

Vol. 7 No. 2 Desember 2020



Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia

E-ISSN: 2580-8303
P-ISSN: 2406-9388



DITERBITKAN OLEH:
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA berkolaborasi dengan
IKATAN APOTEKER INDONESIA (IAI) PENGURUS DAERAH JAWA TIMUR



Terakreditasi SINTA 3
No: B/3693/E5/E5.2.1/2019

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

Penanggung Jawab:

Prof. Junaidi Khotib, M.Kes., Ph.D., 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:

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

Sekretaris:

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

Anggota:

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

Andang Miatmoko, M.Sc., Ph.D., Apt.

Lili Fitriani, S.Si, M.Pharm.SC, Apt.

Prof. Dr. Akhmad Kharis Nugroho, S.Si., M.Si., Apt.

Dr. Isnaeni, M.S., Apt.

Kartini, S.Si., M.Si., Apt., Ph.D.

Dr. Yulistiani, M.Si., Apt.

Aris Widayati, M.Si., Ph.D., Apt.

Deka Prismawan, S.Farm., M.Sc., Apt.

Tegar Achsendo Yuniarta, S.Farm., M.Si.

Rr Retno Widyowati, S.Si., M.Pharm, Ph.D., Apt.

Rudiyansyah, S.Si, M.Si, Ph.D.

Didik Setiawan, Ph.D., Apt.

Mufarrihah, S.Si., M.Sc., Apt.

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

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 diunduh 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 kepada dua *reviewer* yang pakar di bidangnya, 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 telah melalui proses *editing* 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.	Pengaruh Penambahan SPACE terhadap Karakteristik dan Stabilitas <i>Gel Freeze Dried Amniotic Membrane Stem Cell-Metabolite Product</i> Ria Hanistya, Tristiana Erawati, Cita Rosita Sigit Prakoeswa, Fedik Abdul Rantam, Widji Soeratri	59-65
2.	Pengaruh Asam Hialuronat-Space Peptide terhadap Karakteristik, Stabilitas Fisik <i>Gel Amniotic Membran-Stemcell Metabolite Product</i> Rina Mutya Suzliana, Tristiana Erawati, Cita Rosita Sigit Prakoeswa, Fedik Abdul Rantam, Widji Soeratri	66-73
3.	Optimasi Metode dan Uji Stabilitas pada Penetapan Kadar Filantin dalam Ekstrak <i>Phyllanthus niruri</i> Menggunakan KLT-Densitometri Rachma Nurhayati, Riesta Primaharinastiti, Mochamad Yuwono	74-79
4.	Optimasi Metode KCKT-ELSD dengan Pemisahan HILIC untuk Penetapan Kadar Glukosamin Hidroklorida pada Suplemen Kesehatan Etik Wahyuningsih, Riesta Primaharinastiti, Mochammad Yuwono	80-87
5.	Faktor Risiko Kejadian Diabetes Melitus pada Akseptor Pengguna Kontrasepsi Oral Nurmainah, Rafli Armandani, Mohammad Andrie	88-92
6.	Studi Interaksi Molekuler Aktivitas Antimikroba Peptida Bioaktif terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> secara <i>In silico</i> Taufik Muhammad Fakhri, Mentari Luthfika Dewi	93-99
7.	Karakterisasi Ekstrak Etanol Buah <i>Citrus amblycarpa</i> (L), <i>Citrus aurantifolia</i> (S.), dan <i>Citrus sinensis</i> (O.) Andhi Fahrurroji, Hafrizal Riza	100-113

Pengaruh Penambahan SPACE terhadap Karakteristik dan Stabilitas Gel Freeze Dried Amniotic Membrane Stem Cell-Metabolite Product

Ria Hanistya¹, Tristiana Erawati¹, Cita Rosita Sigit Prakoeswa^{2,3}, Fedik Abdul Rantam^{4,5}, Widji Soeratri^{1*}

¹Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, Indonesia

³Departemen Dermatologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁴Pusat Penelitian dan Pengembangan Stem Cell, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁵Laboratorium Virologi dan Imunologi, Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: widjisoeratri@yahoo.com

Submitted: 17 Januari 2020

Accepted: 31 Januari 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Skin, the largest organ in human body is an important site for delivering drug or active ingredients. Some active ingredients are macromolecule with molecule size more than 500 Da hence delivering it into stratum corneum become more challenging and need penetration enhancer to traverse the stratum corneum. SPACE (Skin Penetrating and Cell Entering) are sequences of small molecule of peptide which have demonstrated their potential as enhancer in delivering macromolecule in non invasive way. SPACE is nouvelle enhancer and the study about their effects on physical characteristic and stability in topical gel formulation are limited. **Objective:** This research was conducted to examine the effect of SPACE toward physical characteristic and stability of Amniotic Membrane Stem Cell-Metabolite Product gel. **Methods:** Gel physical characteristics were measured by evaluating gel physical appearance, pH and spreading diameter measurement. The physical stability test was evaluated by observing organoleptic parameter, pH and spreading diameter measurement during 30 days of storage. **Results:** The result of physical stability test showed that the observed gel have transparent appearance, thick consistency and smooth texture with pH around 6.1 and spreading diameter 6.0 cm. Freeze dried AMSC-MP gel was stable during 30 days of storage. **Conclusion:** The addition of SPACE to gel formulation did not disturb the gel physical characteristic and stability.

Keywords: amniotic membrane stem cell-metabolite product, SPACE-peptide, gel, characteristic, stability

Abstrak

Pendahuluan: Sebagai organ terluas yang menyusun tubuh manusia, kulit menjadi salah satu lokasi penting dalam menghantarkan obat atau bahan aktif tertentu ke dalam tubuh manusia. Beberapa bahan aktif berbentuk makromolekul dengan berat molekul lebih dari 500 Da tidak dapat menembus stratum korneum sehingga membutuhkan bantuan penetration enhancer. SPACE (Skin Penetrating and Cell Entering) merupakan rangkaian molekul peptida berukuran kecil yang berpotensi bekerja sebagai enhancer dalam menghantarkan makromolekul dengan cara yang tidak invasif. Namun SPACE merupakan enhancer golongan baru sehingga efek penambahan SPACE terhadap karakteristik dan stabilitas fisik pada formulasi sediaan gel masih belum banyak diketahui. **Tujuan:** Penelitian kali ini bertujuan untuk mengevaluasi efek pemberian SPACE pada karakteristik dan stabilitas fisik sediaan gel freeze dried Amniotic Membrane Stem Cell-Metabolite Product. **Metode:** Karakteristik fisik sediaan gel freeze dried AMSC-MP dengan SPACE dievaluasi menggunakan parameter organoleptis (warna, bau, bentuk, tekstur), pH dan diameter sebar sediaan. Stabilitas fisik sediaan akan dievaluasi dengan menguji karakteristik fisik sediaan selama 30 hari penyimpanan. **Hasil:** Gel freeze dried Amniotic Membrane Stem Cell memiliki pH sekitar 6,1 dan diameter sebar sediaan sekitar 6,0 cm. Seluruh hasil pengujian karakteristik masih memenuhi rentang yang dipersyaratkan. Hasil uji karakteristik dianalisis menggunakan

statistika metode ANOVA satu arah dan tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar formula. Semua formula F1, F2, F3 dan F4 stabil selama 30 hari penyimpanan. **Kesimpulan:** Penambahan SPACE tidak mempengaruhi karakteristik dan stabilitas fisik sediaan *gel freeze dried Amniotic Membrane Stem Cell-Metabolite Product*.

Kata kunci: *amniotic membrane stem cell-metabolite product*, SPACE-peptide, gel, karakteristik, stabilitas

PENDAHULUAN

Sebagai organ terluas yang menyusun tubuh manusia, kulit menjadi salah satu lokasi penting dalam menghantarkan obat atau bahan aktif tertentu ke dalam tubuh manusia agar dapat memberikan efek farmakologis. Penghantaran bahan aktif melalui kulit mendapatkan perhatian yang besar dari para peneliti dari tahun ke tahun karena bersifat non invasif, mudah dilakukan dan memberikan banyak keuntungan bagi penggunaannya. Hanya saja penghantaran melalui kulit memiliki kesulitan sendiri karena kulit memiliki hambatan protektif terhadap masuknya bahan aktif dari lingkungan sekitarnya. Lapisan stratum korneum menyusun lapisan kulit bagian luar dan terdiri dari keratin tertanam dalam lipid kristalin interselular dan bersifat *impermeable* terhadap bahan aktif yang memiliki berat molekul lebih dari 500 Da.

Amniotic membrane stem cells (AMSC) sebagai salah satu alternatif bahan aktif yang dapat digunakan memiliki potensi yang besar penggunaannya untuk diaplikasikan secara klinis (Insausti dkk., 2014; Miki, 2011). Rosita dkk. (2018) mengkondisikan sebuah medium untuk AMSC dimana medium tersebut terdapat *metabolite product* yang mengandung *growth factors* seperti TGF- β yang memicu protein yang dapat mencerahkan kulit, *hepatocyte growth factors*, dan insulin *growth factors* yang memicu pembentukan protein yang berfungsi untuk mencegah kerutan pada kulit. Sitokin dan *growth factors* di dalam *Amniotic Membrane Stem Cells-Metabolite Product* (AMSC-MP) memiliki karakteristik berupa makromolekul hidrofilik yang memiliki ukuran molekul lebih dari 15000 Da sehingga tidak dapat menembus lapisan stratum korneum untuk dapat memberikan efek farmakologisnya. Agar dapat meningkatkan penetrasi suatu bahan aktif di dalam sediaan topikal, maka dibutuhkan adanya penambahan *enhancer*.

Peptida sebagai *enhancer* pada mulanya dikenal dengan sebutan *Protein Transductions Domain* (PTD) atau *cell penetrating protein* (CPP). PTD merupakan suatu sekuens dari asam amino dengan panjang antara 5 - 30 rangkaian (Borelli dkk., 2018). PTD dirancang untuk menembus membran biologis secara efisien dan

memfasilitasi *cell uptake* dari molekul yang dipasangkan pada PTD. Kemampuan PTD dalam meningkatkan penetrasi molekul menyebabkan peningkatan penggunaan PTD dalam penelitian pada penghantaran bahan aktif farmasetik maupun kosmetik (Chen dkk., 2013). SPACE (*Skin Penetrating and Cell Entering*) adalah bagian dari PTD yang berfungsi sebagai *enhancer* peptida yang berpotensi meningkatkan penetrasi bahan aktif berbentuk makromolekul seperti AMSC-MP ke dalam kulit. Hsu & Mitragotri (2011) melakukan penelitian pada SPACE dengan sekuens ACTGSQTHHQTH. Penelitian ini menunjukkan bahwa SPACE dapat berpenetrasi dengan baik ke dalam dermis pada kulit babi dan manusia termasuk pada keratinosit, *fibroblast* dan sel endotelial. Penggunaan SPACE dalam formulasi SiRNA sebagai terapi atopik dermatitis menunjukkan bahwa SPACE dapat melewati stratum korneum menuju membran sel viabel. Analisa dengan FTIR menggunakan kulit manusia menunjukkan bahwa SPACE bekerja dengan cara mengubah susunan keratin pada korneosit dan tidak mempengaruhi susunan lipid pada stratum korneum. Pernyataan ini diperjelas oleh Kumar dkk. (2014) yang menyebutkan bahwa SPACE bekerja tanpa mempengaruhi sifat elektrostatis dari kulit namun secara signifikan mempengaruhi susunan keratin α -helix pada stratum korneum. SPACE berikatan dengan keratin dan menstabilkan struktur *coiled coil* dari keratin di dalam korneosit sehingga menciptakan lebih banyak rute penghantaran secara transeuler yang lebih mudah dilalui bagi bahan aktif yang bersifat hidrofilik dibandingkan jika harus melewati susunan lipid di stratum korneum.

Gel merupakan suatu pembawa yang ideal bagi suatu sediaan perawatan kulit karena gel bersifat lebih tidak berminyak dibanding sediaan krim, tidak menimbulkan rasa yang tidak nyaman karena gel memiliki tekstur yang lembut dan tidak lengket (Lund, 1994). Gel membentuk suatu lapisan yang menempel dengan elegan dan baik sehingga melindungi kulit. Kadar air yang tinggi pada gel menimbulkan sensasi yang menyejukan sehingga meningkatkan kenyamanan penggunaannya. Basis gel terdiri dari

berbagai macam polimer. Polimer yang digemari dalam penggunaannya sebagai basis gel dalam industri farmasi dan kosmetik adalah carbomer (Barry, 1983). Carbomer 940 dipilih karena stabil terhadap suhu selama proses pembuatan dan menghasilkan gel transparan dengan konsistensi yang baik. Pada produk kosmetik, Carbomer 940 digunakan pada rentang konsentrasi 0,5 - 5% (Rosita dkk., 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh SPACE terhadap karakteristik dan stabilitas fisik *gel freeze dried Amniotic Membrane Stem Cell*.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Seluruh bahan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kemurnian *pharmaceutical grade*, antara lain AMSC-MP (Instalasi Bank Jaringan dan Sel, RSUD Dr. Soetomo Surabaya), *SPACE-Peptide* (MedChem, USA) dan basis gel Carbopol 940 (PT Adimitra Prima).

Metode

Pembuatan sediaan gel

Langkah pertama dalam membuat sediaan gel adalah dengan melarutkan bahan aktif AMSC-MP di dalam *aquabidest*. Campuran tersebut kemudian dicampur dengan *SPACE-Peptide*. AMSC-MP yang sudah menyatu dengan *SPACE* selanjutnya diaduk ke dalam Carbopol 940 yang sudah dikembangkan kemudian dicampur dengan *homogenizer Ultra Turrax High Shear Homogenizer* pada kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Pada pembuatan sediaan gel dilakukan replikasi pembuatan sebanyak tiga kali. Rancangan formula pembuatan gel freeze dried AMSC-MP dapat dilihat pada Tabel 1.

Evaluasi karakteristik fisik sediaan gel

Pemeriksaan parameter organoleptis

Evaluasi terhadap parameter organoleptis dilakukan dengan cara mengamati penampilan dari sediaan meliputi warna, bau, tekstur dan konsistensi dari sediaan. Hasil evaluasi terhadap parameter organoleptis sediaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Rancangan formula sediaan gel

Bahan	Fungsi	Konsentrasi Formula (%) (b/b)			
		FI	FII	FIII	FIV
AMSC-MP	Bahan Aktif	0,008	0,008	0,008	0,008
<i>SPACE-Peptide</i>	<i>Enhancer</i>	0	0,008	0,016	0,024
Carbopol 940	Basis	-	-	-	-

Tabel 2. Hasil pengamatan organoleptis sediaan gel

Formula	Pemeriksaan Organoleptis			
	Warna	Bau	Konsistensi	Tekstur
F1	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F2	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F3	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F4	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut

Evaluasi pH sediaan

pH sediaan dari tiap formula diperiksa menggunakan alat pH meter Schotz glass mainz tipe CG-842 yang sudah terkalibrasi. Pemeriksaan pH dilakukan dengan cara mengambil sediaan sebanyak 1 gram kemudian dilarutkan dalam 9 mL aquademineralisata bebas CO₂. Selanjutnya elektroda dimasukkan kemudian dicatat pH sediaan di layar yang tertera (Ghayah dkk., 2014).

Pengukuran diameter penyebaran sediaan

Penentuan diameter penyebaran sediaan dilakukan dengan cara meletakkan sediaan gel yang akan diuji sebanyak 1 gram di atas pelat kaca berskala. Kemudian sediaan tersebut ditutup menggunakan pelat kaca yang

lain. Pelat kaca yang digunakan berukuran 20 x 17 cm, tebal 5 mm dan berat 404,5 gram. Setelah ditutup dengan pelat kaca, kemudian ditambahkan beban di atasnya. Setelah tiga menit, diameter sediaan dicatat. Penambahan beban dilakukan secara bertingkat setiap 10 gram dan dihentikan ketika diameter sediaan konstan (Rosita dkk., 2010).

Evaluasi stabilitas fisik sediaan gel

Uji stabilitas fisik dilakukan untuk mengetahui ketahanan sistem secara fisika selama disimpan pada suhu ruang. Sampel gel AMSC-MP disimpan pada suhu ruang selama 30 hari pada suhu 30 ± 0,5 dan diamati organoleptis, pH dan diameter sebarannya.

Analisis statistika

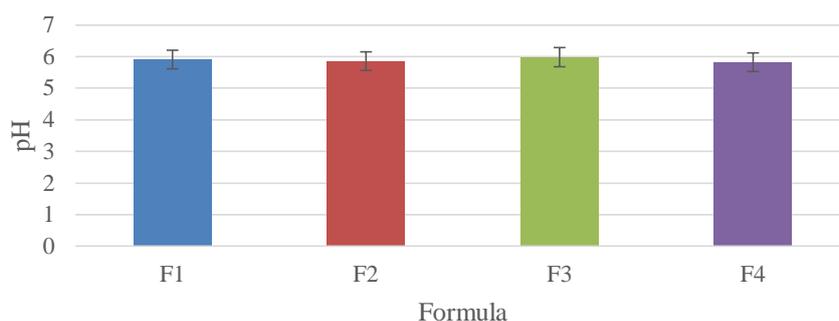
Analisis statistika untuk uji karakteristik fisik dan uji stabilitas fisik selama 30 hari pada kelompok F1 hingga F4 dianalisis dengan menggunakan metode analisis varian (ANOVA) *one way*. Apabila hasil yang diperoleh $\alpha < 0,05$ maka ada perbedaan bermakna antar formula dan dapat dilanjutkan dengan uji *post hoc tukey HSD*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil pengamatan pada parameter organoleptis diperoleh sediaan yang transparan dan jernih pada semua formula, konsistensi yang sedikit kental dan memiliki tekstur yang lembut. Dari keseluruhan sediaan gel yang dibuat, semuanya

memiliki bau yang spesifik. Hal ini dikarenakan bahan aktif *freeze dried* AMSC-MP memiliki bau yang amis seperti telur.

