal of human hypertension*. 2004. 18(11):795-801.
 59. Soenarno MS, Polli, BN, Febriantosa A, Hanifah, R. Identifikasi peptida bioaktif dari olahan susu fermentasi tradisional Indonesia sebagai bahan pangan fungsional untuk kesehatan. *Jurnal Ilmu Produksi dan Teknologi Hasil Peternakan*, 2017. 1(3):191-5.
 60. Nakamura Y, Yamamoto N, Sakai K, Okubo A, Yamazaki S, Takano T. Purification and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitors from sour milk. *Journal of Dairy Science*. 1995. 78.777-783.
 61. Maeno M, Yamamoto N, Takano, T. Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790. *Journal of Dairy Science*. 1996. 79(8):1316-21.
 62. Seppo L, Jauhiainen T, Poussa T, Korpela R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American journal of clinical nutrition*. 2003. 77(2):326-30.
 63. Chen GW, Tsai JS, Pan BS. Purification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides and antihypertensive effect of milk produced by protease-facilitated lactic fermentation. *International Dairy Journal*. 2007. 17(6):641-7.

Uji Aktivitas Antiinflamasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein

(Anti-Inflammation Activity Test of Nanoparticles Ethanol Extract of Temulawak Rhizome (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) with Protein Denaturation Inhibition Method)

YUNAHARA FARIDA^{1*}, DENI RAHMAT¹, AGI WIDIA AMANDA¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640, Indonesia

Diterima 7 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) dikenal memiliki banyak manfaat untuk kesehatan sebagai antibakteri, antiinflamasi, antidiabetes dan antikanker. Tujuan dari penelitian ini untuk membandingkan aktivitas antiinflamasi dari ekstrak rimpang temulawak dengan nanopartikelnya. Ekstrak rimpang temulawak dibuat dengan maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% (v/v). Ekstrak dibuat menjadi nanopartikel dengan metode gelasi ionik dimana menggunakan kitosan dan tripolifosfat. Uji antiinflamasi *in vitro* dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein. Hasil uji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein pada ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antiinflamasi. Hasil menunjukkan nilai rata-rata penghambatan denaturasi protein (IC₅₀) dari ekstrak 521,67±5,80 bpj sedangkan nilai IC₅₀ dari nanopartikel ekstrak rimpang temulawak yang diuji yaitu 398,02±1,78 bpj. Sehingga hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak rimpang temulawak lebih baik daripada ekstrak rimpang temulawak.

Kata kunci: Temulawak, ekstrak, nanopartikel, antiinflamasi, denaturasi protein.

Abstract: Javanese turmeric rhizome (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) has been known to have many health benefits as antibacterial, anti-inflammatory, antidiabetic and anticancer. The purpose of this study was to compare the anti-inflammatory activity of temulawak rhizome extract with its nanoparticles. Temulawak rhizome extract was obtained by maceration using 96% (v/v) ethanol as a solvent. The extracts were made into nanoparticles by ionic gelation method which used chitosan and tripolyphosphate. The results of anti-inflammatory activity test using a method of inhibiting protein denaturation showed the percentage of inhibition of protein denaturation (IC₅₀) of the extract of temulawak rhizome of 521.67±5.80 ppm while the IC₅₀ of the nanoparticles was 398.02±1.78 ppm. Accordingly, the anti-inflammatory activity of the nanoparticles was better than the extract of temulawak rhizome.

Keywords: *Temulawak*, extract, nanoparticles, anti-inflammatory, protein denaturation.

* Penulis korespondensi, HP 081317639394
e-mail: yunahara.faridah@nivpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

TEMULAWAK diketahui memiliki banyak khasiat, salah satu khasiat temulawak adalah antiinflamasi. Rimpang temulawak mengandung kurkuminoid, yaitu suatu zat yang terdiri dari campuran komponen senyawa yang bernama kurkumin, desmetoksikurkumin, bidesmetoksikurkumin, dihidrokurkumin, dan heksahidrokurkumin. Kandungan kurkuminoid pada temulawak mempunyai khasiat yaitu dapat digunakan sebagai antioksidan dan hepatoprotektif, antikanker, gastroprotektif, antihiperlipidemik dan antiinflamasi. Kurkumin yang merupakan komponen utama dalam kurkuminoid dapat berfungsi dalam aktivitas biologi sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat aktivasi NF- κ B yang berperan penting dari ekspresi COX-2^(1,2).

Rimpang temulawak dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (v/v). Ekstrak kental rimpang temulawak dapat dibuat menjadi nanopartikel dengan basis kitosan-Na tripolifosfat. Metode yang digunakan dalam pembuatan nanopartikel ekstrak temulawak adalah metode "buttop up" dengan teknik gelas ionik. Teknik gelas ionik yang melibatkan ikatan sambung silang antara kitosan dan sodium tripolifosfat dapat meningkatkan kestabilan dari nanopartikel yang terbentuk⁽³⁾.

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara in vitro dari senyawa aktif dapat dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein menggunakan Bovin Serum Albumin. Hal ini karena, denaturasi protein pada jaringan adalah salah satu penyebab inflamasi. Panas dapat digunakan untuk mempengaruhi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar karena panas meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul yang menyusun protein bergerak sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan hidrogen. Selain itu, pemanasan akan membuat protein berubah kemampuan mengikat airnya. Energi panas akan mengakibatkan terputusnya interaksi non-kovalen yang ada pada struktur alami protein tetapi tidak memutuskan ikatan kovalennya yang berupa ikatan peptida. Proses ini terjadi pada rentang suhu yang sempit. Penghambatan denaturasi protein diketahui dengan pengukuran serapan secara spektrofotometri UV-Vis. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat dijadikan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat⁽⁴⁾.

Pada penelitian ini akan dibandingkan aktivitas antiinflamasi ekstrak rimpang temulawak dengan bentuk nanopartikelnya sehingga dapat diketahui bentuk yang efektif dari ekstrak untuk pengembangan

sediaan farmasinya. Nanopartikel berbasis kitosan diharapkan dapat mempunyai luas permukaan yang besar terhadap interaksi dengan lingkungan yang berguna bagi aktivitas penghambatan denaturasi protein oleh panas.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*), etanol, kitosan, asam asetat glasial, propilen glikol, dimetil sulfoksida, natrium tripolifosfat, *bovine serum albumin* (BSA), tris base, NaCl, asam asetat glasial, natrium diklofenak, *aquadest*.

METODE. Determinasi Tanaman. Determinasi Tanaman dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Botani, Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Bogor.

Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak. Bahan yang digunakan adalah rimpang diperoleh dari Balitro, Bogor dan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96% secara maserasi berulang. Ditimbang sejumlah 500 g serbuk simplisia kemudian dimaserasi dengan 5 liter etanol 96% (v/v) selama 6 jam lalu didiamkan selama 24 jam. Hasil maserasi disaring dan dilakukan maserasi kembali sebanyak 10 kali dengan etanol 96% (v/v). Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor vakum. Penapisan fitokimia dilakukan pada ekstrak untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, steroid dan triterpenoid, minyak atsiri, kumarin^(5,6).

Pembuatan Nanosuspensi dari Ekstrak Etanol 96% Rimpang Temulawak. Kitosan sebanyak 1 g dilarutkan dalam 100 mL asam asetat glasial 1% menggunakan magnetik stirrer sehingga diperoleh konsentrasi kitosan 1% (b/v). Sebanyak 500 mg ekstrak etanol temulawak ditambahkan pelarut campur (20 mL propilenglikol : 20 mL etanol 70% : 20 mL DMSO 10%) dan 100 mL air. Kemudian ditambahkan larutan kitosan 1% (b/v) sebanyak 40 ml sehingga konsentrasi kitosan menjadi 0,2%. Campuran tersebut diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama 10 menit. Selanjutnya ditetesi dengan 20 mL odium-TPP 0,4% ditetaskan dengan kecepatan 1 tetes / 3 detik dengan buret dan dalam *magnetic stirrer* 300 rpm hingga terbentuk nanopartikel yang ditandai dengan kekeruhan yang homogen. Pengadukan dilanjutkan selama 15 menit agar didapat suspensi nanopartikel ekstrak temulawak yang stabil. Pada suspensi nanopartikel ekstrak etanol temulawak dilakukan kestabilan selama 5 hari meliputi warna, kekeruhan dan endapan⁽³⁾.

Pembuatan Serbuk Nanopartikel Ekstrak Temulawak dengan Pengering Semprot (*Spray Drying*). Suspensi nanopartikel ekstrak temulawak dikeringkan dengan menggunakan pengering semprot (*spray dryer*) pada suhu inlet 160 °C.

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi *In Vitro*. Pembuatan pereaksi:

Pembuatan *Tris Buffer Saline* (TBS). Sebanyak 4,35 g NaCl dilarutkan dalam 200 ml aquadest, ditambahkan 605 mg Tris Base dicukupkan dengan air sampai 400 ml. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan asam asetat glasial hingga pH 6,3, kemudian dicukupkan dengan air sampai 500 mL.

Pembuatan 0,2% BSA dalam TBS. Sebanyak 0,2 g *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan dengan larutan TBS hingga volume 100 mL⁽⁷⁾.

Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak sebagai Kontrol Positif. Sebanyak 25,0 mg natrium diklofenak dilarutkan dalam labu tentukur 25 mL dengan *aquadest* dicukupkan hingga volume 25 mL, sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 bpj. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,3 bpj.

Pembuatan Kontrol Negatif. Sebanyak 500 µl aquadest ditambahkan dengan larutan BSA 0,2% dalam TBS ke dalam labu tentukur hingga volume 5 mL.

Pembuatan Larutan Ekstrak Temulawak. Sebanyak 200,0 mg ekstrak dilarutkan dalam labu tentukur 25 ml dengan aquadest dicukupkan hingga volume 25 ml, sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 8000 bpj. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 4000, 2000, 1000, 500 dan 250 bpj.

Pembuatan Larutan Kontrol Blanko. Larutan kontrol blanko yaitu *aquadest*.

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi. Pembuatan Larutan Uji. Larutan uji dipipet 500 µL larutan ekstrak temulawak yang kemudian ditambah larutan BSA 0,2% hingga volume 5 mL sehingga didapatkan varian konsentrasi menjadi 800, 400, 200, 100, 50 dan 25 bpj.

Pembuatan Larutan Kontrol Positif. Larutan kontrol positif 500 µL larutan natrium diklofenak yang kemudian ditambahkan dengan larutan BSA 0,2% hingga volume 5 ml sehingga didapatkan variasi konsentrasi menjadi 100, 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,13 bpj.

Setiap larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ±25 °C lalu dipanaskan selama 5 menit pada suhu ±72 °C dengan water bath, kemudian didinginkan selama 25 menit pada suhu ruang dan diukur absorbannya dengan spektrofotometer UV-

visible pada panjang gelombang 660 nm.

Perhitungan Persentase Penghambatan Denaturasi Protein.

Persentase penghambatan denaturasi protein diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji})}{(\text{absorbansi kontrol negatif})} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung dengan membuat persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y). Pada uji inhibisi ini, jika dihasilkan % inhibisi > 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi^(7,8).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Fitokimia Serbuk dan Ekstrak.

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap serbuk simplisia dan ekstrak etanol 96% rimpang temulawak. Tujuan dilakukannya penapisan fitokimia ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam tanaman tersebut yang berpotensi memiliki aktivitas biologi. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia yang dilakukan terhadap serbuk simplisia maupun ekstrak etanol 96% rimpang temulawak, keduanya memiliki kandungan metabolit yang sama, yaitu flavonoid, saponin, triterpenoid dan minyak atsiri. Hasil penapisan fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak rimpang temulawak dapat dilihat pada Tabel 1 dimana kurkumin termasuk ke dalam senyawa polifenol. Kurkumin berperan dalam aktivitas sebagai antiinflamasi.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia rimpang temu lawak.

No.	Golongan	Serbuk Simplisia	Ekstrak Etanol 96%
1.	Alkaloid	-	-
2.	Flavonoid	+	+
3.	Saponin	+	+
4.	Tanin	-	-
5.	Kuinon	-	-
6.	Steroid/triterpenoid	-/+	-/+
7.	Minyak atsiri	+	+
8.	Kumarin	-	-

Uji Stabilitas Nanopartikel Ekstrak Temulawak.

Hasil uji stabilitas nanosuspensi ekstrak temulawak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Stabilitas nanosuspensi ekstrak.

Parameter	Hari ke-				
	1	2	3	4	5
Warna	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
Kekeruhan	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
Endapan	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada	Tidak ada

Nanopartikel ekstrak rimpang temulawak memiliki ukuran partikel dengan nilai sebesar 157,8 nm, artinya nanopartikel berhasil terbentuk dengan ukuran yang kecil dan telah memenuhi syarat, dimana suatu partikel dikatakan berukuran nano bila berada pada rentang 1-1000 nm sehingga diharapkan mampu memberikan aktivitas yang baik. Sedangkan distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Nilai polidispersitas yang baik adalah yang mendekati nilai 0 dimana semakin mendekati nilai 0 maka semakin homogen. Nanopartikel ekstrak temulawak pada percobaan ini memiliki nilai indeks polidispersitas 0,488. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikel ekstrak temulawak terdispersi relatif homogen⁽³⁾.

