

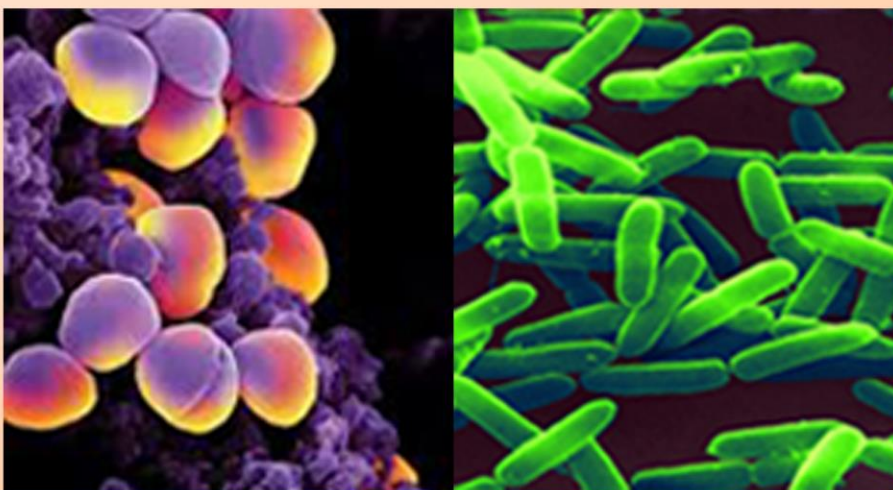
Vol. 6 No. 1 Juli 2019



Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia

E-ISSN: 2580-8303

P-ISSN: 2406-9388



**DITERBITKAN OLEH:
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

In memoriam



A Tribute to Drs. Mochamad Djunaedi, M.Pharm., Ph.D., Apt.

Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia is pleased to publish volume 6 issue 1 July 2019 dedicated to Dr. Mochamad Djunaedi. Dr. Djunaedi was a lecturer on Faculty of Pharmacy Universitas Airlangga. He graduated from Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga as a bachelor of pharmacy in 1988 and got his apothecary degree in 1989. He completed his master degree at Universitas Gadjah Mada in 2006 and obtained his doctoral degree from Universiti Sains Malaysia in 2016.

Dr. Djunaedi was the chief of the operational board of the Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia (JFIKI) since 2016. He was an energetic person and had a big contribution in the development of JFIKI. He worked very hard and gave plenty of ideas to the improvement of JFIKI. Dr. Djunaedi was known as a pleasant and a talented person. Apart of his busy schedules as a lecturer, he sometimes performed a traditional dancing and played traditional musical instruments in some festivals in the faculty. The entire editorial board of JFIKI were very grateful for his outstanding contribution and we are very sad for losing him.

Susunan Dewan Redaksi Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia (JFIKI)

Penanggung Jawab:

Prof. Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt

Dewan Redaksi

Ketua:

Elida Zairina, S.Si, MPH., Ph.D., Apt.

Wakil Ketua:

Suciati, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt.

Redaksi Pelaksana

Ketua:

Drs. Mochamad Djunaedi, M.Pharm., Ph.D., Apt.

Sekretaris:

Neny Purwitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

Anggota:

Gesnita Nugraheni, S.Farm., M.Sc., Apt.

Dr.rer.nat Maria Lucia Ardhani D. L., M.Pharm, Apt.

Tutik Sri Wahyuni, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt.

Bambang Subakti Zulkarnain, M.Clin.Pharm., Apt.

Kholis Amalia Nofianti, S.Farm, M.Sc., Apt.

Abhimata Paramanandana, S.Farm., M.Sc., Apt.

Susmiandri, S.Kom.

Mitra Bestari

Dr. Tristiana Erawati M., M.Si., Apt.

Dr. Muh. Agus Syamsur Rijal S.Si., M.Si., Apt.

Dra. Esti Hendradi, M.Si., Ph.D., Apt.

Dr. Diky Mudhakhir, S.Si., M.Si., Apt.

Andang Miatmoko, M.Pharm.Sci., Ph.D., Apt.

Dr. Ahmad Ainurofiq, S.Si., M.Si., Apt.

Nani Wijayanti Dyah N., S.Farm, M.Farm.Klin, Apt.

Dr. Nuzul Wahyuning Diyah, M.Si., Apt.

Chrismawan Ardianto, S.Farm., M.Sc., Ph.D., Apt.

Dr. Tri Murti Andayani, Sp.FRS., Apt.

Drs. Marcellino Rudyanto, M.Si., Ph.D., Apt.

Dr. Farida Suhud, M.Si., Apt.

Dewi Melani Hariyadi, S.Si., M.Phil., Ph.D., Apt.

Dr. Yudi Wicaksono, S.Si., M.Si., Apt.

**Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Gedung Nanizar Zaman Joenoes**

Jl. Dr. Ir. H. Soekarno Surabaya 60115

Tlp. (031) 5933150, Fax. (031) 5932594

Website:

<http://e-journal.unair.ac.id/index.php/JFIKI>

Email : jfiki@ff.unair.ac.id

Informasi Bagi Penulis

Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia (JFIKI) P-ISSN:2406-9388; E-ISSN:2580-8303 adalah jurnal resmi yang diterbitkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang artikelnya dapat diakses dan unduh secara online oleh publik.

Jurnal ini adalah jurnal *peer-review* nasional yang terbit dua kali dalam setahun tentang topik-topik keunggulan hasil penelitian di bidang pelayanan dan praktek kefarmasian, pengobatan masyarakat, teknologi kefarmasian serta disiplin ilmu kesehatan yang terkait erat. Jurnal ini memfokuskan pada area-area berikut:

1. Farmasi Klinis
2. Farmasi Komunitas
3. Farmasetika
4. Kimia Farmasi
5. Farmakognosi
6. Fitokimia

Naskah yang terpilih untuk dipublikasikan di JFIKI akan dikirim ke dua *reviewer* yang pakar dibidangnya, yang tidak berafiliasi dengan lembaga yang sama dengan penulis dan dipilih berdasarkan pertimbangan tim editor. Proses *review* dilakukan secara tertutup dimana penulis dan *reviewer* tidak mengetahui identitas dan afiliasi masing-masing. Setiap naskah yang didelegasikan ke anggota redaksi diperiksa untuk keputusan akhir proses *review*, komentar dan saran akan dikirim ke penulis untuk menanggapi ulasan *reviewer* dan mengirim kembali naskah revisi dalam waktu yang telah ditentukan. Naskah yang diterima untuk publikasi adalah salinan yang diedit untuk tata bahasa, tanda baca, gaya cetak, dan format. Seluruh proses pengajuan naskah hingga keputusan akhir untuk penerbitan dilakukan secara *online*.

Daftar Isi

No	Artikel	Hal
1.	Formulasi dan Evaluasi Sediaan <i>Lotion</i> dari Ekstrak Daun Lengkek (<i>Dimocarpus Longan</i>) sebagai Antioksidan Dwi Dominica, Dian Handayani	1-7
2.	Formulasi dan Evaluasi Hidrogel Mukoadhesif Metronidazol Menggunakan Kombinasi Kitosan dan Natrium Karboksimetilselulosa Menggunakan Desain Faktorial Andhi Fahrurroji, Agus Setyawan, Bambang Wijianto	8-16
3.	Karakter <i>Solid Lipid Nano Particle</i> (SLN) – Ubiquinon (Q10) dengan Beda Jenis Kosurfaktan: Poloxamer 188, Lesitin, Propilen Glikol Noorma Rosita, Qurrotu A'yunin, Esti Hendradi	17-24
4.	Inhibitory Activity of Levofloxacin against MDR <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Clinical Isolates Lisa Nathalie, Lindawati Alimsardjono, Isnaeni	25-31
5.	Pola Terapi pada Faktor Risiko Kardioserebrovaskuler Pasien Penyakit Ginjal Kronis yang Menjalani Hemodialisis Rizaldy Taslim Pinzon, Martinus Bagas Hogantara Padmanaba, Esdras Ardi Pramudita, Sugianto	32-36
6.	Optimasi Kondisi Sintesis Asam 4-Benzoiloksisinamat Menggunakan Iradiasi Gelombang Mikro Ilham Bagus Sagitaras, Achmad Syahrani, Juni Ekowati	37-43
7.	Pengaruh Matriks Kombinasi Alginat:Gelatin (2%:1%) terhadap Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Mikrosfer Probiotik <i>Lactobacillus acidophilus</i> Tutie Purwanti, Ria Puspita, Tristiana Erawati	44-50

Formulasi dan Evaluasi Sediaan *Lotion* dari Ekstrak Daun Lengkek (*Dimocarpus Longan*) sebagai Antioksidan

Dwi Dominica*, Dian Handayani

Prodi S1-Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Bengkulu

*Corresponding author: dwi_dominica@yahoo.co.id

Submitted: 14 November 2018

Accepted: 25 Juni 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Introduction: Leaves of *Dimocarpus longan*, which are efficacious as an antioxidant, is one of the plants originating from the subtropical region, and able to grow and produce well in tropical regions of Indonesia including Bengkulu Province. **Objective:** To make lotion preparations from Longan leaf extract with concentrations of 0.5%, 1.5% and 2.5%. **Methods:** This study was an experimental study, aimed at making a formula of longan leaf extract. Longan leaf extract was prepared using maceration method. Lotion was made in 3 formulas with a base concentration of stearic acid namely F1 with extract concentration of 0.5%, F2 with a concentration of 1.5%, and F3 concentration of 2.5%. **Results:** Lotion from longan leaf extract was evaluated for 4 weeks including organoleptic, homogeneity test, pH test, dispersion test, emulsion type test, irritation test, and acceptability test. From the research results, Longan leaf extract can be formulated into lotion preparations. Lotion with 0.5% extract concentration in F1 was the best formula. The shape was rather thick, light green, fragrant lemon, homogeneous with pH 6 and spreads 5 - 7 cm, did not irritate the skin and was preferred by the panelists. **Conclusion:** Lotion form longan leaf extract can be made in with various concentrations. The physical properties of lotion preparations with variations in the levels of longan leaf extract did not affect the physical stability of the lotion and did not change during testing.

Keywords: antioxidants, *Dimocarpus longan*, lotion, longan leaves

Abstrak

Pendahuluan: Daun lengkek (*Dimocarpus longan*) adalah salah satu tanaman berasal dari daerah subtropis, dan mampu tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah tropis Indonesia termasuk Provinsi Bengkulu dan berkhasiat sebagai antioksidan. **Tujuan:** untuk membuat sediaan *lotion* dari ekstrak daun lengkek dengan konsentrasi 0,5%, 1,5% dan 2,5%. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang bertujuan untuk membuat formulasi ekstrak daun lengkek. Pembuatan ekstrak daun lengkek digunakan dengan metode maserasi. *Lotion* dibuat dalam 3 formula dengan konsentrasi basis asam stearat yakni F1 dengan konsentrasi ekstrak 0,5%, F2 dengan konsentrasi 1,5%, F3 konsentrasi 2,5%. **Hasil:** *Lotion* dari ekstrak daun lengkek dievaluasi selama 4 minggu meliputi organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya sebar, uji tipe emulsi, uji iritasi, uji kesukaan. Dari hasil penelitian ekstrak daun lengkek dapat diformulasikan menjadi sediaan *lotion*. *Lotion* dengan konsentrasi ekstrak 0,5% pada F1 merupakan sediaan yang paling baik. Bentuk agak kental, warna hijau muda, wangi lemon, homogen dengan pH 6 dan daya sebar 5 - 7 cm, tidak mengiritasi kulit dan lebih disukai panelis. **Kesimpulan:** Ekstrak daun lengkek dapat dibuat sediaan *lotion* dengan berbagai macam konsentrasi. Sifat fisik sediaan *lotion* dengan variasi kadar ekstrak daun lengkek tidak mempengaruhi kestabilan fisik *lotion* dan tidak mengalami perubahan selama dilakukan pengujian.

Kata kunci: antioksidan, daun lengkek, *Dimocarpus longan*, *lotion*

PENDAHULUAN

Pola hidup yang tidak sehat dan polusi udara dapat menyebabkan jumlah radikal bebas dalam tubuh meningkat. Radikal bebas ini sangat berbahaya terhadap tubuh terutama efeknya yaitu pada kulit. Untuk itu tubuh memerlukan antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas yang sangat berbahaya (Katja dkk., 2009).

Senyawa radikal tersebut dapat merusak serabut kolagen kulit dan matriks dermis sehingga kulit menjadi kering, keriput, bersisik bahkan dapat menjadi penuaan dini. Seiring dengan meningkatnya kesadaran masyarakat akan kesehatan kulit maka usaha pencegahan terhadap kerusakan dan penyakit kulit semakin digalakkan (Purwaningsih dkk., 2014). Untuk mencegah efek buruk radikal bebas yang dapat merusak sel-sel kulit tangan dan badan dan bahkan bila dibiarkan dalam waktu yang lama akan menimbulkan kanker kulit, maka perlu dirancang formulasi suatu sediaan kosmetik yang mengandung senyawa antioksidan.

Salah satu bahan alam yang sudah dikenal terbukti khasiatnya sebagai antioksidan adalah tanaman lengkung. Lengkeng (*Dimocarpus longan* Lour.) merupakan famili *Sapindaceae* dengan genus *Dimocarpus* dan termasuk dalam kelas *Magnoliopsida*. Kemanfaatannya lebih kepada khasiatnya sebagai obat baik kandungan dalam buah maupun dari biji yang sudah dilakukan ekstraksi, bukan sebagai buah untuk dikonsumsi saja (Triwinata, 2006). Beberapa hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanaman lengkung mempunyai aktivitas antioksidan (Kurnia, 2015). Aktivitas antioksidan lengkung terutama akibat adanya kandungan *quercetin* (Kurnia, 2015).

Untuk mempermudah penggunaan *quercetin* dalam penelitian ini dibuat dalam bentuk sediaan *handbody lotion*. *Handbody lotion* adalah sediaan kosmetik yang diaplikasikan pada kulit terutama pada bagian tangan dan tubuh. *Lotion* digunakan untuk pemakaian topikal sebagai pelindung kulit (Lachman, 1994).

Penelitian mengenai efek antioksidan tanaman lengkung sudah pernah dilakukan oleh beberapa penelitian sebelumnya dengan memformulasi sediaan krim dari ekstrak metanol kulit buah lengkung dan menunjukkan adanya aktivitas antioksidan (Muthukumarasamy dkk., 2016). Penelitian lain juga mengatakan bahwa kandungan senyawa *quercetin* yang terdapat pada daun lengkung juga berkhasiat sebagai antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian terdahulu, maka pada penelitian ini di buat formulasi sediaan

dalam bentuk *lotion* dari ekstrak metanol daun lengkung sebagai antioksidan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun lengkung, etanol 96%, air suling, karbomer, NaOH, Butylated Hydroxytoluene (BHT), asetil alkohol, oleum rosae, asam stearat, propil paraben, metil paraben, pewangi/oleum citri.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah sebagai berikut: seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator* (Ika@ werke HB4 basic, China), neraca analitik (Shimadzu AU2200, Japan), pH meter digital (744 pH meter Metrohm, Swiss).

Metode

Penelitian ini menggunakan metode penelitian yang bersifat eksperimental dengan rancangan *post design experimental*. *Experimental Research* merupakan penelitian yang bertujuan untuk mempelajari kejadian dalam kerangka korelasi sebab akibat dengan memberikan perlakuan pada subjek penelitian yang kemudian dilakukan uji secara empirik (Yanwirasti, 2008).

Pengujian daya sebar pada sediaan di lakukan menggunakan cawan petri dan anak timbangan 50 g, 100 g, 150 g, 200 g sebagai beban. Uji dilakukan selama 4 minggu berturut-turut. Menurut Garg dkk. (2002) pengujian daya sebar menunjukkan daya sebar yang baik bila daya sebar sebesar 5 - 7 cm.

Prosedur kerja

Pembuatan simplisia daun lengkung

Daun lengkung (*Dimocarpus longan*) ditimbang sebanyak 2 Kg, dicuci bersih dengan air mengalir, lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang dan terhindar dari sinar matahari langsung. Simplisia kering yang diperoleh digiling dengan blender sehingga menjadi serbuk sebanyak 200 g.

Pembuatan ekstrak daun lengkung

Daun lengkung ditimbang sebanyak 200 g dimasukkan kedalam botol, kemudian ditambahkan etanol 96%, lalu dimaserasi selama 5 hari sambil sekali-kali dilakukan pengadukan/pengocokan. Kemudian filtrat yang dihasilkan diendapkan selama satu hari, kemudian disaring dengan menggunakan kapas dan kertas saring, filtrat dipisahkan dari pelarutnya pada suhu 70°C dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*, sehingga diperoleh ekstrak kental daun lengkung.

Pembuatan lotion

Lotion dibuat dengan formulasi sesuai dengan yang ditampilkan pada Tabel 1 Bahan-bahan fase minyak (Cera alba, asam stearat, Span 80, propil paraben) dimasukkan dalam gelas piala, dilebur kemudian dipanaskan pada suhu 75°C di atas hot plate dan fase air (Tween 80 dan metil paraben) dimasukkan dalam gelas piala lalu dipanaskan pada suhu yang sama. Setelah itu perlahan-lahan fase minyak dimasukkan ke dalam fase air sambil terus diaduk dengan pengaduk elektrik secara berselang (*intermitten shaking*: 2 menit pengadukan dengan selang waktu istirahatnya 20 detik).

Selanjutnya, ditambahkan ekstrak daun lengkung dan karbomer yang telah ditambahkan dengan NaOH kemudian diaduk hingga homogen. Terakhir dimasukkan pengaroma dan diaduk hingga berbentuk lotion yang homogen.

Tabel 1. Formula lotion dari ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*)

Bahan	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	Kegunaan
Ekstrak	2,5	5	7,5	Zat aktif
Cera alba	2	2	2	Stabilitas Emulsi
Asam Stearat	5	5	5	Peningkat viskositas
NaOH	0,2	0,2	0,2	Penetrant
Karbomer	0,5	0,2	0,5	Peningkat Viskositas
BHT	0,01	0,01	0,01	Antioksidan
Tween 80	8,9	8,9	8,9	Emulgator
Span 80	1,1	1,1	1,1	Emulgator
Oleum citri	0,5	0,5	0,5	Pengaroma
Nipagin	0,18	0,18	0,18	Pengawet
Nipasol	0,02	0,02	0,02	Pengawet
Aquadest	100	100	100	Pembawa
Ad				

Analisis data

Hasil dari optimasi formula dapat dilakukan dengan pengujian kualitas fisik sediaan lotion selama 4 minggu terhadap data yang diperoleh pada pengamatan organoleptis, nilai pH, homogenitas, uji kestabilan lotion, daya sebar, serta uji iritasi kulit, dan terakhir uji panelis dianalisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk tabel dan bentuk grafik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan pengumpulan sampel yaitu daun lengkung. Peneliti melakukan verifikasi taksonomi

tumbuhan untuk menetapkan kebenaran yang berkaitan dengan ciri taksonomi daun lengkung dan untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Determinasi ini di lakukan di Laboratorium Biologi Universitas Bengkulu. Berdasarkan hasil verifikasi taksonomi sampel tersebut sesuai dengan yang digunakan untuk penelitian yaitu:

- Ordo : Sapindales
- Famili : Sapindaceae
- Spesies : *Dimocarpus longan*

Daun lengkung yang digunakan dilakukan sortasi basah dengan mencuci daun lengkung menggunakan air untuk dipisahkan dari kotoran yang menempel, ditiriskan agar dapat mengurangi kadar air pada bahan, keringkan dengan dijemur dengan cara di angin-anginkan tidak di bawah sinar matahari langsung, setelah kering daun lengkung dihancurkan dengan blender hingga menjadi partikel kecil, simplisia yang diperoleh disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.

Ekstrak daun lengkung yang dihasilkan dari simplisia daun lengkung dengan berat 200 g dimasukan kedalam botol coklat dan direndam dengan etanol 96% sampai terendam selama 3 hari dan sesekali diaduk. Setelah itu filtrat yang dihasilkan kemudian disaring dengan menggunakan saringan yang dilapisi kain, kemudian dilakukan maserasi kembali selama 2 hari. Hasil maserat yang didapat kemudian disaring dengan saringan, kemudian dipekatkan untuk mendapatkan ekstrak kental dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 70°C.

$$\% \text{rendemen} = \frac{41,7575 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 100\% = 20,87\%$$

Keterangan: Berat ekstrak yang diperoleh 41,7575 g; Berat simplisia yang di ekstrak 200 g; hasil rendemen yang didapatkan: 20,87%.

Uji Organoleptis

Setelah dilakukan pembuatan lotion yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 1, kemudian dilakukan pengujian organoleptis dilakukan dengan mengamati perubahan bentuk, warna, bau dari sediaan lotion yang mengandung beberapa variasi ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*). Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 4 minggu penyimpanan. Hasil uji organoleptis dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 1. Lotion ekstrak daun lengkung

Tabel 2. Hasil uji organoleptis lotion daun lengkung (*Dimocarpus longan*)

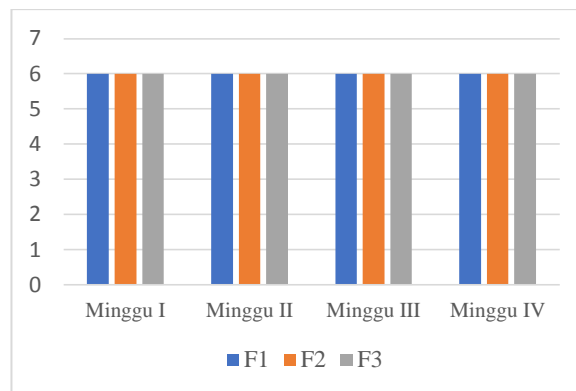
No.	Formula	Organoleptis	Minggu ke			
			I	II	III	IV
1.	F1	Warna	HM	HM	HM	HM
		Bentuk	AK	AK	AK	AK
		Bau	L	L	L	L
2.	F2	Warna	H	KM	KM	KM
		Bentuk	M	K	K	K
		Bau	L	L	L	L
3.	F3	Warna	HT	HT	HT	HT
		Bentuk	LK	LK	LK	LK
		Bau	L	L	L	L

Keterangan: F1: Basis lotion dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 0,5%, F2: Basis lotion dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 1,5% dan F3: Basis lotion dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 2,5% HM: Hijau Muda, HT: Hijau Tua, AK: Agak Kental, K: Kental, LK: Lebih Kental, L: Lemon.

Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan selama 4 minggu dapat dilihat pada Tabel 2 hasil uji organoleptis menunjukkan semua sediaan lotion telah dibuat dan dievaluasi sediaan lotion dengan konsentrasi 2,5% (F3) lebih kental dibanding dengan F1 dan F2 dan tidak ada perubahan warna selama penyimpanan.

Uji pH

Tujuan dilakukan uji pH sediaan lotion ini untuk mengetahui apakah lotion yang telah dibuat telah memenuhi syarat pH untuk sediaan topikal yaitu antara 4,5 - 6,5. Sediaan topikal dengan nilai pH yang terlalu asam dapat mengiritasi kulit sedangkan bila nilai pH terlalu basa dapat membuat kulit kering dan bersisik (Tranggono & Latifa, 2007). Uji pH dilakukan dengan menggunakan kertas pH. Hasil pengukuran pH pada masing-masing sediaan lotion selama 4 minggu dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil pengujian pH lotion ekstrak daun lengkung

Dari grafik diatas diketahui bahwa sediaan lotion yang dihasilkan tidak mengalami perubahan pH. Nilai pH yang diperoleh dari konsentrasi ekstrak daun lengkung dengan berbagai konsentrasi 0,5%, 1,5%, dan 2,5% adalah 6. Dapat disimpulkan bahwa variasi kadar ekstrak daun lengkung tidak mempengaruhi kestabilan pH.

Uji homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aspek homogenitas sediaan lotion yang telah dibuat. Sediaan yang homogen akan menghasilkan kualitas yang baik karena menunjukkan bahan obat terdispersi dalam bahan dasar secara merata, sehingga dalam setiap bagian sediaan mengandung obat yang jumlahnya sama. Jika bahan obat tidak terdispersi merata dalam bahan dasarnya maka obat tersebut tidak mencapai efek terapi yang diinginkan (Ulaen dkk., 2012). Lotion diambil pada masing-masing formula secukupnya kemudian dioleskan pada plat kaca, diraba, dan digosokkan, massa lotion harus menunjukkan susunan homogen yaitu tidak terasa adanya bahan padat pada kaca (Lestari, 2002). Pengujian ini dilakukan selama 4 minggu, hasil pengujian yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3.

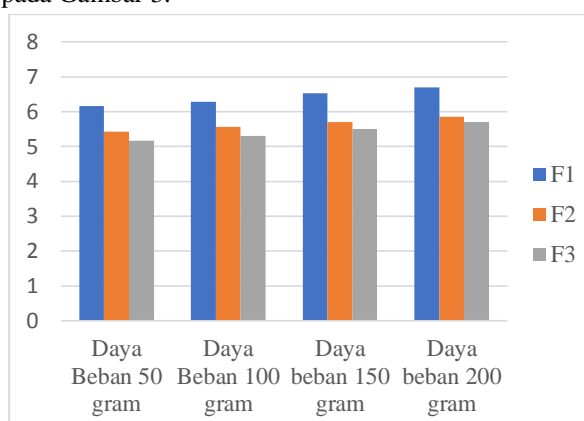
Tabel 3. Hasil uji homogenitas lotion ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*)

No.	Formulasi	Minggu ke			
		I	II	III	IV
1	F1	H	H	H	H
2	F2	H	H	H	H
3	F3	H	H	H	H

Keterangan: F1: konsentrasi ekstrak daun lengkung 0,5%, F2: dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 1,5%, F3: dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 2,5%, H: Homogen.

Uji daya sebar

Tujuan evaluasi daya sebar yaitu untuk mengetahui kemampuan penyebaran *lotion* pada kulit telah memenuhi persyaratan untuk daya sebar *lotion* bila daya sebar sebesar 5 - 7 cm. Daya sebar baik akan mempermudah saat diaplikasikan pada kulit. Faktor yang mempengaruhi diameter daya sebar suatu sediaan adalah jumlah ekstrak yang digunakan setiap masing-masing formula. Hal ini berdasarkan pada kenyataan bahwa semakin rendah konsistensi sediaan *lotion* dengan waktu lekat yang lebih rendah maka dapat membuat *lotion* semakin mudah menyebar (Ansel dkk., 1989). Hasil pengukuran daya sebar pada masing-masing sediaan *lotion* selama 4 minggu dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Rata-rata uji daya sebar ekstrak *lotion* daun lengkung

Sediaan *lotion* daun lengkung dengan konsentrasi 0,5%; 1,5%; 2,5% menunjukkan daya sebar yang berbeda, untuk berat beban 50 g sediaan *lotion* dengan konsentrasi ekstrak lengkung 0,5% menunjukkan daya sebar 6,16 cm; konsentrasi 1,5% menunjukkan daya sebar 5,43 cm; dan untuk *lotion* dengan konsentrasi ekstrak lengkung 2,5% menunjukkan daya sebar 5,16 cm, semua sediaan menunjukkan daya sebar yang baik rata-rata diatas 5 cm atau 6 cm. Daya sebar yang baik dapat menjamin pelepasan bahan obat dengan baik (Voight, 1995). Dari hasil tersebut menunjukkan semua *lotion* yang dihasilkan tetap stabil selama penyimpanan.

Uji akseptabilitas lotion

Uji akseptabilitas ini dilakukan selama 1 hari pada 10 orang panelis yang dilakukan untuk mengetahui formula mana yang paling disukai oleh relawan sebagai *lotion* ekstrak daun lengkung. Adapun hasil uji pada relawan terhadap *lotion* daun lengkung dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil uji akseptabilitas pada *lotion* ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*)

Formula	Indikator	Panelis			
		S	SS	KS	TS
F1	Warna	1	9	-	-
	Bau	3	6	1	-
	Bentuk	1	8	1	-
	Mudah dioles	1	9	-	-
F2	Warna	-	-	6	4
	Bau	5	-	3	2
	Bentuk	9	-	-	2
	Mudah dioles	8	1	-	1
F3	Warna	-	-	4	6
	Bau	3	-	6	1
	Bentuk	1	3	3	3
	Mudah dioles	4	-	4	2

Keterangan: F1: *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 0,5%, F2: *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 1,5%, F3: Basis *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 2,5%, S: suka, SS: sangat suka, KS: kurang suka, TS: tidak suka.