Pemeriksaan pH dilakukan untuk mengetahui apakah penambahan SPACE memberikan pengaruh terhadap pH sediaan. Penentuan nilai pH pada sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP dilakukan menggunakan alat pH meter. pH sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP di dalam basis yang sudah dikembangkan berada pada rentang pH antara 5,5 - 5,8. SPACE memiliki pH antara 7,2 sehingga penambahan SPACE meningkatkan pH sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP menjadi 6,1. Hasil pengukuran pH sediaan dapat dilihat pada Gambar 1.

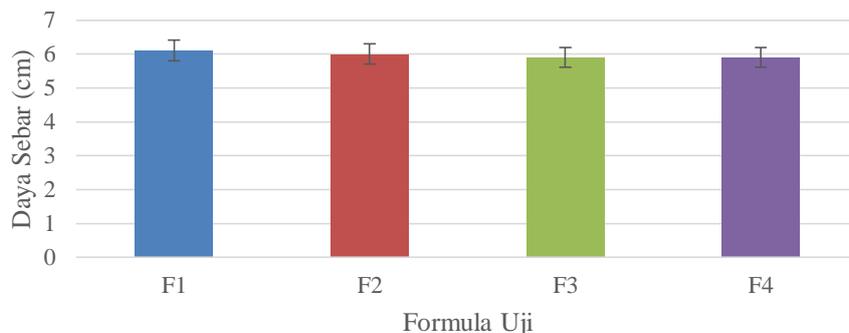


Gambar 1. Histogram hasil pengujian pH sediaan gel

Pengukuran pH dilakukan untuk mencegah terjadinya iritasi kulit yang disebabkan pH yang terlalu tinggi atau terlalu rendah. Iritasi yang dapat terjadi karena pH sediaan terlalu tinggi ataupun terlalu rendah adalah kulit akan menjadi kering, bersisik dan menjadi gatal (Shoviantari, 2017). Sehingga rentang pH harus dijaga pada rentang yang aman bagi kulit yaitu antara 4 - 6 (Rahmasari, 2018).

Kemampuan diameter sebar sediaan ditentukan dengan cara mengukur diameter penyebaran sediaan. Evaluasi ini dilakukan untuk mengetahui kemudahan sediaan digunakan. Diameter sebar suatu sediaan gel dapat dikatakan baik apabila gel dapat dengan mudah dioleskan pada kulit tanpa penekanan yang kuat dengan jari-jari tangan (Oktaviasari & Abdul, 2017). Kemudahan suatu sediaan untuk menyebar dihubungkan dengan luasan permukaan kulit tempat dimana sediaan digunakan. Semakin mudah sediaan digunakan, maka sediaan yang kontak dengan kulit

akan semakin luas sehingga bahan aktif dalam sediaan dapat terdistribusi secara merata. Pengujian ini dilakukan pada semua formula sehingga perlu digunakan salah satu titik penambahan beban untuk membandingkan luas sebaran masing-masing formula. Persyaratan daya sebar yang baik adalah dengan pertambahan luas 4,0 - 6,0 cm (Oktaviasari & Abdul, 2017). Dari hasil pengujian didapatkan bahwa kemampuan diameter sebar sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP berkisar antara 5,9 - 6,1 cm (Gambar 2). Kemudahan penyebaran sediaan didapatkan dari nilai *slope* persamaan regresi hasil profil penyebaran yang diperoleh dengan cara menghubungkan beban dan diameter penyebaran. Semakin besar nilai *slope* yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa sediaan semakin mudah menyebar. Analisis statistika menyatakan bahwa nilai *p value* (sig.) lebih besar dari 0,05 sehingga tidak ada perbedaan bermakna pada profil penyebaran sediaan F1 sampai F4.

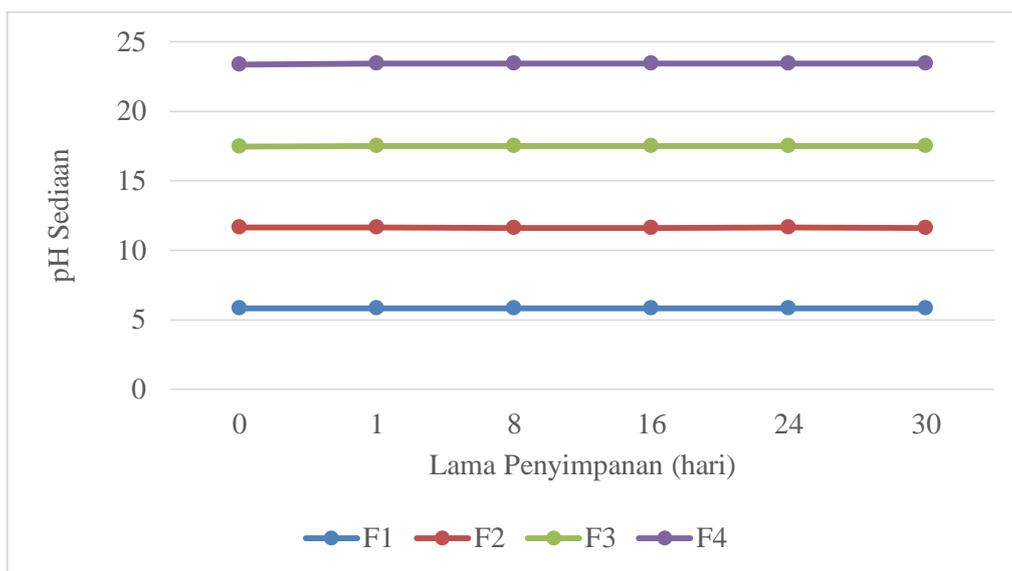


Gambar 2. Histogram hasil pengujian daya sebar sediaan gel pada berat konstan 40 gram

Pada evaluasi terhadap stabilitas fisik sediaan gel, pengamatan organoleptis dilakukan setiap 7 hari sekali dan dibandingkan dengan hari ke 0. Dari hasil pengamatan secara visual didapatkan gel yang tidak berwarna, berbau spesifik dengan konsistensi yang kental dan tekstur yang lembut pada semua formula. Pada akhir penyimpanan (hari ke 30), konsistensi gel pada F3 dan F4 meningkat dibanding F1 dan F2. Peningkatan konsistensi ini terjadi karena gel mengalami *syneresis*. *Syneresis* menghilangkan kelembaban pada gel karena ionisasi gugus hidroksil yang berkurang dan terbentuknya ikatan intramolekuler pada hidrogen. Hilangnya kelembaban tersebut akan mengeliminasi ikatan antara pelarut dengan molekul

polimer sehingga pelarut akan memisah dan meningkatkan konsistensi dari gel (Rosita dkk., 2010).

Evaluasi terhadap pH sediaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh SPACE terhadap pH sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP. Berdasarkan hasil statistika Anova pada pengujian stabilitas pH gel di semua formula didapatkan nilai *p value* (sig.) lebih besar dari 0,05 yang artinya penambahan konsentrasi SPACE-*Peptide* tidak berpengaruh terhadap pH sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP dan pH sediaan stabil selama penyimpanan di suhu ruang selama 30 hari. Histogram hasil evaluasi pH sediaan *gel freeze dried* AMSC-MP selama 30 hari penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 3.



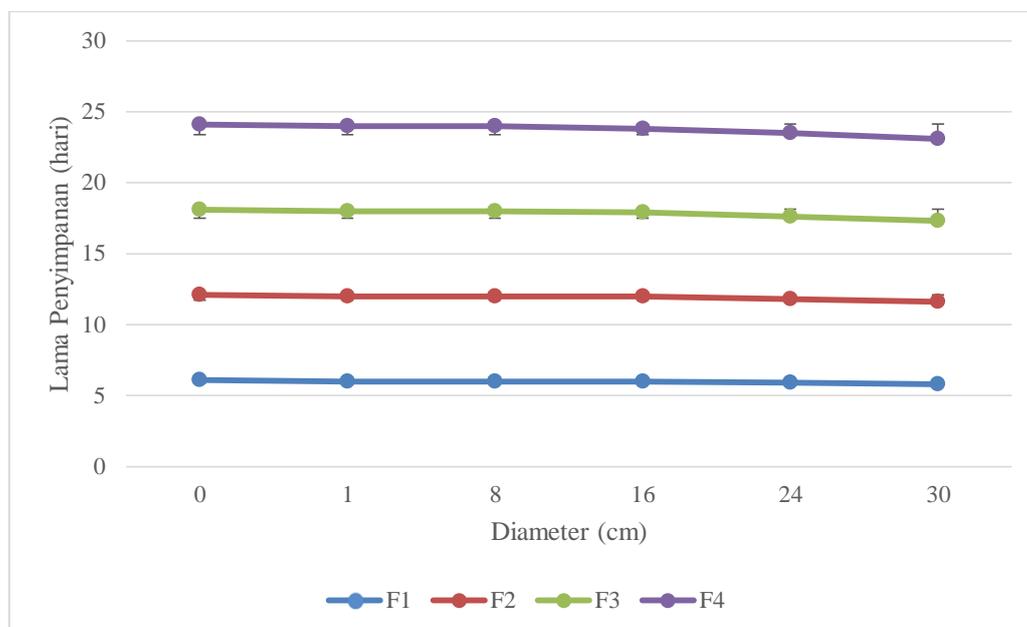
Gambar 3. Hasil pengujian pH sediaan gel selama 30 hari penyimpanan

Pengujian terhadap kemampuan penyebaran sediaan dilakukan sebagai salah satu parameter akseptabilitas sediaan (Martin dkk., 1993). Sediaan akan diminati jika sediaan tersebut mudah diaplikasikan di kulit. Evaluasi terhadap diameter

penyebaran sediaan dilakukan untuk mengetahui apakah SPACE-*Peptide* berpengaruh terhadap kemampuan menyebar sediaan ketika disimpan selama 30 hari. Berdasarkan hasil uji statistika Anova *one way* pada pengujian kemampuan daya sebar semua

formula uji didapatkan nilai *p value* (sig.) lebih besar dari 0,05 sehingga tidak ada perbedaan bermakna antar formula pada diameter sebar sistem gel AMSC-MP selama penyimpanan. Histogram hasil evaluasi

diameter sebar sediaan gel freeze dried AMSC-MP selama 30 hari penyimpanan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Grafik hasil pengujian daya sebar pada berat 40 gram selama 30 hari masa penyimpanan

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian diketahui bahwa penambahan *SPACE-Peptide* tidak mempengaruhi karakteristik fisik (organoleptis, pH, diameter sebar) dari sediaan. Gel yang diperoleh memiliki warna yang jernih (transparan), konsistensi yang kental tekstur yang lembut dan berbau amis. Sediaan gel freeze dried AMSC-MP dengan *enhancer* *SPACE* memiliki pH antara 6,1 dan diameter sebar 6,0 cm sehingga masih berada dalam rentang yang dipersyaratkan. Sediaan cenderung stabil selama masa penyimpanan 30 hari. Penelitian lebih lanjut mengenai efek penambahan *SPACE* terhadap karakteristik fisik dan stabilitas kimia sediaan dalam waktu yang lebih lama (*real time*) perlu dilakukan untuk menunjang data stabilitas penggunaan *SPACE* dalam formulasi sediaan gel freeze dried AMSC-MP.

DAFTAR PUSTAKA

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

Borelli, A., Anna, L. T., Maria, L. T. & Franco, M. B. (2018). Cell Penetrating Peptides as Molecular Carriers for Anti Cancer Agents. *Molecules*; 23; 2-8.

Chen, Y., Manli, W. & Liang, F. (2013). Biomaterials as Novel Penetration Enhancers for Transdermal and Dermal Drug Delivery System. *Drug Delivery*; 20; 199-209.

Ghayah, N., Erawati, T. & Hendradi, E. (2014). Pengaruh Sistem Tipe Mikroemulsi W/O terhadap Karakteristik Sediaan dan Pelepasan Natrium Diklofenak (Perbandingan Konsentrasi Surfaktan (Span 80-Tween 80): Kosurfaktan (Etanol 96%) = 6:1 dalam Basis Gel HPMC 4000. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*; 1; 48-54

Hsu, T. & Mitragotri, S. (2011). Delivery of siRNA and Other Macromolecules into Skin and Cells Using a Peptide Enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108; 15816-15821.

Insausti, C. L., Miguel, B., Ana, M., Garcia, F. & Gregorio, C. (2014). Amniotic Membrane Derived-Stem Cell: Immunomodulatory Properties and Potential Clinical Application. *Stem cells and Cloning: Clinical Application*; 7; 53-63.

Kumar, S., Michael, Z., Ming, C., Stefano, M., John, A., Muraski & Samir, M. (2014). Peptides as Skin Penetration Enhancers: Mechanism of

- Action. *Journal of Controlled Release*; 199; 168-178.
- Lund, W. (1994). *The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics* (12th ed). London: The Pharmaceutical Press.
- Martin, A., Swarbrick, J. & Cammarata, A. (1993). *Physical Pharmacy* (3rd ed). Philadelphia: Lea and Febiger.
- Miki, T. (2011). Amnion Derived Stem Cells: In Quest of Clinical Application. *Stem Cell Research and Therapy*; 25; 1-11.
- Oktaviasari, L. & Abdul, K. Z. (2017). Formulasi dan Uji Stabilitas Fisik Sediaan Lotion O/W Pati Kentang (*Solanum tuberosum*) Serta Aktivasnya Sebagai Tabir Surya. *Majalah Farmaseutik*; 13; 9-27
- Rahmasari, D. (2018). Pengaruh Kadar Surfaktan Kombinasi Tween 80 dan Span 20 terhadap Stabilitas Fisik, Iritabilitas dan Penetrasi Resveratrol. *Tesis*; Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Rosita, C. S. P., Febrina D. P., Nanny H., Irmadita C., Diah, M. I., Dwi, M. & Fedik, A. R. (2018). The Effects of Amniotic Membrane Stem Cell-Conditioned Medium on Photoaging. *Journal of Dermatological Treatment*; 30; 478-482.
- Rosita, N., Purwanti, T. & Agustin. (2010). Stabilitas Fisik dan Efektifitas Sediaan Tabir Surya Kombinasi Oksibenson dan Oktil Metoksisinamat dengan Penambahan Asam Glikolat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*; 7; 16-26.
- Shoviantari, F. (2017). Efektivitas, Iritabilitas dan Stabilitas Fisik Coenzym Q10 dalam Sistem Penghantaran Nanoemulsi dan *Nanostructured Lipid Carriers* Sebagai Kosmetika Antiaging. *Tesis*; Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

Pengaruh Asam Hialuronat-Space Peptide terhadap Karakteristik, Stabilitas Fisik Gel Amniotic Membran-Stemcell Metabolite Product

Rina Mutya Suzliana¹, Tristiana Erawati¹, Cita Rosita Sigit Prakoeswa^{2,3}, Fedik Abdul Rantam⁴, Widji Soeratri^{1*}

¹Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Departemen Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, Indonesia

³Departemen Dermatology dan Venerology, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

⁴Laboratorium Stem Cell, Institute Topical Diseases, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: widjisoeratri@yahoo.com

Submitted: 18 Januari 2020

Accepted: 18 Februari 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Amniotic membrane stem cell metabolite products (AMSC-MP) is the kind of metabolite product obtained from isolated amniotic membranes and cultured in conditioned medium. AMSC-MP contains growth factors and cytokines with aging treatment benefits. Growth factors and cytokines have molecular size which is larger than 20 kDa as AMSC-MP, thus, requires special formulations to deliver for used topical. The formulation of hyaluronic acid is used as combination with SPACE peptide functioning as an enhancer macromolecule for AMSC-MP gel to improve as antiaging activity. To ensure a preparation quality and stability, evaluation of physical characteristic and stability is needed. **Objective:** To evaluate the effect of added hyaluronic acid (0; 0.01; 0.02; 0.04%) combined with SPACE peptide on the characteristics and stability of the AMSC-MP gel formulation. **Methods:** The physical characteristics of AMSC-MP freeze dried gel preparations with the addition of hyaluronic acid combined with SPACE peptide were evaluated by organoleptic test (colour, odor and texture), measuring the pH and deployment capacity. Physical stability testing was done by evaluating gel physical characteristics during 28 days of storage. **Results:** All of the formulas generally showed good appearance. Specifically, the gel observed was transparent, had thick consistency and had smooth texture with specific odour. pH Value was around 5.37 – 5.26 and deployment capacity was approximately in 6.50 – 6.13. All the formulas were stable during 28 days of storage. **Conclusion:** The combination of hyaluronic acid and SPACE peptide to the gel formula did not destroy the characteristic and physical stability of AMSC-MP gel on storage for 28 days.

Keywords: amniotic membrane stem cell metabolite products (AMSC-MP), hyaluronic acid (HA), SPACE peptide, physical characteristic, physical stability

Abstrak

Pendahuluan: Amniotic membran stem cell metabolite product (AMSC-MP) merupakan metabolit produk yang diperoleh dari Amniotic membrane yang diisolasi dan dikultur yang kemudian ditumbuhkan dalam medium terkondisi. AMSC-MP mengandung banyak *growth factor dan sitokin* yang sangat berguna sebagai *antiaging*. *Growth factor* dan sitokin yang pada umumnya berukuran besar lebih dari 20 kDa menyebabkan AMSC-MP membutuhkan formulasi khusus untuk penggunaannya secara topikal. Pada penelitian ini digunakan asam hialuronat dikombinasi dengan *SPACE peptide* yang memiliki fungsi sebagai *enhancer* makromolekul untuk formulasi sediaan gel AMSC-MP sebagai *antiaging*. Untuk memastikan kualitas dan stabilitas suatu sediaan, maka perlu dilakukan uji karakteristik fisik dan uji stabilitas fisik sediaan tersebut. **Tujuan:** Mengevaluasi pengaruh penambahan asam hialuronat (0; 0,01; 0,02; 0,04 %) yang dikombinasi *SPACE peptide* terhadap karakteristik dan stabilitas dari formulasi sediaan gel AMSC-MP. **Metode:** Karakteristik fisik sediaan gel *freeze dried* AMSC-MP dengan penambahan asam hialuronat yang dikombinasi *SPACE peptide* dievaluasi dengan menggunakan parameter organoleptis (warna, bau, konsistensi dan tekstur), pengukuran pH dan kapasitas

penyebaran. Pengujian stabilitas fisik dievaluasi dengan pengukuran pH dan kapasitas penyebaran sediaan setelah penyimpanan selama 28 hari. **Hasil:** Hasil uji karakteristik dan stabilitas fisik sediaan gel AMSC-MP menunjukkan penampilan fisik yang baik, gel transparan dengan konsistensi kental, lembut dengan bau yang khas. Nilai pH sekitar 5,26 - 5,37 dan kapasitas penyebaran pada 6,13 - 6,50. Semua formula stabil selama 28 hari penyimpanan. **Kesimpulan:** Penambahan kombinasi asam hialuronat dan *SPACE peptide* pada formulasi tidak merusak karakteristik dan stabilitas fisik sediaan gel AMSC-MP pada penyimpanan selama 28 hari.