Dari hasil pemeriksaan potensial zeta didapatkan hasil Potensial zeta +51,4 mV. Potensial zeta merupakan parameter muatan listrik suatu partikel yang dapat melakukan interaksi elektrostatis sehingga dapat mempengaruhi kestabilan sistem nanopartikel. Dengan demikian, adanya gaya tarik menarik antar partikel memungkinkan terjadinya agregasi dan pengendapan sehingga suspensi nanopartikel yang terbentuk menjadi tidak stabil. Pada penelitian kali ini didapatkan nilai potensial zeta sebesar +51,4 mV maka nanopartikel ekstrak temulawak memiliki kestabilan yang baik. Dengan demikian, kemungkinan terjadinya agregasi antar partikel berkurang. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai potensial zeta diantaranya karakteristik muatan polimer, pH, dan karakteristik muatan ekstrak yang digunakan.

Pengeringan Nanosuspensi dengan Spray Drying. Setelah dikeringkan dengan suhu outlet 80 °C, didapatkan serbuk dengan karakteristik fisik kering dan tidak lengket dan berwarna kuning muda dengan kadar air sebesar 9,4697%. Hal ini berarti menunjukkan bahwa serbuk nanosuspensi ekstrak rimpang temulawak yang dihasilkan sudah memenuhi syarat yaitu <10%.

Uji Aktivitas Antiinflamasi. Hasil uji kontrol positif (natrium diklofenak), ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak dapat dilihat pada Tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antiinflamasi kontrol positif (natrium diklofenak).

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8315	0,8335	0,8250			
3,13	0,7824	0,7714	0,7636	5,90	7,45	7,44
6,25	0,7128	0,7116	0,7262	14,28	14,63	11,98
12,5	0,6040	0,6023	0,6203	27,36	27,74	24,81
25	0,5060	0,5092	0,5163	39,15	38,91	37,42
50	0,4389	0,4391	0,4218	47,22	47,32	48,87
100	0,0668	0,0587	0,0527	91,97	92,96	93,61

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antiinflamasi ekstrak rimpang temulawak.

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8238	0,8353	0,8257			
25	0,7632	0,7523	0,7663	7,36	9,94	7,19
50	0,6982	0,6934	0,6944	15,25	16,99	15,90
100	0,6143	0,6107	0,6141	25,43	26,89	25,63
200	0,5027	0,5046	0,5036	38,98	39,59	39,01
400	0,3947	0,3967	0,3973	52,09	52,51	51,88
800	0,3262	0,3271	0,3271	60,40	60,84	60,39

Tabel 5. Hasil uji nanopartikel ekstrak rimpang temulawak.

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8215	0,8238	0,8294			
25	0,7016	0,7078	0,7094	14,60	14,08	14,47
50	0,6482	0,6485	0,6568	21,10	21,28	20,81
100	0,5524	0,5541	0,5563	32,76	32,74	32,93
200	0,4322	0,4360	0,4357	47,39	47,07	47,47
400	0,3186	0,3189	0,3159	61,22	61,29	61,91
800	0,2553	0,2574	0,2586	68,92	68,75	68,82

Uji aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan denaturasi protein dilakukan terhadap kontrol negatif, kontrol positif, ekstrak dan nanopartikel ekstrak. Pengujian ini dilakukan secara triplo. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode penghambatan denaturasi protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimana akan mengalami denaturasi (perubahan struktur primer dan sekunder) pada saat dipanaskan. Hal ini yang jadi penanda dimana albumin mengalami kerusakan pada saat diinduksi panas sehingga oleh tubuh dianggap sebagai bahan asing

(antigen) oleh karena itu tubuh melakukan perlawanan yaitu melalui mekanisme inflamasi. Kemudian masing-masing larutan tersebut diukur serapannya pada λ 660 nm. Data serapan yang diperoleh selanjutnya dihitung persentase inhibisinya. Larutan dapat memiliki aktivitas antiinflamasi jika persen inhibisinya lebih dari 20%^(9,10).

Dari data persen inhibisi larutan kontrol positif (natrium diklofenak), ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak yang dilakukan triplo dapat diketahui bahwa larutan kontrol positif pada konsentrasi 12,5 bpj sudah dapat menghambat denaturasi protein. Penghambatan denaturasi protein pada ekstrak mulai ditunjukkan pada konsentrasi 100 bpj, sedangkan penghambatan denaturasi protein pada nanopartikel ekstrak ditunjukkan pada konsentrasi 50 bpj. Berdasarkan data tersebut, maka potensi penghambatan denaturasi protein yang dimiliki oleh ekstrak lebih kecil dibandingkan dengan nanopartikel ekstrak dan nanopartikel ekstrak memiliki potensi penghambatan denaturasi protein lebih kecil daripada larutan kontrol positifnya. Denaturasi protein adalah proses dimana protein kehilangan struktur tersier dan struktur sekunder dengan penerapan tekanan eksternal atau senyawa, seperti asam kuat atau lemah, garam anorganik terkonsentrasi, pelarut organik atau panas. Kebanyakan protein biologis kehilangan fungsi biologisnya ketika terjadi denaturasi⁽⁴⁾.

Kitosan dipilih sebagai bahan nanopartikel karena tidak toksik, bersifat mukoadhesif dan peningkat penetrasi, dan mudah didapat sedangkan BSA dipilih karena merupakan indikator denaturasi protein yang lebih peka dibandingkan dengan indikator albumin yang lainnya. Pada penelitian ini digunakan natrium diklofenak sebagai kontrol positif karena merupakan salah satu obat yang umum digunakan sebagai antiinflamasi. Uji aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan denaturasi protein pernah dilakukan penelitiannya terhadap beberapa ekstrak tanaman dan jus buah. Proses denaturasi protein pada penelitian ini dipengaruhi oleh panas. Pada saat suhu naik maka dapat meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul penyusun protein bergerak atau bergetar sangat cepat sehingga merusak molekul tersebut. Proses denaturasi protein berlangsung secara tetap dan tidak berubah, suatu protein yang mengalami proses denaturasi akan berkurang kelarutannya sehingga mudah mengendap. Protein dalam tubuh rentan untuk mengalami denaturasi yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas yang menyebabkan mekanisme peradangan dengan merangsang pelepasan mediator inflamasi. Adapun mekanisme kerja natrium diklofenak adalah dengan penghambatan sintesa prostaglandin dimana efek sistemik dari inflamasi

adalah demam^(11,12,13).

Nilai IC_{50} menunjukkan efektivitas ekstrak dalam menghambat denaturasi protein. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi saat persentase penghambatan denaturasi protein mencapai nilai 50%⁽¹⁴⁾. Hasil perhitungan IC_{50} pada larutan kontrol positif (natrium diklofenak) rata-rata IC_{50} sebesar $47,74 \pm 0,33$ bpj. Pada ekstrak hasil rata-rata IC_{50} sebesar $521,67 \pm 5,80$ bpj dan pada nanopartikel rata-rata IC_{50} sebesar $398,02$ bpj $\pm 1,78$ bpj.

SIMPULAN

Hasil uji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein pada nanopartikel ekstrak rimpang Temulawak menunjukkan bahwa IC_{50} yaitu $398,02 \pm 1,78$ bpj. Sehingga hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak rimpang temulawak lebih baik daripada aktivitas ekstrak etanol 96% rimpang temulawak.

DAFTAR PUSTAKA

- Choi, S., H.S. Cha and Y.S. Lee. Physicochemical a1. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer*. 2004. 111:679–92.
- Devaraj S, Ismail S, Ramanathan S, Yam MF. Investigation of antioxidant and hepatoprotective activity of standardized *Curcuma xanthorrhiza* rhizoma in carbon tetrachloride-induced hepatic damaged rats. *The Scientific World Journal*. 2014. 1-8.
- Wirawan D. Pengaruh nanopartikel ekstrak temulawak (*curcuma xanthorrhiza roxb.*) berbasis kitosan natrium polifosfat dalam sediaan gel terhadap aktivitas antiacne. Skripsi Universitas Pancasila. 2015
- Verma MA, Kumar PA, Kavitha D, Anurag KB. Anti denaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011. 2(2):1-6
- Tiwari P, Kumar B, Kaur B, Kaur G, Kau H. Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011. 1(1): 98-106.
- Ayoola GA, Coker HAB, Adesegun SA, Bello AAA, Obaweya K1, Ezennia EC, Atangbayila TO. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008. 7 (3): 1019-24.
- Williams LA, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, et al. The in vitro anti-denaturation

- effects included by natural products and non steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is purposed as a screening assay for the detection of anti inflammatory compounds, without the uses of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J.* 2008. 57 (4): 327-30
8. Mizushima Y and Kobayashi M. Interaction of antiinflammatory drugs with serum preteins, especially with some biologically active proteins. *J of Pharma Pharmacol.* 1968. (20):169-73.
 9. Leelaprakash G, Mohan Dass S. In vitro antiinflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*, *International Journal of Drug Development & Research.* 2010. (3):189-96.
 10. Ingle PV, Patel DM. C-reactive protein in various disease condition an overview, *Asian J Pharm Clin Res.* 2011. 4(1):9-13.
 11. Mann G. *Chemistry of the proteids.* London and New York. 1906. 336-44.
 12. Robertson T B. *The physical chemistry of the proteins.* New York and London. 1918.
 13. Chick, H, Martin, CJ. On the heat coagulation of protein. *J Physiol.* 1910. (4):404-30.
 14. Hayun H, Arrahman A, Purwati EM, Yanuar A, Fortunata F, Suhargo F, *et al.* Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of mannich bases of dehydrozingerone derivatives. *J Young Pharm.* 2018. 10(2):6-10.

Efek Gel Putih Telur terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*)

(Effect of Egg White Gel againsts Burn Healing on White Rat (*Rattus novergicus*))

LUCIA HENDRIATI^{1*}, IWAN SAHRIAL HAMID², TEGUH WIDODO¹, CHINTYA
WANDASARI¹, PUTU MIRAH RISTA¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya, Jawa Timur, 60112,
Indonesia

²Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur, 60112, Indonesia

Diterima 15 Maret 2018, Disetujui 29 Agustus 2018

Abstrak: Putih telur secara tradisional dapat digunakan untuk pengobatan luka bakar. Putih telur diformulasikan dalam bentuk gel untuk memudahkan pemakaian dan menutupi bau khas putih telur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian gel putih telur terhadap penyembuhan luka bakar derajat II tikus putih (*Rattus novergicus*) galur Wistar melalui pengamatan jumlah sel makrofag, fibroblast, kepadatan deposit kolagen dan penyembuhan luka. Subyek penelitian berupa tikus putih jantan usia 3 bulan. Luka bakar derajat II pada punggung tikus dibuat menggunakan aluminium panas diameter 2 cm suhu 80 °C selama 20 detik. Tikus putih sebanyak 18 ekor yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan yaitu, kontrol negatif menggunakan NaCl 0,9%, kontrol positif menggunakan Bioplacenton® dan perlakuan gel putih telur 40%. Berdasarkan hasil percobaan, pemberian topikal gel putih telur dapat menurunkan jumlah makrofag, meningkatkan jumlah fibroblas, meningkatkan kepadatan deposit kolagen dan mempercepat penyembuhan luka bakar derajat II pada tikus putih jantan. Pada semua parameter tersebut, gel putih telur memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol negatif NaCl 0,9% dan tidak memiliki perbedaan signifikan dengan kontrol positif Bioplacenton®.

Kata kunci: Gel putih telur, luka bakar, fibroblas, makrofag, kepadatan kolagen, waktu penyembuhan luka.

Abstract: Egg whites has been traditionally used for the treatment of burns. In this research, egg white was formulated into gel dosage form for easy to use and covered unpleasant odor. The aim of this study was to determined effectivity of egg white in gel dosage form against the healing of superficial partial thickness burns (second degree) on white rats (*Rattus novergicus*) Wistar strain with parameters were macrophages, fibroblasts, collagen deposit density and wound healing. Research subject were male white rats aged 3 months. Second degree burns on the back of rat were made by an aluminium with diametres 2 cm and temperature 80 °C for 20 seconds. 18 white rats divided into 3 groups of treatment which is negative control using 0.9% NaCl, positive control using Bioplacenton®, and 40% egg white gel as treatment. Based on the experimental results, white egg gel given topically decreased the number of macrophages and increase the number of fibroblasts, increase the density of collagen deposits and speed up wound healing on second degree burns. White egg gel had significantly difference compared to negative control of NaCl 0.9% and no significantly difference compared to Bioplacenton® as positive control.

Keywords: White egg gel, burns, fibroblast, macrophage, collagen density, wound healing time.

* Penulis korespondensi, Hp. 08121714522
e-mail: luciahendriati@gmail.com

PENDAHULUAN

LUKA bakar derajat II sebagian dangkal disebabkan oleh cairan atau uap panas yang mengakibatkan kerusakan pada sebagian dermis, sedangkan folikel rambut dan kelenjar tetap kering utuh. Penampakan luar pada kulit tampak adanya gelembung berisi cairan, berkeriat, merah, memucat dengan penekanan dan adanya rasa nyeri bila terpapar udara dan panas. Waktu penyembuhan luka dangkal sebagian berkisar antara 7-20 hari dan proses penyembuhan terjadi tanpa pembentukan jaringan parut⁽¹⁾.