Berdasarkan hasil uji panelis, peneliti ingin melihat manakah dari 3 formula yang lebih di sukai panelis. Uji panelis melibatkan 10 orang sukarelawan yang menyetujui untuk berpartisipasi dalam pengujian ini. Panelis akan diberi kertas yang berisikan informasi mengenai apa yang akan dinilai dari sediaan *lotion*, F1 yang paling disukai dari panelis dibandingkan dengan F2 dan F3. Hal ini dikarenakan pada formula 1 mudah dioles, warna hijaunya yang lembut, selain itu panelis juga menyukai bau dari sediaan pada F1 ini yang tidak menyengat.

Uji iritasi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah sediaan *lotion* yang telah dibuat mengiritasi kulit atau tidak. Hasil uji penelitian uji iritasi dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian uji iritasi kulit *lotion* ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*)

No.	Formula	Panelis									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	F1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: F1: Basis *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 0,5%

F2: *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 1,5%

F3: *lotion* dengan konsentrasi ekstrak daun lengkung 2,5%

(-): negatif tidak iritasi

KESIMPULAN

Ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*) dapat dibuat sediaan *lotion* dengan berbagai macam konsentrasi. Sifat fisik dari uji yang telah dilakukan diantaranya uji organoleptis, uji pH, uji homogenitas, serta uji daya sebar sediaan *lotion* dengan variasi kadar ekstrak daun lengkung (*Dimocarpus longan*) tidak mempengaruhi kestabilan fisik *lotion* dan tidak mengalami perubahan selama dilakukan pengujian.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak yang telah banyak membantu dalam penelitian ini. Ucapan terima kasih terutama penulis ucapkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Bengkulu, atas kesempatan yang diberikan dalam melaksanakan Penelitian Pembinaan Universitas.

DAFTAR PUSTAKA

- Ansel, H. C., Popovich & Allen, L. V. (1989). *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System* (Sixth Edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Garg, A., Aggarwal, D., Garg, S. & Singla, A. K. (2002). Spreading of Semisolid Formulations, An Update. *Pharmaceutical Technology*; 2002; 84-105.
- Katja, D. G., Suryanto, E. & Wehantouw, F. (2009). Potensi Daun Alpukat (*Persea Americana* Mill) sebagai Sumber Antioksidan Alami. *Chemistry Progress*; 2; 58-64.
- Kurnia, R. (2015). Pembuatan Simplisia Daun Lengkung (*Dimocarpus Longan*) sebagai Bahan

Baku Tumbuhan Obat. *Skripsi*; Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Lachman, L. A. (1994). *Teori dan praktek Farmasi Industri, III* (Suyatmi, ed). Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Lestari, T. (2002). *Hand and Body Lotion: Pengaruh Penambahan Nipagin, Nipasol dan Campuran Keduanya terhadap Stabilitas Fisika dan Efektifitasnya sebagai Anti Jamur. Skripsi*; Fakultas Farmasi Universitas Gajah Mada, Yogyakarta.

Purwaningsih, S., Ella, S. & Tika, A. B. (2014). Formulasi Skin Lotion dengan Penambahan Karagen dan Antioksidan Alami dari *Rhizophora mucronata* Lamk. *Jurnal Akuatika*; 5; 55-62.

Muthukumarasamy, R., Ilyana, A., Fithriyaani, N. A., Najihah, N. A., Asyiqin, N. & Sekar, M. (2016). Formulation and Evaluation of Natural Antioxidant Cream Comprising Methanolic Peel Extract of *Dimocarpus longan*. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*; 8; 1305-1309.

Tranggono, R. I. & Latifah, F. (2007). *Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetik*. Jakarta: PT. Gramedia.

Triwinata, M. R. (2006). *Pengenalan dan Pengembangan Lengkung Dataran Rendah di Indonesia*. Makalah Workshop Lengkung. Jakarta 23 Nopember 2006.

Ulaen, S. P. J., Banne, Y. & Suatan, R. A. (2012). Pembuatan Salep Anti Jerawat dari Ekstrak Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.). *Jurnal Ilmiah Farmasi*; 3; 45-49.

Voight, R. (1995). Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi ke-5 (Soewandi SN, Widiyanto MD, penerjemah). Yogyakarta: Gajah Mada University Press.

Yanwirasti. (2008). Langkah-langkah Pokok Penelitian Biomedik. *Penelitian*; Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang.

Formulasi dan Evaluasi Hidrogel Mukoadhesif Metronidazol Menggunakan Kombinasi Kitosan dan Natrium Karboksimetilselulosa Menggunakan Desain Faktorial

Andhi Fahrurroji*, Agus Setyawan, Bambang Wijianto
Prodi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak

*Corresponding author: roji_apt@pharm.untan.ac.id

Submitted: 27 Februari 2019

Accepted: 25 Juni 2019

Published online: 31 juli 2019

Abstract

Background: Metronidazole is an antibiotic that is commonly used to treat *Helicobacter pylori* infection. Metronidazole is highly soluble in acid. In order to optimize the solubility, mucoadhesive hydrogels were formulated to maintain longer retention time in the stomach in order to optimize therapy for *H.pylori* infection. **Objective:** The purpose of this research was to obtain optimum formula of polymer hydrogels with combination of chitosan and sodium carboxymethylcellulose (Na-CMC) that could control in vitro release of metronidazole. **Methods:** Prediction of the optimum formula was conducted using a factorial design with Design Expert 7.0.0 Trial software. Initial formula that was used to predict the optimum formula consisted of four formulas with the ratio of chitosan and sodium carboxymethylcellulose polymer is 0.5:1.5; 1.0:1.5; 0.5:3.0; and 1.0:3.0 respectively. **Results:** Variations in the concentration of Na-CMC and chitosan could influence drug release, namely in formula 1 with drug release kinetics following Higuchi kinetics and release mechanism following Fickian diffusion mechanism. Whereas, in formula 4 the physical preparation was the highest mucoadhesive strength compared to the other formulas due to an increase in the concentration of chitosan and sodium carboxymethylcellulose. So that the combination between chitosan and Na-CMC can be a model of metronidazole release from the matrix hydrogel which ranges from 55.633% - 68.319% in 240 minutes. The observation results showed the optimum formula with a ratio of chitosan and sodium carboxymethylcellulose polymers of 1.0% (chitosan) and 3.0% (sodium carboxymethylcellulose), with a response to developing ability of 96.95%; mucoadhesive strength of 0.1911 N/cm²; drug release of 67.457%. Based on the independent test sample t-test on the SPSS 22 trial program explained that the formula of the observation results were not significantly different from the predicted results (p -value > 0.05). **Conclusion:** The results showed that the factorial design method can be used to determine the optimum formula for metronidazole mucoadhesive hydrogels.

Keywords: metronidazole, chitosan, sodium carboxymethylcellulose, hydrogels, factorial designs

Abstrak

Pendahuluan: Metronidazol merupakan suatu antibiotik yang biasa digunakan dalam mengobati infeksi *Helicobacter pylori*. Metronidazol mempunyai kelarutan yang tinggi dalam asam. Untuk mengoptimalkan kelarutan tersebut maka dibuatlah hidrogel mukoadhesif yang dapat mempertahankan waktu tinggal di lambung lebih lama sehingga terapi infeksi *H.pylori* lebih optimal. **Tujuan:** untuk mendapatkan formula optimum dari hidrogel dengan kombinasi polimer kitosan dan natrium karboksimetilselulosa yang dapat mengontrol pelepasan metronidazol secara *in vitro*. **Metode:** Metode yang digunakan untuk memprediksi formula optimum menggunakan desain faktorial. Rancangan formula awal untuk memprediksi formula optimum terdiri dari 4 formula dengan perbandingan polimer kitosan dan natrium karboksimetilselulosa berturut-turut 0,5:1,5; 1,0:1,5; 0,5:3,0; dan 1,0:3,0. **Hasil:** Variasi konsentrasi dari Na-CMC dan kitosan dapat mempengaruhi pelepasan obat, yakni pada formula I dengan kinetika pelepasan obat mengikuti kinetika Higuchi dan mekanisme pelepasan mengikuti mekanisme difusi Fickian. Sedangkan, pada formula 4 memiliki sediaan fisik yaitu kekuatan mukoadhesif yang paling tinggi dibandingkan formula yang lain karena adanya peningkatan konsentrasi kitosan

dan natrium karboksimetilselulosa (Na-CMC). Sehingga kombinasi antara kitosan dan Na-CMC dapat menjadi model pelepasan metronidazol dari matriks hidrogel yakni pada rentang 55,633% - 68,319% dalam waktu 240 menit. Hasil observasi menunjukkan formula optimum dengan perbandingan polimer kitosan dan natrium karboksimetilselulosa sebesar 1,0% (kitosan) dan 3,0% (natrium karboksimetilselulosa), dengan respon untuk kemampuan mengembang sebesar 96,95%; kekuatan mukoadhesif sebesar 0,1911 N/cm²; pelepasan obat sebesar 67,457%. Berdasarkan uji independent sampel t-test pada program SPSS 22 trial menjelaskan bahwa formula hasil observasi tidak berbeda signifikan dengan hasil prediksi (*p-value* > 0,05). **Kesimpulan:** Hasil menunjukkan bahwa metode desain faktorial dapat digunakan untuk menentukan formula optimum dari hidrogel mukoadhesif metronidazol.

Kata kunci: metronidazol, kitosan, natrium karboksimetilselulosa, hidrogel, desain faktorial

PENDAHULUAN

Ulkus peptik merupakan suatu keadaan dimana terjadi kerusakan pada lapisan mukosa sampai dengan lapisan otot saluran cerna yang disebabkan oleh adanya peningkatan bakteri *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) yang terdapat di dalam lambung (Aziz, 2002; Zhang dkk., 2005). Di negara berkembang *H. pylori* menginfeksi orang dewasa sebanyak 80 - 90% dari populasi dan sekitar 60 - 90% pasien yang mengalami tukak lambung terinfeksi oleh *H. Pylori* (Arora dkk., 2012; Farida dkk., 2009).

Pengobatan konvensional seperti sediaan tablet dan kapsul dalam mengatasi infeksi *H. Pylori* sering mengalami kegagalan yang disebabkan oleh permeabilitas obat yang kurang baik, kadar obat yang sedikit di dalam lambung dimana sediaan obat yang tepat untuk infeksi *H. pylori* sediaan yang dapat mempertahankan obatnya lebih lama di lambung karena *H. pylori* tinggal dalam sel epitel mukosa lambung (De la Torre dkk., 2003).

Metronidazol merupakan salah satu antibiotik yang digunakan untuk mengatasi infeksi *H. Pylori* (Lacy dkk., 2009; Redigueri dkk., 2011). Metronidazol mempunyai kelarutan yang tinggi pada pH asam, yaitu 30,6 mg/mL pada pH 1 dan kelarutan yang rendah pada pH basa yaitu 11,6 mg/mL pada pH 7 (Redigueri dkk., 2011). Untuk memaksimalkan kelarutan metronidazol yang tinggi di lambung dan waktu tinggal di lambung, maka dikembangkan sistem penghantaran obat gastroretentif dalam bentuk sediaan hidrogel. Hidrogel dapat meregulasi pelepasan obat melalui perubahan volume gel yang diinduksi oleh lingkungannya seperti kondisi pH, sehingga dapat diterapkan pada penghantaran metronidazol agar terlepas di lambung.

Selain itu, kitosan dan natrium karboksimetilselulosa merupakan polimer yang memiliki sifat mukoadhesif (Tangri & Madhav, 2011).

Penelitian sebelumnya membuat hidrogel dengan polimer kitosan, polivinil pirolidon, dan asam poliakrilat dengan bahan aktif klaritromisin ternyata dapat meningkatkan waktu tinggal obat tersebut di lambung sehingga untuk mengobati infeksi *H. pylori* pada ulkus peptik lebih optimal (Gupta dkk., 2010). Hidrogel yang disintesis dengan bahan dasar kitosan dengan penambahan polivinil alkohol sebagai agen penguat, diperoleh hidrogel yang dapat mengembang pada pH 1,2 dan menyusut pada pH 7 (Gupta dkk., 2010).

Penelitian menunjukkan bahwa kitosan dan natrium karboksimetilselulosa (Na-CMC) mempunyai sifat mukoadhesif yang baik. Hidrogel yang dibuat dari kitosan yang dikombinasikan dengan polivinil pirolidon dan asam poliakrilat ternyata dapat memperpanjang waktu tinggal klaritromisin dan dapat mengontrol pelepasan klaritromisin sehingga terapi infeksi *H. pylori* lebih optimal (Tangri & Madhav, 2011). Metronidazol yang didesain menjadi hidrogel mukoadhesif dapat meningkatkan waktu tinggalnya di lambung sehingga diharapkan terapi infeksi *H. pylori* dapat lebih optimal.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Metronidazol diperoleh dari Wuhan Wuyao Pharmaceutical dengan nomor batch: C04-W103023, kalsium klorida diperoleh dari Merck, kitosan dari Biotech Surindo dengan nomor batch 10A0215.F.HM.CHC, natrium karboksimetilselulosa (Na-CMC) dari Brataco, asam klorida dari Merck, serta natrium klorida diperoleh dari Merck.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (BEL model M254Ai), lemari asam (ESCO model EBC-4A0), *magnetic stirrer* (Schott model D-55122 Mainz), pH meter (HANNA

tipe HI98107), mikropipet (Socorex, Acura Manual Model 815.0010Y), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 2450 & Genesys 10s UV-Vis).

Metodologi

Pembuatan sediaan hidrogel metronidazol

Variasi konsentrasi dari natrium karboksimetilselulosa dan kitosan tertera pada Tabel 1. Larutan Na-CMC (Brataco) dipersiapkan dengan cara melarutkan Na-CMC dengan akuades dan dilanjutkan dengan melakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* (Schott model D-55122 Mainz) pada suhu ruang. Larutan kitosan dipersiapkan dengan cara melarutkan kitosan dalam asam asetat 1%, setelah itu dilakukan pengadukan dengan *magnetic stirrer* hingga kitosan terlarut sepenuhnya (Abu-Jdayil & Fara, 2013).

Sebanyak 250 mg metronidazol dilarutkan dalam 10 mL dapar pH 1,2 kemudian ditambahkan ke dalam larutan Na-CMC dan diaduk selama 45 menit untuk memfasilitasi penetrasi molekul metronidazol ke dalam larutan Na-CMC. Selanjutnya, larutan Na-CMC-Metronidazol diteteskan ke dalam larutan kitosan yang telah mengandung kalsium klorida (CaCl₂) 2% menggunakan *hypodermic syringe* 5 mL dan campuran diaduk secara konstan dengan kecepatan 100 rpm untuk membentuk kompleks kitosan–metronidazol–Na-CMC (Santoso, 2013). Hidrogel yang terbentuk kemudian dikeringkan pada suhu kamar. Hidrogel yang telah kering selanjutnya dipersiapkan untuk analisis lebih lanjut.

Tabel 1. Hasil pengujian profil hidogel mukoadhesif metronidazol

Kode Formula	Variabel		Index	Kekuatan	Persentase kumulatif obat
	X ₁	X ₂	Pengembangan (%/jam)	Mukoadhesif (N/cm ²)	(t ₂₄₀) (%)
F1	-1	-1	60,691 ± 1,775	0,141 ± 0,007	68,319 ± 1,044
F2	1	-1	48,845 ± 1,186	0,164 ± 0,011	65,618 ± 2,307
F3	-1	1	139,667 ± 0,710	0,183 ± 0,005	55,633 ± 2,001
F4	1	1	96,583 ± 0,770	0,192 ± 0,006	66,672 ± 1,808
Level variabel			Konsentrasi rendah (-1)		Konsentrasi tinggi (1)
Kitosan (%)			0,5		1
Na Karboksimetilselulosa (%)			1,5		3

Keterangan: kitosan dilarutkan dalam 10 mL larutan asam asetat 1%; natrium karboksimetilselulosa dilarutkan dalam 10 mL Akuades. Metronidazol yang digunakan sebanyak 250 mg; larutan CaCl₂ 10 mL

Pembuatan larutan dapar pH 1,2

Pembuatan larutan dapar pada pH 1,2 merujuk pada ketentuan yang ditetapkan pada farmakope Indonesia edisi keempat dengan menggunakan HCl pekat sebanyak 7 mL dilarutkan dalam 500 mL akuades. NaCl sebanyak 2 g dilarutkan dalam 100 mL akuades. Larutan NaCl kemudian ditambahkan ke dalam larutan HCl dan ditepatkan dengan akuades hingga 1 L. Selanjutnya campuran tersebut diukur pHnya menggunakan pH meter (DepKes RI, 1995).

Pengukuran kadar metronidazol

Pengukuran kadar metronidazol dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu 2450 & Genesys 10s UV-Vis double beam). Metronidazol sebanyak 100 mg yang ditimbang secara seksama terlebih dahulu dilarutkan kedalam larutan dapar asetat pH 1,2 dan diaduk selama 10 menit dengan kecepatan 500 rpm. Setelah terlarut seluruhnya larutan tersebut dibuat dalam berbagai seri konsentrasi yakni 6, 9, 12, 15, 18 dan 21 ppm. Pengukuran metronidazol menggunakan spektrofotometer berada pada panjang gelombang maksimum 276,8 nm. Proses

pembuatan seri larutan dan pengukuran untuk kurva baku dilakukan repitisi 6x yang dilakukan dari larutan baku yang tersedia. Metode penetapan kadar ditetapkan dengan melakukan verifikasi metode yang meliputi linearitas, akurasi dan presisi. Hasil yang diperoleh pada pengukuran tersebut nilai liniaritas 0,9997, nilai akurasi dan presisi berturut-turut adalah pada rentang 98,124 - 100,198 dan 0,915 - 1,963.

Uji kemampuan mengembang

Pengujian kemampuan mengembang hidrogel dilakukan dalam dapar pH 1,2 yang menggambarkan kondisi cairan lambung. Hidrogel yang telah dikeringkan ditimbang ± 5 mg dan ditempatkan dalam larutan dapar pada suhu kamar. Sampel di keluarkan dari larutan dapar pada interval waktu 1 jam selama 8 jam perendaman. Kelebihan air hidrogel dibersihkan dari permukaan sampel dengan menggunakan kertas saring, kemudian ditimbang bobot hidrogel basah. Rasio pengembangan hidrogel ditentukan dengan persamaan 1 (He, 2007).

$$\text{Rasio Pengembangan (\%)} = \left(\frac{\text{Bobot Hidrogel pada waktu } t - \text{Bobot Hidrogel mula-mula}}{\text{Bobot Hidrogel Mula-Mula}} \right) \times 100\% \dots (1)$$

Uji kekuatan mukoadhesif

Kekuatan mukoadhesif diukur dengan menggunakan modifikasi keseimbangan timbangan. Hidrogel yang diuji ditempatkan pada mukosa usus

$$\text{Daya Adhesi (N)} = \frac{\text{Berat air(g)}}{1000} \times 9,81 \dots (2)$$

$$\text{Kekuatan Mukoadhesif (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Daya Adhesi (N)}}{\text{Luas Permukaan (cm}^2\text{)}} \dots (3)$$

Uji pelepasan obat secara *in vitro*

Tiap formula hidrogel metronidazol dilakukan uji pelepasan metronidazol dari polimer hidrogel dengan metode uji disolusi. Digunakan 900 mL larutan dapar pH 1,2 dalam gelas beaker dan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Pengujian dalam medium pH 1,2 dilakukan selama 4 jam. Sampel larutan diambil pada menit ke-5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240 dan dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum metronidazol. Hasil uji disolusi dimasukkan ke dalam persamaan orde ke-nol, orde kesatu dan *Higuchi* untuk melihat kinetika reaksi obat serta persamaan Kosmeyer-Peppas untuk melihat mekanisme pelepasan obat (Déat-Lainé dkk., 2013; Lin dkk., 2005).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa panjang gelombang maksimum metronidazol yaitu 277 nm pada pelarut larutan dapar pH 1,2. Data panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk membuat kurva baku dalam berbagai konsentrasi sehingga diperoleh persamaan yang akan digunakan untuk menghitung jumlah obat yang dilepaskan setiap satuan waktu tertentu.

Uji kemampuan mengembang

Pengujian kemampuan mengembang hidrogel dilakukan dalam medium dapar pH 1,2 yang menggambarkan kondisi medium lambung tanpa enzim. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui waktu pengembangan yang berkaitan dengan

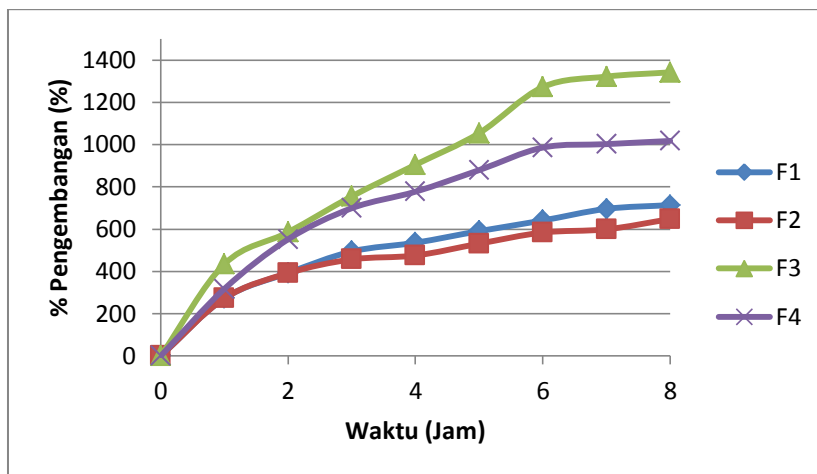
sapi yang terdapat didalam dapar. Kemudian, pada sisi yang lain tambahkan air perlahan dengan kecepatan 100 tetes per menit. Penambahan air dihentikan saat hidrogel terlepas dari mukosa usus sapi. Berat air yang menyebabkan terlepasnya hidrogel dihitung sebagai berat air (g) yang ditentukan berdasarkan persamaan 2 dan 3 (Rajput dkk., 2010).

kemampuan hidrogel dalam mengontrol pelepasan obat dari dalam matriks polimernya. Hasil pengujian (Gambar 1) menunjukkan bahwa lama pengembangan hidrogel berbanding lurus dengan kemampuan pengembangan hidrogel, semakin lama waktu pengembangan akan meningkatkan persen pengembangan dari hidrogel. Adanya penetrasi air secara bebas ke dalam hidrogel mengakibatkan air memenuhi pori-pori yang terdapat pada hidrogel sehingga akan memperbesar derajat pengembangannya (Meng dkk., 2011). Formula 3 dan 4 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan yang signifikan pada 3 jam pertama yang selanjutnya diikuti dengan melambatnya pengembangan dan pengembangan stabil setelah pengujian memasuki jam ke-7. Peristiwa ini diawali dengan terjadinya proses hidrasi ke dalam rantai polimer (Hoffman, 2012). Adanya penetrasi medium asam ke dalam rangka polimer pada waktu awal pengujian yang secara langsung akan mengakibatkan protoniasasi gugus amin primer ($-\text{NH}_3^+$) pada kitosan sehingga terjadinya gaya tolak-menolak didalam rangka kitosan, muatan positif dari kitosan yang terbentuk dapat menyebabkan melemahnya interaksi dengan gugus karboksil Na-CMC, hal inilah yang menyebabkan terjadinya pengembangan yang cukup signifikan pada jam ke-3. Persamaan faktorial untuk respon kemampuan mengembang dapat di lihat pada persamaan 4. Berdasarkan persamaan 4 tersebut, Na-CMC mempunyai pengaruh yang lebih besar dalam menurunkan kemampuan mengembang dan interaksi antara kitosan dan Na-CMC dapat menurunkan kemampuan mengembang hidrogel.

$$\text{Kemampuan mengembang} = -0,710 + 3,141 A + 5,791 B - 3,209 A \dots (4)$$

Ket: A = Proporsi Kitosan

B = Proporsi Na-CMC



Gambar 1. Grafik hasil uji pengembangan hidrogel metronidazol dalam dapar asetat pH 1,2

Uji kekuatan mukoadhesif

Hasil pengujian memperlihatkan bahwa formula 4 mempunyai kekuatan mukoadhesif paling besar. Pada Gambar 2 memperlihatkan bahwa dengan adanya

peningkatan konsentrasi kitosan dan Na-CMC dapat meningkatkan kekuatan mukoadhesif. Persamaan faktorial respon kekuatan mukoadhesif dapat dilihat pada persamaan 5.

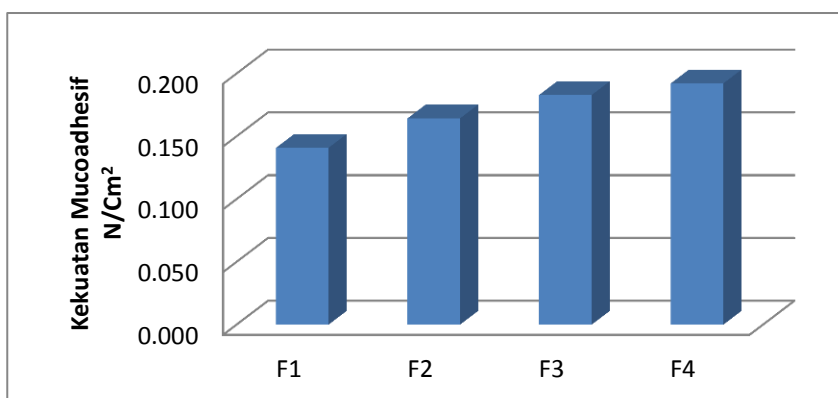
$$\text{Kekuatan Mukoadhesif} = +0,061 + 0,075 A + 0,037 B - 0,018 AB \dots\dots\dots(5)$$

Ket: A = Proporsi Kitosan

B = Proporsi Na-CMC

Berdasarkan persamaan 5 menunjukkan bahwa dengan adanya peningkatan konsentrasi kitosan dan Na-CMC dapat meningkatkan kekuatan mukoadhesif secara signifikan (*p-value* < 0,05). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian menggambarkan formula 4 lebih besar kekuatan mukoadhesif daripada formula 1, 2 dan 3. Hal ini terjadi karena kitosan bersifat kationik dan memiliki gugus -NH₂ yang mana pada kondisi asam akan terprotonasi membentuk -NH₃⁺ yang dapat berikatan dengan glikoprotein mukus yang bersifat anionik (asam sialat) serta permukaan sel mukosa yang bermuatan negatif sehingga membentuk ikatan ionik yang kuat. Kitosan juga berikatan hidrogen antara gugus hidrogel

pada kitosan dengan senyawa penyusun mukosa lainnya (Deacon dkk., 2000). Na-CMC memiliki gugus -COO- yang pada suasana asam akan berada dalam bentuk molekul sehingga ikatan yang terjadi antara Na-CMC dengan komponen mukosa adalah ikatan hidrogen (El Kamel dkk., 2002). Namun dengan adanya interaksi antara kedua polimer dapat menurunkan kekuatan mukoadhesif. Hal ini disebabkan oleh terbentuknya ikatan gaya elektrostastik antara kitosan dan Na-CMC yang akan mengurangi ikatan polimer dengan mukosa lambung (El Kamel dkk., 2002).