Kata kunci: *amniotic membran stem cell* metabolit produk (AMSC-MP), asam hialuronat (HA), *SPACE peptide*, karakteristik fisik, stabilitas fisik

PENDAHULUAN

Amniotic Membran Stem Cell Metabolite Product (AMSC-MP) merupakan produk metabolit *stem cell* yang kini sedang dikembangkan sebagai suatu bahan yang digunakan dalam terapi seluler, regeneratif dan peremajaan kulit (Insausti dkk., 2010). AMSC-MP mengandung *growth factor* dan dan sitokin yang diketahui dapat mempengaruhi biosintesis kolagen serta dapat meningkatkan proliferasi keratinosit epidermal dan *fibroblast* dermal (Meenakshi dkk., 2017). Namun dalam hal ini, *growth factor* dan sitokin yang terkandung di dalam AMSC-MP merupakan molekul hidrofilik yang berukuran lebih besar dari 20 kDa sehingga memiliki penetrasi yang buruk. Molekul yang berukuran lebih besar dari 500 kDa sulit untuk penetrasi melalui *stratum corneum* (Bos & Meinardi, 2000). Pada penelitian sebelumnya (Pratiwi dkk, 2018), AMSC-MP secara klinis diaplikasikan menggunakan *microneedle* menunjukkan efek *photoaging* yang menjanjikan sebagai terapi peremajaan. Namun hal ini dianggap kurang menyenangkan karena penggunaan *microneedle* memiliki keterbatasan yaitu harus dengan bantuan tenaga ahli dan dapat menimbulkan *eritema* setelah penggunaan (Pratiwi dkk., 2018).

SPACE peptide dilaporkan sebagai suatu bahan yang potensial untuk meningkatkan penghantaran pada kulit. *SPACE peptide* telah dikembangkan sebagai peningkat penetrasi untuk makromolekul HA (MW 200-325kDa) (Chen dkk., 2013) dan (siRNA MW 13 kDa) (Mitragotri & Hsu, 2011) (Chen dkk., 2014). *SPACE peptide* diketahui tidak mengubah barrier lipid kulit namun bekerja dengan cara berinteraksi dengan protein kulit dan menginduksi perubahan pada struktur sekunder protein kulit dan menginduksi perubahan pada struktur sekunder protein kulit (α heliks, β -sheet, *turn* dan acak) yang dievaluasi dengan analisis FTIR dan dikonfirmasi dengan *in-silico docking* (Kumar dkk., 2015).

Dalam penelitian lain, (Murphy dkk., 2017) penggunaan AMSC-MP dikombinasi dengan asam hialuronat (HA) dilaporkan dapat memperbaiki penyembuhan luka (*wound healing*). Kombinasi ini memungkinkan untuk pengembangan sebagai sediaan *antiaging* dengan pertimbangan bahwa HA yang diketahui memiliki kemampuan untuk meningkatkan kualitas kulit dengan cara mengembalikan matriks ekstraseluler dan aktivasi *fibroblast*, seperti produksi kolagen dan elastin (Landau & Steven, 2015). Selain itu, HA juga dapat berfungsi sebagai *enhancer* biomakromolekul yang mungkin dimediasi oleh kombinasi *co-transport*, peningkatan hidrasi kulit dan modifikasi sifat *stratum corneum* (Witting dkk., 2015).

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, AMSC-MP diformulasi dalam bentuk sediaan gel *antiaging* dengan beberapa variasi konsentrasi HA yang dikombinasi dengan *SPACE peptide* untuk memperoleh formula dengan karakteristik yang baik dan stabil pada penyimpanan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kemurnian *pharmaceutical grade*, antara lain AMSC-MP (dikultur di Laboratorium *Stem Cell* dan Instalasi Pusat Biomaterial-Bank Jaringan RSUD Dr. Soetomo), *SPACE peptide* (diimpor dari PT. MedChem express), asam hialuronat (PT. Evonic Industries), basis gel Carbopol 940 (PT. Adimitra Prima).

Alat

pH Meter Schott glass mainz CG 842 dan alat uji daya sebar (Laboratorium Farmasetika Universitas Airlangga).

Metode

Persiapan formulasi sediaan gel AMSC-MP HA

Penelitian ini merupakan eksperimental laboratorium. Gel dibuat dengan menimbang terlebih dahulu semua bahan yang akan digunakan. Carbopol 940 sebagai basis gel dikembangkan menggunakan 10

ml aquabidest. Masukkan bahan aktif AMSC-MP *Freeze dry* yang telah dilarutkan dengan menggunakan 1 ml aquabidest. *SPACE peptide* dan HA yang telah disiapkan, dimasukkan ke dalam basis gel dan dicampur hingga homogen dengan menggunakan *homogenizer Ultra Turrax High Shear Homogenizer* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Sediaan

gel yang dibuat dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Dibuat lima formula dengan variasi konsentrasi HA yang berbeda dan dikombinasi dengan *SPACE peptide*. F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V. Sediaan gel yang dibuat dilakukan replikasi sebanyak tiga kali. Komposisi setiap formula dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Formula sediaan gel *Amniotic Membrane Stem Cell Metabolite Product* (AMSC-MP) dengan beberapa konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V)

Formula	Konsentrasi Bahan (%) (b/b)			
	AMSC-MP	<i>SPACE peptide</i>	HA	Basis gel
F _I	0,08	-	-	ad 100
F _{II}	0,08	0,016	-	ad 100
F _{III}	0,08	0,016	0,01	ad 100
F _{IV}	0,08	0,016	0,02	ad 100
F _V	0,08	0,016	0,04	ad 100

Evaluasi karakteristik sediaan gel AMSC-MP

Uji organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan cara visual dengan mengamati secara langsung penampilan sediaan meliputi warna, bau, konsistensi dan tekstur dari gel yang dibuat.

Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menimbang 1 gram sediaan dan diencerkan dengan 10 mL air bebas CO₂ ke dalam beaker gelas lalu diaduk hingga merata. Larutan diukur pH nya dengan menggunakan pH meter. Pengukuran diulangi sebanyak tiga kali (Rosita dkk., 2010).

Uji kapasitas penyebaran

Evaluasi kapasitas penyebaran dilakukan dengan menimbang sediaan gel sebanyak 1 g dan diletakkan pada lempeng kaca berskala, kemudian ditutup dengan lempeng kaca yang lainnya dengan ukuran masing-masing yaitu 20 cm x 17 cm, tebal 5 mm dan berat 404,5 g. Selanjutnya di atas lempeng kaca tersebut ditambahkan beban yang secara teratur ditingkatkan beratnya. Setiap 3 menit, diukur diameter penyebaran sediaan dan dicatat. Beban ditingkatkan tiap 5 gram sampai diperoleh diameter penyebaran yang konstan pada 25 gram (Rosita dkk, 2010).

Evaluasi stabilitas fisik sediaan

Sediaan disimpan pada suhu kamar 25°C ± 0,5°C selama 28 hari dan RH 70 ± 2%. Dilakukan evaluasi

pH dan kapasitas penyebaran pada hari ke-0, ke-14 dan ke-28.

Analisis statistika

Data yang diperoleh dalam penelitian diolah dengan analisis dengan metode statistik *One Way Anova*. Apabila hasil yang diperoleh (P < 0,05) maka ada perbedaan bermakna antar formula dan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui kelompok formula mana saja yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi sediaan gel AMSC-MP

Hasil uji organoleptis

Hasil uji organoleptis sediaan gel AMSC-MP pada masing-masing formula diperoleh konsistensi yang cenderung sama, tekstur lembut dengan bau yang khas amis seperti bau telur. Hal tersebut disebabkan oleh bau dari bahan aktif AMSC-MP *freeze dried*. Perbedaan mendasar hanya terlihat pada warna sediaan dimana F_I dan F_{II} yang tidak mengandung HA tidak memiliki warna dan jernih transparan sedangkan F_{III}, F_{IV} dan F_V dengan peningkatan konsentrasi HA memberikan peningkatan warna yang menjadi lebih kuning hingga kuning kecoklatan yang disebabkan oleh warna dari HA. Hasil evaluasi organoleptis dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan organoleptis sediaan gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V

Formula	Pemeriksaan Organoleptis			
	Warna	Bau	Konsistensi	Tekstur
F _I	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F _{II}	Tidak Berwarna	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F _{III}	Jernih kekuningan	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F _{IV}	Kuning kecoklatan	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut
F _V	Coklat kekuningan	Berbau amis seperti telur	Kental	Lembut

Hasil uji pH

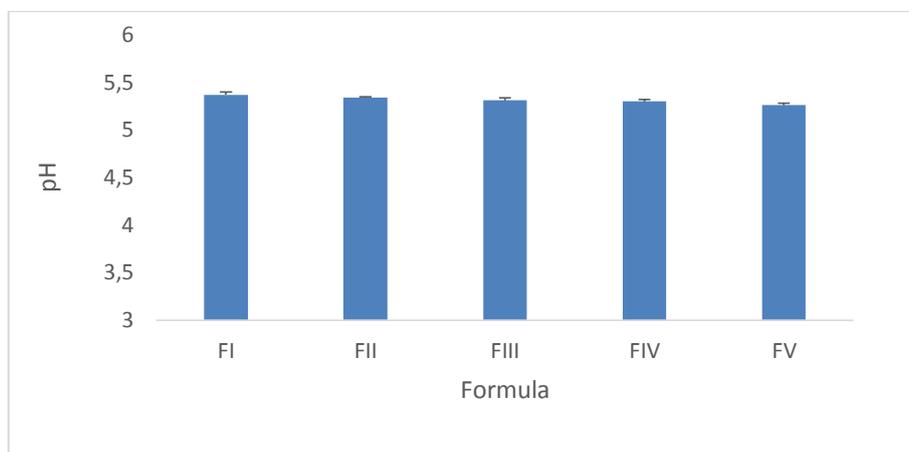
Pengujian pH sediaan bertujuan untuk memenuhi kenyamanan dalam penggunaan secara topikal. Nilai pH gel yang baik adalah pH yang hampir sama atau berada pada rentang pH kulit yang berkisar antara 4,5 - 6,5. Apabila sediaan gel terlalu asam maka dapat menyebabkan iritasi, tetapi apabila pH gel terlalu basa maka kulit dapat menjadi kering dan bersisik (Tranggono, 2007).

Pengujian pH pada penelitian ini juga dilakukan untuk mengetahui apakah penambahan asam hialuronat yang dikombinasi dengan *SPACE peptide* memberikan pengaruh terhadap pH sediaan gel AMSC-MP. Basis sediaan gel yang telah dikembangkan berada pada

rentang pH 5,1 - 5,3. *SPACE peptide* memiliki pH sekitar 7,2 dan HA memiliki pH 4,5 - 8,5. Hasil uji diperoleh seluruh sediaan gel AMSC-MP berada pada isaran 5,37 - 5,26. Hasil analisis statistik menggunakan *One Way Anova* menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antara pH dalam setiap formula sediaan gel AMSC-MP ($P > 0,05$) dan berada pada rentang pH kulit yaitu 4,5 - 6,5. Sehingga dapat disimpulkan bahwa peningkatan variasi konsentrasi asam hialuronat tidak mempengaruhi nilai pH sediaan gel AMSC-MP karena jumlah HA yang ditambahkan sangat sedikit (0,01 - 0,04%). Nilai pH rata-rata pada beberapa formula sediaan gel AMSC-MP dapat dilihat pada Tabel 3 dan histogram Gambar 1.

Tabel 3. Hasil pemeriksaan nilai pH gel AMSC-MP dengan berbagai variasi konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V

Formula	Replikasi			Rata-rata ± SD
	I	II	III	
F _I	5,37	5,36	5,32	5,37 ± 0,03
F _{II}	5,34	5,33	5,35	5,34 ± 0,01
F _{III}	5,29	5,34	5,30	5,31 ± 0,03
F _{IV}	5,30	5,32	5,29	5,30 ± 0,02
F _V	5,28	5,25	5,27	5,26 ± 0,02



Gambar 1. Histogram hasil uji pH gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V)

Hasil uji kapasitas penyebaran

Suatu sediaan lebih disukai bila dapat menyebar dengan mudah dikulit. Pengujian kapasitas penyebaran sediaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh HA yang dikombinasi *SPACE peptide* terhadap kemampuan menyebar sediaan gel AMSC-MP. Hasil uji kapasitas penyebaran pada beban konstan 25 gram diperoleh bahwa semakin tinggi konsentrasi HA, kapasitas penyebaran cenderung menurun dan berada pada kisaran nilai 6,50 - 6,13 cm.

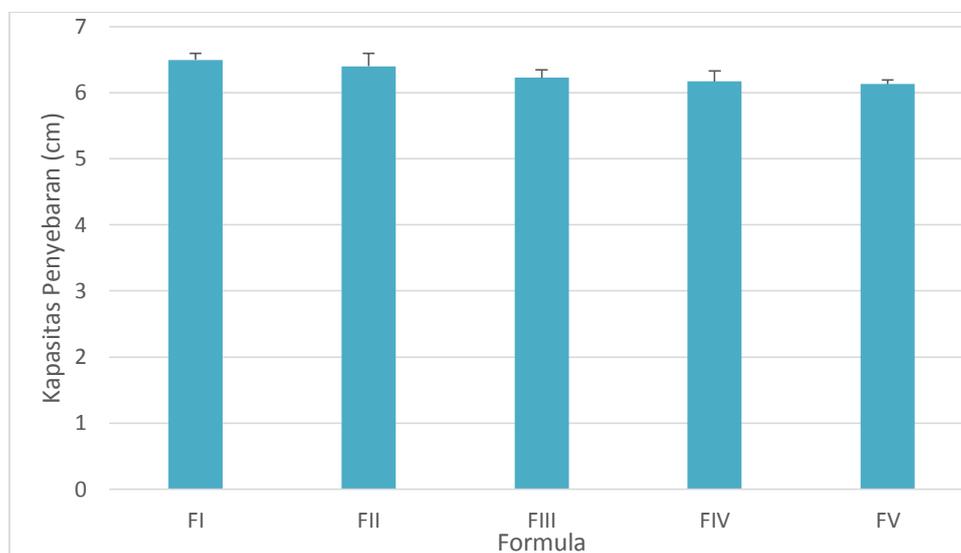
Namun hasil analisis statistik menggunakan *one way anova* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan

yang signifikan ($P > 0.05$) antara kapasitas penyebaran masing-masing formula sediaan gel AMSC-MP dan berada pada rentang yang diharapkan untuk sediaan topikal yaitu berkisar pada 5 - 7 cm (Garg dkk., 2002).

Pada Hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa peningkatan variasi konsentrasi HA tidak mempengaruhi kapasitas penyebaran gel AMSC-MP. Hal tersebut karena jumlah HA yang ditambahkan sangat sedikit (0,01 - 0,04%). Hasil uji kapasitas penyebaran untuk masing-masing formula dapat dilihat pada Tabel 4 dan histogram Gambar 2.

Tabel 4. Hasil uji kapasitas penyebaran gel AMSC-MP dengan berbagai variasi konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V)

Formula	Kapasitas Penyebaran (cm)			Rata-rata ± SD
	Replikasi			
	I	II	III	
F _I	6,5	6,3	6,7	6,50 ± 0,10
F _{II}	6,6	6,2	6,4	6,40 ± 0,20
F _{III}	6,3	6,3	6,1	6,23 ± 0,12
F _{IV}	6,2	6,1	6,2	6,17 ± 0,16
F _V	6,1	6,1	6,2	6,13 ± 0,06



Gambar 2. Histogram hasil uji kapasitas penyebaran gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi HA yang dikombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V) pada hari ke 0,14 dan 28

Stabilitas fisik sediaan gel AMSC-MP

Organoleptis pada penyimpanan 28 hari

Sediaan farmasi dikatakan stabil apabila tidak ada perubahan dari karakteristik sediaan. Evaluasi stabilitas fisik sediaan gel AMSC-MP pada penyimpanan selama 28 hari yang dilakukan dengan mengamati perubahan organoleptis secara visual yang dilakukan pada hari ke-0, ke-14 dan ke-28 didapatkan gel dengan konsistensi cenderung lebih kental dan meningkat pada hari ke-28. Hal ini dapat disebabkan karena adanya penguapan air

selama proses penyimpanan. Untuk menghindari hal tersebut sebaiknya ditambahkan humektan (Rosita dkk., 2010).

Stabilitas fisik pH sediaan

Evaluasi stabilitas fisik sediaan gel AMSC-MP selama penyimpanan selama 28 hari dilakukan pengukuran pH pada hari ke-0, ke-14 dan ke-28.