Penanganan luka bakar dengan bahan alam merupakan salah satu cara yang aman untuk mengobati luka bakar dan sekaligus menekan biaya pengobatan luka bakar. Salah satunya dengan menggunakan putih telur ayam kampung. Kandungan putih telur yang utama adalah protein yang terdiri dari ovotransferin, lisosim, ovomisin, ovomusid, ovalbumin dan avidin⁽²⁾. Kandungan ovotransferin, lisosim dan ovomisin dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dan efek antivirus⁽³⁾. Kandungan putih telur lainnya yaitu ovalbumin juga memiliki potensi untuk digunakan sebagai pembawa obat dan sebagai sumber dari asam amino yang diperlukan untuk proses pertumbuhan⁽⁴⁾. Mekanisme putih telur terhadap penyembuhan luka yaitu dengan membentuk jaringan sel baru dan mempercepat pemulihan jaringan sel tubuh yang rusak⁽²⁾. Akan tetapi, putih telur ayam kampung memiliki kekurangan yaitu bau tidak enak sehingga perlu diformulasikan dalam sediaan gel untuk meningkatkan kenyamanan dalam penggunaan. Berdasarkan penelitian sebelumnya, putih telur efektif pada luka bakar derajat I dan luka bakar derajat II sebagian dangkal⁽⁵⁾. Putih telur tidak bisa digunakan untuk luka derajat II sebagian dalam dan luka derajat III karena perlu dilakukan eksisi awal dan cangkok kulit⁽⁶⁾.

Ada tiga fase dalam penyembuhan luka yaitu fase inflamasi, fase proliferasi dan fase maturasi⁽⁷⁾. Fase inflamasi terjadi beberapa jam setelah cedera dan efeknya bertahan hingga 2-3 hari. Pada fase inflamasi diawali dengan vasokonstriksi untuk mencapai hemostasis sehingga trombus terbentuk dan rangkaian pembentukan darah diaktifkan, sehingga terjadi deposisi fibrin. Keping darah melepaskan *platelet derived growth factor* (PDGF) dan *transforming growth factor* β (TGF- β) yang menarik sel-sel inflamasi, terutama makrofag. Setelah hemostasis tercapai, terjadi vasodilatasi dan permeabilitas pembuluh darah meningkat. Jumlah neutrofil memuncak pada 24 jam dan membantu debridemen. Monosit memasuki luka, menjadi makrofag dan jumlahnya memuncak dalam 2-3 hari. Makrofag menghasilkan PDGF dan TGF- β ,

akan menarik fibroblas dan merangsang pembentukan kolagen. Penyembuhan luka juga ditandai dengan meningkatnya kepadatan deposit kolagen. Kolagen tipe III dibentuk pada hari pertama sampai ketiga setelah trauma yang akan mencapai puncaknya pada minggu pertama. Kolagen tipe III ini akan digantikan oleh kolagen tipe I yang lebih kuat saat proses penyembuhan luka memasuki fase maturasi yaitu sekitar minggu ketiga setelah cedera⁽⁸⁾.

Sebagian besar orang tidak nyaman pengobatan dengan putih telur dikarenakan baunya yang kurang sedap. Formulasi putih telur dalam bentuk gel dapat memudahkan pemakaian dan menutupi bau khas putih telur. Sediaan gel memiliki kandungan air yang tinggi sehingga meningkatkan hidrasi pada stratum korneum sehingga akan memudahkan penetrasi obat melalui kulit. Selain itu, karena gel mengandung air, maka gel mudah bercampur dengan sekret kulit yang mengalami luka bakar.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektifitas gel putih telur terhadap luka bakar derajat II dengan parameter fibroblas, makrofag, kepadatan kolagen dan waktu penyembuhan luka bakar.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Methocel K4M (Colorcon, USA), gliserin (Brataco), propilen glikol (Brataco), metil paraben (Brataco), propil paraben (Brataco). Putih telur ayam kampung (Kelompok Tani Ternak Giri Marga Ayu Banjar Pegongan, Desa Taman, Kecamatan Abiansemal, Kabupaten Badung, Bali), infus NaCl 0,9% (Otsuka), Bioplacenton[®].

Alat. Termometer, gunting, kapas, pinset, perban, mikroskop dan jangka sorong, pH meter, viskometer *Brookfield Rotary*.

Hewan Coba. Tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur Wistar (Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga) dengan usia 3 bulan dengan berat sekitar 250-300 g.

METODE. Formulasi Sediaan Gel. Susunan formula dari sediaan gel putih telur dapat dilihat pada Tabel 1.

Pembuatan Gel Putih Telur. Sediaan gel putih telur yang dibuat sebanyak 300 g. Methocel K4M ditimbang sebanyak 6 g kemudian dibasahi dengan gliserin 24 g. Methocel K4M yang sudah dibasahi kemudian ditambahkan air suling 100 mL dan diaduk perlahan sampai terbentuk gel. Metil paraben 0,54 g dan propil paraben 0,06 g kemudian dilarutkan dalam propilen glikol 6 g. Campuran propilen glikol dimasukkan ke dalam mortir dan diaduk merata sampai terbentuk masa gel. Gel didiamkan selama 24 jam agar mengembang dengan sempurna. Telur

dipisahkan putih telur dari kuning telurnya, kemudian putih telur ditimbang sebanyak 120 g lalu masukkan ke dalam mortar yang berisi gel dan ditambah air suling hingga 300 g. Gel diaduk perlahan agar tidak menimbulkan busa dan tercampur hingga homogen.

Evaluasi Sifat Fisik Sediaan Gel Putih Telur. Pemeriksaan mutu fisik gel putih telur meliputi pemeriksaan organoleptis, pengukuran pH, daya sebandan viskositas.

Penyiapan Bahan Kontrol Positif, Kontrol Negatif dan Perlakuan Gel Putih Telur. Larutan NaCl 0,9% sebagai bahan kontrol negatif (K-), Bioplacenton® digunakan sebagai kontrol positif (K+) dan gel putih telur (P) digunakan sebagai bahan uji.

Pembuatan Luka Bakar Tikus. Tikus terlebih dahulu diadaptasikan selama satu minggu dan

dari setiap luka bakar pada punggung tikus dengan cara eksisi pada bekas luka bakar dengan diameter sekitar 2 cm sampai sedalam otot. Jaringan kulit yang diambil dimasukkan ke dalam botol yang berisi formalin 10% untuk fiksasi jaringan. Pemeriksaan jumlah makrofag dan jumlah fibroblas dilakukan dengan pewarnaan *hematoxylin-eosin*.

Penetapan Jumlah Makrofag, Fibroblas dan Kepadatan Deposit Kolagen. Hasil pengamatan dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 400 kali dengan menghitung jumlah makrofag dan fibroblas aktif setiap lapangan pandang dengan mengamati dari sisi paling kiri atas sampai bawah. Makrofag pada perbesaran 400 kali akan berbentuk ireguler dan berwarna kebiruan dengan granul hasil fagositosis berwarna kecoklatan sebagai pigmen

Tabel 1. Susunan formula gel putih telur.

No	Nama Bahan	Konsentrasi	Komposisi	Fungsi
1	Putih Telur	40%	120 g	Bahan aktif
2	Methocel K4M	2%	6 g	Pembentuk gel
3	Gliserin	8%	24 g	Humektan
4	Propilen Glikol	2%	6 g	Pelarut
5	Metilparaben	0,18%	0,54 g	Pengawet
6	Propilparaben	0,02%	0,06 g	Pengawet
7	Air suling hingga	100%	300 g	Pelarut

diberikan makanan dan minuman. Masing-masing tikus dicukur bulunya pada bagian punggung. Selanjutnya luka bakar menggunakan aluminium panas suhu 800 °C dengan diameter 2 cm selama 20 detik.

Pengelompokan Perlakuan. Sebanyak 18 ekor tikus dibagi menjadi tiga kelompok masing-masing berisi 6 ekor tikus. Kelompok pertama dioles larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif. Kelompok kedua dioles dengan Bioplacenton® sebagai kontrol positif. Kelompok ketiga dioles gel putih telur 40%. Pengolesan gel pada luka bakar sebanyak 350 mg setiap 2 kali sehari. Setelah pengolesan masing-masing luka ditutup dengan perban untuk mencegah kontaminasi ke area luka. Tikus dipelihara pada kandangnya masing-masing serta diberi makanan dan minuman dengan jumlah dan jenis yang sama.

Pengambilan Jaringan. Pengambilan jaringan kulit tikus dilakukan pada hari ke-3 (fase inflamasi) dan hari ke-7 (fase proliferasi), masing-masing dikorbankan 3 ekor tikus pada setiap fase. Tikus dikorbankan dengan cara dibius dengan eter sampai tikus sudah tidak bisa bergerak lagi. Spesimen diambil

eksogen di dalam sitoplasma makrofag. Fibroblas umumnya berkelompok membentuk suatu garis sejajar dengan sitoplasma berwarna kemerahan dan jumlahnya diukur secara manual. Untuk pengukuran kepadatan kolagen, preparat diletakkan di bawah mikroskop cahaya pembesaran 400 kali kemudian kepadatan deposit kolagen diukur menggunakan program komputer *Adobe Photoshop 6.0*.

Penilaian Persen Kesembuhan Luka Bakar. Penilaian waktu penyembuhan luka bakar dilakukan setiap hari dengan mengamati warna pada daerah luka, kekeringan dengan meraba daerah luka dan mengukur diameter luka menggunakan jangka sorong. Perhitungan persentase penyembuhan luka bakar dengan rumus sebagai berikut⁽⁹⁾:

$$px = 100 - (dx/d \times 100\%)$$

- px = persentase penyembuhan luka bakar pada hari ke x
d = diameter luka bakar hari pertama
dx = diameter luka bakar hari ke x

Analisis Data. Data hasil pengamatan fibroblas, makrofag, kepadatan kolagen dan persen kesembuhan dianalisis dengan ANOVA satu arah. Jika terdapat perbedaan yang nyata dilanjutkan uji jarak berganda Duncan dengan taraf kepercayaan 95%. Analisis statistik dengan menggunakan program SPSS for Windows versi 22.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Formulasi Sediaan Gel Putih Telur. Bentuk sediaan gel dipilih karena kemampuan penyebarannya baik pada kulit, memberi rasa dingin melalui penguapan lambat dari kulit, kemudahan pencuciannya dengan air baik dan pelepasan obatnya baik⁽¹⁰⁾. Dalam proses pembuatan, putih telur yang dikocok mudah sekali berbusa. Adanya busa atau aerasi pada sediaan gel akan menghambat proses pelepasan dan absorpsi obat pada kulit. Oleh karena itu pada proses pembuatan gel putih telur, proses homogenisasi putih telur dengan gel dilakukan secara perlahan agar tidak menimbulkan busa. Evaluasi sediaan gel putih telur bertujuan untuk menjamin bahwa gel yang digunakan stabil dan memenuhi syarat sediaan gel. Evaluasi sediaan gel meliputi uji organoleptis, pH, daya sebar, homogenitas dan viskositas. Hasil evaluasi pengujian sediaan gel putih telur dapat dilihat pada Tabel 2.

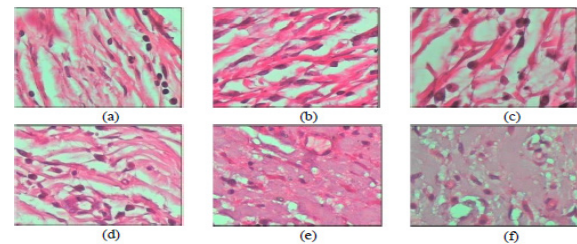
Viskositas sediaan gel yang diperoleh adalah 16.670 cps sedangkan daya sebar 5,1 cm. Pada kondisi tersebut, sediaan gel cukup mudah dioleskan pada daerah luka dan tetap melekat pada daerah luka. Berdasarkan evaluasi mutu fisik sediaan gel putih telur meliputi organoleptis, pH, daya sebar dan viskositas diketahui bahwa gel putih telur secara umum telah memenuhi persyaratan sediaan gel yang baik^(11,12). Dalam penyimpanan, evaluasi sediaan setelah bulan ke-9 menunjukkan hasil yang sama dengan sediaan setelah dibuat. Hal ini menunjukkan formula sediaan memiliki stabilitas fisika kimia yang baik.

Penambahan kombinasi pengawet metil paraben dan propil paraben dapat meningkatkan stabilitas sediaan. Persyaratan sediaan tidak mengandung aerasi juga membantu meningkatkan stabilitas sediaan karena dapat meminimalkan potensi terjadinya oksidasi.

Penetapan Jumlah Makrofag dan Fibroblas.

Hasil pengamatan makrofag dan fibroblas dapat dilihat pada Gambar 1.