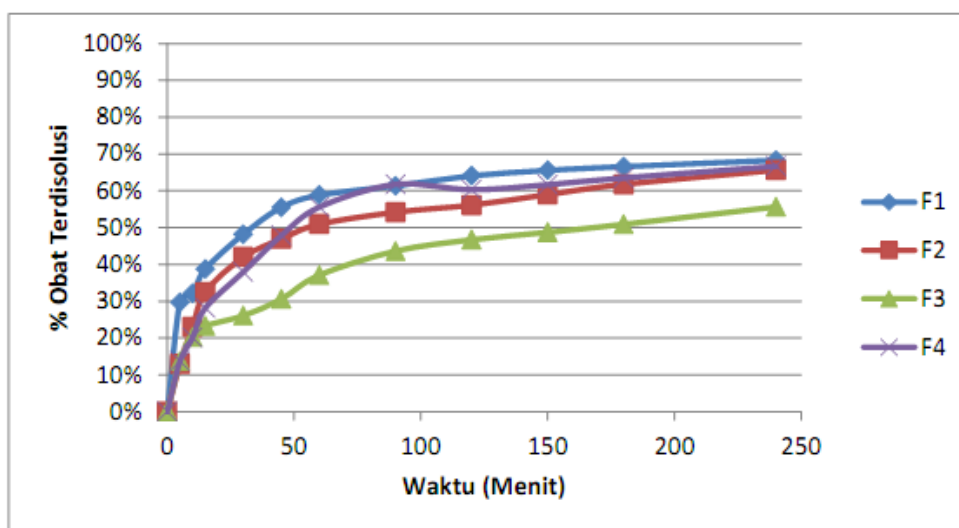


Gambar 2. Diagram hasil uji kekuatan mukoadhesif pada berbagai seri konsentrasi kitosan dan natrium karboksimetilselulosa pada berbagai formula

Uji Pelepasan Obat

Uji pelepasan obat ini menggunakan alat disolusi yang dimodifikasi dan medium disolusi yang digunakan adalah dapar pH 1,2 yang menggambarkan

kondisi cairan lambung. Data profil pelepasan metronidazol dari matriks hidrogel terhadap waktu ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik hubungan antara profil obat terdisolusi dengan lama uji disolusi

Hasil penelitian (pada Tabel 1) menunjukkan bahwa pelepasan obat paling tinggi yaitu pada formula 1 sebesar 68,31% dan paling rendah pada formula 3 sebesar 55,63% selama 4 jam pengujian. Perbedaan yang terjadi antar formula dapat dikarenakan adanya variasi rasio konsentrasi polimer yang digunakan. Semakin kecil konsentrasi kitosan dan Na-CMC semakin besar obat yang akan terlepas dari matriks hidrogel. Pelepasan metronidazol dari matriks hidrogel dikendalikan oleh kinetika Higuchi. Hal ini dapat dilihat nilai r^2 pada Tabel 2 yang mendekati 1 pada formula 1 sampai formula 4. Kinetika Higuchi menggambarkan bahwa jumlah obat yang terlepas sebanding dengan akar waktu dengan mekanisme pelepasan secara difusi Fickian (Komariah, 2012).

Matriks hidrogel yang digunakan juga termasuk matriks hidrofilik yang dapat mengembang pada medium asam, membentuk lapisan gel yang memungkinkan obat dapat berdifusi keluar melalui lapisan tersebut. Semakin lama kecepatan pelepasan obat semakin menurun, hal ini disebabkan karena jarak difusi obat dalam pori-pori sediaan semakin besar, sehingga membutuhkan waktu yang lebih lama untuk membawa obat keluar dari matriks (Banakar, 1992). Nilai eksponen pelepasan obat (n) pada persamaan Korsmeyer-Peppas menggambarkan mekanisme pelepasan obat yang dialami oleh sediaan tersebut. Tabel 3 memperlihatkan bahwa mekanisme pelepasan obat pada sediaan dikendalikan oleh difusi Fick karena nilai $n < 0,5$.

Tabel 2. Parameter pelepasan obat dari hidrogel ; n=3

Formula	Orde Nol		Orde Satu		Higuchi	
	k (menit ⁻¹)	r ²	k (menit ⁻¹)	r ²	k (menit ⁻¹)	r ²
1	0,154 ± 0,001	0,715 ± 0,034	0,003 ± 0,000	0,641 ± 0,031	3,0050 ± 0,0185	0,8741 ± 0,0257
2	0,864 ± 0,612	0,717 ± 0,093	0,004 ± 0,001	0,545 ± 0,081	3,5562 ± 0,3636	0,8651 ± 0,0766
3	0,169 ± 0,007	0,876 ± 0,035	0,005 ± 0,000	0,753 ± 0,068	3,1390 ± 0,1242	0,9684 ± 0,0199
4	0,203 ± 0,008	0,692 ± 0,031	0,005 ± 0,000	0,756 ± 0,020	3,9887 ± 0,1610	0,8549 ± 0,0278

Keterangan: n: jumlah data; r²: koefisien determinasi; k: konstanta pelepasan obat

Tabel 3. Hasil perhitungan model pelepasan berdasarkan persamaan kosmeyer peppas; n=3

Formula	Kosmeyer Peppas		
	k (menit ⁻¹)	r ²	n ^b
1	0,0014 ± 0,0000	0,9538 ± 0,0106	0,2226 ± 0,0007
2	0,0021 ± 0,0004	0,8916 ± 0,0619	0,3653 ± 0,0515
3	0,0022 ± 0,0001	0,9736 ± 0,0259	0,3437 ± 0,0072
4	0,0023 ± 0,0001	0,927 ± 0,014	0,4023 ± 0,0000

Keterangan: n: jumlah data; nb: koefisien difusi; r²: koefisien determinasi; k: konstanta pelepasan

Dengan demikian, pelepasan obat terjadi melalui difusi medium disolusi ke dalam matriks hidrogel (Setiastuti, 2011). Ketika medium disolusi berpenetrasi ke dalam matriks hidrogel, jaringan tiga dimensi hidrogel mengalami relaksasi, selanjutnya hidrogel akan mengembang sehingga medium yang masuk ke dalam matriks dapat membawa obat keluar melalui pori-pori matriks hidrogel secara difusi.

Persamaan faktorial untuk respon % pelepasan obat ditunjukkan pada persamaan 6. Berdasarkan persamaan 6 tersebut, adanya penurunan konsentrasi kitosan dan Na-CMC dapat meningkatkan % pelepasan obat, akan tetapi adanya interaksi kedua polimer tersebut dapat menurunkan % pelepasan obat secara signifikan (*p-value* < 0,05).

$$\text{Pelepasan obat} = 97,44536 - 32,88108 A - 17,61726 B + 18,31983 AB \dots\dots\dots(6)$$

Keterangan : A = Proporsi kitosan
B = proporsi Na-CMC

Penentuan dan pengujian formula optimum

Hasil analisis regresi desain faktorial (Tabel 4) pada parameter uji indeks pengembangan, kekuatan mukoadhesif, dan persentase pengembangan (t₂₄₀)

menunjukkan bahwa persamaan memiliki hubungan yang linear dengan perubahan konsentrasi dari polimer yang digunakan ditunjukkan dengan nilai r² ≤ 0,9.

Tabel 4. Hasil analisis regresi desain faktorial

Koefisien	B0	b1	b2	b12	R2
Indeks Pengembangan (%/Jam)	-0,710	3,141	5,791	-3,209	0,999
Kekuatan Mukoadhesif (N/Cm ²)	0,061	0,075	0,037	-0,018	0,912
pelepasan Obat t ₂₄₀ (%)	97,44536	32,88108	-17,61726	18,31983	0,915

Data-data hasil pengujian respon kemudian diolah dengan menggunakan program *Desain Expert 7.0.0*. Program ini akan memprediksikan kombinasi terbaik dari komponen-komponen yang dioptimasi yaitu kitosan dan Na-CMC. Formula optimum yang disarankan oleh desain adalah kitosan 1%: Na-CMC 3%. Pengujian parameter formula hidrogel optimum

bertujuan untuk mengetahui apakah hasil parameter uji meliputi kemampuan mengembang, kekuatan mukoadhesif, dan pelepasan obat yang diperoleh sesuai dengan hasil prediksi dari program. Hasil pengujian dan analisis parameter hidrogel optimum dengan perbandingan polimer kitosan – Na-CMC = 1% : 3% dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian dan analisis parameter formula optimum; n = 3 ± SD

Parameter	Hasil Prediksi	95% PI low	95% PI high	Hasil Uji	Signifikansi
Kemampuan Mengembang (%)	96,582	95,42	97,74	96,562 ± 0,047	p > 0,05
Kekuatan mukoadhesif (N/cm ²)	0,192	0,18	0,20	0,190 ± 0,004	p > 0,05
Pelepasan obat (%)	66,672	3,71	4,27	67,457 ± 2,427	p > 0,05

Keterangan: n: jumlah data; PI: *prediction interval*

Berdasarkan hasil uji beda menggunakan *independent sample t-test* pada Tabel 4. menunjukkan bahwa nilai aktual dan nilai prediksi dari setiap parameter uji yang dihasilkan oleh formula optimum

tidak berbeda signifikan dikarenakan nilai *p-value* > 0,05. Hal ini mengindikasikan bahwa persamaan yang disarankan oleh program dengan metode desain faktorial dapat memprediksi nilai-nilai yang akan

dihasilkan oleh setiap respon pada formula optimum hidrogel.

KESIMPULAN

Variasi konsentrasi dari natrium karboksimetilselulosa dan kitosan dapat mempengaruhi profil fisikokimia dari sediaan hidrogel mukoadhesif metronidazol. Variasi tersebut dapat mempengaruhi pelepasan obat yakni pada formula I dengan kinetika pelepasan obat mengikuti kinetika Higuchi dan mekanisme pelepasan mengikuti mekanisme difusi fickian. Sedangkan, pada formula 4 memiliki sifat fisik yaitu kekuatan mukoadhesif yang paling tinggi dibandingkan formula yang lain karena adanya peningkatan konsentrasi kitosan dan natrium karboksimetilselulosa. Kombinasi antara kitosan dan Na-CMC dapat mengontrol pelepasan metronidazol dari matriks hidrogel yakni pada rentang 55,633% - 68,319% dalam waktu 240 menit. Formula optimum hidrogel memiliki nilai respon yang tidak berbeda signifikan dengan nilai observasi ($p \geq 0,05$) dengan komposisi optimum kombinasi formula berturut-turut kitosan dan Na karboksimetilselulosa adalah 1% serta 3%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa metode desain faktorial dapat digunakan untuk menentukan formula optimum dari hidrogel mukoadhesif metronidazol.

DAFTAR PUSTAKA

- Abu-Jdayil, B. & Fara, D. A. (2013). Modification of the Rheological Behaviour of Sodium Alginate by Chitosan and Multivalent Electrolytes. *Italian Journal of Food Science*; 25; 196–201.
- Arora, S., Bisen, G. & Budhiraja, R. (2012). Mucoadhesive and Muco-penetrating Delivery Systems for Eradication of *Helicobacter Pylori*. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*; 6; 18-30.
- Aziz, N. (2002). Peran Antagonis Reseptor H-2 Dalam Pengobatan Ulkus Peptikum. *Sari Pediatri*; 3, 222-226.
- Banakar, U. V. (1992). Pharmaceutical Dissolution Testing. New York: Marcel Decker Inc.
- De La Torre, P. M., Enobakhare, Y., Torrado, G. & Torrado, S. (2003). Release of Amoxicillin from Polyionic Complexes of Chitosan and Poly(Acrylic Acid). Study of Polymer/Polymer and Polymer/Drug Interactions within the Network Structure. *Biomaterials*; 24; 1499–1506.
- Deacon, M. P., McGurk, S., Roberts, C. J., Williams, P. M., Tendler, S. J., Davies, M. C., Davis, S. S. & Harding, S. E. (2000). Atomic Force Microscopy of Gastric Mucin and Chitosan Mucoadhesive Systems. *Biochemical Journal*; 348; 557-563.
- Déat-Lainé, E., Hoffart, V., Garrait, G., Jarrige, J. F., Cardot, J. M., Subirade, M., & Beyssac, E. (2013). Efficacy of Mucoadhesive Hydrogel Microparticles of Whey Protein and Alginate for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research*; 30; 721-734.
- El Kamel, A. H., Sokar, M. S., Naggar, V. F. & Gamal, S.A. (2002). Bioadhesive Controlled Release Metronidazol Vaginal Tablets. *Acta Pharmaceutica*; 52; 171–179.
- Farida, A., Unita, M., Yulianita, F., Azhar, M. B. & Yuwono. (2009). Sensitifitas dan Spesifisitas Pemeriksaan *Helicobacter Pylori* pada Saliva Penderita Gastritis Kronik dengan PCR. *Majalah Patologi Indonesia*; 17; 17-20.
- Gupta, A. K., Maurya, S. D., Dhakar & Singh, R. D., (2010). pH-Sensitive Interpenetrating Hydrogel for Eradication of *Helicobacter Pylori*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*; 3; 924-932.
- He, X. S., Liao, Z. W., Huang, P. Z., Duan, J. X., Ge, R. S., Li, H. B. & Geng, Z. C. (2007). Characteristics and Performance of Novel Water-Absorbent Slow Release Nitrogen Fertilizers. *Agricultural Sciences in China*; 6; 338-346.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 64; 18-23.
- Komariah, E. (2012). Pengembangan Granul Mukoadhesif Diltiazem Tertahan Di Lambung Menggunakan Eksiipen Koproses Karagenan dan Pragelatinasi Pati Singkong Propionat. *Tesis*; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Jakarta.
- Lacy, C. F., Armstrong, L. L., Goldman, M. P. & Lance, L. L. (2009). Drug Information Handbook, 1st ed, Lexi Comp's Drug Information Handbooks. USA: Lexi-Comp Inc.
- Lin, Y. H., Liang, H. F., Chung, C. K., Chen, M. C. & Sung, H. W. (2005). Physically Crosslinked Alginate/N,O-carboxymethyl Chitosan Hydrogels with Calcium for Oral Delivery of Protein Drugs. *Biomaterials*; 26; 2105–2113.

- Meng, X., Li, P., Wei, Q., Zhang, H.-X. (2011). pH Sensitive Alginate-chitosan Hydrogel Beads for Carvedilol Delivery. *Pharmaceutical Development and Technology*; 16; 22–28.
- Rajput, G. C., Dr. Majmudar, F. D., Dr. Patel, J. K., Patel, K. N., Thakor, R. S., Patel, B. P. & Rajgor, N. B. (2010). Stomach Specific Mucoadhesive Tablets as Controlled Drug Delivery System - A Review Work. *International Journal on Pharmaceutical and Biological Research*; 1; 30–41.
- Redigueri, C. F., Porta, V. G., Nunes, D. S., Nunes, T. M., Junginger, H. E., Kopp, S., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S., Dressman, J. B. & Barends, D. M. (2011). Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 100; 1618–1627.
- Depkes RI. (1995). Farmakope Indonesia, 4th ed. Jakarta: Depkes RI.
- Santoso, I. L. (2013). Preparasi dan Evaluasi Hidrogel Natrium Diklofenak dengan Kitosan dan Natrium Alginat. *Skripsi*; Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala, Surabaya.
- Setiastuti, A. D. (2011). Preparasi dan Karakterisasi Kitosan Suksinat sebagai Matriks pada Granul Lepas Lambat Mukoadhesif. *Skripsi*; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, Jakarta.
- Tangri, P. & Madhav, N. V. S. (2011). Oral Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *International Journal of Biopharmaceutics*; 2; 36-46.
- Zhang, Y., Argent, R. H., Letley, D. P., Thomas, R. J. & Atherton, J. C. (2005). Tyrosine Phosphorylation of CagA from Chinese *Helicobacter Pylori* Isolates in AGS Gastric Epithelial Cells. *Journal of Clinical Microbiology*; 43, 786-790.

Karakter *Solid Lipid Nano Particle* (SLN) – Ubiquinon (Q₁₀) dengan Beda Jenis Kosurfaktan: Poloxamer 188, Lesitin, Propilen Glikol

Noorma Rosita*, Qurrotu A'yunin, Esti Hendradi
Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: noorma_r@ff.unair.ac.id

Submitted: 26 April 2019

Accepted: 8 Juli 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Introduction: Ubiquinon or Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) is an unstable chemical compound against light, so it is easily degraded. Therefore, a delivery system that can improve the stability of CoQ₁₀ is needed. Solid lipid nanoparticles (SLN) are known to increase molecular stability, and have controlled release characteristics. SLN characteristics (particle size and efficiency of drug trapping), are strongly influenced by the composition of SLN constituents. **Objective:** The purpose of this study was to determine the effect of different types of co surfactants on the characteristics of SLN-CoQ₁₀. SLN-CoQ₁₀ was made with a high shear homogenization method at a speed of 24000 rpm for 2 minutes, 4 cycles. **Methods:** In this study, four formula SLN-CoQ₁₀ were made with propylene glycol (A1), poloxamer 188 (B1), lecithin (C1) as co surfactant and comparison without co surfactant (D1). **Results:** The particle diameter measurements of SLN-CoQ₁₀ produced from propylene glycol co surfactant, poloxamer 188, lecithin and those without using surfactants were 556.1 ± 4.89; 174,1 ± 6,69; 220.4 ± 12.01 and 556.8 ± 17.96 nm while the percentage of entrapment efficiency produced was 32.47 ± 6.88; 77.38 ± 8.63; 19.77 ± 5.69; and 16.09 ± 3.70% respectively. **Conclusion:** Based on the results of the characteristic evaluation, it was concluded that SLN-CoQ₁₀ made with co-surfactant poloxamer 188 had the best characteristics because it had the smallest particle size and the highest percentage of trapping efficiency compared to SLN-CoQ₁₀ with a formula using propylene co-surfactant glycol, lecithin or without co surfactant.

Keywords: solid lipid nanoparticles, coenzyme Q₁₀, co surfactant, particle size, entrapment efficiency

Abstrak

Pendahuluan: Ubiquinon atau Coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀) merupakan senyawa kimia yang tidak stabil terhadap cahaya, sehingga mudah terdegradasi. Oleh karena itu, sistem penghantaran yang bisa meningkatkan kestabilan dari CoQ₁₀ sangat dibutuhkan. *Solid lipid nanoparticles* (SLN) diketahui mampu meningkatkan stabilitas molekul, dan memiliki karakteristik pelepasan terkontrol. Karakteristik SLN (ukuran partikel dan efisiensi penjejakan obat), sangat dipengaruhi kompoen penyusun SLN. **Tujuan:** Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis kosurfaktan terhadap karakteristik SLN-CoQ₁₀. SLN-CoQ₁₀ dibuat dengan metode *high shear homogenization* pada kecepatan 24000 rpm selama 2 menit, 4 siklus. **Metode:** Pada penelitian ini dibuat empat formula SLN-CoQ₁₀ dengan propilen glikol (A1), poloxamer 188 (B1), lesitin (C1) sebagai kosurfaktan dan pembanding tanpa kosurfaktan (D1). **Hasil:** Ukuran diameter partikel SLN-CoQ₁₀ yang dihasilkan dari kosurfaktan propilen glikol, poloxamer 188, lesitin dan yang tanpa menggunakan surfaktan berturut-turut adalah: 556,1 ± 4,89; 174,1 ± 6,69; 220,4 ± 12,01 dan 556,8 ± 17,96 nm sementara itu persen efisiensi penjejakan yang dihasilkan berturut-turut adalah 32,47 ± 6,88; 77,38 ± 8,63; 19,77 ± 5,69; dan 16,09 ± 3,70 %. **Kesimpulan:** Berdasarkan hasil evaluasi karakteristik, disimpulkan bahwa SLN-CoQ₁₀ yang dibuat dengan ko-surfaktan poloxamer 188 memiliki karakteristik yang paling baik karena memiliki ukuran partikel kecil dan persen efisiensi penjejakan yang paling besar dibandingkan dengan SLN-CoQ₁₀ dengan formula yang menggunakan ko-surfaktan propilen glikol, lesitin atau yang tanpa kosurfaktan.

Kata kunci: solid lipid nanoparticles, coenzyme Q₁₀, kosurfaktan, ukuran partikel, efisiensi penjejakan

PENDAHULUAN

CoQ₁₀ adalah benzokuinon larut lipid yang memiliki 10 unit isoprenil di rantai samping dan merupakan komponen kunci dari rantai pernapasan mitokondria (Bhagavan, 2006). CoQ₁₀ disintesis secara endogen melalui jalur mevalonat dalam tubuh manusia. Dengan meningkatnya usia, sintesis CoQ₁₀ berkurang, sehingga mengakibatkan penurunan kadar CoQ₁₀ dalam plasma dan jaringan (Pardeike dkk., 2010). Untuk itu dibutuhkan suplemen CoQ₁₀ dari luar untuk mempertahankan serta mengimbangi fosforilasi oksidatif mitokondria. Sebagai antioksidan, CoQ₁₀ bekerja secara langsung dengan melindungi tubuh dari radikal bebas, sementara itu, secara tidak langsung bekerja dengan merevitalisasi antioksidan lain, serta melindungi tubuh dari stres oksidatif (Wang dkk., 2011). CoQ₁₀ merupakan senyawa kimia yang tidak stabil, khususnya terhadap cahaya, sehingga dibutuhkan sistem penghantaran yang dapat memperbaiki stabilitas CoQ₁₀ tersebut. Jianmin dkk. (2011) telah membuktikan adanya peningkatan stabilitas CoQ₁₀ dengan sistem lipid nanopartikel, salah satunya yaitu *Solid Lipid Nanoparticles* (SLN).

SLN merupakan sistem lipid koloid alternatif yang dibuat untuk beberapa rute administrasi, diantaranya parenteral, oral dan topikal (Muller dkk., 2000). SLN mampu melindungi molekul yang sensitif terhadap lingkungan, serta memiliki karakteristik pelepasan yang terkontrol (Suter dkk., 2016). Karakteristik SLN yang baik diantaranya dapat dilihat dari ukuran partikel dan efisiensi pengebakan bahan obat. Ukuran partikel SLN berkisar antara 10 - 1000 nm (Kovacevic dkk., 2011). Sedangkan untuk harga efisiensi pengebakan SLN, didapatkan dari beberapa penelitian yang telah dilakukan, adalah sekitar 40 - 100% (Chen dkk., 2013; Mappamasing dkk., 2015). Ukuran partikel dan efisiensi pengebakan ini akan berpengaruh pada pelepasan molekul dan stabilitas kimia bahan obat.

Faktor-faktor yang mempengaruhi karakteristik SLN salah satunya adalah komposisi bahan penyusun. Komposisi bahan penyusun SLN pada umumnya terdiri dari lipid, surfaktan dan kosurfaktan. Pemilihan surfaktan dan kosurfaktan penting dalam mengurangi tegangan dan energi permukaan sistem, sehingga mampu memberikan stabilitas yang baik pada formulasi (Bose dkk., 2013). Selain itu, surfaktan dan kosurfaktan juga dapat mempengaruhi sifat fisika-kimia, ukuran partikel serta efisiensi pengebakan dari sistem (Waghmare dkk., 2012). Hal tersebut disebabkan oleh perbedaan jenis maupun konsentrasi surfaktan dan kosurfaktan yang digunakan. Mistry &

Dipak (2015) membuktikan bahwa perbedaan jenis kosurfaktan yang digunakan mempengaruhi ukuran partikel yang dihasilkan. SLN-Copper dengan 20% lipid tristearin, 2% surfaktan tween 80 dan 0,4% kosurfaktan poloxamer 188 menghasilkan ukuran partikel 115,2 nm, sedangkan apabila dikombinasi dengan 0,4% kosurfaktan poloxamer 407 menghasilkan ukuran partikel 277,6 nm (Mistry & Dipak, 2015).

Penelitian ini, membandingkan pengaruh perbedaan jenis kosurfaktan: poloxamer 188, lesitin, dan propilen glikol terhadap karakteristik SLN-CoQ₁₀ dengan lipid setil palmitat, surfaktan tween 80 dan span 80. Tujuan penelitian ini adalah diperoleh karakteristik SLN Q₁₀ yang baik (ukuran partikel kecil dengan pengebakan yang tinggi). Sebagai pembanding dibuat SLN-CoQ₁₀ tanpa penambahan kosurfaktan. Ketiga bahan yang digunakan sebagai kosurfaktan memiliki perbedaan sifat fisika kimia diantaranya yaitu berat molekul, nilai *Hydrophylic Lipophylic Balance* (HLB) dan tegangan permukaan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan antara lain CoQ₁₀ (PT. Chemco Prima Mandiri, Jakarta, Indonesia), lipid setil palmitat (PT. Multi Kimia, Jakarta, Indonesia), tween 80, span 80, poloxamer 188, lesitin, propilen glikol, dapar asetat pH 5,0 ± 0,5 yang dibuat dari natrium asetat anhidrat (C₂H₃NaO₂) dan asam asetat glasial (C₂H₄O₂) pro analisis, KBr, etanol pro analisis, serta aquades bebas CO₂ yang semuanya dari PT. Brataco, Surabaya, Indonesia.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Transmission Electron Microscopy* (TEM, CM 200, Philip, Andover, MA), *Differential Thermal Analysis* (DTA), *Ultra Turrax T-18 High Shear Homogenizer*, pH meter Eutech Instruments pH 700, *Particle Analyzer Delsa™ NanoSubmicron*, X Ray Powder Diffraction (XRPD) (Philips X'Pert, Netherland), *Sentrifuge Hettich Rotofix 32*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, dua lempeng kaca berskala, neraca analitik, dan alat-alat gelas lain.

Pembuatan SLN-CoQ₁₀

Dibuat SLN-CoQ₁₀ dengan empat formula seperti yang disebutkan pada Tabel 1. SLN-CoQ₁₀ dibuat dengan melelehkan lipid setil palmitat dan surfaktan Span 80 pada suhu 60 ± 5°C menggunakan *hot plate* dan diaduk dengan *magnetic stirrer* kecepatan 700 rpm. Setelah lipid meleleh, kemudian ditambahkan CoQ₁₀. Fase air yaitu tween 80, propilen

glikol/poloxamer 188/lesitin, dan dapar asetat pH $5,0 \pm 0,5$ dipanaskan pada suhu $65 \pm 5^\circ\text{C}$ kemudian dicampurkan dengan fase minyak sambil diaduk dengan *high shear homogenizer* kecepatan 24000 rpm selama 2 menit pada suhu $60 \pm 5^\circ\text{C}$ (4 cycle). Tahap akhir adalah tahap pendinginan, yang dilakukan dengan memindahkan emulsi tersebut dari *hot plate*, kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga suhu kamar.

Tabel 1. Formula sistem SLN-CoQ₁₀

Bahan	Konsentrasi (%)			
	A	B	C	D
CoQ ₁₀	1	1	1	1
Setil palmitat	20	20	20	20
Tween 80	7,96	7,96	7,96	7,96
Span 80	12,04	12,04	12,04	12,04
Propilen glikol	10	-	-	-
Poloxamer 188	-	10	-	-
Lesitin	-	-	10	-
Dapar asetat	ad 50 g	ad 50 g	ad 50 g	ad 50 g

Karakterisasi SLN-CoQ₁₀

Morfologi partikel

Sampel diencerkan, lalu dipaparkan pada *ultrasound* selama 20 menit dan diletakkan pada lempeng Cu berlapis karbon, dan diwarnai dengan larutan asam fosfotungstat 2% kemudian lempeng tersebut dikeringkan pada suhu kamar dan diamati pada kenaikan voltase 200 kV.

Ukuran partikel dan *polydispersity index* (PI)

Sebanyak 100 mg sediaan ditambah dengan 10 ml aquades bebas CO₂, kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Dari pengenceran tersebut, diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan ke dalam 10 ml aquadest bebas CO₂. Hasil pengenceran dimasukkan ke dalam kuvet dan diperiksa dari sudut 273° pada suhu 25°C.

pH

Sebanyak 1 g sediaan ditambah dengan 9 mL aquades bebas CO₂, kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* sampai homogen. Selanjutnya elektroda dicelupkan dalam sediaan yang telah diencerkan, kemudian ditunggu sampai pH meter menunjukkan angka yang konstan.

Daya sebar

Sebanyak ± 1 g sediaan, diletakkan diatas lempeng kaca berskala mm dengan diameter 20 cm. Tutup dengan lempeng kaca penutup, bagian atas penutup diberi beban mulai dari beban terkecil hingga terbesar, kemudian diukur diameter penyebaran sediaan hingga didapatkan diameter penyebaran yang konstan.

