



JURNAL

Kefarmasian Indonesia

The Indonesian Pharmaceutical Journal

Efek Sinergis Kombinasi Ekstrak Etanolik Kayu Secang dan Rimpang Lempuyang pada Sel Kanker Payudara MCF-7
(Sari Haryanti, Ika Yanti M. Sholikhah, Yuli Widiyastuti)

Uji Aktivitas Antiseptik Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn.) dalam Obat Kumur terhadap *Staphylococcus aureus* secara in Vitro
(Almasyhuri, Dian Sundari)

*The Effect of Infusion of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Leaves as Natural Preservative toward the Inhibition of Bacterial Growth on Fresh Chicken Meats*
(Dwi Hartanti, Asmiyenti Djaliasrin Djilil, Nur Yulianingsih, Alwani Hamad)

Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase
(Tri Ratna Sulistiyani, Dinihari Indah Kusumawati)

Studi *in Silico* Lima Senyawa Aktif sebagai Penghambat Protein Virus Dengue
(Reni Herman)

Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
(Elda Nurnasari, Kristiana Sri Wijayanti)

Uji Sensitisasi Dermal Masker Gel Kombinasi Ekstrak Ampas Daun Teh dan Air Cucian Beras
(Andi Nurul Annisa, Wahyu Utaminigrum, Erza Genatrika)

Kajian Sistematis: Efek Gen *Multi Drug Resistance-1* pada Farmakokinetik Klopidoogrel
(Rasmaya Niruri, Rini Noviyani, Indah Mei Rahajeng)

Terakreditasi Ristekdikti SK Nomor 21/E/KPT/2018

Terakreditasi LIPI Nomor 783/AU1/P2MI-LIPI/11/2017

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan

Kementerian Kesehatan RI

Jl . Percetakan Negara No. 23 – JAKARTA 10560

Jurnal Kefarmasian Indonesia

The Indonesian Pharmaceutical Journal

Terakreditasi Ristekdikti SK Nomor 21/E/KPT/2018
Terakreditasi LIPI Nomor 783/AU1/P2MI-LIPI/11/2017

S u s u n a n D e w a n R e d a k s i

- Ketua Dewan Redaksi** : Dra. Ani Isnawati, M.Kes., Apt. (Ilmu Kefarmasian dan Epidemiologi Klinik)
- Anggota Dewan Redaksi** : 1. Maratu Soleha, M.Biotech., Apt. (Bioteknologi Farmasi)
2. Nanang Yunarto, M.Si., Apt. (Teknologi Farmasi, Fitokimia, Obat Tradisional)
3. Novi Sulistyaningrum, M.Si. (Kimia Bahan Alam)
4. Rosa Adelina, M.Sc., Apt. (Ilmu Kefarmasian dan Farmakologi)
5. Arifayu Addiena Kurniatri, S.Si. (Kimia Analisis dan Obat Tradisional)
6. Indah Sulistyowati, S.Si. (Kimia Analisis)
7. Intan Sari Oktoberia, S.Si. (Kimia Analisis)
8. Nurul Aini, S.Farm., Apt. (Kimia Farmasi dan Analisis)
9. Dra. Sukmayati Alegantina (Kimia Analisis dan Obat Tradisional)
- Ketua Redaksi Pelaksana** : 1. Irwan Fazar Wibowo, S.Kom., M.A.P.
- Anggota Redaksi Pelaksana** 1. Marta Hadisyah Putra, S.Kom.
2. Uud Nourma Reswandaru, S.Si
- Mitra Bestari** : 1. Prof. Dr. Abdul Rahman, M.Si., Apt. (Kimia Farmasi dan Analisis Produk Halal)
2. Prof. Dr. Berna Elya, M.Si., Apt. (Farmakognosi, Fitokimia dan Obat Bahan Alam)
3. Dr.rer.nat. Adam Hermawan, M.Sc., Apt. (Kimia Farmasi, Bioteknologi dan *Drug Discovery*)
4. Arthur Ario Lelono, M.Sc., Ph.D (Kimia Analisis dan Kimia Bahan Alam)
5. Didik Setiawan, M.Sc., Ph.D, Apt. (Asuhan Kefarmasian dan Farmakoeonomi)
6. Dr. Heni Rachmawati, Apt. (Farmasetika, Formulasi Nanoteknologi, *Drug Delivery Targeting*)
7. Dr.rer.nat Nanang Fakhruddin, M.Sc., Apt. (Farmakognosi, Fitokimia, dan Obat Bahan Alam)
8. Dr. Rizna Triana Dewi, M.Si (Kimia dan Farmakologi)
9. Dr. Yulvian Sani, M.Sc. (Toksikologi, Farmakologi, dan Obat Tradisional)
10. Dra. Lucie Widowati, M.Si., Apt. (Tanaman Obat dan Obat Tradisional)
11. Drs. Max Joseph Herman, M.Kes., Apt. (Asuhan Kefarmasian dan Manajemen Farmasi)
12. Drs. Ondri Dwi Sampurno, M.Si., Apt (Teknologi Farmasi dan Epidemiologi Klinik)
13. Dra. Retno Gitawati, M.S., Apt. (Farmakologi dan Farmasi Klinik)
14. Dra. Rini Sasanti Handayani, M.Kes., Apt. (Asuhan Kefarmasian dan Manajemen Farmasi)
15. drh. Rita Marleta Dewi, M.Kes. (Farmakologi dan Toksikologi)

Jurnal Kefarmasian Indonesia terbit 2 kali dalam 1 tahun, pada bulan Februari dan Agustus merupakan media informasi hasil penelitian dan pengembangan bidang Kefarmasian untuk pengelola program kesehatan dan masyarakat, serta merupakan sarana komunikasi para peneliti/pengelola/peminat bidang kefarmasian

Alamat Redaksi

Pusat Penelitian dan Pengembangan
Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan RI
Jl. Percetakan Negara No. 23
Jakarta 10560
Telepon 021-42881762 ext 118
Website: <http://ejournal2.litbang.kemkes.go.id/index.php/jki>
email : jurnalkefarmasian@gmail.com

Pengantar Redaksi

Berjumpa kembali dengan Jurnal Kefarmasian Indonesia. Pada edisi Volume 9 Nomor 2 ini, JKI menyajikan delapan artikel pilihan yang sebagian besar bertemakan obat bahan alam.

Artikel pertama ditulis oleh Sari Haryanti, dkk. Artikel ini membahas efek ekstrak kayu secang dan rimpang lempuyang pada sel kanker payudara. Kedua bahan alam ini diketahui mengandung senyawa-senyawa yang menunjukkan aktivitas sitotoksik. Artikel selanjutnya menyajikan hasil penelitian terhadap bahan alam yang sangat populer untuk digunakan sebagai obat tradisional di Indonesia, yakni daun sirih. Kali ini, Almasyhuri dkk melakukan pengujian aktivitas antiseptik ekstrak etanol daun sirih terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Dalam artikel ke-3, Dwi Hartanti, dkk menuliskan hasil penelitian mengenai efek infusa daun salam sebagai pengawet alami daging ayam. Penelitian ini didasarkan pada aktivitas antimikroba yang diketahui ada pada daun salam hingga muncul potensi untuk mengembangkan bahan ini sebagai pengawet alami.

Bahasan mengenai keragaman bakteri endofit penghasil L-asparaginase bebas L-glutamase disajikan oleh Tri Ratna Sulistiani, dkk dalam artikel keempat yang dimuat pada edisi kali ini. Penelitian yang dilakukan oleh penulis bertujuan untuk mengoleksi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman obat tropis serta melakukan penapisan potensi penghasil enzim L-asparaginase. L-asparaginase sendiri merupakan enzim pertama dengan aktivitas antileukimia yang sedang intensif dipelajari.

Artikel selanjutnya yang ditulis oleh Reni Herman membahas mengenai studi *in silico* lima senyawa aktif sebagai penghambat virus dengue. Semua senyawa aktif yang diuji berasal dari bahan alam, yakni artemisinin, katekin, mangiferin, epigallo katekin galat, dan kuersetin yang sebelumnya telah diketahui memiliki potensi sebagai antivirus. Artikel keenam dalam edisi ini menyajikan bahasan menarik mengenai penggunaan daun tembakau selain sebagai rokok. Elda Nurnasari, dkk meneliti mengenai aktivitas antibakteri minyak atsiri daun tembakau terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Topik pemanfaatan bahan alam terakhir dalam edisi ini ditulis oleh Andi Nurul Annisa, dkk. Dalam artikel ini, penulis membahas mengenai uji sensitivasi dermal masker gel kombinasi ekstrak ampas daun teh dan air cucian beras.

Artikel terakhir memiliki topik berbeda dari artikel lainnya di edisi ini. Rasmaya Niruri, dkk, yang merupakan salah satu peserta terpilih dari acara International Conference on Pharmaceutical Research and Practice yang diselenggarakan oleh UII tahun 2018, menyajikan kajian sistemik tentang efek gen *multi drug resistance-1* pada farmakokinetik klopidogrel.

Terbitnya JKI Volume 9 Nomor 1 ini tak lepas dari kerja keras banyak pihak. Untuk itu, redaksi mengucapkan banyak terima kasih atas bantuan dan kerja sama yang baik dari seluruh tim editor, mitra bebestari, dan sekretariat. Kami berharap edisi ini dapat menambah pengetahuan dan bermanfaat bagi pembaca. Salam sehat Indonesia.

Redaksi



NLM : QV 766

Sari Haryanti, Ika Yanti M. Sholikhah, Yuli Widiyastuti
(Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu)

Efek Sinergis Kombinasi Ekstrak Etanolik Kayu Secang dan Rimpang Lempuyang pada Sel Kanker Payudara MCF-7

Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):1-9

Abstrak

Kanker merupakan salah satu penyakit kritis, kronis, kompleks, dan menjadi penyebab kematian yang cukup tinggi di dunia. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) mengandung senyawa brazilin dan brazilein, sedangkan rimpang lempuyang (*Zingiber zerumbet* L.) mengandung zerumbon. Senyawa tersebut menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan mekanisme yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek kombinasi kayu secang dan rimpang lempuyang. Kayu secang dan rimpang lempuyang dimaserasi dengan etanol 96% 3x24 jam, disaring, dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering. Uji sitotoksik pada sel MCF-7 dilakukan dengan MTT assay. Nilai index kombinasi (CI) dianalisis dengan CompuSyn berdasarkan hasil sitotoksik kombinasi. Profil siklus sel dan induksi apoptosis dikaji dengan *flow cytometry*. Ekstrak secang dan rimpang lempuyang menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC₅₀ berturut-turut 30 dan 155 µg/mL. Kombinasi ekstrak secang 15 µg/mL dan lempuyang 8, 12, 24, dan 60 µg/mL menghasilkan efek sinergis dengan nilai CI 0,57-0,85. Kombinasi secang 15 µg/mL dengan lempuyang 8 dan 24 µg/mL menunjukkan penghambatan siklus sel di fase G2/M. Kombinasi keduanya juga meningkatkan terjadinya induksi apoptosis dibandingkan kontrol dan perlakuan tunggalnya. Kombinasi ekstrak etanolik kayu secang dan rimpang lempuyang menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis. Sinergisme kombinasi terjadi melalui penghambatan siklus sel di fase G2/M dan induksi apoptosis.

Kata kunci: *Caesalpinia sappan*; *Zingiber zerumbet*; Indeks kombinasi

NLM : QV 766

Almasyhuri, Dian Sundari
(Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan)

Uji Aktivitas Antiseptik Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn.) dalam Obat Kumur terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in Vitro*

Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):10-18

Abstrak

Daun sirih (*Piper betle* Linn.) sangat populer dalam kehidupan masyarakat di Indonesia. Daun sirih berguna untuk kesehatan gigi dan sering digunakan sebagai obat kumur; menghilangkan bau badan dan mulut; mengobati sariawan, mimisan, gatal-gatal, koreng dan keputihan pada wanita. Rongga mulut merupakan tempat berkumpulnya bakteri. Bila terjadi penurunan imunitas bakteri yang semula bersifat komensal dapat berubah menjadi patogen sehingga dapat menimbulkan infeksi. Bakteri yang biasa terdapat dalam rongga mulut salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menempati dan membentuk biofilm pada biomaterial yang menyebabkan resistensi terhadap antimikroba, dengan demikian membuat mereka sulit untuk memberantas host yang terinfeksi *S. Aureus*. Berbagai penelitian terdahulu melaporkan adanya *multidrug* resisten dari golongan *S.aureus* yang dapat menimbulkan kematian, sehingga untuk mengatasi bakteri tersebut dilakukan penelitian aktivitas antiseptik ekstrak etanol daun sirih terhadap *S.aureus* secara *in vitro*. Pengujian dilakukan dengan metode koefisien fenol menggunakan bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Sebagai pembanding adalah obat kumur dengan povidon iodine yang beredar dipasaran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa obat kumur yang mengandung ekstrak etanoldaan sirih memiliki nilai koefisien fenol 1,87 sedangkan obat kumur dengan povidon iodine mempunyai nilai koefisien fenol 1,0. Terlihat bahwa obat kumur yang mengandung ekstrak etanol daun sirih mempunyai efektifitas antiseptik lebih tinggi daripada obat kumur pembandingnya.

Kata kunci: Antiseptik; Ekstrak daun sirih; Obat kumur; *S.aures*

NLM : QV 766

Dwi Hartanti, Asmiyenti Djaliasrin Djali, Nur Yulianingsih, Alwani Hamad (Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto)

Efek Infusa Daun Salam *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. sebagai Pengawet Alami Daging Ayam

Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):19-27

Abstrak

Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba, yang memungkinkan tumbuhan tersebut untuk dikembangkan menjadi pengawet makanan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia dan potensi infusa daun salam sebagai pengawet alami daging ayam. Kandungan kimia infusa daun salam dianalisis dengan menggunakan metode penapisan fitokimia. Potensi infusa daun salam sebagai pengawet alami daging ayam ditentukan berdasarkan aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada daging ayam dan juga pengamatan terhadap kondisi fisik daging yang diawetkan. Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa infusa daun salam mengandung flavonoid, tanin, dan saponin. Infusa daun salam pada konsentrasi optimum 10% mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada daging ayam selama penyimpanan dan memperpanjang masa simpannya hingga 3 hari pada suhu 3-7°C

Kata kunci: Daging ayam; *Syzygium polyanthum*; Infusa; Pengawet alami

NLM : QV766

Tri Ratna Sulistiyani, Dinihari Indah Kusumawati
(Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong)

Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase
Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):28-39

Abstrak

Endofit merupakan mikroba potensial sumber penghasil senyawa aktif penting. Endofit yang diisolasi dari tanaman obat tropis telah menarik perhatian karena biodiversitasnya yang tinggi dan diperkirakan mampu menghasilkan senyawa baru di bidang kesehatan. L-asparaginase merupakan enzim pertama dengan aktivitas antileukemia yang sedang intensif dipelajari. Penelitian ini bertujuan untuk mengoleksi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman obat tropis serta melakukan penapisan potensi penghasil enzim L-asparaginase. Tanaman *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum buchanani*, dan Zingiberaceae dikoleksi dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, NTT. Sampel disterilkan menggunakan metode sterilisasi permukaan dan bakteri endofit diisolasi menggunakan metode *plant piece* pada media R2A. Bakteri endofit terisolasi diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Penapisan bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase dilakukan secara kualitatif menggunakan media R2A termodifikasi dengan penambahan L-asparagin dan indikator *phenol red*. Terdapat 34 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari 5 sampel tanaman obat. Sebanyak 14 genus terdiri dari 17 spesies bakteri yang berbeda diperoleh dari 34 isolat terseleksi. Bakteri endofit *Pseudomonas stutzeri* strain SMKL1 dan *Rhizobium radiobacter* strain SMKW2 dari tanaman Kahili berpotensi sebagai penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase dan berpotensi sebagai kandidat penghasil senyawa kemoterapi kanker leukemia.

Kata kunci: Bakteri endofit; L-asparaginase; Tanaman Obat

NLM : WC 528

Reni Herman
(Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan)

Studi *in Silico* Lima Senyawa Aktif sebagai Penghambat Protein Virus Dengue
Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):40-47

Abstrak

Infeksi dengue merupakan salah satu penyakit endemik di daerah tropis dan subtropis, disebabkan oleh infeksi virus dengue (DENV). Beberapa senyawa sudah dibuktikan memiliki efek antivirus terhadap beberapa virus. Uji *in silico* dilakukan untuk memprediksi stabilitas ikatan senyawa dari bahan alam untuk senyawa artemisinin, katekin, mangiferin, epigalokatekin galat (EGCG), dan kuersetin dengan protein virus dengue pada tingkat molekuler. Uji ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Molecular Operating Environment* (MOE) versi 2008.10. Ligan adalah senyawa ribavirin sebagai kontrol antiviral sedangkan artemisinin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin dengan struktur 3D format mol. Protein DENV dengan format dokumen PDB yang diunduh adalah protein selubung (*envelope*) DENV serotipe 2 dengan kode 1OKE, protein non struktural 3 (NS3) dengan kode 2VBC dan protein NS5 dengan kode 1L9K. Uji *in silico* ini secara umum memperlihatkan senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki stabilitas ikatan yang lebih baik terhadap protein DENV. Secara khusus senyawa mangiferin memiliki stabilitas ikatan lebih baik pada protein selubung, NS3 (helikase dan protease) dan pada NS5-metiltransferase dibandingkan dengan senyawa ribavirin. Senyawa katekin pada NS3-protease, EGCG pada NS3 (helikase dan protease) dan kuersetin pada NS3-protease. Artemisinin memiliki ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ribavirin. Hasil prediksi ini mengindikasikan bahwa senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki potensi untuk menghambat protein DENV dan mangiferin merupakan senyawa yang memiliki potensi hambatan paling baik dengan ikatan lebih stabil pada semua protein yang diuji.

Kata kunci: Antiviral; Katekin; Mangiferin; EGCG; Kuersetin

NLM : QV 766

Elda Nurnasari, Kristiana Sri Wijayanti
(Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat, Karangploso, Malang)

Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*
Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):48-56

Abstrak

Tanaman tembakau banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku rokok, namun hasil penelitian menunjukkan bahwa daun tembakau mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan dalam bidang farmasi dan kesehatan. Daun tembakau mengandung minyak atsiri yang memiliki aroma khas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri minyak atsiri tembakau yang berasal enam sentra yaitu Temanggung, Yogyakarta, Purwodadi, Boyolali, Blitar, dan Probolinggo. Minyak atsiri tembakau diperoleh dengan metode distilasi uap-air. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan uji konsentrasi hambat tumbuh minimum dilakukan terhadap dua bakteri yakni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Rendemen minyak atsiri daun tembakau berkisar antara 0,54-3,39%. Minyak atsiri daun tembakau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dari daun tembakau Yogyakarta sebesar 26 mm, sedangkan untuk bakteri *E.coli* zona hambat terbesar pada minyak atsiri daun tembakau Blitar yakni sebesar 21 mm. Besarnya zona hambat ini tidak berbeda jauh dengan zona hambat pada pengujian antibiotik tetrasiklin sebagai kontrol positif yakni 25 mm pada bakteri *S.aureus* dan 21,5 mm pada bakteri *E.coli*. Minyak atsiri daun tembakau asal Probolinggo mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* mulai konsentrasi 6,25% dan bakteri *E. coli* mulai konsentrasi 12,5%.

Kata kunci: Minyak atsiri; Daun tembakau; Antibakteri; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

NLM : QV 766

Andi Nurul Annisa, Wahyu Utaminingrum, Erza Genatrika
(Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto)

Uji Sensitisasi Dermal Masker Gel kombinasi Ekstrak Ampas Daun Teh dan Air Cucian Beras
Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):57-64

Abstrak

Kombinasi ekstrak ampas daun teh dan air cucian beras sebagai masker gel *peel-off* diketahui stabil dalam penyimpanan 28 hari dan memiliki nilai IC₅₀ sebesar 20,4 ppm. Potensi tersebut dapat memberikan efek optimal sebagai bahan kosmetika. Akan tetapi, untuk memenuhi persyaratan regulasi Badan Pengawas Obat Makanan (BPOM) RI dan ISO 10993, uji sensitisasi kulit juga harus dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui reaksi sensitisasi kulit dari masker gel *peel-off* yang mengandung kombinasi ekstrak ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.) pada hewan uji. Desain penelitian menggunakan eksperimental laboratorium dan pemilihan sampel secara *simple random sampling*. Perlakuan diberikan berdasarkan *posttest-only control group design*. Hasil uji reaksi sensitisasi kulit ditentukan menggunakan metode *Guinea Pig*

Maximization Test (GPMT). Hasil penelitian menunjukkan adanya reaksi eritema maupun edema menurut Skala Magnusson dan Kligman setelah pemberian masker gel *peel-off* sebagai sampel dalam uji topikal pada hewan uji muncul pada hari ke-11 dan pada uji tantangan baru muncul pada hari ke-24. Hal ini disebabkan masa inkubasi selama 1 minggu dimana keadaan hipersensitivitas dapat berkembang sehingga reaksi tersebut disebut juga dengan reaksi hipersensitivitas tertunda.

Kata kunci: Masker gel; Ampas daun teh; Air cucian beras; Uji sensitisasi

NLM : QW 45

Rasmaya Niruri, Rini Noviyani, Indah Mei Rahajeng
(Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret)

Kajian Sistemik: Efek Gen *Multi Drug Resistance-1* pada Farmakokinetik Klopido-grel
Jurnal Kefarmasian Indonesia. 2019;9(1):65-72

Abstrak

Polimorfisme gen *Multi Drug Resistance-1 (MDR-1)*, yang merupakan gen penyandi *P-glycoprotein*, dapat mempengaruhi absorpsi pada saluran cerna. Kajian sistemik ini bertujuan untuk mengidentifikasi efek dari gen *MDR-1* varian 3435 pada farmakokinetik klopido-grel. Literatur kajian diperoleh dari *database MEDLINE, Science Direct, Scopus, Clinical Key, ProQuest* dan *Google Scholar*. Dilakukan *critical review* dan analisis artikel riset yang diperoleh untuk mencapai tujuan kajian ini. Hasil kajian menunjukkan bahwa pada pasien dengan penyakit kardiovaskular, kadar puncak (C_{maks}) dan total daerah dibawah kurva/total *Area Under Curve (AUC)* klopido-grel dan/atau metabolit aktifnya adalah lebih rendah secara signifikan pada subjek dengan 3435TT dibandingkan pada 3435CC. Namun, varian Gen *MDR-1* tidak berkorelasi secara signifikan pada konsentrasi plasma subjek sehat. Profil farmakokinetik klopido-grel menunjukkan perbedaan pada *MDR-1* varian 3435 dan status kesehatan yang berbeda.

Kata kunci: MDR-1; Varian 3435; Farmakokinetik klopido-grel



Abstract Sheet

This Abstract sheet may reproduced/copied without permission or charge

NLM : QV 766

Sari Haryanti, Ika Yanti M. Sholikhah, Yuli Widiyastuti
(Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman
Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Indonesia)

**The Synergistic Effect of Sappan Wood and Bitter
Ginger Rhizome Ethanolic Extract in MCF-7 Human
Breast Cancer Cell Lines The Synergistic Effect of
Sappan Wood and Bitter Ginger Rhizome Ethanolic
Extract in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):1-9**

Abstract

Cancer is one of critical, chronic, and complex disease, also becoming the high cause of death in the world. Brazilin and brazilin in sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.) and zerumbone in bitter ginger rhizome (*Zingiber zerumbet* L.) are known having cytotoxic activity with different mechanisms. This study aimed to examine combination effect of sappan wood and bitter ginger rhizome. Sappan wood and bitter ginger rhizomes macerated with ethanol 96% for 3x24 hours, filtered, and evaporated to obtain dried extract. Cytotoxic effect on MCF-7 cells was done using MTT assay. Combination Index (CI) was determined by CompuSyn based on the result of cytotoxic combination. Cell cycle profile and apoptosis induction was analyzed by flow cytometry. Sappan wood extracts and bitter ginger rhizome exhibited cytotoxic effects on MCF-7 cells with the IC50 values of 30 and 155 µg/mL respectively. The combination of sappan wood 15 µg/mL and bitter ginger 8, 12, 24, and 60 µg/mL produced synergistic effect with the CI value of 0.57-0.85. Sappan wood 15 µg/mL combined with bitter ginger 8 and 24 µg/mL showed cell cycle inhibition at G2/M phase. The combination also increased apoptosis induction compared to untreated cells and its single treatment. The combination of sappan wood ethanolic extracts and bitter ginger rhizome showed synergistic cytotoxic effect. Its synergism effect revealed through cell cycle arrested at G2/M phase and acceleration of apoptotic induction.

**Keywords: Caesalpinia sappan; Zingiber zerumbet;
Combination index**

NLM : QV 766

Almasyhuri, Dian Sundari
(Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan
Teknologi Dasar Kesehatan, Jakarta, Indonesia)

**Antiseptic Activity Test Extract of Betel Leaf (Piper
betle Linn.) in Mouthwash Against Staphylococcus
aureus in Vitro
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):10-18**

Abstract

Betle leaf (*Piper betle* Linn.) is very popular in Indonesia. Betle leaf is useful for dental health and frequently used as mouthwash; to eliminate body and mouth odor; treats mouth ulcer, nosebleed, itching, ulceration and vaginal discharge in women. An oral cavity is a place for bacteria. If there is a bacterial immunity reduction, that was originally commensal bacteria can turn into a pathogen that cause infection. One of bacteria that commonly found in the oral cavity is *Staphylococcus aureus*. The bacteria have the ability to occupy and form biofilm on biomaterials that cause resistant to antimicrobials, thus making it difficult to eradicate host that is infected by *S. aureus*. Previous study reported a multidrug resistant of *S. aureus* that could cause death, that to overcome it, betle leaves extract ethanol in vitro antiseptic test to *S. aureus* was conducted. The test was conducted by the phenol coefficient method using *S. aureus* ATCC 25923 bacteria. Povidone iodine mouthwash that is circulated in the market is used as a comparison. The results showed that mouthwash containing ethanol extract of betle leaf had a phenol coefficient value of 1.87 while povidone iodine mouthwash as a comparison, had a phenol coefficient of 1.0. Mouthwash containing ethanol extract of betle leaf had higher antiseptic effectiveness than the comparative mouthwash.

**Keywords: Antiseptic; Betle leaf extract; Mouthwash;
S. aureus.**

NLM : QV 766

Dwi Hartanti, Asmiyenti Djaliasrin Djali, Nur
Yulianingsih, Alwani Hamad
(Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammad
Purwokerto, Purwokerto, Indonesia dan Departmen
Chemical Engineering, Faculty of Engineering
Science, Universitas Muhammadiyah Purwokerto)

**The Effect of Infusion of Syzygium polyanthum
(Wight) Walp. Leaves as Natural Preservative
Chicken Meats
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):19-27**

Abstract

Syzygium polyanthum (Wight) Walp. (Indonesian bay leaf) is known for possessing antimicrobial activity that might be applied for natural food preservative. In this study, we analyzed the constituents of infusion of *S. polyanthum* leaves and evaluated its potency as the preservative of fresh chicken meats. The infusions were prepared with the method described in Indonesian Pharmacopeia. Phytochemical content of infusion of *S. polyanthum* leaves was analyzed by qualitative phytochemical screening using colorimetric methods. Its application for preservative of fresh chicken meat was evaluated based on its activity in inhibiting the growth of bacteria on the meats as well as the physical observation of the preserved meats. The infusion of *S. polyanthum* leaves contained flavonoids, tannins, and saponins. The infusion at the optimum concentration of 10% was capable of inhibiting bacterial growth on chicken meats and extending their shelf life up to 3 days in temperature of 3-7°C.

Keywords: Chicken meat; *Syzygium polyanthum*; Infusion; Natural preservative

NLM : QV 766

Tri Ratna Sulistiyani, Dinihari Indah Kusumawati
(Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, Indonesia)

Diversity of Endophytic Bacteria as a L-Asparaginase Producer Free of L-Glutaminase
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):28-39

Abstract

Endophytes are potential as a source of active compound producer. Endophytes that is isolated from tropical medicinal plants has been getting attention due to its high biodiversity and active compound producing ability. L-asparaginase is the first enzyme used as chemotherapeutic agent for leukemia. The aim of this study is to collect the endophytic bacteria associated with tropical medicinal plants from Sumba Island and investigate the activity of L-asparaginase without L-glutaminase from endophytic bacteria isolates. The samples *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum buchanani*, and *Zingiberaceae* are collected from Wanggameti, East Sumba, NTT. Samples are sterilized using surface-sterilization method and endophytic bacteria are isolated using plant piece method on R2A media. Selected endophytic bacteria are identified by 16S rDNA sequences. L-asparaginase screening is conducted using modified R2A with addition of L-asparagine and phenol red as colour indicator. A total of 34 isolates of endophytic bacteria were collected from 5 samples. A total of 14 genus consisted of 17 different bacterial species were obtained from 34 selected isolates. Endophytic bacteria of *P. stutzeri* strains of SMKLI and *R. radiobacter* strains of SMKW2 from the Kahili plant were needed as L-glutaminase-free L-asparaginase and were potential to be candidate of leukemia cancer chemotherapy.

Keywords: Endophytic bacteria; L-asparaginase; Medicinal plants

NLM : WC 528

Reni Herman
(Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan,
Badan Litbang Kesehatan, Jakarta, Indonesia)

In Silico Study of Five Active Compounds as Dengue Virus Protein Inhibitors
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):40-47

Abstract

Dengue infection is an endemic disease in the tropics and subtropics, caused by dengue virus (DENV) infection. Some compounds have been shown to have antiviral effects on some viruses. In silico study is conducted to predict the stability of natural ingredient compounds: artemisinin, catechin, mangiferin, epigallocatechin gallate (EGCG), and quercetin in their interactions with dengue virus proteins at molecular level. This study is carried out using the 2008 version of the Molecular Operating Environment (MOE) software. Ligands are ribavirin as antiviral control whereas artemisinin, mangiferin, EGCG, and quercetin with 3D mole format structures. The downloaded DENV protein with PDB document format is the DENV serotype 2 envelope protein with 1OKE code, non structural protein 3 (NS3) with 2VBC code and NS5 protein with 1L9K code. In silico test generally showed that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had more stable docking ligands to DENV's proteins. In particular, mangiferin had stable docking ligand to envelope proteins, NS3 (helicase and protease) and in NS5-methyltransferase compared to ribavirin. Catechin stabled on NS3-protease, EGCG on NS3 (helicase and protease) and quercetin on NS3-protease. Artemisinin had less stabled bonds than ribavirin. The results indicated that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had potential inhibition to DENV proteins whereas mangiferin was the most potential compound to inhibit dengue virus protein targets.

Keywords: Antiviral; Catechin; Mangiferin; EGCG; Quercetin

NLM : QV 766

Elda Nurnasari, Kristiana Sri Wijayanti
(Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat,
Karangploso, Malang, Indonesia)

Antibacterial Activities of Tobacco Leaf Essential Oil Against Escherichia coli and Staphylococcus aureus
The Indonesian Pharmaceutical Journal.
2019;9(1):48-56

Abstract

Tobacco plants are widely used as raw material for cigarettes, but the results of the study show that in tobacco leaves contain compounds that can be used in the pharmaceutical and health fields. Tobacco leaves contain essential oils that have a distinctive aroma. The study aims to examine the antibacterial activity of tobacco essential oil from six sources tobacco such as Temanggung, Yogyakarta, Purwodadi, Boyolali, Blitar and Probolinggo. Tobacco essential oil is obtained by the steam-water distillation method. Antibacterial activity evaluation was carried out by diffusion method and the minimum inhibitory concentration on two bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The yield of tobacco essential oil ranged from 0.54-3.39%. Tobacco essential oil had antibacterial activity against bacteria *E. coli* and *S. aureus* in the presence of inhibition zones in bacterial media. The biggest inhibition zone was in Yogyakarta tobacco essential oil of 26 mm for *S. aureus* bacteria, while for *E. coli* bacteria the biggest inhibition zone was Blitar tobacco essential oil which was equal to 21 mm. The inhibition zone was not much different from the inhibition zone in tetracycline antibiotic testing (positive control) which was 25 mm in *S. aureus* and 21.5 mm bacteria in *E. coli* bacteria. Tobacco essential oil from Probolinggo was able to inhibit the growth of *S. aureus* bacteria up to a concentration of 6.25% and *E. coli* bacteria to a concentration of 12.5%.

Keywords: Essential oils; Tobacco leaf; Antibacterial; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

NLM : ...

Andi Nurul Annisa, Wahyu Utaminingrum, Erza Genatrik
(Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto, Indonesia)

Dermal Sensitization Test of Gel Mask Containing Combination Of Green Tea Waste Extract and Rice Washing Water

The Indonesian Pharmaceutical Journal. 2019;9(1):57-64

Abstract

The combination of tea leaf dregs extract and rice washing water as a peel-off gel mask was found to be stable up to 28 days of storage and had an IC₅₀ value 20.4 ppm. This potential can provide an optimal effects as cosmetic ingredients. However, to meet the regulatory requirements of Badan Pengawas Obat Makanan (BPOM) RI and ISO 10993, a dermal sensitization test also need to be done. The aim of this study was to determine the dermal sensitization reaction from peel-off gel mask containing a combination of tea leaf dregsextract (*Camellia sinensis* L.) and rice washing water (*Oryza sativa* L.) in test animal. This study was designed based on experimental laboratory methods and sample selection by simple random sampling. The intervention was given based on posttest-only control group design. The test results for dermal sensitization were determined using the Guinea

Pig Maximization Test (GPMT) method. The results showed erythema and edema reactions according to the Magnusson and Kligman scale after administration of peel-off gel masks as samples in the topical tests in test animals, appeared on the 11th day and in the challenge test appeared on the 24th day. This was due to incubation period for one week where the hypersensitivity state can develop, so that this reaction is also called the delayed hypersensitivity reaction.

Keywords: Gel mask; Green tea waste; Rice washing water; Sensitization test

LM : QW 45

Rasmaya Niruri, Rini Noviyani, Indah Mei Rahajeng
(Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Indonesia, Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana, Indonesia, Program Studi Ilmu Keperawatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Indonesia, Doctor of Philosophy Program in HTA (International Program), Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Thailand)

A Systematic Review: Impact of Multi Drug Resistance-1 Gene on Clopidogrel Pharmacokinetics The Indonesian Pharmaceutical Journal. 2019;9(1):65-72

Abstract

Multi Drug Resistance-1 (MDR-1) gene polymorphisms encoding for P-glycoprotein can affect clopidogrel intestinal absorption. This systematic review aim to identify the impact of MDR-1 gene 3435 variants on clopidogrel pharmacokinetics. Literature review were retrieved from MEDLINE, Science Direct, Scopus, Clinical Key, ProQuest and Google Scholar databases. The articles are critically reviewed and analyzed to answer this systematic review's aim. The result showed that, in patients with cardiovascular disease, the peak plasma concentration (C_{max}) and the total area under the plasma concentration-time curve (AUC) of clopidogrel and its active metabolites were lower in 3435TT compared to 3435CC. Nevertheless, the variants of MDR-1 gene were not significantly correlated to the plasma concentration in healthy subjects. Clopidogrel pharmacokinetic profile varied widely between MDR-1 3435 variants and subjects.

Keywords: MDR-1; 3435 variant; Clopidogrel pharmacokinetic

Jurnal Kefarmasian Indonesia

The Indonesian Pharmaceutical Journal

Vol.9 No.1-Februari 2019

DAFTAR ISI

Efek Sinergis Kombinasi Ekstrak Etanolik Kayu Secang dan Rimpang Lempuyang pada Sel Kanker Payudara MCF-7 Sari Haryanti, Ika Yanti M. Solikhah, Yuli Widiyastuti	1 – 9
Uji Aktivitas Antiseptik Ekstrak Etanol Daun Sirih (<i>Piper betle</i> Linn.) dalam Obat Kumur terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> secara in Vitro Almasyhuri, Dian Sundari	10 – 18
The Effect of Infusion of <i>Syzygium polyanthum</i> (Wight) Walp. Leaves as Natural Preservative Chicken Meats Dwi Hartanti, Asmiyenti Djaliasrin Djilil, Nur Yulianingsih, Alwani Hamad	19 – 27
Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase Tri Ratna Sulistiyani, Dinihari Indah Kusumawati	28 – 39
Studi <i>in Silico</i> Lima Senyawa Aktif sebagai Penghambat Protein Virus Dengue Reni Herman	40 – 47
Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Eschericia coli</i> dan <i>Staphylococcus aureus</i> Elda Nurnasari, Kristiana Sri Wijayanti	48 – 56
Uji Sensitisasi Dermal Masker Gel Kombinasi Ekstrak Ampas Daun Teh dan Air Cucian Beras Andi Nurul Annisa, Wahyu Utamingrum, Erza Genatrika	57 – 64
Kajian Sistematis: Efek Gen <i>Multi Drug Resistance-1</i> pada Farmakokinetik Klopidoogrel Rasmaya Niruri, Rini Noviyani, Indah Mei Rahajeng	65 – 72

**Pusat Penelitian dan Pengembangan
Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan**

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan RI

Jl. Percetakan Negara No.23 Jakarta 10560

Efek Sinergis Kombinasi Ekstrak Etanolik Kayu Secang dan Rimpang Lempuyang pada Sel Kanker Payudara MCF-7

The Synergistic Effect of Sappan Wood and Bitter Ginger Rhizome Ethanolic Extract in MCF-7 Human Breast Cancer Cell Lines

Sari Haryanti*, Ika Yanti M. Sholikhah, Yuli Widiyastuti

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Indonesia

*E-mail: sari.haryanti@gmail.com

Diterima: 23 Agustus 2018

Direvisi: 24 Januari 2019

Disetujui: 7 Februari 2019

Abstrak

Kanker merupakan salah satu penyakit kritis, kronis, kompleks, dan menjadi penyebab kematian yang cukup tinggi di dunia. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) mengandung senyawa brazilin dan brazilin, sedangkan rimpang lempuyang (*Zingiber zerumbet* L.) mengandung zerumbon. Senyawa tersebut menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan mekanisme yang berbeda. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji efek kombinasi kayu secang dan rimpang lempuyang. Kayu secang dan rimpang lempuyang dimaserasi dengan etanol 96% 3x24 jam, disaring, dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kering. Uji sitotoksik pada sel MCF-7 dilakukan dengan MTT assay. Nilai index kombinasi (CI) dianalisis dengan CompuSyn berdasarkan hasil sitotoksik kombinasi. Profil siklus sel dan induksi apoptosis dikaji dengan *flow cytometry*. Ekstrak secang dan rimpang lempuyang menunjukkan efek sitotoksik pada sel MCF-7 dengan nilai IC_{50} berturut-turut 30 dan 155 $\mu\text{g/mL}$. Kombinasi ekstrak secang 15 $\mu\text{g/mL}$ dan lempuyang 8, 12, 24, dan 60 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan efek sinergis dengan nilai CI 0,57-0,85. Kombinasi secang 15 $\mu\text{g/mL}$ dengan lempuyang 8 dan 24 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan penghambatan siklus sel di fase G2/M. Kombinasi keduanya juga meningkatkan terjadinya induksi apoptosis dibandingkan kontrol dan perlakuan tunggalnya. Kombinasi ekstrak etanolik kayu secang dan rimpang lempuyang menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis. Sinergisme kombinasi terjadi melalui penghambatan siklus sel di fase G2/M dan induksi apoptosis.