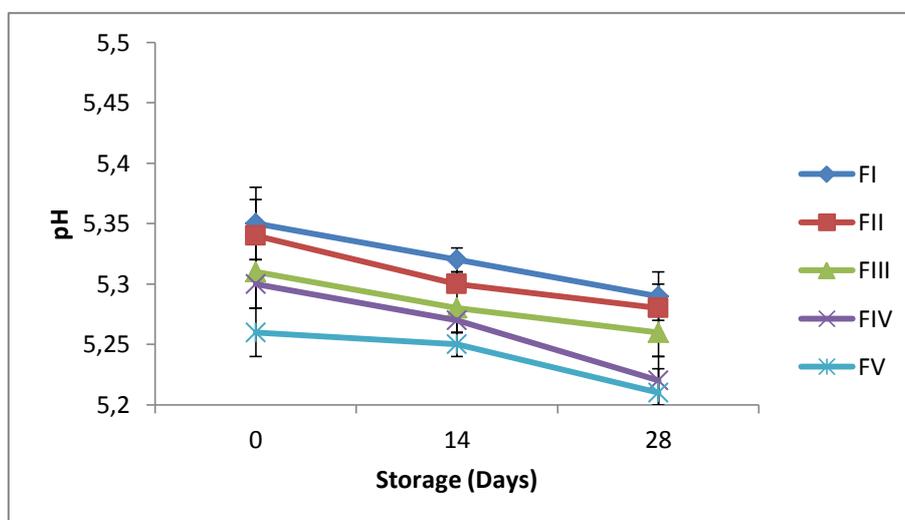
Hasil pengujian nilai pH dengan metode statistika *One Way Anova* tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$) yang berarti bahwa

penambahan HA yang dikombinasi dengan *SPACE peptide* tidak berpengaruh terhadap pH sediaan gel AMSC-MP dan stabil pada penyimpanan selama 28

hari. Nilai pH rata-rata pada beberapa formula sediaan gel AMSC-MP setelah penyimpanan selama 28 hari dapat dilihat pada Tabel 5 dan grafik pada Gambar 3.

Tabel 5. Hasil uji kapasitas penyebaran gel AMSC-MP dengan berbagai variasi konsentrasi HA yang dikombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V) selama penyimpanan pada hari ke 0, 14 dan 28

Formula	Hari	Replikasi			Rata-rata ± SD
		I	II	III	
FI	0	5,37	5,36	5,32	5,35 ± 0,03
	14	5,31	5,33	5,33	5,32 ± 0,01
	28	5,30	5,28	5,31	5,29 ± 0,02
FII	0	5,34	5,33	5,35	5,34 ± 0,01
	14	5,30	5,29	5,31	5,30 ± 0,01
	28	5,32	5,27	5,25	5,28 ± 0,04
FIII	0	5,29	5,34	5,30	5,31 ± 0,03
	14	5,27	5,29	5,30	5,28 ± 0,02
	28	5,27	5,25	5,28	5,26 ± 0,02
FIV	0	5,30	5,32	5,29	5,30 ± 0,02
	14	5,28	5,26	5,28	5,27 ± 0,01
	28	5,22	5,21	5,25	5,22 ± 0,02
FV	0	5,28	5,25	5,27	5,26 ± 0,02
	14	5,25	5,26	5,24	5,25 ± 0,01
	28	5,23	5,20	5,22	5,21 ± 0,02



Gambar 3. Grafik hasil pengukuran pH sediaan gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi asam hialuronat yang dikombinasi *SPACE peptide* F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V pada hari ke 0,14 dan 28

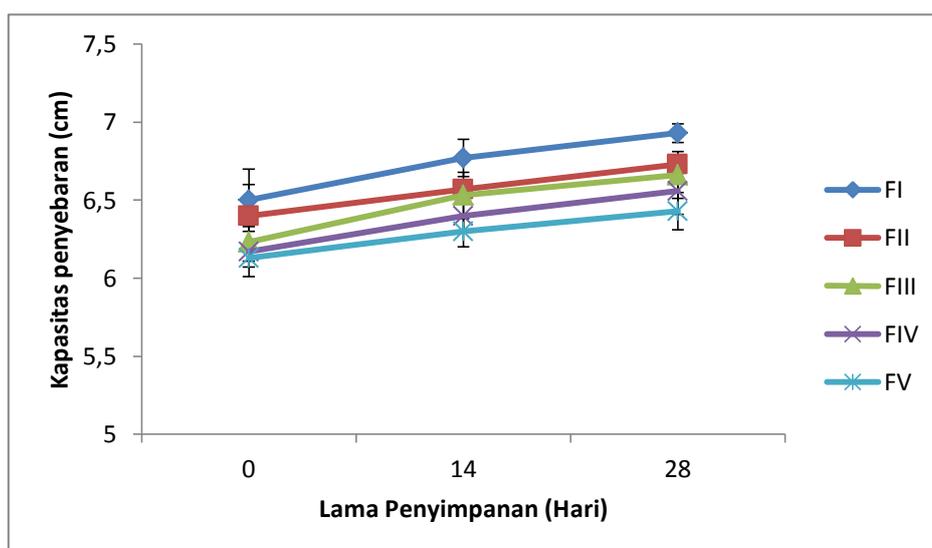
Hasil uji stabilitas kapasitas penyebaran gel AMSC-MP

Kestabilan kapasitas penyebaran selama penyimpanan merupakan salah satu parameter akseptabilitas suatu sediaan (Martin dkk., 1993). Evaluasi pada penelitian ini untuk mengetahui apakah HA yang dikombinasi dengan *SPACE peptide* berpengaruh terhadap kapasitas penyebaran sediaan gel AMSC-MP pada penyimpanan selama 28 hari dan dilakukan pengukuran pada hari ke-0, hari ke-14 dan hari ke-28.

Dari hasil analisis statistik *One way Anova*, kapasitas penyebaran sediaan gel AMSC-MP pada masing-masing formula tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($P > 0.05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa penambahan HA yang dikombinasi *SPACE peptide* tidak mempengaruhi stabilitas kapasitas penyebaran gel AMSC-MP pada penyimpanan selama 28 hari. Hasil uji kapasitas penyebaran pada beberapa formula sediaan gel AMSC-MP setelah penyimpanan selama 28 hari dapat dilihat pada Tabel 6 dan grafik pada Gambar 4.

Tabel 6. Hasil pengukuran kapasitas penyebaran sediaan gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi HA yang dikombinasi *SPACE peptide* (F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV}, F_V) pada hari ke 0,14 dan 28

Formula	Hari	Replikasi			Rata-rata ± SB
		I	II	III	
I	0	6,5	6,3	6,7	6,50 ± 0,20
	14	6,9	6,7	6,7	6,77 ± 0,12
	28	6,9	7,0	6,9	6,93 ± 0,06
II	0	6,6	6,2	6,4	6,40 ± 0,20
	14	6,6	6,5	6,6	6,57 ± 0,06
	28	6,7	6,7	6,8	6,73 ± 0,06
III	0	6,3	6,3	6,1	6,23 ± 0,12
	14	6,5	6,4	6,7	6,53 ± 0,15
	28	6,5	6,7	6,8	6,66 ± 0,15
IV	0	6,2	6,1	6,2	6,17 ± 0,16
	14	6,3	6,4	6,5	6,40 ± 0,30
	28	6,6	6,7	6,4	6,56 ± 0,15
V	0	6,1	6,1	6,2	6,13 ± 0,06
	14	6,3	6,4	6,2	6,30 ± 0,10
	28	6,5	6,3	6,5	6,43 ± 0,12



Gambar 4. Grafik hasil pengukuran kapasitas penyebaran sediaan gel AMSC-MP dengan beberapa variasi konsentrasi HA dengan kombinasi *SPACE peptide* F_I, F_{II}, F_{III}, F_{IV} dan F_V pada hari ke 0,14 dan 28

Perubahan pH sangat mempengaruhi stabilitas kimia bahan aktif dalam hal ini sitokin dan *growth factor* dan stabilitas fisik sediaan gel, menyebabkan perubahan karakteristik dan kapasitas penyebaran. Hasil pengujian ini diperoleh bahwa penambahan HA (0,01 - 0,04%) yang dikombinasi dengan *SPACE peptide* tidak berpengaruh terhadap nilai pH sediaan sehingga diharapkan stabilitas bisa terjaga hal ini didukung oleh tidak adanya perubahan kapasitas daya sebar sehingga sediaan gel tetap stabil.

KESIMPULAN

Penambahan HA (0,01 - 0,04%) dengan kombinasi *SPACE peptide* tidak mempengaruhi karakteristik

(organoleptis, pH dan kapasitas penyebaran) sediaan gel *Amniotic Membran Stem Cell Metabolit Produk* (AMSC-MP). Gel yang diperoleh memiliki warna yang jernih (transparan) hingga kuning kecoklatan dengan konsistensi kental dan berbau amis seperti telur dengan pH gel berkisar antara 5,26 - 5,37 dan diameter kapasitas penyebaran 6,13 - 6,50 cm masih berada pada rentang yang dipersyaratkan. Sediaan gel AMSC-MP dengan HA dan *SPACE peptide* stabil secara fisik (pH dan kapasitas penyebaran) pada penyimpanan selama 28 hari. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penambahan HA dan *SPACE peptide* terhadap stabilitas kimia (penetapan kadar

sitokin dan growth factor) pada sediaan gel freeze dried AMSC-MP.

DAFTAR PUSTAKA

- Bos, J. D. & Meinardi, M. (2000). The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration and of Chemical Compounds and Drugs. *Experimental Dermatology*; 9; 165–169.
- Chen, M., Vivek, G., Aaron, C., Anselmo, J. A. & Muraski, S. M. (2013). Topical Delivery of Hyaluronic Acid into Skin Using SPACE-Peptide Carriers. *Journal of Controlled Release*; 173; 67–74.
- Chen, M., Zakrewsky, M., Gupta, V., Anselmo, A. C., Slee, D. H., Muraski, J. A. & Mitragotri, S. (2014). Topical Delivery of siRNA into Skin Using SPACE-Peptide Carriers. *Journal of Controlled Release*; 179; 33–41.
- Garg, A., Anggarwal, D. & Sigla, A. (2002). Spreading of Semisolid Formulation: An Update. *Pharmaceutical Technology North America*; 2; 84-102.
- Insausti, C. L., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Majado, M. J., Castellanos, G. & Moraleda, J. M. (2010). The Amniotic Membrane as a Source of Stem Cells. *Histology and Histopathology*; 25; 91–98
- Kumar, S., Zakrewsky, M., Chen, M., Menegatti, S., Muraski, J. A. & Mitragotri, S. (2015). Peptides as Skin Penetration Enhancers: Mechanisms of action. *Journal of Controlled Release*; 199; 168–178.
- Landau, M. & Steven, F. (2015). Science of Hyaluronic Acid Beyond Filling: Fibroblasts and Their Response to the Extracellular Matrix. *Plastic and Reconstructive Surgery*; 136; 188S-195S.
- Martin, A., Swarbick, J. & Cammarata, A. (1993). Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences (3rd ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Meenakshi, G., Marek, D. & Victoria, V. L. (2017). Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. *International Journal of Molecular Sciences*; 18; 208.
- Mitragotri, S. & Hsu, T. (2011). Delivery of siRNA and Other Macromolecules into Skin and Cells Using a Peptide Enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 108; 15816-15821.
- Murphy, S., Aleksander, S., Lujie, S. & Khiry, S. R. H. (2017). Solubilized Amnion Membrane Hyaluronic Acid Hydrogel Accelerates Full-Thickness Wound Healing. *Stem Cells Translational Medicine*; 6; 2020-2032.
- Pratiwi, F. D., Murtiastutik, D. & Prakoeswa, C. R. S. (2018). Efek Pemberian Topikal Produk Metabolit Amniotic Membrane Stem Cell (PM-AMSC) pada Penuaan Kulit. *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*; 30; 95-101.
- Rosita, N., Tutiek, P. & Agustin. (2010). Stabilitas Fisik dan Efektivitas Sediaan Tabir Surya Kombinasi Oksibenson dan Oktil Metoksisinamat dalam Basis Gel Carbomer 940 dengan Penambahan Asam Glikolat. *Majalah Ilmu Kefarmasian*; 7; 16-26
- Tranggono, L. (2007). Buku Pegangan Ilmu Pengetahuan Kosmetika. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.
- Witting, M., Alexander, B., Robert, B. & Katerina, V. (2015). Interactions of Hyaluronic Acid with the Skin and Implications for the Dermal Delivery of Biomacromolecules. *Molecular Pharmaceutics*; 12; 1391-1401.

Optimasi Metode dan Uji Stabilitas pada Penetapan Kadar Filantin dalam Ekstrak *Phyllanthus niruri* Menggunakan KLT-Densitometri

Rachma Nurhayati, Riesta Primaharinastiti, Mochammad Yuwono*

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

*Corresponding author: yuwono05@yahoo.com

Submitted: 11 Februari 2020

Accepted: 10 April 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Phyllanthin is the major lignan compound in *Phyllanthus niruri* with hepatoprotective activity. For the standardization of *P. niruri* extracts, a simple and selective TLC-densitometric method has been developed, and phyllanthin was used as a phytochemical marker in this study. **Objective:** To obtain the optimal condition of the separation and to evaluate the stability of phyllanthin as a pre-validation stage by using TLC-densitometry. **Methods:** Optimal conditions were studied in the variation of the mobile phase composition, the analytical wavelength, the saturation time of TLC chamber, the elution distance and the volume of the spot. The stability test was done by analyzing the standard and extract solutions at 0, 4, 8, and 24 hours. **Results:** The composition of selected mobile phase which gave good separation and symmetrical peak shape was toluene: ethyl acetate: formic acid (15: 10.5: 1.5 v / v / v) with a wavelength of 279 nm, time of saturation was 60 minutes, elution distance was 8 cm and volume of spots was 10 μ L. Stability tests showed a decrease in area and shift of Rf during storage. **Conclusion:** In this study, the optimal condition for analysis of phyllanthin in the *P. niruri* extracts has been proposed and successfully applied for stability test in the pre-validation stage of the method development. Phyllanthin was unstable during storage, therefore standard solutions and extracts should be made fresh to maintain the stability.

Keywords: phyllanthin, optimization of analytical methods, stability, TLC-densitometry

Abstrak

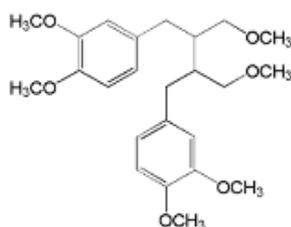
Pendahuluan: Filantin merupakan senyawa lignan utama pada *Phyllanthus niruri* yang menunjukkan aktivitas hepatoprotektif. Untuk keperluan standardisasi ekstrak, metode kromatografi lapis tipis (KLT)-densitometri yang sederhana dan selektif telah dikembangkan dalam penelitian ini dengan menggunakan filantin sebagai marker fitokimia. **Tujuan:** Untuk menetapkan kondisi analisis KLT-densitometri yang optimal dan mengevaluasi stabilitas filantin. **Metode:** Penentuan kondisi optimal analisis dilakukan dengan cara menentukan komposisi fase gerak, panjang gelombang analisis, waktu penjuanan bejana, jarak elusi dan volume penotolan. Uji stabilitas filantin dilakukan dengan menganalisis larutan standar dan ekstrak pada 0, 4, 8 dan 24 jam. **Hasil:** Komposisi fase gerak terpilih yang menghasilkan pemisahan yang baik dan bentuk puncak yang simetris yaitu toluen : etil asetat : asam format (15 : 10,5 : 1,5 v/v/v) dengan panjang gelombang 279 nm, waktu penjuanan bejana 60 menit, jarak elusi 8 cm dan volume penotolan 10 μ L. Uji stabilitas larutan uji menunjukkan adanya penurunan area dan pergeseran Rf pada waktu penyimpanan. **Kesimpulan:** Pada penelitian ini telah diperoleh kondisi optimal untuk analisis filantin. Kondisi optimal yang diperoleh pada penelitian ini dapat digunakan untuk uji stabilitas tahap pre-validasi metode. Filantin tidak stabil selama penyimpanan, sehingga larutan baku dan ekstrak sebaiknya dibuat baru ketika akan dilakukan analisis untuk menjamin stabilitas.

Kata kunci: filantin, optimasi metode analisis, stabilitas, KLT-densitometri

PENDAHULUAN

Bahan alam telah banyak dimanfaatkan sebagai obat karena mengandung senyawa bioaktif yang memberikan efek terapi untuk tubuh. Sebanyak 30 - 40% produk obat yang beredar saat ini berasal dari bahan alam baik melalui proses isolasi maupun semi sintesis. Salah satu bahan alam yang sedang dan banyak dikembangkan untuk produk obat saat ini adalah *Phyllanthus niruri*. Ekstrak daun, batang dan akar tanaman ini telah lama digunakan sebagai obat di berbagai negara untuk terapi penyakit ginjal dan kandung kemih, infeksi saluran cerna, diabetes dan virus hepatitis B (Khatoon dkk., 2006).

Penelitian yang banyak dilakukan pada *P. niruri* adalah membuktikan efek hepatoprotektif (Bhattacharjee & Sil, 2007; Krithika dkk., 2009; Chirdchupunseree & Pramyothin, 2010). Efek hepatoprotektif pada *P. niruri* disebabkan oleh adanya senyawa filantin. Ravikumar dkk. (2011) membuktikan bahwa filantin secara bermakna menghambat enzim NS3 protease dan NS5B RNA serta mencegah replikasi virus hepatitis C. Krithika dkk. (2015) juga membuktikan bahwa filantin dapat menyebabkan hambatan pada reseptor kinase *transforming growth factor* (TGF) beta tipe 1 dan hambatan pada jalur pensinyalan TGF melalui ALK5, Smad 2 dan 3 sehingga mencegah fibrosis hati. Struktur filantin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur filantin (3,3',4,4',9,9'-Hex-methoxylignan)

Di Indonesia, standar simplisia dan ekstrak yang digunakan dalam pengobatan diatur dalam Farmakope Herbal Indonesia (FHI) (Depkes RI, 2009). Pada monografi FHI, prosedur analisis herba meniran ditentukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan larutan pembanding kuersetin dan belum disebutkan metode baku untuk analisis filantin. Beberapa metode analisis untuk penentuan filantin telah dikembangkan dan metode Kromatografi Lapis Tipis Kinerja Tinggi (KLTKT) menjadi metode yang paling banyak digunakan (Tatiya dkk., 2011; Tripathi dkk., 2006; Arsul dkk., 2011; Nayak dkk., 2010;

Murugaiyah & Chan, 2007; Khabiya dkk., 2014). Akan tetapi metode ini tidak banyak diaplikasikan oleh industri farmasi di Indonesia karena relatif lebih mahal dibandingkan metode KLT.