Thermal analysis

Sampel ditimbang sebanyak 3 - 5 mg, lalu dimasukkan dalam *sample pan*, kemudian ditutup. *Sample pan* dimasukkan ke dalam *sample holder*. Sebagai *sample pan* digunakan *aluminium crucible*. Pemanasan dilakukan dengan laju 10°C/menit. Pemeriksaan suhu lebur dilakukan pada rentang 30 - 100°C. Hasil termogram yang diperoleh menunjukkan titik lebur dan entalpi (ΔH) bahan-bahan yang terdapat dalam sampel. Untuk menghitung persen indeks rekristalisasi (IR) dapat digunakan rumus:

$$\%IR = \frac{\Delta H_{SLN}}{\Delta H_{lipid} \times Cl_{lipid}} \times 100\%$$

ΔH_{SLN} merupakan entalpi dari sistem SLN, ΔH_{lipid} merupakan entalpi dari lipid yang digunakan dan Cl_{lipid} merupakan konsentrasi dari fase lipid (Hou dkk., 2003).

Pola difraksi dan keteraturan kristal

Kondisi pengukuran sebagai berikut: target logam Cu, filter $\text{K}\alpha$, voltase 40 kV, dan arus 40 mA. Analisis dilakukan pada rentang 2 θ 5 - 50°C. Sampel diletakkan pada *sample holder* dan diratakan untuk mencegah orientasi partikel selama penyimpanan sampel.

Efisiensi penjejakan

SLN-CoQ₁₀ sebanyak 100 mg diencerkan dengan etanol pro analisis hingga 10,0 mL kemudian disentrifus 1500 rpm selama 5 menit dan disaring menggunakan kertas saring *millipore* Whatman 0,22 μm . Supernatan dipipet 0,5 mL, dan ditambah etanol pro analisis hingga 5,0 mL. Kemudian larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum CoQ₁₀ (272 nm) yang kemudian dibandingkan dengan serapan larutan baku CoQ₁₀ yang telah diketahui kadarnya. Kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi obat bebas pada fase air dispersi SLN. Blanko yang digunakan adalah sistem SLN-base yang dipreparasi sesuai dengan sampel uji. Selanjutnya dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%EP = \frac{C_t - C_f}{C_t} \times 100\%$$

C_t merupakan kadar awal CoQ₁₀ dalam sistem SLN, sedangkan C_f merupakan kadar CoQ₁₀ yang tidak terjebak dalam sistem SLN.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi SLN-CoQ₁₀

Morfologi partikel

Pemeriksaan morfologi partikel ditujukan untuk mengetahui distribusi dan bentuk atau karakter partikel. Bentuk partikel ini mempengaruhi lapisan film yang terbentuk. Partikel sferis akan menghasilkan

bentukan lapisan film yang baik karena jarak yang dihasilkan antar partikel lebih kecil dan rapat (Wissing dkk., 2004).

Transmission Electron Microscopy (TEM) merupakan metode untuk mengetahui karakteristik morfologi partikel dan mikrostruktur seperti misel, kristalin, gelembung, emulsi, serta nanopartikel (Hou dkk., 2003).

Ukuran partikel dan *polydispersity index* (PDI)

Pemeriksaan ukuran diameter partikel dan distribusi ukuran partikel yang lebih dikenal sebagai *Polydispersity Index* (PDI) SLN-CoQ₁₀ dengan tiga kombinasi kosurfaktan yang berbeda yaitu, propilen glikol, poloxamer 188, lesitin, dan pembanding tanpa kosurfaktan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan ukuran diameter partikel (d) dan *Polydispersity Index* (PDI) SLN-CoQ₁₀

Formula	d rata-rata (nm) ± SB	PDI rata-rata ± SB
A	556,1 ± 4,89	0,247 ± 0,03
B ^{*)}	174,1 ± 6,69	0,111 ± 0,01
C	220,4 ± 12,01	0,199 ± 0,05
D	556,8 ± 17,96	0,251 ± 0,01

^{*)}Berbeda secara bermakna Berdasarkan hasil analisis statistik ANOVA satu arah didapatkan nilai sig (0,000 < 0,05)

Ukuran partikel merupakan hal yang penting dalam formulasi SLN (Svilenov & Tzachev, 2014). Umumnya dengan adanya pemanasan pada proses pembuatan menyebabkan viskositas menurun dan menghasilkan ukuran partikel yang lebih kecil. Sementara itu, jumlah bahan aktif yang terjebak pada lipid dapat memicu peningkatan ukuran partikel (Uner, 2006).

Pada pemeriksaan ukuran diameter partikel SLN-CoQ₁₀ didapatkan hasil bahwa semua sediaan memenuhi rentang ukuran sistem lipid nanopartikel yaitu 10 sampai 1000 nm (Hou dkk., 2003). Ukuran partikel dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya berat molekul, viskositas dan tegangan permukaan bahan (Martins dkk., 2012).

Dalam penelitian ini, poloxamer 188 mampu menghasilkan ukuran diameter partikel lebih kecil dibandingkan dengan kosurfaktan yang lain. Hal tersebut diduga karena nilai HLB yang cukup besar yaitu 29, sehingga bekerja lebih efektif pada fase air yang merupakan fase luar sistem. Droplet yang dilingkupi oleh poloxamer 188 menjadi lebih sulit untuk saling bergabung, sehingga sistem menjadi lebih stabil. Selain itu, tegangan permukaan poloxamer 188

lebih kecil dibandingkan tegangan permukaan kosurfaktan yang lain, hal tersebut juga menyebabkan ukuran diameter partikel yang dihasilkan menjadi lebih kecil (Sweetman, 2009). Lesitin menghasilkan ukuran diameter partikel yang lebih kecil jika dibandingkan dengan propilen glikol. Lesitin mempunyai fungsi sebagai surfaktan, sedangkan propilen glikol hanya sebagai kosurfaktan, diduga kemampuan lesitin dalam menurunkan tegangan permukaan sistem lebih besar dibandingkan dengan propilen glikol, sehingga mampu menghasilkan ukuran diameter partikel yang lebih kecil.

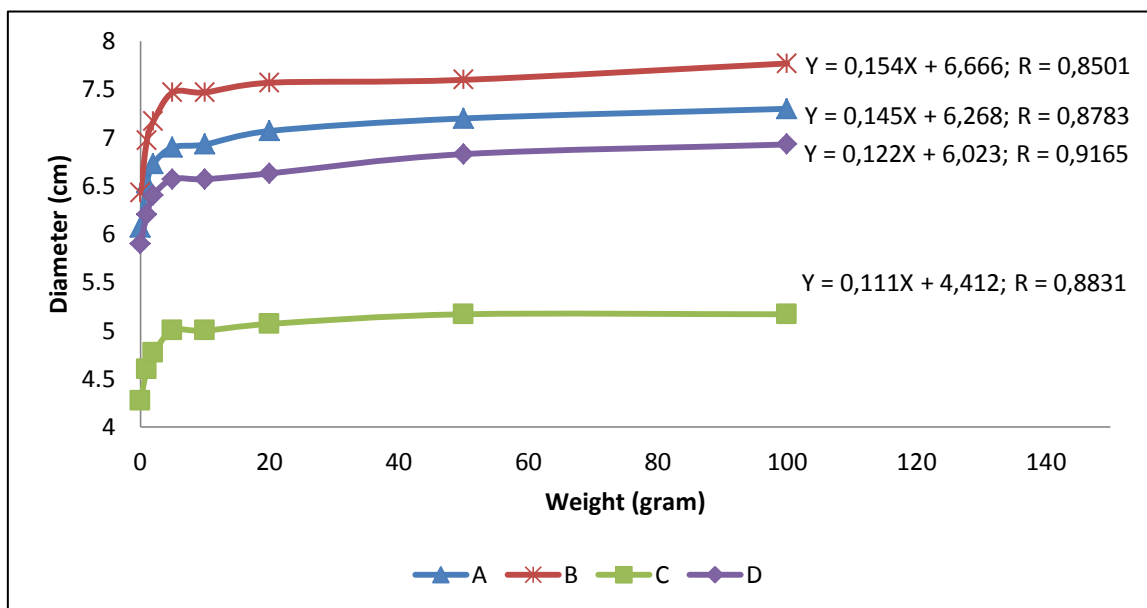
Sedangkan berdasar hasil pemeriksaan PDI dapat disimpulkan bahwa keempat formula SLN-CoQ₁₀ menghasilkan distribusi ukuran diameter partikel yang homogen, ditunjukkan dengan nilai PDI kurang dari 0,3 (Das & Chaundhury, 2011). Nilai PDI yang mendekati angka 0 menunjukkan ukuran partikel yang homogen, sedangkan nilai PDI lebih dari 0,3 menunjukkan partikel yang heterogen (Pegi dkk., 2011).

pH

Berdasarkan hasil pengukuran pH SLN-CoQ₁₀ disimpulkan bahwa semua pH sediaan memenuhi pH spesifikasi yaitu semua berada pada rentang 5,0 ± 0,5, artinya berada dalam rentang pH kulit yaitu 4,0 - 6,8 (Barry, 1983), sehingga aman untuk digunakan. Penggunaan sediaan dengan pH yang berbeda jauh dengan pH kulit dapat menyebabkan masalah pada kulit, dimana penggunaan sediaan dengan pH yang terlalu asam dapat menyebabkan iritasi kulit sedangkan penggunaan sediaan dengan pH yang terlalu basa dapat merusak mantel asam kulit. Nilai pH yang relatif sama antar formula disebabkan ketiga jenis kosurfaktan yang berbeda tersebut semuanya relative tidak mempengaruhi pH.

Daya sebar

Penentuan daya sebar dilakukan untuk mengetahui kapasitas penyebaran dari sediaan. Selain itu, dilakukannya uji daya sebar dapat digunakan untuk menggambarkan viskositas dari sediaan. Semakin besar diameter penyebaran suatu sediaan, semakin kecil viskositas sediaan tersebut. Dari hasil pemeriksaan daya sebar pada Gambar 1, dapat disimpulkan bahwa formula SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan poloxamer 188 memiliki daya penyebaran paling besar dan formula SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan lesitin memiliki daya penyebaran paling kecil. Hal tersebut dapat dilihat dari harga *slope* persamaan garis yang dihasilkan.



Gambar 1. Kurva hasil pemeriksaan daya sebar SLN-CoQ₁₀

Efisiensi penjebakan

Efisiensi penjebakan digunakan untuk mengetahui seberapa besar persentase bahan aktif yang terjebak di dalam sistem. Penentuan persen efisiensi penjebakan pada penelitian ini dilakukan dengan metode sentrifugasi. Metode lain yang dapat digunakan yaitu metode dialisis dan gel filtrasi (Misra dkk., 2004).

Hasil pengukuran efisiensi penjebakan formula SLN-CoQ₁₀ dengan tiga kombinasi kosurfaktan yang berbeda yaitu, propilen glikol, poloxamer 188, lesitin, dan pembanding tanpa kosurfaktan, didapatkan rata-rata efisiensi penjebakan seperti yang disebutkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan efisiensi penjebakan SLN-CoQ₁₀

Formula	Rata-rata Efisiensi Penjebakan (%) ± SB
A	32,47 ± 6,88
B ^{*)}	77,38 ± 8,63
C	19,77 ± 5,69
D	16,09 ± 3,70

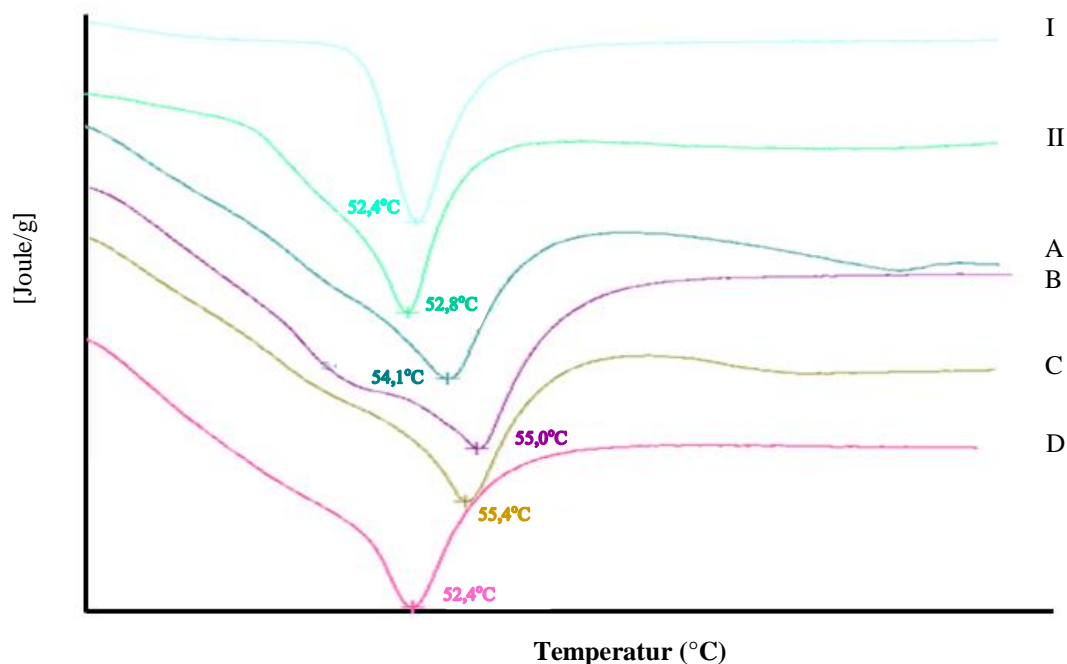
^{*)}Berbeda secara bermakna Berdasarkan hasil analisis statistik ANOVA satu arah didapatkan nilai signifikansi (0,000 < 0,05)

Terdapat perbedaan bermakna antara formula poloxamer 188 (B) dengan formula lainnya, dimana

formula B memiliki efisiensi penjebakan paling besar. Efisiensi penjebakan dipengaruhi oleh berbagai faktor diantaranya keteraturan kristal matriks inti dan kelarutan bahan aktif di dalam matriks inti. Dalam hal ini, kosurfaktan poloxamer 188 mampu menjebak CoQ₁₀ lebih banyak diduga karena kelarutan bahan aktif dalam matriks inti lebih besar dibandingkan dengan formula lain. Selain itu, ukuran partikel kecil yang dihasilkan formula SLN-CoQ₁₀ diduga mendukung hasil efisiensi penjebakan yang besar. Semakin kecil ukuran partikel menyebabkan luas permukaan semakin besar sehingga kontak dengan bahan aktif CoQ₁₀ juga semakin besar.

Thermal analysis

Kristalisasi dan polimorfisme juga dipengaruhi oleh suhu lebur. Berdasarkan hasil pemeriksaan suhu lebur pada Gambar 2, termogram yang dihasilkan menunjukkan suhu lebur setil palmitat 52,4°C. Pada pemeriksaan formula SLN-CoQ₁₀ terjadi pergeseran puncak endotermik dibandingkan dengan setil palmitat. Hal tersebut disebabkan karena adanya perbedaan komposisi antara setil palmitat tunggal dan formula SLN-CoQ₁₀. Pada umumnya pencampuran dua bahan akan menyebabkan penurunan suhu lebur karena menurunnya keteraturan kristal (Brittain, 2009).



Gambar 2. Hasil overlay termogram setil palmitat (I), CoQ₁₀ (II), SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan propilen glikol (A1), poloxamer 188 (B1), lesitin (C1) dan tanpa kosurfaktan (D1)

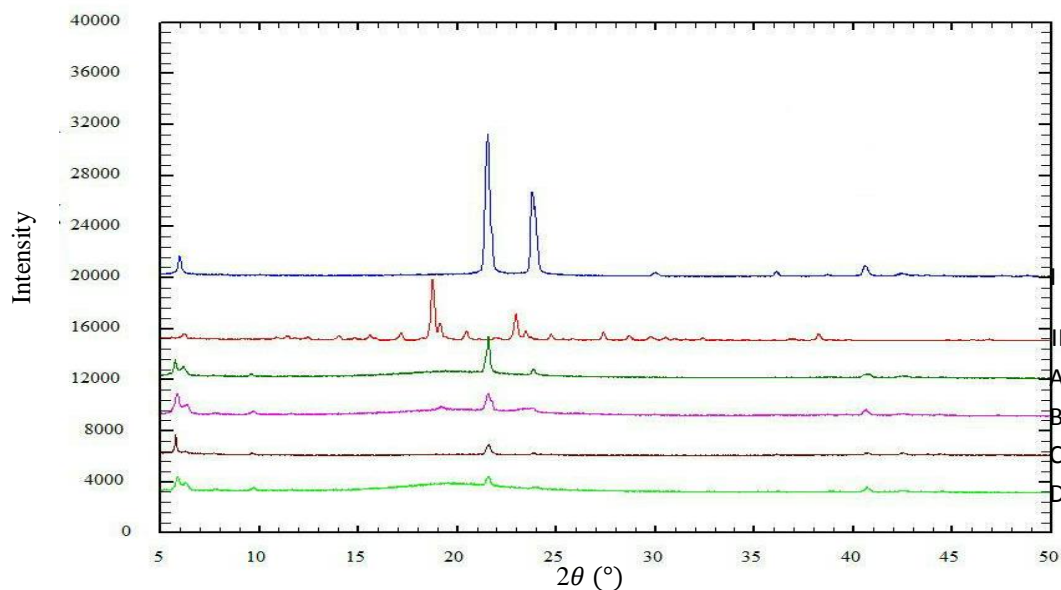
Berdasarkan hasil pemeriksaan didapatkan hasil bahwa formula SLN-CoQ₁₀ memiliki suhu lebur lebih tinggi dibandingkan dengan suhu lebur setil palmitat. Hal ini dapat disebabkan karena pada formula SLN-CoQ₁₀ tidak menggunakan kombinasi lipid, baik lipid cair maupun lipid padat yang dapat mengganggu struktur matriks atau keteraturan kristal (Hendradi dkk., 2017). Semakin tinggi suhu lebur maka semakin besar pula indeks rekristalisasinya. Parameter suhu lebur, entalpi dan persen indeks rekristalisasi (IR) dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Parameter suhu lebur, entalpi dan persen indeks rekristalisasi (IR)

Sampel	Suhu lebur (°C)	ΔH (J/g)	% IR
Setil palmitat	52,4	97,7	-
CoQ ₁₀	52,8	96,5	-
A‡	54,1	157	8,03
B‡	55,0	225	11,51
C‡	55,4	166	8,50
D‡	52,4	107	5,48

Pola difraksi dan keteraturan kristal

Penentuan pola difraksi dan keteraturan kristal dapat digunakan untuk mendukung data hasil efisiensi penjebakan. Hasil penentuan pola difraksi keempat formula SLN-CoQ₁₀ pada Gambar 3, memiliki pola yang mirip dengan pola difraksi lipid setil palmitat tunggal. Berdasarkan hasil pemeriksaan pola difraksi diketahui bahwa intensitas difraksi utama lipid setil palmitat pada sudut 2θ 21,54°, mengalami penurunan pada keempat formula SLN-CoQ₁₀. Hal tersebut menunjukkan bahwa ada penurunan keteraturan kisi kristal pada masing-masing formula jika dibandingkan dengan difraksi lipid setil palmitat tunggal. Keteraturan kisi kristal berhubungan dengan kemampuan lipid dalam menjebak bahan obat. Pada lingkungan dengan keteraturan kisi kristal yang tinggi membuat obat lebih mudah untuk terekspulsi keluar. Hal tersebut menyebabkan penjebakan obat menjadi kecil (Rosita dkk., 2014).



Gambar 3. Hasil perbandingan pola difraksi setil palmitat (I), CoQ₁₀ (II), SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan propilen glikol (A1), poloxamer 188 (B1), lesitin (C1) dan tanpa kosurfaktan (D1) pada rentang sudut 2θ 5-50°

Pada hasil termogram (Gambar 2) dan difraktogram (Gambar 3) tidak didapatkan puncak CoQ₁₀ pada formula SLN-CoQ₁₀. Hal tersebut mengindikasikan bahwa bahan aktif CoQ₁₀ sudah terjebak di dalam sistem SLN (Teeranachaideekul dkk., 2007).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil karakterisasi sistem SLN-CoQ₁₀ dengan perbedaan jenis kosurfaktan dapat disimpulkan bahwa perbedaan jenis kosurfaktan yang digunakan mempengaruhi karakteristik sistem meliputi ukuran partikel dan efisiensi pengebakan. Ukuran partikel terkecil hingga terbesar berturut-turut dihasilkan oleh SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan poloxamer 188, lesitin, propilen glikol, dan pembanding tanpa kosurfaktan. Sedangkan untuk efisiensi pengebakan terbesar hingga terkecil berturut-turut dihasilkan oleh SLN-CoQ₁₀ dengan kosurfaktan poloxamer 188, propilen glikol, lesitin dan pembanding tanpa kosurfaktan.

DAFTAR PUSTAKA

Barry, B. W. (1983). *Dermatological Formulation Percutaneous Absorption*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Bhagavan, H. N. & Chopra, R. K. (2006). Coenzyme Q₁₀: Absorption, Tissue Uptake, Metabolism and Pharmacokinetics. *Free Radical Research*; 40; 445–53.

Bose, S., Du, Y., Takhistov, P. & Michniak-Kohn, B. (2013). Formulation Optimization and Topical Delivery of Quercetin from Solid Lipid Based Nanosystems. *International Journal of Pharmaceutics*; 441; 56-66.

Brittain, C. G. (2009). *Using Melting Point to Determine Purity of Crystalline Solids*. http://www.chm.uri.edu/mmcgregor/chm228/use_of_melting_point_apparatus.pdf. Accessed: 26 Juli 2017.

Chen, S., Wei, L., Jiangling, W., Xin, C., Conghui G., Hui Z., Shan, C., Xiaojing, Z., Yuxiang, T. & Xiangliang, Y. (2013). Preparation of Coenzyme Q₁₀ Nanostructured Lipid Carriers for Epidermal Targeting with High-pressure Microfluidics Technique. *Drug Development and Industrial Pharmacy*; 39; 20-28.

Das, S. & Chaundhury, A. (2011). Recent Advantages in Lipid Nanoparticle Formulations with Solid Matrix for Oral Drug Delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists*; 12; 62-76.

Hendrardi, E., Primaharinastiti, R. & Putranti, A. R. (2017). Effectivity and Physicochemical Stability of Nanostructured Lipid Carrier Coenzyme Q10 in Different Ratio of Lipid Cetyl Palmitate and Alpha Tocopheryl Acetate as Carrier. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*; 10; 146-152.

- Hou, D., Xie, C., Huang, K. & Zhu, C. (2003). The Production and Characteristics of Solid Lipid Nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*; 24; 1781-1785.
- Jianmin, W., Yan, L., Hongxia, W., Xueyang, D., Hengfeng, F., Guoqing, L. & Qiang, X. (2011). Antioxidative Activity Evaluation of CoQ₁₀-Nanostructured Lipid Carrier. *Advanced Materials Research*; 284; 989-992.
- Kovacevic, A., Savia, S., Vuleta, G., Muller, R. H. & Keck, C. M. (2011). Polyhydroxy Surfactants for the Formulation of Lipid Nanoparticles (SLN and NLC): Effects on Size, Physical Stability and Particle Matrix Structure. *International Journal of Pharmaceutics*; 406; 163-172.
- Mappamasing, F., Anwar, E., Mun'im, A. (2015). Formulation, Characterization and In Vitro Penetration Study of Resveratrol Solid Lipid Nanoparticles in Topical Cream. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*; 13; 137-144.
- Martins, S., Tho, I., Souto, E., Ferreira, D. & Brandl, M. (2012). Multivariate Design for the Evaluation of Lipid and Surfactant Composition Effect for Optimisation of Lipid Nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; 45; 613-623.
- Misra, A., Kalariya, M., Padhi, B. K. & Chougule, M. (2004). Methotrexate Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Topical Treatment of Psoriasis: Formulation & Clinical Implication. *Drug Delivery Technology*; 13; 14-19.
- Mistry, K. R. & Dipak, K. S. (2015). SLNs can Serve as the New Brachytherapy Seed: Determining Influence of Surfactants on Particle Size of Solid Lipid Microparticles and Development of Hydrophobised Copper Nanoparticles for Potential Insertion. *Journal of Chemical Engineering & Process Technology*; 7; 1-9.
- Muller, R. H., Mäder, K. & Gohla, S. (2000). Solid Lipid Nanoparticles (SLN) for Controlled Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 50; 161-177.
- Pardeike, J., Schwabe, K. & Müller, R. H. (2010). Influence of Nanostructured Lipid Carriers (NLC) on the Physical Properties of the Cutanova Nanorepair Q₁₀ Cream and the In Vivo Skin Hydration Effect. *International Journal of Pharmaceutics*; 396; 166-173.
- Pegi, A. G., Alenka, Z., Julijana, K., Polona, J. & Janez, K. (2011). Preparation of Nanoparticles by Using a Vibrating Nozzle Device. US: Patent Application.
- Rosita, N., Setyawan, D., Soeratri, W. & Martodihardjo, S. (2014). Physical Characterization of Beeswax and Glyceryl Monostearat Binary System to Predict Characteristics of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Loaded Para Methoxy Cinnamic Acid (PMCA). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 6; 939-945.
- Suter, F., Schmid, D., Wandrey, F. & Züllli, F. (2016). Heptapeptide-loaded Solid Lipid Nanoparticles for Cosmetic Anti-Aging Applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 108; 304-309.
- Svilenov, H. & Tzachev, C. (2014). Solid Lipid Nanoparticles - A Promising Drug Delivery System: *Nanomedicine*. Bulgaria: Sofia University.
- Sweetman, S. (2009). Martindale The Complete Drug Reference 36th edition. London: Pharmaceutical Press.
- Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Junyaprasert, V. B. & Muller, R. H. (2007). Cetyl Palmitate-based NLC for Topical Delivery of Coenzyme Q₁₀ - Development, Physicochemical Characterization and In Vitro Release Studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*; 67; 141-148.
- Uner, M. (2006). Preparation, Characterization and Physicochemical of Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC): Their Benefits as Colloidal Drug Carrier Systems. *Pharmazie*; 61; 375-86.
- Waghmare, S., Grampurohit, N., Gadhave, M., Gaikwad, D. & Jadhav, S. (2012). SLN: A Promising Drug Delivery System. *International Research Journal of Pharmacy*; 3; 100-107.
- Wang, J., Wang, H., Zhou, X., Tang, Z., Guoqing, Z., Guangyu, L. & Xia, Q. (2011). Physicochemical Characterization, Photo-stability, and Cytotoxicity of Coenzyme Q₁₀-loading NLC. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*; 12; 2136-2148.
- Wissing, S. A., Yener, G., Muller, R. H. (2004). Influence of Surfactants on the Physical Stability of Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Formulations. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*; 59; 331-332.

Inhibitory Activity of Levofloxacin against MDR *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates

Lisa Nathalie¹, Lindawati Alimsardjono², Isnaeni^{1*}

¹Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding Author: isnaeni@ff.unair.ac.id

Submitted: 29 April 2019

Accepted: 25 Juli 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Introduction: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* are the most dangerous and important species among their genus. These bacteria are often resistant to many classes of antimicrobial agents; which make difficulties in selecting appropriate drug to treat infections. Multidrug-resistance occurs readily in hospitals for which antimicrobials agents were used widely. **Objective:** The aims of this study was to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bacterial concentration (MBC) of levofloxacin against 22 multidrug resistant- clinical (MDR) strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients pus and urine in hospital. **Methods:** Determination of the MIC was performed by macro-dilution broth assay as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), while the MBC was determined one-step further after the MIC determination. **Results:** It was found that MIC of the levofloxacin were $(0.3 \pm 0.0) - >0.5 \mu\text{g/mL}$ and $(0.2 \pm 0.1) - (1.0 \pm 0.0) \mu\text{g/mL}$ against *S. aureus* from pus and urine, respectively. In addition, higher MICs were yielded against *P. aeruginosa*, $(1.0 \pm 0.0) - >8.0 \mu\text{g/mL}$ and $(0.7 \pm 0.3) - (3.0 \pm 1.2) \mu\text{g/mL}$ for pus and urine isolates respectively. Similar to MICs, the MBCs against *P. aeruginosa* were higher than *S. aureus*, $(0.6 \pm 0.0) - > 4.0 \mu\text{g/mL}$ and $(0.3 \pm 0.0) - >8.0 \mu\text{g/mL}$ isolated from pus and urine respectively, $(2.0 \pm 0.6) - > 8.0 \mu\text{g/mL}$ and $(3.0 \pm 1.2) - >7.0 \mu\text{g/mL}$ against *P. aeruginosa* from pus and urine respectively. **Conclusion:** The levofloxacin was still susceptible as bacteriostatic against isolates from both body fluids, but not bactericidal towards all isolates.