Kata kunci: *Caesalpinia sappan* L; *Zingiber zerumbet* L; Indeks kombinasi

Abstract

Cancer is one of critical, chronic, and complex disease, also becoming the high cause of death in the world. Brazilin and brazilin in sappan wood (*Caesalpinia sappan* L.) and zerumbone in bitter ginger rhizome (*Zingiber zerumbet* L.) are known having cytotoxic activity with different mechanisms. This study aimed to examine combination effect of sappan wood and bitter ginger rhizome. Sappan wood and bitter ginger rhizomes macerated with ethanol 96% for 3x24 hours, filtered, and evaporated to obtain dried extract. Cytotoxic effect on MCF-7 cells was done using MTT assay. Combination Index (CI) was determined by CompuSyn based on the result of cytotoxic combination. Cell cycle profile and apoptosis induction was analyzed by flow cytometry. Sappan wood extracts and bitter ginger rhizome exhibited cytotoxic effects on MCF-7 cells with the IC_{50} values of 30 and 155 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The combination of sappan wood 15 $\mu\text{g/mL}$ and bitter ginger 8, 12, 24, and 60 $\mu\text{g/mL}$ produced synergistic effect with the CI value of 0.57-0.85. Sappan wood 15 $\mu\text{g/mL}$ combined with bitter ginger 8 and 24 $\mu\text{g/mL}$ showed cell cycle inhibition at G2/M phase. The combination also increased apoptosis induction compared to untreated cells and its single treatment. The combination of sappan wood ethanolic extracts and bitter ginger rhizome showed synergistic cytotoxic effect. Its synergism effect revealed through cell cycle arrested at G2/M phase and acceleration of apoptotic induction.

Keywords: *Caesalpinia sappan* L; *Zingiber zerumbet* L; Combination index

PENDAHULUAN

Sekitar 70% populasi penduduk di berbagai wilayah dunia telah memanfaatkan produk berbasis tumbuhan (herbal) sebagai upaya pemeliharaan kesehatan primer. Produk herbal digunakan sebagai ramuan tunggal, kombinasi ramuan, atau kombinasi ramuan dan obat konvensional. Ketika ramuan digunakan dalam kombinasi, efek yang dihasilkan bisa menjadi lebih kompleks karena berbagai kemungkinan interaksi dapat terjadi. Interaksi kombinasi yang diharapkan adalah manfaat terapeutik tambahan atau sinergis. Terapi kombinasi diperlukan untuk pengobatan penyakit kritis, kronis dan kompleks, seperti kanker, AIDS, dan tuberkulosis paru.¹

Kanker masih menjadi salah satu penyebab kematian tertinggi di dunia. Kanker payudara merupakan jenis kanker yang paling banyak diderita wanita. Negara di Asia dengan jumlah kasus kanker payudara tertinggi pada tahun 2012 adalah Cina (187.213 kasus), selanjutnya India (144.937 kasus), Jepang (55.710 kasus), Indonesia (48.998), dan Pakistan (34.038 kasus). Berdasarkan data tersebut, estimasi prevalensi kanker payudara di Indonesia adalah 40,3 per 100.000 penduduk, dengan estimasi angka kematian sebesar 16,6 per 100.000.²

Kanker merupakan penyakit dengan etiologi dan patofisiologi yang sangat kompleks. Sel kanker sangat mudah dan cepat menjalani adaptasi molekuler, sehingga spesifisitas dan efikasi terapi secara tunggal cukup sulit mencapai efek pengobatan optimal. Selain itu, agen kemoterapi konvensional saat ini seringkali meninggalkan masalah klinis berupa efek toksik pada organ lain serta berkembangnya peristiwa resistensi. Bahan alami, terutama tumbuhan, dapat saling dikombinasikan sehingga mencapai efek sinergis dengan meningkatkan sitotoksitas pada sel kanker, serta meningkatkan sensitivitas respon imun untuk melawan kanker.³

Penemuan kombinasi tumbuhan yang menghasilkan interaksi sinergis merupakan strategi yang cukup potensial dalam pengembangan terapi kanker payudara. Beberapa tumbuhan diketahui memiliki mekanisme yang berbeda dalam menghasilkan efek sitotoksik. Kajian perbedaan mekanisme aksi dapat digunakan sebagai salah satu dasar dalam penentuan kombinasi tumbuhan. Sebagai contoh, secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan tumbuhan dalam famili Leguminosae yang digunakan secara luas dalam pengobatan tradisional di Asia.⁴ Ekstrak etanolik kayu secang memiliki efek sitotoksik kuat terhadap sel kanker payudara 4T1. Namun demikian, aktivitas antimetastasis secang tergolong lemah dibandingkan daun awar-awar (*Ficus septica*).⁵ Secang menghambat siklus sel fase G2/M pada sel MCF-7 dan MCF-7/HER2.^{6,7}

Lempuyang atau *Zingiber zerumbet* L. Roscoe ex Sm. merupakan tumbuhan famili Zingiberaceae. Di Asia Tenggara, rimpang lempuyang digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengatasi radang, demam, sakit gigi, gangguan pencernaan, dan meredakan nyeri.⁸ Zerumbon adalah salah satu senyawa seskuiterpen utama yang berkontribusi dalam aktivitas farmakologi lempuyang.⁹ Zerumbon merupakan salah satu agen kemopreventif potensial untuk kanker kolon dan kulit.^{10,11} Zerumbon menurunkan ekspresi VEGF dan NF-κB sehingga menghambat angiogenesis pada sel kanker lambung.¹²

Perbedaan mekanisme secang dan lempuyang menarik untuk diteliti lebih lanjut. Kombinasi keduanya diharapkan dapat menghasilkan efek sinergis. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji aktivitas sitotoksik, profil siklus sel, dan induksi apoptosis ekstrak etanolik kayu secang dan rimpang lempuyang, baik tunggal maupun kombinasi.

METODE

Penelitian dilakukan pada tahun 2017 di laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Tawangmangu.

Alat dan bahan

Alat

ELISA Reader Biorad dan *flow cytometry* BD Accuri C6.

Bahan

Simplisia kayu secang dan rimpang lempuyang diperoleh dari Laboratorium Pascapanen, B2P2TO2T. Kedua simplisia diserbuk menggunakan blender, kemudian dimaserasi dengan etanol 96% selama 3x24 jam secara terpisah. Maserat kemudian disaring, dan diuapkan pada oven suhu 40 °C hingga didapatkan ekstrak kering kayu secang dan rimpang lempuyang.

Sel kanker payudara MCF-7 merupakan koleksi Laboratorium Biologi Molekuler, B2P2TO2T, diperoleh dari American Type Culture Collection (ATCC). Sel dipelihara dalam media kultur Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Sigma) yang ditambahkan Fetal Bovine Serum (FBS) 10% (Gibco), dan penisilin-streptomisin 1% (Gibco).

Prosedur kerja

Uji sitotoksik dilakukan dengan metode MTT assay pada sel MCF-7. Sel yang telah konfluen dalam cawan dipanen dengan tripsin EDTA 0,25% (Sigma). Sel dihitung dengan hemositometer. Sejumlah 10^3 sel/sumuran didistribusikan ke dalam 96-well plate. Sel diinkubasi selama 48 jam di dalam inkubator CO₂ 5%, 37 °C. Ekstrak 10 mg dalam 100 µL DMSO, diencerkan dalam media kultur dengan konsentrasi lempuyang 20, 40, 80, 150, 200, 250 µg/mL; secang 10, 20, 30, 32, 35, 40 µg/mL. Ekstrak dimasukkan dalam sumuran, masing-masing perlakuan sebanyak 3 sumuran (triplo). Sel diinkubasi selama 24 jam di dalam

inkubator CO₂. Pada akhir inkubasi, media dibuang, sel dicuci dengan phosphate buffer saline (PBS) 100 µL/sumuran, ditambahkan MTT 100 µL/sumuran, diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 3 jam. Selanjutnya ditambahkan *stopper* sodium dodesil sulfat (SDS, Sigma) 10% dalam HCl 0,01N. *Plate* dibiarkan semalam pada suhu kamar terlindung dari cahaya, dibaca dengan ELISA reader panjang gelombang 595 nm.¹³ Uji sitotoksik kombinasi dilakukan dengan seri konsentrasi lempuyang 8, 12, 24, 60 µg/mL; secang 2, 3, 6, 15 µg/mL.

Profil siklus sel dianalisis dengan *flow cytometry*. Sel dipanen, dihitung menggunakan hemositometer, kemudian didistribusikan ke dalam 6-well plate, yang terdiri dari 6 well (sumuran). Masing-masing sumuran berisi sejumlah 1×10^7 sel dalam 1,5 mL media kultur, kemudian diinkubasi selama 2x24 jam. Selanjutnya, sel dalam sumuran diberikan 6 perlakuan yaitu ekstrak secang 15 µg/mL, lempuyang 8 dan 24 µg/mL, kombinasi secang 15µg/mL dengan lempuyang 8 µg/mL, kombinasi secang 15 µg/mL dengan lempuyang 24 µg/mL, dan kontrol sel tanpa perlakuan, kemudian diinkubasi dalam inkubator CO₂ selama 24 jam. Pada akhir perlakuan, media dalam setiap sumuran dimasukkan dalam *conical* yang berbeda. Tiap *conical* diberi tanda dan selanjutnya digunakan untuk perlakuan yang sama. Sel dicuci dengan 500 µL PBS, kemudian PBS dimasukkan ke dalam *conical*. Sel ditambahkan 200 µL tripsin-EDTA 0,25%, diinkubasi 3 menit, diberikan 500 µL media dan diresuspensi. Suspensi sel dimasukkan dalam *conical* yang sama, dipusingkan 500 rpm selama 5 menit. Endapan difiksasi dengan etanol 70% dingin, dibiarkan 1 jam dalam suhu ruang, dipusingkan 2000 rpm selama 3 menit, dicuci dengan PBS, dipusingkan kembali, ditambahkan 400 µL reagen PI (propidium iodide) 1 mg/mL (Sigma), 10 mg/mL RNase (Sigma) dan 0,1% (v/v) Triton-X 100 (Sigma). Sel diresuspensikan dan diinkubasi 5 menit dalam ruang gelap,

kemudian dibaca dengan *flow cytometer*.

Untuk pengamatan apoptosis, tahapan cara kerja hingga diperoleh endapan sel, sama dengan profil siklus sel. Endapan sel kemudian diresuspensi dengan 100 μL *binding buffer* (BD), 2 μL Annexin-V (BD) dan 2 μL PI (BD), lalu diinkubasi dalam ruang gelap selama 10 menit. Suspensi sel dibaca dengan *flow cytometer*.

Analisis Data

Data MTT *assay* dianalisis dengan regresi linier Excel MS Office 2013, sehingga diperoleh nilai IC_{50} . Analisis nilai CI (indeks kombinasi) menggunakan *software* CompuSyn. Interpretasi nilai CI terlihat pada Tabel 1. Data *flow cytometer* dianalisis menggunakan Accuri C6 *software*.

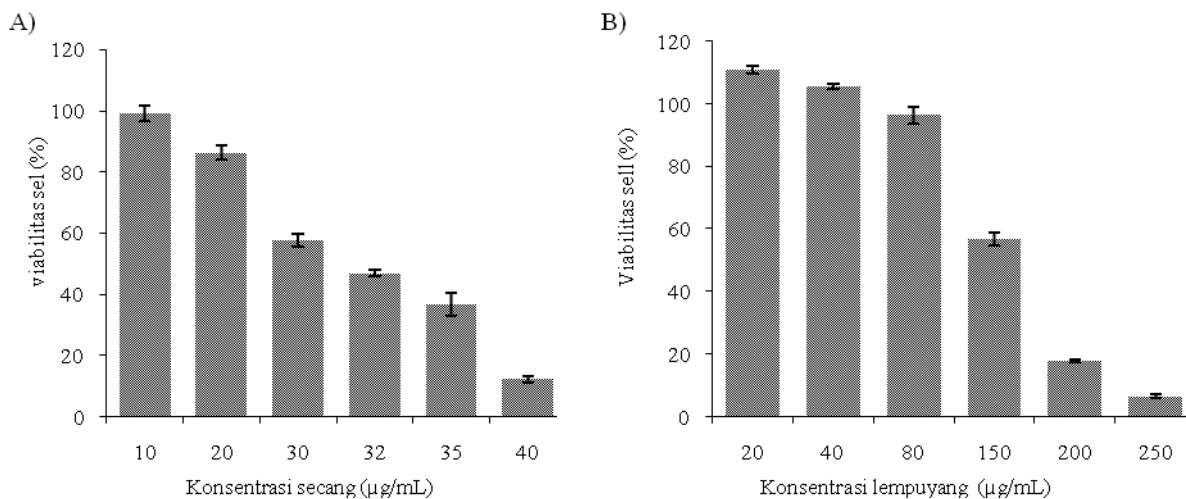
Tabel 1. Interpretasi nilai CI

CI	Interpretasi
< 0.1	Sinergis sangat kuat
0.10 – 0.30	Sinergis kuat
0.30 – 0.70	Sinergis
0.70 – 0.90	Sinergis menengah
0.90– 1.10	Mendekati aditif
1.10– 1.45	Antagonis menengah
1.45 – 3.30	Antagonis
>3.3	Antagonis kuat

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan analisis hasil MTT assay, ekstrak etanolik kayu secang dan rimpang lempuyang mampu menurunkan viabilitas sel MCF-7. Hasil perhitungan persentase viabilitas dan hubungannya dengan konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada grafik di Gambar 1. Secang memberikan efek yang lebih baik dengan nilai IC_{50} 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, jauh lebih poten dibandingkan IC_{50} lempuyang sebesar 155 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Penelitian lain melaporkan ekstrak metanol kayu secang menunjukkan efek sitotoksik pada sel kanker paru A-549 dengan nilai IC_{50} 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁴, sedangkan pada sel kanker serviks HeLa nilai IC_{50} 26 $\mu\text{g}/\text{mL}$.¹⁵ Hasil penelitian Nurziah, dkk., 2012, ekstrak etanol kayu secang memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker payudara T47D dengan nilai IC_{50} 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$.¹⁶ Penelitian lain menggunakan ekstrak heksan rimpang lempuyang pada sel Human Myeloid Leukemia HL60 memberikan nilai IC_{50} 63,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$.¹⁷

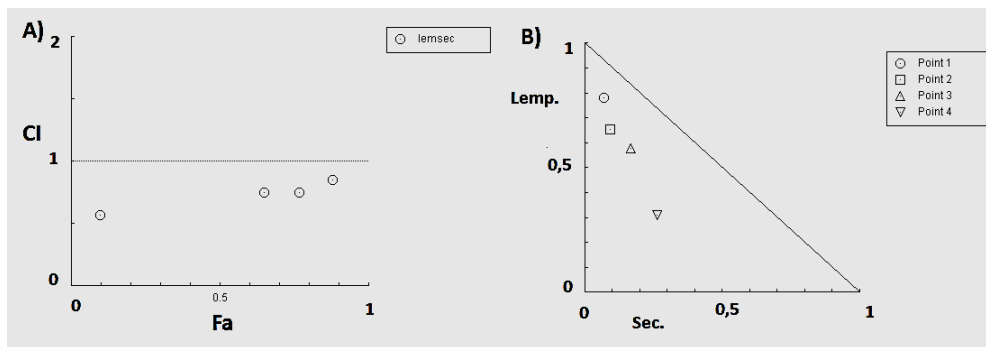


Gambar 1. Grafik konsentrasi ekstrak secang (A) dan lempuyang (B) tunggal vs viabilitas sel. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Data persentase viabilitas sel merupakan representasi dari rerata \pm SD

Tabel 2. Viabilitas sel MCF-7 setelah diberi perlakuan kombinasi ekstrak kayu secang dan rimpang lempuyang

Konsentrasi lempuyang ($\mu\text{g/mL}$)	Viabilitas kombinasi (%)				
	Konsentrasi secang ($\mu\text{g/mL}$)				
	0	2	3	6	15
0	-	93,4 \pm 3,2	93,3 \pm 1,9	94,9 \pm 1,5	95,1 \pm 2,4
8	96,0 \pm 3,8	96,9 \pm 0,3	98,6 \pm 1,8	98,0 \pm 1,3	88,0 \pm 2,1
12	94,9 \pm 3,2	97,5 \pm 4,4	95,1 \pm 2,0	93,1 \pm 2,1	76,8 \pm 1,1
24	102,6 \pm 2,8	100,1 \pm 1,3	100,4 \pm 7,3	100,4 \pm 2,2	64,9 \pm 5,7
60	110,0 \pm 3,8	101,0 \pm 1,7	100,2 \pm 2,1	86,5 \pm 0,4	9,8 \pm 3,1

Ket.: masing-masing perlakuan kombinasi diulang tiga kali. Data persentase viabilitas sel merupakan representasi dari rerata \pm SD



Gambar 2. Nilai CI (A) dan isobologram (B) kombinasi ekstrak kayu secang dan rimpang lempuyang dengan *CompuSyn*. Nilai CI < 1 dan point kombinasi di bawah garis miring isobologram menunjukkan efek sinergis. Fa merepresentasikan viabilitas sel, Fa=1 artinya viabilitas sel 100%, Fa<1 viabilitas sel 0%

Kombinasi secang dan lempuyang masing-masing menggunakan konsentrasi tidak lebih dari $\frac{1}{2}IC_{50}$. Hasil MTT assay menunjukkan kombinasi lempuyang dengan secang konsentrasi kurang dari 15 $\mu\text{g/mL}$ belum berpengaruh nyata terhadap penurunan viabilitas sel. Efek penurunan viabilitas terlihat pada kombinasi secang 15 $\mu\text{g/mL}$ dengan lempuyang 8, 12, 24, dan 60 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 2). Selanjutnya, empat seri kombinasi tersebut dianalisis menggunakan software *CompuSyn*. Kombinasi secang 15 $\mu\text{g/mL}$ dan lempuyang 8, 12, 24, dan 60 $\mu\text{g/mL}$ menghasilkan efek sinergis dengan nilai *combination index* (CI) < 1 berturut-turut 0,85, 0,75, 0,74, dan 0,57; serta poin kombinasi berada di bawah garis aditif isobologram (Gambar 2). Analisis *CompuSyn* juga menunjukkan kombinasi kedua ekstrak memiliki nilai *dose reduction index* (DRI) > 1 mengindikasikan efek saling memperkuat.

Selanjutnya, mekanisme sitotoksik dikaji melalui pengamatan siklus sel dan apoptosis pada dua kombinasi, yaitu secang 15 $\mu\text{g/mL}$ dengan lempuyang 8 dan 24 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan *flow cytometer*. Pemilihan konsentrasi berdasarkan hasil viabilitas kombinasi seperti terlihat pada Tabel 2.

Kombinasi secang:lempuyang (15:8) dan (15:24) $\mu\text{g/mL}$ berturut-turut menghasilkan viabilitas 88,0% dan 64,9%. Besaran nilai viabilitas tersebut diharapkan dapat merepresentasikan jumlah sel hidup yang cukup untuk menggambarkan gambaran profil siklus sel maupun kematian sel.

Profil siklus sel perlakuan tunggal ekstrak kayu secang 15 $\mu\text{g/mL}$ tunggal menunjukkan peningkatan populasi sel di fase G2/M menjadi 42,3%, sedangkan kontrol tanpa perlakuan 27,6%. Ekstrak rimpang lempuyang 8 dan 24 $\mu\text{g/mL}$ hanya sedikit meningkat, berturut-turut 32,3%

dan 30,7%. Profil siklus sel kombinasi menunjukkan dominasi efek secang sehingga menghambat siklus sel di fase G2/M berturut-turut 43,5% dan 41,5% (Gambar 3). Sejalan dengan hasil penelitian ini, Handayani dkk. 2017, melaporkan senyawa brazilin dan brazilein yang diisolasi dari kayu secang menghambat siklus sel di fase S dan G2/M pada sel kanker kolon WiDr.¹⁸ Pada sel *multiple myeloma* U266, brazilin memperlihatkan hambatan pada fase G2/M.¹⁹

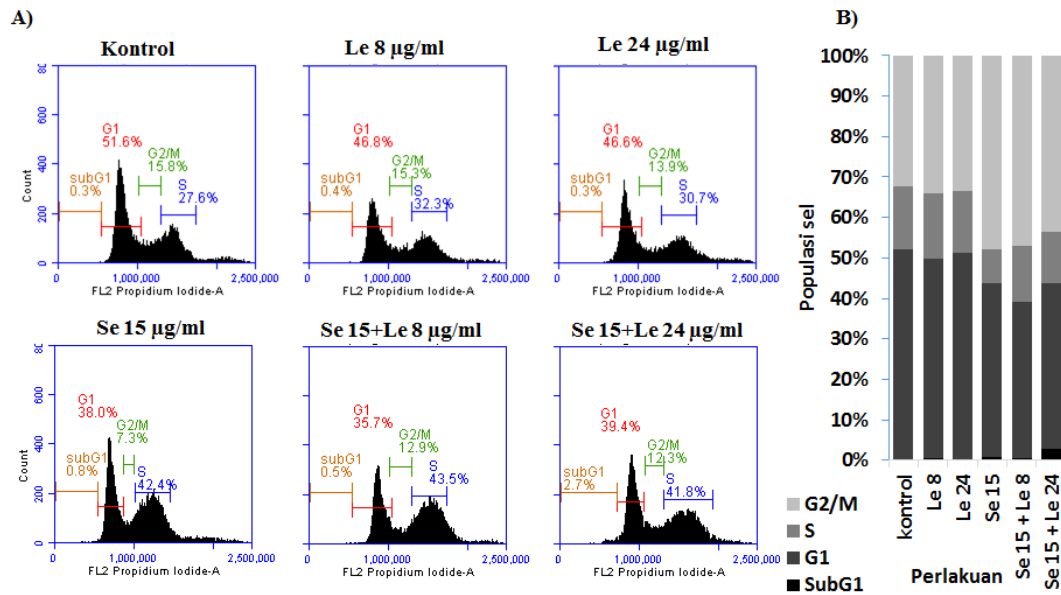
Peningkatan populasi di fase G2/M menunjukkan terhentinya siklus sel di fase tersebut. Pembuatan protein dan organel sel serta persiapan menuju pembelahan sel (mitosis) merupakan peristiwa yang terjadi pada fase G2/M. Gangguan atau hambatan pada fase G2/M menyebabkan terjadinya kesalahan regulasi yang menyebabkan pembelahan sel tertunda, bahkan terhenti.²⁰ Berhentinya siklus sel menggambarkan terjadinya mekanisme pertahanan diri sel kanker untuk memperbaiki kerusakan DNA. Penghentian siklus sel sebelum proses *repair* sempurna, akan mengaktivasi signal yang mengarah pada kematian sel.²¹

Profil siklus sel kombinasi secang 15 µg/mL dan lempuyang 24 µg/mL menunjukkan peningkatan populasi sel di subG1 menjadi 2,7%, sedangkan kontrol tanpa perlakuan 0,3%. Peningkatan populasi sel di SubG1 mengindikasikan terjadinya kematian sel. Penelusuran jenis kematian sel yang terjadi, dilakukan dengan uji induksi apoptosis *double staining* PI dan annexin V menggunakan *flow cytometer*. Annexin akan mengikat lipid *phosphatidylserine* (PS), yang dalam kondisi normal berada di dalam membran plasma bagian dalam. Saat awal terjadi apoptosis, PS akan keluar ke bagian membran luar dan terikat annexin. Pada sel yang mengalami apoptosis lanjut dan nekrosis, annexin juga akan masuk ke dalam membran plasma. Sedangkan PI hanya bisa masuk pada sel yang mengalami kerusakan membran atau nekrosis.²²

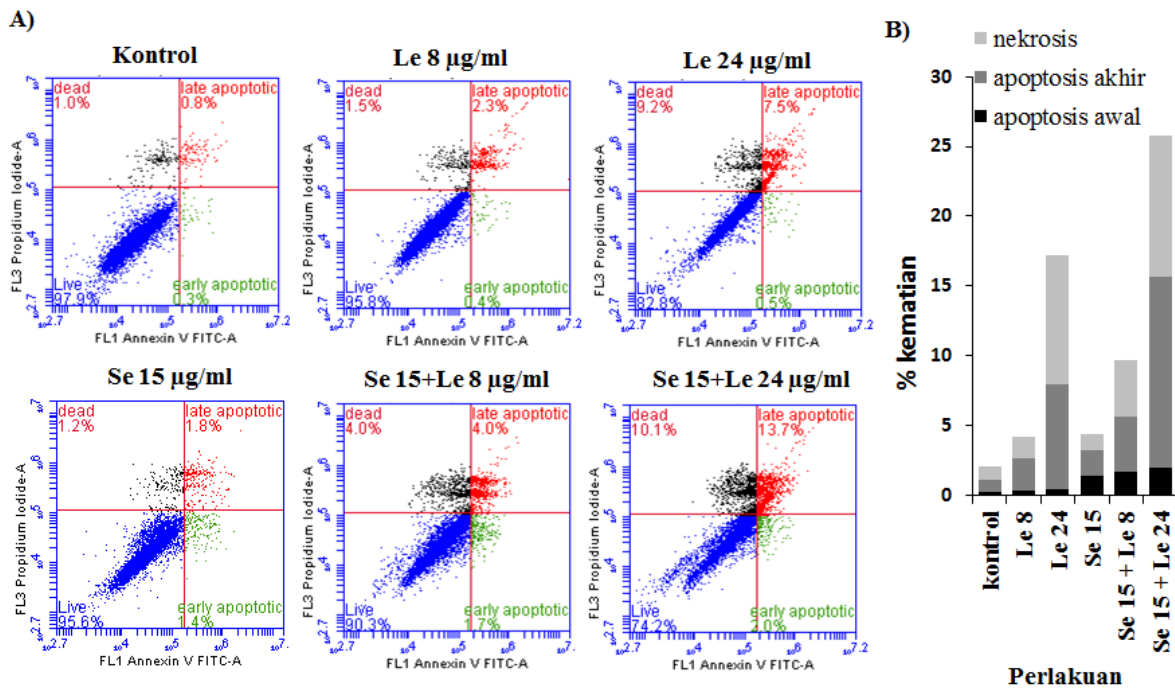
Profil kematian sel menunjukkan

ekstrak rimpang lempuyang menginduksi terjadinya apoptosis lanjut berturut-turut sebesar 2,3% dan 7,5%. Sel apoptosis lanjut pada perlakuan secang tunggal belum memperlihatkan kenaikan yang berarti (1,8%) dibandingkan kontrol (0,8%). Lempuyang 24 µg/mL menginduksi nekrosis sebesar 9,2%. Kombinasi secang dan lempuyang menunjukkan peningkatan sel apoptosis lanjut menjadi 13,7% dan sel nekrosis 10,0% (Gambar 4). Menurut Crowley dkk., 2016, jumlah sel apoptosis dan nekrosis dalam suatu populasi tergantung pada dosis, durasi dan tingkat keparahan perlakuan. Pada perlakuan *in vitro*, apoptosis berlangsung dengan cepat selama beberapa jam, dan setelah itu sel mengalami nekrosis sekunder.²² Profil kematian sel pada perlakuan kombinasi menunjukkan kemiripan dengan profil lempuyang tunggal. Hasil penelitian Sithara dkk., 2017, zerumbon dosis 50 dan 75 µM menginduksi apoptosis namun belum terjadi perubahan profil siklus sel. Pada dosis 100 µM terjadi induksi apoptosis dan penghambatan siklus sel di fase G2/M.²³

Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan proses yang berperan penting dalam perkembangan organisme dan homeostasis jaringan. Dalam kondisi patologis, terutama kanker, terjadi deregulasi ekspresi protein antiapoptosis sehingga sel terhindar dari kematian dan terus ber-proliferasi.²⁴ Sel kanker juga mengalami disfungsi regulasi siklus sel, sehingga terjadi proliferasi yang tidak terkontrol dan atau terganggunya proses kematian sel terprogram. Penghambatan apoptosis selama proses karsinogenesis berperan sangat penting dalam perkembangan dan pertumbuhan sel kanker.²⁵ Berdasarkan profil *flow cytometry*, sinergisme kombinasi dalam penelitian ini terjadi melalui penghambatan siklus sel di fase G2/M oleh ekstrak kayu secang, dan percepatan induksi apoptosis oleh rimpang lempuyang.



Gambar 3. Profil distribusi siklus sel perlakuan ekstrak tunggal dan kombinasi, dengan staining propidium iodide (PI) dan flow cytometry. Sel MCF-7 diberi perlakuan tunggal secang (Se), lempuyang (Le) dan kombinasinya selama 24 jam. (A) Histogram siklus sel; (B) analisa populasi sel di setiap fase



Gambar 4. Deteksi sel apoptosis perlakuan ekstrak tunggal dan kombinasi, menggunakan doublestaining propidium iodide (PI) - annexin V dan flow cytometry. Sel MCF-7 diberi perlakuan tunggal secang (Se), lempuyang (Le) dan kombinasinya selama 24 jam. (A) Histogram sel apoptosis; (B) analisa % kematian sel apoptosis/nekrosis

Apoptosis atau kematian sel terprogram merupakan proses yang berperan penting dalam perkembangan organisme dan homeostasis jaringan. Dalam kondisi

patologis, terutama kanker, terjadi deregulasi ekspresi protein antiapoptosis sehingga sel terhindar dari kematian dan terus berproliferasi.²⁴ Sel kanker juga mengalami

disfungsi regulasi siklus sel, sehingga terjadi proliferasi yang tidak terkontrol dan atau terganggunya proses kematian sel terprogram. Penghambatan apoptosis selama proses karsinogenesis berperan sangat penting dalam perkembangan dan pertumbuhan sel kanker.²⁵ Berdasarkan profil *flow cytometry*, sinergisme kombinasi dalam penelitian ini terjadi melalui penghambatan siklus sel di fase G2/M oleh ekstrak kayu secang, dan percepatan induksi apoptosis oleh rimpang lempuyang.

KESIMPULAN

Kombinasi ekstrak etanolik kayu secang dan rimpang lempuyang menghasilkan efek sitotoksik yang sinergis. Sinergisme kombinasi terjadi melalui penghambatan siklus sel di fase G2/M oleh ekstrak kayu secang, dan percepatan induksi apoptosis oleh ekstrak rimpang lempuyang.

SARAN

Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengkaji aktivitas penghambatan metastasis yang dihasilkan oleh kombinasi secang dengan lempuyang.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Akhmad Syaikh, SKM, MS.c Kepala B2P2TO2T, yang telah memberikan dukungan fasilitas yang diperlukan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan artikel ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Che CT, Wang ZJ, Chow MSS, Lam CWK. Herb-herb combination for therapeutic enhancement and advancement: Theory, practice and future perspectives. *Molecules*. 2013;18(5):5125–41.
2. Ghoncheh M, Mohammadian-hafshejani A, Salehiniya H. Incidence and mortality of breast cancer and their relationship to development in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(14):6081–7.
3. Aung TN, Qu Z, Kortschak RD, Adelson DL. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):1–20.
4. Nirmal NP, Rajput MS, Prasad RGS V, Ahmad M. Brazilin from *Caesalpiniasappan* heartwood and its pharmacological activities: {A} review. *Asian Pac J Trop Med*. 2015;8(6):421–30.
5. Haryanti S, Murwanti R, Putri H, Ilmawati GPN, Pramono S, Meiyanto E. Different 4T1 cells migration under *Caesalpinia sappan* L. and *Ficus septica* Burm.f ethanolic extracts. *Indonesia J Cancer Chemoprevention*. 2017 Feb;8(1):21–6.
6. Haryanti S, Pramono S, Murwanti R, Meiyanto E. The synergistic effect of doxorubicin and ethanolic extracts of *Caesalpinia sappan* L. wood and *Ficus septica* Burm.f. leaves on viability, cell cycle progression, and apoptosis induction of MCF - 7 cells. *Indonesian Journal of Biotechnology*. 2016;21(1):29–37.
7. Jenie RI, Handayani S, Susidarti RA, Udin Z, Meiyanto E. Cytotoxic and antimetastasis effect of ethyl acetate fraction from *Caesalpinia sappan* L. on MCF-7/HER2 cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention*. 2017 Feb;8(1):42-50.
8. Yob NJ, Jofrry SM, Affandi MMRMM, Teh LK, Salleh MZ, Zakaria ZA. *Zingiber zerumbet* (L.) Smith: A review of its ethnomedicinal, chemical, and pharmacological uses. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011 Mar;543216.
9. Koga AY, Beltrame FL, Pereira A V. Several aspects of *Zingiber zerumbet*: a review. *Rev Bras Farmacogn*. 2016 Mei;26(3):385–91.
10. Murakami A, Tanaka T, Lee J-Y, Surh Y-J, Kim HW, Kawabata K, et al. Zerumbone, a sesquiterpene in subtropical ginger, suppresses skin tumor initiation and promotion stages in ICR mice. *Int J Cancer*. 2004 Jul;110(4):481–90.
11. Nakamura Y, Yoshida C, Murakami A, Ohigashi H, Osawa T, Uchida K. Zerumbone, a tropical ginger sesquiterpene, activates phase II drug metabolizing enzymes. *FEBS Letters*. 2004;572(1–3):245–50.
12. Tsuboi K, Matsuo Y, Shamoto T, Shibata T, Koide S, Morimoto M, et al. Zerumbone

- inhibits tumor angiogenesis via NF- κ B in gastric cancer. *Oncol Rep.* 2014;31(1):57–64.
13. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays [Internet]. Assay guidance manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013 [dikutip 19 Maret 2018]. Tersedia pada: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433>
 14. Hemalatha K, Sunitha D, Satyanarayana D. Cytotoxic activity of ethanolic extracts of *Caesalpinia sappan* Linn and *Anona squamosa* Linn in A-549 cell line. *Int J Pharm Ind Res.* 2011;01(04):318–21.
 15. Hung TM, Dang NH, Dat NT. Methanol extract from Vietnamese *Caesalpinia sappan* induces apoptosis in HeLa cells. *Biol Res.* 2014;47(1):1-5.
 16. Nurzijah I, Putri DDP, Rivanti E, Meiyanto E. Secang (*Caesalpiniasappan* L.) heartwood ethanolic extract shows activity as doxorubicin co-chemotherapeutic agent by apoptotic induction on T47D breast cancer cells. *Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention.* 2012;3(2):377–84.
 17. Norfazlina MN, Zuraina MYF, Rajab NF, Nazip SM, Rumiza AR, Zaila CFS, et al. Cytotoxicity study of *Nigella sativa* and *Zingiber zerumbet* extracts, thymoquinone and zerumbone isolated on human myeloid leukemia (HL60) cell. In: *The Open Conference Proceedings Journal.* 2014; 99–107.
 18. Handayani S, Susidarti RA, Jenie RI, Meiyanto E. Two active compounds from *Caesalpinia sappan* L. in combination with cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest on WiDr cells. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(3):375–80.
 19. Kim B, Kim S-H, Jeong S-J, Sohn EJ, Jung JH, Lee MH, et al. Brazilin induces apoptosis and G2/M arrest via inactivation of histone deacetylase in multiple myeloma U266 cells. *J Agric Food Chem.* 2012 Oct;60(39):9882–9.
 20. Kelley MR, Logsdon D, Fishel ML. Targeting DNA repair pathways for cancer treatment: what's new? *Futur Oncol.* 2014;10(7):1215–37.
 21. Carrassa L. Cell cycle, checkpoints and cancer. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2014;18(1):67–75.
 22. Crowley LC, Marfell BJ, Scott AP, Waterhouse NJ. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Nov;(11):953–7.
 23. Sithara T, Dhanya BP, Arun KB, Sini S, Dan M, Kokkuvayil Vasu R, et al. Zerumbone, a cyclic sesquiterpene from *Zingiber zerumbet* induces apoptosis, cell cycle arrest, and antimigratory effects in SW480 colorectal cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2018 Jan;66(3):602–12.
 24. Mohammad RM, Muqbil I, Lowe L, Yedjou C, Hsu H-Y, Lin L-T, et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35:S78–103.
 25. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int.* 2014:150845.