Penetapan kadar filantin menggunakan metode KLT pada ekstrak etanol herba meniran juga telah dilaporkan oleh Alegantina dkk (2015) menggunakan fase gerak kloroform : metanol (9 : 1), akan tetapi resolusi puncak filantin dalam ekstrak rendah sehingga senyawa filantin belum memisah dengan sempurna. Selain itu stabilitas filantin juga belum dilaporkan. Tujuan dari penelitian ini untuk mendapatkan kondisi optimal analisis menggunakan metode KLT-densitometri yang diharapkan memberikan hasil pemisahan yang baik dan mengevaluasi stabilitas filantin sebagai tahap awal pengembangan metode untuk analisis filantin.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Standar filantin (Sigma Aldrich), ekstrak etanol *Phyllanthus niruri* (Natura Lab), toluen (Merck), asam format (Merck), etila setat (Merck), metanol (Merck), n-heksana (Merck), aseton (Merck), kloroform (Merck), asetonitril (Merck).

Alat

Lempeng KLT silica gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets 20 x 20 cm (Merck), bejana pengembang 10 x 10 cm (Camag), KLT scanner 3 dengan UV detektor (Camag), winCATS software versi 1.4.8.2012 (Camag).

Metode

Pembuatan larutan baku induk standar filantin

Ditimbang 1,0 mg standar filantin, dilarutkan dalam 10 mL metanol. Baku induk ini selanjutnya dapat digunakan untuk membuat baku kerja 20 - 100 ppm melalui tahap pengenceran.

Pembuatan larutan ekstrak

Ditimbang 1,0 gram ekstrak etanol *P. niruri* dan dilarutkan dalam 10 mL metanol. Larutan dipanaskan pada suhu 60°C diatas *hotplate* dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 60 menit. Larutan disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 4000 rpm untuk memisahkan supernatan dan endapannya.

Pembuatan fase gerak

Untuk tahap optimasi kondisi maka fase gerak dibuat dalam beberapa macam komposisi fase gerak seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Variasi komposisi fase gerak yang diuji untuk mendapatkan kondisi optimal

No	Komposisi fase gerak	Perbandingan volume
1	n-heksana : aseton : etil asetat	37 : 6 : 6 v/v/v
2.	Kloroform : etil asetat	1 : 1 v/v
3.	Kloroform : asetonitril : metanol : asam format	60 : 30 : 10 : 0,5 v/v/v/v
4.	Toluen : etil asetat : asam format	15 : 10,5 : 1,5 v/v/v

Optimasi kondisi analisis

Optimasi kondisi analisis dilakukan dengan cara mengubah komposisi fase gerak, menentukan panjang gelombang maksimum untuk pengamatan noda, optimasi waktu penjuanan bejana selama 15 - 90 menit, optimasi jarak elusi pada panjang 7 - 9 cm dan optimasi volume penotolan sebanyak 6 - 20 µL pada plat KLT. Parameter yang diamati dalam pemilihan kondisi optimal adalah faktor retardasi (Rf), bentuk puncak dan resolusi (Rs) terbaik. Rs dihitung menggunakan rumus matematika sebagai berikut:

$$R = \frac{2 (\max Rf1 - \max Rf2)}{(\text{end } Rf1 - \text{start } Rf1) + (\text{end } Rf2 - \text{start } Rf2)}$$

Keterangan:

- Rs = resolusi
- Rf1 = faktor retardasi senyawa 1
- Rf2 = faktor retardasi senyawa 2

Uji stabilitas larutan uji

Uji stabilitas dilakukan dengan membagi larutan standar dan ekstrak dalam 4 tabung berbeda. Masing-masing tabung diberi label 0 jam, 4 jam, 8 jam, dan 24 jam. Larutan uji dianalisis sesuai waktu yang telah ditentukan dalam label. Semua tabung disimpan pada suhu 4°C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Optimasi kondisi analisis

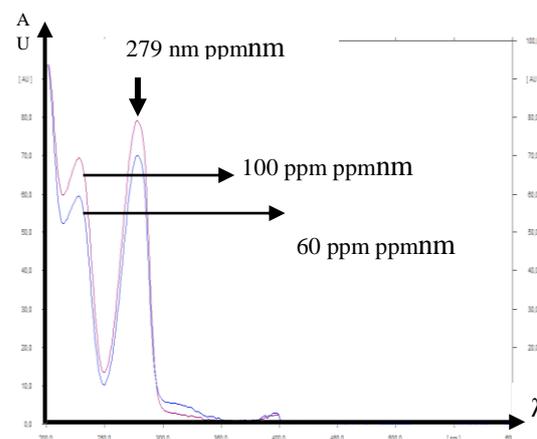
Berdasarkan percobaan yang telah dilakukan terhadap variasi komposisi fase gerak, diperoleh data pada Tabel 2. Komposisi fase gerak 1 menunjukkan resolusi yang baik antara puncak filantin dan pengotornya yaitu > 1,5 akan tetapi puncak filantin *fronting*. Hal ini dapat mempengaruhi hasil analisis sehingga fase gerak 1 tidak dipilih. Komposisi fase gerak 2 menunjukkan resolusi < 1,5 sehingga puncak filantin tidak terpisah sempurna dengan puncak pengotornya. Selain itu puncak filantin juga *fronting* sehingga fase gerak 2 tidak dipilih. Komposisi fase gerak 3 tidak menunjukkan adanya puncak filantin yang terelusi, sehingga fase gerak 3 tidak dipilih. Komposisi fase gerak 4 menunjukkan resolusi yang paling optimal dan puncak yang simetris, sehingga fase gerak ini dipilih dan digunakan untuk proses analisis selanjutnya.

Tabel 2. Data hasil percobaan variasi komposisi fase gerak

Fase gerak	Rf	Rs1	Rs2	Puncak
1	0,37	1,7	2,1	<i>Fronting</i>
2	0,78	1,1	-	<i>Fronting</i>
3	NA	NA	NA	NA
4	0,66	7,3	1,8	Simetris

*NA: puncak tidak terdeteksi.

Panjang gelombang maksimal yang terdeteksi yaitu 200 nm. Akan tetapi apabila dilakukan analisis pada panjang gelombang tersebut maka banyak puncak pengganggu yang muncul dan dapat mempengaruhi hasil analisis senyawa filantin. Pada panjang gelombang 279 nm, area yang dihasilkan puncak filantin tinggi dan puncak pengganggu yang dihasilkan sangat sedikit sehingga panjang gelombang terpilih yang digunakan yaitu 279 nm (Gambar 2).



Gambar 2. Spektra dan panjang gelombang senyawa filantin

Penjuanan bejana dengan sempurna diperlukan agar proses elusi dan pemisahan dapat berjalan dengan baik. Hasil optimasi waktu penjuanan bejana tertera pada Tabel 3. Dari hasil optimasi diperoleh waktu penjuanan bejana dapat mempengaruhi Rf. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Dezeeuw (1968) yang menunjukkan ketidakstabilan Rf suatu senyawa setelah dielusi pada bejana yang tidak dilakukan penjuanan. Waktu penjuanan bejana yang optimal pada penelitian ini yaitu minimal 60 menit karena Rf stabil setelah 60 menit.

Tabel 3. Data hasil optimasi waktu penjujukan bejana

Waktu penjujukan (menit)	Area	Rf
15	921,4	0,59
30	956,6	0,61
60	1098,8	0,66
90	1095,0	0,66
120	1084,8	0,66

Hasil optimasi volume penotolan tertera pada Tabel 4. Berdasarkan hasil yang diperoleh, volume penotolan yang memberikan bentuk puncak simetris yaitu 6 µL dan 10 µL. Pada volume penotolan 16 µL dan 20 µL, puncak mengalami *fronting*. Hal ini dapat disebabkan volume penotolan terlalu besar. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Tripathi dkk. (2006), Khabiya dkk. (2014) dan Alegantina dkk. (2015), diperoleh kadar filantin yang relatif kecil sehingga volume penotolan 10 µL lebih dipilih pada penelitian ini dibandingkan 6 µL.

Tabel 4. Data hasil optimasi volume penotolan

Konsentrasi (ng/µL)	Volume totalan (µL)	Area	Puncak
20,14	6	531,4	Simetris
20,14	10	1069,8	Simetris
20,14	16	1688,1	<i>Fronting</i>
20,14	20	2125,0	<i>Fronting</i>

Jarak elusi juga telah dioptimasi pada penelitian ini. Hasil optimasi tertera pada Tabel 5. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa jarak elusi dapat mempengaruhi Rf dan Rs. Pemisahan yang paling baik didapatkan pada jarak elusi 9 cm. Akan tetapi jarak elusi 8 cm juga memenuhi persyaratan Rs yaitu > 1,5.

Tabel 6. Hasil uji stabilitas larutan standar dalam waktu tertentu

Waktu pengamatan (jam)	Rata-rata Area	Selisih area (%)	Rf	Selisih Rf (%)
0	7421,0 ± 0,5	-	0,66	-
4	6829,7 ± 0,4	7,9	0,67	1,5
8	6715,3 ± 0,5	9,5	0,71	7,5
24	6579,4 ± 0,5	11,3	0,71	7,5

Tabel 7. Hasil uji stabilitas larutan ekstrak dalam waktu tertentu

Waktu pengamatan (jam)	Rata-rata Area	Selisih area (%)	Rf	Selisih Rf (%)
0	2889,7 ± 0,3	-	0,62	-
4	2883,9 ± 0,5	0,2	0,58	6,4
8	2671,9 ± 0,3	7,5	0,58	6,4
24	2452,2 ± 0,3	15,1	0,56	9,7

Untuk menghemat waktu elusi maka dipilih jarak elusi 8 cm.

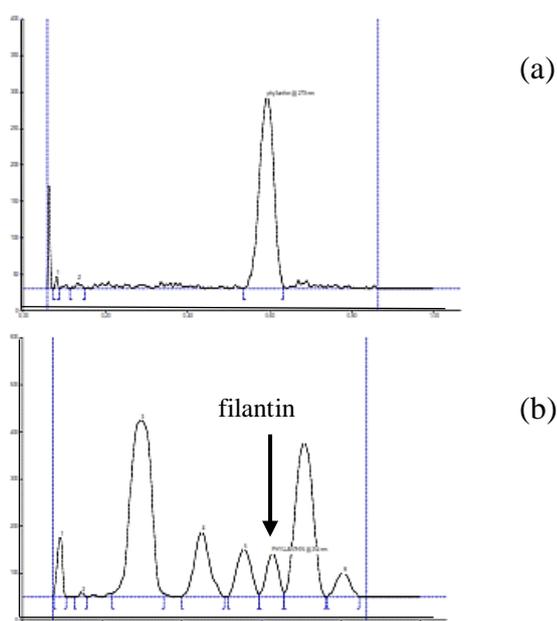
Tabel 5. Data hasil optimasi jarak elusi

Jarak elusi (cm)	Rf	Rs1	Rs2
7	0,54	6,1	1,2
8	0,66	7,3	1,8
9	0,72	7,5	2

Stabilitas larutan uji

Uji stabilitas pada larutan standar dan ekstrak merupakan salah satu uji yang dilakukan pada tahap pre-validasi. Uji stabilitas ini dilakukan untuk mengevaluasi stabilitas larutan uji pada waktu penyimpanan tertentu. Analit pada larutan uji dikatakan stabil apabila selisih area maupun faktor retardasi sebesar 2% terhadap analit pada larutan uji yang baru dibuat dan langsung dianalisis (Indrayanto, 2012). Hasil uji stabilitas larutan uji pada beberapa waktu pengukuran dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7.

Berdasarkan data yang diperoleh diketahui bahwa larutan uji tidak stabil setelah penyimpanan 4 jam. Kemudian dilakukan analisis menggunakan SPSS untuk menentukan apakah terdapat perbedaan bermakna antara area dan faktor retardasi pada setiap waktu pengamatan. Data yang diperoleh menunjukkan distribusi normal dan homogen sehingga dilakukan pengujian dengan *one-way ANOVA*. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan bermakna rata-rata area dan Rf pada setiap waktu pengamatan. Hal tersebut menunjukkan bahwa semakin lama larutan standar disimpan maka akan semakin menurun kadarnya (Gambar 3).



Gambar 3. Kromatogram standar filantin (a) dan ekstrak filantin (b) menggunakan fase gerak toluen : etil asetat : asam format (15 : 10,5 : 1,5 v/v/v)

KESIMPULAN

Kondisi optimal yang diperoleh pada penelitian ini untuk analisis filantin adalah komposisi fase gerak toluen : etil asetat : asam format (15 : 10,5 : 1,5 v/v/v) dengan lama penjuanan 60 menit, panjang gelombang analisis 279 nm, jumlah penotolan 10 μ L dan jarak elusi 8 cm. Stabilitas larutan diuji pada penelitian ini sebagai tahap prevalidasi. Stabilitas larutan uji menurun dengan penyimpanan pada waktu tertentu ditandai dengan penurunan area dan pergeseran faktor retardasi pada kromatogram filantin. Disarankan untuk larutan uji dibuat baru ketika akan dilakukan analisis. Pada penelitian selanjutnya dapat dilakukan validasi metode untuk kondisi optimal yang telah diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

Alegantina, S., Setyorini, H. A. & Triwahyuni. (2015). Pengujian Mutu dan Penetapan Kadar Filantin Pada Ekstrak Etanol Herna Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Buletin Penelitian Kesehatan*; 43; 11-16.

Arsul, V. A., Ganjiwale, R. & Yeole, D. (2011). Development and Validation of Phyllanthin by HPTLC in Hepatoprotective Polyherbal Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Research in Chemistry*; 4; 815-817.

Bhattacharjee, R. & Sil, P. (2007). Protein Isolates from the Herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), Plays Hepatoprotective Role

Against Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage Via Its Antioxidant Properties. *Food and Chemical Toxicology*; 45; 817-826.

Chirdchupunseree, H. & Pramyothin, P. (2010). Protective Activity of Phyllanthin in Ethanol-Treated Primary Culture of Rat Hepatocytes. *Journal Ethnopharmacol*; 128; 172-176.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI). (2009). Farmakope Herbal Indonesia. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia

Dezeeuw, R. A. (1968). Reproducibility of Rf Values in Unsaturated Chambers and Related Development Techniques. *Journal of chromatography*; 33; 222-226.

Indrayanto, G. (2012). Validation of Analytical Methods. *Profiles of Drug Substances, Excipients, And Related Methodology*; 37; 439-463.

Khabiya, R., Upadhyay, D., Srivastava, A. & Anandjiwala, S. (2014). Simultaneous Quantification of Three Bioactive Lignans, Viz., Phyllanthin, Hypophyllanthin and Niranthin from *Phyllanthus amarus* Using High-Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of planar chromatography*; 27; 281-286.

Khatoun, S., Rai, V., Rawat, A. & Mehrotra, S. (2006). Comparative Pharmacognostic Studies of Three *Phyllanthus* Species. *Journal of Ethnopharmacology*; 104; 79-86.

Krithika, R., Jyothilakshmi, V., Prashantha, K. & Verma, R. J. (2015). Mechanism of Protective Effect of Phyllanthin Against Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity and Experimental Liver Fibrosis in Mice. London: Taylor & Francis.

Krithika, R., Mohankumar, R., Ramtej, J. Y. & Shrivastav, P. S. (2009). Isolation, Characterization and Antioxidative Effect of Phyllanthin Against CCL-induced Toxicity in HepG2 Cell Line. *Chemico-Biological Interactions*; 181; 351-358.

Murugaiyah, V. & Chan, K. L. (2007). Determination of Four Lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a Simple High-Performance Liquid Chromatography Method with Fluorescence Detection. *Journal of Chromatography A*; 1154; 198-204.

Nayak, P. S., Upadhyay, A., Dwivedi, S. K. & Rao, S. (2010). Quantitative Determination of Phyllanthin in *Phyllanthus amarus* by High Performance Thin Layer Chromatography. *Boletin Latinoamericano*

y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas; 9; 353-358.

Ravikumara, Y., Raya, U. & Nandhithaa, M. (2011). Inhibition of Hepatic C Virus Replication by Herbal Extract: *Phyllanthus amarus* as Potent Natural Source. *Virus Research*; 158; 89-97.

Tatiya, A., Patil, R., Sutar, M., Shirkhedkar, A. & Surana, S. (2011). Determination of Phyllanthin and Galic Acid in Herbal Hepatoprotective

Formulation by TLC-Densitometry Analysis. *Pharmacognosy Journal*; 3; 39-43.

Tripathi, A. K., Verma, R. K., Gupta, A. K., Gupta, M. M. & Khanuja, S. P. (2006). Quantitative Determination of Phyllantine and Hypophyllantine in *Phyllanthus* Species by High-Performance Thin Layer Chromatography. *Phytochemical Analysis*; 17; 394-397.

Optimasi Metode KCKT-ELSD dengan Pemisahan HILIC untuk Penetapan Kadar Glukosamin Hidroklorida pada Suplemen Kesehatan

Etik Wahyuningsih¹, Riesta Primaharinastiti², Mochammad Yuwono^{2*}

¹Program Studi S2 Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: yuwono05@yahoo.com

Submitted: 11 Februari 2020

Accepted: 15 April 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: The analysis of glucosamine hydrochloride in dietary supplements poses several challenges due to the lack of a sufficient UV chromophore and its high polarity. **Objective:** To get optimized condition of high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) using a hydrophilic interaction liquid chromatography column (HILIC) for the separation of glucosamine hydrochloride in dietary supplements. **Methods:** The influence of the concentration of ammonium formate, mobile phase pH, and composition of acetonitrile as mobile phase on chromatographic separation of glucosamine hydrochloride in the dietary supplement were investigated in detail. ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm, 5 µm were used as column and ELSD was used as detector. **Results:** The best separation demonstrating symmetrical peak of glucosamine was achieved under isocratic condition using mobile phase composition of acetonitrile : water : 30 mM ammonium formate (77 : 3 : 20, v/v/v) at pH of 4.5, column temperature of 35°C, flow rate of 1 mL/min, and injection volume of 5 µL. The temperatures of nebulization and evaporation were 50°C and 80°C, respectively, and the flow rate of nitrogen was at 1.10 standard liter per minutes (SLM). **Conclusion:** The optimized condition of HPLC with ELSD by using HILIC mode proved to be selective and sensitive for the separation of glucosamine hydrochloride in dietary supplements.