Makrofag mencapai puncak pada hari ke-3



Gambar 1. Hasil pengamatan makrofag dan fibroblas dengan perbesaran 400x :

(a) K- (hari ke-3); (b) K+(hari ke-3); (c) P (hari ke-3);
(d) K- (hari ke-7); (e) K+(hari ke-7); (f) P(hari ke-7).

sedangkan fibroblas mencapai puncaknya sekitar satu minggu setelah trauma dan merupakan sel dominan pada minggu pertama fase penyembuhan luka⁽¹³⁾.

Perhitungan rerata jumlah makrofag pada hari ke-3 yang disajikan pada Tabel 3. menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan berbeda bermakna. Hasil yang paling tinggi ada pada kelompok perlakuan putih telur yaitu $4,07 \pm 0,12$. Pada hari ke-7 menunjukkan bahwa kelompok perlakuan perlakuan putih telur berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif dan tidak berbeda bermakna dengan kontrol positif. Perlakuan kontrol positif dan perlakuan putih telur menyebabkan penurunan jumlah makrofag pada hari ke-7. Sedangkan perlakuan kontrol negatif tidak terlihat terjadi penurunan aktivitas makrofag. Hal ini menunjukkan bahwa putih telur dapat menurunkan jumlah makrofag. Ovomusin, ovotransferin dan

Tabel 2. Hasil evaluasi sediaan gel putih telur.

Pengujian	Hasil	Persyaratan
Organoleptis		
Bentuk	Gel	Gel
Bau	Bau Khas	Bau Khas
Warna	Jernih, tanpa aerasi	Jernih, tanpa aerasi
pH	7,0	4-7
Homogenitas	Homogen	Homogen
Daya Sebar	5,1 cm	5-7 cm
Viskositas	16.670 cps	10.000-70.000 cps

lisosim di dalam kandungan putih telur bekerja meningkatkan aktivitas monosit dan makrofag dan sitotoksitas, menstimulasi *killer T-cells* dan meningkatkan aktivitas makrofag secara *in vitro*⁽²⁾. Sehingga pada pengamatan, jumlah makrofag pada kelompok perlakuan putih telur lebih banyak dibanding kelompok kontrol positif maupun negatif pada hari ke-3 dan menurun dengan cepat pada hari ke-7.

Makrofag mempunyai peran penting dalam respon imun. Fungsi utama makrofag dalam imunitas adalah

merupakan sel dominan pada minggu pertama fase penyembuhan luka⁽¹³⁾. Protein dalam putih telur yaitu ovalbumin berperan sangat penting sebagai sumber asam amino untuk *growth factor*. *Growth factor* ini berkontribusi dalam penyembuhan luka dengan menstimulasi fibroblas (*connectivetissue cells*) untuk memproduksi kolagen lebih banyak yang akan mengisi daerah luka⁽¹⁴⁾. Semakin tinggi jumlah fibroblas, maka kepadatan kolagen juga besar. Jumlah fibroblas mempengaruhi jumlah kolagen padat sebesar 33,9% sedangkan sisanya dipengaruhi

Tabel 3 . Rerata jumlah makrofag dan fibroblas pada semua kelompok perlakuan.

Kelompok	Rerata jumlah makrofag		Rerata jumlah fibroblas	
	Hari ke- 3	Hari ke-7	Hari ke- 3	Hari ke 7
K (-)	2,47 ^a ± 0,12	3,53 ^a ± 0,30	1,27 ^a ± 0,12	2,07 ^a ± 0,11
K (+)	3,53 ^b ± 0,42	1,80 ^{b,c} ± 0,20	1,67 ^{b,c} ± 0,12	4,93 ^{b,c} ± 0,80
P	4,07 ^c ± 0,12	1,67 ^c ± 0,23	1,87 ^c ± 0,12	5,53 ^c ± 0,30

a,b,c menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (larutan NaCl 0,9%); K (+) = kontrol positif (Bioplacenton®); P = perlakuan dengan gel putih telur.

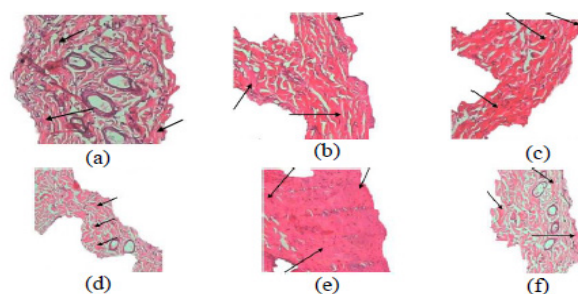
fagositosis partikel asing yang masuk ke dalam tubuh, makromolekul antigen, sel atau jaringan sendiri yang mengalami kerusakan atau mati. Makrofag juga akan mengikuti netrofil menuju luka setelah 48-72 jam dan menjadi sel predominan setelah hari ke-3 setelah cedera. Debris dan bakteri akan difagositosis oleh makrofag. Makrofag juga berperan utama memproduksi berbagai *growth factor* yang dibutuhkan dalam produksi matriks ekstra seluler oleh fibroblas dan pembentukan neovaskularisasi. Keberadaan makrofag oleh karenanya sangat penting dalam fase penyembuhan ini⁽⁸⁾.

Berdasarkan perhitungan data rerata jumlah fibroblas pada hari ke-3 tampak bahwa kelompok perlakuan putih telur berbeda bermakna dengan kelompok kontrol negatif, dan tidak beda bermakna dengan kontrol positif. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada perlakuan hari ke-7. Pada semua kelompok perlakuan terjadi peningkatan jumlah fibroblas dari hari ke-3 sampai hari ke-7. Peningkatan yang paling tinggi ditunjukkan oleh perlakuan gel putih telur. Berdasar hasil tersebut putih telur terbukti dapat meningkatkan aktivitas sel fibroblas.

Fibroblas adalah sel yang mensintesis matriks ekstraseluler dan kolagen yang berperan penting dalam penyembuhan luka. Fibroblas berfungsi mempertahankan integritas struktur jaringan ikat dengan memproduksi matriks ekstraseluler. Fibroblas terakumulasi di daerah luka melalui angiogenesis antara dua sampai lima hari setelah cedera dan

oleh faktor lain. Faktor lain adalah ketersediaan asam amino, suplai oksigen, antioksidan dan ketersediaan zat besi dalam tubuh. Asam amino adalah bahan pembentuk kolagen, sedangkan oksigen dan zat besi akan meningkatkan produksi kolagen dalam tubuh⁽²⁾.

Kepadatan Deposit Kolagen. Hasil pengamatan makrofag dan fibroblas dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kepadatan deposit kolagen: (a) K - (hari ke-3), (b) K +(hari ke-3), (c) P (hari ke-3), (d) K - (hari ke-7), (e) K+(hari ke-7), (f) P (hari ke-7)

Berdasarkan data pada Tabel 4. dapat disimpulkan pada hari ke-3 kelompok kontrol positif, kelompok gel putih telur menunjukkan perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif. Sedangkan pada hari ke-7, ketiga kelompok perlakuan menunjukkan hasil yang berbeda bermakna. Rerata kepadatan deposit kolagen tertinggi berturut-turut ditunjukkan oleh pemberian kontrol positif, gel putih telur dan kontrol negatif. Kolagen termasuk protein fibrin, yang berada di daerah dermis berperan dalam pembentukan

struktur sel terbesar pada matriks ekstraseluler yang mempertahankan bentuk jaringan. Secara umum, kandungan kolagen dapat berjumlah sekitar 25-35% dari total protein pada tubuh. Kolagen tipe III dibentuk pada hari pertama sampai ketiga setelah trauma yang akan mencapai puncaknya pada minggu pertama. Kolagen tipe III ini akan digantikan oleh kolagen

Data hasil pengukuran diameter luka bakar pada tikus putih jantan yang diamati dari hari ke-3 hingga hari ke-7 dapat dilihat pada Tabel 5.

Berdasarkan perhitungan statistik, kelompok kontrol positif dan kelompok gel putih telur memberikan perbedaan bermakna dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok perlakuan kontrol positif

Tabel 4. Hasil Kepadatan deposit kolagen hari ke-3 dan ke-7.

Perlakuan	Kepadatan Deposit Kolagen	
	Hari ke-3	Hari ke-7
K (-)	207,4167 ^a ± 14,33946	219,3833 ^a ± 11,76501
K (+)	236,4600 ^b ± 2,44514	239,5368 ^b ± 4,23257
P	229,5867 ^b ± 3,83914	223,8000 ^c ± 4,16360

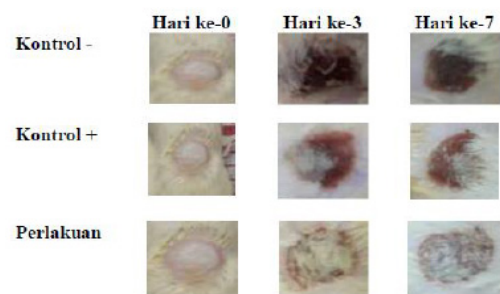
a,b,c menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (larutan NaCl 0,9%) ; K (+) = kontrol positif (Bioplacenton®) ; P = perlakuan dengan gel putih telur.

tipe I yang lebih kuat saat proses penyembuhan luka memasuki fase maturasi yaitu sekitar minggu ketiga setelah cedera⁽⁸⁾.

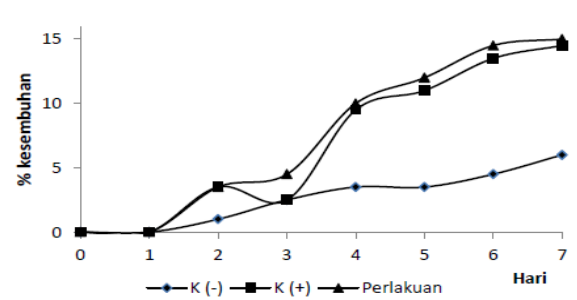
Perbedaan kepadatan deposit kolagen antara kontrol positif dengan perlakuan gel putih telur diduga disebabkan kandungan yang terdapat pada kontrol positif yaitu ekstrak plasenta 10%. Ekstrak plasenta mengandung *fibronectin* tipe III sebagai biogenik stimulator yang dapat meningkatkan atau mempercepat dan reproduksi sel kulit dan meregenerasi sel yang rusak⁽¹⁵⁾. Selain itu diduga disebabkan berat molekul dari kandungan senyawa kontrol positif lebih kecil dari berat molekul kandungan putih telur sehingga absorpsi topikal kontrol positif lebih baik dibandingkan dengan gel putih telur. Kepadatan deposit kolagen dengan pemberian gel putih telur akan meningkat hingga mencapai akhir fase proliferasi. Fase proliferasi ini akan berlangsung hingga hari ke-21⁽¹⁶⁾.

Persen Kesembuhan Luka Bakar. Pengamatan makroskopis luka bakar pada punggung tikus dapat dilihat pada Gambar 3. Pada kontrol negatif, hari ke-4 dan ke-5 tampak luka bakar berwarna merah menandakan luka bakar memasuki fase proliferasi. Pada hari ke-6 dan 7 jaringan kulit kontrol negatif mengalami nekrosis, sedangkan pada kontrol positif dan perlakuan gel putih telur tidak terdapat nekrosis dan luka tampak berwarna merah. Perbedaan ini disebabkan karena larutan NaCl 0,9% sebagai kontrol negatif tidak memiliki kandungan antimikroba sehingga terjadi infeksi lebih besar dan mengganggu regulasi proliferasi fibroblas. Secara visual, luka pada kontrol negatif tampak berwarna kehitaman yang disebabkan karena nekrosis, sedangkan pada kontrol positif dan kelompok perlakuan luka tetap berwarna merah.



Gambar 3. Pengamatan makroskopis luka bakar hari ke-0, ke-3, dan ke-7.

tidak berbeda bermakna dengan kelompok kontrol positif dan kelompok gel putih telur. Hal tersebut menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif dan kelompok gel putih telur dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Data diameter luka dibuat dalam bentuk persen (%) untuk mengetahui peningkatan kesembuhan luka bakar pada tikus putih dapat dilihat pada Gambar 4. Persentase tertinggi penyembuhan luka berturut-turut adalah pemberian gel putih telur, kontrol positif dan kontrol negatif.



Gambar 4. Grafik rerata persen kesembuhan hari ke-3 dan hari ke-7.

Tabel 5. Hasil perhitungan diameter luka hari ke-3 sampai hari ke-7.

Perlakuan	Diameter Luka (cm)				
	Hari ke -3	Hari ke -4	Hari ke -5	Hari ke -6	Hari ke -7
K (-)	1,95 ^a ± 0,050	1,93 ^a ± 0,029	1,93 ^a ± 0,03	1,92 ^a ± 0,03	1,88 ^a ± 0,03
K (+)	1,87 ^b ± 0,03	1,82 ^b ± 0,03	1,78 ^b ± 0,03	1,73 ^b ± 0,08	1,72 ^b ± 0,08
P	1,85 ^b ± 0,00	1,80 ^b ± 0,05	1,77 ^b ± 0,03	1,72 ^b ± 0,03	1,70 ^b ± 0,050

a,b,c menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$).

Keterangan : K (-) = kontrol negatif (larutan NaCl 0,9%) ; K (+) = kontrol positif (Bioplacenton®) ; P = perlakuan dengan gel putih telur.