Uji Aktivitas Antiseptik Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* Linn.) dalam Obat Kumur terhadap *Staphylococcus aureus* secara in Vitro

Antiseptic Activity Test Extract of Betel Leaf (*Piper betle* Linn.) in Mouthwash Against *Staphylococcus aureus* in Vitro

Almasyhuri*, Dian Sundari

Pusat Penelitian dan Pengembangan Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Jakarta, Indonesia
*E-mail: almasyhuri@ymail.com

Diterima: 28 Agustus 2018

Direvisi: 26 September 2018

Disetujui: 23 Oktober 2018

Abstrak

Daun sirih (*Piper betle* Linn.) sangat populer dalam kehidupan masyarakat di Indonesia. Daun sirih berguna untuk kesehatan gigi dan sering digunakan sebagai obat kumur; menghilangkan bau badan dan mulut; mengobati sariawan, mimisan, gatal-gatal, koreng dan keputihan pada wanita. Rongga mulut merupakan tempat berkumpulnya bakteri. Bila terjadi penurunan imunitas bakteri yang semula bersifat komensal dapat berubah menjadi patogen sehingga dapat menimbulkan infeksi. Bakteri yang biasa terdapat dalam rongga mulut salah satunya adalah *Staphylococcus aureus*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menempati dan membentuk biofilm pada biomaterial yang menyebabkan resistensi terhadap antimikroba, dengan demikian membuat mereka sulit untuk memberantas host yang terinfeksi *S. Aureus*. Berbagai penelitian terdahulu melaporkan adanya *multidrug* resisten dari golongan *S.aureus* yang dapat menimbulkan kematian, sehingga untuk mengatasi bakteri tersebut dilakukan penelitian aktivitas antiseptik ekstrak etanol daun sirih terhadap *S.aureus* secara in vitro. Pengujian dilakukan dengan metode koefisien fenol menggunakan bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Sebagai pembanding adalah obat kumur dengan povidon iodine yang beredar dipasaran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa obat kumur yang mengandung ekstrak etanol daun sirih memiliki nilai koefisien fenol 1,87 sedangkan obat kumur povidon iodine mempunyai nilai koefisien fenol 1,0. Terlihat bahwa obat kumur yang mengandung ekstrak etanol daun sirih mempunyai efektifitas antiseptik lebih tinggi daripada obat kumur pembandingnya.

Kata kunci : Antiseptik; Ekstrak daun sirih; Obat kumur; *S. aureus*.

Abstract

Betle leaf (*Piper betle* Linn.) is very popular in Indonesia. Betle leaf is useful for dental health and frequently used as mouthwash; to eliminate body and mouth odor; treats mouth ulcer, nosebleed, itching, ulceration and vaginal discharge in women. An oral cavity is a place for bacteria. If there is a bacterial immunity reduction, that was originally commensal bacteria can turn into a pathogen that cause infection. One of bacteria that commonly found in the oral cavity is *Staphylococcus aureus*. The bacteria have the ability to occupy and form biofilm on biomaterials that cause resistant to antimicrobials, thus making it difficult to eradicate host that is infected by *S. aureus*. Previous study reported a multidrug resistant of *S. aureus* that could cause death, that to overcome it, betle leaves extract ethanol in vitro antiseptic test to *S.aureus* was conducted. The test was conducted by the phenol coefficient method using *S. aureus* ATCC 25923 bacteria. Povidone iodine mouthwash that is circulated in the market is used as a comparison. The results showed that mouthwash containing ethanol extract of betle leaf had a phenol coefficient value of 1.87 while povidone iodine mouthwash as a comparison, had a phenol coefficient of 1.0. Mouthwash containing ethanol extract of betle leaf had higher antiseptic effectiveness than the comparative mouthwash.

Keywords: Antiseptic; Betle leaf extract; Mouthwash; *S. aureus*.

PENDAHULUAN

Sirih (*Piper betle* Linn.) termasuk familia Piperaceae. Tradisi makan sirih sangat populer dalam kehidupan masyarakat di Indonesia. Sirih berguna untuk kesehatan gigi dan menghilangkan bau badan dan bau mulut yang tidak sedap, sebagai obat kumur, sariawan, mimisan, gatal-gatal, koreng dan mengobati keputihan pada wanita. Daun sirih mempunyai aroma yang khas dengan kandungan minyak atsiri 4,2%.^{1,2} Komponen utama minyak atsiri adalah senyawa fenol yaitu betlephenol dan kavikol yang merupakan senyawa aromatik, dan senyawa turunannya seperti kavibetol, karvakol, eugenol, allilpyrocatechol dan ketekin. Kavikol merupakan komponen paling banyak ditemui pada daun sirih dan menyebabkan bau khas sirih. Selain itu daun sirih mengandung suatu seskuiterpen, diastase, tannin, gula dan pati. Senyawa fenol yang terkandung dalam minyak atsiri daun sirih bersifat antimikroba dan antijamur yang kuat dan efektif menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri.^{2,3}

Rongga mulut dan gigi merupakan bagian tubuh yang memiliki fungsi penting dalam kaitannya dengan kesehatan tubuh. Dengan menjaga kesehatan mulut dan gigi secara tidak langsung telah mengurangi resiko terkena penyakit yang menyangkut kesehatan tubuh khususnya kesehatan rongga mulut dan gigi. Masalah mulut yang sering muncul adalah bau mulut, sariawan dan infeksi mulut, selain itu ditemukan pula masalah lain seperti mulut kering, radang gusi dan kanker mulut.⁴

Rongga mulut merupakan tempat berkumpulnya bakteri, bila terjadi penurunan imunitas bakteri yang semula bersifat komensal dapat berubah menjadi patogen sehingga dapat menimbulkan infeksi. Bakteri yang biasa terdapat dalam rongga mulut salah satunya adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menempati dan membentuk biofilm pada biomaterial yang menyebabkan resistensi terhadap antimikroba, dengan demikian membuat

mereka sulit untuk memberantas host yang terinfeksi.⁵ *S. aureus* saat ini juga menjadi penyebab utama infeksi nosokomial. Karena banyaknya pasien yang dirawat di luar rumah sakit, maka penyebarannya dimasyarakat juga semakin meningkat. Penelitian terdahulu melaporkan adanya multidrug resisten dari golongan *S.aureus* yang dapat menimbulkan kematian, sehingga berbagai penelitian untuk mengatasi hal ini sangat diperlukan.⁶ Untuk mengatasi bakteri tersebut dilakukan penelitian aktivitas antiseptik obat kumur terhadap bakteri *S. aureus*.

Obat kumur adalah sediaan berupa larutan yang digunakan untuk membersihkan rongga mulut dan gigi secara lebih bersih dibandingkan dengan sikat gigi biasa. Obat kumur memiliki kandungan dasar berupa air, agen pembersih, bahan pengharum, pewarna dan alkohol.^{7,8} Berdasarkan kandungan bahan aktif yang terkandung di dalamnya, obat kumur dapat digolongkan menjadi beberapa jenis, yaitu : obat kumur yang mengandung bahan aktif antiseptik/antimikroba seperti *povidone iodine*, *cetylpyridinium chloride* berfungsi mengontrol pertumbuhan bakteri pada mulut, mengurangi plak, menyembuhkan radang gusi, dan menghilangkan bau mulut. Ada obat kumur yang bahan aktifnya *fluoride*, berfungsi membantu mencegah terbentuknya lubang gigi dan mencegah kerusakan gigi. Bahan pewangi bisa menjadi salah satu kandungan pada obat kumur. Bahan aktif ini akan berperan sebagai bahan kimia yang mampu menetralsir bau mulut.⁸

Obat kumur yang beredar di pasaran adalah obat kumur yang mengandung bahan kimia seperti alkohol dan bahan antiseptik/antimikroba. Alkohol sebagai zat pelarut dapat menimbulkan beberapa efek seperti sensasi terbakar ketika berkontak dengan mukosa dan rasa kering pada mukosa mulut. Penggunaan yang berlebihan bahan antiseptik obat kumur akan merusak keseimbangan bakteri dalam mulut karena kandungan alkohol dan antiseptiknya membunuh mikroorganisme dalam mulut termasuk mikroorganisme normal yang ada

di dalam mulut.⁹ Efek penggunaan obat kumur berbahan kimia sebenarnya dapat diminimalisir dengan menggunakan bahan alami, salah satu bahan alami yang dapat digunakan yaitu daun sirih. Kandungan yang terdapat pada daun sirih berupa minyak atsiri yang didalamnya terdapat senyawa fenol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada mulut.^{9,10}

Telah dilakukan uji daya antiseptik ekstrak etanol daun sirih formula obat kumur terhadap bakteri *S. aureus* secara in vitro. Pengujian dilakukan dengan metode koefisien fenol menggunakan bakteri *S. aureus* ATCC 25923. Sebagai pembanding digunakan obat kumur yang beredar di pasaran dengan bahan aktif povidon iodine 1%.

METODE

Penelitian ini merupakan eksperimen laboratorium yang dilakukan di laboratorium mikrobiologi Gizi Bogor. Pengujian ekstrak etanol daun sirih sebagai antiseptik dilakukan dengan metode koefisien fenol menggunakan bakteri *S. aureus* ATCC 25923.

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari oven (Mettler), rotary evaporator (Buchi) dan tabung reaksi steril,

Bahan uji adalah daun sirih (*Piper betle* Linn.) yang didapat dari daerah Depok. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 berumur 24 jam dari Laboratorium Teknologi Bio Industri PUSPITEK Serpong. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol; Nutrien Agar (oxid), Nutrien Broth; Tween 80 (Merck), Span 80 Gliserin; fenol (Merck), NaCl (Merck), aquades steril, obat kumur yang mengandung zat aktif Povidon iodine 1%

Cara kerja

Pembuatan ekstrak etanol daun sirih

Sebanyak 3 kg daun sirih segar dibersihkan dan dicuci dengan air, kemudian dirajang halus dan dijemur di

bawah sinar matahari langsung hingga kering. Dari 3 kg daun sirih segar menghasilkan simplisia sebanyak 1,5 kg kemudian simplisia dihaluskan hingga menjadi serbuk. Serbuk daun sirih ini diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 70% sehingga didapat ekstrak kental untuk kemudian dihitung rendemen ekstrak yang diperoleh.⁸

Pembuatan formula obat kumur dengan ekstrak dan tanpa ekstrak daun sirih

Gliserin sebanyak 20 ml ditambahkan ke dalam 2 g ekstrak daun sirih sambil diaduk hingga merata, kemudian ditambahkan 0,5 ml Tween 80 dan 1 ml span 80, aduk campuran hingga larut dan 100 ml air ditambahkan agar larutan menjadi homogen. Formulasi obat kumur tanpa ekstrak daun sirih dibuat dengan cara gliserin sebanyak 20 ml ditambahkan 0,5 ml Tween 80 dan 1 ml span 80, kemudian diaduk, tambahkan 100 ml air, aduk agar larutan menjadi homogen.

Pembuatan stok bahan uji formula obat kumur ekstrak dan tanpa ekstrak daun sirih

Dari hasil pembuatan formula obat kumur ekstrak dan obat kumur tanpa ekstrak daun sirih di atas, masing-masing diambil sebanyak 5 ml sebagai stok bahan uji.

Pembuatan stok obat kumur mengandung povidon iodine sebagai pembanding

Sebagai pembanding antiseptik digunakan obat kumur yang mengandung bahan aktif *povidon iodine* 1%. Diambil 5 ml obat kumur povidon iodine sebagai stok bahan uji.

Pembuatan larutan stok fenol

Larutan stok fenol dibuat dengan cara melarutkan 5 gram kristal fenol dengan 100 ml air suling steril, maka didapat larutan fenol dengan konsentrasi 5%.^{11,12}

Pengenceran obat kumur ekstrak daun sirih dan obat kumur povidon-iodine

Sebanyak 1 ml larutan obat kumur ekstrak etanol 70% daun sirih dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril kemudian diencerkan dengan air suling steril dengan berbagai konsentrasi yaitu 1:20; 1:30; 1:40; 1:50; 1:60; 1:70; 1:80; 1:90; 1:100; 1:110; 1:150; 1:200; 1:250. Larutan tersebut dihomogenkan kemudian dipindahkan ke tabung steril lain masing-masing sebanyak 5 ml. Lakukan pengenceran pada obat kumur povidon iodine dengan cara yang sama seperti pengenceran obat kumur ekstrak daun sirih.^{13,14,15}

Pengenceran fenol 5%

Sepuluh tabung steril disiapkan dengan diberi nomor (no.) 1-10. Tabung 1-5 diberi air suling steril sebanyak 5; 6; 7; 8 dan 9 ml. Kemudian dari tabung 1-5 masing-masing diberi pengenceran fenol (1:20) sebanyak 2 ml dan homogenkan. Sebanyak 5 ml larutan pada tabung 1 dipindahkan ke dalam tabung no. 6, demikian juga dari tabung no. 2 ke tabung no. 7; dari tabung no. 3 ke tabung no. 8; dari tabung no. 4 ke tabung no. 9 dan dari tabung no. 5 ke tabung no. 10, maka didapat pengenceran larutan fenol 1:70; 1:80; 1:90; 1:100; dan 1:110.^{14,15}

Uji koefisien fenol larutan stok (stok fenol 5%, obat kumur ekstrak etanol 70% daun sirih, obat kumur tanpa ekstrak daun sirih, obat kumur povidon iodine)

Sebanyak 5 ml stok fenol 5% dimasukkan dalam tabung steril lalu ditambahkan 0,5 ml biakan kaldu bakteri *S. aureus*, dihomogenkan kemudian dalam

waktu 5, 10, 15 menit dipindahkan satu mata ose ke tabung yang berisi kaldu nutrien broth (NB) steril, dihomogenkan lalu diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30-37 °C, diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada setiap tabung. Uji koefisien fenol untuk stok obat kumur ekstrak daun sirih, stok obat kumur tanpa ekstrak daun sirih dan stok obat kumur povidon-iodine terhadap *S. aureus* perlakuannya sama dengan uji koefisien fenol pada stok fenol 5%.¹⁵

Uji koefisien fenol dari pengenceran fenol 5%, obat kumur ekstrak daun sirih dan obat kumur povidon iodine

Sebanyak 5 ml larutan pengenceran fenol 5% di atas dimasukkan ke dalam tabung steril dan ditambahkan 0,5 ml biakan kaldu bakteri *S. aureus* kemudian dihomogenkan. Dalam waktu 5, 10, 15 menit dipindahkan satu mata ose ke dalam tabung yang berisi kaldu NB steril, dihomogenkan dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 30-37 °C, kemudian diamati terlihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada setiap tabung. Uji koefisien fenol untuk pengenceran obat kumur ekstrak daun sirih, pengenceran obat kumur povidon-iodine perlakuannya sama dengan uji koefisien fenol pada pengenceran fenol 5%.¹⁵

Hasil uji koefisien fenol adalah hasil bagi pengenceran tertinggi dari bahan uji terhadap pengenceran larutan fenol yang mematikan bakteri dalam 10 menit tetapi tidak mematikan dalam 5 menit.¹⁵ Dalam rumus sebagai berikut:

$$\text{Koefisien fenol} = \frac{\text{Pengenceran tertinggi bahan uji yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam 5 menit}}{\text{Pengenceran tertinggi larutan fenol yang mematikan dalam waktu 10 menit tetapi tidak mematikan dalam 5 menit}}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi dengan cara maserasi dari 3 kg daun sirih segar dengan etanol 70% didapat 24 gram ekstrak kental. Rendemen ekstrak daun sirih dapat dilihat pada Tabel 1.

Hasil ekstraksi daun sirih menggunakan etanol 70% memberikan rendemen 4,8%. Rendemen yang diperoleh cukup kecil dimana rendemen yang kecil akan menghasilkan ekstrak yang sedikit. Penelitian sebelumnya memperoleh rendemen ekstrak etanol daun sirih hijau dengan cara maserasi sebesar 14,16%.¹⁶ Lebih rendahnya rendemen pada penelitian ini dibanding penelitain sebelumnya kemungkinan dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain ukuran partikel, jenis pelarut, metode, dan lama ekstraksi.¹⁷

Penggunaan etanol 70% dalam pembuatan ekstrak dikarena kapang dan kuman sulit tumbuh, tidak beracun, netral dan absorbsinya bagus. Etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan dan hanya membutuhkan panas sedikit untuk pemekatannya. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak

atsiri, glikosida, kurkumin, antrakinin, flavonoid, steroid, damar dan klorofil, sedangkan lemak, malam, tanin dan saponin hanya sedikit larut.^{8,11}

Pengamatan aktivitas antiseptik stok fenol 5%, stok formula obat kumur dengan ekstrak daun sirih, stok obat kumur povidon iodine dan stok formula obat kumur tanpa ekstrak daun sirih terhadap *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pada Tabel 2 stok fenol 5%, stok formula obat kumur ekstrak daun sirih dan stok obat kumur povidon iodine pada semua waktu kontak dapat mematikan bakteri, sedangkan pada formula obat kumur tanpa ekstrak daun sirih terlihat adanya pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hal tersebut, larutan stok fenol, obat kumur ekstrak daun sirih, dan obat kumur povidon iodine bersifat antiseptik terhadap bakteri *S. aureus*. Formula obat kumur tanpa ekstrak daun sirih tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, dan untuk selanjutnya formula obat kumur tanpa ekstrak daun sirih ini tidak digunakan lagi untuk pengujian selanjutnya.

Tabel 1. Rendemen ekstrak etanol 70% daun sirih (*Piper betle* Linn.)

Bahan ekstrak	Daun segar (gram)	Serbuk (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
Daun sirih	3000	1500	24	4,8

Tabel 2. Pengamatan aktivitas antiseptik ke empat stok bahan uji terhadap bakteri *S. aureus* pada menit ke-5, 10 dan 15

Bakteri	Waktu kontak											
	Menit ke-5 Bahan uji				Menit ke-10 Bahan uji				Menit ke-15 Bahan uji			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

Keterangan :

- : tidak mengandung bakteri *S. aureus*

+ : mengandung bakteri *S. aureus*

Bahan uji 1 : stok fenol 5%

Bahan uji 2 : stok formula obat kumur ekstrak daun sirih.

Bahan uji 3 : stok obat kumur Povidon iodine.

Bahan uji 4 : stok formula obat kumur tanpa ekstrak daun sirih.

Tabel 3. Hasil pengamatan aktivitas antiseptik obat kumur ekstrak etanol daun sirih dan fenol terhadap bakteri *S. aureus*

Pengenceran	Obat kumur ekstrak daun sirih									Fenol								
	Waktu kontak dan ulangan									Waktu kontak dan ulangan								
	Menit ke-5			Menit ke-10			Menit ke-15			Menit ke-5			Menit ke-10			Menit ke-15		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1:20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1:90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:150	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : - : tidak mengandung bakteri *S. aureus*
 + : mengandung bakteri *S. aureus*
 1,2,3: ulangan 1, 2 dan 3

Tabel 4. Hasil pengamatan aktivitas antiseptik obat kumur povidon iodine dan fenol terhadap bakteri *S. aureus*

Pengenceran	Obat kumur povidon iodine									Fenol								
	Waktu kontak dan ulangan									Waktu kontak dan ulangan								
	Menit ke-5			Menit ke-10			Menit ke-15			Menit ke-5			Menit ke-10			Menit ke-15		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1:20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:80	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
1:90	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:100	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:110	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:150	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1:250	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan : - : tidak mengandung bakteri *S. aureus*
 + : mengandung bakteri *S. aureus*
 1,2,3: ulangan 1, 2 dan 3

Fenol merupakan bahan kimia yang dapat membunuh mikroorganisme, germisidal kuat yang telah digunakan dalam jangka waktu panjang. Fenol (C₆H₅OH) merupakan zat pembaku daya antiseptik sehingga daya antiseptik dinyatakan dengan koefisien fenol.

Koefisien fenol merupakan sebuah nilai aktivitas germisidal suatu antiseptik dibandingkan dengan efektivitas germisidal fenol. Aktivitas germisidal adalah kemampuan suatu senyawa antiseptik untuk membunuh mikroorganisme dalam jangka waktu tertentu.¹⁴

Untuk mengetahui efektivitas antiseptik terhadap bakteri *S. aureus*, dilakukan pengamatan terhadap aktivitas antiseptik pada pengenceran formula obat kumur ekstrak daun sirih dan pengenceran obat kumur povidon iodine terhadap fenol pada menit ke-5, ke-10, dan ke-15 menit dengan 3 kali pengulangan. Hasil pengamatan aktivitas antiseptik obat kumur ekstrak daun sirih dan obat kumur povidon iodine terhadap fenol dapat dilihat pada Tabel 3 dan 4.

Salah satu cara pengujian antiseptik adalah dengan metode pengenceran. Kekuatan antiseptik pada metode tersebut dinyatakan dengan koefisien fenol.⁸ Komponen utama minyak atsiri dari ekstrak daun sirih adalah senyawa turunan fenol yaitu betle phenol dan kavikol. Senyawa fenol yang terkandung daun sirih bersifat antimikroba dan antijamur yang kuat dan efektif menghambat pertumbuhan beberapa jenis bakteri.^{2,3} Efektivitas senyawa antiseptik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi dan lama paparannya. Semakin tinggi konsentrasi dan semakin lama paparan akan meningkatkan efektivitas senyawa antiseptik.^{3,18} Hasil penelitian lain menunjukkan senyawa kavikol yang memberikan bau khas daun sirih, memiliki daya membunuh bakteri lima kali lebih besar dari fenol biasa.¹³

Hasil pengamatan pada Tabel 3 dilanjutkan dengan menghitung koefisien fenol. Fenol memberikan efektivitas terhadap antiseptik pada pengenceran 1:80 sedangkan untuk obat kumur ekstrak daun sirih pada pengenceran 1:150. Untuk obat kumur ekstrak daun sirih menit ke-10 pada semua ulangan menghasilkan kematian bakteri, tetapi pada menit ke-5 bakteri yang tidak mati hanya pada ulangan 1, sedangkan pada ulangan ke-2 dan ke-3 bakteri *S. aureus* mati. Oleh karena itu, perhitungan koefisien fenol tidak dapat dihitung. Pengenceran tertinggi obat kumur ekstrak daun sirih terjadi pada pengenceran 1:200 tetapi bakteri yang mati pada menit ke-10 dari tiga kali ulangan hanya terjadi satu kali yaitu pada ulangan ke-3 saja sehingga

diambil kesimpulan pengenceran tertinggi obat kumur ekstrak daun sirih ini efektif sebagai antiseptik pada pengenceran 1:150 dimana pada menit ke-10 bakteri *S. aureus* mati pada ke tiga ulangan obat kumur ekstrak daun sirih.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pengenceran obat kumur dengan povidon iodine mempunyai sifat antiseptik yang setara dengan fenol (Tabel 4). Pada pengenceran 1:80, baik obat kumur povidon iodine maupun fenol pada menit ke-10 dapat menyebabkan kematian bakteri, sedangkan obat kumur ekstrak daun sirih memberikan efektivitas antiseptik pada pengenceran 1:150.

Hasil pengamatan tersebut dilanjutkan dengan menghitung koefisien fenol untuk masing-masing obat kumur. Nilai koefisien fenol obat kumur ekstrak daun sirih adalah 1,87 (lebih dari 1) sedangkan untuk fenol dan obat kumur povidon iodine adalah 1. Hal ini menunjukkan formula obat ekstrak daun sirih mempunyai efektivitas antiseptik yang lebih baik dibandingkan dengan fenol dan obat kumur povidon iodine.

Penelitian terdahulu dari ekstrak daun sirih menyatakan khasiat antiseptik dan antibakteri ekstrak daun sirih juga terlihat pada formulasi sediaan pasta gigi yang mengandung ekstrak daun sirih dan ekstrak kulit jeruk lemon dimana formulasi pasta gigi ini dapat menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*, dan senyawa yang berperan sebagai antiseptik ini adalah kandungan polifenol dan tannin yang terdapat dalam daun sirih.¹⁴ Penelitian lainnya telah pula dilakukan terhadap pengamatan sediaan gel ekstrak etanol 96% daun saga 5%, dimana pada menit ke-10 ekstrak tersebut dapat mematikan bakteri *S. aureus* dan pada menit ke-5 bakteri tersebut tetap ada dalam sediaan.¹⁹ Pengujian terhadap toksisitas akut ekstrak daun sirih telah pula dilakukan oleh Sari dimana ekstrak etanol daun sirih masuk dalam kategori praktis tidak toksik.²⁰ Dari hasil penelitian ini dan peneliti sebelumnya dapat dikatakan formulasi obat kumur dengan bahan ekstrak etanol daun sirih ini efektif

sebagai antiseptik dan aman digunakan sebagai obat kumur.

KESIMPULAN

Obat kumur ekstrak etanol daun sirih secara in vitro efektif sebagai antiseptik terhadap bakteri *S. aureus*. Berdasarkan nilai koefisien fenol, obat kumur dengan ekstrak daun sirih mempunyai aktivitas antiseptik yang lebih tinggi dibandingkan dengan formula obat kumur povidon iodine yang beredar di masyarakat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Rismawati, Drs. Erwin Affandi, dan staf lain yang telah bekerja melakukan penelitian ini, membantu dan bekerja sama dengan baik sehingga penelitian ini dapat terlaksana dan selesai dengan baik.

DAFTAR RUJUKAN

1. Iptika A. Keterkaitan kebiasaan dan kepercayaan mengunyah sirih pinang dengan kesehatan gigi. *Jurnal Unair*. 2014;3(1): 64-69.
2. Sumampouw O.J. Uji in vitro aktivitas antibakteri dari daun sirih. *Jurnal Biomedik*. 2010;2(3):187-93.
3. Dhika TS. Perbandingan efek antibakteri berbagai konsentrasi daun sirih (*Piper betle* Linn) terhadap *Streptococcus mutans*. [Skripsi]. Universitas Diponegoro; 2007.
4. Arifin M.F, Nurhidayati L, Syarmalina, Rensy. Formulasi *edible* film ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) sebagai antihalitosis. *Prosiding Kongres Ilmiah ISFI XVII*; Desember 2009:7-9.
5. Bhattacharya S, Bir R, Majumdar T. Evaluation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a tertiary care hospital, Tripura, Northeast India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2015 Sept;9(9):1-5.
6. ECDC/EMEA The bacterial challenge: time to react. Stockholm: European center for diseaseprevention and control; 2009.
7. Suratmi, Juanita F. Pengaruh kumur infusum daun sirih (*Piper batle* L.) terhadap oral hygiene pasien bed rest di ruang Dahlia RSUD dr. Soegiri. *Surya*. 2016;08(03): 16-20.
8. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Indonesia*. Edisi 5. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2014.
9. Toar AI, Posangi J, Wowor V. Daya hambat obat kumur cetylpyridinium chloride dan obat kumur daun sirih terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Jurnal Biomedik*. 2013 ;5(1):163-8.
10. Ardianti GM. Efektivitas ekstrak daun sirih sebagai obat kumur terhadap penurunan plak indeks. [Skripsi]. Universitas Negeri Semarang; 2011.
11. Rachma M. Formulasi sediaan obat kumur yang mengandung minyak atsiri temulawak (*Curcuma xanthorriza*) sebagai antibakteri *Porphyromonas gingivatis* penyebab bau mulut. [Skripsi]. Universitas Indonesia; 2010.
12. Ansel H. *Pengantar bentuk sediaan farmasi*. Editor. Penerbit Universitas Indonesia,[diterjemahkan oleh Ibrahim F.] Edisi 4. Jakarta: 2005.
13. Reveny J. Daya antimikroba ekstrak dan fraksi daun sirih merah (*Piper betle* Linn.). *Jurnal ILMU DASAR*. Januari 2011;12(1):6-12.
14. Nurdianti L, Annysyia WF, Pamela YM, Novianti E, Audina M, Kurniasari E. Formulasi sediaan pasta gigi herbal kombinasi ekstrak daun sirih (*Piper betle*) dan kulit buah jeruk lemon (*Citrus limon* Burm.f) sebagai pemutih dan antiseptik pada gigi. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 2016;16(1): 177-187
15. Waluyo L. *Teknik dasar dalam mikrobiologi*. Malang: UMM Press; 2008.
16. Vifta RS,, Wansyah MA, Hati AK. perbandingan total rendemen dan skrining antibakteri ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) secara mikrodilusi. *Journal of Science and Applicative Technology* . 2017;I(2):87-93.
17. Salamah N, Rozak, Abror MA. Pengaruh metode penyarian terhadap kadar alkaloid total daun jembirit (*Tabernaemontana sphaerocarpa* BL) dengan metode Spektrofotometri Visibel, *Pharmaciana*. Mei 2017;7(1):113-22.

18. Saraswati D. Pengaruh konsentrasi ekstrak daun sirih terhadap daya hambat *Escherichia coli*. Jurnal Health & Sport. 2011;3(2):285-362.
19. Pertiwi RD, Kristanto J, Praptiwi GA. Uji aktivitas antibakteri formulasi gel untuk sariawan dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* Linn.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Jurnal Ilmiah Manuntung. 2016;2(2):239-47.
20. Sari WP. Uji toksisitas akut campuran ekstrak etanol daun sirih (*Piper betle* L.) dan ekstrak kering gambir (*Uncaria gambir* R. terhadap mencit putih jantan. [Skripsi]. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah; 2010.

The Effect of Infusion of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. Leaves as Natural Preservative Chicken Meats

Efek Infusa Daun Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) sebagai Pengawet Alami Daging Ayam

Dwi Hartanti^{1*}, Asmiyenti Djaliasrin Djali¹, Nur Yulianingsih¹, Alwani Hamad²

¹Faculty of Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto, Indonesia

²Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering and Science, Universitas Muhammadiyah Purwokerto

*E-mail: dwhartanti@ump.ac.id

Diterima: 3 Januari 2019

Direvisi: 5 Februari 2019

Disetujui: 18 Februari 2019

Abstract

Syzygium polyanthum (Wight) Walp. (Indonesian bay leaf) is known for possessing antimicrobial activity that might be applied for natural food preservative. In this study, we analyzed the constituents of infusion of *S. polyanthum* leaves and evaluated its potency as the preservative of fresh chicken meats. The infusions were prepared with the method described in Indonesian Pharmacopeia. Phytochemical content of infusion of *S. polyanthum* leaves was analyzed by qualitative phytochemical screening using colorimetric methods. Its application for preservative of fresh chicken meat was evaluated based on its activity in inhibiting the growth of bacteria on the meats as well as the physical observation of the preserved meats. The infusion of *S. polyanthum* leaves contained flavonoids, tannins, and saponins. The infusion at the optimum concentration of 10% was capable of inhibiting bacterial growth on chicken meats and extending their shelf life up to 3 days in temperature of 3-7 °C.

Keywords: Chicken meat; *Syzygium polyanthum*; Infusion; Natural preservative

Abstrak

Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba, yang memungkinkan tumbuhan tersebut untuk dikembangkan menjadi pengawet makanan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan kimia dan potensi infusa daun salam sebagai pengawet alami daging ayam. Kandungan kimia infusa daun salam dianalisis dengan menggunakan metode penapisan fitokimia. Potensi infusa daun salam sebagai pengawet alami daging ayam ditentukan berdasarkan aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri pada daging ayam dan juga pengamatan terhadap kondisi fisik daging yang diawetkan. Penapisan fitokimia menunjukkan bahwa infusa daun salam mengandung flavonoid, tanin, dan saponin. Infusa daun salam pada konsentrasi optimum 10% mampu menghambat pertumbuhan bakteri pada daging ayam selama penyimpanan dan memperpanjang masa simpannya hingga 3 hari pada suhu 3-7 °C.

Kata kunci: Daging ayam; *Syzygium polyanthum*; Infusa; Pengawet alami

INTRODUCTION

Syzygium polyanthum (Wight) Walp. (Indonesian bay leaf, *salam* in Bahasa Indonesia, Myrtaceae), is a spice commonly used in Indonesian culinary, typically as a spice for savory meals. It has been known for possessing antimicrobial activity and traditionally used to treat bacterial-related diarrhea.^{1,2} The extracts of *S. polyanthum* leaves were active as antibacterials and antifungals, it was reported for growth inhibition activity of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*.³⁻⁶ The essential oil of this plant also demonstrated antimicrobial activity against *B. subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio cholera*.^{7,8} The antimicrobial activity exhibited by *S. polyanthum* leaves might support its use as a natural food preservative. The use of spices as a food preservative is desirable. We are familiar with the flavor, aroma, and color of those spices so their use might enhance the reception level of the preserved food.

Fresh chicken meat is largely consumed worldwide.⁹ Its nature that is rich with protein and water enables the growth of microbes at room temperature. Chicken meat is easily damaged by microbial activity, so preservation is needed to extend the shelf life and ensure the quality of chicken meat.¹⁰ *Campylobacter* spp., *E. coli*, and *Salmonella* sp. were reported as the common contaminants of fresh poultry meat.¹¹ The use of essential oil of spices as a natural preservative in chicken meat has been reported.¹²⁻¹⁵ However, the use of essential oils is not practical in the household setting for its preparation needs a special technique and relatively high cost expended. Hence, a more practical use of spices as natural fresh chicken meat needs to be studied further. In this paper, we report the chemical constituents and application of infusion of *S. polyanthum* leaves as a natural preservative of fresh chicken meat.

MATERIALS AND METHODS

Plant materials

The leaves of *S. polyanthum* were collected from Banjarnegara, Indonesia. The leaves were dried at room temperature for seven days and ground into a fine powder using grinding machine. The plant was authenticated at Laboratory of Botany, Jenderal Soedirman University, Purwokerto, Indonesia.

Infusion preparation

Infusion of *S. polyanthum* leaves was prepared according to a common infusion preparation method.¹⁶ Infusion was prepared in four concentrations: 0%, 5%, 10%, and 20%. Ten percent infusion was prepared by weighing 10 g of powdered dry leaves and then adding it with 100 ml of distilled water. Those materials were put in an infuse apparatus, and boiled for 15 minutes at a temperature of 90 °C. The infusion was filtered and its volume was fixed into 100 ml with distilled water. Five and 20% infusions were prepared accordingly. Zero percent of infusion was a boiled distilled water in the same manner and used as the negative control in this study.

Qualitative phytochemical screening

The main constituents of infusion of *S. polyanthum* leaves were analyzed with the standard qualitative phytochemical screening method.^{17,18} Briefly, Zn-chloride acid, sulphuric acid, Dragendorff's reagent, and ferric chloride were used to identify flavonoids, terpenoids, alkaloids, and tannins, respectively. Formation of foam method was used to identify saponins in infusion.

Preservative potency evaluation

The fresh chicken meat used in this study was obtained from a local market at Purwokerto, Indonesia. They were cut in size of 1x1x1 cm. Each piece was immersed in boiling water for 2 minutes to reduce the

number of the microorganisms on their surfaces. Meats were placed in 100 ml of 4 different concentrations of infusion of *Syzygium polyanthum* leaves under sterile condition, they were 0%, 5%, 10%, and 20%, respectively. The meats preserved in the infusion were stored at a temperature of 3-7 °C. On day 3, 6, 9, and 12, the bacterial growth on the meats was determined and their physical appearance was evaluated. On the respective observation days, meat from each cube was put in 25 ml of sterile nutrient broth (NB) medium and then homogenized for a minute. One ml of suspension was transferred into 9 ml of sterile NB and then incubated in temperature of 37 °C for 24 hours. The optical densities of cultured bacterial suspensions were recorded with UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 600 nm for evaluating the indirect enumeration of bacterial growth. One ml of first mentioned suspension was also cultured on 15 ml of nutrient agar (NA) to observe the direct growth of bacteria. The physical observation of the preserved meats includes the evaluation of odor, texture, and formation of slime to determine the shelf life of the meats compared to that treated with the negative control.^{19,20} All the works were replicated 3 times.

Statistical analysis

Means separation of the optical densities of cultured bacterial suspensions in NB was accomplished by Duncan's multiple range tests. Significance was evaluated at p-value < 0.05. Statistical analysis was conducted by

the general procedures of SPSS Statistics v.17 (SPSS Inc.).

RESULT AND DISCUSSION

Infusion of *S. polyanthum* leaves used in this study contained tannins, flavonoids, and saponins (Table 1). Water, as the solvent in our study is a strongly polar compound, extracted flavonoids and tannins which are relatively polar compounds contained in leaves of *S. polyanthum*. A less polar ethanolic extract of this plant contains alkaloids, saponins, quinines, phenols, triterpenoids, steroids, and flavonoids.²¹ Another report mentioned that the ethanolic extract of the plant obtained from Samarinda-Indonesia contains carbohydrates, tannins, alkaloids, steroids, triterpenoids, and flavonoid.²² Saponins were previously reported as the main constituents of infusion of *S. polyanthum* leaves grown in Bali.¹⁹

The antimicrobial activity of flavonoids, tannins, and saponins has been reported. Tannins from leaves of *Samanea saman* was responsible for its activity against *E. coli*.²³ Another report also mentioned that polyphenol compounds including tannins and flavonoids from *Jatropha curcas* were the active compounds that supporting its use as an antimicrobial agent against *S. aureus*.²⁴ Hence, those three groups of compounds contained in the infusion of *S. polyanthum* leaves might be responsible for the antibacterial activity and further meat preservative potency.