Keywords: HPLC-ELSD, HILIC, method optimization, glucosamine hydrochloride, dietary supplements

Abstrak

Pendahuluan: Analisis glukosamin hidroklorida dalam suplemen kesehatan memiliki beberapa kesulitan dikarenakan rendahnya absorpsi pada daerah UV dan sifat kepolarannya yang tinggi. **Tujuan:** Mendapatkan kondisi optimum metode kromatografi cair kinerja tinggi dengan detektor hamburan cahaya evaporatif (KCKT-ELSD) menggunakan kolom kromatografi cair interaksi hidrofilik (HILIC) untuk pemisahan glukosamin hidroklorida dalam suplemen kesehatan. **Metode:** Optimasi kondisi KCKT dilakukan terhadap pengaruh konsentrasi amonium format, pH fase gerak, dan komposisi asetonitril dalam fase gerak pada pemisahan glukosamin hidroklorida dalam suplemen makanan. ZIC-HILIC 150 x 4,6 mm, 5 µm digunakan sebagai kolom. Optimasi kondisi ELSD dilakukan terhadap pengaruh suhu nebulasi dan evaporasi. **Hasil:** Pemisahan terbaik yang menghasilkan puncak simetris dari glukosamin hidroklorida dicapai dalam kondisi isokratik menggunakan komposisi fase gerak asetonitril : air : 30 mM ammonium format (77 : 3 : 20, v/v/v) pada pH 4,5, suhu kolom 35°C, laju alir fase gerak 1 mL/menit, dan volume injeksi sampel 5 µL. Suhu nebulisasi dan evaporasi berturut-turut adalah 50°C dan 80°C, dengan laju aliran nitrogen adalah 1,10 standar liter per menit (SLM). **Kesimpulan:** Kondisi optimum KCKT-ELSD dengan mode HILIC yang diperoleh dalam penelitian ini menghasilkan kromatogram dengan puncak glukosamin hidroklorida yang simetris, dan terpisah secara selektif dan sensitif dari komponen matriks suplemen kesehatan.

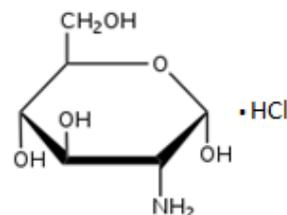
Kata kunci: KCKT-ELSD, HILIC, optimasi metode, glukosamin hidroklorida, suplemen kesehatan

PENDAHULUAN

Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) merupakan metode pilihan untuk analisis senyawa polar yang saat ini banyak digunakan. HILIC pertama kali diperkenalkan pada tahun 1990 oleh Alpert, menggunakan fase gerak campuran pelarut organik khususnya asetonitril. Secara prinsip model pemisahan dilakukan seperti pada kromatografi fase normal (*Normal Phase*) yaitu dengan kolom fase diam polar sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut organik (asetonitril 60-95%) dan pelarut protik yang umumnya adalah air karena mempunyai sifat eluasi yang kuat dan garam mudah menguap seperti ammonium asetat atau amonium format (Ikegami dkk., 2008). Beberapa penelitian menyatakan bahwa HILIC merupakan teknik pemisahan yang efektif untuk senyawa polar seperti protein, peptida, nukleotida dan sediaan farmasi (Guo, 2015). Secara prinsip mekanisme kerja HILIC adalah mekanisme partisi dari analit diantara lapisan air pada fase diam dan fase gerak. Ketebalan lapisan air berbeda-beda tergantung pada tipe kolom (Dinh dkk., 2013). Untuk analit yang mengalami mekanisme partisi, ketebalan lapisan air memegang peranan penting. Selain mekanisme partisi, interaksi *ion-exchange*, ikatan hidrogen, ikatan dipol-dipol dan interaksi hidrofobik juga terjadi pada HILIC. Gaya elektrostatis analit pada fase diam juga memegang peranan penting (Alpert, 2008). Kompleksnya mekanisme retensi dan tersedianya bermacam-macam kolom HILIC mengindikasikan bahwa pengembangan dan optimasi metode tersebut sangat diperlukan, karena adanya perbedaan hidrofobilitas kolom, interaksi ion dan perbedaan struktur kimia analit (Kawachi dkk., 2011).

Glukosamin hidroklorida (Gambar 1) merupakan senyawa yang memiliki polaritas tinggi dengan nilai pKa 8,23 dan log P sebesar -2,175 (Megantara dkk., 2016). Pemilihan HILIC untuk pemisahan glukosamin hidroklorida memiliki keunggulan dibandingkan kolom fase normal dan kolom fase terbalik. Pada kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) kolom fase terbalik (*reversed phase*), senyawa glukosamin hidroklorida dengan polaritas yang tinggi tersebut tidak teretensi kuat pada fase diam sehingga analisis menjadi sulit karena puncak analit seringkali terganggu oleh matriks sampel. Metode KCKT kolom fase terbalik (*reversed phase*) sebelumnya telah dikembangkan dengan menggunakan mode pasangan ion (*ion pairing*) dengan fase gerak yang mengandung pereaksi seperti garam heksana sulfonat atau oktana sulfonat untuk

meningkatkan retensi (Way dkk., 2000). Penggunaan mode pasangan ion memiliki beberapa keterbatasan antara lain mahalnya pereaksi pasangan ion dan dapat mengurangi daya tahan kolom serta dibutuhkan waktu ekuilibrasi yang relatif lama.



Gambar 1. Struktur kimia glukosamin hidroklorida

Ditinjau dari struktur kimianya, glukosamin hidroklorida merupakan gula amino yang memiliki serapan lemah pada daerah ultraviolet/visual (UV-VIS). Metode analisis yang secara umum digunakan untuk analisis glukosamin hidroklorida adalah KCKT dengan detektor UV. Masalah yang timbul pada penggunaan detektor UV adalah deteksi glukosamin hidroklorida yang rendah sehingga harus dilakukan derivatisasi lebih dahulu dengan penambahan pereaksi tertentu sebelum dilakukan analisis, sehingga memerlukan waktu yang lebih lama. Detektor lain yang dapat digunakan untuk pemisahan glukosamin hidroklorida adalah indeks bias refraktif (RID), tetapi sensitivitas RID lebih rendah dibandingkan ELSD. Selain itu, detektor lain yang kurang umum digunakan untuk analisis rutin dalam laboratorium pengujian adalah *corona charged aerosol detector* (cCAD) (Chhavi dkk., 2019). Analisis glukosamin pada sediaan suplemen dengan kolom ZIC-HILIC metode UPLC-QToF-MS juga dilaporkan (Zheng dkk., 2017), namun instrumen tersebut mahal dan butuh keahlian khusus dalam operasional instrumen.

Pada penelitian ini dilakukan pengembangan dan optimasi metode KCKT detektor ELSD mode HILIC untuk analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen kesehatan sehingga komponen lain dalam matriks sampel dapat terpisah dan tidak mengganggu selama proses analisis.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Standar glukosamin HCl (USP, US/Canada), sampel suplemen kesehatan diperoleh dari apotek di Surabaya, amonium format (Sigma-Aldrich), asetonitril HPLC grade (Mallinckrodt), air HPLC grade (Merck, US/Canada), asam klorida (Merck, US/Canada), asam format (Merck, US/Canada).

Alat

Instrumen KCKT yang digunakan adalah Agilent 1100 series HPLC dengan detektor ELSD Agilent 380 dan pemisahan *zwitterion hydrophilic interaction liquid chromatography* (ZIC-HILIC) *column* ukuran pori 200 Å (SeQuant ZIC-HILIC, 150 mm x 4.6 mm x 5 µm, Merck Millipore, VIC, Australia), *ultrasonic bath* (Elma Transsonic TI-H-25).

Metode

Pembuatan larutan baku induk

Stok larutan standar adalah larutan standar glukosamin hidroklorida pada konsentrasi 1000 µg/mL yang disiapkan dari 10,0 mg standar glukosamin hidroklorida (99%) yang dilarutkan dalam air (v/v) dan dicukupkan sampai 10,0 mL dalam labu ukur.

Preparasi sampel

Sebanyak 20 tablet suplemen kesehatan yang mengandung 500 mg glukosamin hidroklorida ditentukan keseragaman bobotnya kemudian digerus hingga halus. Ditimbang seksama 200 mg sampel yang

telah dihaluskan, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan air hingga garis tanda, kemudian disonikasi selama 20 menit dan disaring dengan penyaring membran nilon 0,45 µm dan disuntikkan ke dalam sistem KCKT.

Optimasi kondisi

Metode pengembangan menggunakan dapar 5, 20 atau 30 mM amonium format dilakukan pada berbagai pH 4,0, 4,5 and 6,0 (fase gerak A), air HPLC 3% (fase gerak B) dan berbagai komposisi asetonitril (60%, 62%, 5%, 72,5 % and 77 %) (fase gerak C). Fase gerak kemudian disaring dengan *Millipore vacuum* menggunakan filter 0,45 µm and disonikasi selama 10 menit sebelum digunakan. Kondisi ELSD adalah temperatur nebulasi diatur pada 50°C, temperatur evaporasi diatur pada 80°C dengan laju alir gas nitrogen sebesar 1,10 standar liter per menit (SLM). Optimasi kondisi analisis glukosamin hidroklorida dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Optimasi kondisi pada analisis glukosamin hidroklorida

Kondisi	I	II	III	IV
Konsentrasi asetonitril	60%	62,5%	72,5 %	77%
pH	4,0	4,5	6,0	-
Konsentrasi dapar	5 mM	20 mM	30 mM	-

HASIL DAN PEMBAHASAN

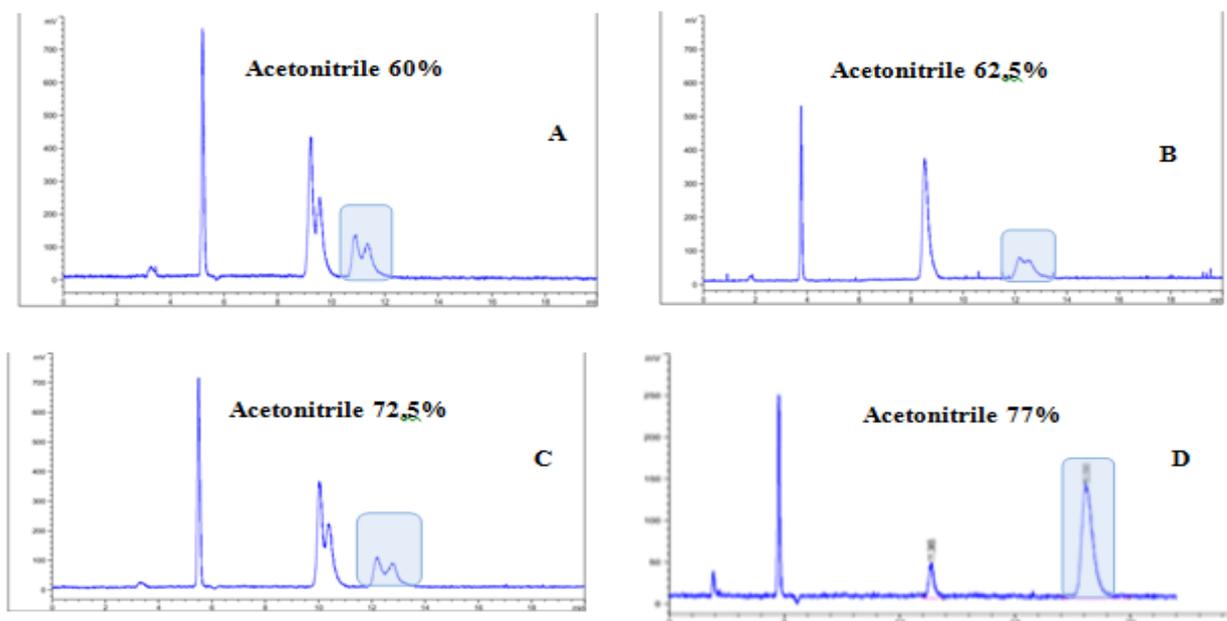
Optimasi komposisi asetonitril

Asetonitril direkomendasikan sebagai pelarut organik pada HILIC, karena memiliki kemampuan membentuk ikatan hidrogen dan mudah menguap. Pengaruh perbedaan komposisi asetonitril terhadap pemisahan, waktu retensi dan area puncak glukosamin hidroklorida tersaji pada Gambar 2. Pada penelitian ini dilakukan variasi komposisi asetonitril dari 60 - 77% (Gambar 2 A, B, C, D). Ketika asetonitril diubah pada konsentrasi 60%, 62,5%, dan 72,5%, area puncak glukosamin hidroklorida terlihat melebar (Gambar 2 A, B, C). Ketika komposisi asetonitril ditingkatkan 77%, maka resolusi juga meningkat (Gambar 2.D).

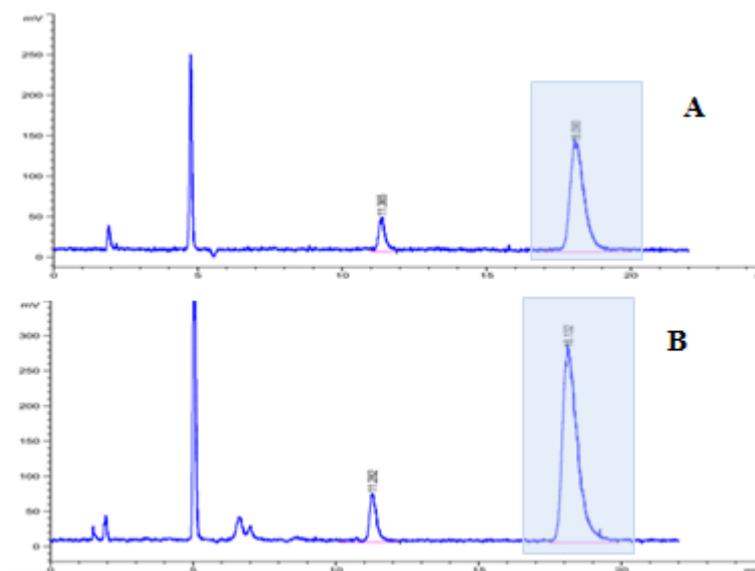
Penambahan persentase air pada fase gerak akan meningkatkan waktu retensi, namun menurunkan resolusi (Gambar 2). Air membentuk lapisan *pseudo-stationary* pada fase polar kolom ZIC-HILIC (Sentkowska dkk., 2013), sehingga air merupakan bagian penting pada HILIC dan diperlukan minimal 2% dari volume fase gerak (Lifford dkk., 2009). Glukosamin hidroklorida merupakan senyawa polar dan teretensi pada lapisan *pseudo-stationary* yang kaya akan air. Penurunan komposisi asetonitril dari 80% -

65% memberikan interaksi yang lemah pada lapisan *pseudo-stationary*, sehingga menurunkan waktu retensi glukosamin (Hao dkk., 2008).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa komposisi asetonitril 77%, 3% air dan 20% amonium format 30 mM memberikan hasil yang optimum (Gambar 2 D) dengan resolusi > 1,5. Dibandingkan dengan metode analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen dengan fase gerak metanol dengan penambahan pereaksi pasangan ion garam oktana sulfonat (Way dkk., 2000), metode pemisahan HILIC dalam penelitian ini memiliki keunggulan tidak diperlukannya pereaksi pasangan ion sehingga dapat meningkatkan daya tahan kolom, hasil pemisahan yang lebih baik dengan resolusi > 1,5 dan dapat mengatasi interferensi komponen matrik sampel (Gambar 3). Dibandingkan dengan metode derivatisasi dengan *Phenylisothiocyanate* dengan fase gerak metanol asam fosfat pada analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen (David dkk., 2005) dan metode *capillary electrophoretic* (CE) dengan derivatisasi menggunakan *o-phtalaldehyde* (Shigeki & Takao, 2012), metode pemisahan HILIC menghasilkan resolusi yang baik tanpa derivatisasi.



Gambar 2. Pengaruh komposisi asetonitril pada penetapan kadar glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC column (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, fase gerak berbagai komposisi asetonitril (pada kromatogram), 30 mM amonium format 77%, Air 3%, pH 4,5; temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, flow rate 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL



Gambar 3. Kromatogram standar glukosamin hidroklorida (A) dan sampel (B) pada fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), pH 4,5, temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, flow rate 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

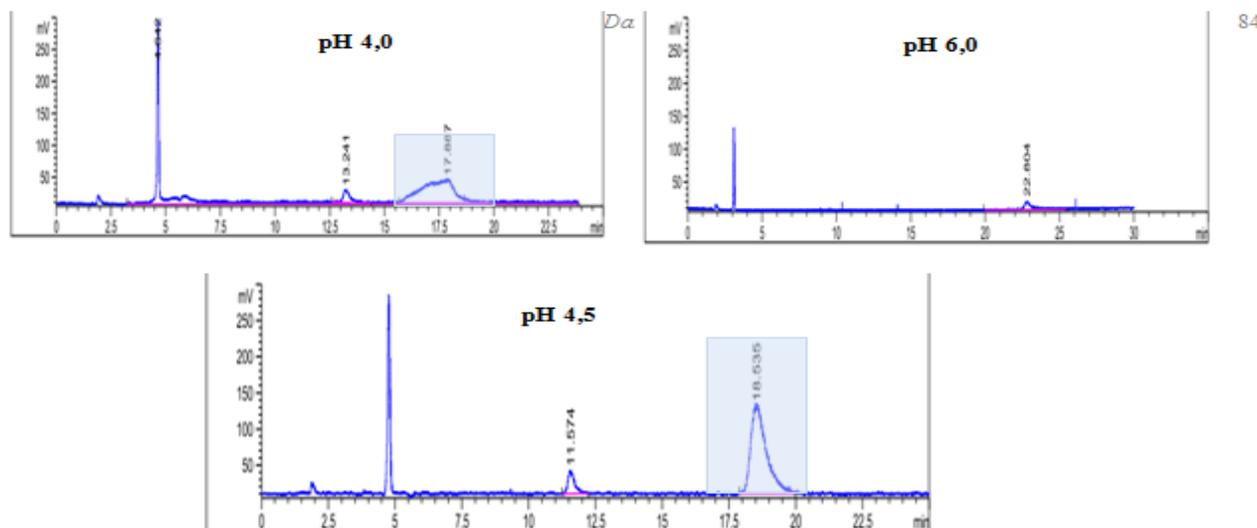
Optimasi pH dapar

Pengaruh pH dapar pada penelitian ini dilakukan pada rentang pH 4 - 6. Pada dapar pH = 4, resolusi menurun dan puncak melebar (Gambar 4 A), namun jika pH ditingkatkan menjadi 6, maka tidak muncul puncak glukosamin hidroklorida walaupun waktu analisis diperpanjang sampai 30 menit. Hal ini disebabkan oleh retensi yang lebih lama pada kolom (Gambar 4 B). Resolusi optimum diperoleh pada dapar

pH = 4,5 (Gambar 4 C). Analit yang mudah terionisasi, waktu retensi dipengaruhi oleh pH (Hana dkk., 2014). Analit bermuatan lebih hidrofilik dan lebih teretensi dalam teknik pemisahan HILIC. Glukosamin hidroklorida memiliki nilai pKa sebesar 8,23 sehingga dengan peningkatan pH dapar (pH 4 – 6) glukosamin hidroklorida bermuatan positif dan akan terjadi interaksi elektrostatis dengan fase diam pada HILIC yang berakibat meningkatkan retensi. pH dapar juga

mempengaruhi muatan pada fase diam dimana pH > 5, silanol akan terdeprotonasi, sehingga permukaan silika

bermuatan negatif dan menyebabkan analit dengan muatan positif teretensi lebih lama.