SIMPULAN

Berdasarkan analisis data maka dapat disimpulkan bahwa pemberian topikal gel putih telur dapat menurunkan jumlah makrofag dan meningkatkan jumlah fibroblas. Gel putih telur juga dapat meningkatkan kepadatan deposit kolagen dan mempercepat waktu penyembuhan luka pada luka bakar derajat II pada tikus putih jantan.

DAFTAR PUSTAKA

- Noer MS. Penanganan luka bakar akut. In Noer, M.S. (eds) Penanganan luka bakar. 2006. Airlangga University Press. 3-5.
- Abdou AM, Kim M, Sato K. Functional proteins and peptides of hen's egg origin. In Ledesma BH, Hsieh CC (eds). Bioactive Food Peptides in Health and Disease. 2013. InTech. 120-36.
- Kratz F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. J. Control. Release. 2008. 132:171-83.
- Pieron A, Quave CL, Santoro RF. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the dolomiti lucane, Inland Southern Italy. Journal of Ethnopharmacology. 2004. 95: 373-84.
- Rukiana A. Uji efek penyembuhan luka bakar menggunakan putih telur ayam kampung (albumin) pada kelinci (*Oryctolagus cuniculus*). Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Indonesia Timur, Makassar. 2011.
- James HH, David MH. Burns, in: Schwartz's principles of surgery. 18th ed. McGraw-Hill. New York. 2005. p.189-216
- Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. (eds). Ilmu bedah sabiton, Buku Kedokteran EGC. 2010.
- Gurtner GC. Wound healing, normal and abnormal. In: Thorne CH, Beasley RW, Aston SJ, Bartlett SP, Gurtner GC, Spear SL. Grabb and Smith's Plastic. 6th ed. 2007. 15-22.
- Huseini HF, Rahimzadeh G, Fazeli MR, Mehrazma M, Salehi M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. Burns. 2012. 38. 719 - 23.
- Allen LV, Popovich NG, Ansel HC. Ansel's pharmaceutical dosage form and drug delivery systems. Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- Garg A, Deepika A, Garg S, Singla AK. Spreading of semisolid formulation. USA: Pharmaceutical Tecnology. 2002. 84-104.
- Bushe L. Presented at the Advisory Committee for Pharmaceutical Science Meeting on March 12. 2003. www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/03/slides/3926SI_11Buhse.ppt. Diakses pada 30 Agustus, 2016.
- Falanga V. The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation. Blood Cells, Molecules, and Diseases. 2004. 32 (1): 88-94.
- Saeed MA, Ahmad I, Yaqub U, Akbar S, Waheed A, Saleem M, Nasirudin. Aloe vera: a plant of vital significance. Quarterly Science Vision. 2003. Vol. 9 No.1-2 Jul-Dec.
- Biswas TK, Auddy B, Bhattacharya NP, Bhattacharya S. Mukherjee B. Wound healing activity of human placental extracts in rats. Acta Pharmacol Sin. 2001. 22:1113-6.
- Arisanty IP. Konsep dasar manajemen perawatan luka. 2013. EGC.

Efek *Spirulina platensis* terhadap Analisis Kadar, Gambaran Histopatologi, Ekspresi Insulin dan Glut-4 pada Tikus Wistar yang Diinduksi *Streptozotocin*

(Effect of *Spirulina platensis* on Level Analysis, Histopathology, Insulin and Glut-4 Expression in Wistar Rats Induced by *Streptozotocin*)

KINTOKO^{1*}, RIFQI FERRY BALFAS^{1,3}, NURA USTRINA¹, SITARINA WIDYARINI², LINTANG CAHYA SAPUTRI¹, ANANDHITA NURWIJAYANTI¹, FAJAR SLAMET RIANA¹, NENI TRI ANGGRAINII

¹ Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, DIY, Indonesia

² Bagian Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Jawa Tengah, Indonesia

³ Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Muhadi Setiabudi, Brebes, Jawa Tengah, Indonesia

Diterima 16 Juli 2018, Disetujui 26 September 2018

Abstrak: Berdasarkan riset kesehatan dasar di Yogyakarta insiden diabetes mellitus berdasarkan diagnosis dokter adalah 2,6% dan akan meningkat dengan usia, tetapi akan menurun dari usia > 65 tahun. Dalam beberapa pengobatannya dengan obat sintetis dan bahan-bahan alami seperti *Spirulina platensis*. *Spirulina platensis* adalah salah satu Mikroalga yang berisi spektrum alami karoten dan *xanthophyll* pigmen campuran, dan dengan phycocyanin memiliki aktivitas antioksidan, dan *Spirulina platensis* dapat menunjukkan penurunan gula darah. Jenis penelitian adalah eksperimental. *Spirulina platensis* dibuat dengan beberapa dosis 36 mg, 72 mg, dan 144 mg. Tikus dibagi dalam 6 kelompok, tikus di ukur kadar gula hari ke 0-28. Setelah itu dianalisa kadar efek *Spirulina platensis*. Hasilnya dianalisis menggunakan metode SPSS ANOVA dan Post Hoc tes dengan tingkat keyakinan 95%. Hasil analisis kadar menunjukkan bahwa *Spirulina plantesis* yang induksi *streptozotocin* dengan berbagai dosis terdapat peningkatan dan juga pada kelompok dosis STZ + SP 36 dalam analisis dapat meningkatkan kadar analisis. Sementara pada histopatologi hasil dan insulin ekspresi di pankreas dan histologi dan ekspresi glukosa transporter 4 dan histopatologi pada ginjal dan hati menunjukkan baik berubah berbagai kelompok dosis pengobatan terutama di STZ + SP 36 kelompok dosis. Jadi STZ + SP 36 kelompok dosis menampilkan perubahan kedua dalam studi ini.

Kata Kunci: Anti diabetes, histopatologi, *spirulina plantesis*, *streptozotocin*.

Abstract: Basic health research based in Yogyakarta of the incident based on the physician's diagnosis of diabetes mellitus is 2.6% and will increase with age, but will decrease from the age of > 65 years. In some treatment with synthetic drugs and natural ingredients such as *Spirulina platensis*. *Spirulina platensis* is one of the Mikroalgae that contains a spectrum of natural carotene and xanthophyll pigments mixed with phycocyanin, and has antioxidant activity, and *Spirulina platensis* may indicate a decrease in blood sugar. This type of research is experimental. *Spirulina platensis* made with some dose of 36 mg, 72, and 144 mg mg. Of mice were divided into 6 groups, measuring sugar levels in rats a day to 0-28. After it analyzed the levels of the effect of *Spirulina platensis*. The results were analyzed using SPSS methods of ANOVA and Post Hoc test with a 95% confidence level. The results of the analysis indicate that the levels of spirulina plantesis that streptozotocin induced with different dose there was an increase in the dose group and also on STZ + SP 36 in analysis can increase levels of analysis. While at Histopathology results and insulin in the pancreas and Histology expression and expression of glucose transporter 4 and Histopathology in the liver and kidneys showed good change treatment doses of various groups especially in STZ + SP 36 dose groups. So STZ + SP 36 dose groups showing the second amendment in this study.

Key words: Anti diabetic, histopathology, *Spirulina plantesis*, *streptozotocin*.

*Penulis korespondensi, HP 082220709977
e-mail: kkintoko77@gmail.com

PENDAHULUAN

DIABETES MELLITUS (DM) merupakan salah satu penyakit yang terus mengalami peningkatan di dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan bahwa pada tahun 2014 sekitar 422 juta orang menderita diabetes, sedangkan pada tahun 1980 berjumlah 108 juta. Dari hasil ini, prevalensi global hampir dua kali lipat sejak tahun 1980, yaitu dari 4,7% naik menjadi 8,5%.

Diabetes merupakan suatu penyakit tidak mampu mengendalikan jumlah glukosa dalam aliran darah sehingga menyebabkan penyakit hiperglikemia, hiperglikemia ialah suatu keadaan glukosa dalam aliran darah yang tingginya sudah membahayakan⁽¹⁾.

Diabetes Mellitus merupakan faktor terjadinya penyakit kardiovaskular, seperti arteri koroner⁽²⁾, penyakit jantung koroner. Beberapa hal penyebabnya adalah hiperlipidemia⁸. Hiperlipidemia merupakan keadaan dimana tingginya kadar lipid dalam darah (kolesterol total, trigliserida, dan low density lipoprotein (LDL) melebihi batas normalnya, dimana kadar kolesterol total normal < 200 mg/dL sedangkan trigliserida normal <150 mg/dL. Pada tahun 2013, jumlah persentase penduduk Indonesia dengan faktor risiko kolesterol total sebesar 35,9% dan trigliserida 11,9%⁽³⁾.

Peningkatan kadar *malondialdehid* (MDA) menjadi indikator dari produksi radikal bebas berlebih dan dapat menurunkan enzim antioksidan intrasel⁽⁴⁾. Pada kondisi stres oksidatif, produksi *reactive oxygen species* (ROS) yang tinggi akan meningkatkan aktivitas enzim antioksidan untuk menetralkan ROS sehingga jumlahnya dalam tubuh menjadi berkurang. Stres oksidatif dapat memicu peroksidasi lipid sehingga menimbulkan kerusakan sel serta dapat mengakibatkan adanya kerusakan pada fungsi hati dengan meningkatnya beberapa penanda biokimia seperti *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT), *Serum Glutamic Piruvic Transaminase* (SGPT), bilirubin alkaline fosfatase serta peningkatan jaringan peroksidasi lipid⁽⁴⁾.

Diabetes mellitus tipe 2 yaitu tubuh tetap menghasilkan insulin dalam jumlah yang normal, namun insulin yang dihasilkan tidak bekerja dengan baik atau terjadi resistensi insulin karena reseptor insulin pada membran sel berkurang sehingga tidak tanggap terhadap insulin⁽⁵⁾.

Pada keadaan normal atau gula darah puasa (GDP) tidak mengalami diabetes maka semakin tinggi ekspresi *Glucose Transporter 4* (GLUT 4). Penginduksian streptozotocin dapat mengakibatkan resistensi insulin sehingga kadar glukosa dalam darah tinggi, streptozotocin dapat pula menyebabkan *Glucose Transporter 4* (GLUT 4) yang memfasilitasi glukosa masuk ke dalam sel menurun, sehingga mengakibatkan

penurunan pemasukkan glukosa ke dalam otot dan jaringan adiposa.

Salah satu sumber daya hayati biota laut Indonesia yang mampu memutuskan reaksi rantai radikal sehingga dapat menghambat ROS dan stres oksidatif pada penderita DM yaitu *Spirulina platensis*, mikroalga hijau biru yang kaya akan kandungan protein, vitamin, mineral, pigmen fikosianin dan karotenoid yang berfungsi sebagai antioksidan eksogen. *Spirulina platensis* memiliki berbagai kandungan kimia seperti klorofil-a, xanthophyll, fikosianin dan karotenoid⁽⁶⁾. Fikosianin dan fikosianobilin dari *Spirulina platensis* menghambat nefropati diabetes terhadap stress oksidatif⁽⁷⁾. *Spirulina platensis* mengandung spektrum alami campuran karoten dan pigmen xantofil (pigmen yang menyebabkan warna kuning pada tumbuhan), yang dengan fikosianin memiliki aktivitas antioksidan, serta *Spirulina platensis* menunjukkan penurunan gula darah⁽⁸⁾.

Spirulina platensis merupakan salah satu mikroalga yang memiliki kandungan lemak dan protein yang cukup tinggi⁽¹⁰⁾. Senyawa aktif yang berfungsi sebagai hepatoprotektor adalah antioksidan. Kandungan kimia yang terkandung dalam *Spirulina platensis* juga dapat mengikat radikal bebas sehingga dapat berfungsi sebagai hepatoprotektor.

Berdasarkan uraian diatas, peneliti ingin aktivitas *Spirulina platensis* sebagai antidiabetes terhadap ureum, kreatinin, *Trigliserida* (TG), *Cholesterol Total* (TC), *Malondialdehida* (MDA), *Serum Glutamic Piruvic Transaminase* (SGPT), *Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase* (SGOT), gambaran histopatologi hati dan ginjal serta mengetahui ekspresi insulin dan GLUT4 pada tikus Wistar putih yang diinduksi *Streptozotocin*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Untuk hewan percobaan ialah tikus jantan galur wistar usia 2-3 bulan dengan bobot 150-200 gram sejumlah 54 tikus Wistar putih yang didapatkan dari LPPT Universitas Gajah Mada. Penelitian ini terdapat kemudian hewan uji dilakukan pembagian menjadi 6 kelompok perlakuan. bubuk mikroalga *Spirulina platensis* diambil dari kolam pembudidayaan di PT. Neoalgae Industri Makmur, Sukoharjo. Makanan tikus dalam bentuk pelet dan pemberian aquadest. Bahan kimia yang digunakan ialah *streptozotocin* (*Nacalai tesque*[®]), ketamin injeksi (*Generik*[®]), Larutan PBS, reagen glucose GOD FS (*Diasys*[®]), Larutan Formalin 10%, *cat Hematoxylin & Eosin* (HE), GLUT-4 *Polyclonal Antibody* 1 µg/µL (Bioss) (*Host: Rabbit; Souce: KLH conjugated synthetic peptide derived from human GLUT-4*), antibody primer mouse anti-insulin (1:300; Abcam, USA), PGA, CMC-NA, gliserin. Alat yang digunakan untuk perlakuan terhadap hewan uji adalah kandang tikus, timbangan analitik, peralatan

pakan dan minum tikus, sonde tikus oral, spuit injeksi 3cc dan spuit injeksi 5cc, *glucometer* (clever check®), masker dan sarung tangan, pipa kapiler darah dengan antikoagulan, *effendorf* volume 1,5 mL alat-alat gelas, *vortex* (heidolph®), *mikropipet* (socorex®), *waterbath* (memer th®), *sentrifuge* (sorvall®), *spektrofotometer* (shimadzu®), *blue tips* dan *yellow tip*.