Table 1. The result of qualitative phytochemical screening analysis of infusion of *S. polyanthum* leaves

Constituents	Reagents	Results		Conclusion
		Positive	Observed	
Flavonoids	Zn-HCl	formation of a red color	a red hue was formed	positive
Terpenoids	H ₂ SO ₄	formation of the transparent ring on the surface of the upper layer	brown color in the upper layer was formed	negative
Alkaloids	Dragendorf	formation of a brown color	orange precipitation was observed	negative
Tannins	FeCl ₃	formation of dark green color	a dark green hue was observed	positive
Saponins	-	formation of stable foam	the stable foam was formed	positive

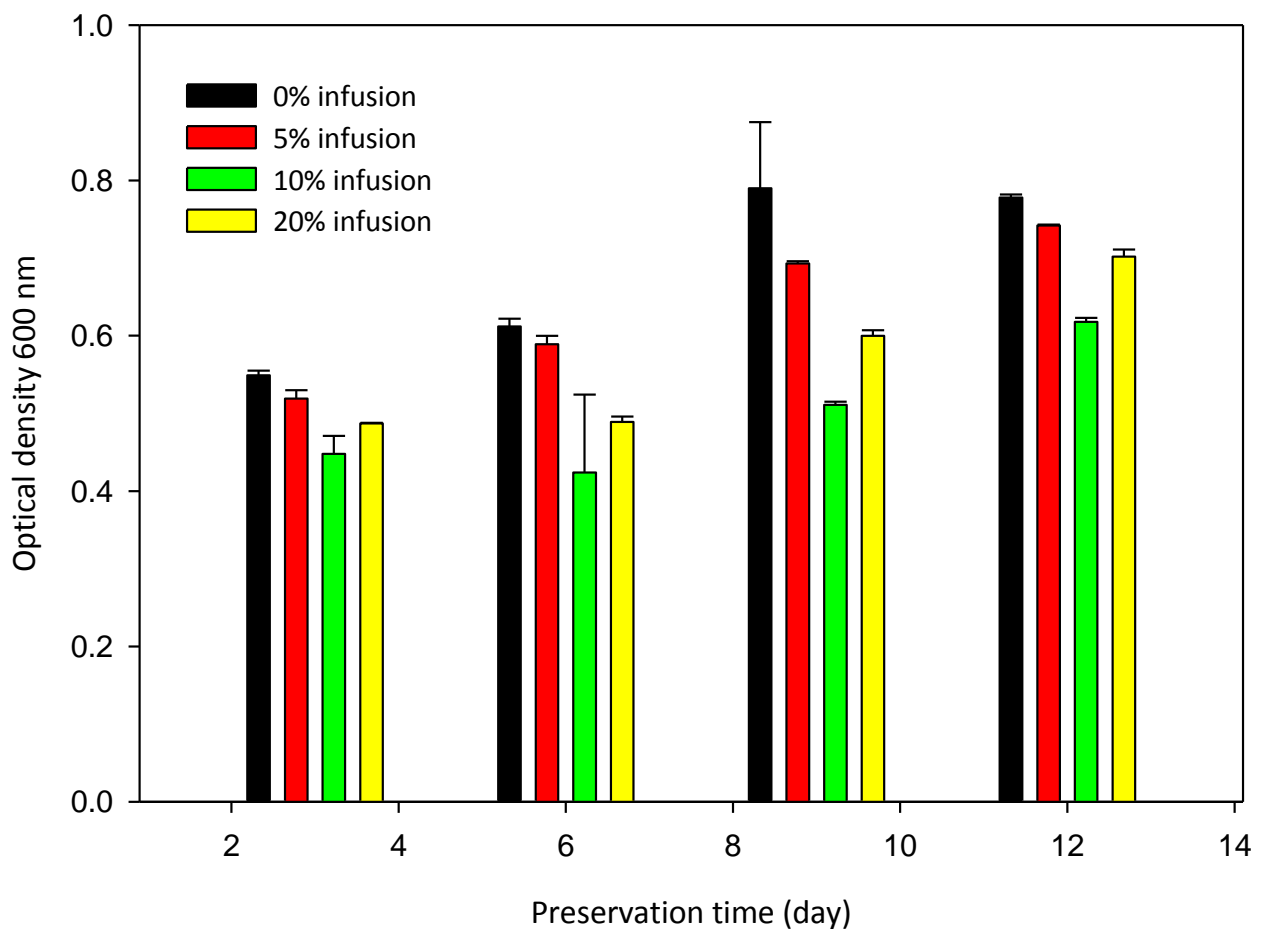


Figure 1. The profile of optical density of cultures of meats preserved with infusion of *S. polyanthum* leaves in NB media

The potency of the infusion of *S. polyanthum* leaves to preserve fresh chicken meat was evaluated by the indirect enumeration of microbial growth on the meat. The preservation with infusion in different concentrations affected the optical density of the samples, which represented the number of microbes grew on the meats. The degree of the increasing optical density, and hence the microbial growth on the meats, was different among treatments. On day 3, there were no differences of optical densities between meats preserved with infusions of *S. polyanthum* leaves in all given concentrations and that of the negative control. This result indicated that bacterial growth in all given concentrations was equal with bacterial growth in negative control. It is assumed that the microbes on the meats

were still in lag phase. Their number simply represented the initial microbial burden of the samples. On day 6, the optical densities of samples in all treatments were increased. However, the meats preserved with 10% and 20% infusion of *S. polyanthum* leaves showed inhibition of bacterial growth, shown by a significantly different optical density compared to that of negative control (p -value < 0.05). There were increasing optical densities of all samples on day 9 and 12 compared to day 6. Nevertheless, all given concentrations of infusion were also significantly different from that in the negative control group. Hence, infusion of *S. polyanthum* leaves at concentrations of 5%, 10%, and 20% were capable of inhibiting the

Table 2. Physical characteristic of the meats preserved with infusion of *S. polyanthum* leaves

Treatment groups	Physical characteristic	Preservation time (day)			
		3	6	9	12
0% infusion	odor	fresh	fresh	fresh	deteriorated
	texture	firm	firm	friable	friable
	slime	none	none	none	none
5% infusion	odor	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic
	texture	firm	firm	friable	friable
	slime	none	none	none	none
10% infusion	odor	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic
	texture	firm	firm	firm	friable
	slime	none	none	none	none
20% infusion	odor	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic	fresh, aromatic
	texture	firm	firm	firm	friable
	slime	none	none	none	none

Note: Bold printed words indicated first changes of the physical characteristic for the given treatment groups.

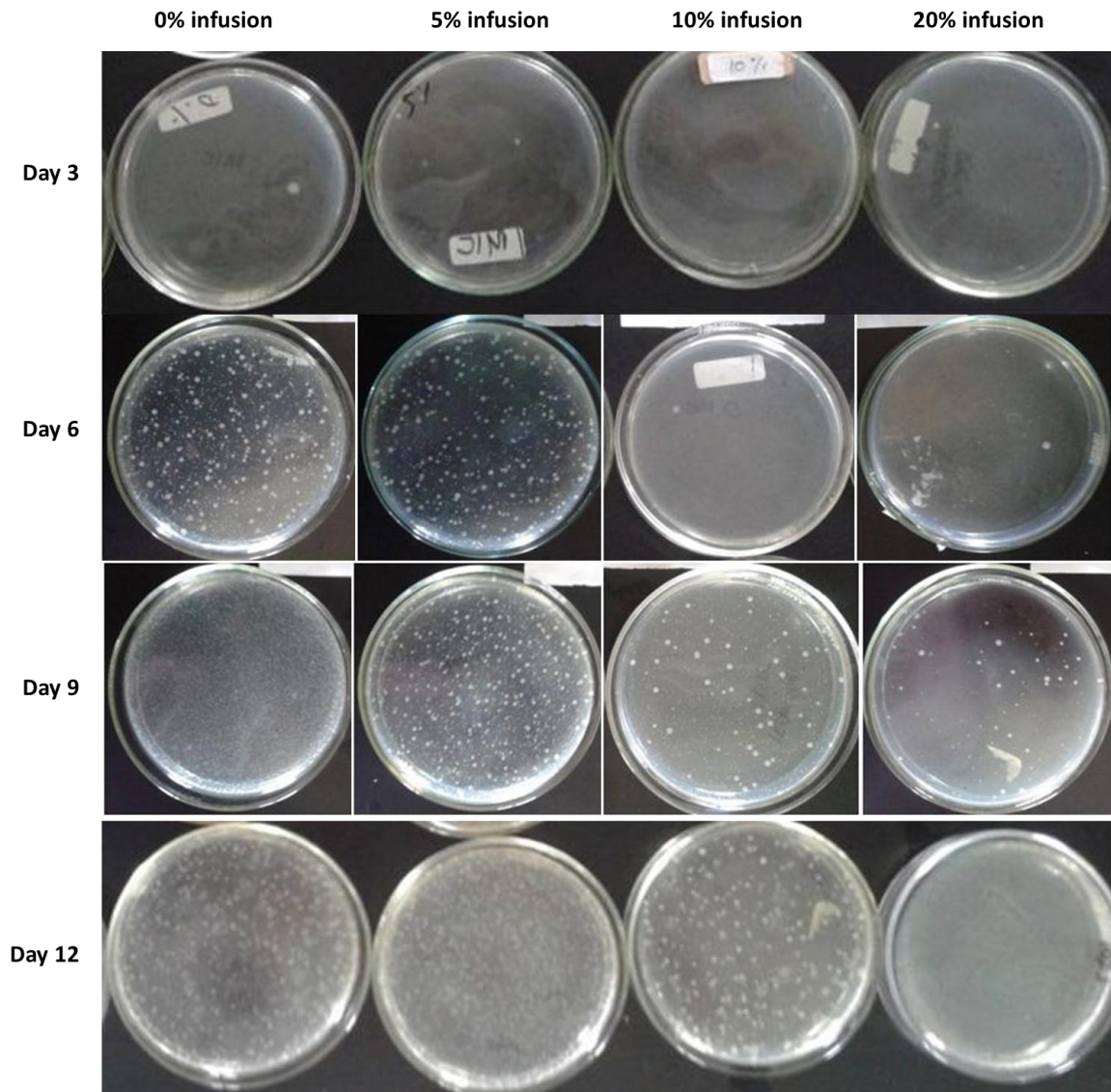


Figure 2. Bacterial growth on meats preserved with infusions of *S. polyanthum* leaves cultured in NA, on day 3, 6, 9, and 12 of preservation

growth of bacteria on preserved meats compared to the negative control. This result demonstrated that the higher concentration of infusion, the better it inhibited the growth of the bacteria. However, infusion of *S. polyanthum* leaves in both concentrations of 10% and 20% demonstrated the equal bacterial growth inhibitory activity, as their optical densities in day 6, 9, and 12 were not statistically different (Figure 1).

We also evaluated the profile of direct growth of bacteria on the meat preserved with the infusion of *S. polyanthum* leaves on the NA medium to determine its preservation potency (Figure 2). In general, the number of bacterial colonies increased with the time of preservation, while a higher concentration of infusion generated a less bacterial colony. On day 3, there was no visually microbial growth on meat observed at any given concentration of the extract. On day 6, bacterial growth was observed on meats in negative control and those preserved with 5%, while those preserved with 10% and 20% of infusions were remained clear without microbial growth. On day 9, microbial growth was visually observed on meats preserved with infusions of *S. polyanthum* leaves at all given concentration. The most number of bacteria colony on preserved meats was observed in 0% of infusion, followed by those preserved with infusion at a concentration of 5%, 10%, and 20%, respectively. On day 12, there was more microbial growth on meats compared to day 9. The result of this direct enumeration of the bacteria on the meats preserved with the infusions of *S. polyanthum* leaves demonstrated that the higher concentrations of the infusion, the better inhibitory activity was observed. Compared to the indirect enumeration method, the result was similar to a slight difference in 20% infusion. However, we did not quantitatively enumerate the bacterial counts and just utilized the limited visual observations so we could not confirm if the number of bacteria in meats preserved with

10% infusion was truly less than that of 20% infusion.

In general, the use of infusions of *S. polyanthum* leaves changed the color of the meats from pinkish white to brownish. The higher concentration of infusion, the darker the meats preserved. We utilized a physical evaluation of the preserved meats to determine their shelf life with the treatment of infusion of *S. polyanthum* leaves (Table 2). Odor, texture, and formation of slime on the meats were used as the parameters observed and then compared to those treated with negative control. According to SNI 3924:2009 on the quality of carcass and meat of chicken, a good quality of chicken meats could be tested by visual and palpation evaluation.²⁵ The fresh chicken meats should possess a consistent color, firm texture, and slime-free. All those characters were observed at the beginning of the preservation. There was a different odor between meats preserved with negative control and those preserved with infusion. The first mentioned groups were chicken-fresh, whereas the later was fresh with a hint of specific aromatic odor from *S. polyanthum*. As more bacteria were observed (Figure 2), meats in negative control and those preserved with 5% infusion group started to be friable at day 9, while those preserved with infusion at higher concentrations started to change at day 12. Hence, the infusion at a concentration of 5% was not capable of extending the shelf life of the meats. The odor of meats in negative control started to change at day 12, while meats preserved with infusion at higher concentrations were remained fresh with the aromatic scent of *S. polyanthum*. It can be concluded that fresh chicken meat preserved with infusion of *S. polyanthum* leaves at concentrations of 10% and 20% are capable of extending shelf life up to 3 days longer than unpreserved fresh chicken meat.

Based on the inhibition of bacterial growth (both direct and indirect) and physical evaluation of the meats, infusion

of *S. polyanthum* leaves was potential to be used as a natural preservative of fresh chicken meats. Infusions in both concentration of 10% and 20% demonstrated the same potency in inhibiting bacterial growth as well as physical changes of meats. However, we chose 10% as the optimal concentration of the infusion due to its color changed. The color of infusion at a concentration of 20% was dark brown and it changed the color of the meats. Darker-looking meat might be not preferable and has low acceptability. The infusion of *S. polyanthum* leaves could inhibit bacterial growth on meats at the optimum concentration of 10%, as well as capable of extending the meats shelf life up to 3 days at a temperature of 3-7°C compared to that of the negative control group.

Our finding that infusion of *S. polyanthum* leaves can be used as fresh chicken meat was in accordance with previously reported data. The infusion of *S. polyanthum* leaves was capable of extending the shelf life and decreasing the total bacterial count of Broiler chicken meat at a concentration of 20%²⁶ and 10%.²⁷ Another report demonstrated that it was able to maintain the quality of pork up to 9 hours at room temperature storage.¹⁹

Our results demonstrated that the infusion of spices could be developed for natural preservatives. It might be studied further so it can be used as the alternative for essential oil of spices for that said purposes. Essential oils of spices were potential to be used as food preservatives but their use were limited by their unpractical preparation needed and insolubility in water.^{12,14,28-30}

CONCLUSION

Infusion of *S. polyanthum* leaves at the optimum concentration of 10% was potential to be used as a natural preservative of fresh chicken meats. It was capable of inhibiting bacterial growth on meats during refrigerated storage and extending its shelf life up to 3 days.

Flavonoids, tannins, and saponins might be responsible for antibacterial activity accounted for this preservative potency.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the Directorate General of Higher Education, Ministry of National Research and Higher Education, Indonesia for financial support.

REFERENCES

1. Ramli S, Radu S, Shaari K, Rukayadi Y. Antibacterial activity of ethanolic extract of *Syzygium polyanthum* L. (Salam) leaves against foodborne pathogens and application as food sanitizer. Biomed Res Int. 2017;2017:Article ID 9024246.
2. Malik A, Ahmad AR. Antidiarrheal activity of ethanolic extract of bay leaves (*Syzygium polyanthum* [Wight.] Walp.). Int Res J Pharm. 2013;4(4):106-108.
3. Murhadi, Suharyono AS, Susilawati. Aktivitas antibakteri ekstrak daun salam (*Syzygium polyantha*) dan daun pandan (*Pandanus amaryfolius*). J Teknol dan Ind Pangan. 2007;18(1):17-24.
4. Fitriani A, Hamdiyati Y, Engriyani R. Aktivitas antifungi ekstrak etanol daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara in vitro. Biosfera. 2012;29(2):71-9.
5. Lau KY, Zainin NS, Abas F, Rukayadi Y. Antibacterial and sporicidal activity of *Eugenia polyantha* Wight against *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2014;3(12):499-510.
6. Hamad A, Mahardika MGP, Istifah, Hartanti D. Antimicrobial and volatile compounds study of four spices commonly used in Indonesian culinary. J Food Pharm Sci. 2016;4(1):1-5.
7. Amalina N, Natanamurugaraj G, Mashitah MY, Ashikin AKN. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Syzygium polyanthum* (Wight) Walp. essential oils. In: International Conference of Natural Products. 2013.
8. Hamad A, Mahardika MGP, Yuliani I, Hartanti D. Chemical constituents and

- antimicrobial activities of essential oils of *Syzygium polyanthum* and *Syzygium aromaticum*. *Rasayan J Chem*. 2017;10(2):564–9.
9. OECD. Meat consumption (indicator) [Internet]. OECD Data. 2019 [cited 2019 Feb 14]. Available from: <https://data.oecd.org/agroutput/meat-consumption.htm>
 10. Dave D, Ghaly AE. Meat spoilage mechanism and preservation techniques: A critical review. *Am J Agric Biol Sci*. 2011;6(4):486–510.
 11. Zhao C, Ge B, Villena J de, Sudler R, Yeh E, Zhao S, et al. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella* serovars in retail Chicken, Turkey, Pork, and Beef from Greater Washington D,C. area. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(12):5431–6.
 12. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL, Debbabov D. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol*. 2012;3(12):1–24.
 13. Yadaf AS, Singh RP. Natural preservatives in poultry meat products. *Nat Prod Radiance*. 2004;3(4):300–3.
 14. Fratianni F, Martino L De, Melone A, Feo V De, Coppola R, Nazzaro F. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *J Food Sci*. 2010;75(8):M528-535.
 15. Petrová J, Pavelková A, Hleba L, Pochop J, Rovná K, Katarina M. Microbiological quality of fresh chicken breast meat after Rosemary essential oil treatment and vacuum packaging. *Anim Sci Biotechnol*. 2013;46(1):140–4.
 16. Anonymous. *Farmakope Indonesia*. 4th ed. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 1995.
 17. Patel MR, Panchal HS, Saluja AK. Identification of terpenoids and steroidal compounds in *Caryota urens* leaves by column chromatography and various spectroscopic techniques. *World J Pharm Pharm Sci*. 2016;5(5):1610–22.
 18. Zohra SF, Meriem B, Samira S, Muneer MSA. Phytochemical screening and identification of some compounds from mallow. *J Nat Prod Plant Resour*. 2012;2(4):512–6.
 19. Agustina KK, Sari PH, Suada IK. Pengaruh perendaman pada infusa daun salam terhadap kualitas dan daya tahan daging babi. *Bull Vet Udayana*. 2017;9(1):34–41.
 20. De-Azeredo GA, Stamford TLM, Nunes PC, Neto NJG, de Oliveira MEG, de Souza EL. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Res Int*. 2011;44:1541–8.
 21. Hasanah N. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun salam. *J Pena Med*. 2015;5(1):55–9.
 22. Kusuma IW, Kuspradini H, Arung ET, Aryani F, Min Y, Kim J, et al. Biological activity and phytochemical analysis of three Indonesian medicinal plants, *Murraya koenigii*, *Syzygium polyanthum* and *Zingiber purpurea*. *J Acupunct Meridian Stud* 2011;4(1):75–9.
 23. Sari PP, Rita SW, Puspawati MN. Identifikasi dan uji aktivitas senyawa tanin dari ekstrak daun Trembesi (*Samanea saman* (Jacq.) Merr) sebagai antibakteri *Escherichia coli*. *J Kim*. 2015;9(1):27–34.
 24. Nuria CM, Faizatun A, Sumantri. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella Typhi* ATCC 1408. *J Ilmu Pertan*. 2009;5(2):26 – 37.
 25. BSN. SNI 3924:2009 Mutu karkas dan daging ayam. Badan Standar Nasional; 2009. p. 1–7.
 26. Pura EA, Suradi K, Suryaningsih L. Pengaruh berbagai konsentrasi daun salam (*Syzygium polyanthum*) terhadap daya awet dan akseptabilitas pada karkas ayam broiler. *J Ilmu Ternak*. 2015;15(2):2–7.
 27. Kusumaningrum A, Widiyaningrum P, Mubarak I. Penurunan total bakteri daging ayam dengan perlakuan perendaman infusa daun salam (*Syzygium polyanthum*). *J MIPA*. 2013;36(1):14–9.
 28. Andayani T, Hendrawan Y, Yulianingsih R. Minyak atsiri daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai pengawet alami pada ikan teri (*Stolephorus indicus*). *J Bioproses Komod Trop*. 2014;2(2):123–

- 30.
29. Hamad A, Hartanti D. The use of essential oil of Clove (*Syzygium aromaticum*) as Tofu's natural preservative. *Farmasains*. 2015;2(6):289–94.
30. Prakash B, Kedia A, Mishra PK, Dubey NK. Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*. 2015;47:381–91.

Keragaman Bakteri Endofit Penghasil L-Asparaginase Bebas L-Glutaminase

Diversity of Endophytic Bacteria as a L-Asparaginase Producer Free of L-Glutaminase

Tri Ratna Sulistiyani*, Dinihari Indah Kusumawati

Pusat Penelitian Biologi-LIPI, Cibinong, Indonesia
*E-mail: trilisty01@gmail.com

Diterima: 14 Desember 2018

Direvisi: 2 Februari 2019

Disetujui: 20 Februari 2019

Abstrak

Endofit merupakan mikroba potensial sumber penghasil senyawa aktif penting. Endofit yang diisolasi dari tanaman obat tropis telah menarik perhatian karena biodiversitasnya yang tinggi dan diperkirakan mampu menghasilkan senyawa baru di bidang kesehatan. L-asparaginase merupakan enzim pertama dengan aktivitas antileukemia yang sedang intensif dipelajari. Penelitian ini bertujuan untuk mengoleksi dan mengidentifikasi bakteri endofit dari tanaman obat tropis serta melakukan penapisan potensi penghasil enzim L-asparaginase bebas L-Glutaminase. Tanaman *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum buchanani*, dan Zingiberaceae dikoleksi dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, NTT. Sampel disterilkan menggunakan metode sterilisasi permukaan dan bakteri endofit diisolasi menggunakan metode *plant piece* pada media R2A. Bakteri endofit terisolasi diidentifikasi berdasarkan sekuen 16S rDNA. Penapisan bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase dilakukan secara kualitatif menggunakan media R2A termodifikasi dengan penambahan L-asparagin dan indikator *phenol red*. Terdapat 34 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari 5 sampel tanaman obat. Sebanyak 14 genus terdiri dari 17 spesies bakteri yang berbeda diperoleh dari 34 isolat terseleksi. Bakteri endofit *Pseudomonas stutzeri* strain SMKL1 dan *Rhizobium radiobacter* strain SMKW2 dari tanaman Kahili berpotensi sebagai penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase dan berpotensi sebagai kandidat penghasil senyawa kemoterapi kanker leukemia.

Kata kunci: Bakteri endofit; L-asparaginase; Tanaman obat

Abstract

Endophytes are potential as a source of active compound producer. Endophytes that is isolated from tropical medicinal plants has been getting attention due to its high biodiversity and active compound producing ability. L-asparaginase is the first enzyme used as chemotherapeutic agent for leukemia. The aim of this study is to collect the endophytic bacteria associated with tropical medicinal plants from Sumba Island and investigate the activity of L-asparaginase free L-Glutaminase from endophytic bacteria isolates. The samples *Gliricidia sepium*, *Pittosporum moluccanum*, *Clerodendrum buchanani*, and Zingiberaceae are collected from Wanggameti, East Sumba, NTT. Samples are sterilized using surface-sterilization method and endophytic bacteria are isolated using plant piece method on R2A media. Selected endophytic bacteria are identified by 16S rDNA sequences. L-asparaginase screening is conducted using modified R2A with addition of L-asparagine and phenol red as colour indicator. A total of 34 isolates of endophytic bacteria were collected from 5 samples. A total of 14 genus consisted of 17 different bacterial species were obtained from 34 selected isolates. Endophytic bacteria of *P. stutzeri* strains of SMKL1 and *R. radiobacter* strains of SMKW2 from the Kahili plant were needed as L-glutaminase-free L-asparaginase and were potential to be candidate of leukemia cancer chemotherapy.

Keywords: Endophytic bacteria; L-asparaginase; Medicinal plants

PENDAHULUAN

Kebutuhan senyawa obat kanker untuk kemoterapi semakin meningkat seiring meningkatnya angka kejadian 36 jenis kanker di 185 negara yang mencapai 18.1 juta kasus dan 9.6 juta kematian.¹ Kanker menempati peringkat ke-7 sebagai penyebab kematian utama di Indonesia dengan persentase kematian 5.7% dari total angka kejadian dengan tingkat prevalensi 4.3 per 1000 populasi.² Obat-obatan dari tanaman herbal telah lama digunakan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit seperti diabetes, kanker, dan masalah kulit. Beberapa tanaman yang dapat digunakan untuk terapi kanker diantaranya Tapak dara (*Catharanthus roseus*), Kemangi (*Ocimum sanctum*), Lidah buaya (*Aloe vera*), Ginseng India (*Withania somnifera*), Bawang putih (*Allivum sativum*), Kunyit (*Curcuma longa*)³, *Taxus brevifolia*, dan beberapa tanaman obat lainnya. Senyawa kurkuminoid yang terkandung dalam tanaman kelompok famili Zingiberaceae mempunyai banyak manfaat salah satunya sebagai antikanker.⁴

Selama beberapa dekade pengobatan kanker dilakukan dengan kemoterapi, operasi dan radiasi, atau kombinasi dari ketiganya.⁵ Akan tetapi, penggunaan obat melalui kemoterapi secara konvensional sering kali tidak efisien dan memiliki kendala dalam pengiriman obat ke target sel kanker sehingga kemoterapi justru membahayakan sel-sel sehat pasien. Perkembangan kemoterapi saat ini semakin pesat untuk meningkatkan efisiensi obat ke sel kanker dan meminimalisir pengaruh obat ke sel sehat menggunakan *Drug Delivery System* (DDS) yang dikombinasikan dengan nanopartikel yang berfungsi sebagai molekul pembawa obat ke sel kanker.⁶

Pengetahuan tentang etnobotani suatu tanaman mampu memberikan informasi yang cukup untuk melakukan isolasi senyawa aktif dari tanaman tradisional. Keterbatasan sediaan tanaman di alam dianggap sebagai faktor pembatas untuk

memperoleh senyawa aktif baru. Bakteri endofit merupakan salah satu mikroba sumber senyawa bioaktif potensial. Bakteri endofit hidup mengkolonisasi pada tanaman terutama daun, batang, akar, dan dapat tinggal untuk seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya tanpa menyebabkan kerusakan atau penyakit bagi inangnya. Populasi dan profil bakteri endofit pada tanaman dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kondisi lingkungan tempat tumbuh tanaman inang, jenis tanaman, umur tanaman, dan umumnya tanaman dengan sejarah etnobotani tinggi memiliki prospek keragaman mikroba endofit yang tinggi pula.⁷⁻⁹

Endofit saat ini dipandang sebagai sumber potensial untuk menghasilkan metabolit sekunder dan enzim penting dalam industri. Senyawa alami berupa enzim yang berasal dari mikroba dimanfaatkan oleh industri farmasi sebagai obat, contohnya L-asparaginase, kitinase, kolagenase, lipase, nattokinase, *L-amino acid α -ligase*, dan *serratiopeptidase*.^{10,11} Enzim L-asparaginase merupakan enzim yang rutin digunakan dalam kemoterapi terutama untuk kanker sel darah putih.^{12,13} Enzim akan mengambil asam amino esensial asparagin dari sel kanker dan memecahnya sehingga sel kanker mengalami kelaparan dan akhirnya mati. Enzim tersebut bertanggung jawab dalam konversi L-asparagin menjadi L-aspartat dan amonia. L-asparaginase dari bakteri yang telah digunakan adalah Elspar[®] dari *Escherichia coli* dan Erwinase[®] dari *Erwinia chrysantemi*.⁹ Selain dalam bidang kesehatan, L-asparaginase juga digunakan dalam membantu proses reduksi kadar L-asparagin yang merupakan prekursor utama dalam pembentukan kontaminasi makanan akrilamid. Bakteri endofit yang berasal dari lima tanaman obat *Catharanthus roseus*, *Ocimum sanctum*, *Aloe vera*, *Withania somnifera*, dan *Marrayo konengi* memiliki aktivitas L-asparaginase yang dapat dikembangkan sebagai senyawa antikanker baru.¹⁰

Beberapa mikroba dapat menghasilkan L-asparaginase dan memiliki aktivitas L-glutaminase karena L-asparagin dan L-glutamin memiliki struktur yang sama. Mikroba tersebut antara lain *Serratia marcescens*, *E. coli*, *E. chrysantemi*, *Pseudomonas* sp. dan *Acinetobacter glutaminasificans*. Studi melaporkan bahwa adanya aktivitas L-glutaminase dapat menyebabkan efek samping selama terapi antara lain alergi, pankreatitis, diabetes, dan kelainan koagulasi.¹¹

Secara tradisional tanaman obat yang digunakan untuk isolasi bakteri endofit memiliki sifat antimikroba, namun belum ada data ilmiah yang mempelajari sifat antikankernya. Oleh karena itu, penapisan mikroba penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase perlu dilakukan dari berbagai sumber, terutama dari bakteri endofit. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengidentifikasi, dan melakukan penapisan bakteri endofit penghasil enzim L-asparaginase bebas L-glutaminase dari tanaman obat yang dikoleksi dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, Nusa Tenggara Timur (NTT).

METODE

Penelitian ini merupakan percobaan laboratorium yang dilakukan di Laboratorium Biosistematika dan Kultur Koleksi Mikroba, Pusat Penelitian Biologi-LIPI.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan antara lain mesin PCR (*Thermo Scientific*), Elektroforator (Takara, model Mupid-EXu), dan UV *transilluminator* (Biorad). Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%.

natrium hipoklorit 3%, sikloheksamida (Merck), media R2A (Difco), KOH (Merck), gliserol (Merck), *GoTaq Green Master Mix 2x* (Promega), primer 27F dan 1492R (IDT), DMSO for *molecular* (Sigma), agarosa (Thermo Scientific), etidium bromida (Biotech), pati terlarut (Merck), K₂HPO₄ (Merck), MgSO₄ (Merck), agar (Difco), *phenol red* (Sigma), L-asparagin (Merck), L-glutamin (Merck).

Sampel tanaman

Sampel tanaman obat diambil dari Desa Wanggameti, Sumba Timur, NTT dari ketinggian yang berbeda pada tahun 2016. Tanaman terpilih adalah tanaman sehat bebas kontaminasi patogen tanaman. Sampel yang digunakan sebanyak lima tanaman obat (Tabel 1). Sampel tanaman diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi-LIPI berdasarkan karakteristik morfologi.

Penyiapan sampel tanaman

Sampel tanaman dari lokasi pengambilan sampel dibawa ke laboratorium untuk diisolasi bakteri endofitnya. Sampel tanaman (rimpang, batang, daun, bunga, dan buah) dicuci dengan air mengalir selama 5-10 menit, dipotong-potong, dan dilanjutkan dengan proses sterilisasi permukaan.

Sterilisasi permukaan jaringan tanaman

Sampel tanaman direndam dalam etanol 70% selama 3 menit, lalu direndam dengan natrium hipoklorit 3% selama 5 menit, dan dibilas dengan etanol 70% selama 30 detik, dilanjutkan pencucian dengan akuades steril selama 2 menit.

Tabel 1. Tanaman obat yang diambil dari Sumba Timur

Kode sampel	Nama Tanaman	Manfaat tanaman (secara tradisional)
SMG	Gamal (<i>Gliricidia sepium</i>)	Pengawet mayat
SMK	Kahili (<i>Pittosporum moluccanum</i>)	Obat luka kulit
SMR	Rarawala (<i>Clerodendrum buchanani</i>)	Obat sakit kepala
SMKz	Zingiberaceae	Imunostimulan
SMZg	Zingiberaceae	Antimikroba

Pencucian dengan akuades steril diulang sebanyak tiga kali.¹² Sampel kemudian dikeringkan menggunakan kertas tisu steril. Efisiensi sterilisasi permukaan diuji dengan menyebarkan 100 µL akuades hasil pencucian terakhir pada beberapa jenis media yang ditambah sikloheksamida 50 µg/mL untuk menghambat pertumbuhan cendawan. Media yang digunakan adalah R2A dengan konsentrasi 1/10. Akuades hasil pencucian yang menunjukkan adanya pertumbuhan mikroba tidak digunakan sebagai sampel isolasi bakteri endofit.

Isolasi bakteri endofit

Isolasi bakteri endofit dilakukan dengan metode *plant piece*.¹³ Sampel tanaman yang telah steril dipotong menjadi ukuran 4-6 mm. Sampel kemudian diletakkan di atas media yang telah ditambah sikloheksamida 50 µg/mL. Cawan petri selanjutnya diinkubasi selama 2-15 hari pada suhu 28 °C. Bakteri yang tumbuh dari metode *plant piece* diisolasi dan dipurifikasi. Bakteri endofit yang memiliki karakteristik morfologi berbeda dipilih untuk digunakan pada tahap berikutnya. Karakteristik fenotip yang diamati antara lain adalah warna, tepian permukaan, serta reaksi Gram menggunakan uji KOH.¹⁴

Pemurnian bakteri endofit

Koloni bakteri yang telah tumbuh dimurnikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan cara digores berdasarkan metode kuadran. Pemurnian dilakukan sampai diperoleh koloni tunggal. Koloni yang telah murni kemudian ditanam dalam tabung reaksi yang berisi agar miring NA dan disimpan pada suhu 4 °C. Isolat murni selanjutnya dipelihara dengan baik dan disimpan dalam gliserol 10% pada suhu –80 °C.¹⁴

Ekstraksi DNA, amplifikasi PCR, dan elektroforesis

Sel dari koloni tunggal pada permukaan media padat diambil menggunakan tusuk

gigi steril dan disuspensikan ke dalam 20 µL air bebas nuklease. Suspensi kemudian di-*vortex* selama 10 detik dan diinkubasi pada suhu 98 °C selama 5 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan dengan sentrifugasi untuk selanjutnya digunakan sebagai cetakan DNA.

DNA diamplifikasi menggunakan *GoTaq Green Master Mix 2x* dengan sepasang primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3'). Setiap tabung berisi *Ultrapure water* 9,75 µL, *GoTaq Green Master Mix 2x* 12,5 µL, primer 27F (10 µM) 0,625 µL, primer 1492R (10 µM) 0,625 µL, DMSO 0,5 µL, dan 1 µL sampel DNA dengan total volume 25 µL. Amplifikasi dilakukan pada kondisi PCR: predenaturasi 95 °C selama 90 detik, dilanjutkan 30 siklus terdiri atas denaturasi (95 °C, 30 detik), *annealing* (50 °C, 30 detik), *elongasi* (72 °C, 90 detik), dan *final extension* pada 72 °C selama 5 menit, dilanjutkan 4 °C selama 20 menit. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1%. Setelah selesai, gel direndam dalam larutan etidium bromida 5 µg/mL selama 30 menit. Hasil elektroforesis dilihat menggunakan alat UV *transilluminator*.^{15,16}

Sekuensing 16S rDNA dan analisis bioinformatika

Hasil amplifikasi PCR disekuensing di Laboratorium MacroGen Korea menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data hasil sekuensing diolah dengan program Bioedit. Homologi sekuen 16S rDNA dicari pada server Eztaxon. Sekuen referensi diperoleh dari bank data *GenBank/DDBJ/EMBL* yang diakses secara *online* melalui internet www.ezbiocloud.net. Analisis pohon filogenetik menggunakan metode *neighbour-joining* yang terimplementasi dalam MEGA 7.0 dengan nilai *bootstrap* 1000x.¹⁷⁻²⁰

Penapisan bakteri endofit dalam menghasilkan L-asparaginase atau L-glutaminase

Penapisan kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan L-asparaginase atau L-glutaminase menggunakan metode uji lempeng cepat berdasarkan kemampuan membentuk warna merah muda di sekitar koloni yang ditumbuhkan pada media R2A termodifikasi. Komposisi media R2A termodifikasi adalah *dextrose* 0.5 g, pati terlarut 0.5 g, K_2HPO_4 0.3 g, $MgSO_4$ 0.05 g, Agar 16 g, akuades 1000 mL. Media ditambah dengan *phenol red* 0.009%, dan asam amino (L-asparagin 5 g atau L-glutamin 5 g) dengan pH 6.2. Isolat bakteri selanjutnya digores pada permukaan media R2A termodifikasi dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 24-48 jam. Isolat bakteri juga ditumbuhkan di media R2A termodifikasi tanpa asam amino (L-asparagin atau L-glutamin) sebagai kontrol negatif.²¹

HASIL DAN PEMBAHASAN

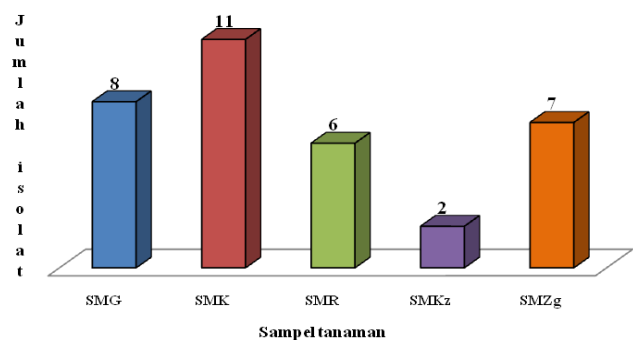
Isolasi bakteri endofit dari tanaman obat

Isolasi bakteri endofit asal tanaman obat dengan metode sterilisasi permukaan berhasil mensterilkan permukaan sampel. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ditemukan mikroba yang tumbuh pada cawan petri yang telah disebar dengan akuades cucian terakhir hasil proses sterilisasi permukaan. Hasil isolasi menunjukkan bahwa bakteri endofit ditemukan pada semua bagian tanaman mulai dari rimpang, batang, daun, bunga, dan buah. Bakteri endofit ditemukan hampir pada semua bagian tanaman inang termasuk akar atau rimpang, batang, daun, biji, buah, umbi, dan juga dalam nodul tanaman legum.²²

Bakteri yang keluar dari bagian tanaman sampel dianggap sebagai bakteri

endofit. Bakteri yang terisolasi dari lima jenis tanaman sampel menunjukkan jumlah yang bervariasi (Gambar 1). Jumlah terbanyak diperoleh dari sampel tanaman obat Kahili (SMK) sebanyak 11 isolat. Terdapat dua faktor umum yang berpengaruh terhadap kelimpahan dan distribusi bakteri endofit pada suatu tanaman yaitu musim dan usia tanaman dimana tanaman yang lebih tua mempunyai organ yang lebih besar sehingga diperkirakan jumlah endofit akan lebih banyak.^{23,24} Beberapa faktor lain yang berpengaruh adalah rotasi tanaman, kondisi tanah, jaringan tanaman, dan keberadaan patogen tanaman. Jumlah endofit pada tanaman obat paling banyak terdapat pada bagian daun, diikuti batang, dan akar.²⁴

Daun pada umumnya dipilih oleh endofit karena permukaannya yang luas, kaya nutrisi, dan dinding selnya tipis sehingga memudahkan kolonisasi endofit. Hal tersebut berbeda dengan hasil studi yang menunjukkan bahwa jumlah bakteri endofit terisolasi lebih banyak dikoleksi dari bagian batang. Hal ini disebabkan batang merupakan tempat menyalurkan sari makanan dari daun menuju seluruh bagian tanaman.



Gambar 1. Bakteri endofit terisolasi dari tanaman obat di Sumba Timur ((Gamal (SMG); Kahili (SMK); Rarawala (SMR); Zingiberaceae (SMKz); Zingiberaceae (SMZg)).