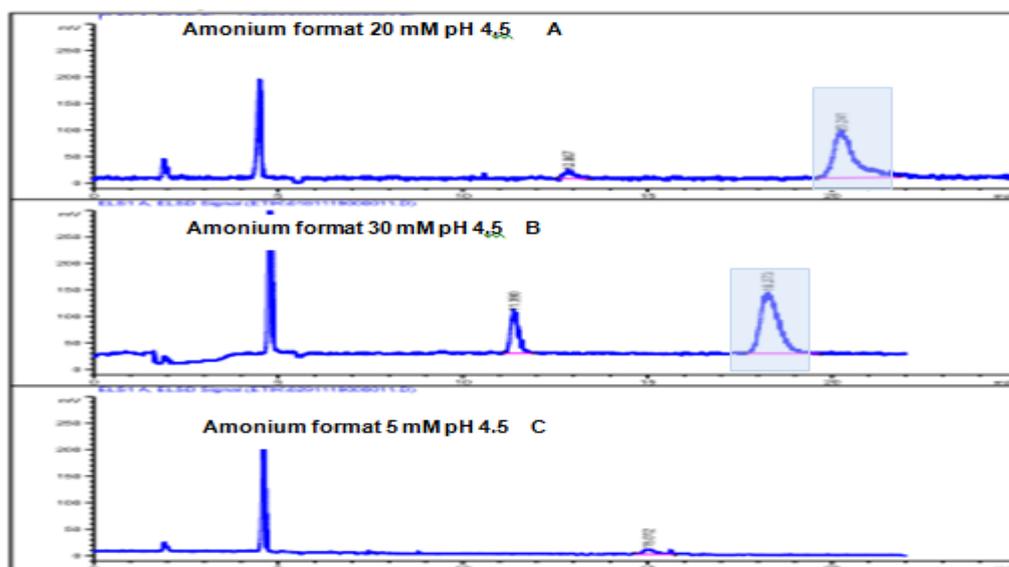
Gambar 4. Pengaruh pH pada pemisahan glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC *column* (150, 4,6 mm), 200 Å 5µm, berbagai pH (pada kromatogram), fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, *flow rate* 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

Optimasi komposisi amonium format

Pada penelitian ini diamati pengaruh amonium format terhadap proses pemisahan glukosamin hidroklorida. Konsentrasi yang digunakan adalah 5 – 30 mM (Gambar 5).

Pada konsentrasi amonium format 5 mM area puncak glukosamin hidroklorida tidak tampak, karena glukosamin hidroklorida teretensi lebih lama pada kolom (Gambar 5 B). Ketika konsentrasi amonium format ditingkatkan menjadi 20 mM, resolusi

meningkat dan waktu retensi lebih lama (20,31 menit). Pada peningkatan konsentrasi amonium format menjadi 30 mM, waktu retensi lebih singkat yaitu 18,53 menit (Gambar 5 C). Untuk menentukan konsentrasi dapar dengan kondisi terpilih dilakukan penyuntikan masing-masing 6 kali pada penggunaan dapar amonium format 20 mM dan 30 mM dengan kondisi terpilih pada konsentrasi 600 µg/mL. Hasil dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.



Gambar 5. Pengaruh komposisi amonium format pada pemisahan glukosamin hidroklorida menggunakan ZIC HILIC *column* (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, berbagai komposisi amonium format (pada kromatogram), fase gerak asetonitril : air : amonium format 30 mM (77 : 3 : 20, v/v/v), pH 4,5; temperatur kolom 35°C, detektor ELSD, *flow rate* 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL

Tabel 2. Harga Rt, area, *Theoretical Plate* (N), resolusi (Rs), selektivitas (α) dan *symmetry* pada konsentrasi dapar amonium format 20 mM

Rep	Glukosamin hidroklorida					
	Amonium format 20 mM					
	Rt (menit)	Area	N	Rs > 1.5	$\alpha > 1$	Tf ≤ 2.0
1	20,23	3669	8195	10,70	1,57	0,53
2	20,24	3747	9355	11,38	1,57	0,55
3	20,26	3678	9617	12,02	1,57	0,47
4	20,24	3631	9519	11,88	1,57	0,48
5	20,24	3714	9471	10,96	1,57	0,49
6	20,24	3757	9255	10,98	1,57	0,50
Mean	20,24	3699,33	-	-	-	-
SD	0,01	48,70	-	-	-	-
RSD	0,05	1,32	-	-	-	-

Tabel 3. Harga Rt, area, *Theoretical Plate* (N), resolusi (Rs), selektivitas (α) dan *symmetry* pada konsentrasi dapar amonium format 30 mM

Rep	Glukosamin hidroklorida					
	Amonium format 30 mM					
	Rt (menit)	Area	N	Rs > 1.5	$\alpha > 1$	Tf ≤ 2.0
1	18,66	4023	7455	12,05	1,61	0,73
2	18,57	4115	8152	11,73	1,60	0,60
3	18,53	4039	8771	12,29	1,60	0,64
4	18,48	4149	7297	11,50	1,60	0,70
5	18,35	4109	6861	11,00	1,61	0,73
6	18,42	4123	7198	11,86	1,60	0,60
Mean	18,50	4093,00	-	-	-	-
SD	0,11	50,18	-	-	-	-
RSD	0,59	1,23	-	-	-	-

Pengaruh konsentrasi dapar dalam fase gerak pada konsentrasi 20 mM dan 30 mM memberikan nilai faktor selektivitas (α) > 1, resolusi (Rs) > 1,5 dan bilangan lempeng teoritis (N) > 2000. Dapar pada HILIC berperan sangat penting untuk menurunkan interaksi elektrostatis antara analit yang bermuatan dengan fase diam. Peningkatan konsentrasi dapar akan menurunkan retensi analit yang bermuatan berlawanan dengan muatan pada fase diam (Dinh dkk., 2013). Fenomena tersebut dapat diamati dari retensi glukosamin hidroklorida yang menurun dengan meningkatnya konsentrasi dapar. Peningkatan konsentrasi amonium format tidak dilakukan, karena larutan dapar akan berinteraksi dengan gugus sulfonat pada fase diam sehingga mengurangi usia kolom.

Waktu retensi pada penggunaan dapar 30 mM lebih singkat rata-rata 18,50 menit dengan nilai RSD 0,59% sedangkan pada pemakaian dapar 20 mM diperoleh waktu retensi rata-rata 20,24 menit dengan nilai RSD 0,05%. Area puncak analit pada penggunaan dapar 30 mM memberikan hasil yang lebih tinggi dengan rata-rata 4093 dan nilai RSD 1,23%, sedangkan pada penggunaan dapar 20 mM area puncak yang diperoleh rata-rata 3699,33 dengan nilai RSD 1,32%.

Dibandingkan dengan metode KCKT menggunakan *detektor corona charged aerosol detector* (cCAD) kolom ZIC-HILIC dengan komposisi asetonitril 65% dan 35% amonium asetat 100 mM (Chhavi dkk., 2019), pada metode KCKT-ELSD dengan kolom ZIC-HILIC menggunakan dapar amonium format 30 mM 20% menghasilkan resolusi yang baik. Pada pemakaian dapar amonium asetat 100 mM, konsentrasi yang tinggi dapat berinteraksi dengan gugus sulfonat pada fase diam yang dapat mengurangi daya tahan kolom.

Suhu kolom, laju alir fase gerak, kondisi ELSD antara lain suhu nebulasi dan evaporasi serta laju alir gas nitrogen mempengaruhi resolusi dan mekanisme retensi dari analit sehingga perlu dilakukan optimasi lebih lanjut. Pada kondisi ELSD, suhu nebulisasi dan ukuran tetapan aerosol (berkisar antara 4 hingga 40 μ m) mempengaruhi respons detector (Lafosse & Herbretau, 2002). Pembentukan aerosol membutuhkan gas inert sebagai contoh nitrogen, helium atau argon. Laju alir gas mempengaruhi ukuran tetapan (*droplet*) yang terbentuk pada saat nebulasi. Aliran gas yang tinggi akan menghasilkan droplet yang kecil dan penguapan akan lebih mudah, namun droplet

yang terlalu kecil memiliki efektifitas yang rendah terhadap hamburan cahaya sehingga menghasilkan respon yang rendah (Laksmi dkk., 2012). Optimasi kondisi ELSD pada analisis *2-Deoxy D-Glucose* dengan HILIC pada suhu *drift tube* 30 - 50°C dan laju alir nitrogen 1,5 – 2,5 mL/menit telah dilaporkan. Hasil yang optimum diperoleh pada laju alir nitrogen 1,5 mL/menit dan suhu *drift tube* 30°C. Peningkatan laju alir nitrogen lebih besar dari 2,0 mL/menit menurunkan respon detektor (Laksmi dkk., 2012). Pada analisis karbohidrat, optimasi kondisi ELSD dilakukan pada suhu nebulasi antara 70°C - 85°C, suhu evaporator antara 85°C - 100°C dan laju alir nitrogen antara 0,6 - 1,2 SLM. Kondisi optimum diperoleh pada suhu nebulizer 88,8°C, suhu evaporator 77,9°C dan laju alir nitrogen sebesar 1,1 SLM (Luis dkk., 2015).

Pengaturan suhu evaporasi ditujukan untuk menguapkan fase gerak. Beberapa contoh fase gerak yang dapat digunakan adalah TFA (*trifluoro acetic acid*), amonium format, amonium asetat, asam asetat, amonium karbonat dan amonium hidroksida (Lucena dkk., 2007). Pada analisis glukosamin dan karbohidrat dengan detektor ELSD secara umum fase gerak yang sering digunakan adalah amonium format dan amonium asetat (Hubert dkk., 2010).

KESIMPULAN

Metode KCKT-ELSD dengan mode pemisahan *Hydrophilic interaction liquid chromatography* untuk analisis glukosamin hidroklorida pada sediaan suplemen kesehatan didapatkan kondisi optimum dengan penggunaan kolom ZIC HILIC (150, 4,6 mm), 200 Å 5 µm, fase gerak asetronitril : 30 mM amonium format : air (77 : 20 : 3, v/v/v) secara isokratik, temperatur kolom 35°C, pH 4,5, laju alir fase gerak 1 mL/menit, volume injeksi 5 µL dengan kondisi detektor ELSD suhu nebulasi dan evaporator 50°C : 80°C, *flow rate* Nitrogen 1,10 SLM.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Unit Layanan Pengujian dan Departemen Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas dukungan sarana.

DAFTAR PUSTAKA

Alpert, A. J. (2008). Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and

Selective Isolation of Phosphopeptide. *Analytical Chemistry*; 80; 62-77.

Chhavi, A., Gregory, M. P., Mandhur, S. & Rahul, P. P. (2019). Development and Validation of a Novel High Performance Liquid Chromatography-Coupled with Corona Charged Aerosol Detector Method for Quantification of Glucosamine in Dietary Supplements. *PLoSOne*; 14; 1-20.

David, J., Lingjun, Z., Jianhai, C. & Emily, P. (2005). Precolumn Derivatization Liquid Chromatography Method for Analysis of Dietary Supplements for Glucosamine: Single Laboratory Validation Study. *Journal of AOAC International*; 88; 413-417.

Dinh, N. P., Jonsson, T. & Irgum, K. (2013). Water Uptake on Polar Stationary Phases Under Conditions for Hydrophilic Interaction Chromatography and Its Relation to Solute Retention. *Journal of Chromatography A*; 1320; 33-47.

Guo, Y. (2015). Recent Progress in the Fundamental Understanding of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Analyst*; 140; 6652-6466.

Hana, V., Katerina, J., Katerina, S., Helena, T., Petr, S. & Lucie, N. (2014). Study of the Retention Behavior of Small Polar Molecules on Different Types of Stationary Phases Used in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Journal of Separation Science*; 37; 1-11.

Hao, Z., Xiao, B. & Weng, N. (2008). Impact of Column Temperature and Mobile Phase Components on Selectivity of Hydrophilic Interaction Chromatography (HILIC). *Journal of Separation Science*; 31; 1449-1464.

Hubert, C., Hovan, S., Locamte, F., Houbart, V., Deeby, C. D., Fillet, M. & Piel, G. (2010). Development & Validation of a Sensitive Solid Phase Extraction/HILIC/MS Method for the Accurate of Glucosamine in Dog Plasma. *Journal of Chromatography A*; 1217; 3275-3281.

Ikegami, T., Tomomatsu, K., Takubo, H., Horie, K. & Tanaka, N. (2008). Separation Efficiencies in Hydrophilic Interaction Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1184; 474-503.

Kawachi, Y., Ikagami, T., Tokubo, H., Ikagami, Y., Muyamoto, M. & Tanaka, N. (2011). Chromatographic Characterization of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Stationary

- Phase: Hydrophilicity, Charge Effect, Structural Selectivity and Separation Efficiency. *Journal of Chromatography A*; 1218; 5903-5919.
- Lafosse, M. & Herbreteau, B. (2002). Carbohydrate Analysis by LC and SFC Using Evaporative Light Scattering Detection. *Journal of Chromatography*; 66; 1101–1134.
- Laksmi, N. C., Subrahmanyam, D. & Dubey, P. K. (2012). A Novel LC-ELSD Method for the Quantification of 2-Deoxy D-glucose Using HILIC Chromatography. *Schoolar Research Library*; 4; 591-598.
- Lifford, R. M., Ye, B., Nancy, J. B. & Shuhong, Z. (2009). Comparison of the Sensitivity of Evaporative Universal Detector and LC/MS in the HILIC and the Reversed-phase HPLC Mode. *Journal of Chromatography B*; 877; 4133-4139.
- Lucena, R., Cárdenas, S. & Valcárcel, M. (2007). Evaporative Light Scattering Detection: Trends in Its Analytical Uses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*; 388; 1663–1672.
- Luis, C. H., Elena, P. L. & Pilar, R. (2015). Improved Evaporative Light Scattering Detection for Carbohydrate Analysis. *Food chemistry*; 180; 265-271.
- Megantara, S., Mutakin, M. & Levita, J. (2016). Prediction of Log P and Spectrum Quersetin, Glucosamine and Andrographolide and Its Corellation with Laboratory Analysis. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*; 8; 33-37.
- Sentkowska A., Biesaga M. & Pyrzynska K. (2013). Effects of the Operation Parameters on HILIC Separation of Flavonoids on Zwitterionic Column. *Talanta*; 115; 284-90.
- Shigeki, A. & Takao, A. (2012). Development of a Simple Capillary Electrophoretic Determination of Glucosamine in Nutritional Supplements Using In-Capillary Derivatization with *O*-Phthalaldehyde. *Food chemistry*; 130; 1137-1141.
- Way, W. K, Gibson, K. G. & Breite, A. G. (2000). Determination Glucosamine in Nutritional Supplement by RP-ion Pair HPLC. *Journal Liquid Chromatography & Real Technology*; 23; 2861-2871.
- Zheng, L., Kim, M., Han, P. & Quigley, C. L. (2017). Determination Glucosamine in Food Supplement by HILIC-ESI-MS. *European Pharmaceutical Review*; 22; 62-65.

Faktor Risiko Kejadian Diabetes Melitus pada Akseptor Pengguna Kontrasepsi Oral

Nurmainah*, Rafli Armandani, Mohammad Andrie

Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

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

Submitted: 11 Februari 2020

Accepted: 19 Mei 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Hormone progesterone in oral contraceptives can interfere with carbohydrate metabolism and accumulation of fat levels are at risk for an increase in blood sugar levels. **Objective:** We studied the association between types of contraception and the value of the Body Mass Index (BMI) to the risk of diabetes mellitus in acceptors in the Perumnas II Pontianak Public Health Care. **Methods:** The research method used observational with cross sectional design. Data collection using medical record acceptors during the period January 2018 to March 2019. The sampling technique was done by purposive sampling, based on inclusion and exclusion criteria. There were 44 acceptors who fulfilled the inclusion and exclusion criteria in this study. Furthermore, the measurement of blood sugar levels while using a glucometer. The data obtained were analyzed by chi-square test. **Results:** The results showed that 20% of the acceptors used single oral contraceptives and 80% were combined. However, the difference in the risk of diabetes mellitus from the two groups was not statistically significant ($p = 0.647$; $OR = 0.44$; $CI95\% = 0.45 - 4.395$). In addition, acceptors with a BMI value ≥ 23 (Kg/m^2) were 60% and acceptors with a BMI value < 23 (Kg/m^2) were 40%. However, the difference in the risk of diabetes mellitus between the two groups was not statistically significant ($p = 0.30$; $OR = 3.8$; $CI95\% = 0.560 - 26.052$). **Conclusion:** There is no significant associated between the oral contraceptives and BMI to the risk of the incidence of diabetes mellitus.