METODE. Perlakuan hewan uji yang telah mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta nomor : 405/EP-FKIK-UMY/VII/2017. Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni-Agustus 2017.

Tikus perlakuan dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, yaitu kelompok normal, SP, STZ, STZ+SP 36, STZ+SP 72 dan STZ+SP 144. Pada kelompok normal tikus diberi 180 mg/kgBB, kelompok STZ tikus diinduksi STZ dosis 45 mg/kgBB dan tidak diberi SP. Pada kelompok perlakuan STZ+SP 36, 72 dan 144 tikus diinduksi STZ 45 mg/kgBB dan diberi SP dosis 180, 360 dan 720 mg/kgBB. Tikus dipuasakan selama 12 jam diamati kadar gula darah kemudian diberikan STZ 45 mg/kg BB secara intra peritoneal, perlakuan dilakukan selama 28 hari.

Pembuatan Streptozotosin (STZ). Larutan stok yang dibuat yaitu ditimbang STZ sebanyak 450 mg dilarutkan dalam 50 ml buffer sitrat 0,02 M sehingga 1 mL larutan mengandung 9 mg STZ. Dosis STZ yang digunakan mengacu pada penelitian yang telah ada yaitu, menggunakan dosis 45 mg/kgBB. Apabila bobot tikus rata-rata adalah 200 gram, maka dibutuhkan 9 mg STZ untuk setiap ekor tikus. Jika 1 ml larutan mengandung 10 mg STZ, maka induksi i.p memerlukan 0,9 mL larutan STZ20.

Pembuatan Suspensi. Bahan suspensi *Spirulina plantesis* yang digunakan dalam penelitian ini PGA dan CMC-Na digerus sampai homogen, kemudian dilarutkan dengan air sampai terbentuk *mucilage* (pada mortir I). Serbuk *spirulina plantesis* yang akan dibuat suspensi dihaluskan, selanjutnya ditambahkan *gliserin* dan digerus hingga homogen (pada mortir II). Campuran bahan (pada mortir II) dituang sedikit demi sedikit ke dalam campuran bahan (pada mortir I) diaduk hingga homogen. Setelah itu, dimasukkan ke dalam gelas ukur beserta dengan air bilasan dari mortir. Terakhir ditambahkan *Aqua destillata* hingga 100 mL.

Tabel 1. Formulasi suspensi kombinasi suspending agent PGA dan CMC-Na.

Bahan	CMC-NA	Spirulina	Fungsi
Spirulina	-	4 gram	Zat Aktif
PGA	1,25 gram	1,25 gram	Suspending agent
CMC-Na	1 gram	1 gram	Suspending agent
Gliserin	10 mL	10 ml	Wetting agent
Aqua Destillata	ad 100 ml	ad 100 ml	Cairan pembawa

Pengamatan parameter DM yaitu pemeriksaan kadar gula darah puasa diukur dari sebelum perlakuan hari ke 0, dan 28, sedangkan pengamatan kadar ureum, kreatinin, TG, TC, MDA, SGPT, SGOT dilakukan pada hari ke-28 di LPT UGM. Tikus dipuasakan selama 12 jam sebelum pengambilan darah. Darah diambil dari mata tikus dan ditampung menggunakan *ependorf*. *Disentrifuge* dengan kecepatan 4000 rpm selama 4 menit, diambil serum (bagian atas) untuk ditetapkan kadar.

Pengamatan Gambaran Histopatologi Organ Ginjal, Pankreas, Hati, Otot dan Adiposa. Tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan kethamine HCl yang diberikan secara intramuscular, anestesi terjadi selama 20-40 menit setelah penyuntikan. Kemudian tikus dibedah pada bagian abdomen untuk diambil ginjal, pankreas, hati, otot dan adiposa dan diisolasi, dibersihkan dengan larutan PBS dan direndam di dalam larutan fiksatif Bouin selama 24 jam. Dilanjutkan dengan proses dehidrasi, infiltrasi dan diakhiri dengan penanaman di dalam parafin. Setelah itu, disayat dengan ketebalan 7 µm menggunakan mikrotom. Pita sayatan yang terbentuk disimpan di atas baki preparat, selanjutnya diambil beberapa sayatan untuk ditempel di atas kaca preparat dengan menggunakan *poly-L-lysine* 10%, sayatan diwarnai dengan Hematoksin-Eosin. Kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 400 kali. Diamati perubahan sel-sel hati (degenerasi dan nekrosis) dan pada pankreas jika ditemukan pulau Langerhans dengan jelas, maka sayatan pada daerah tersebut baru bisa dianalisis secara imunohistokimia⁽³⁾

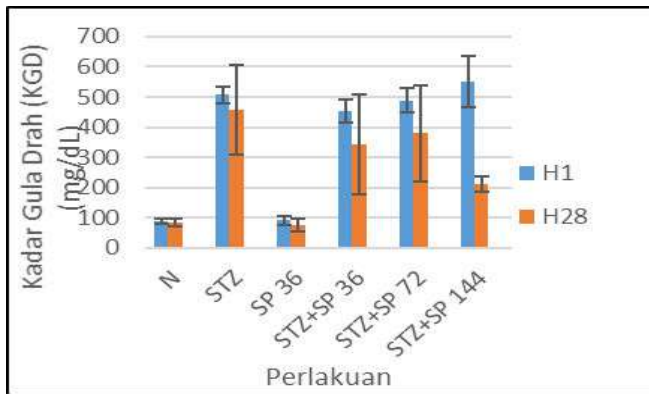
Pengamatan Imunohistokimia.

Imunohistokimia insulin menggunakan antibodi primer *mouse anti-insulin*, dan Imunohistokimia GLUT4 menggunakan *Anti-Glucose Transporter GLUT4 antibody*. Pengamatan ekspresi insulin dan GLUT4 diukur dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x dan dengan menggunakan software ImageJ dengan plug-in IHC-Profler.

Data Analisis. Dari data absorbansi dianalisis secara statistik dengan taraf kepercayaan 95%. Data kadar dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogrov-Smirnov dan uji homogenitas dengan uji Levene. Jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen ($p > 0,05$) maka dilakukan uji One Way ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji LSD untuk membandingkan antar kelompok atau data homogen. Apabila data tersebut tidak memenuhi salah satu persyaratan analisis parametrik maka dapat dilakukan uji statistik non parametric dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan 95% untuk melihat perbedaan antar kelompok perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Gula Darah. Hasil kadar gula darah pada penelitian ini dengan variasi dosis dibuat untuk mengetahui efektivitas dosis *Spirulina platensis* pada tikus diabetes yang diinduksi *Streptozotocin*, hasil pengamatan parameter diabetes di dapat hasil sebagai berikut:



Gambar 1. Grafik Rata-rata KGD

Keterangan : Kelompok Normal (N), Kelompok STZ, Kelompok SP 36 , STZ+SP 36, STZ+SP 72 STZ+SP 144.

Berdasarkan hasil Gambar 1. bahwa nilai kadar gula darah untuk berbagai kelompok dan waktu hari ke-0 dan ke-28 mayoritas mengalami penurunan, pada kelompok dosis STZ+SP 72 mengalami

penurunan paling besar dibandingkan ke dua dosis yang lain. Hasil ini sesuai jurnal yang didapat bahwa *Spirulina platensis* mengandung spektrum alami campuran karoten dan pigmen xantofil, dan fikosianin memiliki aktivitas antioksidan, serta menunjukkan penurunan gula darah⁽⁸⁾.

Kemudian hasil analisis statistika menggunakan SPSS yang bertujuan untuk dapat mengetahui perbedaan yang lebih signifikan antara kelompok normal setelah pemberian *Spirulina platensis* dengan kelompok *streptozotocin* serta kelompok dengan dosis selama 28 hari. Analisis distribusi normal yaitu dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* yang bertujuan untuk menguji sebaran data yang ada terdistribusi normal atau tidak, hasil data kadar gula darah tidak terdistribusi normal ($p > 0,05$). Kemudian dilanjutkan uji *Kruskal-Wallis* ini bertujuan untuk mengetahui perbedaan perlakuan antar kelompok, yang hasilnya dapat dilihat pada tabel test statistic. Hasil uji menunjukkan nilai signifikan yaitu untuk kadar gula darah H-0 dan untuk H-28 hasil $< 0,05$, sehingga memiliki perbedaan yang bermakna pada kadar glukosa darah H-0 dan H-28, kemudian pada kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan bermakna maka dilakukan analisis *Post Hoc. Post Hoc* untuk uji *Kruskal-Wallis* adalah dengan uji *Mann-Whitney*⁽¹¹⁾.

Berdasarkan pada penelitian terjadi peningkatan yang signifikan pada kadar glukosa darah setelah

Tabel 2. Rata-rata kadar analisis ureum, kreatinin, TG, TC, MDA, SGPT, SGOT (n=3).

Kelompok	Ureum (mg/dl ±SD)	Kreatinin (mg/dl±SD)	TG (mg/dl±SD)	TC (mg/dl±SD)	MDA (mmol/L±SD)	SGPT (U/L±SD)	SGOT (U/L±SD)
Normal	49,53 ± 5,14*	0,32±0,05*	81.47±6.30*	50.63±7.51*	2,29±0,52*	46.47 ± 4.90*	106.17 ± 11.66*
STZ	68,97± 1,29	0,47±0,11	136.57±32.99	75.90±23.57	5,05±1,27	222.4±64.43	393.97±55.05
SP 36	38,37± 1,92*	0,42±0,04	67.30±13.09*	57.27±8.95	2,02±0,22*	42.73±9.50*	105.47±6.44*
STZ+SP 36	90,67± 3,31	0,31±0,02*	79.43±30.08*	39.57±10.02*	3,24±0,70*	62.76±37.52*	133.23±59.92*
STZ+SP 72	61,67± 8,33	0,31±0,02*	108.93±32.99	48.37±3.28*	2,63±0,14*	160.37±33.34	280.20±96.77
STZ+SP 144	55,83± 2,04	0,23±0,03*	68.53±17.80*	59.73±12.33	3,82±0,45*	94.43±48.93	235.47±30.91

*Nilai $p < 0,05$ yang berarti berbeda signifikan dibanding kelompok STZ

diinduksi *streptozotocin*. *Streptozotocin* dapat menaikkan kadar glukosa darah dengan mekanisme dengan merusak sel β pankreas. Peningkatan kadar glukosa darah disebabkan senyawa radikal bebas yang merusak sel-sel pada pankreas sehingga tidak dapat berfungsi. Diabetes militus adalah sekumpulan gejala yang ditandai dengan meningkatnya kadar glukosa darah sebagai akibat defisiensi insulin baik relative maupun absolut⁽¹²⁾.

Penurunan yang terdapat pada kadar glukosa darah pada penelitian ini menggunakan *Spirulina platensis*, *Spirulina platensis* mampu menurunkan kadar glukosa darah, karena mengandung spektrum alami dari campuran karoten, xantofil, dan fikosianin yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan⁽⁹⁾, penelitian di atas menunjukkan penurunan kadar glukosa darah sebelum dan setelah pemberian *Spirulina platensis* mengalami penurunan terutama pada kelompok STZ+SP 144 mengalami penurunan paling besar dibanding perlakuan yang lain. Kandungan antioksidan dalam *Spirulina platensis* dapat menurunkan kadar glukosa darah dengan mekanisme menghambat reaksi oksidasi dan dapat menetralkan atau menangkap radikal bebas⁽¹³⁾.

Analisis Kadar. Hasil pada penelitian ini dengan variasi dosis dibuat untuk mengetahui efektivitas dosis *Spirulina platensis* pada tikus diabetes yang diinduksi Streptozotocin, hasil pengamatan parameter diabetes di dapat hasil seperti pada Tabel 2. Nilai SGOT tikus normal adalah 20 – 100 IU/L. Namun pada penelitian ini ketiga kelompok perlakuan tikus Wistar diabetes masih memiliki nilai aktivitas SGOT diatas normal. Enzim SGOT tidak hanya terdapat pada hati melainkan juga dihasilkan dalam otot dan jantung. Sehingga berkemungkinan tingginya aktivitas SGOT karena juga diproduksi enzim SGOT di organ selain hati yang menyebabkan nilai SGOT meningkat melebihi normal.