Keywords: levofloxacin, MDR, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus and *Pseudomonas aeruginosa* are the most dangerous and important species among their genus (Forbes *et. al.*, 2002; Kiska & Gilligan, 2003). These bacteria are often resistant to enormous classes of antimicrobial agents; which make difficulties in selecting appropriate drug to treat infections (MacDougall *et. al.*, 2005). Multidrug-resistance occurs readily in hospitals as a place where antimicrobial used widely. Susceptibility test in pus and urine isolates at Dr. Soetomo General Hospital Surabaya (DSGHS) from August 2005 to February 2006 showed that 74.1% of *S. aureus* isolates (n = 85) and 95.9% *P. aeruginosa* isolates (n = 222) were

MDR-isolates. The MDR is defined as resistance against at least two antimicrobial agents from different class.

Fluoroquinolone is derived from quinolone contains fluorin on the sixth carbon atom (C-6) of quinolone structure (Yao & Moellering, 2003). The fluoroquinolone is widely used and prescribed for more than 11% (Gilbert, 2001). Levofloxacin, one of quinolone new generation and an optical isomer of ofloxacin is widely used in clinical practice due to safety and efficacy. The antibiotic is also known to have highly effectiveness against *S. aureus* and less likely to cause resistance compared to older quinolones (Evans & Titlow, 1998). Study on

evaluation of the utility of various commonly used fluoroquinolones against 250 clinical isolates of *S. aureus* showed that among the fluoroquinolones, maximum resistance in methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). There was seen to ciprofloxacin (92.5%), followed by ofloxacin (80.4%), no reports on the levofloxacin (Gade and Oazi, 2013). Muller *et. al.* (1999) proved the superior activity of levofloxacin over that of ofloxacin against methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

Disk diffusion test of levofloxacin against *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolates from pus and urine in DSGHS for 7 months (August 2005 to February 2006) indicated that 1.56% (n = 64) *S. aureus* and 42.76% (n = 145) *P. aeruginosa* isolates were resistant against this drug. In this research, the MIC and MBC of levofloxacin against MDR-isolates of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were studied to be aware of possible changes in levofloxacin activity since sensitivity test has not been done after February 2006. The isolates were hypothesized susceptible against levofloxacin.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Levofloxacin was synthesized in Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Stock solution of levofloxacin was prepared at concentration of 100 µg/mL, and dissolved in sterile water. This solution was diluted in sterile water to achieve 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 8 µg/mL of the antimicrobial solution.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as standard strains. Isolate of bacterial test were obtained from pus and urine in DSGHS. Selected strains for the MIC and MBC determination should meet the criteria of being resistant toward minimal two antimicrobial agents from different classes. The sample size was determined using Stein's-Two Stage Sample, yielding 11 isolates of *S. aureus* and *P. aeruginosa*, each (Ostle & Mensing, 1975; Steel & Torrie, 1981). Müller Hinton Broth (MHB, Oxoid, England) was used as the test medium for MIC determination and nutrient agar (Oxoid, England) was used as medium for inoculum preparation and MBC determination.

Methods

Sample collection

Samples were obtained from pus and urine patients from DSGHS identified as MDR strains based on

retrospective study. The number of test samples was calculated based on Stein's Two-Stage Sample method, in which the determination of the minimum inhibitory levels of several isolates, calculated the average value and standard deviation of each isolate, then the remaining isolates were determined by matching the D value, the comparison between the results experiments with results that were considered to have a significant effect (δ) with a standard deviation (σ) at the level of α (significance or probability of making type I errors) and β (probability of making type II errors) that have been determined at the beginning of the study (Ostle & Mensing, 1975; Steel & Torrie, 1981). This study used a value of $\alpha = 0.05$ and $\beta = 0.10$.

Inoculum preparation

Cultures of *S. aureus* and *P. aeruginosa* were grown on non-selective media (nutrient agar) and incubated overnight. A total of 4 - 5 colonies were taken with Öse needle then made suspensions in MHB media. Turbidity level was adjusted with 0.5 McFarland solutions by adding liquid media or adding bacterial colonies (Jorgensen & Turnidge, 2003).

Minimum inhibitory concentration (MIC) Determination

The MIC was determined by the macro dilution assay in Müller Hinton Broth. Direct colony suspension method was used for inoculum preparation using nutrient agar as a medium. The macro dilution assays were performed using ten sterile 16 x 100-mm test tubes containing serial twofold dilutions of each diluted antimicrobial agent. The final inoculum prepared from logarithmic-phase bacteria was 5×10^3 CFU/mL. The MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobial agent which completely inhibited visible bacterial growth in the tubes as detected by unaided eyes (CLSI, 2006).

Minimum bacterial concentration (MBC) determination

Determining MICs was followed by MBC determination. An aliquot from each tube in the dilution series exhibited bacterial inhibition was sub-cultured into nutrient agar. After an overnight incubation (18 - 20 hours), the colonies on plates were counted. The MBC is defined as the lowest antimicrobial concentration which inhibits 99.9% bacterial growth compared to bacterial concentration in the original inoculum. Forbes *et. al.* (2002) defined the MBC as the antimicrobial concentration inhibits 100% bacterial growth on the plate.

Analysis of data

The MIC and MBC values of each strain were determined based on the serial dilution (Figure 1) method. The observation results were used to determine levofloxacin activity profiles against these two bacteria. These values were determined thrice and the mean values were determined as the MIC or MBC. The lowest concentration of levofloxacin which completely inhibited visible bacterial growth in the tubes as detected by visible observation denoted as

MIC. The inhibitory concentration by which 100% of bacterial growth on the plate was inhibited denoted as MBC.

In vitro resistance of *S. aureus* toward levofloxacin is defined as MIC \geq 4 $\mu\text{g/mL}$, MIC = 2 $\mu\text{g/mL}$ for intermediate, and MIC \leq 1 $\mu\text{g/mL}$ for susceptibility border. Whilst resistance of *P. aeruginosa* to levofloxacin is defined as MIC of \geq 8 $\mu\text{g/mL}$, MIC = 4 $\mu\text{g/mL}$ for intermediate, and MIC \leq 2 $\mu\text{g/mL}$ for susceptibility border (CLSI, 2006).

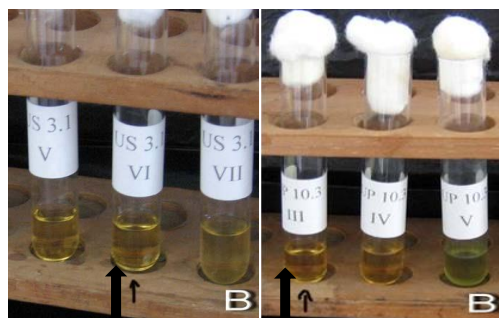


Figure 1. Observation of MIC (\rightarrow) using serial dilution test
 S = *Staphylococcus aureus*, P = *Pseudomonas aeruginosa*

RESULTS AND DISCUSSION

The disk diffusion susceptibility test performed towards 22 selected isolates used in this study. Wholly *S. aureus* showed methicillin-susceptible *S.*

aureus (MSSA). All isolates from both body fluid showed resistance against more than two antibiotics classes (Table 1 and Table 2).

Table 1. In vitro activity of levofloxacin against *Staphylococcus aureus* pus isolates (Retrospective study)

Isolate Code	Resistant	Susceptible
SP 1	PEN, CHL	MET, NVB, SXT, GEN, NET, VAN, NIT, FOF, CLI, ERY, CFP-SUL, TET
SP 2	PEN, ERY, CLI, TET	MET, NVB, CHL, NIT, GEN, FOF, CFP-SUL, GAT, VAN, NET
SP 3	PEN, TET	MET, NVB, CLI, SXT, ERY, GEN, CFP-SUL, VAN, CHL, FOF
SP 4	PEN, NIT ^a	MET, NVB, FOF, NET, GEN, VAN, CHL, SXT, CLI, TET, CFP-SUL, ERY
SP 5	PEN, CHL, TET	MET, NVB, NIT, VAN, CFP-SUL, SXT, FOF, ERY, NET, CLI
SP 6	PEN, TET	MET, NVB, CHL, SXT, FOF, GEN, ERY, VAN, CXM, CFP-SUL, CLI, NIT, NET
SP 7	PEN, SXT, CHL, ERY, NIT (I) ^a	MET, NVB, VAN, CFP-SUL, CLI, TET, NET

^a: intermediate, SP: *S. aureus* collected from pus

Table 2. In vitro activity of levofloxacin against *Staphylococcus aureus* urine isolates (Retrospective study)

Isolate Code	Resistant	Susceptible
SU 1	PEN, TET	MET, NVB, ERY, SXT, VAN, GAT, NIT, CHL, NET, MEM, GEN, FOF, CFP-SUL, CLI
SU 2	PEN, ERY	MET, NVB, NET, NIT, CFP-SUL, GAT, FOF, GEN, CLI, VAN, SXT, TET, CHL
SU 3	PEN, CHL ^a , NET ^a , GEN, TET, CLI ^a	MET, NVB, ERY, VAN, NIT, GAT, FOF, CFP-SUL
SU 4	CLI, SXT, GEN ^a	MET, NVB, VAN, TET, FOF, NIT, ERY, CHL, CFP-SUL

SU: *S. aureus* collected from urine

The susceptibility test has not been conducted by levofloxacin since February 2006. The levofloxacin activity assay was performed by using MIC and MBC parameters. The MIC of levofloxacin against *S. aureus* isolated from pus (0.3 ± 0.0) - > 0.5 $\mu\text{g/mL}$

showed less susceptible compare to urine isolates (0.2 ± 0.1) - (1.0 ± 0.0) $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). The five of seven pus isolates (bacterial isolated from pus) (71.4%) and all four urine isolates are susceptible (Table 4).

Table 3. In vitro activity of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* pus isolates (Retrospective study)

Isolate Code	Resistant	Susceptible
PP 1	AMK (I), NET, CIP, SXT, CTX, AMP, GAT, GEN, AMC	CAZ, CFP-SUL, MEM, FEP, FOF, TZP, ATM
PP 2	GEN (I), SXT, AMC, AMP	GAT, FEP, TZP, ATM, NET, CIP, CFP-SUL, FOF, CTX, CAZ, AMK, MEM
PP 3	AMP, FOF (I), AMC, SXT	CAZ, MEM, FEP, CFP-SUL, GAT, NET, CTX, AMK, CIP, TZP
PP 4	AMC, AMP, SXT, CTX (I)	FOF, CFP-SUL, NET, CAZ, FEP, TZP, MEM, CIP, ATM, GEN, GAT, AMK
PP 5	FOF, SXT, AMC, CTX	CFP-SUL, CIP, TZP, NET, CFP-SUL, C, GEN, DA, SXT, VAN, ERY
PP 6	FOF (I), AMP, AMC, SXT	MEM, CIP, CTX, FEP, TZP, ATM, AMK, NET, GEN, CAZ, CFP-SUL
PP 7	AMC, AMP, SXT	CFP-SUL, AMK, MEM, FEP, GAT, FOF, CIP, NET, CAZ, TZP, CTX, GEN, ATM

PP = *P. aeruginosa* collected from pus

Table 4. In vitro activity of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* urine isolates (Retrospective study)

Isolate Code	Resistant	Susceptible
PU 1	SXT, AMC	CAZ, AMK, TZP, ATM, CFP-SUL, FOF, MEM, NET, GEN, CIP, FEP, CTX,
PU 2	AMC, SXT, CTX (I)	ATM, FEP, MEM, CAZ, GEN, AMK, GAT, TZP, CFP-SUL, FOF, NET, CIP
PU 3	AMC, CTX(I), SXT, FOF (I)	CAZ, GAT, CFP-SUL, ATM, AMK, TZP, FEP, NET, GEN, CIP, MEM
PU 4	SXT, AMC, CTX	CAZ, NET, ATM, GEN, MEM, FEP, AMK, CIP, TZP, FOF, CFP-SUL

PU = *P. aeruginosa* collected from urine

AMK: Amikacin; AMC: Amoxicilin-clavulanic acid; AML: Ampicillin; ATM: Aztreonam; C: chloramphenicol; CAZ: ceftazidime; CIP: ciprofloxacin; GEN: Gentamicin; CTX: cefotaxime; CXM: cefuroxime; DA: Clindamycin; F: Nitrofurantoin; FEP: Cefepime; FOF: Fosfomycin; GAT: Gatifloxacin; LEV: Levofloxacin; MEM: meropenem; MET: methicillin; NET: Netilmicin; NV: novobiocin; P: Penicillin; CFP-SUL: cefoperazone-sulbactam; SXT: cotrimoxazole; TE: tetracycline; TZP: piperacillin-tazobactam; VAN: vancomysin; ERY: erythromycin

The MBC values against pus isolates against *S. aureus* (2.0 ± 0.6) - > 8.0 $\mu\text{g/mL}$ were also lower than MBC against urine isolates, (3.0 ± 1.2) - > 7.0 $\mu\text{g/mL}$ (Table 5 and Table 6). Research done by Muller *et. al.* (1999) on the serum bactericidal activity (SBA) of

levofloxacin used 10 healthy volunteers collected after a single oral dose of either levofloxacin (500 mg) or ofloxacin (400 mg) indicated that the levofloxacin was significantly more bactericidal than ofloxacin against all strains of *S. aureus* tested.

Table 5. In vitro MIC and MBC of levofloxacin against *Staphylococcus aureus* pus isolates

Isolate Code	MIC ± SD (µg/mL)	MBC ± SD (µg/mL)	MBC/MIC ratio	Note
Standard strain	2.0 ± 0.0	> 7.0	>3.5	Not bactericidal
SP 1	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0	2	Bactericidal
SP 2	1.0 ± 0.8	2.0 ± 0.9	2	Bactericidal
SP 3	1.0 ± 0.6	> 4.0	>4	Not Bactericidal
SP 4	> 0.5	> 1.0	>2	Not Bactericidal
SP 5	0.5 ± 0.0	1.0 ± 0.6	2	Bactericidal
SP 6	0.5 ± 0.0	4.0 ± 3.5	8	Not Bactericidal
SP 7	3.3 ± 1.2	3.0 ± 1.2	0.9	Bactericidal

Table 6. In vitro MIC and MBC of levofloxacin against *Staphylococcus aureus* urine isolates

Isolate Code	MIC ± SD (µg/mL)	MBC ± SD (µg/mL)	MBC/MIC ratio	Note
Standard strain	2.0 ± 0.0	> 7.0	>3.5	Not bactericidal
SU 1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	1.5	Bactericidal
SU 2	0.3 ± 0.0	> 8.0	26.7	Not Bactericidal
SU 3	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.3	1.1	Bactericidal
SU 4	1.0 ± 0.0	> 8.0	>8	Not Bactericidal

Based on the data analysis, it could be concluded that in vitro susceptibility of *S. aureus* against levofloxacin was better than *P. aeruginosa*. Higher MICs were yielded against *P. aeruginosa*, (1.0 ± 0.0) - > 8.0 µg/mL and (0.7 ± 0.3) - (3.0 ± 1.2) µg/mL for pus and urine isolates respectively. Similar to MICs, the MBCs against *P. aeruginosa* were higher than *S. aureus*, (0.6 ± 0.0) - > 4.0 µg/mL and (0.3 ± 0.0) - > 8.0 µg/mL isolated from pus and urine respectively, (2.0 ± 0.6) - > 8.0 µg/mL and (3.0 ± 1.2) - > 7.0 µg/mL against *P. aeruginosa* from pus and urine respectively (Table 7 and Table 8). Similar results were obtained in

other research (Drago, 2001). It was found that levofloxacin was active, defined as having ability to be a bacteriostatic and bactericidal agent against MDR isolates. Nester *et. al.* stated that antimicrobial agent is considered bactericidal if MBC is 2 - 4 times than MIC (Nester *et. al.*, 1973). Another statement concluded that levofloxacin was considered as bactericidal when its MBC is equal or slightly higher than MIC (Janssen-Ortho, 2005). Basis on those secondary evidences could be considered that levofloxacin as a bactericide on behalf MBC/MIC rate was ≥ 4.

Table 7. In vitro MIC and MBC of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* pus isolates

Isolate Code	MIC ± SD (µg/mL)	MBC ± SD (µg/mL)	MBC/MIC ratio	Note
Standard strain	2.0 ± 0.0	> 7.0	>3.5	Not bactericidal
PP 1	> 8.0	> 8.0	>1	Not Bactericidal
PP 2	1.7 ± 0.6	4.7 ± 3.1	2.8	Bactericidal
PP 3	1.7 ± 0.6	3.0 ± 1.2	1.8	Bactericidal
PP 4	1.0 ± 0.6	3.0 ± 1.2	3	Bactericidal
PP 5	1.0 ± 0.0	2.0 ± 0.6	2	Bactericidal
PP 6	1.0 ± 0.6	> 4.0	>4	Not Bactericidal
PP 7	3.0 ± 1.2	8.0 ± 0.0	2.7	Bactericidal

Table 8. In vitro MIC and MBC of levofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* urine isolates

Isolate Code	MIC ± SD (µg/mL)	MBC ± SD (µg/mL)	MBC/MIC ratio	Note
Standard strain	2.0 ± 0.0	> 7.0	>3.5	Not bactericidal
PU 1	0.7 ± 0.3	> 5.0	>7.1	Not Bactericidal
PU 2	0.8 ± 0.3	3.0 ± 1.2	3.8	Bactericidal
PU 3	3.0 ± 1.2	3.0 ± 1.2	1	Bactericidal
PU 4	3.0 ± 1.2	> 7.0	>2.3	Not Bactericidal

Several factors affected antimicrobial activity in vitro, such as pH, inoculum size, incubation time, drug susceptibility, patient's condition as a source of the test bacteria, antimicrobial and bacteria characteristic (Koneman *et. al.*, 1997; Brooks *et. al.*, 2001). Inoculum size used in this research (106 CFU/mL) was lower than usual colony in infected tissue (108-1010CFU/g), might cause decreased of antimicrobial activity in vivo, but according to Mizunaga *et. al.* (2005), decreasing fluoroquinolone activity was not well-correlated with high inoculum size, but depends on the antimicrobial and bacteria characteristic. Larger incubation time might be bias the result because as incubation time increase, antimicrobial concentration is decrease. The incubation time was ranged 18 - 20 hours to avoid this problem.

S. aureus susceptibility against levofloxacin was higher than *P. aeruginosa*, because there was a substitution in C-7 position with pyrrolidinyl moiety; which enhances quinolones activity against Gram-positives bacterias (Bambeke *et. al.*, 2003; Mitscher, 2005). There was also a concern of additional mechanism of levofloxacin against Gram-positive bacteria, which are active on non-dividing cells and not requiring protein or RNA synthesis (Montanari *et. al.*, 1999). Various efflux pumps of *P. aeruginosa* also lead to more MDR compare with *S. aureus* because various efflux pumps enable substrates to attach on and finally increase drug resistance (Bambeke *et. al.*, 2003).

There are also differences in fluoroquinolone activities against several pathogenic bacteria as proved previously by Mitscher (2005). Those differences may also be seen in our sample SP 2; which was in intermediate border against levofloxacin but susceptible against gatifloxacin. Pseudomonal isolates, PP 7 and PU 3 were also in intermediate level against levofloxacin, but susceptible against gatifloxacin and ciprofloxacin.

Commonly, a resistance in single antimicrobial agent will give similar result to the rest agents in the same class (Heritage, 2001; Muramatsu *et. al.* 2005). On the other side, Cunha (2001) argued that old generation of quinolones (nalidixic acid, norfloxacin) and ciprofloxacin are highly potential to cause resistance and their limitation use in clinical practice will reduce resistance against quinolones. Nevertheless, we suggest that alternative agent against levofloxacin - resistant isolate is better be chosen from different antimicrobial class.

In conclusion, levofloxacin has still active as a bacteriostatic and bactericidal activity against MDR-*S. aureus* and *P. aeruginosa* clinical isolates, however further studies on this subject are warranted using larger sample size and well-correlated with in vivo condition.

CONCLUSION

The Levofloxacin was still active as a bacteriostatic and bactericidal activity against MDR *S. aureus* and *P. aeruginosa* clinical isolates, but further studies on this subject are warranted using larger sample size and well-correlated with in vivo condition.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our thanks to Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd for supplying levofloxacin, James H. Jorgensen and Jennifer M. Andrews for valuable document and suggestions.

REFERENCES

- Bambeke, F. V., Gllupeczynski, Y., Plésiat, P., Pechère, J. C. & Tulkens, P. M. (2003). Antibiotic Efflux Pumps in Procaryotic Cells: Occurrence, Impact on Resistance and Strategies for the Future of Antimicrobial Therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 51; 1055-1065.
- Brooks, G. F., Butel, J. S. & Morse, S. A. (2001). Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 22th ed. Boston: Appleton & Lange.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically - Seventh Edition; Approved standard M7-A7. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement M100-S16. Wayne, PA: CLSI.
- Cunha, B. A. (2001). Effective Antibiotic-Resistance Control Strategies. *Lancet*; 3537; 1307-1308.
- Drago, L., De Vecchi, E., Mombelli, B., Nicola, L., Valli, M. & Gismondo, M. R. (2001). Activity of Levofloxacin and Ciprofloxacin against Urinary pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48; 37-45.
- Evans, M. E. & Titlow, W. B. (1998). Levofloxacin Selects Fluoroquinolone-resistant Methicillin-

- Resistant *Staphylococcus aureus* Less Frequently than Ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 41; 285–288.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weisselfeld, A. S. (2002). Bailey and Scott's Diagnostic of Microbiology, 11th ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc.
- Gade, N. D., Oasi, M. S. (2013). Fluoroquinolone Therapy in *Staphylococcus aureus* Infections: Where Do We Stand?. *Journal of Laboratory Physicians*; 5; 109–112.
- Gilbert, D. N., Kohlhepp, S. J., Slama, K. A., Grunkemeier, G., Lewis, G., Dworkin, R. J., Slaughter, S. E. & Leggett, J. E. (2001). Phenotypic Resistance of *Staphylococcus aureus*, Selected *Enterobacteriaceae*, and *Pseudomonas aeruginosa* after Single and Multiple In Vitro Exposures to Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Trovafloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 45; 883–892.
- Muller-Serieys, C., Decré, D., Benoit, C., Bigot, C., Maubert, B., Carbon, C. (1999). Levofloxacin: Serum Bactericidal Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 43; 67–70.
- Heritage, J., Wilcox, M. & Sandoe, J. (2001). Antimicrobial Resistance Potential. *Lancet*; 358; 1099–1100.
- Janssen-Ortho, Inc. 2005. Levaquin by Jansen-Otrho. <http://www.orthomcneil.com/.../assets/common/company/pi/levaquin.pdf;jsessionid=CWW2VR14A0BGWCQPCCEDC0YKB2IWN5C>. Accessed: 25 Juli 2006.
- Jorgensen, J. A. & Turnidge, J. D. (2003). Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. USA: WMC Brown Publishers.
- Kiska, D. L. & Gilligan, P. H. (2003). Manual of Clinical Microbiology (8th ed). Washington, DC: ASM Press,.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Winn, Jr., W. C. (1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (5th ed). St. Louis: Mosby, Inc.
- MacDougall, C., Harpe, S. E., Powell, J. P., Johnson, C. K., Edmond, M. B. & Polk, R. E. (2005). *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and Fluoroquinolone use. *Emerging Infectious Diseases*; 11; 1197–1204.
- Mitscher, L. A. (2005). Bacterial Topoisomerase Inhibitors: Quinolone and Pyridine Antibacterial Agents. *Chemical Reviews*; 105; 559–592.
- Mizunaga, S., Kamiyama, T., Fukuda, Y., Takahata, M. & Mitsuyama, J. (2005). Influence of Inoculum Size of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on in Vitro Activities and in Vivo Efficacy of Fluoroquinolones and Carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 56; 91–96.
- Montanari, M. P., Mingoia, M., Marchetti, F. & Varaldo, P. E. (1999). In Vitro Activity of Levofloxacin against Gram Positive Bacteria. *Chemotherapy*; 45; 411–417.
- Muramatsu, H., Horii, T., Takeshita, A., Hashimoto, H. & Maekawa, M. (2005). Characterization of Fluoroquinolone and Carbapenem Susceptibilities in Clinical Isolates of Levofloxacin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemother*; 51; 70–75.
- Nester, E. W., Roberts, C. E., McCarthy, B. J. & Pearsall, N. N. (1973). Molecules, Microbes, and Man. New York: Holt-Reinhart Winston.
- Ostle, B. & Mensing, R. W. (1975). Statistics in Research (3rd ed). Iowa: The Iowa State University Press.
- Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. (1981). Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach (2nd ed). Auckland: McGraw-Hill Inc.
- Yao, J. D. C. & Moellering, J. R. (2003). Manual of Clinical Microbiology (8th ed). Washington, DC: ASM Press.

Pola Terapi pada Faktor Risiko Kardioserebrovaskuler Pasien Penyakit Ginjal Kronis yang Menjalani Hemodialisis

Rizaldy Taslim Pinzon, Martinus Bagas Hogantara Padmanaba*, Esdras Ardi Pramudita, Sugianto
Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta

*Corresponding author: bagashogantara@gmail.com

Submitted: 2 Mei 2019

Accepted: 24 Juli 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Background: Chronic kidney disease (CKD) is a progressive decrease in kidney function. The treatment of CKD varies greatly because CKD has many risk factors such as cardiocerebrovascular disease. Appropriate treatment should be given for underlying disease. **Objective:** To identify the profil of treatment for risk factors for cardiocerebrovascular disease in chronic kidney disease patients undergo hemodialysis. **Methods:** This study used cross sectional method with a descriptive approach. The subjects studied were patients with chronic kidney disease who underwent hemodialysis at Bethesda Hospital and Panti Rapih Hospital Yogyakarta. The data used in this study is secondary data taken from medical record data. The data were shown in tables for analysis. **Results:** This study involved 92 chronic kidney disease of patients with hemodialysis consist of 60 men (65.2%) and 32 women (35.8%) with the mean of age is 50 years old. Patients with a clinical history who were at risk of becoming cardiocerebrovascular disease and had not received treatment 39 people (42.4%). The major risk factor of cardiocerebrovascular disease was hyperhomocystein 91 patients (98.9%). The common medication used to reduce the occurrence of cardiocerebrovascular disease were folic acid with a total of 81 patients (89%), anti anemia 77 patients (90.6%), anti hypertensive 74 patients (90.2%). **Conclusions:** The common medication used were folic acid, anti anemia, and anti hypertensive. The most common cardiocerebrovascular risk factor was hyperhomocysteinemia.

Keywords: treatment, chronic kidney disease, kardioserebrovaskular

Abstrak

Pendahuluan: Penyakit ginjal kronis (PGK) merupakan penurunan fungsi ginjal secara progresif dan sudah berlangsung lama. Pola terapi pada PGK sangat bervariasi karena PGK memiliki banyak faktor risiko seperti penyakit kardioserebrovaskular sehingga perlu diberikan obat yang sesuai dengan penyakit yang mendasari. **Tujuan:** Mengidentifikasi profil pola terapi pada faktor risiko penyakit kardioserebrovaskular pasien penyakit ginjal kronis yang menjalani hemodialisis. **Metode:** Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *cross sectional* atau potong lintang dengan pendekatan deskriptif. Subjek yang diteliti adalah penderita penyakit Ginjal Kronis yang menjalani hemodialisis di RS Bethesda dan RS Panti Rapih Yogyakarta. Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data sekunder yang diambil dari data rekam medis. Analisis menggunakan data yang diambil dibuat dalam bentuk tabel. **Hasil:** Penelitian ini melibatkan 92 pasien penyakit ginjal kronis yang menjalani hemodialisis terdiri dari 60 laki-laki (65,2%) dan 32 perempuan (34,8%) dengan rata-rata usia 50 tahun. Pasien dengan riwayat klinis yang berisiko menjadi penyakit kardioserebrovaskular dan belum mendapat pengobatan 39 orang (42,4%). Faktor risiko kardioserebrovaskular paling banyak adalah hiperhomosisteinemia 91 pasien (98,9%). Obat yang banyak digunakan untuk mengurangi terjadinya penyakit kardioserebrovaskular adalah asam folat dengan jumlah 81 pasien (89%), anti anemia 77 pasien (90,6%), dan anti hipertensi 74 pasien (90,2%). **Kesimpulan:** Pola terapi yang banyak digunakan adalah asam folat, anti anemia, dan anti hipertensi. Faktor risiko kardioserebrovaskular paling banyak adalah hiperhomosisteinemia.