Sebanyak 34 isolat bakteri endofit berhasil diisolasi dari 5 sampel tanaman obat yang diteliti. Isolat bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat dari

Sumba Timur menunjukkan karakteristik yang beragam. Sebagian besar isolat memiliki karakteristik Gram negatif, bentuk *circular*, tepian *entire*, permukaan *shiny*, tidak tembus pandang, dan berwarna putih dan kuning. Hasil uji KOH

menunjukkan 85,29% merupakan bakteri Gram negatif dan 14,71% bakteri Gram positif (Tabel 2). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan semua isolat memiliki sel berbentuk batang.

Tabel 2. Identitas bakteri endofit dari tanaman obat berdasarkan sekuen 16S rDNA

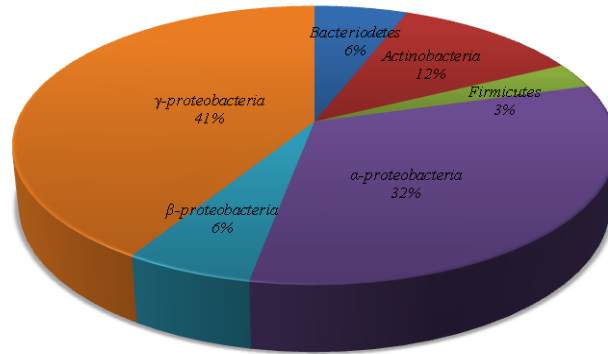
Isolat	Uji KOH	Identitas terdekat	Kesamaan (%)	Filum
SMGW1	-	<i>Chryseobacterium pallidum</i> DSM 18015(T)	99,42	<i>Bacteroidetes</i>
SMGW2	-	<i>Pantoea eucrina</i> PSNIH	99,70	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMGW3	-	<i>Pantoea anthophila</i> LMG2558(T)	99,81	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMGW4	-	<i>Chryseobacterium pallidum</i> DSM 18015(T)	99,42	<i>Bacteroidetes</i>
SMGW5	+	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,48	<i>Actinobacteria</i>
SMGW6	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMGW7	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMGW8	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL1	-	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588(T)	99,86	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKL2	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL3	+	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	99,70	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKL4	-	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,48	<i>Actinobacteria</i>
SMKL5	-	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34(T)	98,98	<i>Betaproteobacteria</i>
SMKW1	-	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	99,93	<i>Actinobacteria</i>
SMKW2	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	99,51	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW3	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	99,69	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW4	-	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	99,70	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKW5	-	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20(T)	99,91	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMKFr1	+	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	99,70	<i>Actinobacteria</i>
SMRW1	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRW2	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,88	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRW3	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,69	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRFr1	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRF11	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,81	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMRF12	-	<i>Xanthomonas cynarae</i> CFBP 4188(T)	99,93	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKzR1	-	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> JCM 16536(T)	96,94	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMKzR2	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,90	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR1	-	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	99,89	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR2	-	<i>Enterobacter asburiae</i>	99,89	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgR3	-	<i>Ancylobacter sonchi</i> Osot(T)	99,62	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMZgF11	-	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	98,25	<i>Alphaproteobacteria</i>
SMZgF12	+	<i>Pseudomonas entomophila</i> L48(T)	99,78	<i>Gammaproteobacteria</i>
SMZgF13	-	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1(T)	100,00	<i>Firmicutes</i>
SMZgF14	-	<i>Variovorax gossypii</i> JM-310(T)	99,85	<i>Betaproteobacteria</i>

Ket: (+) bakteri Gram positif; (-) bakteri Gram negatif

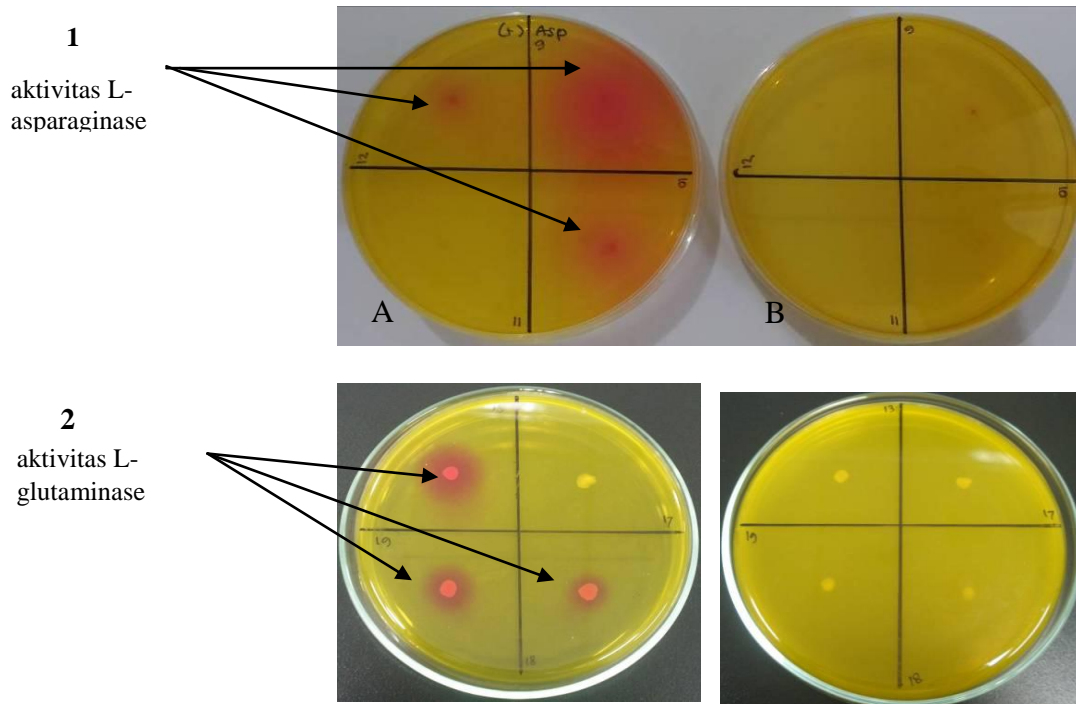
Identifikasi bakteri endofit dari tanaman obat

Analisis sekuen 16S rDNA isolat bakteri endofit yang dilakukan secara parsial dan perbandingan dengan sekuen tipe bakteri lain di bank data DNA, diperoleh nilai tingkat kesamaan yang tinggi dengan data base yaitu 98%-100%.

Tingkat keragaman bakteri endofit yang berasal dari tanaman yang dikoleksi dari Sumba Timur juga sangat tinggi yaitu dari 34 isolat teridentifikasi terdiri dari 14 genus yang merepresentasikan 17 spesies yang berbeda seperti yang ditampilkan pada Tabel 2.



Gambar 2. Komposisi bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat asal Sumba Timur



Gambar 3. (1) Deteksi produksi L-asparaginase (2) Deteksi produksi L-glutaminase dari bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat dari Sumba Timur (A: media dengan L-asparaginase/L-glutamin; B: media tanpa L-asparagin/L-glutamin, kontrol negatif)

Sebanyak 34 isolat terisolasi terdiri dari 4 filum antara lain *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, dan *Proteobacteria* dengan isolat paling dominan adalah filum *Proteobacteria* yang terdiri dari kelompok γ -*proteobacteria*, α -*proteobacteria*, dan β -*proteobacteria* (Gambar 2). Hal ini sejalan dengan studi Chowdhury *et al.* yang menyatakan bahwa *Proteobacteria* dominan pada tanaman ginseng dari Korea.²⁵ Studi ini menunjukkan bahwa isolat *Firmicutes* merupakan filum dengan isolat terkecil dengan satu isolat yang teridentifikasi sebagai *Bacillus* yaitu *Bacillus mobilis*. Hal tersebut berbeda dengan hasil studi lain yang menyatakan bahwa bakteri endofit genus *Bacillus* dan *Pseudomonas* lebih banyak terisolasi dibandingkan dengan genus lainnya.²⁵ Studi ini mengambil sampel tanaman obat dari lingkungan dengan temperatur dan ketinggian yang berbeda, dimana hal tersebut memengaruhi populasi dan profil bakteri endofit pada tanaman.^{26,27}

Penapisan bakteri endofit penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase

Hasil penapisan awal menunjukkan beberapa isolat bakteri endofit berpotensi menghasilkan L-asparaginase. Hal ini ditandai dengan terbentuknya warna merah muda disekeliling isolat bakteri pada media R2A termodifikasi dengan penambahan senyawa L-asparagin. Berdasarkan reaksi kimia yang terjadi pada L-asparagin, adanya L-asparaginase yang dihasilkan oleh bakteri endofit menyebabkan terbentuknya L-aspartat dan amonia. Indikator *phenol red* pada kondisi asam berwarna kuning, sedangkan pada kondisi basa akan berwarna merah muda.

Amonia yang dihasilkan dari reaksi L-asparaginase bersifat basa dan kondisi ini akan mengubah warna media menjadi merah muda (Gambar 3). Warna media akan tetap kuning pada isolat yang tidak memiliki kemampuan menghasilkan L-asparaginase.

Aktivitas L-glutaminase selama produksi L-asparaginase dapat menyebabkan efek samping selama terapi secara enzimatik.¹¹ Beberapa isolat penghasil L-asparaginase juga menghasilkan L-glutaminase yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah muda pada media dengan penambahan L-glutamin (Gambar 3).

Tabel 3 menunjukkan aktivitas L-asparaginase dari 23 isolat. Kemampuan isolat bakteri dalam menghasilkan L-asparaginase berbeda-beda berdasarkan besar kecilnya zona merah muda yang terbentuk. Hasil uji kualitatif produksi L-asparaginase menunjukkan 12 dari 23 isolat memiliki aktivitas L-asparaginase yang tinggi. Bakteri potensial penghasil L-asparaginase adalah kelompok Enterobacteriaceae contohnya *E. coli* dan *E. chrysanthemi*.²⁸ Hal ini sesuai dengan hasil penapisan bahwa bakteri dengan aktivitas L-asparaginase sebagian besar dari kelompok Enterobacteriaceae yaitu genus *Pantoea* dan *Enterobacter* (Tabel 3).

Tabel 3 menunjukkan 4 isolat dari 23 isolat memiliki aktivitas L-asparaginase dan tidak menunjukkan aktivitas L-glutaminase. Hasil penapisan menunjukkan bahwa *P. stutzeri* strain SMK1 dan *R. radiobacter* strain SMK2 memiliki aktivitas L-asparaginase yang tinggi dan tidak memiliki aktivitas L-glutaminase sehingga berpotensi sebagai kandidat penghasil senyawa agen kemoterapi kanker leukemia. *P. eucrina* dan *R. radiobacter* strain SMZgF11 meskipun tidak memiliki aktivitas L-glutaminase tetapi aktivitas L-asparaginase yang rendah sehingga tidak potensial sebagai kandidat penghasil senyawa agen kemoterapi kanker leukemia.

Analisis filogenetik bakteri endofit penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase menggunakan isolat-isolat *strain type* yang diambil secara *online* dari *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* LPSN (Gambar 4).²⁹ Empat bakteri endofit terseleksi berdasarkan

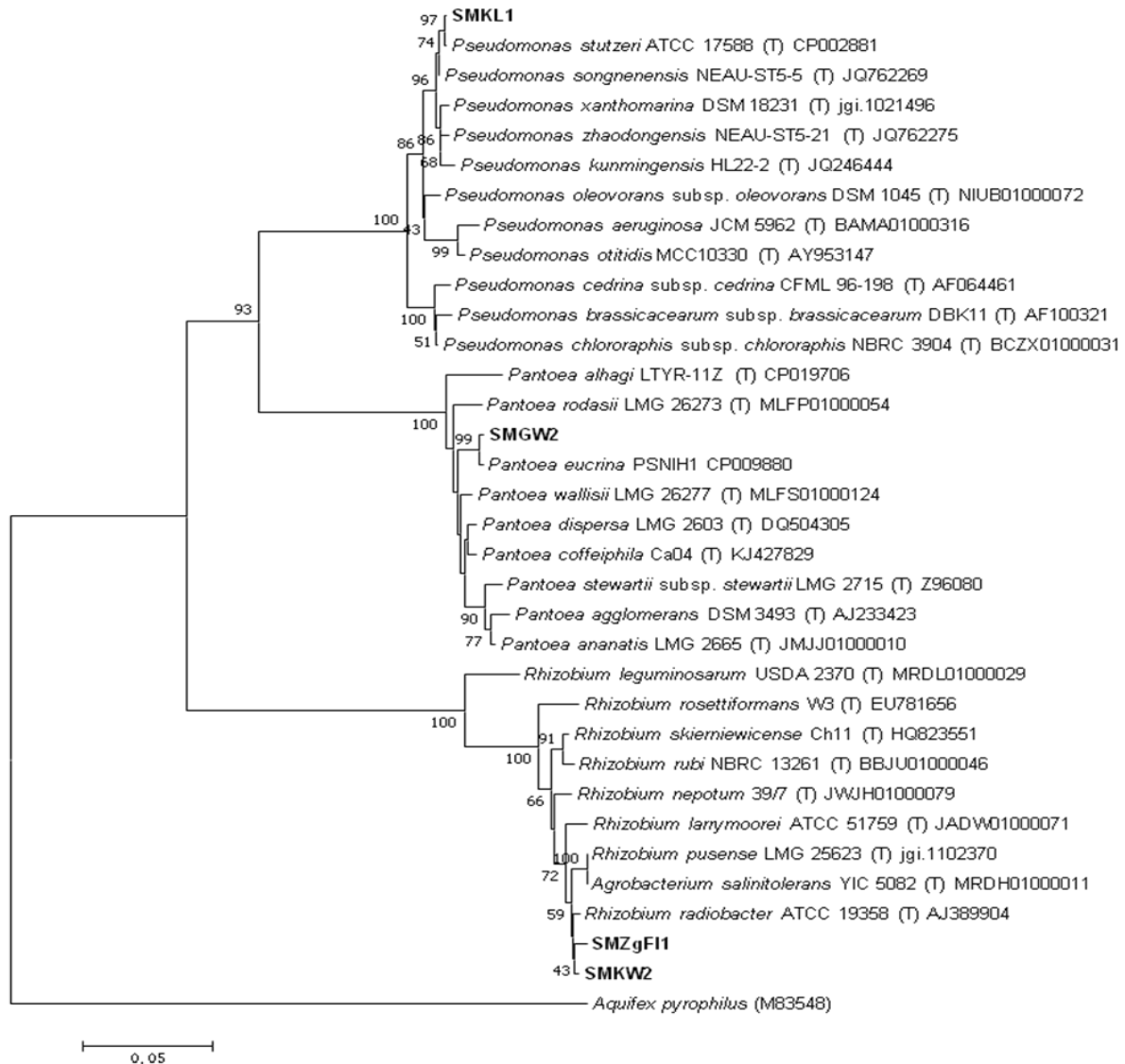
analisis filogenetik termasuk dalam filum *Proteobacteria* yaitu *Gammaproteobacteria* dan *Alphaproteobacteria*. Isolat SMK1 yang teridentifikasi sebagai *P. stutzeri* termasuk dalam genus *Pseudomonas*, ordo *Pseudomonadales*, Kelas *Gammaproteobacteria*. Isolat

SMGW2 teridentifikasi sebagai *P. eucrina* genus *Pantoea*, ordo *Enterobacteriales*, Kelas *Gammaproteobacteria*, sedangkan isolat SMK2 dan SMZgF1 teridentifikasi sebagai *R. radiobacter* termasuk dalam genus *Rhizobium*, Ordo *Rhizobiales*, Kelas *Alphaproteobacteria*.

Tabel 3. Penapisan bakteri endofit penghasil L-asparaginase dan L-glutaminase yang berasosiasi dengan tanaman obat

Kode isolat	Identitas	Famili	Aktivitas L-asparaginase	Aktivitas L-glutaminase
SMGW2	<i>Pantoea eucrina</i> PSNIH1	Enterobacteriaceae	+	-
SMGW3	<i>Pantoea anthophila</i> LMG2558(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRW2	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRW3	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMRF1	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMKzR2	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	++
SMZgR1	<i>Enterobacter tabaci</i> YIM Hb-3(T)	Enterobacteriaceae	+++	+
SMZgR2	<i>Enterobacter asburiae</i>	Enterobacteriaceae	+++	+
SMGW6	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	+	++
SMGW8	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	++	+
SMKL2	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230 (T)	Sphingomonadaceae	++	+
SMKW3	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	Sphingomonadaceae	++	++
SMKW4	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> ATCC 51230(T)	Sphingomonadaceae	++	++
SMGW7	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+++	++
SMKW2	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+++	-
SMZgF1	<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	Rhizobiaceae	+	-
SMKL1	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588(T)	Pseudomonadaceae	+++	-
SMKL4	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i> ATCC 31317(T)	Microbacteriaceae	+	+
SMKL5	<i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34(T)	Burkholderiaceae	+++	+++
SMKW5	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20(T)	Methylobacteriaceae	+	+
SMKzR1	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i> JCM 16536(T)	Xanthomonadaceae	+	+++
SMZgF14	<i>Variovorax gossypii</i> JM-310(T)	Comamonadaceae	+++	++
SMZgF13	<i>Bacillus mobilis</i> 0711P9-1(T)	Bacillaceae	++	+

Ket: (+++) aktivitas tinggi; (++) aktivitas sedang; (+) aktivitas rendah; (-) tidak ada aktivitas



Gambar 4. Pohon filogenetik berdasar sekuen 16S rDNA dari bakteri endofit penghasil L-asparaginase tanpa aktivitas L-glutaminase menggunakan metode *neighbour-joining*, model K2 dan distribusi Gamma dengan nilai bootstarp 1000 replikasi

KESIMPULAN

Bakteri endofit yang berasosiasi dengan tanaman obat *G. sepium*, *P. moluccanum*, *C. b Buchananii*, dan Zingiberaceae, memiliki tingkat keragaman bakteri yang sangat tinggi. Bakteri endofit *P. stutzeri* strain SMKL1 dan *R. radiobacter* strain SMKW2 dari tanaman Kahili berpotensi sebagai penghasil L-asparaginase bebas L-glutaminase dan hal ini diharapkan menjadi peluang bakteri endofit tersebut sebagai kandidat penghasil senyawa kemoterapi kanker leukemia.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Proyek DIPA Pusat Penelitian Biologi - Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) TA 2016. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdri. Rinatu Siswi S.Si atas bantuannya selama melakukan penelitian di laboratorium

DAFTAR RUJUKAN

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. 2018;394–424.
2. Wahidin M, Noviani R, Hermawan S, Andriani V, Ardian A, Djarir H. Population-Based Cancer Registration in Indonesia. 2012;13:1709–10.
 3. Dixit S, Ali H. Anticancer activity of Medicinal plant extract-A review. *J Chem Cheml Sci.* 2010;1(1):79–85.
 4. Suhirman S, Hernani, Syukur C. Uji toksisitas ekstrak lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet*) terhadap larva udang (*Artemia salina* Leach.) *Bul Littro.* 2006;XVII(1):30–8.
 5. Devita VT, Chu E. AACR Centennial Series A History of Cancer Chemotherapy. 2008;(21):8643–54.
 6. Hu Q, Sun W, Wang C, Gu Z. Recent advances of cocktail chemotherapy by combination drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.022>
 7. Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep.* 2001;18(4):448–59.
 8. Vellard M. The enzyme as drug: Application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;14(4):444–50.
 9. Manasa C, Nalini MS. L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall. (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats (India). *Int Sch Res Not.* 2014;2014:1–7.
 10. Joshi RD, Kulkarni NS. Optimization studies on L-asparaginase production from endophytic Bacteria. 2016;2:624–9.
 11. Saxena A, Upadhyay R, Kango N. Isolation and identification of actinomycetes for production of novel extracellular glutaminase free L-asparaginase. *Indian J Exp Biol.* 2015;53(12):786–93.
 12. Jalgaonwala RE, Mahajan RT. Evaluation of hydrolytic enzyme activities of endophytes from. *Biotechnol Adv.* 2011;7(6):1733–41.
 13. Arau WL, Marcon J, Maccheroni W, Elsas JD Van, Vuurde JW Van. Diversity of Endophytic Bacterial Populations and Their Interaction. 2002;68(10):4906–14.
 14. Powers EM. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol.* 1995;61(10):3756–8.
 15. Packeiser H, Lim C, Balagurunathan B, Wu J, Zhao H. An extremely simple and effective colony PCR procedure for bacteria, yeasts, and microalgae. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169(2):695–700.
 16. Palaniappan P, Chauhan PS, Saravanan VS, Anandham R, Sa T. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol Fertil Soils.* 2010;46(8):807–16.
 17. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series.* 1999;41:95–98
 18. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(PART 3):716–21.
 19. Saitou N, Nei M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evo.* 1987;4:406–25.
 20. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. 2018;33(7):1870–4.
 21. Mahajan R V., Saran S, Saxena RK, Srivastava AK. A rapid, efficient and sensitive plate assay for detection and screening of l-asparaginase-producing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;341(2):122–6.
 22. Ruby EJ. A Review: Bacterial Endophytes and their Bioprospecting. *Journal of Pharmacy Research,* 2011;4(3), pp.795–799.
 23. Chareprasert S, Piapukiew J, Thienhirun S, Whalley AJS, Sihanonth P, Products F. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea.* 2006;481–2.
 24. Chow Y, Ting ASY. Endophytic l-asparaginase-producing fungi from plants associated with anticancer properties. *J Adv Res.* 2015;6(6):869–76.
 25. Chowdhury EK, Jeon J, Rim SO, Park Y.

- Composition , diversity and bioactivity of culturable bacterial endophytes in mountain-cultivated ginseng in Korea. *Sci Rep*. 2017;(July):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-10280-7>
26. Hardoim PR, Overbeek LS Van, Berg G, Pirttilä M, Compant S, Campisano A, et al. The Hidden World within Plants : Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. 2015;79(3):293–320.
27. Ratna Sulistiyani T, Lisdiyanti P, Lestari Y. Population and Diversity of Endophytic Bacteria Associated with Medicinal Plant *Curcuma zedoaria*. *Microbiol Indones*. 2014;8(2):65–72. Available from: <http://jurnal.permi.or.id/index.php/mionline/article/view/276>
28. Lopes AM, Oliveira-Nascimento L de, Ribeiro A, Tairum CA, Breyer CA, Oliveira MA de, et al. Therapeutic l-asparaginase: upstream, downstream and beyond. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(1):82–99.
29. Parte AC, Road W. LPSN — list of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2014;42(November 2013):613–6.

Studi *in Silico* Lima Senyawa Aktif sebagai Penghambat Protein Virus Dengue

In Silico Study of Five Active Compounds as Dengue Virus Protein Inhibitors

Reni Herman

Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbang Kesehatan, Jakarta, Indonesia

*E-mail: reni.hermann1@gmail.com

Diterima: 11 Januari 2019

Direvisi: 4 Februari 2019

Disetujui: 22 Februari 2019

Abstrak

Infeksi dengue merupakan salah satu penyakit endemik di daerah tropis dan subtropis, disebabkan oleh infeksi virus dengue (DENV). Beberapa senyawa sudah dibuktikan memiliki efek antivirus terhadap beberapa virus. Uji *in silico* dilakukan untuk memprediksi stabilitas ikatan senyawa dari bahan alam untuk senyawa artemisinin, katekin, mangiferin, epigallocatekin galat (EGCG), dan kuersetin dengan protein virus dengue pada tingkat molekuler. Uji ini dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak *Molecular Operating Environment* (MOE) versi 2008.10. Ligan adalah senyawa ribavirin sebagai kontrol antiviral sedangkan artemisinin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin dengan struktur 3D format mol. Protein DENV dengan format dokumen PDB yang diunduh adalah protein selubung (*envelope*) DENV serotipe 2 dengan kode 1OKE, protein non struktural 3 (NS3) dengan kode 2VBC dan protein NS5 dengan kode 1L9K. Uji *in silico* ini secara umum memperlihatkan senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki stabilitas ikatan yang lebih baik terhadap protein DENV. Secara khusus senyawa mangiferin memiliki stabilitas ikatan lebih baik pada protein selubung, NS3 (helikase dan protease) dan pada NS5-metiltransferase dibandingkan dengan senyawa ribavirin. Senyawa katekin pada NS3-protease, EGCG pada NS3 (helikase dan protease) dan kuersetin pada NS3-protease. Artemisinin memiliki ikatan yang kurang stabil dibandingkan dengan ribavirin. Hasil prediksi ini mengindikasikan bahwa senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki potensi untuk menghambat protein DENV dan mangiferin merupakan senyawa yang memiliki potensi hambatan paling baik dengan ikatan lebih stabil pada semua protein yang diuji.

Kata Kunci: Antiviral; Katekin; Mangiferin; EGCG; Kuersetin

Abstract

Dengue infection is an endemic disease in the tropics and subtropics, caused by dengue virus (DENV) infection. Some compounds have been shown to have antiviral effects on some viruses. In silico study is conducted to predict the stability of natural ingredient compounds: artemisinin, catechin, mangiferin, epigallocatechin gallate (EGCG), and quercetin in their interactions with dengue virus proteins at molecular level. This study is carried out using the 2008 version of the Molecular Operating Environment (MOE) software. Ligands are ribavirin as antiviral control whereas artemisinin, mangiferin, EGCG, and quercetin with 3D mole format structures. The downloaded DENV protein with PDB document format is the DENV serotype 2 envelope protein with 1OKE code, non structural protein 3 (NS3) with 2VBC code and NS5 protein with 1L9K code. In silico test generally showed that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had more stable docking ligands to DENV's proteins. In particular, mangiferin had stable docking ligand to envelope proteins, NS3 (helicase and protease) and in NS5-methyltransferase compared to ribavirin. Catechin stabled on NS3-protease, EGCG on NS3 (helicase and protease) and quercetin on NS3-protease. Artemisinin had less stabled bonds than ribavirin. The results indicated that catechin, mangiferin, EGCG, and quercetin had potential inhibition to DENV proteins whereas mangiferin was the most potential compound to inhibit dengue virus protein targets.

Keywords: Antiviral; Catechin; Mangiferin; EGCG; Quercetin

PENDAHULUAN

Infeksi virus dengue merupakan salah satu penyakit endemik di daerah tropis dan subtropis yang disebabkan oleh empat serotipe virus dengue. Belum ada pengobatan spesifik untuk infeksi dengue. Virus dengue (DENV) berupa partikel sferis dengan diameter 40–50 nm, diliputi oleh lipopolisakarida. DENV memiliki genom sebesar ~11 kb dengan materi genetik RNA untai tunggal *sense* positif. Genom mengkode 3 protein struktural dan 7 protein nonstruktural (NS). Protein struktural terdiri dari *capsid* (C), *envelope* (E) dan *pre-membrane/membrane* (prM/M). Protein nonstruktural terdiri dari NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, dan NS5.¹

Beberapa protein DENV yang telah diketahui berperan penting pada proses infeksi dan replikasi yaitu protein selubung (*envelope*), NS3 protease/helikase dan NS5 metiltransferase/RdRp. Protein selubung berperan penting pada saat infeksi karena memediasi perlekatan virus dengan reseptor pada permukaan sel.² Senyawa yang dapat menghambat proses ini berpeluang untuk dikembangkan sebagai antivirus. Protein struktural 3 (NS3) merupakan protein yang ditemukan di dalam sel, terdiri dari 2 domain yaitu protease dan helikase. Protease ini berperan untuk proses pemotongan poliprotein yang penting untuk replikasi virus di dalam sel³ dan helikase berperan dalam proses replikasi genetik virus.⁴ Protein nonstruktural 5 (NS5) terdiri dari 2 domain yaitu metiltransferase dan *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp) yang berperan pada replikasi RNA virus.¹

Beberapa senyawa bahan alam dilaporkan memiliki kemampuan sebagai antiviral seperti epigallocatekin galat (EGCG) terhadap infeksi virus hepatitis C,⁵

mangiferin dapat menghambat infeksi HIV,⁶ kuersetin dapat menghambat virus influenza A,⁷ katekin dapat menghambat virus zika,⁸ dan artemisinin dapat menghambat sitomegalovirus.^{9,10} Pada studi ini diprediksi interaksi dan stabilitas ikatan terbaik dari senyawa bahan alam: artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin terhadap protein virus dengue pada tingkat molekuler menggunakan simulasi komputer (*in silico*). Ikatan senyawa ini diharapkan dapat menghambat aktivitas protein dan proses replikasi virus.

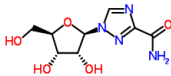
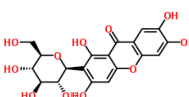
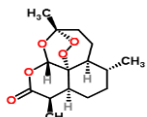
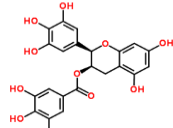
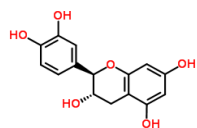
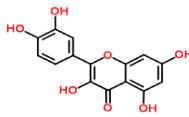
METODE

Pengambilan data dan pemodelan molekul senyawa bahan alam

Pada penelitian ini uji dilakukan dengan perangkat lunak *Molecular Operating Environment* (MOE) versi 2008.10. Sebagai data pembanding dipersiapkan data ligan yaitu ribavirin. Artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin menggunakan struktur 3D dengan format mol yang diunduh melalui <http://chemspider.com/> (Tabel 1). Situs ini menyediakan database struktur senyawa untuk keperluan *virtual screening*. Perangkat lunak melakukan minimalisasi energi terhadap keenam struktur senyawa tersebut dengan metode *forcefield* untuk mendapatkan molekul yang paling stabil.¹¹

Struktur protein struktural DENV dengan format dokumen pdb (protein data bank) diunduh melalui portal informasi struktur biologi makromolekuler RCSB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), dan PDBJ (protein data bank Japan) melalui situs <http://pdj.org/>. Protein yang diunduh adalah protein selubung (*envelope*) DENV-2 (kode: 1OKE), protein NS3 (kode: 2VBC), dan NS5 (kode: 1L9K).

Tabel 1. Struktur senyawa ribavirin, artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin

Nama Senyawa	Struktur	Nama Senyawa	Struktur
Ribavirin		Mangiferin	
Artemisinin		EGCG	
Katekin		Kuersetin	

Preparasi protein target dan simulasi

Preparasi protein dilakukan dengan menambahkan molekul polar untuk menyamakan kondisi di dalam larutan. Berikutnya dilakukan pencarian sisi aktif yang dapat berikatan dengan ligan. *Docking* molekul dilakukan di antara sisi aktif pada protein DENV dengan senyawa. Protonasi 3D dan minimalisasi energi menggunakan parameter *force field*, AMBER99 + salvation, gradient 0,05. Struktur ini yang kemudian digunakan sebagai reseptor untuk analisis *docking*.

Active site finder digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkalkulasi posisi aktif pada reseptor molekul. Parameter yang digunakan adalah *London dG*, *placement: triangle matcher*, *Retain: 10*, *refinement: forcefield* dan *re-scoring 2: London dG*. Hasil ditampilkan dalam bentuk energi yang paling kecil pada ikatan ligan dengan protein struktural DENV.

Analisis

Hasil analisis menampilkan posisi ikatan antara kelima senyawa dengan protein, gugus yang mengadakan ikatan hidrogen

dengan asam amino serta kekuatan ikatan yang ditampilkan dalam bentuk nilai energi bebas Gibbs (ΔG). Nilai ini merupakan parameter kekuatan ikatan dengan reseptor. Semakin rendah nilai ΔG , ikatan ligan dengan reseptor semakin stabil. Selain itu juga ditampilkan konstanta inhibisi (pKi) untuk menentukan afinitas ikatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penambatan molekul atau *molecular docking* merupakan metode komputasi yang digunakan untuk menghitung afinitas ikatan maupun memperkirakan tempat ikatan senyawa dengan protein.¹² Prosedur ini digunakan sebagai acuan untuk menentukan orientasi yang baik dari suatu senyawa dengan senyawa yang telah dijadikan obat yang sifatnya relatif. Uji ini dilakukan untuk memprediksi kemampuan senyawa artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin untuk berikatan dengan protein virus dengue. Hasil uji lima senyawa ini secara *in silico* ditampilkan pada Tabel 2 dengan senyawa ribavirin sebagai pembanding. Tabel 3 menunjukkan interaksi ligan dengan protein, residu, tipe ikatan, skor

Tabel 2. Nilai ΔG (kkal/mol) hasil uji *in silico* artemisinin, katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin

Protein Virus Dengue	Ribavirin	Artemisinin	Katekin	Mangiferin	EGCG	Kuersetin
Selubung (<i>Envelope</i>) DENV	-10,1510	-6,7842	-10,6318	-12,1607*	-10,7043	-11,1121
NS3-Protease	-11,4780	-9,3786	-14,7234	-15,0470	-15,7316*	-15,7530*
NS3-Helicase	-12,2861	-8,4054	-16,8596*	-15,7248	-17,6025*	-13,0082
NS5-Metil transferase	-10,3158	-8,3839	-14,7972	-17,6264*	-13,8701	-14,6770

Ket: * = Nilai yang dianggap paling stabil

pengikatan, jarak atom serta afinitas ikatan dari senyawa yang memiliki nilai ΔG paling baik. Secara umum nilai ΔG pada masing-masing protein lebih rendah pada katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin dibandingkan dengan senyawa ribavirin dan artemisinin, yang artinya ikatan senyawa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin lebih stabil terhadap protein DENV dibandingkan dengan ribavirin dan artemisinin. Masing-masing senyawa ini juga memiliki nilai ΔG paling rendah pada protein tertentu, seperti katekin memiliki nilai ΔG paling rendah pada ikatan dengan NS3-helikase, EGCG pada NS-3 (protease dan helikase) dan kuersetin pada protein NS3-protease. Mangiferin memiliki nilai ΔG lebih rendah pada hampir semua protein. Berdasarkan hasil ini kemudian ditampilkan interaksi ligan dan protein, residu, tipe ikatan, skor pengikatan, jarak atom, dan konstanta inhibisi dari senyawa yang memiliki nilai ΔG paling rendah pada Tabel 3. Berikut adalah rincian hasil uji *in silico*.

Katekin

Dibandingkan dengan senyawa lain, katekin memiliki ikatan paling stabil jika berikatan dengan NS3-helikase, dengan nilai nilai ΔG -16.8596 kkal/mol dan konstanta inhibisi 11.286 μM . Katekin berikatan pada 4 residu, 2 *site* donor H dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan paling baik pada residu

Lys 398 dengan jarak atom 2.77 Å (Tabel 2 dan 3).

Mangiferin

Hasil analisis *in silico* menunjukkan ikatan senyawa mangiferin dengan selubung DENV memiliki ikatan paling stabil dibandingkan dengan ikatan senyawa lain pada protein yang sama. Hasil uji memberikan nilai energi bebas (ΔG) -12.1607 kkal/mol dengan konstanta inhibisi (pKi) 9.604 μM . Interaksi ikatan ditampilkan pada Tabel 3. Mangiferin berikatan pada 2 *site* sebagai donor H dan 5 *site* sebagai akseptor H. Skor pengikatan tinggi pada residu Gln 271 sebesar 98,1% dan jarak atom 1.69 Å. Mangiferin juga memiliki nilai ΔG paling baik jika berikatan dengan protein metiltransferase. Nilai ΔG 17.6264 kkal/mol dan nilai pKi 11.356 μM . Senyawa ini berikatan dengan 9 residu, 6 *site* donor H dan 5 *site* akseptor H. Skor paling tinggi pada ikatan dengan residu Lys 61 dengan jarak 2,79 Å (Tabel 3).

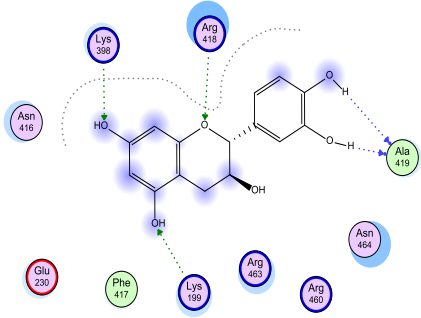
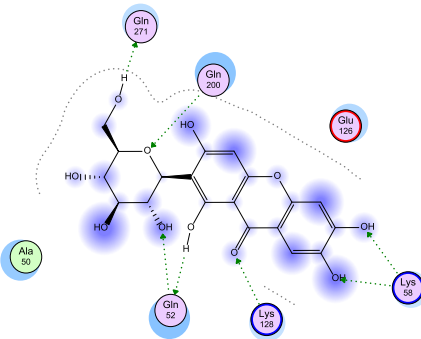
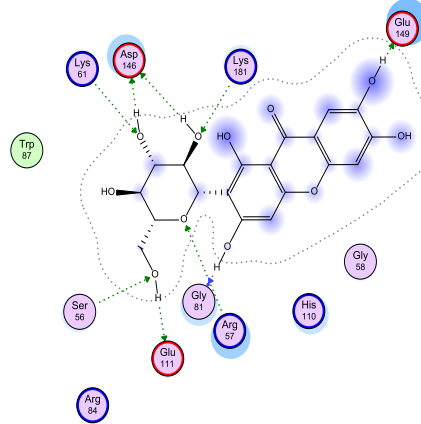
EGCG

Senyawa EGCG memiliki ikatan lebih stabil jika berikatan dengan NS3-protease dan NS3-helikase. Ikatan dengan NS3 protease memiliki nilai ΔG -15.7316 kkal/mol dengan nilai pKi 11.955 μM . Katekin berikatan pada 7 residu, 6 *site* donor H, dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan

paling tinggi sebesar 85,3% dengan jarak atom 2.7 Å. Ikatan EGCG juga paling baik dengan NS3-helikase, nilai ΔG -17.6025 kkal/mol dan konstanta inhibisi (pKi) 12.016

μM . Berikatan pada 4 residu, 4 *site* donor H dan 3 *site* akseptor H. Skor pengikatan paling besar 56.4% dengan jarak atom 2.80 Å (Tabel 2 dan 3).