Nilai SGPT tikus normal adalah 5–224 IU/l. Enzim SGPT lebih spesifik dalam menentukan kerusakan pada hati karena paling banyak berada pada organ hati dibandingkan organ tubuh lainnya 28. Terjadinya penurunan aktivitas enzim SGPT merupakan salah satu indikasi kesembuhan sel-sel hati yang mengalami kerusakan atau terjadinya perlindungan hati dari kerusakan yang diakibatkan oleh *streptozotocin* setelah pemberian *Spirulina platensis*.

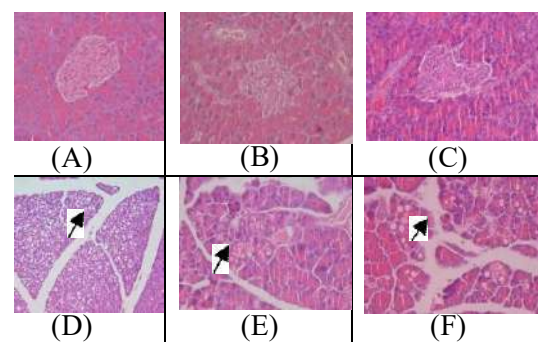
Kadar ureum dan kreatinin pada kelompok perlakuan STZ+SP 144 dapat menurunkan kadar kreatinin secara signifikan ($p < 0,05$) di bandingkan kelompok perlakuan STZ+SP 36 dan streptozotocin + spirulina 0,36. Kadar ureum pada kelompok

perlakuan STZ+SP 144 dapat menurunkan kadar ureum secara signifikan dibandingkan dua kelompok yang lain.

Pemberian *streptozotocin* dapat meningkatkan kadar kolesterol total dan trigliserida serum yang signifikan ($p < 0,05$). Pemberian suspensi *Spirulina platensis* dapat menurunkan kadar kolesterol total dan trigliserida serum pada semua varian dosis. Penurunan kadar kolesterol dan trigliserida serum yang signifikan terdapat pada kelompok STZ + SP 36 ($p < 0,050$).

Hasil data analisis kadar pada Tabel 2. kelompok dosis STZ + SP 36 dapat memperbaiki kadar analisis. Pada Diabetes Melitus Terjadinya hiperglikemia menyebabkan peningkatan produksi radikal bebas ataupun *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang tidak stabil dan sangat reaktif⁽⁷⁾. Serta peningkatan produksi ROS yang melebihi kapasitas pertahanan enzim antioksidan sel menyebabkan terjadinya stres oksidatif⁽¹⁴⁾, sehingga pada *Spirulina plantesis* terdapat Fikosianin dan fikosianobilin menghambat nefropati diabetes terhadap stress oksidatif²⁴. Kelompok STZ menunjukkan ketidaknormalan pada tiap analisis, sehingga bahwa induksi streptozotocin dengan dosis 45 mg/kgBB mampu merusak ginjal sehingga terjadi penurunan fungsi ginjal yang ditandai dengan penurunan kadar ureum dan peningkatan kadar kreatinin dalam serum. Pada serum MDA disebabkan terjadi peningkatan ROS dalam sirkulasi.

Penurunan kadar disebabkan karena adanya peran aktif *Spirulina platensis* sebagai antioksidan dalam mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada membran sel. Diketahui *Spirulina platensis* mengandung beberapa senyawa aktif, yaitu fikosianin, beta karoten serta vitamin yang berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Kandungan fikosianin dan beta karoten pada *Spirulina platensis* berperan sebagai antioksidan yang kuat dalam menghambat lipid peroksidasi⁽¹⁵⁾.



Gambar 2. Histopatologi pankreas dengan pewarnaan hematoksilin eosin (perbesaran 400x)

Keterangan : (A) = kelompok Normal, (B) = kelompok STZ, (C) = kelompok SP 36, (D) = kelompok STZ+SP 36, (E) = kelompok STZ+SP 72, (F) = kelompok STZ+SP 144.

Histopatologi pada Pankreas. Tujuan dari pengamatan histopatologi pankreas adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Spirulina platensis* terhadap pemulihan fungsi ginjal dan hati akibat induksi *Streptozotocin* (STZ).

Hasil histopatologi pankreas normal menunjukkan bahwa tidak adanya terjadi perubahan patologi pankreas dapat dilihat pada Gambar 2. (A). Sedangkan pada Gambar 2. (B) terjadinya nekrosis pada tikus kelompok STZ. Terjadinya nekrosis pada pulau langerhans ditandai dengan adanya ruang-ruang kosong yang ada dibagian tengah pulau langerhans. Ruang-ruang kosong tersebut disebabkan karena adanya nekrosis sel beta. Penurunan jumlah sel beta pankreas menunjukkan adanya gangguan metabolisme insulin pada pankreas yang menyebabkan menurunnya sel beta dalam pulau *Langerhans*⁽¹⁶⁾.

Hal ini membuktikan bahwa pemberian STZ dapat mengganggu sekresi insulin. Pemberian STZ menyebabkan adanya radikal bebas yang mampu meningkatkan oksigen reaktif yang mempunyai peran penting terhadap kerusakan sel β pankreas⁽¹⁷⁾. Kerusakan sel β pankreas yang diakibatkan oleh gangguan sekresi hormon insulin menyebabkan penurunan produksi insulin yang akan mengakibatkan gangguan metabolisme lemak yang mengakibatkan terjadinya peningkatan trigliserida (TG) serta kolesterol. Sehingga pada perlakuan *Spirulina platensis* mampu memberikan perbaikan pada jaringan yang telah diinduksi streptozotocin. Hasil penelitian Surbakti (2013) mengatakan bahwa *Spirulina platensis* mengandung senyawa antioksidan. Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas.

Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan terhadap sayatan jaringan pankreas diwarnai dengan imunohistokimia, setelah itu dilakukan penghitungan ekspresi sel-sel β pankreas yang imunoreaktif terhadap insulin. Hasil analisis *Mann-whitney* menunjukkan bahwa ekspresi sel β pankreas antara kelompok STZ dengan kelompok normal, spirulina, sedang dan tinggi memiliki perbedaan yang bermakna ($p \leq 0,05$). Uji statistik ANOVA menunjukkan data ekspresi insulin terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$ namun tidak homogen dengan nilai $p > 0,05$, maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann-Whitney*.

Hasil statistik menunjukkan bahwa kelompok STZ dengan kelompok normal memiliki perbedaan yang signifikan $p < 0,05$. Hal ini membuktikan bahwa *Streptozotocin* memberikan efek diabetes terhadap tikus. *Streptozotocin* bekerja dengan cara mempengaruhi terhadap sensitifitas reseptor terhadap insulin atau mempengaruhi terhadap

sekresi insulin sehingga menyebabkan ketidak optimalan insulin dalam pengangkutan kadar glukosa darah.

Tabel 3. Rata-rata % ekspresi insulin.

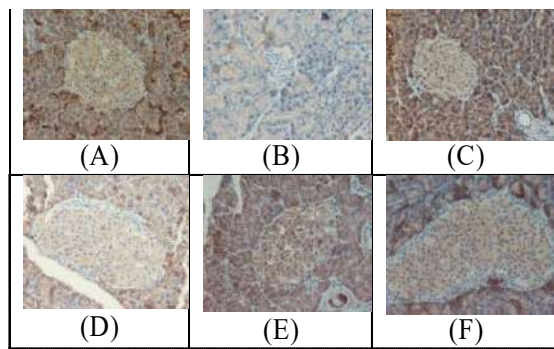
Kelompok	% Ekspresi Insulin Mean \pm SD (RIBU)
Normal	187,45 \pm 1,39*
STZ	0,35 \pm 0,38
SP 36	14,80 \pm 1,53*
STZ+SP 36	1,03 \pm 0,89
STZ+SP 72	22,55 \pm 1,16*
STZ+SP 144	13,68 \pm 7,60*

*Nilai $p < 0,05$ yang berarti berbeda signifikan dibanding kelompok STZ.

Hasil statistik menunjukkan bahwa kelompok STZ dengan kelompok normal memiliki perbedaan yang signifikan $p < 0,05$. Hal ini membuktikan bahwa *Streptozotocin* memberikan efek diabetes terhadap tikus. *Streptozotocin* bekerja dengan cara mempengaruhi terhadap sensitifitas reseptor terhadap insulin atau mempengaruhi terhadap sekresi insulin sehingga menyebabkan ketidak optimalan insulin dalam pengangkutan kadar glukosa darah.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kelompok STZ dengan kelompok spirulina memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa spirulina tidak mempengaruhi ekspresi insulin pada tikus normal. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kelompok STZ dengan kelompok rendah tidak memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian spirulina dosis low pada tikus diabetes belum mempengaruhi ekspresi insulin di pankreas.

Hasil uji statistik menunjukkan bahwa kelompok STZ dengan kelompok dosis STZ+SP 72 dan STZ+SP 144 memiliki perbedaan yang signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa spirulina mempengaruhi ekspresi insulin. Spirulina memberikan hasil penurunan kadar glukosa darah. Penurunan kadar glukosa darah terjadi dengan adanya perbaikan sel β pankreas⁽⁸⁾, sehingga meningkatkan jumlah sel β pankreas. *Spirulina platensis* mengandung antioksidan dan antiinflamasi yang kuat yaitu bahan aktif fikosianin dan β karoten6. Fikosianin memiliki kemampuan untuk mengikat radikal bebas termasuk radikal alkoxyl, hidroksil dan peroksil. Sehingga mengurangi produksi nitrit, menekan *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) dan menghambat lipid peroksida⁽²⁾.



Gambar 3. Mikrofotografi Ekspresi Insulin dengan pewarnaan imunohistokimia (perbesaran 400x),

Keterangan : (A) = kelompok Normal, (B) = kelompok STZ, (C) = kelompok SP 36, (D) = kelompok STZ+SP 36, (E) = kelompok STZ+SP 72, (F) = kelompok STZ+SP 144.

Berdasarkan pengamatan preparat pada Gambar 3. menggunakan pewarnaan imunohistokimia yang menunjukkan bahwa kelompok STZ (Gambar 3 (B)) terdeteksi sel β pankreas sedikit. Kim *et al.* (2007) mengatakan bahwa sel lain yang berwarna biru didapatkan dari *Counterstain* menggunakan pewarnaan hematosilin yang mewarnai sel-sel pankreas selain dari sel β pankreas yang berwarna coklat yang terwarnai dengan imunohistokimia. Hal ini juga menunjukkan bahwa sel β pada pankreas mengalami kerusakan akibat induksi STZ. Berkurangnya sintesis insulin ditandai dengan penurunan ekspresi insulin dari sel β *Langerhans* pankreas yang imunoreaktif terhadap antibodi insulin (pewarnaan imunohistokimia) hanya bereaksi dengan sel-sel yang menghasilkan insulin.

Histopatologi pada Otot dan Adiposa. Hasil pada histopatologi dapat dilihat pada Table 4. Tujuan dari pengamatan histopatologi otot dan adiposa adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Spirulina platensis* terhadap pemulihan fungsi otot dan adiposa akibat induksi *Streptozotocin* (STZ).

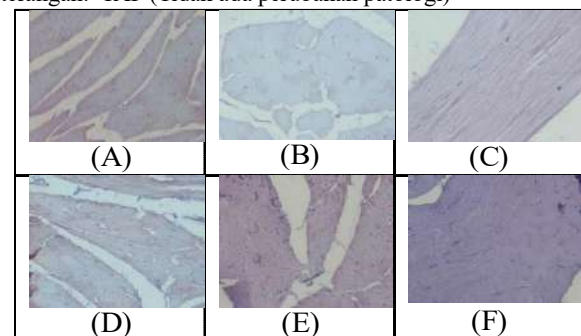
Kemudian dilanjutkan dengan pengamatan Imunohistokimia setelah dilakukan penghitungan ekspresi sel-sel otot yang imunoreaktif terhadap *glucose transporter 4* pada jaringan otot, maka kita dapat melihat perbedaannya, berikut analisis ekspresi GLUT 4 pada jaringan otot pada tikus setelah diberikan *Spirulina plantensis*.

Menunjukkan tidak adanya perubahan patologi pada gambaran histopatologi pada pewarnaan hematosilin eosin. Pada penelitian Khotib (2010) hasil histopatologi pada minggu ke-4 tidak adanya nekrosis pada jaringan otot dan adiposa. Gambaran normal ekspresi GLUT 4 pada Gambar 4 (A),

Tabel 4. Hasil Pengamatan Histopatologi HE pada Otot dan Adiposa.

Kode	Preparat Histopatologi		Skorin g	Rasio Nekrosis
	Otot	Adiposa		
Kelompok Normal	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
Kelompok STZ	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
Kelompok SP 36	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
Kelompok STZ + SP 36	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
Kelompok STZ + SP 72	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
Kelompok STZ + SP 144	TAP	TAP	0	0/4 = 0%
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	
	TAP	TAP	0	

Keterangan: TAP (Tidak ada perubahan patologi)



Gambar 4. Microfotografi Ekspresi GLUT 4 Otot dengan pewarnaan imunohistokimia (perbesaran 400x),

Keterangan : (A) = kelompok N, (B) = kelompok STZ, (C) = kelompok SP 36, (D) = kelompok STZ+SP 36, (E) = kelompok STZ+SP 72, (F) = kelompok STZ+SP 144.

sedangkan pada kelompok STZ gambar 4 (B) tidak terdapat ekspresi GLUT 4 dikarenakan terdapat banyak glukosa. *Streptozotocin* memiliki mekanisme dapat menyebabkan kerusakan DNA dan kromosom akibat dari radikal bebas selama metabolisme *streptozotocin*⁽²⁾.