Kata kunci: pola terapi, penyakit ginjal kronis, kardioserebrovaskular

PENDAHULUAN

Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) tahun 2013 menunjukkan bahwa prevalensi penduduk Indonesia yang menderita gagal ginjal sebesar 0,2% atau 2 per 1000 penduduk. Prevalensi PGK di Yogyakarta adalah 0,2% atau 2 per 1000 penduduk (Kemenkes RI, 2017).

Penyakit ginjal kronis merupakan kelainan fungsi atau struktur ginjal yang berlangsung lebih dari 3 bulan yang ditandai dengan adanya satu atau lebih tanda kerusakan ginjal disertai penurunan LFG (KDIGO, 2013).

Penyakit ginjal kronis dapat menimbulkan beberapa komplikasi yaitu anemia, hiperlipidemia, osteofistrotrofi, masalah nutrisi dan penyakit kardioserebrovaskular. Pasien penyakit ginjal kronis memiliki risiko 5 - 10 kali lebih tinggi untuk meninggal akibat penyakit kardioserebrovaskular. Penyakit kardioserebrovaskular menjadi komplikasi yang ditakutkan karena merupakan penyebab utama pada penyakit ginjal kronis (Subagio, 2014).

Berdasarkan data yang ada dan mengetahui terapi serta penyakit penyerta pada PGK yang menjalani hemodialisis, Penelitian ini dilakukan untuk mengukur pola terapi pada faktor risiko kardioserebrovaskular pasien penyakit ginjal kronis yang menjalani hemodialisis.

METODE

Penelitian di lakukan di RS Bethesda dan RS Panti Rapih Yogyakarta pada bulan Agustus 2018 - Desember 2019. Metode penelitian yang digunakan yaitu cross-sectional dengan pendekatan deskriptif yang menggunakan rekam medik pasien gagal ginjal kronis yang menjalani hemodialisis. Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive* dari data rekam medik yang memenuhi kriteria inklusi yaitu pasien dengan gagal ginjal yang menjalani hemodialisis, bersedia menjadi responden dan menjalani hemodialisis rutin 2 kali dalam seminggu. Kriteria Eksklusi yaitu pasien yang tidak bersedia menjadi responden dan tidak kompeten dalam memberikan inform consent. Data yang diperoleh disajikan dan dilaporkan dalam bentuk tabel persentase.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penyakit ginjal kronis insiden dan prevalensi tergantung pada jenis kelamin, usia, ras, dan penyakit bawaan. Prevalensi penyakit ginjal kronis dengan jenis kelamin laki-laki lebih banyak daripada perempuan dan

meningkat dengan bertambahnya usia (Krauss & Hak, 2000). Data pada Tabel 1 menunjukkan prevalensi laki-laki lebih banyak yaitu 60 orang (65,2%) sedangkan perempuan 32 orang (34,8%). Perbedaan jenis kelamin dapat menyebabkan perbedaan pola hidup. Pola hidup seperti merokok, mengonsumsi alkohol yang merupakan faktor risiko terjadinya penyakit ginjal yang ditemukan lebih banyak pada laki-laki dibandingkan perempuan (Chang dkk., 2016). Distribusi usia paling banyak pada rentang 56 tahun sampai 65 tahun yaitu berjumlah 28 orang (30,4%). Pada usia lebih dari 40 tahun terjadi penurunan bersihan kreatinin 0,75 mL/menit/tahun (Mallappallil & Friedman, 2014).

Tabel 1. Karakteristik pasien

Karakteristik Pasien	n = 92	%
Usia		
17 - 25 tahun	1	1,1
26 - 35 tahun	10	10,9
36 - 45 tahun	17	18,5
46 - 55 tahun	27	29,3
56 - 65 tahun	28	30,4
> 65 tahun	9	9,8
Jenis Kelamin		
Laki-laki	60	65,2
Perempuan	32	34,8
Faktor Risiko		
Kardioserebrovaskular		
Hipertensi	82	89,1
Diabetes Melitus	32	34,8
Anemia	85	92,4
Dislipidemia	9	9,8
Hiperhomosisteinemia	91	98,9
Pola Terapi		
Asam Folat	81	88
Obat Antihipertensi	74	80,4
Obat Antidiabetes	22	23,9
Penurun Lipid	6	6,5
Anti Anemia	77	83,7

Penelitian ini mengungkap penggunaan yang tinggi sebanyak 90,6% yakni 74 pasien, untuk terapi faktor risiko kardioserebrovaskular. Pasien PGK mempunyai target terapi < 140/90 mmHg (Krauss & Hak, 2000). Data pada Tabel 2 menunjukkan obat anti hipertensi paling banyak golongan *calcium channel blocker* (CCB) 47 orang. Terapi dengan golongan *calcium channel blocker* digunakan sebagai terapi tunggal atau terapi kombinasi. Golongan CCB merupakan antihipertensi yang efektif pada PGK (KDOQI, 2012). Pada pasien yang intoleran CCB, golongan *angiotensin reseptor blocker* diyakini mampu berfungsi sebagai renoprotektif lebih baik

dibandingkan dengan golongan lain (Carter & Barry, 2002).

Data pada Tabel 2 menunjukkan obat golongan diuretik digunakan pada penelitian ini yaitu Furosemid 34 orang. Penggunaan obat diuretik dapat mengatasi edema terkait dengan gagal jantung kongestif. Obat furosemide menghambat reabsorpsi natrium dan klorida pada tubulus proksimal, distal, dan *loop of henle*.

Penggunaan beta *blocker* dapat memperburuk fungsi ginjal karena penurunan aliran darah ginjal (Nafrialdi, 2007). Data pada Tabel 2 menunjukkan 8 orang (8,7%) menggunakan golongan beta *blocker* yaitu bisoprolol. Berdasarkan pustaka maka pasien dengan gagal ginjal kronik sebaiknya menghindari penggunaan beta *blocker*.

Penggunaan alfa 2 *adrenergic agonist* dapat menurunkan tekanan perfusi (Lewis dkk., 2002). Data pada Tabel 2 menunjukkan 13 pasien mendapatkan terapi Clonidin. Berdasarkan pustaka Penggunaan Alfa 2 *adrenergic agonist* sebaiknya dihindari karena dapat menyebabkan penurunan LFG.

Tabel 2. Karakteristik golongan obat anti hipertensi (n = 74)

Golongan	Jumlah Pasien	%
CCB	47	63,5
ARB	41	55,4
Diuretik	34	45,9
Alfa 2 Agonis	13	17,6
Beta Blocker	8	10,8

Data pada Tabel 3 menunjukkan penggunaan terapi tunggal untuk antihipertensi sebanyak 26 dan terapi kombinasi sebanyak 48 pasien. Data pada Tabel 4 menunjukkan terapi tunggal yang paling banyak digunakan adalah CCB yakni 13 orang. Data pada Tabel 5 menunjukkan kombinasi obat yang paling banyak digunakan adalah kombinasi 2 yaitu ARB dan Diuretik. Pemberian terapi kombinasi dapat meningkatkan efektivitas obat sehingga target penurunan pada pasien hipertensi dapat tercapai (Untari dkk., 2014).

Tabel 3. Karakteristik terapi hipertensi (n = 74)

Jenis Terapi	Jumlah Pasien	%
Tunggal	26	35,1
Kombinasi	48	64,9

Tabel 4. Karakteristik terapi tunggal hipertensi (n = 26)

Golongan	Jumlah Pasien	%
CCB	13	17,6
ARB	7	9,5
Diuretik	4	5,4
Alfa 2 Agonis	2	2,7

Tabel 5. Terapi kombinasi anti hipertensi (n = 48)

Golongan	Jumlah Pasien	%
Kombinasi 2 Obat		
CCB, Alfa 2 Agonis	3	4,1
CCB, ARB	6	8,1
ARB, Diuretik	9	12,2
CCB, Diuretik	8	10,8
CCB, Beta Blocker	2	2,7
CCB, ARB	1	1,4
Alfa 2 Agonis, Diuretik	1	1,4
Kombinasi 3 Obat		
CCB, ARB, Alfa 2 Agonis	3	4,1
ARB, Diuretik, Beta Blocker	1	1,4
Diuretik, CCB, ARB	8	10,8
ARB, CCB, Beta Blocker	2	2,7
Kombinasi 4 Obat		
CCB, ARB, Alfa 2 Agonis, Diuretik	1	1,4
CCB, ARB, Alfa 2 Agonis, Beta Blocker	1	1,4
ARB, Alfa 2 Agonis, Diuretik, Beta Blocker	2	2,7

Penggunaan asam folat membantu menurunkan risiko *hiperhomosisteinemia*. Data pada Tabel 6 menunjukkan penggunaan asam folat sebanyak 89%, yakni sejumlah 81 pasien. Pasien dengan PGK stadium akhir memiliki prevalensi hiperhomosistein yang tinggi. Hal ini sesuai dengan pustaka bahwa plasma homosistein berkorelasi dengan estimasi dari LFG. Penurunan LFG hingga 60 ml/menit dapat menimbulkan hiperhomoterapi sistein. Pada stadium akhir gagal ginjal prevalensi hiperhomosistein mencapai 85 - 100%. *Hiperhomosistein* tinggi pada stadium akhir disebabkan oleh penurunan LFG (Guldener, 2006).

Data pada Tabel 6 menunjukkan pasien yang memiliki riwayat hiperhomosisteinemia tetapi belum mendapat asam folat tercatat 10 orang. Target pemberian terapi terpenuhi apabila homosistein basal < 10 U mol/L. Penggunaan asam folat 0,5 - 5 mg/hari dapat menurunkan homosistein total serum 15% - 40% dalam 6 minggu. Konsumsi diet yang mengandung asam folat, vitamin B6, dan vitamin B12 disarankan pada homosistein basal > 10 U mol/L (Guldener, 2006).

Penggunaan obat penginduksi eritropoesis pada pasien PGK digunakan dalam panduan tatalaksana anemia. Berbagai evidences menunjukkan bahwa eritropoietin rekombinan (rHEPO) dapat memperbaiki parameter hematologi, menurunkan mortalitas dan morbiditas, serta meningkatkan kualitas hidup pasien (Fink, 2002). Data pada Tabel 6 menunjukkan 90,2%, yakni 77 orang dari 92 orang mendapat terapi epoetin alfa. Pasien yang memiliki riwayat anemia tetapi tidak mendapatkan epoetin alfa tercatat 8 orang. KDOQI (2012) memberi pedoman untuk terapi epoetin digunakan saat terjadi penurunan Hb atau hematokrit hingga 80% dari batas normal sehingga pada penelitian ini epoetin alfa sudah diberikan sesuai dengan target untuk mengatasi anemia pada pasien.

Tabel 6. Karakteristik riwayat pengobatan

Riwayat Pengobatan	Jumlah Pasien	Total Pasien	%
Riwayat klinis (diobati)			
Hiperhomosisteinemia	81	91	89
Hipertensi	74	82	90,2
Diabetes Melitus	22	32	68,8
Dislipidemia	6	9	66,7
Anemia	77	85	90,6
Riwayat klinis (belum diobati)			
Hiperhomosisteinemia	10	91	11
Hipertensi	8	82	9,8
Diabetes Melitus	10	32	31,2
Dislipidemia	3	9	33,3
Anemia	8	85	9,4

Penggunaan obat antidiabetes untuk menurunkan gula darah pada pasien sehingga risiko komplikasi penyakit kardioserebrovaskular dapat menurun (Lubis, 2014). Terapi anti diabetes yang digunakan adalah obat oral dan insulin. Pengendalian gula darah pada pasien PGK secara insensif akan mencegah progresifitas dan mencegah timbulnya penyulit kardiovaskuler baik pada DM Tipe 1 maupun DM Tipe 2 (Gugun, 2008). Data

pada Tabel 7 menunjukkan bahwa insulin digunakan oleh 10 pasien sedangkan 12 pasien menggunakan obat oral. Penggunaan obat antidiabetes disesuaikan dengan kondisi pasien. Insulin merupakan terapi antidiabetes yang telah digunakan secara luas pada pasien DM tipe 2 dengan nefropati (Hendromartono, 2014).

Tabel 7. Terapi anti diabetes (n = 22)

Golongan	Jumlah Pasien	%
Insulin	10	45,5
Glikuidon	5	22,7
Glimipirid	2	9,1
Alpha Glukosidase Inhibitor	5	22,7

Penggunaan penurun lipid golongan HMGCoA reductase inhibitor seperti lovastatin, pravastatin, simvastatin, fluvastatin banyak disarankan dikarenakan golongan obat ini yang paling efektif untuk pasien yang mengalami peningkatan kadar LDL dan kolesterol total (Krauss & Hak, 2000). Data pada Tabel 8 menunjukkan penggunaan terbanyak obat dislipidemi adalah simvastatin yaitu 5 pasien dan 1 pasien menggunakan gemfibrozil. Pada rekam medis tercatat 3 pasien yang menderita penyakit klinis belum menerima obat. Penggunaan penurun lipid disarankan jika memiliki riwayat klinis untuk mengurangi risiko penyakit kardioserebrovaskular.

Tabel 8. Terapi penurun lipid (n = 6)

Golongan Obat	Jumlah Pasien	%
Simvastatin	5	83,3
Gemfibrozil	1	16,7

KESIMPULAN

Obat yang banyak digunakan pada faktor risiko kardioserebrovaskular pasien penyakit ginjal kronis yang menjalani hemodialisis adalah asam folat 81 pasien (89%), anti anemia 77 pasien (90,2%), dan anti hipertensi 74 pasien (90,6%). Faktor risiko kardioserebrovaskular yang paling banyak ditemukan dan hampir ditemui pada setiap pasien yang menjalani hemodialisis adalah hiperhomosisteinemia. Terdapat jumlah yang cukup tinggi dari pasien yang memiliki riwayat klinis tetapi belum menerima obat yaitu lebih dari 40% (39 dari 92 pasien).

DAFTAR PUSTAKA

Carter, L. & Barry, J. S. J. (2002) Hipertension (In: DiPiro, T. J., Talbert, R. L., Yee, G. Pharmacotherapy A Pathophysiologic

- Approach, 5th ed). St Louis: McGraww-Hill Companies.
- Chang, P., Chien, L., Lin Y. F., Wu, M. S., Chiu, W. T. & Chiou, H. Y. (2016). Risk Factors of Gender for Renal Progression in Patients with Early Chronic Kidney Disease. *Medicine (Baltimore)*; 95; 4203.
- Fink, J. (2002) Treatment for the Anemia of Chronic Kidney Disease. <http://www.medscape.com/viewarticle/445253>. Accessed: 5 Desember 2018.
- Gugun, A. M. (2008) Hiperhomosisteinemia dan Faktor Risiko Kelainan Vaskuler. *Mutiara Medika*; 8; 97-105.
- Guldener, C. V. (2006) Why is Homocysteine Elevated in Renal Failure and What Can be Expected from Homocysteine-lowering?. *Nephrol Dial Transplant*; 21; 1161–1166.
- Hendromartono. (2014). Nefropati Diabetik (In: Setiati, S. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid 2, 6th ed). Jakarta: Interna Publishing.
- KDIGO. (2013) Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney International Supplements*; 3; 1-50.
- KDOQI. (2012) KDOQI US Commentary on the 2012 KDIGO Clinical Practice Guideline for Management of Blood Pressure in CKD. New York: National Kidney Foundation, Inc.
- Krauss, A. G. & Hak, L. J. (2000) Chronic Renal Disease. Philadelphia: Lippicott William and Wilkins.
- Kemenkes RI. (2017). InfoDATIN: Situasi Penyakit Ginjal Kronis. Jakarta: Kemenkes RI.
- Lewis, M. J., St Peter, W. L. & Collin, A. (2002). End Stage Renal Disease. StLouis: McGraw-Hill Companies.
- Lubis, H. R. (2014). Penyakit Ginjal Kronik. Jakarta: Interna Publishing.
- Mallappallil, M. & Friedman, E. A. (2014). Chronic Kidney Disease in the Elderly: Evaluation and Management. *Clinical Practice*; 11; 525–535.
- Nafrialdi, S. A. (2007). Farmakologi dan Terapi. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI.
- Subagio, S. W. (2014). Kejadian Penyakit Kardioserebrovaskular pada Penderita Penyakit Ginjal Kronik Stadium V dengan Diabetes Melitus dan Tanpa Diabetes Melitus. *Skripsi*; Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Untari, M. K., Nugroho, A E. & Irijanto, F. (2014) Perbandingan Efek Terapi Kombinasi 2 Obat dengan 3 Obat Antihipertensi pada Pasien Hemodialisis. *Journal of Management and Pharmacy Practice*; 4; 215.

Optimasi Kondisi Sintesis Asam 4-Benzoiloksisinamat Menggunakan Iradiasi Gelombang Mikro

Ilham Bagus Sagitaras, Achmad Syahrani, Juni Ekowati*

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: j_ekowati@yahoo.com

Submitted: 7 Mei 2019

Accepted: 25 Juli 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Background: One of the efforts to improve the activity of *p*-coumaric acid, is to increase its lipophylicity. The benzylation reaction on the phenolic moiety of *p*-coumaric acid is one of the strategy to increase its lipophylicity. Microwave irradiation is an alternative method to increase the efficiency of the organic reaction. Beside having the advantage of accelerating chemical reactions, the use of microwave irradiation can also cause degradation of the desired product and rise of other side reactions. **Objectives :** to optimize the condition of the benzylation reaction in the phenolic moiety of *p*-coumaric acid using microwave irradiation. **Methods:** The reaction was performed using microwave oven at power irradiation: 180, 270, and 360 Watt, by reacting *p*-coumaric acid, benzoyl chloride, and pyridine as catalysts to produce the 4-benzoyloxy-cinnamic acid. The completion of the reaction was determined by TLC every 30 seconds reaction time. The characterization of 4-benzoyloxy-cinnamic acid was performed using UV-Vis, FT-IR and ¹H-NMR spectrometry. **Results:** The yield of product at 180, 270, and 360 Watt consecutively were 49.3%, 58.5%, and 47.7%. There was significant difference between the percentage yields at 180 and 270 Watt; and between yield at 270 and 360 Watt, but there was no significant difference between the yield at 180 and 360 Watt. The highest yield reaction was obtained at 270 Watt was 61.4%. Reaction conducted over sixty seconds caused degradation of the product. **Conclusion:** Optimum condition benzylation reaction *p*-coumaric acid to produce 4-benzoyloxy-cinnamic acid is one minute at 270 Watt power of microwave irradiation.

Keywords: 4-benzoyloxy-cinnamic acid, microwave, power of irradiation, *p*-coumaric acid, nucleophilic acyl substitution

Abstrak

Pendahuluan: Salah satu usaha meningkatkan aktivitas asam *p*-kumarat adalah meningkatkan sifat lipofiliknya. Reaksi benzoilasi gugus fenol asam *p*-kumarat merupakan salah satu strategi meningkatkan sifat lipofilik. Iradiasi microwave merupakan salah satu alternative metode untuk meningkatkan efisiensi dalam reaksi organik. Selain memiliki kelebihan mempercepat reaksi kimia, penggunaan iradiasi gelombang mikro juga dapat menyebabkan kerusakan struktur kimia produk maupun terjadinya reaksi samping lainnya. **Tujuan:** Mendapatkan kondisi optimum reaksi sintesis asam 4-benzoiloksisinamat. **Metode:** asam 4-benzoiloksisinamat disintesis dengan cara mereaksikan asam *p*-kumarat, benzoil klorida dan piridin sebagai katalis. Reaksi benzoilasi dilakukan dengan iradiasi gelombang mikro pada daya 180, 270, dan 360 Watt. Karakterisasi asam 4-benzoiloksisinamat dilakukan menggunakan alat spektrometer UV-Vis, FT-IR dan ¹H-NMR. **Hasil:** Persentase hasil yang diperoleh pada daya 180, 270, dan 360 Watt berturut-turut adalah sebagai berikut 49,3%, 58,5%, and 47,7%. Terdapat perbedaan yang signifikan persentase hasil yang diperoleh pada daya 270 Watt dengan persentase hasil pada daya 180 Watt dan 360 Watt, tetapi tidak ada perbedaan bermakna persentase hasil pada daya 180 Watt dan 360 Watt. Persentase hasil terbesar diperoleh selama enam puluh detik pada daya 270 Watt, yaitu 61,4%. Jika reaksi dilakukan lebih dari enam puluh detik, terjadi kerusakan struktur senyawa target.

Kesimpulan: Kondisi optimum sintesis asam 4-benzoiloksisinamat menggunakan iradiasi gelombang mikro adalah selama enam puluh detik pada daya 270 Watt.

Kata Kunci: asam 4-benzoiloksisinamat, microwave, daya iradiasi gelombang mikro, asam *p*-kumarat

PENDAHULUAN

Asam *p*-kumarat adalah salah satu derivat senyawa asam sinamat yang dilaporkan dapat berfungsi sebagai agen anti inflamasi. Asam *p*-kumarat berfungsi sebagai agen anti inflamasi dengan menurunkan ekspresi inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS), COX-2, IL-1 β , dan TNF- α pada mRNA dan/atau kadar protein dalam sel RAW 264,7 yang distimulasi oleh LPS. Asam *p*-kumarat juga dapat menurunkan kadar sitokin (Zhao dkk., 2016).

Berdasarkan strukturnya, asam *p*-kumarat memiliki satu cincin aromatis, satu gugus -OH fenolik, satu ikatan karbon rangkap dua (C=C), dan satu gugus karboksilat. Dari keempat gugus tersebut, terdapat dua gugus farmakofor yang berperan dalam aktivitas antiinflamasi, yaitu gugus karboksilat dan cincin aromatis (Neophytou dkk., 2011; Caseley dkk., 2015).

Berdasarkan data dengan program ChemBioDraw Ultra 12.0®, asam *p*-kumarat memiliki nilai log P sebesar 1,54. Nilai log P tersebut yang lebih rendah dibandingkan dengan nilai log P membran semipermeabel dalam tubuh (log P = 2 – 3) sehingga diperlukan suatu upaya untuk meningkatkan nilai log P agar daya penetrasi terhadap membran semipermeabel meningkat dan aktivitas dapat meningkat. Salah satu upaya yang dilakukan dalam penelitian ini untuk meningkatkan aktivitas antiinflamasi dari asam *p*-kumarat yaitu dengan melakukan reaksi esterifikasi pada gugus -OH fenolik. Penggantian gugus tersebut dapat meningkatkan sifat hidrofobik senyawa tersebut sehingga proses penembusan membran semipermeabel dalam tubuh akan menjadi lebih mudah (Ekowati dkk., 2017).

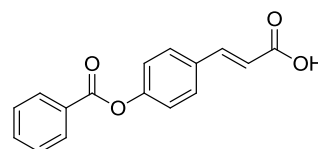
Sehubungan dengan usaha meningkatkan lipofilitas senyawa asam *p*-kumarat, dilakukan perubahan gugus OH fenolik menjadi gugus ester melalui reaksi substitusi asil nukleofilik. Pada penelitian ini gugus -OH fenolik asam *p*-kumarat direaksikan dengan suatu senyawa asil halida.

Asil halida merupakan derivat asam karboksilat yang paling reaktif dibandingkan dengan derivat ester lainnya sehingga reaksi antara asil halida dengan alkohol berjalan lebih cepat dibandingkan reaksi esterifikasi lainnya (Solomon dkk., 2016).

Pada penelitian ini digunakan katalis basa organik yaitu piridina. Piridina memiliki nilai pK_b sebesar 8,75 (Quellette & Rawn, 2014). Piridina memiliki struktur planar dan pasangan atom bebas pada N tidak ikut dalam resonansi sehingga piridina merupakan katalis basa yang efektif (Putra dkk., 2017). Sebagai katalis, piridina mempercepat reaksi melalui pembentukan ion asilpiridinium yang nantinya akan bereaksi dengan alkohol atau fenol. Piridina selanjutnya akan mengikat hasil samping HCl membentuk suatu garam yang larut dalam air (Carey & Sundberg, 2001).

Iradiasi gelombang mikro digunakan sebagai sumber energi pada reaksi ini. Iradiasi gelombang mikro pada dasarnya adalah iradiasi gelombang elektromagnetik yang saat ini banyak diterapkan dalam sintesis senyawa organik. Metode ini memiliki beberapa keunggulan, antara lain laju pemanasan yang lebih cepat sehingga mengakibatkan berkurangnya waktu reaksi, produk yang dihasilkan lebih banyak, pemanasannya seragam, selektif (didasarkan pada respon suatu bahan terhadap gelombang mikro), ramah lingkungan, dan reproduibilitas lebih baik (Ameta dkk., 2015).

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh daya pada proses iradiasi gelombang mikro terhadap persentase hasil sintesis senyawa asam 4-benzoiloksisinamat yang didapatkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Asam 4-*O*-benzoiloksisinamat

Penggunaan iradiasi gelombang mikro dapat mempercepat laju reaksi karena energi yang dipancarkan oleh oven gelombang mikro tersebut dapat meningkatkan jumlah tumbukan-tumbukan yang terjadi pada molekul-molekul senyawa polar. Jumlah energi yang dipancarkan oleh oven gelombang mikro tersebut tergantung pada daya yang digunakan. Semakin besar daya yang dikeluarkan, maka semakin besar pula energi yang dipancarkan oleh oven gelombang mikro (Grundas, 2011).

BAHAN DAN METODE

Bahan

Asam *p*-kumarat (Sigma-Aldrich®), Benzoil klorida p.a (Merck®), Tetrahidrofuran p.a (Merck®), Piridina p.a (Merck®), *n*-Heksana p.a (Merck®), Etil asetat p.a (Merck®), Kloroform p.a (Merck®), Asam formiat p.a (Merck®), Asam klorida p.a (Merck®), Metanol p.a (Merck®), Silica gel 60 (Merck®), dan lempeng KLT silica gel GF254 (Merck®).

Alat

Neraca analitik Sartorius® BL-600, Sharp® Microwave oven R-728(S)-In (Spesifikasi: daya 900 watt, kapasitas maksimum 25 L, dan power source 220 – 240 Volt), lampu UV 254 nm, pengukur titik lebur (Electrothermal Melting Point Apparatus®), spektrofotometer FT-IR (Perkin Elmer® Spektrum One), spektrofotometer UV-Vis (Hitachi® UH5300), dan spektrofotometer FT-NMR Jeol® ECS 400 MHz (dilakukan di ITD UNAIR), aplikasi IBM SPSS Statistics 24.

Metode

Optimasi kondisi sintesis

Asam kumarat sebanyak 200 mg (1,22 mmol) dilarutkan dalam tetrahidrofuran 0,5 mL (6,21 mmol), benzoil klorida sebanyak 0,3 mL (2,58 mmol) dan 0,5 mL piridina dalam kondisi dingin. Campuran direaksikan dalam oven gelombang mikro pada daya 180, 270, dan 360 watt dan waktu diatur selama 30 detik tiap satu kali iradiasi.

Uji kesempurnaan reaksi

Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Densitometri dengan baku pembanding yaitu asam kumarat dan asam benzoat, dan fase gerak yang digunakan adalah campuran eluen kloroform : etil asetat = 9 : 1.

Uji kualitatif OH-fenolik

Senyawa hasil sintesis ditetesi dengan pereaksi FeCl₃ dan diamati warna yang terbentuk. Pembandingnya adalah asam *p*-kumarat.