Tabel 3. Hasil prediksi ikatan ligan dengan protein virus dengue berdasarkan nilai δg terbaik

Senyawa dengan ikatan paling baik	Interaksi ligan dan protein	Residu	Tipe Ikatan	Skor Pengikatan (%)	Jarak (Å)	Konstanta Inhibisi (pKi)
Katekin-helikase		ALA 419*	H-don	10.5	3.74	11.286
		ALA 419*	H-don	45.3	1.97	
		LYS 199*	H-acc	63.1	2.75	
		LYS 398	H-acc	86.1	2.77	
		ARG 418*	H-acc	11.0	3.32	
Mangiferin: - selubung (<i>envelope</i>)		GLN 52	H-don	35.4	2.20	9.604
		GLN 271	H-don	98.1	1.69	
		GLN 52	H-acc	38.9	2.95	
		LYS 58	H-acc	73.3	2.79	
		LYS 58	H-acc	58.7	2.75	
		LYS 128	H-acc	33.2	2.82	
		GLN 200	H-acc	26.3	3.08	
- NS5 Metiltransfe rase		SER 56	H-don	76.9	2.70	11.356
		GLY 81	H-don	11.7	1.94	
		GLU 111	H-don	75.1	1.59	
		ASP 146	H-don	69.2	1.53	
		ASP 146	H-don	19.0	1.92	
		GLU 149	H-don	19.3	1.50	
		SER 56	H-acc	76.9	2.70	
		ARG 57*	H-acc	39.8	2.79	
		ARG 57*	H-acc	15.4	3.08	
		LYS 61	H-acc	81.0	2.79	
		LYS 181*	H-acc	61.0	2.72	

Lanjutan Tabel 3.

Senyawa dengan ikatan paling baik	Interaksi ligan dan protein	Residu	Tipe Ikatan	Skor Pengikatan (%)	Jarak (Å)	Afinitas (pKi)
EGCG - NS3 Helicase		GLU 230	H-don	29.1	1.62	12.016
		GLU 230	H-don	22.2	2.94	
		GLU 230	H-don	27.1	1.72	
		GLU 233	H-don	38.7	1.54	
		LYS 199*	H-acc	19.8	2.55	
		LYS 199 *	H-acc	56.4	2.80	
		ARG 418*	H-acc	56.1	2.76	
- NS3 Protease		ASP 75*	H-don	64.7	1.60	11.955
		THR 120	H-don	85.3	2.70	
		THR 156	H-don	36.1	2.89	
		VAL 162	H-don	37.4	1.66	
		THR 120	H-acc	85.3	2.70	
		ASN 152	H-acc	12.7	3.15	
		THR 156	H-acc	36.1	2.89	
Quercetin : - Protease		THR 118	H-don	49.9	2.73	9.964
		GLY 121	H-don	35.2	1.83	
		GLU 122	H-don	48.1	1.76	
		ASN 152	H-don	19.7	1.71	
		THR 118	H-acc	49.9	2.73	

Ket: * = Residu dengan fungsi penting bagi replikasi DENV

Kuersetin

Senyawa ini memiliki nilai ΔG 15.7530 kkal/mol dan konstanta inhibisi 9.964 μM . Berikatan pada 5 residu, 4 *site* donor H dan

1 *site* akseptor H. Skor pengikatan paling tinggi 49.9% dengan jarak atom 2.73 Å. (Tabel 2 dan 3).

Hasil uji *in silico* pada Tabel 2 memperlihatkan nilai ΔG terhadap 5 senyawa yang diuji dan ribavirin sebagai kontrol antivirus. Ribavirin sudah diketahui memiliki efek antivirus terhadap DENV dan juga digunakan sebagai kontrol pada uji antivirus.¹³ Hasil uji ini mengindikasikan katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin memiliki nilai ΔG yang lebih baik dibandingkan artemisinin yang sudah dilaporkan memiliki efek antivirus¹⁰ dan memiliki nilai ΔG paling tinggi dengan prediksi stabilitas konformasi kompleks yang lebih rendah. Hasil ini juga menunjukkan senyawa katekin, EGCG, dan kuersetin memiliki stabilitas kompleks lebih tinggi pada protein NS3, sementara mangiferin memiliki stabilitas konformasi kompleks yang lebih tinggi pada empat protein DENV dibanding senyawa lainnya. Meskipun nilai ΔG mangiferin terhadap NS3-protease dan NS3-helikase kurang kuat dibanding katekin, EGCG, dan kuersetin namun ikatan H donor maupun akseptor pada mangiferin dan NS3 lebih banyak.

Selain penilaian ikatan ligan dengan protein, perlu juga dilihat lokasi interaksinya. Beberapa studi tentang proteomik virus dengue telah melaporkan bagian penting untuk infeksi atau *active site* dari protein DENV. Misalnya struktur protein selubung DENV, terdapat 3 domain yang penting untuk proses infeksi, yaitu domain I berfungsi proses perubahan konfirmasi ketika partikel DENV menempel dengan reseptor, domain II berperan pada saat fusi dengan membran sel dan domain III bagian yang menempel pada reseptor sel.¹⁴

Pada protease, telah dilaporkan residu yang berperan penting pada proses replikasi yaitu His 51, Asp 75, dan Ser 135.¹⁵ Hasil uji menunjukkan EGCG berikatan dengan Asp 75 (Tabel 3). Studi lain juga melaporkan residu yang berperan sebagai *active site* pada protein NS3-helikase,¹⁵ hasil

uji pada katekin dan EGCG juga menunjukkan ada ikatan dengan residu yang penting untuk replikasi DENV (Tabel 3).

Beberapa residu juga telah dilaporkan berperan penting pada NS5 metiltransferase, residu yang dilaporkan penting untuk proses replikasi RNA DENV ini diantaranya adalah Phe 25, Lys 30, Arg 57, Lys 181, dan Arg 212.¹⁵ Hasil pada studi ini memperlihatkan mangiferin berikatan dengan residu Arg 57 dan Lys 18 (Tabel 3). Pada uji ini tidak dapat dilakukan prediksi terhadap protein NS5-RdRp karena tidak ditemukan struktur protein dengan format pdb.

Pada protein selubung dilaporkan 18 residu pada protein E DENV-3 yang berperan penting pada proses infeksi yaitu H149, I162, S104, R186 (DI), T76, N89, Y96, W101, F108, K110, N240, M258, H259, A265, I276 (DII), S296, S311, dan K321 (DIII).¹⁷ Hasil uji *molecular docking* ini memperlihatkan posisi ikatan mangiferin berada antara domain I dan II dari protein selubung. Asam amino pada domain II lebih nonpolar, berkaitan dengan proses fusi dengan membran sel.¹⁴

KESIMPULAN

Hasil uji menunjukkan bahwa katekin, mangiferin, EGCG, dan kuersetin secara *in silico* memiliki potensi sebagai penghambat protein virus dengue. Di antara senyawa tersebut yang memiliki potensi hambatan paling baik terhadap semua protein DENV adalah mangiferin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Kami mengucapkan terimakasih kepada Kepala Puslitbang Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbangkes yang atas izinnya studi ini dapat terlaksana dan Ibu Dra. Ani Isnawati, M.Kes atas masukan dan bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR RUJUKAN

1. Henschel EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Review*. 1990 Oct;3(4):376–96.
2. Alen MMF, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy. *Journal of Tropical Medicine*. 2012;2012:1-13.
3. Luo D, Xu T, Hunke C, Gruber G, Vasudevan SG, Lescar J. Crystal structure of the NS3 protease-helicase from dengue virus. *Journal of Virology*. 2008 Jan;82(1):173–83.
4. Wang CC, Huang ZS, Chiang PL, Chen CT, Wu HN. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Letters*. 2009 Feb;583(4):691–6.
5. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *British Journal of Pharmacology*. 2013 Mar;168(5):1059–73.
6. Wang RR, Gao YD, Ma CH, Zhang XJ, Huang CG, Huang JF, *et al.* Mangiferin, an anti-HIV-1 agent targeting protease and effective against resistant strains. *Molecules*. 2011 May;16(5):4264–77.
7. Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, *et al.* Quercetin as an antiviral agent inhibits influenza A virus (IAV) entry. *Viruses*. 2015 Dec;8(1):1-18.
8. Carneiro BM, Batista MN, Braga ACS, Nogueira ML, Rahal P. The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. *Virology*. 2016 Sep;496:215–8.
9. Flobinus A, Taudon N, Desbordes M, Labrosse B, Simon F, Mazeron M-C, *et al.* Stability and antiviral activity against human cytomegalovirus of artemisinin derivatives. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014 Jan;69(1):34–40.
10. Roy S, He R, Kapoor A, Forman M, Mazzone JR, Posner GH, *et al.* Inhibition of human cytomegalovirus replication by artemisinins: effects mediated through cell cycle modulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015 Jul;59(7):3870–9.
11. Isnawati A, Adelina R. Studi docking molekuler catechin gallate, epicatechin gallate, galocatechin gallate, dan epigallocatechin gallate sebagai obat dislipidemia. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2015;5(1):25-32.
12. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current Computer Aided Drug Design*. 2011 Jun;7(2):146–57.
13. Chang J, Schul W, Butters TD, Yip A, Liu B, Goh A, *et al.* Combination of alpha-glucosidase inhibitor and ribavirin for the treatment of dengue virus infection in vitro and in vivo. *Antiviral Research*. 2011 Jan;89(1):26–34.
14. Wahala WMPB, Donaldson EF, Alwis R De, Loper MAA, Baric RS, Silva AM De. Natural Strain Variation and Antibody Neutralization of Dengue Serotype 3 Viruses. 2010;6(3):1–10.
15. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*. 2008 Aug;11(4):369–77.
16. Henderson BR, Saeedi BJ, Campagnola G, Geiss BJ. Analysis of RNA binding by the dengue virus NS5 RNA capping enzyme. *PLoS One*. 2011 Oct;6(10):1-9.
17. Christian EA, Kahle KM, Mattia K, Puffer BA, Pfaff JM, Miller A, *et al.* Atomic-level functional model of dengue virus envelope protein infectivity. *Proceeding of The National Academy Sciences*. 2013;110(46):1–6.

Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

Antibacterial Activities of Tobacco Leaf Essential Oil Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Elda Nurnasari*, Kristiana Sri Wijayanti

Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat, Karangploso, Malang, Indonesia

*Email: eldanurnasari@yahoo.com

Diterima: 18 Desember 2018

Direvisi: 27 Januari 2019

Disetujui: 22 Februari 2019

Abstrak

Tanaman tembakau banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku rokok, namun hasil penelitian menunjukkan bahwa daun tembakau mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan dalam bidang farmasi dan kesehatan. Daun tembakau mengandung minyak atsiri yang memiliki aroma khas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri minyak atsiri tembakau yang berasal enam sentra yaitu Temanggung, Yogyakarta, Purwodadi, Boyolali, Blitar, dan Probolinggo. Minyak atsiri tembakau diperoleh dengan metode distilasi uap-air. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dan uji konsentrasi hambat tumbuh minimum dilakukan terhadap dua bakteri yakni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Rendemen minyak atsiri daun tembakau berkisar antara 0,54-3,39%. Minyak atsiri daun tembakau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dari daun tembakau Yogyakarta sebesar 26 mm, sedangkan untuk bakteri *E. coli* zona hambat terbesar pada minyak atsiri daun tembakau Blitar yakni sebesar 21 mm. Besarnya zona hambat ini tidak berbeda jauh dengan zona hambat pada pengujian antibiotik tetrasiklin sebagai kontrol positif yakni 25 mm pada bakteri *S. aureus* dan 21.5 mm pada bakteri *E. coli*. Minyak atsiri daun tembakau asal Probolinggo mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* mulai konsentrasi 6,25% dan bakteri *E. coli* mulai konsentrasi 12,5%.

Kata kunci: Minyak atsiri; Daun tembakau; Antibakteri; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

Abstract

Tobacco plants are widely used as raw material for cigarettes, but the results of the study show that in tobacco leaves contain compounds that can be used in the pharmaceutical and health fields. Tobacco leaves contain essential oils that have a distinctive aroma. The study aims to examine the antibacterial activity of tobacco essential oil from six sources tobacco such as Temanggung, Yogyakarta, Purwodadi, Boyolali, Blitar and Probolinggo. Tobacco essential oil is obtained by the steam-water distillation method. Antibacterial activity evaluation was carried out by diffusion method and the minimum inhibitory concentration on two bacteria, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The yield of tobacco essential oil ranged from 0.54-3.39%. Tobacco essential oil had antibacterial activity against bacteria *E. coli* and *S. aureus* in the presence of inhibition zones in bacterial media. The biggest inhibition zone was in Yogyakarta tobacco essential oil of 26 mm for *S. aureus* bacteria, while for bacteria the biggest inhibition zone was Blitar tobacco essential oil which was equal to 21 mm. The inhibition zone was not much different *E. coli* from the inhibition zone in tetracycline antibiotic testing (positive control) which was 25 mm in *S. aureus* and 21.5 mm bacteria in *E. coli* bacteria. Tobacco essential oil from Probolinggo was able to inhibit the growth of *S. aureus* bacteria up to a concentration of 6.25% and *E. coli* bacteria to a concentration of 12.5%.

Keywords: Essential oils; Tobacco leaf; Antibacterial; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Tanaman menghasilkan senyawa metabolit primer dan sekunder. Metabolit primer bersifat esensial dalam proses metabolisme sel dan proses sintesis pada tanaman tersebut.¹ Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan oleh tanaman sebagai mekanisme pertahanan terhadap predator dan mikroorganisme patogen.

Minyak atsiri merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang memiliki bau atau aroma khas. Minyak atsiri adalah campuran senyawa volatil yang beraroma kuat dan memiliki susunan senyawa kompleks. Minyak atsiri memiliki aktivitas farmakologi antara lain antiseptik, bakterisida, virusida, fungisida, dan sifat-sifat farmakologi yang lain.²

Minyak atsiri umumnya dijumpai pada jenis tanaman yang memiliki bau atau aroma. Tembakau merupakan salah satu tanaman yang memiliki aroma yang khas. Daun tembakau mengandung minyak atsiri dengan rendemen berkisar antara 0,0267 – 0,8428 %.³ Hasil penelitian menyebutkan bahwa minyak atsiri tembakau memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.⁴

Bakteri patogen seperti *E. Coli* dan *S. aureus* merupakan bakteri penyebab infeksi pada manusia. Masyarakat mengobati penyakit infeksi akibat bakteri menggunakan antibiotik yang mudah diperoleh seperti tetrasiklin, ampisilin, atau antibiotika jenis lainnya. Pemakaian antibiotik secara berlebihan dan dengan dosis yang kurang tepat dapat mengakibatkan terjadinya resistensi antibiotik.⁵ Adanya resistensi terhadap antibiotik memerlukan alternatif senyawa antibakteri lain yang dapat berasal dari bahan alami. Salah satu yang potensial adalah minyak atsiri daun tembakau.

Isolasi minyak atsiri daun tembakau juga merupakan langkah diversifikasi produk tembakau non rokok. Minyak atsiri

tembakau dapat diperoleh dari hasil samping pertanian tembakau seperti daun tembakau yang memiliki mutu rendah dan bunga tembakau. Hasil penelitian sebelumnya daun tembakau yang tidak laku dijual dapat menghasilkan minyak atsiri dengan rendemen 3,25% menggunakan metode ekstraksi pelarut. Minyak atsiri tersebut mengandung 91 senyawa kimia dengan neofitadiena sebagai senyawa utama.⁶ Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun tembakau di enam sentra terhadap bakteri *E.coli* dan *S. aureus*.

METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium. Kegiatan yang dilakukan adalah preparasi sampel, ekstraksi minyak atsiri daun tembakau, uji aktivitas antibakteri, dan uji konsentrasi hambat tumbuh minimum.

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan adalah seperangkat alat destilasi uap-air, *rotary vacuum evaporator*, autoklaf, *shaking incubator*, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF), dan spektrofotometer (Spektrophotometer 600 UV-Vis Thermo Scientific), Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) (Shimadzu QP-2010S)

Bahan yang digunakan adalah daun tembakau rajangan yang diperoleh dari enam daerah penghasil tembakau, yaitu Yogyakarta (tembakau Yogyakarta), Temanggung (tembakau Temanggung), Boyolali (tembakau Boyolali), Purwodadi (tembakau Purwodadi), Blitar (tembakau Blitar), dan Probolinggo (tembakau Paiton), isolat *E. coli* dan *S.aureus* dari *Food and Nutrition Culture Collection* (FNCC) Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), tetrasiklin sebagai kontrol positif.

Preparasi sampel

Sampel daun tembakau yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari enam daerah sentra tembakau yaitu Temanggung, Yogyakarta, Purwodadi, Boyolali, Blitar dan Probolinggo. Daun tembakau rajangan kering sebelum dilakukan destilasi uap-air dipotong kecil-kecil, disaring, dan diayak dengan saringan 10 mesh.

Ekstraksi minyak atsiri daun tembakau

Sebanyak 796,2 gram daun tembakau Temanggung, 706,9 gram daun tembakau Yogyakarta, 535,7 gram daun tembakau Purwodadi, 683,4 gram daun tembakau Boyolali, 437,9 gram daun tembakau Blitar dan 446,2 gram daun tembakau Probolinggo didistilasi menggunakan metode distilasi uap selama ± 6 jam. Hasil distilasi ditampung kemudian dipekatkan sehingga air dan minyak terpisah. Minyak atsiri yang diperoleh selanjutnya disimpan untuk uji aktivitas antibakteri.

Uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi⁷

Sebanyak satu ose bakteri dari stok biakan diambil lalu diinkubasi dalam 10 mL medium cair NB selama 20 jam pada suhu 37 °C dan dihomogenkan. Medium NA sebanyak 15 mL pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ dituangkan ke dalam cawan petri steril dan didiamkan pada suhu kamar sampai memadat.

Sejumlah biakan bakteri dalam medium cair NB diambil dan disebar di dalam medium NA lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Jika nilai absorbansinya $\leq 0,5$ maka diambil 100 μL biakan bakteri sedangkan jika absorbansinya 0,6-1,0 biakan bakteri yang diambil 50 μL .

Tetrasiklin sebagai kontrol positif ditimbang 100 mg kemudian dilarutkan dengan akuades steril sampai 1 mL sehingga diperoleh larutan stok tetrasiklin 10 %. Larutan stok tetrasiklin 10 % kemudian diencerkan dengan mengambil 7,5 μL dilarutkan dalam akuades steril

sampai 500 μL sehingga diperoleh konsentrasi tertrasiklin 0,15%. Media NB tanpa penambahan larutan uji dan kontrol positif digunakan sebagai kontrol negatif.

Media yang telah diinokulasi kultur bakteri uji dilubangi dengan diameter ± 8 mm. Sampel minyak atsiri dan larutan kontrol dimasukkan ke dalam lubang tersebut lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 jam. Zona hambat yang terlihat bening di sekeliling lubang menandakan adanya aktivitas antibakteri. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan penggaris.

Pengujian konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM)⁸

Setelah aktivitas antibakteri minyak atsiri daun tembakau diketahui tahap selanjutnya menentukan KHTM minyak atsiri terhadap bakteri uji. Variasi konsentrasi yang digunakan untuk menentukan KHTM pada penelitian ini yaitu 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1 %, dan 0,5 % (v/v).

Pengamatan dilakukan dengan mengamati kejernihan media. Media yang jernih, kemudian ditanam dengan metode *streak plate*. Prosedur yang dilakukan adalah media NA yang telah dimasak dimasukkan ke dalam cawan petri ± 22 ml dan dibiarkan sampai padat. Inokulan diambil pada tabung dengan media yang jernih, digoreskan pada cawan petri, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Pertumbuhan bakteri diamati untuk hasil Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil distilasi uap-air sampel daun tembakau yang berasal dari enam lokasi yakni Temanggung, Boyolali, Yogyakarta, Purwodadi, Blitar, dan Probolinggo diperoleh rendemen minyak atsiri berkisar antara 0,54-3,39%. Berat daun tembakau yang digunakan tidak sama karena menyesuaikan ketersediaan sampel daun tembakau yang ada. Pemilihan lokasi

pengambilan sampel berdasarkan ketersediaan sampel diluar musim panen.

Ekstraksi minyak atsiri daun tembakau menggunakan metode distilasi uap-air karena metode ini merupakan metode yang sederhana dan murah. Kelebihan dari metode ini adalah penetrasi uap lebih merata dan dapat masuk ke dalam jaringan tanaman, dan suhu yang dapat dipertahankan sampai 100 °C. Keuntungan yang lain adalah waktu penyulingan lebih singkat dan rendemen minyak atsiri lebih besar bila dibandingkan dengan metode distilasi air.⁹

Minyak atsiri tembakau memiliki aroma yang khas dan kuat karena mengandung senyawa aromatis. Minyak atsiri dari tembakau oriental Prilep memiliki aktivitas antibakteri sebesar 15 mm pada bakteri *E. coli* dan 15,2 mm pada bakteri *S. aureus*.⁴ Antibakteri merupakan senyawa kimia khusus yang dihasilkan oleh organisme hidup dalam konsentrasi rendah serta dapat menghambat proses penting mikroorganisme.^{10,11}

Hasil uji aktivitas antibakteri minyak atsiri daun tembakau menunjukkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar lubang sampel. Diameter zona hambat terlihat dari zona bening di sekitar lubang. Jika semakin luas zona bening maka semakin besar suatu bahan dalam menghambat

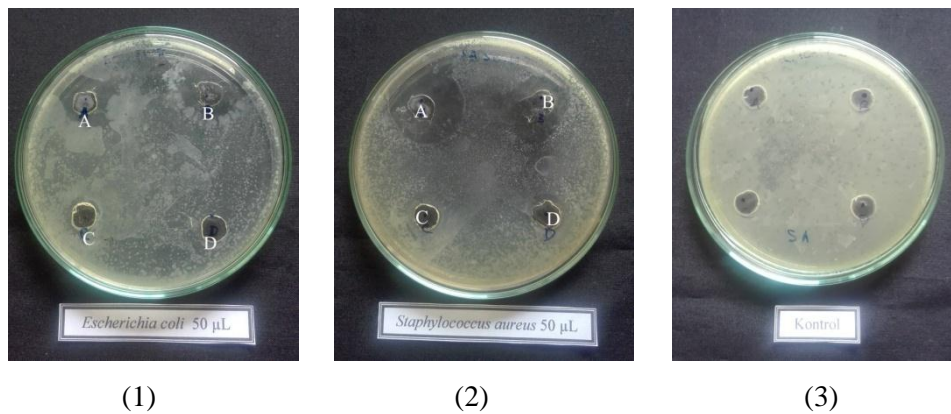
pertumbuhan bakteri. Data besarnya zona hambat disajikan pada Tabel 1.

Zona hambat terbesar untuk bakteri *S.aureus* diperoleh dari minyak atsiri tembakau Yogyakarta sebesar 26 mm, sedangkan untuk bakteri *E. coli* zona hambat terbesar diperoleh dari minyak atsiri tembakau Blitar yakni sebesar 21 mm. Pengukuran zona hambat bakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi. Metode difusi dengan menggunakan sumuran lebih sensitif dibandingkan dengan cakram. Susanto, dkk. mengategorikan diameter zona hambat sesuai dengan kekuatan daya hambatnya. Kategori lemah, sedang, kuat, dan sangat kuat secara berturut-turut adalah diameter zona hambat ≤ 5 , 6-10, 11-20, dan ≥ 21 mm.¹² Berdasarkan kategori zona hambat tersebut maka minyak atsiri tembakau Blitar memiliki zona hambat yang kuat terhadap bakteri *E.coli* dan *S.aureus* dengan zona hambat sebesar 21 mm dan 24,5 mm (Tabel 1). Hasil pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri daun tembakau dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

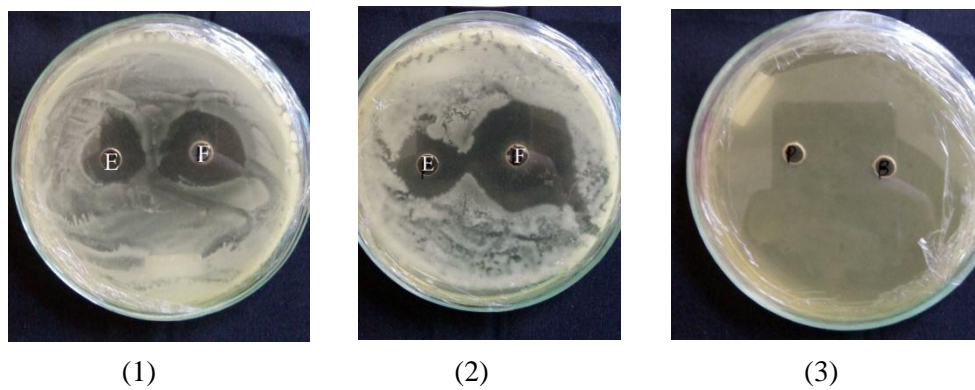
Tetrasiklin sebagai kontrol positif untuk uji aktivitas antibakteri merupakan golongan antibiotik spektrum luas. Tetrasiklin memiliki kemampuan melawan sejumlah besar patogen diantaranya adalah bakteri gram positif (*S. aureus*) dan bakteri gram negatif (*E. coli*).¹³

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri enam minyak atsiri tembakau terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

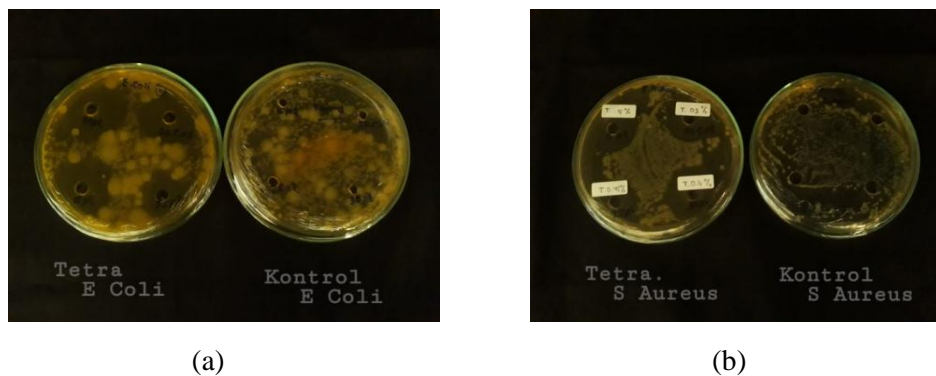
Jenis minyak atsiri tembakau	Rata-rata zona hambat (mm)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Tembakau Temanggung	13,25	25,75
Tembakau Boyolali	6,00	22,25
Tembakau Yogyakarta	10,75	26,00
Tembakau Purwodadi	0,00	14,50
Tembakau Blitar	21,00	24,50
Tembakau Probolinggo	1,30	8,50
Kontrol negatif	0,00	0,00
Kontrol positif	21,50	25,00



Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri (zona hambat) (1) Bakteri *E. coli* (2) Bakteri *S. aureus* (3) Kontrol negatif (A: tembakau Temanggung B: tembakau Yogyakarta C: tembakau Boyolali D: tembakau Purwodadi)



Gambar 2. Hasil uji aktivitas antibakteri (zona hambat) (1) Bakteri *E. coli* (2) Bakteri *S. aureus* (3) Kontrol negatif (E: tembakau Probolinggo F: tembakau Blitar)



Gambar 3. Zona hambat antibiotik tetrasiklin terhadap bakteri (a) *E. Coli* dan (b) *S. aureus*

Mekanisme kerja tetrasiklin dengan menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri. Tetrasiklin masuk ke dalam bakteri melalui dua proses yaitu difusi pasif dan transport aktif. Setelah tetrasiklin masuk ke

dalam ribosom maka akan berikatan dengan ribosom 30s dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino sehingga proses sintesis protein tidak dapat berlangsung

yang mengakibatkan bakteri tidak dapat bermetabolisme.^{14,15}

Hasil uji GCMS menunjukkan bahwa salah satu kandungan senyawa utama dalam minyak atsiri daun tembakau adalah piridin. Piridin termasuk dalam golongan alkaloid. Senyawa alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan mekanisme aksi mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Selain itu, alkaloid juga menghambat pembentukan sintesis protein sehingga dapat mengganggu metabolisme bakteri.¹⁶ Hasil yang hampir sama diperoleh pada pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kulit manggis yang juga mengandung senyawa alkaloid, dimana ekstrak kulit manggis mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan memiliki kesetaraan dengan antibiotik tetrasiklin.¹⁷ Senyawa alkaloid merupakan senyawa

metabolit sekunder yang digunakan oleh tanaman sebagai mekanisme pertahanan diri dari serangan bakteri patogen dan predator.¹⁸

Konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM)

Uji Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal suatu bahan yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji KHTM minyak atsiri dari 6 sampel daun tembakau terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* menunjukkan bahwa positif menghambat pada berbagai konsentrasi (Tabel 2). Hasil penelitian Puspita menyebutkan bahwa ekstrak daun tembakau pada konsentrasi 20% b/v dapat menghambat *S. aureus* dan *E. coli* namun kemampuannya cenderung lemah, dan tergolong sedang pada konsentrasi 40%-60% (b/v).¹⁹

Tabel 2. Pengaruh penggunaan minyak atsiri daun tembakau terhadap kadar hambat tumbuh minimum bakteri *E. coli* dan *S. aureus*

Konsentrasi minyak atsiri tembakau	Hasil uji KHTM bakteri <i>E. coli</i>					
	Tembakau Temanggung	Tembakau Boyolali	Tembakau Yogyakarta	Tembakau Purwodadi	Tembakau Blitar	Tembakau Probolinggo
Kontrol (+)	-	-	-	-	-	-
100%	-	-	-	-	-	-
50%	+	-	-	-	+	-
25%	+	-	-	-	+	-
12,5%	+	+	+	+	+	-
6,25%	+	+	+	+	+	+
3,125%	+	+	+	+	+	+
Kontrol (-)	+	+	+	+	+	+
Konsentrasi minyak atsiri tembakau	Hasil uji KHTM bakteri <i>S. aureus</i>					
	Tembakau Temanggung	Tembakau Boyolali	Tembakau Yogyakarta	Tembakau Purwodadi	Tembakau Blitar	Tembakau Probolinggo
Kontrol (+)	-	-	-	-	-	-
100%	-	-	-	-	-	-
50%	+	-	-	-	+	-
25%	+	-	+	-	+	-
12,5%	+	+	+	+	+	-
6,25%	+	+	+	+	+	-
3,125%	+	+	+	+	+	+
Kontrol (-)	+	+	+	+	+	+

Keterangan: (-): jernih (menghambat)
(+): keruh (tidak menghambat)

Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa minyak atsiri daun tembakau asal Probolinggo mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* pada konsentrasi 12,5% dan 6,25%.

Kemampuan minyak atsiri daun tembakau dalam menghambat pertumbuhan bakteri tergantung pada beberapa faktor antara lain konsentrasi minyak atsiri, kandungan senyawa aktif dalam minyak atsiri serta jenis bakteri.

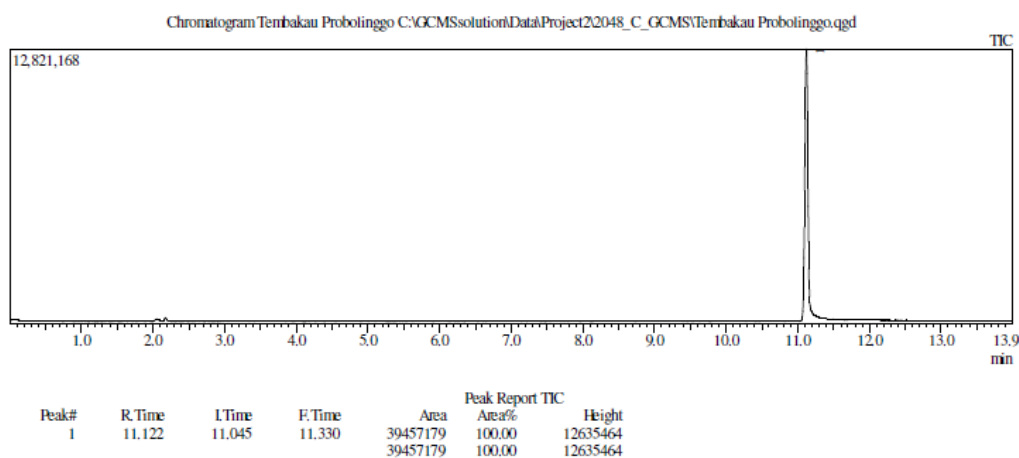
Konsentrasi minyak atsiri sangat memengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri. Semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri maka semakin kuat daya hambatnya. Hal ini terlihat pada Tabel 2 dimana pada konsentrasi 100% semua jenis minyak atsiri dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Kandungan senyawa aktif dalam minyak atsiri secara kuantitatif dan kualitatif tergantung pada beberapa faktor antara lain jenis tembakau, tanah dan iklim, ukuran daun, waktu panen, cara pengeringan daun, umur tanaman dan waktu pengeringan.²⁰ Minyak atsiri tembakau asal Probolinggo mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* berturut-turut mulai dari 12,5 dan 6,25%.

Hasil uji GC-MS menunjukkan minyak atsiri daun tembakau asal Probolinggo terdapat senyawa aktif piridin dengan luas area sebesar 12635464 (Gambar 4). Piridin merupakan salah satu jenis alkaloid.

Kandungan utama senyawa kimia dalam tembakau adalah alkaloid seperti nikotin, nornikotin, anatabin. Nikotin adalah suatu alkaloid dengan nama kimia 3-(1-metil-2-pirolidil) piridin. Senyawa piridin dapat diperoleh dari senyawa nikotin yang mengalami perubahan struktur. Senyawa alkaloid bersifat basa sehingga mudah mengalami dekomposisi karena panas dan sinar. Perubahan ini dapat disebabkan karena proses destilasi dan proses pemurnian dengan rotary evaporator.²¹

Penelitian ini menunjukkan minyak atsiri tembakau dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* sampai konsentrasi 6,25% sedangkan pada bakteri *E. coli* hanya mampu menghambat sampai konsentrasi 12,5%. Bakteri gram positif seperti *S. aureus* memiliki dinding sel yang relatif lebih sederhana, terdiri dari komponen peptidoglikan dan asam teikoat.²² *E. coli* merupakan salah satu bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang lebih tebal karena terdiri dari peptidoglikan dan lebih banyak mengandung lipid. Bakteri gram negatif juga memiliki sistem membran luar berupa *bilayer* yang terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (lapisan luar) yang bersifat nonpolar. Hal ini yang menyebabkan senyawa antibakteri lebih sulit untuk masuk ke dalam sel sehingga aktivitas antibakterinya lebih lemah dibandingkan dengan bakteri gram positif.²³



Gambar 4. Kromatogram GC-MS minyak atsiri tembakau Probolinggo

KESIMPULAN

Minyak atsiri tembakau memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dengan adanya zona hambat di media bakteri. Zona hambat terbesar pada minyak atsiri tembakau Yogyakarta sebesar 26 mm untuk bakteri *S. aureus*, sedangkan untuk bakteri *E. coli* zona hambat terbesar pada minyak atsiri tembakau Blitar yakni sebesar 21 mm. Minyak atsiri tembakau asal Probolinggo mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* sampai konsentrasi 6,25% dan bakteri *E. coli* sampai pada konsentrasi 12,5%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Kepala Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat atas kesempatan untuk melaksanakan penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada saudara Heri Prabowo sebagai Penanggung jawab RPTP, serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nur Wahidah R dan PN. Analisis Senyawa Metabolit Primer Pada Jamur Merang. *J Akad Kim.* 2017;6(1):43–7.
2. de Alencar Filho JMT, Araújo LDC, Oliveira AP, Guimarães AL, Pacheco AGM, Silva FS, et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of croton heliotropiifolius in different seasons of the year. *Brazilian J Pharmacogn* [Internet]. 2017;27(4):440–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2017.02.004>
3. Nurnasari E, Subiyakto. Komposisi kimia minyak atsiri pada beberapa tipe daun tembakau (*Nicotiana tabaccum L.*). *Ber Biol* [Internet]. 2011;10(5):571–80. Available from: <file:///C:/Users/Saskara/Edi/Downloads/1913-3768-1-SM.pdf>
4. Palic R, Stojanovic G, Alagic S, Nikolic M, Lepojevic Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and CO2 extracts of the oriental tobacco, Prilep. *Flavour Fragr J.* 2002;17(5):323–6.
5. Negara KS. Analisis Implementasi Kebijakan Penggunaan Antibiotika Rasional Untuk Mencegah Resistensi Antibiotika di RSUP Sanglah Denpasar: Studi Kasus Infeksi Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus Analysis The Implementation Policy of Rational Use of Antibiot. *J Adm Kebijak Kesehat.* 2014;1(1):42–50.
6. Zhang X, Gao H, Zhang L, Liu D, Ye X. Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Ind Crop Prod* [Internet]. 2012;39:162–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.02.029>
7. Prayoga E. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) dengan Metode Difusi Disk dan Sumuran terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Jakarta: Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah.; 2013. 40 p.
8. Effendi F, Anna P, Ernie S. Uji Aktivitas Antibakteri Teh Kombucha Probiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Fitofarmaka.* 2014;4(2):34–41.
9. Armando, Rochim. Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas. I. Jakarta: Penebar Swadaya; 2009. 20 p.
10. Utami ER. Antibiotika, Resistensi, dan Rasionalitas Terapi. *Saintis.* 2012;1(1):124–38.
11. Rahmawati N, Sudjarwo E, Widodo E. Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *J Ilmu-ilmu Peternak.* 2014;24(3):24–31.
12. Susanto, Sudrajat, Ruga R. Studi kandungan bahan aktif tumbuhan meranti merah (*Shorea leprosula Miq*) sebagai sumber senyawa antibakteri. *Mulawarman Sci.* 2012;11(12):181–90.
13. Katzung B. *Farmakologi Dasar dan Klinik.* 10th ed. Publisher E, editor. Jakarta; 2012. 30 p.
14. Asraf M. Uji Sensitivitas Antibiotika

- Pada Isolat Lapang *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Bogor: Institut Pertanian Bogor; 2015. 4 p.
15. Tariq S, Faheem S, Rizvi A, Anwar U. Tetracycline : Classification , Structure Activity Relationship and Mechanism of Action as a Theranostic Agent for Infectious Lesions-A Mini Review. 2018;5(4):1–10.
 16. Safitri L, Susilorini T, Surjowardojo P. Evaluasi Aktivitas Antimikroba (*Streptococcus Agalactiae*) Menggunakan Ekstrak Buah Mahkota Buah (*Phaleria Macrocarpa L.*) Dengan Pelarut Yang Berbeda. *J Ilmu dan Teknol Has Ternak*. 2017;12(1):8–15.
 17. Sylvia Aulia Rahmah S dan S. Uji antibakteri dan daya inhibisi ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap aktivitas xantin oksidase yang diisolasi dari air susu sapi segar. *J online Univ Negeri Malang*. 2012;1(1):1–11.
 18. Shachi Singh, Swapnil SKV. Antibacterial properties of Alkaloid rich fractions obtained from various parts of *Prosopis juliflora*. *Int J Pharma Sci Res* [Internet]. 2011;2(3):114–20. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/de76/d0398e695b03a218480c0036a6ca6d982d98.pdf>
 19. Puspita PE. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tembakau Temanggung Varietas Genjah Kemloko. Institut Pertanian Bogor; 2011.
 20. Bonamonte. D, M. V, A. F, M. M, G. A, C. F. Tobacco-induced contact dermatitis. *Eur J Dermatology* [Internet]. 2016;26(3):223–31. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L613634603%0Ahttp://dx.doi.org/10.1684/ejd.2016.2771>
 21. Lenny H. Kimia Bahan Organik Alam. Bogor: Universitas Pakuan Bogor; 2018. 142 p.
 22. Mulyani S, Legowo A, Mahanani A. Viabilitas bakteri asam laktat, keasaman dan waktu pelelehan es krim probiotik menggunakan starter *Lactobacillus casei* dan *Bifidobacterium bifidum*. *J Indon Trop Anim Agric*. 2008;33(2):120–5.
 23. Dewi F. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Universitas Sebelas Maret; 2010.