Tabel 5. Rata-rata % ekspresi GLUT 4 pada jaringan otot.

Kelompok	% Ekspresi Insulin Mean \pm SD (RIBU)
Normal	51,15 \pm 8,54*
STZ	0,37 \pm 0,14
SP 36	13,13 \pm 19,53 *
STZ+SP 36 mg/kgBB	18,72 \pm 29,54 *
STZ+SP 72 mg/kgBB	36,69 \pm 46,30 *
STZ+SP 144 mg/kgBB	13,68 \pm 7,60 *

*Nilai $p < 0.05$ yang berarti berbeda signifikan dibanding kelompok STZ.

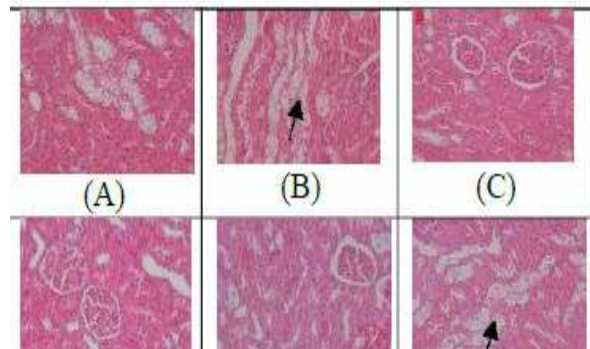
Hasil Uji statistik menunjukkan data jumlah ekspresi GLUT 4 tidak terdistribusi normal ($p > 0,05$) dan juga data tidak homogen ($p < 0,05$) sehingga dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis* dan *Mann-Withney*. Hasil uji *Kruskal Wallis* antara semua kelompok memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) kemudian dilakukan uji *Mann Withney* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara kelompok 1 dan lainnya. Perbandingan kelompok normal, kelompok SP 36 dengan kelompok STZ perbedaan yang signifikan dengan kontrol negatif ($p < 0,05$), data menunjukkan bahwa ekspresi GLUT 4 pada kelompok normal dan kelompok SP 36 adalah yang paling besar. Hasil uji statistik kelompok STZ dengan kelompok SP menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan. Hasil ekspresi GLUT-4 yang semakin banyak dapat dikatakan bahwa penggunaan glukosa oleh jaringan semakin baik, sehingga jumlah glukosa dalam darah menjadi berkurang karena diangkut ke jaringan. Di dalam jaringan glukosa akan diubah menjadi ATP (energi) yang bermanfaat bagi tubuh.

Kadar glukosa darah turun akibat dari insulin dengan meningkatkan glukosa ke dalam jaringan adiposa dan otot dengan membawa pengangkutan glukosa, ikatan insulin dan reseptornya membutuhkan GLUT-4 masuk ke dalam sel otot dan jaringan adiposa serta uptake glukosa sehingga dapat menurunkan kadar glukosa darah. Kondisi hiperglikemia pada penderita diabetes melitus menyebabkan terjadi *reactive oxygen species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) meningkat sehingga oksidasi NADPH pada jaringan endotel. *Reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) merupakan molekul yang sangat reaktif yang dapat mengoksidasi dan merusak DNA, protein, dan lipid yang menyebabkan stres oksidatif. Sebab terjadinya stres oksidatif akibat dari ketidakseimbangan antara jumlah molekul yang sangat reaktif (ROS dan RNS) dengan antioksidan yang ada.

Histopatologi Ginjal dan Hati. Tujuan dari

pengamatan histopatologi ginjal dan hati adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian *Spirulina platensis* terhadap pemulihan fungsi ginjal dan hati akibat induksi *Streptozotocin* (STZ).

Secara makroskopis jaringan yang mengalami nekrosis terlihat lebih pucat dan transparan bila dibandingkan dengan jaringan normal disekitarnya. Secara mikroskopik nukleus akan mengalami piknosis yaitu nukleus terlihat lebih bundar, ukuran lebih kecil dan tercat lebih gelap⁽¹⁸⁾.



Gambar 5. Histopatologi Ginjal dengan pewarnaan Hematoksin Eosin (HE) (perbesaran 400x),

Keterangan: Hasil histopatologi ginjal yang mengalami nekrosis dengan pewarnaan hematoksin eosin (perbesaran 400x), Keterangan : (A) = kelompok Normal, (B) = kelompok STZ, (C) = kelompok SP 36, (D) = kelompok STZ + SP 36, (E) = kelompok STZ + SP 72, (F) = kelompok STZ + SP 144; Hasil → menunjukkan nekrosis pada ginjal.

Hasil gambaran pengamatan histopatologi ginjal kelompok STZ nilainya menunjukkan bahwa pemberian streptozotocin menimbulkan kerusakan nekrosis pada. Sehingga menunjukkan bahwa perlakuan pada hewan uji mengalami diabetes dengan adanya nekrosis yang terjadi di kelompok STZ.

Hasil histopatologi hati pada kelompok spirulina mayoritasnya tidak mengalami perubahan patologi pada hati dapat dilihat pada Gambar 6. Hati yang normal jika diamati secara mikroskopik akan terlihat seperti Gambar 6 (A). Berdasarkan hasil analisis histopatologi hati pada kelompok normal tidak adanya nekrosis dan terlihat inti sel padat serta tidak terdapat sel-sel yang mengalami degenerasi, sehingga mengidentifikasi bahwa tidak terjadi kerusakan pada hati tikus normal. Hasil histopatologi hati pada kelompok STZ mengalami kerusakan pada sel hati dapat dilihat pada Gambar 6 (B), ditandai dengan terjadinya multifokal radang dan degenerasi hidropik pada hati.

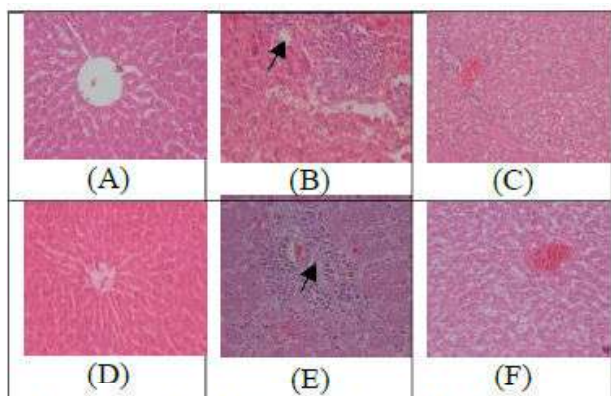
Multifokal radang ditandai dengan adanya infiltrasi limfosit di dalam parenkim hepar, sedangkan degenerasi hidropik ditandai dengan adanya vakuola terbatas tidak jelas di dalam sitoplasma hepatosit dan sel tampak hipertrofi.

Hal ini menunjukkan bahwa penginduksian *streptozotocin* pada tikus merusak organ hati. Hasil histopatologi hati kelompok STZ+SP 72 menunjukkan bahwa pada hati tikus terdapat infiltrasi sejumlah sedikit sel radang limfosit dan sel plasma terlihat pada multifokal area parenkim dapat di lihat pada Gambar 6 (E). Hasil tersebut menunjukkan bahwa hati tikus kelompok medium hanya menimbulkan sedikit peradangan ringan. Hasil histopatologi kelompok high menunjukkan bahwa pada hati tikus tidak terjadi perubahan patologi hati tikus dapat dilihat pada Gambar 6 (F).

Terjadinya nekrosis pada organ ginjal dan hati dapat ditekan kerusakannya oleh pemberian *Spirulina plantesis* yang ditunjukkan dari perbedaan nekrosis, walaupun dari kedua dosis lainnya juga mengalami nekrosis sel tetapi tidak sebanyak pada kelompok STZ+SP dan juga tidak sebanyak pada kelompok STZ yang mengalami keseluruhan nekrosis. *Spirulina platensis* mengandung antioksidan dan antiinflamasi yang kuat yaitu bahan aktif fikosianin dan β karoten⁽⁶⁾.

SIMPULAN

Hasil dari analisis *Spirulina plantesis* mampu mengurangi kadar gula darah, mengurangi kerusakan sel pada pankreas, hati, ginjal serta mampu meningkatkan insulin dan GLUT-4. *Spirulina plantesis* juga mampu menurunkan kadar kolesterol, TG, ureum, kreatinin, MDA dan mengurangi aktivitas SGPT, SGOT.



Gambar 6. Histopatologi hati dengan pewarnaan hematoksin Eosin (HE) (perbesaran 400x),

Keterangan : Keterangan : (A) = kelompok Normal, (B) = kelompok STZ, (C) = kelompok SP 36, (D) = kelompok STZ+SP 36, (E) = kelompok STZ+SP 72, (F) = kelompok STZ+SP 144.

DAFTAR PUSTAKA

1. Setiabudi, 2008. Referensi Kesehatan Diabetes Mellitus. Diakses : 21 Desember 2017. <http://creasoft.wordpress.com/2008/04/15/diabetesmellitus/>.
2. Deng R, Chow TJ. Review: hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae spirulina. *Cardiovascular Therapeutics*. 2010. (28): e33-e45.
3. Hanum, N.N. Hubungan kadar glukosa darah sewaktu dengan profil lipid pada pasien diabetes mellitus Tipe II di Rumah Sakit Umum Daerah kota Cilegon periode januari-april 2013. Skripsi. FK dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta. 2013.
4. Widyaningsih, W. Salamah, N. Efek ekstrak etanol ganggang hijau (*ulva lactuca* i) terhadap berat badan dan kadar trigliserida tikus jantan yang diberi diet lemak tinggi. *Pharmaciana*. 2015. 5(2).
5. Stumvoll, M., Goldstein, B.J., Haeften, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy, *Lancet* 365. 2005. 46-1333.
6. Abed SA, El-Shazely MO, Ahmed KA, Abdel mawla EM, Obrahim AK. Therapeutic effect of *Spirulina plantesis* on streptozotocin-induced. Diabetic rats, Egypt. *J. Comp. Path & Clinic Path*. 2015.28(1):18-31.
7. Soviana, E., R., Banundari, S.W. Nyoman. Pengaruh suplementasi β -caroten terhadap kadar glukosa darah dan kadar malondialdehida pada tikus sprague dawley yang diinduksi streptozotocin. *Jurnal Gizi Indonesia*.2014.2(2):41-6.
8. Ridwan A, Astrian RT, Barlian A. Pengukuran efek antidiabetes polifenol (*polyphenon 60*) berdasarkan kadar glukosa darah dan histologi pankreas mencit (*Mus musculus* L) SW. jantan yang dikondisikan diabetes melitus. *Jurnal Matematika &Sains*. 2012.17(2):78-82.
9. Farouk K. El-Bazl, Hanan F. Aly , El-Sayed, and Amal A. Mohamed. Role of spirulina platensis in the control of glycemia in DM2 rats. 2013.
10. Amanatin, D, Riesya. Pengaruh Kombinasi Konsentrasi Media Ekstrak Tauge (MET) dengan Pupuk Urea terhadap Kadar Protein Spirulina sp. *Sains dan Seni Pomits*. 2013. 2(2) : 2337-3520
11. Laymena, E. H., Pendidikan, P., Kedokteran, S., Kedokteran, F., & Diponegoro, U. Pengaruh formalin peroral dosis bertingkat histopatologis otak tikus wistar. Universitas Diponegoro. Semarang. 2012
12. Suiradka, I.P. Penyakit Penyakit degeneratif: mengenal, mencegah dan mengurangi faktor risiko 9 penyakit degeneratif. Nuha Medika Yogyakarta. 2012. 25-53
13. Murray, K.R., 1995, Biokimia Harper, Eduisi 22, Penerjemah: A. Hartono, Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
14. Palmiera, C. M., D. L., Santos, R., Seica, A. J., Moreno, M. S., Santos. Enhanced mitochondrial testicular antioxidant capacity in goto-kakizaki diabetic rats: role of coenzyme q, *Am J Physiol Cell Physiol* 281. 2001. 1023-8.

15. Sakti, M., Darmono, S.S., Nyoman S.W. Pengaruh suplementasi spirulina terhadap beberapa parameter sindrom metabolik (studi di puskesmas lebdosari kota semarang), *Jurnal Gizi Indonesia*. 2015. 3(2): 94-100.
16. M.P. Okky dan B.W. Simon. Uji efek ekstrak air daun pandan wangi terhadap penurunan kadar glukosa darah dan histopatologi tikus diabetes mellitus. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2014. 2(2) p.16-27.
- 17 Nugroho, A. E. Animals models of diabetes melitus: pathology and mechanism of some diabetogenics, *Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi, Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta*. 2006.
18. Sudiono, J., Kurniadhi, Hendrawan, A., Djimantoro, B. *Penuntun praktikum patologi anatomi*, Buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2001.