Tahap pemisahan senyawa hasil sintesis

Campuran hasil sintesis ditambahkan larutan HCl 2N hingga suasana asam dan terbentuk endapan. Endapan tersebut disaring dengan corong Buchner, dan dilakukan proses pemurnian dengan kromatografi kolom. Fase diam silica gel 60 (Merck), fase gerak kloroform : etil asetat (9:1).

Uji kemurnian senyawa hasil sintesis

Uji kemurnian dengan penentuan jarak lebur

Pengujian kemurnian senyawa hasil sintesis dengan penentuan jarak lebur dilakukan dengan menggunakan alat *Electrothermal Melting Point*

Apparatus. Dilakukan pengamatan saat serbuk terlihat mulai melebur hingga seluruh bagian kristal melebur sempurna.

Uji kemurnian dengan KLT

Sedikit senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam kloroform kemudian ditotolkan pada plat silica gel GF254. Sebagai pembanding, digunakan asam kumarat dan asam benzoat. Uji Kemurnian ini dilakukan dengan menggunakan tiga eluen yang berbeda. Eluen yang digunakan antara lain *n*-heksana : kloroform : asam formiat = 19 : 20 : 1, kloroform : etil asetat = 9 : 1, dan kloroform : etil asetat : metanol = 50 : 50 : 1. Setelah itu dilakukan pengamatan noda di bawah lampu sinar UV 254 nm.

Identifikasi struktur senyawa

Identifikasi dengan spektrofotometri UV

Sejumlah tertentu senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam kloroform dan diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Lalu diamati bentuk spektrum yang terekam dan panjang gelombang maksimalnya.

Identifikasi dengan spektrofotometri FTIR

Sejumlah kecil senyawa hasil sintesis digerus bersama dengan serbuk kering KBr dalam mortir agat. Kemudian campuran tersebut dimasukkan ke dalam alat pencetak pelet dan dilakukan pencetakan hingga diperoleh pelet yang transparan. Pelet yang terbentuk diletakkan dalam *sample holder* dan dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer FT-IR.

Identifikasi dengan spektrometri ¹H-NMR

Sejumlah kecil senyawa hasil sintesis dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambahkan TMS (di dalam 5 mm o.d. glass tube) kemudian diletakkan dalam *sample holder*. Diamati dan dianalisis spektrum resonansi magnet proton yang terekam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sintesis antara asam *p*-kumarat dan benzoil klorida dengan katalis piridin menggunakan iradiasi gelombang mikro pada daya 180 Watt, 270 Watt, dan 360 Watt telah berhasil dilakukan (Gambar 2). Hasil yang diperoleh dengan uji KLT dapat dilihat pada Tabel 1.

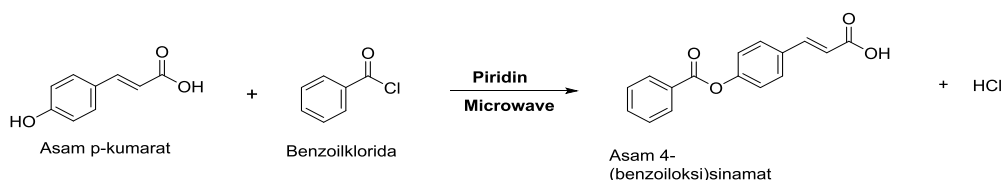
Berdasarkan Tabel 1, dapat diketahui bahwa terdapat 4 noda pada senyawa hasil sintesis. Noda dengan nilai R_f = 0,09 adalah noda dari asam *p*-kumarat, noda dengan nilai R_f = 0,17 adalah noda dari asam benzoat, noda dengan nilai R_f = 0,54 adalah noda dari benzoil klorida, dan noda dengan nilai R_f = 0,89 adalah noda dari senyawa target.

Tabel 1. Hasil uji KLT senyawa hasil sintesis

Daya (Watt)	Waktu	Jumlah Noda	Rf	Intensitas Relatif Noda (Visual)
180	0 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	1 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	2 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
3 x 30	4 noda	0,09	++	
		0,17	+	
		0,54	++	
		0,89	+++	
270	0 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	1 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	2 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
3 x 30	4 noda	0,09	++	
		0,17	+	
		0,54	++	
		0,89	+++	
360	0 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	1 x 30	4 noda	0,09	++
			0,17	+
			0,54	++
			0,89	+++
	2 x 30	2 noda	0,09	+++
			0,17	++

*Eluen : kloroform : etil asetat (9:1)

Keterangan : +++: Intensitas noda tinggi (gelap); ++: Intensitas noda sedang (sedang); +: Intensitas noda rendah (pudar)



Gambar 2. Sintesis asam 4-(benzoiloksi)sinamat

Sintesis yang dilakukan pada daya 360 Watt sampling ke 2 x 30 detik, menunjukkan bahwa noda dari zat baru telah hilang akan tetapi noda dari asam p-kumarat dan asam benzoat memiliki intensitas tinggi. Hal tersebut berarti bahwa pada kondisi tersebut, zat baru yang dihasilkan pada kondisi tersebut telah mengalami degradasi. Oleh karena itu, membutuhkan metode KLT-Densitometri untuk mengetahui waktu reaksi yang menghasilkan persentase hasil sintesis yang paling besar.

Hasil uji KLT-Densitometri senyawa hasil sintesis dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2, dapat diketahui bahwa rata-rata persentase hasil reaksi terbesar didapatkan pada daya 270 Watt dengan waktu 2 x 30 detik. Pada sintesis dengan daya 360 Watt pada

waktu 1 x 30 detik menunjukkan bahwa persentase hasil dari zat baru telah menurun.

Hal tersebut dapat terjadi karena penggunaan daya 360 Watt memberikan energi yang terbesar, sehingga energi panas terbentuk secara berlebihan. Panas yang berlebih tersebut dapat menyebabkan zat baru yang telah terbentuk mengalami degradasi menjadi asam kumarat dan asam benzoat kembali.

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna pada persentase hasil sintesis dari ketiga daya tersebut, maka digunakan uji statistika *One Way Anova* menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics 24*. Berdasarkan uji statistik tersebut ($\alpha = 0,05$), diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna ($p = 0.005$) persentase hasil antara penggunaan daya 270 Watt dengan daya 180 Watt.

Tabel 2. Hasil uji KLT-densitometri senyawa hasil sintesis

Daya (Watt)	Waktu (detik)	Persentase Hasil Reaksi (%)			
		Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata
180	0 x 30	46,8	46,5	47,2	46,8 ± 0,4
	1 x 30	49,3	49,4	49,1	49,3 ± 0,2
	2 x 30	56,1	56,2	57,5	56,6 ± 0,8
	3 x 30	48,4	47,9	48,6	48,3 ± 0,4
270	0 x 30	54,1	53,5	56,3	54,6 ± 1,5
	1 x 30	57,7	57,5	60,2	58,5 ± 1,5
	2 x 30	60,7	60,2	63,2	61,4 ± 1,8
	3 x 30	46,8	46,7	48,9	47,5 ± 1,2
360	0 x 30	53,5	53,9	55,1	54,2 ± 0,8
	1 x 30	47,5	47,2	48,4	47,7 ± 0,6

*Eluen yang digunakan untuk KLT adalah kloroform : etil asetat (9:1)

Hasil analisis statistik juga menunjukkan signifikansi ($p = 0,001$), antara persentase hasil pada daya 270 Watt dengan daya 360 Watt sebesar Nilai $p < 0,05$ ini menyatakan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara persentase hasil sintesis pada daya 270 Watt dan pada daya 360 Watt. Sedangkan nilai signifikansi (p) yang didapatkan antara persentase hasil pada penggunaan daya 180 Watt dengan daya 360 Watt adalah 0,088. Nilai $p > 0,05$ menyatakan bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antara persentase hasil sintesis pada daya 180 Watt dan 360 Watt.

Setelah diketahui nilai persentase hasil terbesar, dilakukan proses pemisahan dengan kromatografi kolom. Senyawa hasil sintesis yang telah dipisahkan dengan kromatografi kolom dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan uji titik lebur dan uji kemurnian dengan metode KLT.

Hasil uji titik lebur yang didapatkan yaitu jarak lebur yang didapatkan untuk senyawa hasil sintesis sebesar 121 - 123°C sedangkan jarak lebur asam p-kumarat sebesar 193 - 194°C. Nilai jarak lebur senyawa hasil sintesis lebih rendah dari asam kumarat karena

pada senyawa hasil sintesis hanya memungkinkan terjadinya ikatan hidrogen intermolekuler pada gugus karboksilat. Sedangkan pada asam kumarat, ikatan hidrogen intermolekuler dapat terjadi pada gugus karboksilat dan gugus -OH fenolik sehingga ikatan intermolekul asam *p*-kumarat lebih besar dan nilai titik leburnya lebih tinggi.

Hasil uji kemurnian dengan metode KLT dilakukan dengan menggunakan tiga eluen berbeda. Pada eluen kloroform : etil asetat (9:1) didapatkan 1 noda dengan nilai R_f sebesar 0,88. Pada eluen *n*-heksana : etil asetat : asam formiat (19:20:1) didapatkan 1 noda dengan nilai R_f sebesar 0,80. Pada eluen kloroform : etil asetat : metanol (50:50:1) didapatkan 1 noda dengan nilai R_f sebesar 0,91.

Setelah dilakukan uji kemurnian, dilanjutkan dengan identifikasi struktur untuk memastikan bahwa senyawa yang terbentuk adalah asam 4-benzoiloksisinamat. Identifikasi struktur yang dilakukan antara lain dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan spektrometri $^1\text{H-NMR}$.

Analisis menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk mengetahui pola spektrum dan panjang gelombang senyawa (Solomon dkk., 2016). Panjang gelombang maksimum asam kumarat sebagai bahan awal adalah 310 nm dan untuk asam 4-benzoiloksisinamat adalah 285 nm. Hal tersebut menunjukkan bahwa terjadi pergeseran panjang gelombang menjadi lebih pendek (hipsokromik).

Terjadinya pergeseran panjang gelombang maksimum (λ_{max}) ini dikarenakan gugus auksokrom -OH pada asam *p*-kumarat telah berubah menjadi gugus ester yang mana gugus karbonil dalam ester tersebut merupakan suatu gugus kromofor yang memiliki transisi $n \rightarrow \pi^*$ pada 280 - 290 nm dan transisi $\pi \rightarrow \pi^*$ pada 188 nm (Pavia dkk., 2015). Adanya perbedaan panjang gelombang dan perbedaan pola spektrum keduanya menunjukkan bahwa zat hasil sintesis berbeda dengan asam *p*-kumarat.

Analisis menggunakan spektrofotometri FT-IR bertujuan untuk mengetahui adanya gugus-gugus fungsi apa saja yang terdapat dalam suatu senyawa (Solomon dkk., 2016). Hasil spektrum inframerah dari senyawa asam *p*-kumarat menunjukkan adanya serapan -OH fenolik pada 3380 cm^{-1} , C=O karboksilat pada 1671 cm^{-1} , C-O pada 1243 cm^{-1} , C=C aromatis pada 1510 cm^{-1} , C-H pada 832 cm^{-1} , C=C alkena pada 1627 cm^{-1} , dan C-H pada 2924 cm^{-1} .

Hasil spektrum inframerah senyawa asam 4-benzoiloksisinamat dengan katalis piridina

menunjukkan serapan -OH karboksilat pada 3444 cm^{-1} , C=O karboksilat pada 1716 cm^{-1} , C-O pada 1269 cm^{-1} , C=C aromatis pada 1506 cm^{-1} , C-H pada 859 cm^{-1} , C=C alkena pada 1639 cm^{-1} , C-H pada 2924 cm^{-1} , dan C=O ester pada 1736 cm^{-1} .

Hasil identifikasi dengan spektrofotometri FT-IR menunjukkan bahwa terdapat perbedaan gugus fungsi antara senyawa hasil sintesis dengan bahan awal asam *p*-kumarat. Pada senyawa hasil sintesis dengan ditemukan adanya tambahan gugus karbonil dari ester, sedangkan pada senyawa awal asam *p*-kumarat tidak ditemukan gugus tersebut. Selain itu pita serapan tajam dari gugus -OH fenolik yang ada pada asam *p*-kumarat telah berubah menjadi pita serapan yang landai dengan intensitas sedang pada senyawa hasil sintesis. Sehingga berdasarkan hasil spektrum inframerah tersebut dapat disimpulkan bahwa senyawa hasil sintesis berbeda dengan senyawa awal.

Identifikasi senyawa hasil sintesis dengan spektrometer $^1\text{H-NMR}$ dilakukan dengan menggunakan pelarut CDCl_3 . Pada hasil spektrum $^1\text{H-NMR}$ ditemukan adanya 12 proton, antara lain proton dari asam karboksilat pada pergeseran kimia 10,0 ppm (singlet) dengan jumlah proton 1H.

Proton dari alkena didapatkan pada pergeseran kimia 6,43 ppm (doblet) dengan tetapan kopling ($J = 16\text{ Hz}$) dengan jumlah proton 1H dan pada pergeseran kimia 7,52 ppm (doblet) dengan tetapan kopling ($J = 16\text{ Hz}$) dengan jumlah proton 1H. Berdasarkan Pavia dkk. (2015), diketahui bahwa gugus alkena dengan isomer *cis* memiliki nilai tetapan kopling sebesar 6 - 15 Hz, sedangkan untuk isomer *trans* sebesar 11 - 18 Hz. Tetapan kopling gugus alkena yang diperoleh dari spektrum $^1\text{H-NMR}$ sebesar 16 Hz yang menunjukkan bahwa senyawa yang terbentuk dalam posisi *trans*.

Proton dari cincin aromatis I didapatkan pada pergeseran kimia 7,53 ppm (doblet, 2H) dan 7,59 ppm (doblet, 2H) dengan tetapan kopling ($J = 8,8\text{ Hz}$). Berdasarkan Pavia dkk. (2015), menyatakan bahwa proton yang memiliki pasangan atom hidrogen pada posisi ortho memiliki nilai tetapan kopling sebesar 6 - 10 Hz. Tetapan kopling dari kedua proton pada cincin aromatis I sebesar 8,8 Hz yang menunjukkan bahwa kedua proton tersebut memiliki posisi *ortho*. Proton dari cincin aromatis II didapatkan pada pergeseran kimia 8,21 ppm (doblet, 2H) dengan tetapan kopling ($J = 9,2\text{ Hz}$), dan geseran kimia 7,67-7,77 ppm (multiplet, 3H). Pergeseran kimia dari proton-proton yang didapatkan pada spektrum $^1\text{H-NMR}$ tersebut mengarahkan bahwa senyawa yang terbentuk adalah asam *trans*-4-benzoiloksisinamat.

KESIMPULAN

Kondisi optimum sintesis asam 4-benzoiloksisinamat dengan katalis piridin dan menggunakan metode iradiasi gelombang mikro adalah pada power iradiasi 270 Watt selama reaksi 2 x 30 detik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya disampaikan kepada Universitas Airlangga yang telah membiayai penelitian ini dari dana PTUPT 2017-2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Ameta, S. C., Punjabi, P. B., Ameta, R. & Ameta, C. (2015). *Microwave-Assisted Organic Synthesis: A Green Chemical Approach*. 1st Ed. Canada: Apple Academic Press Inc.
- Carey, F. A. & Sundberg, R. J. (2001). *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reaction and Synthesis* (4th Ed.). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Caseley, E. A., Muench, S. P., Baldwin, S. A., Simmons, K., Fishwick, C. W. & Jiang, L. H. (2015). Docking of Competitive Inhibitors to the P2X7 Receptor Family Reveals Key Differences Responsible for Changes in Response between Rat and Human. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*; 25; 3164-3167.
- Ekowati, J., Diah, N. W., Miatmoko, A. & Hamid, I. S. (2017). *Rekayasa Senyawa Fenolik Turunan Asam Sinamat sebagai Anti-platelet dan Anti-kanker*. Laporan Penelitian; PTUPT Universitas Airlangga, Surabaya.
- Grundas, S. (2011). *Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials* (1st Ed). Rijeka: InTech.
- Neophytou, N., Leonis, G., Stavrinoudakis, N., Simic, M., Grdadolnik, S. G., Papavassilopoulou, E., Michas, P., Moutevelis-Minakakis, P., Papadopoulos, M. G., Zing, M. & Mavromoustakos, T. (2011). Docking and Molecular Dynamics Calculations of Pyrrolidinone Analog MMK16 Bound to COX and LOX Enzymes. *Molecular Informatics*; 30; 473-486.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S. & Vyvyan, J. R. (2015). *Introduction to Spectroscopy* (5th Ed). Stanford: Cengage Learning.
- Putra, G. S., Widiyana, A. P., Muchlashi, L. A., Sulistyowaty, M. I., Ekowati, J. & Budiati, T. (2017). The Influence of Ratio Pyridine and Triethylamine Catalysts on Synthesis 2-Phenyl-Benzo[D] [1,3] Oxazine-4-On Derivatives. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 9; 73-80.
- Quellette, R. J. & Rawn, J. D. (2014). *Organic Chemistry: Structure, Mechanism, and Synthesis* (1st Ed). San Diego: Elsevier.
- Solomon, T. W. G., Fryhle, C. B. & Snyder, S. A. (2016). *Organic Chemistry* (12th Ed). New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Zhao, Y., Liu, J., Zeng, C., Li, X. & Zhao, J. (2016). Anti-Inflammatory Effects of *p*-Coumaric Acid in LPS-Stimulated RAW264.7 Cells: Involvement of NF-κB and MAPKs Pathways. *Medical Chemistry*; 6; 327-330.

Pengaruh Matriks Kombinasi Alginat:Gelatin (2%:1%) terhadap Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Mikrosfer Probiotik *Lactobacillus acidophilus*

Tutie Purwanti*, Ria Puspita, Tristiana Erawati
Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: tutiek_purwanti@yahoo.com

Submitted: 17 Mei 2019

Accepted: 8 Juli 2019

Published online: 31 Juli 2019

Abstract

Background: *Microspheres* is one of the drug delivery systems that can be use for oral or topical delivery. The effectiveness of the microspheres as the drug delivery system is influenced by the polymer matrix component. **Objective:** The purpose of this study was to determine the effect of combination matrix sodium alginate:gelatin (2%:1%) on the characteristics of probiotic microspheres such as size, entrapment efficiency, and this antibacterial activity. **Methods:** The microspheres were made by different matrix using combination matrix sodium alginate:gelatin (2%:1%) (F-I), probiotic microspheres with 3% sodium alginate matrix (F-II) and probiotic microspheres with 3% gelatin matrix (F-III). The probiotic microspheres are made by extrusion technique, and dried using an oven. **Results:** The average particle size of F-I, F-II, and F-III were 8.03 μm , 9.69 μm , and 5.40 μm , respectively. The entrapment efficiency of F-I, F-II, and F-III were 77.48%, 84.20% and 87.93% respectively, while the antibacterial activity obtained inhibitory zone diameter of F-I, F-II, and F-III were 11.72 ± 0.58 mm, 9.8 ± 0.57 mm, and 9.27 ± 0.19 mm, respectively. The results of statistical test using the ANOVA method and followed by the HSD test were known that there were significant differences between F-I, F-II, F-III. **Conclusion:** It can be concluded that the probiotic microsphere F-I has a smaller size than F-I and greater than F-III. Probiotic microsphere F-I have the lowest entrapment efficiency, but have the greatest antibacterial activity compared to probiotic microsphere F-II and F-III.

Keywords: *microsphere, extrusion, sodium alginate, gelatin, probiotic Lactobacillus acidophilus*

Abstrak

Pendahuluan: Mikrosfer adalah salah satu sistem penghantaran obat yang dapat digunakan untuk menghantarkan obat pada pemakaian secara oral maupun topikal. Efektivitas mikrosfer sebagai sistem penghantar obat antara lain dipengaruhi oleh polimer penyusun matriknya. **Tujuan:** Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh matrik natrium alginat 2% : gelatin 1% terhadap karakteristik mikrosfer probiotik yaitu ukuran, efisiensi penjebakan, dan aktivitas antibakteri yaitu diameter zona hambatnya. **Metode:** Dibuat mikrosfer probiotik dengan matriks berbeda yaitu kombinasi alginat:gelatin (2%:1%) (F-I), matriks alginat 3% (F-II) dan matriks gelatin 3% (F-III). Mikrosfer probiotik dibuat dengan teknik ekstrusi dan dikeringkan menggunakan oven. **Hasil:** Hasil pemeriksaan karakteristik menunjukkan bahwa rerata ukuran partikel F-I, F-II, dan F-III berturut-turut adalah 8,03 μm , 9,69 μm , dan 5,40 μm . Efisiensi penjebakan F-I, F-II, dan F-III berturut-turut adalah 77,48 %, 84,20 %, dan 87,93 %. Sedangkan hasil uji aktivitas antibakteri, diperoleh diameter zona hambat F-I, F-II, dan F-III berturut-turut adalah $11,72 \pm 0,58$ mm , $9,8 \pm 0,57$ mm, dan $9,27, \pm 0,19$ mm. Hasil uji statistik dengan metode ANOVA yang dilanjutkan uji HSD menunjukkan adanya perbedaan signifikan pada ukuran, efisiensi penjebakan maupun diameter zona hambat antara mikrosfer probiotik F-I, F-II, F-III. **Kesimpulan:** Disimpulkan bahwa mikrosfer probiotik F-I dengan matriks kombinasi alginat:gelatin (2%:1%) memiliki ukuran yang lebih kecil dari F-I (matriks alginat 3%) dan lebih besar dari F-III (matriks gelatin 3%).

Mikrosfer probiotik F-I memiliki harga efisiensi penjebakan paling rendah, tetapi memiliki aktivitas antibakteri paling besar dibandingkan dengan mikrosfer probiotik F-II dan F-III.

Kata kunci: mikrosfer, ekstrusi, natrium alginat, gelatin, probiotik *Lactobacillus acidophilus*

PENDAHULUAN

Probiotik (*Lactobacillus acidophilus*) dalam jumlah tertentu, yaitu $\geq 10^7$ cfu/g dapat memberikan efek terapi bagi kesehatan, khususnya saluran pencernaan (Halász, 2009; Flourou-Paneri dkk., 2013). Beberapa penelitian yang telah dilakukan juga menunjukkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri penyebab infeksi kulit (Šuškić dkk., 2010; Lew & Liong, 2013). Hal ini disebabkan karena kandungan metabolit dari *Lactobacillus acidophilus* yaitu bakteriosin dapat bersifat sebagai antibakteri. Sehingga probiotik ini sangat potensial dikembangkan untuk penggunaan topikal untuk mengatasi *acne*, *aging*, *rosaceae*, dermatitis, inflamasi kulit dan infeksi bakteri (Lannitti & Palmieri, 2010; Inostroza dkk., 2012).

Permasalahannya adalah probiotik ini tidak stabil terhadap faktor suhu, kelembaban, pH, dan stres (Jood dkk., 2012). Sehingga untuk menjaga stabilitas dan memperpanjang efek farmakologi yang ditimbulkan, melalui pola pelepasan diperlambat diperlukan sistem penghantaran yang sesuai yaitu mikrosfer (Burgain dkk., 2011; Agnihotri dkk., 2012; Solanki dkk., 2013). Mikrosfer dibuat dengan cara mengenkapsulasi probiotik menggunakan matriks kombinasi natrium alginat-gelatin dengan penyambung silang larutan CaCl_2 . Dipilih metode ekstrusi, karena memiliki beberapa kelebihan yaitu sederhana, murah, mudah dilakukan, serta tidak menyebabkan kerusakan probiotik, karena tidak memerlukan suhu tinggi maupun pelarut organik (Manjanna dkk., 2010; Sahil dkk., 2011).

Karakteristik mikrosfer probiotik, dalam hal ini ukuran, efisiensi penjebakan dan aktivitas antibakteri dipengaruhi oleh jenis dan konsentrasi matriks, konsentrasi *cross linker*, pH saat pencampuran larutan matriks dan suspensi probiotik sebelum proses ekstrusi. Dalam proses mikroenkapsulasi dibutuhkan suatu matriks yang biasanya berupa polimer (Saijala dkk., 2011). Natrium alginat merupakan polimer alam yang banyak digunakan dalam proses mikroenkapsulasi karena sifatnya yang biokompatibel, biodegradabel, larut dalam air, tidak toksik dan relatif murah. Natrium alginat dapat membentuk gel dengan kation bervalensi dua antara lain ion Ca^{2+} , sehingga pada penelitian ini

digunakan larutan CaCl_2 sebagai bahan penyambung silang. Selain keuntungan yang telah disebutkan, ternyata alginat memiliki kekurangan yaitu mikrosfer yang dihasilkan terlalu porus, sehingga kurang optimal dalam melindungi probiotik dari faktor lingkungan. Struktur yang porus tersebut juga akan mengakibatkan kemampuan menjebak probiotik rendah (Chávarri dkk., 2012). Oleh karena itu diperlukan polimer lain untuk meminimalkan kekurangan tersebut. Gelatin merupakan polimer yang bersifat biodegradabel, biokompatibel, stabil pada rentang pH yang luas, murah, memiliki daya pengembangan yang baik, dan bisa mengalami sambung silang seperti natrium alginat (GMIA, 2012; Elzoghby, 2013).

Karena sifat amfoternya, gelatin dapat dikombinasikan dengan polisakarida anionik seperti natrium alginat (Li dkk., 2009). Selain itu kombinasi natrium alginat dan gelatin sebagai matriks akan mengurangi porositas, karena matriks yang terbentuk lebih kompak, sehingga ukuran partikel lebih kecil dan kemampuan menjebak lebih besar (Li dkk., 2009).

Dalam penelitian ini, dibuat tiga macam mikrosfer probiotik yaitu F-I dengan matriks kombinasi natrium alginat:gelatin (2%:1%), F-II dengan matriks alginat 3% dan F-III dengan matriks gelatin 3%. Mikrosfer probiotik ekstrusi dikeringkan menggunakan oven dengan temperatur kurang dari 40°C . Selanjutnya dilakukan pemeriksaan ukuran partikel, efisiensi penjebakan dan aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* dengan mengukur diameter zona hambatnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Lactobacillus acidophilus dari Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gajah Mada, *Staphylococcus aureus*, gelatin tipe B (*Pharmaceutical Grade*), Natrium alginat (*Pharmaceutical Grade*), kalsium klorida (*Food Grade*), air suling steril, media *de Man Ragoza Shorpe* (MRS) Broth steril, *Natrium Klorida* (*Pro Analysis*), *Phosphate Buffer Salin* (PBS) steril, Agar AA (*Food Grade*) dan Media Nutrien Agar (NA) steril.

Alat

Plate Stirer (Dragon Lab MS pro), pH meter SCHOTT glass mainz tipe CG 842, spektrofotometer FTIR (Jasco FT-IR/5300), alat Ekstrusi, Mikroskop Optik, incubator (Memmert INB 500), *Colony counter*

(Suntex 570), Vortex (Labinco L46), Autoklaf (Huxley HL340), *Thermoshaker* (Gerhardl Labshake), Ultra sentrifugator Hermle Z36HK timbangan analitik, Oven, Cawan Petri, Ôse, pipet mikro, jangka sorong.