Uji Sensitisasi Dermal Masker Gel Kombinasi Ekstrak Ampas Daun Teh dan Air Cucian Beras

Dermal Sensitization Test of Gel Mask Containing Combination of Green Tea Waste Extract and Rice Washing Water

Andi Nurul Annisa*, Wahyu Utamingrum, Erza Genatrika

Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Purwokerto, Indonesia
*E-mail: andinurulanis@gmail.com

Diterima: 24 September 2018

Direvisi: 21 Januari 2019

Disetujui: 19 Februari 2019

Abstrak

Kombinasi ekstrak ampas daun teh dan air cucian beras sebagai masker gel *peel-off* diketahui stabil dalam penyimpanan 28 hari dan memiliki nilai IC_{50} sebesar 20,4 ppm. Potensi tersebut dapat memberikan efek optimal sebagai bahan kosmetika. Akan tetapi, untuk memenuhi persyaratan regulasi Badan Pengawas Obat Makanan (BPOM) RI dan ISO 10993, uji sensitisasi kulit juga harus dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui reaksi sensitisasi kulit dari masker gel *peel-off* yang mengandung kombinasi ekstrak ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.) pada hewan uji. Desain penelitian menggunakan eksperimental laboratorium dan pemilihan sampel secara *simple random sampling*. Perlakuan diberikan berdasarkan *posttest-only control group design*. Hasil uji reaksi sensitisasi kulit ditentukan menggunakan metode *Guinea Pig Maximization Test* (GPMT). Hasil penelitian menunjukkan adanya reaksi eritema maupun edema menurut Skala Magnusson dan Kligman setelah pemberian masker gel *peel-off* sebagai sampel dalam uji topikal pada hewan uji muncul pada hari ke-11 dan pada uji tantangan baru muncul pada hari ke-24. Hal ini disebabkan masa inkubasi selama 1 minggu dimana keadaan hipersensitivitas dapat berkembang sehingga reaksi tersebut disebut juga dengan reaksi hipersensitivitas tertunda.

Kata kunci: Masker gel; Ampas daun teh; Air cucian beras; Uji sensitisasi

Abstract

The combination of tea leaf dregs extract and rice washing water as a *peel-off* gel mask was found to be stable up to 28 days of storage and had an IC_{50} value 20.4 ppm. This potential can provide an optimal effects as cosmetic ingredients. However, to meet the regulatory requirements of Badan Pengawas Obat Makanan (BPOM) RI and ISO 10993, a dermal sensitization test also need to be done. The aim of this study was to determine the dermal sensitization reaction from *peel-off* gel mask containing a combination of tea leaf dregsextract (*Camellia sinensis* L.) and rice washing water (*Oryza sativa* L.) in test animal. This study was designed based on experimental laboratory methods and sample selection by *simple random sampling*. The intervention was given based on *posttest-only control group design*. The test results for dermal sensitization were determined using the *Guinea Pig Maximization Test* (GPMT) method. The results showed erythema and edema reactions according to the Magnusson and Kligman scale after administration of *peel-off* gel masks as samples in the topical tests in test animals, appeared on the 11th day and in the challenge test appeared on the 24th day. This was due to incubation period for one week where the hypersensitivity state can develop, so that this reaction is also called the delayed hypersensitivity reaction.

Keywords: Gel mask; Green tea waste; Rice washing water; Sensitization test

PENDAHULUAN

Teh dan beras merupakan bahan yang secara empiris digunakan untuk perawatan kecantikan sebagai warisan tradisional di Indonesia. Disisi lain, penggunaan teh dan beras lebih banyak digunakan sebagai bahan pangan yang menghasilkan limbah yaitu ampas daun teh dan air cucian beras. Ampas daun teh dan air cucian beras hingga saat ini masih dimanfaatkan sebagai kompos yang dapat meningkatkan kualitas pertumbuhan tanaman hias dan pakan ternak.^{1,2} Namun, masih banyak potensi yang dimiliki ampas daun teh dan air cucian beras yang dapat digunakan sebagai bahan baku kosmetik.

Ampas daun teh mengandung senyawa antioksidan yang berpotensi sebagai bahan baku kosmetik. Senyawa antioksidan tersebut adalah senyawa polifenol total, flavanoid total, asam galat, katekin dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) dengan nilai masing-masing sebesar 7,1%; 1,04%; 2,76%; 0,83%; dan 5,18%.³ Selain itu, air cucian beras juga berpotensi sebagai antioksidan dan *antiaging* karena memiliki *starch* atau pati halus. Senyawa golongan karbohidrat tersebut dapat merontokkan debu dan sel kulit mati pada wajah dan dapat meregenerasi sel-sel kulit.⁴ Potensi air cucian beras sebagai antioksidan juga telah dilaporkan yakni adanya total polifenol sebesar 390,98 mg/100 g bahan dan daya penangkapan radikal bebas sebesar 385,27 mmol eq.trolox/ g bahan.² Ampas daun teh yang dilaporkan mengandung bahan antioksidan, memenuhi syarat sebagai bahan baku kosmetik dan memiliki efek sinergisme jika dikombinasikan dengan air cucian beras sebagai masker antioksidan.

Kandungan antioksidan dari ampas daun teh sebanyak 7% dan air cucian beras sebanyak 5% yang dikombinasikan dalam formula masker gel *peel-off* telah dilaporkan stabil dalam penyimpanan 28 hari pada uji stabilitas sediaan dan memiliki IC₅₀ sebesar 20,4 ppm.⁵ Potensi kedua ekstrak tersebut dalam sediaan masker gel *peel-off* diharapkan dapat memberikan efek

optimal dan sinergisme untuk perawatan wajah, karena masker gel *peel-off* memiliki retensi yang baik, dapat mengurangi komedo dan kulit mati, serta mengurangi keriput.⁶ Oleh karena itu, untuk dapat digunakan sebagai perawatan wajah maka diperlukan tes keamanan kosmetika sesuai persyaratan Badan Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM).

Tes keamanan kosmetika menurut persyaratan BPOM tahun 2014 terdiri dari, 9 jenis, diatur dalam peraturan BPOM nomor 7 tahun 2014 tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis secara *in-vivo*.⁷ Salah satu persyaratan tes keamanan kosmetika yang akan diujikan pada formula masker gel *peel-off* kombinasi ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.) adalah uji sensitisasi dermal pada hewan uji. Uji sensitisasi dermal ini dilakukan untuk mengetahui reaksi sensitivitas pada kulit jika sediaan tersebut digunakan sebagai kosmetika perawatan wajah.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium untuk melakukan uji sensitisasi dermal terhadap sediaan masker gel *peel-off* kombinasi ekstrak ampas daun teh yang diekstrak menggunakan etanol dan air cucian beras secara *in vivo*.^{2,3} Hewan uji yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur Wistar dewasa muda dan sehat, berjenis kelamin jantan dengan bobot 160-300 gram menyesuaikan dengan bobot hewan uji pada BPOM RI untuk uji sensitisasi dermal. Teknik sampling untuk menentukan hewan uji menggunakan *simple random sampling* dengan perlakuan *posttest-only control group design*, dimana hewan uji dikelompokkan menjadi 3 kelompok yaitu kontrol normal (tanpa perlakuan) sebanyak 5 tikus, kontrol negatif (NaCl fisiologis) sebanyak 5 tikus dan kelompok sampel (masker wajah dengan kombinasi konsentrasi 7% ekstrak ampas daun teh dan 5% endapan air cucian beras) sebanyak 10 tikus. Hewan uji tersebut kemudian

diaklimatisasi di ruang percobaan selama 5 hari. Hewan uji dicukur bulunya 24 jam sebelum penelitian dimulai.

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahapan uji, yaitu uji pendahuluan dan uji utama. Uji pendahuluan bertujuan untuk mengidentifikasi reaksi sensitisasi dermal yang berpotensi muncul akibat pemberian sampel uji. Uji pendahuluan dilakukan dengan melalui dua fase yaitu fase induksi intradermal dan fase uji topikal. Pada uji utama dilakukan untuk melihat respon sensitisasi dermal pada hewan uji. Uji utama dilakukan melalui tiga fase yaitu fase induksi intradermal, uji topikal dan ujiantang.

Penelitian ini telah memenuhi kaidah etik yang tertera dalam Deklarasi Helsinki 2008 sesuai dengan surat ijin Komisi Etik dan Penelitian Kedokteran FK UNSOED dengan nomor persetujuan etik Ref. 0472/KEPK/I/2018.

Alat dan Bahan

Timbangan analitik, alat-alat gelas laboratorium, stamper dan mortir, kertas saring, pinset, kompor penangas, panci, occlusive patch, elastic bandage, kassa steril, injeksi 1 ml dan 3 ml serta gunting.

Masker gel *peel-off* yang mengandung komposisi ampas daun teh, air cucian beras basis gel pembentuk *peel-off* (HPMC dan PVA), humektan (Propilenglikol) dan pengawet (Metil paraben dan propil paraben), Freund's Complete Adjuvant (FCA, Sigma), NaCl fisiologis (Otsuka), etanol 70% (Bratachem), sodium dodesilsulfat 10% (Merck), dan hewan uji tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Prosedur kerja

Penelitian ini menggunakan prinsip dari metode Guinea Pig Maximization Test (GPMT) untuk menilai reaksi sensitisasi dermal terhadap kulit tikus.^{7,8} Tikus percobaan diaklimatisasi selama 5 hari sebelum digunakan di kandang Sarana Pemeliharaan Hewan Uji Laboratorium Farmakologi dan Toksikologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah

Purwokerto. Setiap kelompok percobaan melalui dua tahapan uji yaitu tahap uji pendahuluan dan uji utama sesuai dengan peraturan BPOM nomor 7 tahun 2014 dan ISO 10993-10. Hewan uji diberikan sampel jadi dari masker gel peel-off kombinasi ampas daun teh dan air cucian beras di area tengkuk untuk uji pendahuluan dan area punggung pada uji utama. Sampel tersebut diberikan selama 24 jam dengan dibalut oleh kassa dan perban selanjutnya ditutup dengan occlusive patch. Setelah itu, dilakukan pengamatan untuk uji pendahuluan selama 24 jam kemudian dilanjutkan ke uji utama. Pengamatan pada uji utama terhadap kulit tikus dimulai dari hari ke-0 (sebagai awal dari fase induksi intradermal), ke-1, dan ke-7 (sebagai awal fase induksi topikal). Selanjutnya, pengamatan dilanjutkan pada fase induksi topikal di hari ke-9 untuk melihat reaksi eritema dan edema. Pada fase ini sodium deodesilsulfat 10% diberikan ke hewan uji jika fase induksi topikal hari ke-7 tidak terlihat reaksi eritema dan edema. Pengamatan kemudian dilanjutkan pada hari ke-11 hingga fase uji tantang di hari ke-22, ke-23, dan ke-24 dengan melakukan skoring eritema dan edema menurut skala Magnusson dan Kligman pada Tabel 1.

Tabel 1. Skala Magnusson dan Kligman

Reaksi topikal	Skor
Tidak terlihat perubahan	0
Eritema ringan atau bercak eritema	1
Eritema sedang atau kumpulan eritema	2
Eritema kuat dan/atau edema/pembengkakan	3

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil yang diperoleh dari uji pendahuluan dapat dilihat pada gambar 1. dan tabel 2. sedangkan interpretasi data skor mengacu pada Skala Magnusson dan Kligman.^{7,8}



- a. Kelompok normal;
- b. Kelompok kontrol negatif
- c. Kelompok sampel

Gambar 1. Hasil Pengamatan Uji Pendahuluan

Pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pada semua kelompok percobaan tidak terjadi reaksi sensitisasi dermal. Hal ini dikarenakan reaksi sensitisasi membutuhkan proses untuk membentuk respon imunitas. Oleh karena itu, percobaan dilanjutkan dengan tahap uji utama untuk melihat respon sensitisasi dermal.

Hasil uji utama pada fase induksi intradermal dan uji topikal ternyata menunjukkan bahwa tidak terlihat tanda klinis eritema dan edema pada hewan uji.

Namun, setelah pengamatan induksi topikal hari ke-11 pada kelompok sampel diperoleh gambaran klinis eritema dan edema yang dapat dilihat pada gambar 2.

Gambaran klinis eritema dan edema juga terlihat pada uji tantang (Gambar 3). Sedangkandata pengamatan uji topikal dan uji tantang dapat dilihat pada Tabel 3. dimana interpretasi data skor mengacu pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 3. tikus percobaan kelompok sampel pada hari ke-11 sebanyak 4 ekor memiliki skor 3, sebanyak 4 ekor memiliki skor 1 dan sebanyak 2 ekor memiliki skor 0. Selanjutnya, data yang diperoleh pada uji tantang untuk kelompok sampel pada hari ke-22, ke-23 dan ke-24 berturut-turut yaitu sebanyak 4 ekor memiliki skor 1 dan 6 ekor memiliki skor 0. Interpretasi untuk skor 3 menunjukkan eritema kuat dan/atau edema (pembengkakan). Sedangkan nilai skor 1 yaitu eritema ringan atau bercak eritema serta skor 0 menunjukkan tidak ada perubahan. Data tersebut di atas menunjukkan adanya reaksi sensitisasi dermal. Reaksi sensitisasi tersebut terlihat karena antara uji induksi intradermal dan uji topikal terdapat periode masa inkubasi minimal 1 minggu dimana keadaan hipersensitivitas dapat berkembang. Dengan demikian, hasil yang diperoleh menunjukkan adanya reaksi sensitisasi pada hewan uji dibandingkan dengan kelompok normal dan kelompok negatif yang hanya diberikan NaCl fisiologis.

Tabel 2. Hasil pengamatan reaksi sensitisasi dermal pada uji pendahuluan

Tikus	Hari ke-0 (Induksi Intradermal)			Hari ke-1 (Induksi Topikal)		
	KN	K(-)	KS	KN	K(-)	KS
T1	0	0	0	0	0	0
T2	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	0	0	0	0

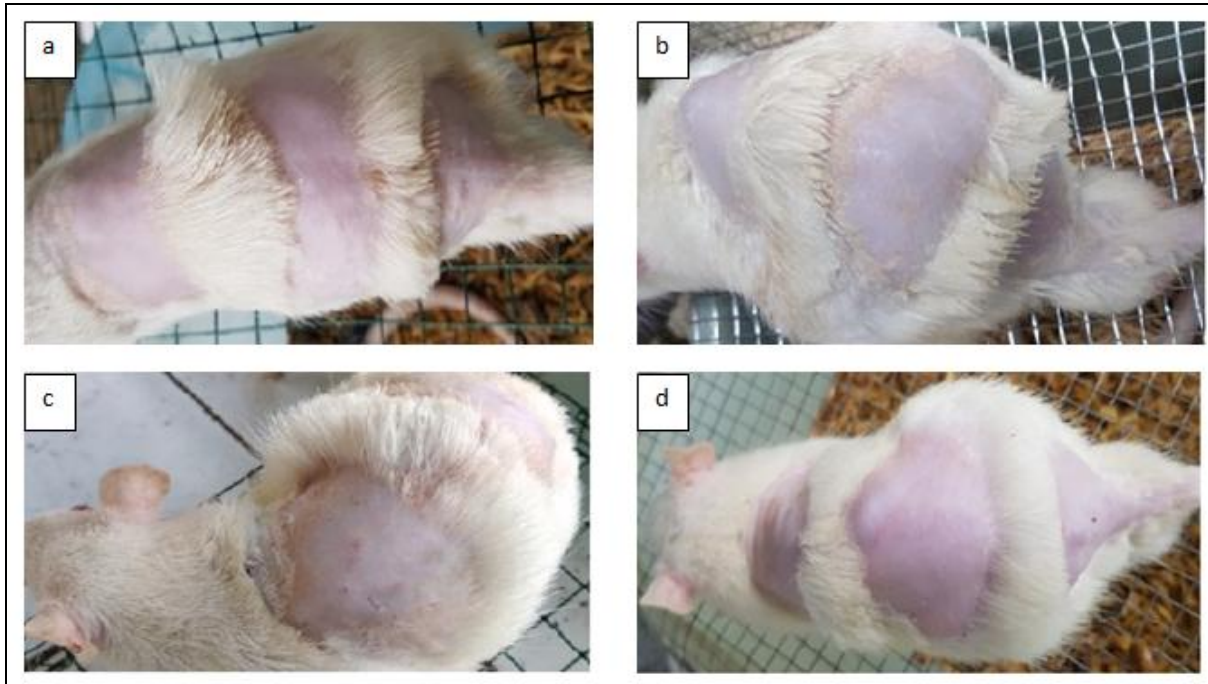
Keterangan:

T1-T3 : Tikus percobaan 1-3

KN : Kelompok normal

K (-) : Kelompok negatif

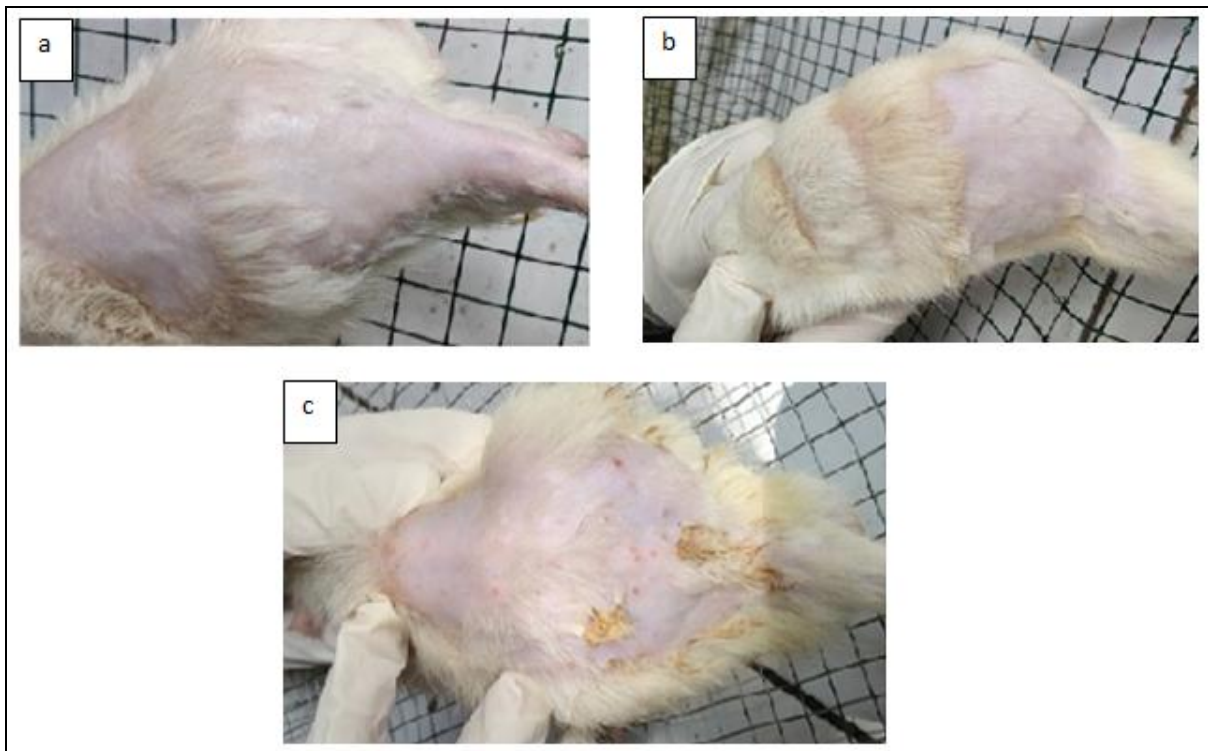
KS : Kelompok sampel



Keterangan:

- a. Tikus kelompok normal
- b. Tikus kelompok negatif
- c. Tikus kelompok sampel yang mengalami berkas eritema
- d. Tikus kelompok sampel yang mengalami edema

Gambar 2. Hasil Pengamatan Uji Topikal Hari ke-1



Keterangan:

- a. Tikus kelompok normal
- b. Tikus kelompok negatif
- c. Tikus kelompok sampel yang mengalami berkas eritema

Gambar 3. Hasil Pengamatan Uji Tantang

Tabel 3. Hasil pengamatan reaksi sensitisasi dermal pada uji utama topikal hari ke-11 sampai uji tantang hari ke-24

Tikus	Uji Topikal (Hari ke-11)			Uji Tantang								
				Hari ke-22			Hari ke-23			Hari ke-24		
	KN	K(-)	KS	KN	K(-)	KS	KN	K(-)	KS	KN	K(-)	KS
T1	0	0	3	0	0	1	0	0	1	0	0	1
T2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T3	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
T4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0
T7	(-)	(-)	3	(-)	(-)	1	(-)	(-)	1	(-)	(-)	1
T8	(-)	(-)	1	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0
T9	(-)	(-)	3	(-)	(-)	1	(-)	(-)	1	(-)	(-)	1
T10	(-)	(-)	3	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0	(-)	(-)	0

Keterangan:

- T1-T10 : Tikus percobaan 1-10
- KN : Kelompok normal
- K (-) : Kelompok negatif
- KS : Kelompok sampel
- Skor (-) : Tanpa T6-T10

Reaksi sensitisasi merupakan reaksi biologi kompleks yang melibatkan banyak tahap termasuk penetrasi kulit, induksi dari sinyal yang berbahaya, ikatan peptida, tahap metabolit dan aktivasi dari *Antigen Presenting Cells* (APC).⁹ Tanda dan gejala klinis pada reaksi sensitisasi dermal berupa eritema dan edema terlihat pada hewan uji kelompok sampel. Eritema dan edema timbul akibat adanya peningkatan tekanan dan bertambahnya permeabilitas pembuluh darah serta akumulasi volume cairan interstisial yang disebabkan oleh mekanisme vasodilatasi.¹⁰ Kedua gambaran klinis tersebut termasuk respon inflamasi yang timbul akibat reaksi hipersensitivitas.

Reaksi hipersensitivitas ini merupakan reaksi akibat respon sistem imun yang berlebihan pada antigen. Reaksi tersebut dikategorikan sebagai reaksi hipersensitivitas selular atau hipersensitivitas tipe IV. Reaksi ini diperantai oleh sel T CD4⁺ dan CD8⁺.¹¹ Hal ini dikarenakan limfosit T di sensitisasi khusus tanpa peran antibodi sehingga menyebabkan respon tertunda (*delayed-responding*). Respon hipersensitivitas tertunda dipengaruhi oleh FCA (bahan ajuvan) sebagai antigen spesifik yang membentuk respon imun melalui

reaksi granulomatososa. Prosesnya ditandai dengan pembentukan granuloma berupa sel-sel berinti tunggal yang mengalami perubahan histosit, sel-sel epiteloid dan sel-sel dari benda asing. Kemudian, FCA sebagai antigen spesifik akan mengaktifkan makrofag yang khas dan memicu kepekaan limfosit T untuk mengeluarkan limfokin. Selain itu, adanya akumulasi neutrofil di vena daerah paparan akibat dari interaksi antar sel limfosit T dengan FCA, menyebabkan terlepasnya limfokin dan menarik makrofag ke daerah paparan. Aktivasi makrofag melepaskan monokin dan sitokin yaitu IL-1 dan TNF yang mengaktifkan sel limfosit untuk menghasilkan IFN- γ , yang akan merangsang monosit ke jaringan sehingga meningkatkan respon inflamasi untuk menghancurkan benda asing.^{11,12}

Benda asing yang dimaksud dalam penelitian ini adalah sodium dodesilsulfat dan masker gel *peel-off* kombinasi ekstrak ampas daun teh dan air cucian beras. Sodium dodesil sulfat (SDS) adalah surfaktan yang digunakan dalam formula masker gel *peel-off* sebagai zat aktif permukaan. SDS telah dilaporkan pada penelitian terdahulu menunjukkan hasil yang signifikan dalam menginduksi reaksi

iritasi setelah dioleskan ke kulit dan wajah.¹³ Penggunaan SDS dalam pasta gigi juga dapat menghasilkan reaksi alergi dan iritasi eritematosa nonspesifik pada penggunaannya.¹⁴ Hal tersebut terjadi karena SDS memicu reaksi alergi dan iritasi pada sel epitel. SDS dapat merangsang pelepasan sitokin dari sel epitel dan bertindak sebagai agen inflamasi yang menyebabkan deskuamasi mukosa mulut serta iritasi.¹⁵ Penelitian lain menunjukkan bahwa reaksi iritasi kulit dapat terdeteksi hanya dengan menggunakan SDS konsentrasi rendah yang dilarutkan dalam basis gel dibandingkan basis lainnya. Hal ini dikarenakan kosmetika yang mengandung basis gel memiliki bobot molekul zat yang tinggi dan mudah larut dalam air serta menguap lebih lambat setelah kosmetik tersebut diaplikasikan. Oleh karena itu, durasi kontak antara sampel dan kulit akan lebih lama pada penggunaan gel dan dapat menyebabkan reaksi iritasi yang lebih kuat dalam penggunaan aplikasi berulang.¹⁵ Selain SDS, masker gel *peel-off* dalam penelitian ini juga berperan sebagai benda asing.

Masker gel *peel-off* pada kelompok sampel hewan uji menimbulkan reaksi sensitisasi jika dibandingkan dengan hasil dari kelompok negatif yang hanya diberikan NaCl fisiologis dan kelompok normal. Hal ini dikarenakan efek eritema dan edema muncul setelah periode hipersensitivitas berkembang pada pemberian sampel masker gel *peel-off* kombinasi ekstrak ampas daun teh dan air cucian beras. Sampel tersebut dikenali oleh sistem imunitas sebagai benda asing. Pengenalan benda asing tersebut menimbulkan respon hipersensitivitas untuk menghancurkan benda asing sehingga timbul eritema dan edema pada hewan uji. Potensi SDS dan sampel masker gel *peel-off* sebagai benda asing tersebut yang mengaktivasi sel limfosit T dan monosit di dalam jaringan sehingga menyebabkan tanda kemerahan (eritema) dan pembengkakan (edema) pada kulit.¹⁰ Hasil yang didapatkan pada uji tantang

selama hari ke-22, ke-23, dan ke-24 memiliki skor nilai yang sama karena ruam eritema akan mengalami proses terlepasnya stratum korneum/terkelupasnya jaringan epitel kulit (deskuamasi) dalam waktu 1-2 minggu.¹⁶

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa formula masker gel *peel-off* kombinasi ekstrak ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.) dengan bahan surfaktan SDS menimbulkan reaksi sensitisasi kulit pada hewan uji setelah pemberian pada uji utama fase uji topikal pada hari ke- 11 yang dinilai menurut Skala Magnusson dan Kligman karena kandungan SDS dilaporkan memiliki efek signifikan untuk menginduksi reaksi alergi dan iritasi.

SARAN

Perlu dilakukan uji sensitisasi kulit pada masker gel *peel-off* ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.) yang tidak mengandung SDS sebagai bahan surfaktan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih diberikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto dan Tim Uji Praktikum.

DAFTAR RUJUKAN

1. Kresno, SW. Pertumbuhan dan kualitas daun bromelia dengan menggunakan ampas teh dan air cucian beras putih. [Thesis]. Yogyakarta UPN VETERAN; 2014 <http://eprints.upnyk.ac.id/10377/> diakses pada tanggal 10 Januari 2018
2. Ijiri D, Shogo N, Kenji T, Satoru I, Akira O. Effects of feeding dried concentrated rice-washing water on growth performance and skeletal muscle lipid peroxidation in broiler chickens. Japan Poultry Science Association.2013;50:370-74

3. Handayani D, Abdul M, Anna SR. Optimasi ekstraksi ampas teh hijau (*Camellia sinensis*) menggunakan metode microwave assisted extraction untuk menghasilkan ekstrak teh hijau. *Traditional Medicine Journal*. 2014;19(1):29-35.
4. Samahah N, Qomariyah N, Dinda DR, Eva R, Rusly H. Pengolahan air leri menjadi sabun pembersih wajah alami dan ekonomis. *Prosiding Seminar Nasional Kimia FMIPA Universitas Negeri, Surabaya*; 2015.
5. Annisa AN, Nisya A, Tyas AK, Maya A, Irfan N. Camorys for antiaging: Masker wajah dari limbah ampas daun teh (*Camellia sinensis* L.) dan air cucian beras (*Oryza sativa* L.). *Laporan Akhir Program Kreativitas Mahasiswa Bidang Penelitian. Purwokerto: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto*; 2017.
6. Jayronia S. Design and development of peel-off mask gel formulation of tretinoin for acne vulgaris. *World J. Pharm. Pharm. Sci*. 2016;5:928–38.
7. Republik Indonesia. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Nomor 7 Tahun 2014 tentang Pedoman uji toksisitas nonklinik secara *in vivo*. Jakarta: BPOM; 2014.
8. International Standard ISO 10993-10. biological evaluation of medical devices: tests for irritation and skin sensitization. ISO Third Edition. Switzerland: International Standard ISO; 2010.
9. Ball N, Stuart C, Juan CC, Hans C, Dorothea E, Roger E, et al. Evaluating the sensitization potential of surfactants: Integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and in vitro methods in a weight-of-evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2011;60(3):389-400
10. Hafizi I, Marsetyawan HNES. Penentuan konsentrasi stainless steel 316L dan kobalt kromium remanium GM-800 pada uji GPMT. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 2016;2(3):121-27.
11. Riwayati. Reaksi hipersensitivitas atau alergi. *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera*. 2015;13(26):22-7.
12. Zayyan AB, M. Yanuar IN, Ika KO. Pengaruh ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) terhadap jumlah sel limfosit pada inflamasi pulpa studi in vivo pada gigi molar rahang atas tikus putih wistar jantan. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2016;1(2):140-5.
13. Marrakchi S, Maibach HI. Sodium lauryl sulfate-induced irritation in the human face: regional and age-related differences. *Skin Pharmacology and Physiology*. 2006;19(3): 177-80.
14. Brown RS, Langston S, Alison LG. Inflammatory reaction of the anterior dorsal tongue presumably to sodium lauryl sulfate within toothpastes: a triple case report. *Oral Medicine*. 2018;125(2):17-21.
15. Horita K, Daisuke H, Hiroyuki T, Mitsue Y, Akiko Y, Kayoko M. Effects of different base agents on prediction of skin irritation by sodium lauryl sulfate using patch testing and repeated application test. *Toxicology*. 2017;382:10-5.
16. Menaldi SLS, Prakoeswa CRS, Ayudianti P, Ramali LM, Laksono RM, Surjaatmaja M, et.al. *Skin infections: Must known diseases*. Universitas Brawijaya Press, Malang; 2016.

Kajian Sistematis: Efek Gen *Multi Drug Resistance-1* pada Farmakokinetik Klopido­grel

A Systematic Review: Impact of Multi Drug Resistance-1 Gene on Clopidogrel Pharmacokinetics

Rasmaya Niruri^{1*}, Rini Noviyani^{2,4}, Indah Mei Rahajeng³

¹Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Sebelas Maret, Indonesia

²Program Studi Farmasi, FMIPA, Universitas Udayana, Indonesia

³Program Studi Ilmu Keperawatan, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana, Indonesia

⁴Doctor of Philosophy Program in HTA (International Program), Faculty of Pharmacy, Mahidol
University, Thailand

*E-mail: rasmaya@staff.uns.ac.id

Diterima: 15 Oktober 2018

Direvisi: 26 Januari 2019

Disetujui: 16 Februari 2019

Abstrak

Polimorfisme gen *Multi Drug Resistance-1* (*MDR-1*), yang merupakan gen penyandi *P-glycoprotein*, dapat mempengaruhi absorpsi pada saluran cerna. Kajian sistematis ini bertujuan untuk mengidentifikasi efek dari gen *MDR-1* varian 3435 pada farmakokinetik klopido­grel. Literatur kajian diperoleh dari *database MEDLINE, Science Direct, Scopus, Clinical Key, ProQuest* dan *Google Scholar*. Dilakukan *critical review* dan analisis artikel riset yang diperoleh untuk mencapai tujuan kajian ini. Hasil kajian menunjukkan bahwa pada pasien dengan penyakit kardiovaskular, kadar puncak (C_{maks}) dan total daerah dibawah kurva/*total Area Under Curve* (AUC) klopido­grel dan/atau metabolit aktifnya adalah lebih rendah secara signifikan pada subjek dengan 3435TT dibandingkan pada 3435CC. Namun, varian Gen *MDR-1* tidak berkorelasi secara signifikan pada konsentrasi plasma subjek sehat. Profil farmakokinetik klopido­grel menunjukkan perbedaan pada *MDR-1* varian 3435 dan status kesehatan yang berbeda.

Kata kunci: *MDR-1; Varian 3435; Farmakokinetik klopido­grel*

Abstract

Multi Drug Resistance-1 (MDR-1) gene polymorphisms encoding for P-glycoprotein can affect clopidogrel intestinal absorption. This systematic review aim to identify the impact of MDR-1 gene 3435 variants on clopidogrel pharmacokinetics. Literature review were retrieved from MEDLINE, Science Direct, Scopus, Clinical Key, ProQuest and Google Scholar databases. The articles are critically reviewed and analyzed to answer this systematic review's aim. The result showed that, in patients with cardiovascular disease, the peak plasma concentration (C_{max}) and the total area under the plasma concentration–time curve (AUC) of clopidogrel and its active metabolites were lower in 3435TT compared to 3435CC. Nevertheless, the variants of MDR-1 gene were not significantly correlated to the plasma concentration in healthy subjects. Clopidogrel pharmacokinetic profile varied widely between MDR-1 3435 variants and subjects.

Keywords: *MDR-1; 3435 variant; Clopidogrel pharmacokinetic*

PENDAHULUAN

Gen *Multi Drug Resistance-1* (*MDR-1*) varian 3435 ditemukan dengan frekuensi tinggi pada populasi asia.¹ Varian tersebut berkaitan secara signifikan pada *major adverse cardiovascular outcome* (*MACE*).² *P-glycoprotein* (*P-gp*), yang disandi oleh Gen *MDR-1*, adalah suatu *adenosine triphosphate* (*ATP*)-*dependent-drug-efflux pump*. *P-gp* atau *MDR-1 transporter* berperan penting dalam bioavailabilitas xenobiotika. Adanya varian pada gen *MDR-1* dapat mempengaruhi tingkat ekspresi dan fungsi *P-gp*.¹

Respon yang buruk (*poor responsiveness*) pada terapi clopidogrel berkaitan dengan genotip *TT* pada polimorfisme 3435. Pasien yang mengalami agregasi platelet lebih dari 70% diklasifikasikan kedalam *poor responsiveness*.³ Terdapatnya *T allele carrier* pada 3435 tersebut juga merupakan faktor resiko terjadinya *MACE* pada pasien dengan *loading dose* klopidogrel 300 mg.² Riset kajian sistematis ini bertujuan untuk mengidentifikasi efek dari Gen *MDR-1* varian 3435 pada farmakokinetik klopidogrel.

METODE

Dilakukan kajian sistematis terhadap sejumlah artikel riset dari tahun 2006 yang ditelusuri, diseleksi, dan dilakukan penilaian terhadap kualitasnya. Seleksi dan penilaian kualitas artikel riset dilakukan oleh 2 (dua) *reviewer*. Jika terdapat perbedaan, maka dipecahkan dengan diskusi antara 2 *reviewer*. Ketika perbedaan tetap tidak dapat diselesaikan maka dilakukan konsultasi lebih lanjut dengan *reviewer* ketiga.

Strategi pencarian dan seleksi artikel riset

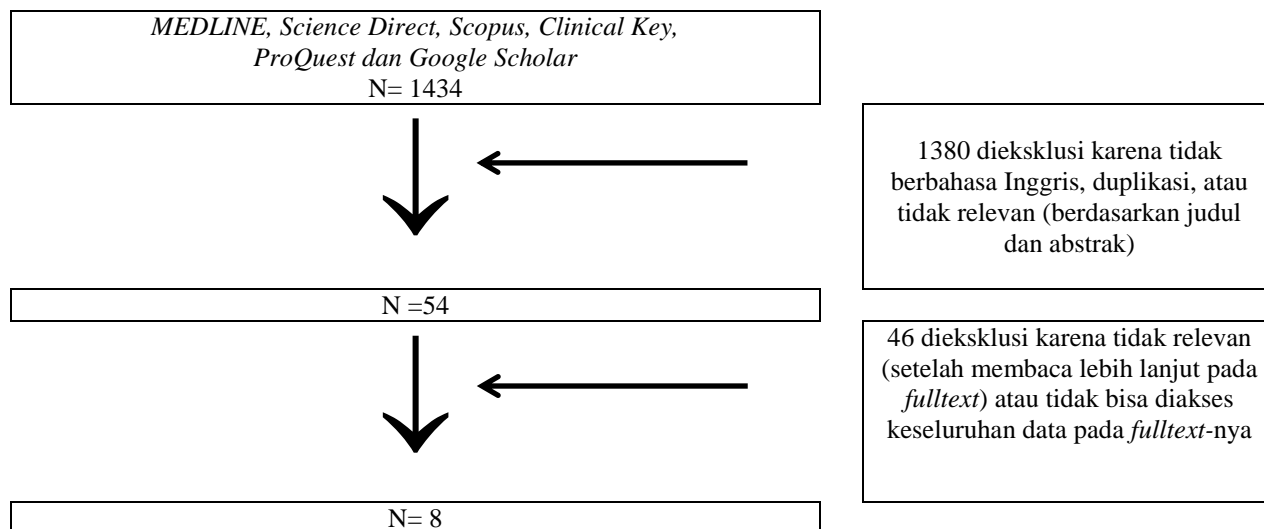
Pencarian secara komprehensif pada *database MEDLINE, Science Direct, Scopus, Clinical Key, ProQuest, dan Google Scholar* dilakukan untuk memperoleh literatur yang paling relevan dengan tujuan kajian ini. Keseluruhan kombinasi kata kunci yaitu ("*platelet aggregation inhibitors*") or

("clopidogrel") and ("*mdr1 gene*") or ("*ABCB1*") and ("*bioavailability*") or ("*pharmacokinetic*") or ("*pharmacokinetics*") diterapkan pada pencarian artikel riset pada *database*.

Artikel riset yang memenuhi kriteria inklusi akan dianalisis, yaitu *fulltext* studi observasional dan *clinical trial* yang original dimana subjeknya mendapatkan pemeriksaan genotip pada gen *MDR-1* varian 3435 dan dilakukan evaluasi parameter farmakokinetik dari klopidogrel. Artikel yang memenuhi kriteria eksklusi akan dikeluarkan dan tidak dianalisis. Kriteria eksklusi pada kajian ini adalah: artikel riset yang tidak dalam Bahasa Inggris, adanya duplikasi artikel, artikel riset yang hanya diperoleh dalam bentuk abstrak atau dalam bentuk laporan, dan jika keseluruhan data pada *fulltext* tidak dapat diakses. Jika artikel merupakan duplikasi (terdapat lebih dari satu artikel dengan pengarang yang sama, judul, dan abstrak yang sama) namun dipublikasikan pada penerbit yang berbeda, maka akan dipilih artikel dengan tahun terbit lebih awal. Artikel riset yang potensial dan relevan akan di ekstrak berdasarkan judul dan abstrak, selanjutnya *fulltext* disaring berdasarkan kriteria kajian ini.

Penilaian kualitas artikel riset dan sintesis data

The Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies dari *the National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute* digunakan untuk mengevaluasi kualitas dari artikel riset.⁵ Pada penilaian kualitas metodologi, yang dimasuk *exposure* adalah subjek (pada artikel riset yang dianalisis) yang telah dilakukan pemeriksaan genotip gen *MDR-1* pada posisi 3435 dan *outcome* adalah hasil parameter farmakokinetik pada subjek dengan varian 3435. Data yang terekstrak akan dianalisis secara deskriptif.



Gambar 1. Flow chart hasil seleksi riset artikel

HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi artikel

Terdapat 1434 artikel yang dapat diakses judul dan abstraknya melalui enam database yang digunakan. Dari artikel tersebut, diperoleh 8 artikel riset yang memenuhi kriteria (Gambar 1, Tabel 1, dan Tabel 2) dan dilakukan penilaian kualitas metodologi.

Berdasarkan penilaian kualitas, terdapat setidaknya 1 kriteria yang tidak sesuai dengan *tool criteria*, sehingga mempengaruhi kualitas (Tabel 2 dan Tabel 3). Faktor yang berkontribusi membuat kualitas artikel lebih rendah adalah jumlah

sampel yang relatif sedikit, jumlah persentase yang besar (>20%) untuk partisipan yang tidak dapat diikuti hingga akhir penelitian (*participants who loss to follow up*), tidak adanya *adjustment/pengukuran* dari *confounding variable* yang potensial berpengaruh pada farmakokinetik klopidoogrel, serta ketidakcukupan data pada *baseline* karakteristik subjek riset.

Hasil penilaian kualitas artikel pada kajian ini (Tabel 3) diperoleh 1 artikel dengan rating yang bagus, 6 artikel rating cukup, dan 1 artikel rating kurang.

Tabel 1. Area Under Curve pada subyek sehat dan pasien

Subyek	Dosis Klopidoogrel	Genotipe	AUC dari klopidoogrel (ng/ml x jam)	AUC darimetabolit aktifklopidoogrel * (ng/ml x jam)
Subyek sehat ⁶	300 mg	TT	4.5 ± 1.7	236.6
		TC	11.7 ± 7.9	1641 ± 61.2
		CC	8.1 ± 6.9	195.7 ± 136.4
Pasien Coronary artery disease ⁹	300 mg	TT	11.35 ± 3.27	1.88 ± 1.03
		TC	33.38 ± 26.12	7.62 ± 5.82
		CC	38.08 ± 30.93	8.22 ± 6.07
	600 M	TT	25.09 ± 7.72	3.48 ± 1.65
		TC	120.58 ± 96.78	11.72 ± 9.20
		CC	109.43 ± 84.03	14.25 ± 9.53

AUC: Area Under Curve; Data AUC diberikan dalam nilai *mean* ± standar deviasi (SD);

(*): Metabolit aktif klopidoogrel yang dievaluasi adalah metabolit thiol

Tabel 2. Ringkasan riset artikel yang terseleksi

Subjek/(N)	Etnis / negara	Dosis klopidogrel	Profil farmakokinetik pada gen <i>MDR-1</i> varian 3435	Pustaka nomor
Subjek sehat/(22)	Korea	Klopidogrel 300 mg (hari pertama) dan 75 mg sehari sekali selama 6 hari berturut turut	AUC dari klopidogrel dan metabolit aktifnya adalah 3435 TT < 3435CC < 3435TC (tapi tidak berbeda bermakna)	6
Subjek sehat/(160)	USA	Klopidogrel 75 mg/hari selama 9 hari	AUC dan konsentrasi maksimum (C_{max}) klopidogrel metabolit aktif tidak berkorelasi dengan varian 3435	7
Pasien <i>Acute coronary syndrome</i> (ACS)/(401)	Cina	Klopidogrel 300 mg <i>loading dose</i>	AUC dan C_{max} klopidogrel dan metabolit (inaktif dan aktif) berkurang secara signifikan pada 3435TT dan 3435TC, dibandingkan 3435CC	8
Pasien <i>Coronary artery disease</i> (CAD)/(60)	Jerman	Klopidogrel 300 mg, 600 mg	AUC dan C_{max} klopidogrel dan metabolit aktifnya berkurang secara signifikan pada TT, dibandingkan dengan TC dan CC	9
Subjek yang akan menjalani <i>elective coronary angiography</i> dan <i>Percutaneous Coronary Intervention</i> (PCI)/(38)	Kaukasia (<i>central Poland</i>)	Klopidogrel 75 mg <i>maintenance dose</i> setidaknya 7 hari sebelum tindakan	AUC pada klopidogrel lebih rendah secara signifikan pada 3435TT dibandingkan pada 3435CC dan 3435TC	10
Pasien kandidat untuk <i>revascularization</i> dengan PCI/(10)	Italia	Klopidogrel (<i>single oral loading dose</i>) 600mg, diikuti 75 mg per hari	AUC dan C_{max} diukur. Hasilnya adalah 3435TT genotip menurunkan secara signifikan absorpsi klopidogrel	11
Pasien yang menjalani <i>coronarography</i> atau PCI/(22)	Kaukasia	Klopidogrel 75-mg setidaknya 7 hari Sebelum tindakan	3435TT genotip adalah kovariat dari <i>clearance</i> /bioavailabilitas (CL/F), dengan adanya 3435TT <i>apparent clearance</i> dari klopidogrel adalah lebih tinggi	12
Pasien dengan <i>coronary artery disease</i> /(73)	Kaukasia (mayoritas)	Klopidogrel (<i>single oral loading dose</i>) 600mg, diikuti 75 mg per hari	Tidak dapat mendeteksi efek dari ABCB1 genotip, karena 3435CC tidak ditemukan	13

Tabel 3. Hasil penilaian kualitas riset artikel yang terseleksi

Kriteria*	Kim <i>et al</i> ⁶	Frelinger <i>et al</i> ⁷	Wang <i>et al</i> ⁸	Taubert <i>et al</i> ⁹	Karazniewicz- lada <i>et al</i> ¹⁰	Danese <i>et al</i> ¹¹	Danielak <i>et al</i> ¹²	Braun <i>et al</i> ¹³
1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
3	N	NR	NR	NR	NR	Y	N	NR
4	Y	Y	NR	Y	Y	Y	Y	Y
5	N	N	N	Y	N	N	N	N
6	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
7	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
8	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
9	Y	Y	Y	Y	Y	Y	CD	Y
10	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
11	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	CD
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	N
13	Y	Y	NR	Y	Y	N	Y	Y
14	N	Y	N	N	N	N	N	N
Rating	Cukup	Bagus	Cukup	Cukup	Cukup	Kurang	Cukup	Cukup

Y= *Yes* (Ya), N= *No* (Tidak), NR = *Not Response* (tidak ada respon), NA = *Not Applicable* (tidak dapat diterapkan), CD = *Cannot be Determined* (Tidak dapat ditentukan)

(*)Kualitas metodologi berdasarkan 14 kriteria pada *Quality Assessment Tool for Observational Cohort and Cross-Sectional Studies*, dari *the National Institutes of Health, National Heart, Lung, and Blood Institute*, yaitu :

1. Apakah pertanyaan atau tujuan riset dinyatakan secara jelas?
2. Apakah populasi pada penelitian sudah dinyatakan secara spesifik dan jelas batasannya?
3. Apakah subjek yang dapat berpartisipasi dalam penelitian tersebut adalah setidaknya 50% dari populasi ?
4. Apakah keseluruhan subjek diseleksi atau direkrut dari populasi yang sama atau hampir sama (termasuk periode waktu yang sama)? Apakah kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian telah dinyatakan secara spesifik dan diterapkan pada keseluruhan partisipan?
5. Apakah ada justifikasi tentang besar sampel, *power description*, atau *variance and effect estimates*?
6. Untuk analisis pada artikel tersebut, apakah *exposure of interes* telah diukur atau ditentukan sebelum *outcome* diukur?
7. Apakah waktu pengamatan adalah cukup untuk dapat melihat hubungan *exposure* dan *outcome* jika ada?
8. Untuk *exposure* yang berbeda jumlah atau tingkatannya, apakah dilakukan pengukuran dengan berbagai *level* yang berbeda dari *exposure* yang berkaitan dengan *outcome* (seperti kategori *exposure* atau *exposure* diukur dengan variabel *continuous*)?
9. Apakah pengukuran *exposure* (sebagai variabel bebas) dinyatakan secara jelas, valid, reliabel, dan diimplementasikan secara konsisten di seluruh partisipan?
10. Apakah *exposure* dinilai lebih dari satu kali?
11. Apakah pengukuran *outcome* (sebagai variabel tergantung) dinyatakan secara jelas, valid, reliabel, dan diimplementasikan secara konsisten di seluruh partisipan?
12. Apakah *outcome assessors blinded* pada status *exposure* pada partisipan?
13. Apakah subjek yang tidak dapat mengikuti penelitian hingga akhir (*loss to follow-up*) adalah 20% atau kurang dari jumlah awal penelitian (*baseline*)?
14. Apakah potensial *confounding variables* diukur dan dilakukan *adjustment* secara statistik terkait *impact*-nya pada hubungan antara *exposure(s)* dan *outcome(s)*?

Outcome (efek gen MDR-1 varian 3435 pada parameter farmakokinetik)

Gen MDR-1 terdapat pada exon 26. Varian genotip yang terdapat pada gen MDR1 posisi 3435 adalah CC, TT, dan TC.^{1,2,3} Tabel 2 menunjukkan bahwa 535 subjek dengan *ischemia-related cardiovascular disease* (yaitu pasien dengan diagnosis *acute coronary syndrome/ACS*, *coronary artery disease/CAD*, dan pasien *percutaneous coronary intervention/PCI*) yang diperoleh dari 5 artikel riset^{8,9,10,11,12} menunjukkan varian 3435 dari gen *MDR-1* dapat mengubah farmakokinetik klopidogrel. Sejumlah 513 dari 535 pasien tersebut menunjukkan kadar puncak (C_{max}) dan total area dibawah kurva (AUC) klopidogrel dan/atau metabolit aktifnya, menurun secara signifikan pada 3435TT dibandingkan pada 3435CC.^{8,9,10,11} Dilaporkan pula pada 22 subjek menunjukkan bahwa 3435TT merupakan kovariat dari *clearance* (CL)/bioavailabilitas (F) klopidogrel; dan nilai *apparent clearance* klopidogrel lebih tinggi pada subjek dengan polimorfisme tersebut.¹²

Klopidogrel adalah substrat P-gp. Absorpsi, bioavailabilitas, dan eliminasi dari substrat P-gp dapat dipengaruhi dengan adanya induksi atau inhibisi pada ekspresi P-gp.^{1,14} Pada sel epitel intestinal, P-gp bertanggung jawab terhadap efluks obat sehingga membatasi *drug cellular uptake* dan absorpsinya sedangkan pada sel tubuli ginjal dan permukaan kanalikular hepatosit, ekspresi P-gp dapat meningkatkan eliminasi obat.¹³

Adanya varian 3435TT dapat menyebabkan tingginya ekspresi P-gp sehingga dapat mengakibatkan peningkatan intestinal efluks. Peningkatan efluks tersebut dapat menyebabkan nilai AUC klopidogrel dan metabolit aktifnya yang lebih rendah pada pasien *coronary artery disease* dengan genotip TT dibandingkan pada genotip CC maupun TC (Tabel 1 dan 2). Peningkatan intestinal efluks, dapat membatasi absorpsi klopidogrel, sehingga dapat berimplikasi pada keterbatasan fungsinya sebagai

antiplatelet.^{8,11}

Tabel 1 dan 2 memperlihatkan hasil riset pada subjek sehat, yaitu efek polimorfisme 3435 pada farmakokinetik klopidogrel yang berbeda dibandingkan hasil yang diperoleh pada pasien dengan *ischemia-related cardiovascular disease*. Pada 182 subjek sehat (dari 2 artikel riset), menunjukkan bahwa AUC klopidogrel dan/atau metabolit aktifnya adalah lebih rendah pada *mutant* 3435TT dibandingkan dengan *wild type* (3435CC), namun perbedaan hasil tersebut tidak bermakna secara signifikan. Nilai C_{max} dari metabolit klopidogrel juga tidak berkorelasi dengan polimorfisme tersebut pada subjek sehat.^{6,7}

Status penyakit (metastasis kanker, iskemia, infeksi) dapat mengubah fungsi P-gp.¹⁵ Kondisi iskemia dapat mempengaruhi ekspresi P-gp. Pada kondisi normal, ekspresi P-gp tidak ditemukan pada jantung atau hanya ditemukan pada *endothelial cells of arterioles* dan kapiler, tapi tidak pada kardiomyosit.¹⁶ Namun, terjadi overekspresi P-gp pada kardiomyosit yang mengalami hipoksia iskemik akut maupun kronik.^{15,16} Iskemia juga dapat mempengaruhi fungsi P-gp pada otak. Pada studi tentang *cilnidipine*, dilaporkan bahwa pada otak umumnya *cilnidipine* diblok oleh P-gp. Tapi pada otak yang iskemik, *cilnidipine* dapat terdistribusi masuk kedalam otak.¹⁵ Ekspresi P-gp dapat menurunkan absorpsi obat.^{14,17} Terdapat variasi ekspresi P-gp pada berbagai segmen intestinal manusia. Pada usus kecil, aktivitas P-gp paling tinggi dideteksi pada daerah ileum sentral.¹⁵ Variasi ekspresi P-gp juga telah ditemukan pada kolon dan lambung manusia.¹⁷ Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengidentifikasi efek iskemia dan polimorfisme gen dalam kaitannya dengan farmakokinetik klopidogrel.

KESIMPULAN

Pada pasien dengan dengan *ischemia-related cardiovascular disease*, AUC, dan C_{\max} klopidogrel dan/atau metabolit aktifnya lebih rendah secara signifikan pada 3435 TT dibandingkan dengan 3435 CC. Namun pada subjek sehat, adanya varian 3435 dari gen *MDR-1* tidak berkorelasi dengan AUC and C_{\max} klopidogrel dan/atau metabolit aktifnya. Profil farmakokinetik klopidogrel dapat bervariasi dengan adanya varian 3435 dari gen *MDR-1* dan pada status kesehatan yang berbeda.

DAFTAR RUJUKAN

1. Brambilia AJL, Tapia. *MDR1 (ABCB1) polymorphisms: functional effects and clinical implications*. Revista de Investigación Clínica. 2013 Sept-Oct;65(5):445-54
2. Su J, Xu J, Li X, Zhang H, Hu J, Fang R. et al. *ABCB1 C3435T polymorphism and response to clopidogrel treatment in coronary artery disease (CAD) patients: a meta-analysis*. Plos One. 2012 Oct;7(10):1-14
3. Calderón-Cruz B, Rodríguez-Galván K, Manzo-Francisco LA, Vargas-Alarcón G, Fragoso JM, Peña-Duque MA, et al. *C3435T polymorphism of the ABCB1 gene is associated with poor clopidogrel responsiveness in a Mexican population undergoing percutaneous coronary intervention*. Thrombosis Research. 2015 Nov;136(5):894-8
4. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Meneveau N. et al. *Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events*. New England Journal of Medicine. 2009 Jan;360(4):363-75
5. National Heart Lung and Blood Institute. *Quality assessment tool for observational cohort and cross-sectional studies*. USA: US Department of Health & Human Services; 2014.
6. Kim HS, Cho DY, Park BM, Bae SK, Yoon YJ, Minkyung O, et al. *The Effect of CYP2C19 genotype on the timecourse of platelet aggregation inhibition after clopidogrel administration*. The Journal of Clinical Pharmacology. 2013;54(8):850-7.
7. Frelinger AL 3rd, Bhatt D, Lee RD, Mulford DJ, Wu J, Nudurupati S, Nigam A, et al. *A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers*. Journal of the American College of Cardiology. 2012;59(14):1304-11
8. Wang XQ, Shen CL, Wang BN, Huang XH, Hu ZL, Li J. *Genetic polymorphisms of CYP2C19 and ABCB1 C3435T affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel in 401 patients with acute coronary syndrome*. Gene. 2012 Mar;558(2):200-7.
9. Taubert D, Von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goesser T, et al. *Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption*. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2006 Nov;80(5):486-501
10. Karazniewicz-Łada M, Danielak D, Rubis B, Burchardt P, Komosa A, Lesiak M, et al. *Impact of common ABCB1 polymorphism on pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel and its metabolites*. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2014 Nov;40(2):226-31
11. Danese E, Fava C, Beltrame F, Tavella D, Calabria S, Benati M, et al. *Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in patients undergoing percutaneous coronary intervention: comparison between vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay and multiple electrode aggregometry*. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2016 Feb; 14(2): 282-93.
12. Danielak D, Karazniewicz-Łada M, Komosa A, Burchardt P, Lesiak M, Kruszyna L. et al. *Influence of genetic co-factors on the population pharmacokinetic model for clopidogrel and its active thiol metabolite*. European Journal of Clinical Pharmacology. 2017;73(12):1623-32

13. Braun OÖ, Angiolillo DJ, Ferreiro JL, Jakubowski JA, Winters KJ, Effron M, et al. Enhanced active metabolite generation and platelet inhibition with prasugrel compared to clopidogrel regardless of genotype in thienopyridine metabolic pathways. *Thrombosis and Haemostasis*. 2013 Dec; 110(6): 1223–31
14. Wessler JD, Grip LT, Mendell J, Giugliano RP. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013 Jun;61(25):2495–502
15. Yano K, Tomono T, Ogihara T. Advances in studies of P-glycoprotein and Its expression regulators. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 2018;41(1): 11–9.
16. Auzmendi J, Merelli A, Girardi E, Orozco-Suarez S, Rocha L, Lazarowski A. Progressive heart P-glycoprotein (P-gp) overexpression after experimental repetitive seizures (ERS) associated with fatal status epilepticus (FSE) Is it related with SUDEP?. *Molecular & Cellular Epilepsy*. 2014 Feb;3:1-9
17. Ho GT, Moodie FM, Satsangi J. Multidrug resistance 1 gene (P-glycoprotein 170): an important determinant in gastro intestinal disease?. *Gut*. 2003 May;52(5):759–66.



FORMULIR PERNYATAAN KLIRENS ETIK PUBLIKASI ILMIAH

Sehubungan dengan pengajuan naskah untuk dinilai, dengan ini saya:

Nama :

Unit//Instansi :

Menyatakan bahwa setiap naskah dalam daftar terlampir adalah hasil karya sendiri atau bersama tim, yang:

- Isinya **asli** atau bebas dari a) fabrikasi; b) falsifikasi; c) plagiasi; d) duplikasi; e) fragmentasi/salami; dan f) pelanggaran hak cipta data/isi.
- Penerbitnya **sah** atau bebas dari a) pelanggaran hak cipta lembaga/penerbit; b) penerbit pemangsa (jurnal/buku), dan c) penerbit rekayasa.
- Perolehannya bila melalui pertemuan ilmiah **benar** atau bebas dari: a) rekayasa pertemuan ilmiah; dan b) pertemuan ilmiah yang tidak dihadiri.
- Perolehannya bila menggunakan data sekunder harus melalui persetujuan instansi terkait
- Pengajuannya **pertama kali** atau belum pernah diajukan untuk dinilai bagi keperluan yang sama pada pengajuan sebelumnya.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan jujur dan bertanggung jawab sesuai dengan Peraturan kepala LIPI No.06/E/2013 tentang Kode Etika Peneliti.

....., 20.....

Penulis

Materai

Rp. 6000,-

(.....)

Catatan : Surat pernyataan beserta daftar lampirannya dibuat rangkap empat: asli (bermaterai) untuk redaksi, fotokopi pertama untuk TP2I, TP2U, dan penulis.

Catatan:

Silakan kirim formulir persetujuan yang bertanda tangan asli via pos ke Redaksi Pelaksana Jurnal Kefarmasian Indonesia dengan alamat. Jl. Percetakan Negara No.23, Jakarta, 10560 atau *E-mail*: jurnalkefarmasian@gmail.com



FORMULIR PERNYATAAN HAK CIPTA (*COPYRIGHT STATEMENT*)

Naskah yang berjudul :

.....
.....
.....

Nama penulis :

Naskah akan diterbitkan dalam Jurnal Kefarmasian Indonesia Vol No.-20...

Penulis menyatakan bahwa:

Silakan beri tanda (√) :

Ada kutipan utuh

Kutipan utuh data sekunder (bentuk kata, angka, gambar, tabel) yang merupakan barang hak cipta (*copyright*), disalin (*reproduced*), digambar (*redrawn*), ditabelkan (*reused*) dalam versi sendiri, sudah seizin pemegang hak cipta (penulis, penerbit, organisasi).

Sebutkan data.....

Tidak ada kutipan utuh

Kutipan sebagian data sekunder (bentuk kata dan angka) yang disalin (*reproduced*), digambar (*redrawn*), ditabelkan (*reused*) sebagai pembanding untuk data primer Anda atau pelengkap tabel/gambar Anda sendiri sudah menyebutkan referensi sesuai dengan format pengutipan data.

Naskah ini asli dan penulis mengalih hak cipta (*transfer of copyright*) naskah ini kepada Jurnal Kefarmasian Indonesia. Penulis akan menerima 1 eksemplar naskah dalam bentuk cetak lepas (*off-print*) dan 2 eksemplar jurnal cetak (*print journal*).

....., 20.....

Disetujui oleh Penulis utama

(.....)

Catatan:

Silakan kirim formulir persetujuan yang bertanda tangan asli via pos ke Redaksi Pelaksana Jurnal Kefarmasian Indonesia dengan alamat. Jl. Percetakan Negara No.23, Jakarta, 10560 atau *E-mail*: jurnalkefarmasian@gmail.com



PETUNJUK PENULISAN

Tipe naskah

Jurnal Kefarmasian Indonesia (JKI) menerima naskah hasil penelitian dan *review* hasil-hasil penelitian yang berkaitan dengan upaya kesehatan di bidang farmasi.

Persyaratan umum untuk naskah yang hendak diajukan adalah 1) naskah asli hasil karya penulis, 2) belum pernah diterbitkan sebelumnya, 3) naskah tidak sedang dalam proses publikasi di jurnal lain, 4) dituliskan menggunakan format yang telah ditentukan.

Naskah akan di-*review* oleh mitra bestari dan dewan redaksi.

Dewan redaksi akan memutuskan apakah naskah yang diajukan dapat diterbitkan atau tidak dalam JKI.

Dewan redaksi berhak mengedit tulisan dalam hal gaya penulisan, format, dan kejelasan kalimat.

Penulis akan diminta untuk memperbaiki naskah dalam hal substansi, format, dan penulisan berdasarkan masukan dari mitra bestari dan dewan redaksi.

Naskah yang tidak dapat diterbitkan dalam JKI tidak dapat dikembalikan dan penulis dipersilakan untuk mengajukan naskah tersebut ke jurnal lain.

Pengajuan naskah

Penulis harus mengirimkan naskah melalui e-journal dengan terlebih dahulu login melalui website <http://ejournal.litbang.kemkes.go.id/index.php/jki>

Penulisan naskah

Naskah harus diketik menggunakan *software* pengolah kata (Microsoft Word atau Open Office). *Font* yang digunakan di seluruh naskah adalah Times New Roman spasi tunggal, dengan jumlah halaman antara 7 dan 12 halaman (termasuk gambar dan tabel). Ukuran kertas yang digunakan adalah A4, format satu kolom, dengan margin normal, dan pengaturannya *justified*.

Sistematika penulisan

- Petunjuk penulisan naskah secara lengkap dapat dilihat pada website <http://ejournal.litbang.kemkes.go.id/index.php/jki/authorguideline>
- Naskah ditulis secara sistematis dengan **urutan**: Judul; Nama Penulis; Afiliasi Penulis; Abstrak; Kata Kunci; Pendahuluan; Metode; Hasil dan Pembahasan; Kesimpulan; Ucapan Terima Kasih; dan Daftar Rujukan.
- **Judul** harus akurat, jelas, spesifik, dan lengkap, maksimal 15 kata. Tidak diperkenankan mengandung singkatan yang jarang digunakan. Judul dituliskan dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris.
- **Nama penulis** ditulis tanpa gelar dan jabatan profesional seperti Prof, Dr, Manajer Produksi, dll. Selalu tuliskan nama Anda dengan lengkap tanpa disingkat.
- **Afiliasi** semua penulis dituliskan dengan lengkap. Afiliasi meliputi: nama departemen/unit, nama universitas/nama instansi, alamat, kota, kode pos, negara. Penulis korespondensi (termasuk alamat *e-mail*) ditulis dengan menambahkan tanda bintang(*) pada *superscript* setelah nama. Bila penulis memiliki afiliasi yang berbeda, diberikan kode nomor berbeda di akhir nama penulis dengan format *superscript*. Bila semua penulis memiliki afiliasi/instansi yang sama, kode nomor tidak perlu dituliskan.
- **Abstrak** ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris dengan jenis huruf Times New Roman, spasi tunggal. Abstrak harus jelas, singkat, dan deskriptif. Abstrak ditulis dalam bentuk narasi dalam satu paragraf, harus memberikan pengantar singkat disertai dengan masalah, tujuan, metode, ringkasan hasil serta kesimpulan. Abstrak ditulis dengan jumlah kata antara 150-250 kata.
- **Kata kunci** maksimal 5 kata, dipilih yang paling mewakili dan paling spesifik menggambarkan isi naskah. Setiap kata kunci ditulis dengan format *sentence case*, dipisahkan dengan titik koma (;).
- Dalam **Pendahuluan, Metode, Hasil dan Pembahasan, Kesimpulan, dan Saran**:
 - Jika ingin menuliskan singkatan, tulis terlebih dahulu dengan lengkap diikuti dengan singkatannya. Contoh: Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas).
 - Referensi diurutkan berdasarkan kemunculannya dalam naskah dan nomor urutnya dituliskan secara *superscript* setelah kalimat, gambar, atau tabel yang disitasi/dikutip/ditampilkan.
 - Untuk penelitian laboratorium, sebutkan merek dan jenis alat dan bahan yang digunakan
 - Judul tabel dituliskan sebelum tabel, *center, bold* ukuran huruf 12. Isi dan keterangan tabel menggunakan ukuran huruf 10. Jangan menampilkan garis vertikal pada tabel. Pastikan menulis kalimat pengantar sebelum menampilkan tabel.
 - Judul gambar dituliskan setelah gambar, *center, bold* ukuran huruf 12. Pastikan gambar yang ditampilkan jelas dan dapat terbaca. Selalu tuliskan pengantar sebelum menampilkan gambar.
 - Kesimpulan harus menjawab tujuan penelitian.
 - Bila tidak hendak mengemukakan saran, bab ini tidak perlu ditulis.
- **Ucapan terima kasih** harus dituliskan. Terima kasih dapat ditujukan kepada penyandang dana dan pihak-pihak yang membantu selama penelitian dan penulisan naskah.
- **Daftar rujukan** ditulis dalam format Vancouver.



CONTOH PENULISAN DAFTAR RUJUKAN

Daftar rujukan untuk naskah dalam JKI ditulis menggunakan format Vancouver.

Artikel/jurnal ilmiah

Format umum untuk sitasi artikel/jurnal ilmiah adalah:

Penulis. Judul publikasi. Nama jurnal/majalah ilmiah. Tahun publikasi;volume(nomor):halaman.

Artikel dengan 1 orang penulis

1. Suhardi. Preferensi peminum alkohol di Indonesia menurut Riskesdas 2007. Buletin Penelitian Kesehatan. 2011;39(4):154-64.

Artikel dengan 2 sampai 6 penulis

2. Siswantoro H, Hasugian AR, Avrina R, Risniati Y, Tjitra E. Efikasi dan keamanan dihidroartemisinin-piperakuin (DHP) pada penderita malaria falsiparum tanpa komplikasi di Kalimantan dan Sulawesi. Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2011;21(3):135-44.

Artikel dengan penulis lebih dari 6 orang

3. Prasaja B, Harahap Y, Lusthom W, Setiawan EC, Ginting MB, Hardiyanti, et al. A bioequivalence study of two tamsulosin sustained-release tablets in Indonesian healthy volunteers. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2011;36(2):109-13.

Artikel elektronik dengan nomor DOI

4. Nakanishi S, Abe M, Yamamoto S, Murai M, Miyoshi H. Bis-THF motif of acetogenin binds to the third matrix-side loop of ND1 subunit in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011 Sep;1807(9):1170-6. doi: 10.1016/j.bbabo.2011.05.012.

Artikel elektronik tanpa nomor DOI

5. de Oliveira MA, Lacerda CD, Bonella AF. Developing methods to compare tablet formulation of atorvastatin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2012 [cited 2013 Nov 21];48(4):801-10.
Available from: <http://www.scielo.br/pdf/bjps/v48n4/v48n4a24.pdf>
6. Widodo Y, Harahap H, Triwinarto A. Strategi peningkatan praktik pemberian ASI eksklusif. *Jurnal Penelitian Gizi dan Makanan* [Internet]. 2003 [disitasi 2005 Apr 14];26(1):31-8. Diunduh dari: <http://ejournal.litbang.depkes.go.id/index.php/pgm/article/view/1428>

Buku

Format umum untuk sitasi buku adalah:

Penulis. Judul: subjudul. Edisi. Lokasi/kota: Penerbit; tahun terbit.

Buku dengan 1 orang penulis

7. Rodriguez-Amaya DB. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington: OMNI Research; 2001.

Buku dengan 2 sampai 6 penulis

8. Siregar CJP, Wikarsa S. Teknologi farmasi sediaan tablet: dasar-dasar praktis. Jakarta: EGC; 2010.

Buku dengan nama editor

9. Soepardi EA, Iskandar N, Bashiruddin J, Restuti RD, editor. Buku ajar ilmu kesehatan: telinga, hidung, tenggorok, kepala dan leher. Edisi 6. Jakarta: FKUI; 2007.
10. Beale JM, Block JH, editors. Wilson & Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry. 12th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

Organisasi sebagai penulis

11. Satgas Imunisasi PP IDAI. Panduan imunisasi anak: mencegah lebih baik daripada mengobati. Jakarta: Ikatan Dokter Anak Indonesia; 2011.

Tanpa nama penulis

12. Farmakope Indonesia. Edisi 5. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2014.

Bab dalam buku/Bagian buku

13. Sukarban S, Santoso SO. Antelmintik. Dalam: Ganiswara SG, Setiabudy R, Suyatna FD, Purwastyastuti, editor. Farmakologi dan terapi. Edisi 4. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI; 1995. Hal. 523-536.
14. Carlin BAC. Direct compression and the role of filler-binder. In: Ausburger LL, Hoag SW, editors. Pharmaceutical dosage forms: tablets. 3rd ed. Volume 2, Rational design and formulation. New York: Informa Healthcare; 2008. p. 173-216.

Buku terjemahan

15. Brunton LL, Parker KL, Blumenthal DK, Buxton ILO, editor. Goodman & Gilman manual farmakologi dan terapi [diterjemahkan oleh Sukandar EY, Adnyana IK, Sigit JI, Sasongko LDN, Anggadiredja K]. Jakarta: EGC; 2010.

Buku dengan lebih dari satu penerbit

16. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. Grayslake: Pharmaceutical Press; 2009. Jointly published with the American Pharmacist Association.

Webpage

Format umum untuk sitasi dari internet adalah:

Penulis. Judul publikasi [Internet]. Lokasi/kota (jika ada): Penerbit; tanggal publikasi dengan format tahun bulan tanggal [tanggal *update* terakhir (jika ada); tanggal disitasi]. Diunduh dari: alamat *web*.

Berikut adalah contoh-contoh sitasi dari *webpage* dengan berbagai kelengkapan elemen sitasi.

17. Philippidis A. The top 25 best-selling drugs of 2014 [Internet]. New Rochelle: Genetic Engineering & Biotechnology News; 2015 Feb 23 [cited 2015 Mar 16]. Available from: <http://www.genengnews.com/insight-and-intelligenceand153/the-top-25-best-selling-drugs-of-2014/77900383/>
18. Experimental drug shows promise in lowering cholesterol, heart attack risk [Internet]. 2015 Mar 15 [cited 2015 Mar 16]. Available from: <http://www.drugs.com/news/experimental-shows-promise-lowering-cholesterol-heart-attack-risk-56027.html>
19. US Food and Drug Administration. Atorvastatin calcium dissolution method [Internet]. Silver Spring: US Food and Drug Administration; [date unknown] [updated 2004 Jan 15; cited 2013

- Jun 1]. Available from:
http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults_Dissolutions.cfm
20. Badan Litbang Pertanian. Bebaskan residu pestisida sayuran dan buah dengan ozonisasi [Internet]. Jakarta: Badan Litbang Pertanian; 2015 Mar 11 [disitasi 2015 Mar 13]. Diperoleh dari: <http://www.litbang.pertanian.go.id/berita/one/2106/>

Prosiding

Format umum untuk sitasi prosiding adalah:

Editor. Judul prosiding. Judul seminar/konfransi; tanggal pelaksanaan; lokasi/kota tempat seminar/konfransi dilaksanakan, negara. Lokasi/kota penerbit: nama penerbit; tahun terbit.

Buku prosiding utuh

21. Budiyono, Ginandjar P, Saraswati LD, Wuryanto MA, Widajanti L, editor. World fit for children. Prosiding Seminar Nasional dalam rangka Dies Natalis Undip ke-55; 2012 Okt 6; Semarang, Indonesia. Semarang: Badan Penerbit Universitas Diponegoro; 2012.

Makalah bagian dari prosiding

22. Kunz U, Kirschning A. A new microreactor for the solution-phase synthesis of potential drugs. In: Matlosz M, Ehrfeld W, Baselt JP, editors. Microreaction technology. IMRET 5: Proceedings of the Fifth International Conference on Microreaction Technology; 2001 May 27-30; Strasbourg, France. Berlin: Springer; 2002. p. 424-45.

Thesis/Disertasi

23. Dharmayanti NLPI. Perubahan genom dan karakter virus avian influenza sub tipe H5N1 pada unggas di Indonesia [disertasi]. Jakarta: Universitas Indonesia; 2009.
24. Basto PA. Development of polymeric nanoparticle vaccines for immunostimulation [PhD thesis]. Cambridge, MA: Massachusetts Institute of Technology; 2013.

Paten

25. Nerurkar M, Naringrekar V, inventors; Bristol-Myers Squibb Company, assignee. Aripiprazole complex formulation and method. United States patent US 7115587 B2. 2006 Oct 3.

Dokumen Pemerintah

Undang-undang

26. Republik Indonesia. Undang-undang Republik Indonesia Nomor 18 Tahun 2014 tentang Kesehatan Jiwa.

Peraturan Pemerintah

27. Republik Indonesia. Peraturan Pemerintah Nomor 33 Tahun 2012 tentang Pemberian Air Susu Ibu Eksklusif. Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 58. Jakarta: Sekretariat Negara; 2012.

Peraturan Menteri

28. Republik Indonesia. Peraturan Menteri Kesehatan Nomor 59 Tahun 2014 tentang Standar Tarif Pelayanan Kesehatan dalam Penyelenggaraan Program Jaminan Kesehatan. Jakarta: Kementerian Kesehatan; 2014.



PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
Jl. Percetakan Negara No. 23 Jakarta 10560
Telp. (021) 42881758, 42881762, 42881754, Fax. (021) 42881754
www.pusat1.litbang.depkes.go.id

ISSN 2085-675X



9 772085 675008