Tabel 1. Formula mikrosfer probiotik

Bahan	Fungsi	F-I	F-II	F-III
*suspensi Probiotik:				
<i>L. acidophilus</i>	Bahan Aktif	10 mL	10 mL	10 mL
Gelatin tipe B	Matriks	1,5 g (1%)	-	4,5 g (3%)
Natrium alginat	Matriks	3 g (2%)	4,5 g (3%)	-
Aquadest	Pelarut	140 mL	140 mL	140 mL
CaCl ₂ 1,5 M	<i>Cross linker</i>	300 mL	300 mL	300 mL

* suspensi probiotik diambil saat jumlah mikroba minimal $10^6 - 10^7$ cfu/mL

Keterangan:

F-I : Formula mikrosfer probiotik dengan matriks kombinasi natrium alginat:gelatin (2%:1%)

F-II : Formula mikrosfer probiotik dengan matriks natrium alginat 3% (sebagai kontrol)

F-III : Formula mikrosfer probiotik dengan matriks gelatin 3% (sebagai kontrol)

Pembuatan mikrosfer probiotik

Dibuat mikrosfer probiotik berbagai formula dengan matriks yang berbeda, sesuai komposisi yang tertera pada Tabel 1. Diukur probiotik 5 mL dari starter yang sudah memenuhi persyaratan. Disiapkan larutan natrium alginat dan gelatin dengan cara natrium alginat dan gelatin didispersikan ke dalam aquadest 140 mL sambil terus diaduk lalu disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Selanjutnya masukkan suspensi probiotik ke dalam larutan natrium alginat-gelatin sambil diaduk sampai homogen, lakukan pemeriksaan jumlah koloni menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT) sebelum dilakukan proses ekstrusi. Siapkan larutan kalsium klorida 1,5 M 300 mL sebagai larutan penyambung silang. Disemprotkan campuran suspensi probiotik dan larutan polimer melalui *noozle* yang di bawahnya sudah ada media penampung yaitu larutan kalsium klorida 1,5 M. Ukuran diameter *noozle* 45 µm, jarak antara *noozle* dengan larutan kalsium klorida 8 cm dan tekanan kompresor 40 Psi. Dilakukan pengadukan selama 1 jam dengan kecepatan 1000 rpm. Mikrosfer yang terbentuk dipisahkan dari larutan CaCl₂ dengan cara disentrifugasi 2500 rpm selama 6 menit, lalu dicuci dengan air steril, sampai bebas CaCl₂. Dilakukan penyaringan dan mikrosfer probiotik yang diperoleh dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 30 jam (Poshadri & Kuna, 2010; Prasant dkk., 2011).

Penentuan ukuran partikel

Pengukuran ukuran partikel dilakukan menggunakan mikroskop optik yang dilengkapi dengan

micrometer okular dan obyektif (Martin, 2002) dengan sampel 300 partikel mikrosfer.

Uji efisiensi pengebakan

Uji efisiensi pengebakan dilakukan menggunakan metode Angka Lempeng Total (ALT). Uji efisiensi pengebakan dilakukan untuk melihat adanya pengaruh proses pembuatan mikrosfer terhadap viabilitas bakteri. Ditimbang 0,5 gram mikrosfer probiotik, kemudian didispersikan ke dalam 50 mL larutan PBS steril pada pH 7,4 dan di *shaker* selama 2 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran 10x, dan dilakukan plating pada media MRS agar. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Perhitungan jumlah koloni bakteri probiotik diekspresikan dengan menggunakan satuan *colony forming units* (cfu)/gram (Mokarram dkk., 2009). Efisiensi pengebakan merupakan perbandingan antara jumlah koloni sesudah dibuat mikrosfer dengan jumlah koloni sebelum dibuat mikrosfer dikalikan 100%.

Uji aktivitas antibakteri

Preparasi media uji

Bahan media nutrien agar (NA) sebanyak ± 23 gram dilarutkan didalam ± 1 liter air suling dan diaduk hingga homogen. Larutan dipanaskan dengan pemanasan perlahan, hingga mendidih selama satu sampai dua menit. Larutan yang sudah homogen dituang kedalam wadah dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Bahan media *nutrien broth* (NB) sebanyak ± 8 gram dilarutkan kedalam ± 1 liter air suling dan diaduk

hingga homogen. Larutan dipanaskan dengan pemanasan perlahan hingga mendidih selama satu atau dua menit. Setelah homogen larutan dituang kedalam wadah dan disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.

Penyiapan sampel

Ditimbang 200 miligram mikrosfer probiotik, dicampur dengan 10 mL larutan PBS 7,4 steril dan di *shaker* selama 2 jam.

Penyiapan inokulum bakteri

Sebanyak 1 kawat Öse biakan murni *S. aureus* dari stok biakan dimasukkan pada media NB. Kemudian tabung disimpan dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam. Sebanyak 5 mL larutan garam fisiologis (salin) ditambahkan ke dalam tabung, dikocok sampai seluruh biakan terlepas sehingga didapatkan $1,4 \times 10^8$ cfu. Biakan setara dengan absorbansi 0,885 diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm sampai diperoleh transmittansi 25% (Johnson & Levin, 2013).

Uji aktivitas daya hambat terhadap *Staphylococcus aureus*

Disiapkan 2 buah tabung reaksi yang masing-masing berisi media NA steril sebanyak 8 mL (*seed layer*) dan 10 mL (*base layer*). Media *base layer* dituangkan kedalam cawan petri steril, dibiarkan memadat. Masukkan 3 µm inokulum *S. aureus* kedalam tabung *seed layer* pada suhu 40 - 45°C, kemudian di vortex. Selanjutnya dituang secara merata pada permukaan *base layer* dalam cawan petri dan biarkan memadat. Dibuat lubang atau sumuran pada agar dengan pipa pencetak sesuai dengan ketentuan. Isi masing-masing lubang tersebut dengan 50 µL yaitu 1 (kontrol positif), 1 (kontrol negatif), 1 (suspensi probiotik), 3 (sampel F-I), 3 (sampel F-II), dan 3

(sampel F-III), kemudian cawan petri dibungkus kertas dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona terang yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong (milimeter). Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik gentamisin sulfat, sedangkan kontrol negatif adalah semua bahan dalam formula selain suspensi probiotik. Pengujian dilakukan tiga kali replikasi untuk masing-masing sampel uji.

Analisa data

Pengolahan data karakteristik yaitu ukuran, efisiensi pengebakan dan aktifitas anti bakteri *L. acidophilus* dilakukan secara statistik dengan metode analisis varian *one way ANOVA*, yang dilanjutkan dengan uji *Honesty Significant Difference (HSD)* Tukey dengan derajat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi mikrosfer probiotik

Dari hasil pengamatan mikrosfer probiotik yang dilihat di bawah mikroskop optik perbesaran 400x terlihat mikrosfer yang sferis. Hal ini disebabkan karena pada proses pembuatan larutan polimer-probiotik disemprotkan melewati lubang/pori dengan ukuran tertentu, sehingga membentuk *droplet* cair yang sferis dan ketika mengalami pemadatan akibat proses sambung silang menghasilkan mikrosfer yang sferis juga (Joshi dkk., 2012).

Distribusi ukuran mikrosfer probiotik

Hasil pengukuran mikrosfer probiotik menggunakan mikroskop dengan skala okuler 10 dan skala objektif 40. Digunakan 300 partikel pada setiap kali pengukuran. Hasil penentuan ukuran partikel diperoleh rerata ukuran mikrosfer probiotik seperti yang tercantum pada Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Rerata ukuran mikrosfer probiotik

Mikrosfer Probiotik	Rata-rata Ukuran (µm)
F-I (Alginate:Gelatin (2%:1%))	8,03
F-II (Alginate 3%)	9,69
F-III (Gelatin 3%)	5,40

Rerata ukuran mikrosfer probiotik F-I, F-II, dan F-III berturut-turut adalah 8,03 µm, 9,69 µm, dan 5,40 µm. Ukuran partikel terkecil pada F-III yaitu mikrosfer probiotik dengan matrik gelatin 3% dan ukuran terbesar adalah pada F-II yaitu mikrosfer probiotik dengan matrik natrium alginat 3%. Sedangkan F-I yaitu mikrosfer probiotik dengan matriks kombinasi natrium alginat:gelatin (2%:1%) memiliki ukuran lebih besar dari F-III, lebih kecil dari

F-II. Natrium alginat tersusun atas asam guluronat (blok G) dan manuronat (blok M). Pada proses sambung silang terjadi interaksi antara ion Ca^{2+} dengan gugus karboksil pada asam guluronat yang saling berdekatan saja, sedangkan gugus karboksil pada asam manuronat tetap berjajar horizontal dalam keadaan bebas, sehingga menyebabkan ukuran partikel natrium alginat lebih besar dibandingkan dan struktur yang terbentuk porus. Sedangkan pada mikrosfer probiotik

F-I dengan matriks kombinasi natrium alginat-gelatin terbentuk struktur yang lebih kompak dengan porositas yang rendah. Sehingga mikrosfer yang terbentuk memiliki ukuran lebih kecil.

Berdasarkan distribusinya, ukuran dari mikrosfer probiotik F-I, F-II, dan F-III berkisar antara 3 sampai 15 mikron, sehingga masih memenuhi persyaratan ukuran untuk mikrosfer dengan tujuan penggunaan topikal.

Tabel 3. Hasil perhitungan log ALT *Lactobacillus acidophilus*

Formula	ALT (cfu/mL)		log ALT (cfu/mL)	
	Sebelum dibuat mikrosfer	Setelah dibuat mikrosfer	Sebelum dibuat mikrosfer	Setelah dibuat mikrosfer
F-I	$9,37 \times 10^7 \pm 3,51 \times 10^6$	$1,15 \times 10^6 \pm 7,4 \times 10^4$	$7,97 \pm 0,01$	$6,06 \pm 0,02$
F-II	$1,58 \times 10^7 \pm 1,07 \times 10^6$	$1,08 \times 10^6 \pm 7,35 \times 10^4$	$7,20 \pm 0,03$	$6,03 \pm 0,03$
F-III	$7,60 \times 10^6 \pm 7,94 \times 10^5$	$1,02 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^4$	$6,88, \pm 0,04$	$6,01 \pm 0,00$

Keterangan: Data merupakan rata-rata dari replikasi $3x \pm SD$

Dari Tabel 3 diketahui bahwa terjadi penurunan jumlah koloni pada masing-masing mikrosfer probiotik, sebagai akibat proses ekstrusi. Nilai ALT terkecil terjadi pada F-III, namun jumlah koloni ketiga mikrosfer probiotik masih memenuhi persyaratan viabilitas yang dibutuhkan yaitu $10^6 - 10^7$ cfu/mL (Flourou-Paneri dkk., 2013).

Tabel 4. Efisiensi pengebakan mikrosfer probiotik

Mikrosfer Probiotik	Efisiensi Pengebakan (%)
F I	$77,48 \pm 0,17$
F II	$84,20 \pm 0,16$
F III	$87,93 \pm 0,43$

Keterangan: Data merupakan rata-rata dari replikasi $3x \pm SD$

Dari Tabel 4 dapat diketahui bahwa ada pengaruh proses pembuatan mikrosfer terhadap viabilitas *Lactobacillus acidophilus* dalam mikrosfer yaitu terjadinya penurunan viabilitas yang ditunjukkan adanya penurunan jumlah koloni bakteri.

Efisiensi pengebakan diperhitungkan sebagai jumlah koloni bakteri sesudah proses (terjebak dalam mikrosfer) dibagi dengan jumlah koloni sebelum dilakukan proses ekstrusi kemudian dikalikan 100 %. Hasil perhitungan koloni dengan metode ALT diperoleh nilai ALT mikrosfer probiotik F-I, F-II dan F-III sebelum ekstrusi berturut-turut adalah $9,37 \times 10^7 \pm 3,51 \times 10^6$ cfu/g, $1,58 \times 10^7 \pm 1,07 \times 10^6$ cfu/mL, dan $7,60 \times 10^6 \pm 7,94 \times 10^5$ cfu/mL. Nilai ALT dari ketiga formula memenuhi syarat jumlah probiotik sebagai antibakteri yaitu $10^6 - 10^7$ cfu/mL (Flourou-Paneri dkk., 2013). Nilai ALT F-I, F-II dan F-III setelah proses ekstrusi berturut-turut adalah $1,15 \times 10^6 \pm 7,4 \times 10^4$ cfu/mL, $1,08 \times 10^6 \pm 7,35 \times 10^4$ cfu/mL, dan $1,02 \times 10^6 \pm 1,39 \times 10^4$ cfu/mL. Dari data ini dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh pembuatan mikrosfer terhadap efisiensi pengebakan bakteri yaitu mengalami penurunan jumlah bakteri yang hidup. Hasil penentuan

efisiensi pengebakan dari ketiga mikrosfer berturut turut formula I, II, dan III adalah 77,48%, 84,20%, dan 87,93%. Hasil analisa statistik dengan *One Way* Anova dan *post hoc* HSD, diketahui bahwa terdapat perbedaan signifikan pada ketiga mikrosfer probiotik. Efisiensi pengebakan terendah terjadi pada mikrosfer probiotik F-I dan tertinggi pada mikrosfer probiotik F-III. Namun ketiga mikrosfer probiotik masih memenuhi ketentuan viabilitas yang dipersyaratkan.

Uji aktivitas antibakteri mikrosfer probiotik

Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan bakteri uji *S. aureus* dengan cara mengukur diameter zona hambatnya. *S. aureus* adalah bakteri patogen yang dapat menyebabkan infeksi pada kulit. Hasil pengukuran diameter zona hambat ketiga formula mikrosfer probiotik dapat dilihat pada Tabel 5. Diameter zona hambat mikrosfer probiotik F-I, F-II, dan F-III berturut turut adalah $11,72 \pm 0,58$ mm, $9,8 \pm 0,57$ mm, dan $9,27 \pm 0,19$ mm. Setelah dilakukan analisa statistik *One Way* Anova dilanjutkan *post hoc* HSD, terdapat perbedaan signifikan aktivitas antibakteri pada ketiga mikrosfer probiotik tersebut. Mikrosfer probiotik dengan matriks kombinasi alginat dan gelatin memberikan aktivitas yang lebih besar dibanding formula dengan polimer tunggal, baik natrium alginat 3% maupun gelatin 3%. Diameter zona hambat tertinggi dihasilkan oleh mikrosfer probiotik F-I yaitu sebesar $11,72 \pm 0,58$ mm.

Tabel 5. Diameter zona hambat mikrosfe probiotik

Mikrosfer	Zona Hambat (mm)
Mikrosfer F-I	$11,72 \pm 0,58$
Mikrosfer F-II	$9,8 \pm 0,57$
Mikrosfer F-III	$9,27 \pm 0,19$
Kontrol Positif	$13,22 \pm 0,01$

Keterangan:

Data merupakan rata-rata dari replikasi $3x \pm SD$
Kontrol positif = Gentamisin sulfat

Berdasarkan hasil Log ALT (setelah ekstrusi dan oven) dan aktivitas menunjukkan bahwa hasil Log ALT mikrosfer probiotik F-I > F-II > F-III, dan aktivitas antibakteri F-I > F-II > F-III. Terlihat bahwa harga log ALT linier dengan aktivitas antibakteri, semakin besar harga log ALT, maka semakin tinggi pula aktivitas antibakterinya.

Efisiensi pengebakan F-III > F-II > F-I, namun uji aktivitas F-I > F-II > F-III. Hal ini menunjukkan bahwa mikrosfer probiotik F-I dengan matriks kombinasi natrium alginat-gelatin menghasilkan efisiensi pengebakan terendah namun memberikan aktivitas antibakteri paling tinggi dibanding formula lain. Hal ini dapat dijelaskan dengan data transmitan. Dimana % transmitan F-I, F-II dan F-III berturut turut adalah 81,60%, 85,60%, dan 89,50%. Sedangkan hasil efisiensi pengebakan pada formula I, II dan III adalah 77,48%, 84,20%, dan 87,93%. Semakin rendah transmitan, berarti semakin kecil intensitas cahaya yang diteruskan. Hal dikarenakan semakin banyak jumlah sel bakteri. Oleh karena itu, pada F-I aktivitas antibakterinya paling tinggi, meskipun efisiensi pengebakannya paling rendah. Hal ini disebabkan karena transmitan F-I paling rendah.

Setelah dilakukan kesetaraan konsentrasi terhadap kontrol positif gentamisin sulfat dapat disimpulkan bahwa mikrosfer probiotik F-I, F-II, dan F-III memiliki nilai diatas harga MIC gentamisin sulfat. Minimum *Inhibitory Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah suatu antibakteri yang dapat menghambat kehidupan mikroorganisme lain (Kumar & Kar, 2014). Kesetaraan konsentrasi mikrosfer probiotik F-I, F-II, dan F-III dengan gentamisin sulfat secara berturut turut adalah 4,45 ppm, 1,19 ppm, dan 0,30 ppm, sedangkan MIC gentamisin sulfat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 0,71 ppm (Johnson & Levin, 2013). Dapat disimpulkan bahwa mikrosfer probiotik F-I dan F-II mempunyai efektivitas sebagai antibakteri.

KESIMPULAN

Mikrosfer probiotik dengan matriks kombinasi natrium alginat-gelatin (2%:1%) memiliki efisiensi pengebakan *Lactobacillus acidophilus* paling kecil, dan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* paling besar dibandingkan dengan mikrosfer probiotik dengan matriks natrium alginat 3% dan matriks gelatin 3%. Sedangkan ukuran partikelnya lebih kecil dari mikrosfer probiotik dengan matriks natrium alginat 3%, tetapi lebih besar dari mikrosfer probiotik dengan matriks gelatin 3%.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnihotri, N., Mishra, R., Goda, C. & Arora, M. (2012). Microencapsulation - A Novel Approach in Drug Delivery: A Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2; 1-20.
- Burgain, J., Gaiani, C., M., Linder & Scher, J. (2011). Encapsulation of Probiotic Living Cells: From Laboratory Scale to Industrial Applications. *Journal of Food Engineering*; 104; 467-483.
- Chávarri, M., Marañón, I. & Villarán, C. (2012). Encapsulation Technology to Protect Probiotic Bacteria. London: IntechOpen.
- Elzoghby, A. E. (2013). Gelatin-based Nanoparticles as Drug and Gene Delivery Systems: Reviewing three Decades of Research. *Journal of Controlled Release*; 172; 1075-1091.
- Flourou-Paneri, P., Christaki, E. & Bonos, E. (2013). Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients: Lactic Acid Bacteria – R & D for Food. London: IntechOpen.
- GMIA. (2012). Gelatin Handbook. Massachusetts: Atlantic Gelatin/Kraft Foods Global Inc.
- Halász, A. (2009). Food Quality and Standards Vol III: Lactic Acid Bacteria. Oxford: EOLSS Publication.
- Inostroza, E. C., Yanez, B., Riquelme, G. & Storh, K. (2012). Formulation Based on the Synthesis of Microspheres Made from Cross Linked Natural Gelatin, Used as a Carrier for Strains of Probiotic *Lactobacillus* spp. for Treating Skin Wounds and/or Lesions. Paris: European Patient Application.
- Johnson, P. J. T. & Levin, B. R. (2013). Pharmacodynamics, Population Dynamics, and the Evolution of Persistence in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Genetics*; 9; 1-13.
- Jood, S., Khetarpaul, N. & Goyal, R. (2012). Effect of Germination and Probiotic Fermentation on pH, Titratable Acidity, Dietary Fibre, β -glucan and Vitamin Content of Sorghum Based Food Mixtures. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; 2; 1-4.
- Joshi, S., Patel, P., Lin, S. & Madan, P. L. (2012). Development of Cross Linked Alginate Spheres by Ionotropic Gelation Technique for Controlled Release of Naproxen Orally. *Asian Journal of Pharmaceutical Science*; 7; 134-142.
- Kumar, R. & Kar, A. (2014). Microencapsulation of Nutraceuticals Using Spray Freeze Drying Method: A Brief Review. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*; 4; 47-51.

- Lannitti, T. & Palmieri, B. (2010). Therapeutical Use of Probiotic Formulations in Clinical Practice. *Clinical Nutrition*; 29; 701-725.
- Lew, L. C. & Liong, M. T. (2013). Bioactives from Probiotics for Dermal Health: Functions and Benefits. *Journal of Applied Microbiology*; 114; 1241-1253.
- Li, X. Y., Chen, X. G., Cha, D. S., Park, H. J. & Liu, C. S. (2009). Microencapsulation of a Probiotic Bacteria with Alginate-Gelatin and Its Properties. *Journal of Microen-capsulation*; 26; 315-324.
- Manjanna, K. M., Pramodkumar, T. M. & Shivakumar, B. (2010). Calcium Alginate Cross-linked Polymeric Microbeads for Oral Sustained Drug Delivery in Arthritis. *Drug Discoveries and Therapeutics*; 4; 109-122.
- Martin, M. (2002). Surfactans and Polymers in Drug Delivery. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Habibi, N. M. B. & Shahidi, F. (2009). The Influence of Multi Stage Alginat Coating on Survivability of Potential Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal Juice. *Food Research International*; 42; 1040-1045.
- Poshadri, A. & Kuna, A. (2010). Microen-capsulation Technology: A Review. *The Journal of Research Angrau*; 38; 86-102.
- Prasant, V. V., Moy, A. C., Mathew, S. T. & Manthapan, R. (2011). Microspheres - An Overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*; 2; 332-338.
- Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A. & Kapoor, B. (2011). Microsphere: A Review. *International Journal Of Research In Pharmacy And Chemistry*; 1; 1184-1198.
- Saijala, A., Krishna, P., Amareshwar & Chakravarty, P. (2011). Different Techniques Used for the Preparation of Nanoparticles using Natural Polymers and Their Application. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*; 3; 45-50.
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Dushyant, A. S., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., Thakar, P. M. (2013). Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotis as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International*; 2013; 1-21.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K. & Matošić, S. (2010). Antimicrobial Activity – the Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology*; 48; 296-307.

JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

(P-ISSN: 2406-9388; E-ISSN: 2580-8303)

SEKRETARIAT: d/a Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Jl. Dharmawangsa Dalam, Telp. (031)5033710 Fax. (031)5020514, Surabaya-60286 Email: jfiki@ff.unair.ac.id

Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia (JFIKI) menerima naskah tulisan hasil penelitian, survei, telaah pustaka yang erat kaitannya dengan bidang kesehatan, khususnya bidang kefarmasian. JFIKI terbit tiap enam bulan. Naskah yang dimuat adalah naskah hasil seleksi yang telah disetujui Dewan Redaksi dan belum pernah dipublikasikan di penerbitan lain.

Naskah dikirimkan via email kepada Redaksi Pelaksana d.a. jfiki@ff.unair.ac.id

PETUNJUK BAGI PENULIS

1. Naskah ditulis dengan program Microsoft Word Jenis huruf: Times New Romans, 10 point regular, justify, line spacing menggunakan multiple 1,2. Struktur kimia dapat dibuat dengan Chemdraw. Foto dan gambar dalam format jpg/jpeg dan untuk grafik dapat digunakan excel.
2. File gambar dan tabel ditempatkan terpisah dari file naskah.
3. Gambar termasuk grafik dibuat terpisah dari naskah, maksimum 1 halaman dan minimum ¼ halaman. Judul gambar ditulis di bagian bawah gambar dengan nomor urut angka arab.
4. Tabel dan keterangan: tabel harus utuh dalam satu halaman. Judul tabel ditulis di bagian atas tabel dengan nomor urut angka arab.
5. Naskah ditulis dalam Bahasa Indonesia atau bahasa Inggris, disusun dengan urutan sebagai berikut:
 - a. **Judul** ditulis dengan 'Title Case' (huruf kapital pada huruf pertama setiap kata kecuali kata hubung), bold, maksimum 15 kata.
 - b. **Nama penulis/para penulis** (tanpa gelar; nama depan ditulis dengan huruf kecil kecuali huruf pertama, sedangkan nama akhir ditulis dengan huruf kapital semua) beserta nama lengkap instansi penulis. Jika para penulis berasal dari instansi yang berbeda maka gunakan tanda ¹, ², ³ dan seterusnya di belakang nama masing – masing penulis. Penulis yang menjadi * alamat korespondensi diberi tanda * dan harus disertai alamat institusi lengkap beserta *e-mail*.
 - c. **Abstrak:** ditulis dalam bahasa Indonesia dan bahasa Inggris, maksimum 250 kata. **Abstract** dalam bahasa Inggris disusun sebagai berikut: *Background, objective, Method, Result and Conclusion*. **Abstrak** dalam bahasa Indonesia disusun sebagai berikut: Pendahuluan, Tujuan, Metode, Hasil dan Kesimpulan.

- d. **Kata kunci/Keywords:** 1 – 5 kata.
- e. **PENDAHULUAN**
Berisi latar belakang dan tujuan penelitian.
- f. **BAHAN DAN METODE**
Berisi penjelasan tentang: **Bahan** (sebutkan asal dan kualifikasinya); **Alat** (hanya yang sangat menentukan hasil penelitian; sebutkan nama, merk dan kualifikasinya); **Metode** (prosedur dilakukannya penelitian).
- g. **HASIL DAN PEMBAHASAN**
Berisi penjelasan tentang hasil dari semua tahapan yang telah dijelaskan dibagian metode.
- h. **KESIMPULAN**
Berisi tentang ringkasan dari apa yang didapatkan dari hasil penelitian serta apa yang perlu dipelajari lebih lanjut.
- i. **UCAPAN TERIMA KASIH**
Berisi ucapan terimakasih kepada pihak-pihak yang membantu dalam penelitian.
- j. **DAFTAR PUSTAKA** (lihat petunjuk)
Disarankan untuk menggunakan fitur citation dan bibliography yang ada pada Microsoft Word dengan menggunakan APA style.
6. **Pustaka dalam naskah** ditunjukkan dengan nama akhir penulis diikuti tahun. Bila pustaka mempunyai lebih dari dua penulis, ditulis nama akhir penulis utama diikuti dengan *et al.* (bila bahasa

Inggris) dan dkk. (bila bahasa Indonesia). Lalu tahun. Contoh:

Kultur suspensi sel *Solanum mammosum* mempunyai kemampuan melakukan biotransformasi salisilamida menjadi glikosidanya (Syahrani dkk., 1997)

7. **Daftar Pustaka** disusun berdasarkan abjad nama akhir penulis utama.

- a. **Majalah/jurnal** (*standard journal article*): nama akhir ditulis lengkap, diikuti singkatan nama lainnya yang diambil dari huruf depan nama tersebut, setelah itu ditulis tahun terbit, judul artikel, nama majalah/jurnal (ditulis lengkap tidak disingkat) dan volume (ditulis miring / *italic*) terakhir nomor halaman. Contoh:

Bosworth, H. B., Olsen, M. K., McCant, F., Harrelson, M., Gentry, P. & Rose, C. (2007). Hypertension Intervention Nurse Telemedicine Study (HINTS): testing a multifactorial tailored behavioral/educational and a medication management intervention for blood pressure control. *American Heart Journal*; 153; 918-24.

- b. **Buku:** semua nama penulis disebutkan (nama akhir ditulis lengkap, diikuti singkatan nama depan), tahun terbit, judul artikel, nama editor, judul buku dan volume (ditulis miring/*italic*), edisi, penerbit, kota dan nomor halaman. Contoh:

Cade, J. F. & Pain, M. C. F. (1988). Essentials of Respiratory Medicine. *Blackwell Science*; 220-230. Oxford: ABC Publishing.

Colby, V. T., Carrington, C. B. & Pain, M. C. F. (1999) Infiltrative lung disease In: Thurlbeck WM (ed.) *Pathology of the Lung*; 198-213. New York: Thieme Medical Publishers.

c. **Materi elektronik** (*electronic material*). Contoh:

World Health Organisation. (2003). Update 94: Preparing for the Next Influenza Season in a World Altered by SARS. <http://www.who.international/csr/disease/influenza/sars>. Accessed: 15 September 2003.

d. **Skripsi, tesis, disertasi atau poster** serta lainnya. Contoh:

Dina, S. (2004). Uji Antimalaria In Vivo Isolat *Andrographis paniculata* dari *Andrographis paniculata* Nees Terhadap *Plasmodium berghei* pada Mencit. *Skripsi*; Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

8. **Singkatan (Abbreviations):**

Penggunaan singkatan tidak disarankan kecuali untuk standar satuan ukuran (misal g, mg, mL, Kg atau cm). Singkatan yang digunakan harus didefinisikan dalam kurung pada saat disebutkan pertama kali di dalam *abstract* dan lagi di dalam naskah. Singkatan harus ditulis kembali pada keterangan gambar atau tabel, jika ada. Daftar singkatan yang digunakan dan definisi harus disertakan sebagai bagian dari naskah.

9. **Naskah yang diterima akan dikoreksi**, diberi catatan dan dikirimkan kembali kepada penulis untuk diperbaiki. Penulis mengirimkan kembali naskah yang telah diperbaiki dalam bentuk cetakan dan bentuk file.

10. Penulis akan menerima satu eksemplar naskah terbitan.