Keywords: acceptor, body mass index, diabetes mellitus, oral contraceptives

Abstrak

Pendahuluan: Kandungan hormon progesteron dalam kontrasepsi oral dapat mengganggu metabolisme karbohidrat dan penumpukan kadar lemak yang berisiko untuk terjadinya peningkatan kadar gula darah. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini adalah untuk menganalisis hubungan jenis kontrasepsi dan nilai Indeks Masa Tubuh (IMT) terhadap risiko kejadian diabetes melitus pada akseptor kontrasepsi oral di Puskesmas Perumnas II Pontianak. **Metode:** Metode penelitian observasional dengan rancangan potong lintang yang bersifat analitik. Pengumpulan data dilakukan secara retrospektif berdasarkan data rekam medik akseptor kontrasepsi oral selama periode Januari 2018 hingga Maret 2019. Teknik pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*, berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Akseptor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini sebanyak 44 akseptor. Selanjutnya, 44 akseptor dilakukan pengukuran kadar gula darah sewaktu dengan menggunakan alat glukometer. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji khi kuadrat. **Hasil:** Hasil penelitian menunjukkan bahwa akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral tunggal mengalami risiko kejadian diabetes melitus sebanyak 20% sedangkan akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral kombinasi sebanyak 80%. Namun perbedaan risiko kejadian diabetes melitus dari kedua kelompok secara statistik tidak bermakna signifikan ($p = 0,647$; $OR = 0,44$; $CI 95\% = 0,45 - 4,395$). Selain itu, akseptor kontrasepsi oral dengan nilai IMT ≥ 23 (Kg/m^2) yang mengalami risiko kejadian diabetes melitus tercatat sebanyak 60% dan akseptor dengan nilai

IMT < 23 (Kg/m²) sebanyak 40%. Namun perbedaan risiko kejadian diabetes melitus kedua kelompok secara statistik tidak bermakna signifikan ($p = 0,30$; OR = 3,8; CI95% = 0,560 - 26,052). **Kesimpulan:** Tidak terdapat hubungan yang bermakna signifikan antara jenis kontrasepsi oral dan IMT terhadap risiko kejadian diabetes melitus pada akseptor pengguna kontrasepsi oral.

Kata kunci: akseptor, diabetes melitus, indeks masa tubuh, kontrasepsi oral

PENDAHULUAN

Program Keluarga Berencana (KB) telah diakui mampu menekan angka kelahiran di Indonesia. Hasil *Total Fertility Rate* (TFR) di Indonesia dari tahun 2012 hingga tahun 2017 diketahui telah mengalami penurunan dari 2,6% menjadi 2,4%. Hal ini diimbangi dengan persentase wanita kawin yang telah mengikuti program KB di Indonesia sekitar 63% dimana 57% menggunakan program KB dengan metode modern dan sisanya menggunakan metode KB tradisional. Salah satu metode KB modern yang banyak dipilih oleh wanita kawin atau akseptor adalah kontrasepsi oral (pil KB) setelah KB suntik (BKKBN, 2018).

Kontrasepsi oral merupakan salah satu kontrasepsi hormonal diketahui memiliki reversibilitas yang tinggi dibandingkan dengan kontrasepsi hormonal lainnya. Namun demikian, penggunaan kontrasepsi oral dapat menimbulkan efek samping berupa peningkatan kadar gula darah. Risiko diabetes melitus pada wanita kawin yang menggunakan kontrasepsi oral 4 kali lebih besar dibandingkan wanita kawin yang tidak menggunakan kontrasepsi oral (Sudoyo, 2009; Deleskog dkk., 2011). Akseptor kontrasepsi oral yang mengalami peningkatan gula darah diperkirakan sekitar 10% hingga 20% (Nurpalah, 2018; Rahma dkk., 2019)

Jenis kontrasepsi oral ada dua yaitu kontrasepsi oral tunggal yang mengandung progesteron saja dan kontrasepsi oral kombinasi yang mengandung progesteron dan estrogen sintetik. Adanya kandungan hormon progesteron dalam kontrasepsi oral tersebut diketahui dapat mengganggu metabolisme karbohidrat melalui pergeseran kortisol oleh progestin dari ikatan globulin. Globulin diketahui memiliki afinitas yang tinggi untuk berikatan dengan progesteron dibandingkan dengan kortisol. Kondisi ini menyebabkan terjadi peningkatan kadar kortisol bebas dari proses metabolisme glukosa (glukogenesis) yang berdampak pada peningkatan kadar gula darah. Di sisi lain, adanya gangguan metabolisme karbohidrat dari penggunaan kontrasepsi oral maka diduga berdampak pada peningkatan berat badan akseptor (Speroff & Fritz, 2005). Peningkatan berat badan pada akseptor

mencapai 5% atau lebih selama kurun waktu 6 bulan, sekitar 2 Kg setelah 12 bulan, dan terus meningkat hingga 10 Kg setelah pemakaian 24 bulan (Bonny dkk., 2009). Progesteron sintetik berpotensi untuk terjadinya penumpukan lemak di bawah kulit dan meningkatkan akumulasi lemak viseral yang disebabkan kadar estrogen pada akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral rendah atau mengalami hipoestrogen (Reifsnider dkk., 2013). Kondisi tersebut memicu untuk berkembangnya penyakit diabetes melitus (DM) tipe 2 pada akseptor pengguna kontrasepsi oral.

Berdasarkan permasalahan tersebut peneliti tertarik untuk menganalisis hubungan peningkatan kadar gula darah pada akseptor pengguna kontrasepsi oral berdasarkan jenis kontrasepsi oral dan indeks masa tubuh (IMT) akseptor. Penelitian dilakukan pada akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral di Puskesmas Perumnas II Pontianak. Jumlah akseptor KB aktif di Puskesmas Perumnas II merupakan akseptor terbanyak di kota Pontianak. Jumlah akseptor yang tercatat di Puskesmas tersebut sebanyak 6.864 jiwa, dimana 28,63% menggunakan kontrasepsi oral.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah data rekam medik yang memuat data karakteristik akseptor seperti usia, jenis kontrasepsi oral, berat badan, tinggi badan, dan kadar gula darah sewaktu.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah lembar pengumpul data, program SPSS (*Statistical Product and Service Solutions*) versi 23.0.0, dan alat pengukur kadar gula darah atau glucometer (Gluco dr[®]).

Metode penelitian dan teknik pengambilan sampel

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasional dengan rancangan potong lintang (*cross sectional*) yang bersifat analitik. Pengumpulan data secara retrospektif menggunakan data rekam medik akseptor kontrasepsi oral selama periode Januari 2018 hingga Maret 2019. Teknik

pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel berdasarkan pada pemenuhan kriteria yang telah ditentukan sebelumnya (Riwidikno & Handoko, 2012). Kriteria inklusi dalam penelitian ini yaitu, wanita berusia 19 tahun atau lebih yang menggunakan kontrasepsi oral tunggal maupun kombinasi, tidak menggunakan obat diabetes melitus maupun insulin, dan tidak memiliki riwayat diabetes mellitus. Kriteria eksklusinya adalah memiliki catatan data rekam medik yang tidak lengkap atau tidak jelas terbaca. Akseptor yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi pada penelitian ini sebanyak 44 akseptor. Selanjutnya, 44 akseptor dilakukan pengukuran kadar gula darah sewaktu. Pengambilan sampel darah yang digunakan adalah sampel darah perifer di ujung jari dan pengukuran kadar gula darah dilakukan dengan menggunakan alat glukometer. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji khi kuadrat (*chi-square*). Uji dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variabel jenis kontrasepsi oral dan IMT dengan peningkatan kadar gula darah akseptor (Dahlan, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Setelah dilakukan observasi data akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral selama 1 tahun hingga lebih terlihat karakteristik akseptor pada Tabel 1, dimana akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral sebanyak 70,45% berusia di bawah 40 tahun. Akseptor dengan usia tersebut memiliki masa reproduksi yang sehat dan subur sehingga kontrasepsi oral digunakan sebagai cara untuk menjarangkan kehamilan (Meysetri dkk., 2019). Jenis kontrasepsi oral yang banyak dipilih oleh akseptor adalah kontrasepsi oral kombinasi sebanyak 65,91%. Kontrasepsi oral kombinasi yang digunakan akseptor mengandung levonorgestel 0,15 mg dan ethinylestradiol 0,03 mg. Kontrasepsi oral kombinasi memiliki efektivitas yang sama dengan tubektomi dalam mencegah kehamilan (Baziad, 2002). Akseptor yang memiliki IMT ≥ 23 Kg/m² sebanyak 31,82%. Nilai IMT ≥ 23 Kg/m² menunjukkan akseptor berada pada derajat risiko obesitas. Obesitas merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya diabetes melitus tipe 2 (PERKENI, 2015).

Tabel 1. Karakteristik akseptor di Puskesmas Perumnas II (n = 44)

No.	Karakteristik	Jumlah	Persentase (%)
Jenis Kontrasepsi oral			
1.	a. Tunggal	15	30,09
	b. Kombinasi	29	65,91
Indeks Masa Tubuh (Kg/m ²)			
2.	a. ≥ 23	14	31,82
	b. < 23	30	68,18
Kadar gula darah sewaktu (mg/dL)			
3.	a. > 140	5	11,36
	b. < 140	39	88,64
Total		44	100

Tampak pada Tabel 2 bahwa akseptor kontrasepsi oral yang menggunakan kontrasepsi oral tunggal yang mengalami risiko kejadian diabetes melitus sebanyak 20% dan akseptor kontrasepsi oral kombinasi yang mengalami risiko kejadian diabetes melitus sebanyak 80%. Namun perbedaan risiko diabetes melitus dari kedua kelompok secara statistik tidak memiliki hubungan yang bermakna signifikan ($p = 0,647$; OR = 0,44; CI95% = 0,45 - 4,395). Artinya, dari hasil analisis ini menunjukkan tidak ada hubungan antara akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral tunggal maupun kontrasepsi oral kombinasi dengan risiko kejadian diabetes melitus (Meysetri dkk., 2019). Secara teori, kontrasepsi oral tunggal yang mengandung

progesteron memiliki risiko lebih besar dibandingkan dengan kontrasepsi oral kombinasi yang mengandung progesteron dan esterogen. Hormon progesteron cenderung dapat meningkatkan kadar gula darah sedangkan hormon esterogen dapat menstabilkan kadar gula darah (Rahma dkk., 2019). Pada umumnya akseptor yang menggunakan kontrasepsi oral kombinasi memiliki kadar gula darah sewaktu yang normal (Rahma dkk., 2019). Kontrasepsi oral kombinasi tidak mengganggu metabolisme karbohidrat, hanya sebagian kecil saja yang mengalami gangguan, tetapi tidak sampai mengalami gangguan klinis yang bermakna (Bender & Mayes, 2009).

Tabel 2. Hubungan jenis kontrasepsi oral dengan risiko kejadian diabetes melitus

Jenis Kontrasepsi Oral	Risiko Kejadian Diabetes Melitus				p- value	OR	CI 95%	
	Ya		Tidak				Lower-Upper	
	n	%	n	%				
Tunggal	1	20	14	35,9	0,647	ref	0,45 - 4,395	
Kombinasi	4	80	25	64,1				

Keterangan: ref: *reference* (pembanding); OR: *odds ratio*; CI: *confidence interval*

Tampak pada Tabel 3 bahwa akseptor kontrasepsi oral dengan nilai IMT ≥ 23 (Kg/m²) yang mengalami risiko kejadian diabetes melitus sebanyak 60% dan akseptor dengan nilai IMT < 23 (Kg/m²) yang mengalami risiko kejadian diabetes melitus sebanyak 40%. Namun perbedaan risiko diabetes melitus kedua kelompok secara statistik tidak memiliki hubungan yang bermakna signifikan ($p = 0,30$; OR = 3,8; CI95% = 0,560 - 26,052). Artinya, tidak ada hubungan antara akseptor yang memiliki IMT ≥ 23 (Kg/m²) maupun akseptor yang memiliki IMT < 23 (Kg/m²) dengan risiko kejadian diabetes melitus (Arif, 2014). Hal ini dikarenakan pengukuran risiko diabetes melitus belum cukup dengan hanya mengukur nilai IMT saja, tetapi

perlu dilakukan pengukuran lingkar pinggang (Adwinda & Srimati, 2019). Seperti halnya yang dilakukan di negara Australia, Thailand, dan Hongkong (Pongastha dkk., 2012). Hasil pengukuran lingkar pinggang dapat digunakan sebagai prediksi yang lebih baik untuk mengukur resistensi insulin pada DM tipe 2 dibanding dengan nilai IMT. Hal ini dikarenakan IMT dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kepadatan tulang dan otot (Huang dkk., 2012). Penelitian lainnya menyebutkan bahwa peningkatan IMT dengan kadar gula darah puasa memiliki hubungan bermakna hanya sampai kadar gula darah 110 mg/dL (Kang & Kim, 2012).

Tabel 3. Hubungan Indeks Masa Tubuh (IMT) dengan Risiko Kejadian Diabetes Melitus

IMT (Kg/m ²)	Risiko Kejadian Diabetes Melitus				p- value	OR	CI 95%	
	Ya		Tidak				Lower-Upper	
	n	%	n	%				
≥ 23	3	60	11	28,2	0,30	ref	0,560 - 26,052	
< 23	2	40	28	71,8				

Keterangan: ref: *reference* (pembanding); OR: *odds ratio*; CI: *confidence interval*

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian bahwa tidak terdapat hubungan yang signifikan antara jenis kontrasepsi oral dan nilai IMT dengan risiko kejadian diabetes melitus pada akseptor pengguna kontrasepsi oral di Puskesmas Perumnas II Pontianak, dimana nilai satatistiknya secara berturut-turut menunjukkan $p = 0,647$; OR = 0,44; CI95% = 0,45 - 4,395 dan $p = 0,30$; OR = 3,8; CI95% = 0,560 - 26,052.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura dan pihak Puskesmas Perumnas II Pontianak yang telah membantu selama pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Adwinda, M. D. & Srimati, M. (2019). Hubungan Lingkar Perut, Konsumsi Gula dan Lemak dengan Kadar Glukosa Darah Pegawai Direkotrat Poltekkes Kemenkes Jakarta II. *Nutrire Diaita*; 11; 7-17.

Arif, Y. E. D. R. (2014). Hubungan Indeks Massa Tubuh dengan Kadar Gula Darah Puasa pada Pegawai Sekretariat Daerah Provinsi Riau. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*; 1; 14-15.

Baziad, A. (2002) Kontrasepsi Hormonal. Jakarta: Yayasan Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo.

Bender, D. & Mayes, P. (2009). Gluconeogenesis & Control of Blood Glucose. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

- BKKBN. (2018). Survey Demografi dan Kesehatan Indonesia by BKKBN. <http://sdki.bkkbn.go.id/?lang=id>. Accessed: 10 September 2019.
- Bonny, A., Secic, M. & Cromes, B. (2009). A Longitudinal Comparison of Body Composition Changes in Adolescent Girls Receiving Hormonal Contraception. *Journal of Adolescent Health; 45*; 423–425.
- Dahlan, M. (2009). Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan (4th ed.). Jakarta: Salemba Medika.
- Deleskog, A., Hilding, A. & Östenson, C. G. (2011). Oral Contraceptive Use and Abnormal Glucose Regulation in Swedish Middle Aged Women. *Diabetes Research and Clinical Practice; 92*; 288–292.
- Huang, L. H., Liao, Y. L. & Hsu, C. H. (2012). Waist Circumference is a Better Predictor Than Body Mass Index of Insulin Resistance in Type 2 Diabetes. *Obesity Research and Clinical Practice; 6*; e314–e320.
- Kang, H. M. & Kim, D. J. (2012). Body Mass Index and Waist Circumference According to Glucose Tolerance Status in Korea: The 2005 Korean Health and Nutrition Examination Survey. *Journal of Korean Medical Science; 27*; 518–524.
- Meysetri, F. R., Serudji, J. & Agus, M. (2019). Perbedaan Kadar Glukosa Darah Puasa pada Akseptor Suntik Depo Medroksi Progesteron Asetat dengan Akseptor Pil Kombinasi di Puskesmas Lubuk Buaya Padang Tahun 2018. *Jurnal Kesehatan Andalas; 8*; 227.
- Nurpalah, R. (2018). Pemeriksaan Glukosa Darah pada Wanita Pengguna Kontrasepsi Oral dan pada Wanita Hamil Trimester III. *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada; 17*; 385-389.
- PERKENI. (2015). Pengolahan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia. Jakarta: PB PERKENI.
- Pongastha, S., Morakot, N., Sangchun, K. & Chaovitsaree, S. (2012). Correlation Between Waist Circumference and Other Factors in Menopausal Women In Thailand. *Health; 4*; 60-65.
- Rahma, S., Mursyida, A. & Rauf, Y. (2019). Kadar Gula Darah Pengguna Kontrasepsi Hormonal. *Jambura Nursing Journal; 1*; 73–84.
- Reifsnider, E., Mendias, N., Davila, Y. & Babendure, J. B. (2013). Contraception and the Obese Woman. *Journal of the American Association of Nurse Practitioners; 25*; 223–233.
- Riwidikno & Handoko. (2012). Statistik Kesehatan. Yogyakarta: Mitra Cendikia.
- Speroff, L. & Fritz, M. (2005). Hormone Biosynthesis, Metabolism and Mechanism of Action in Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. *Lippincot Williams dan Wilkin; 7*; 87–94.
- Sudoyo. (2009). Buku Ajaran Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Interna Publishing.

Studi Interaksi Molekuler Aktivitas Antimikroba Peptida Bioaktif terhadap *Staphylococcus aureus* Secara *In silico*

Taufik Muhammad Fakih*, Mentari Luthfika Dewi

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

*Corresponding author: taufikmuhammadf@gmail.com

Submitted: 28 Maret 2020

Accepted: 10 Mei 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) contains bioactive peptides and is widely used in treatment of various diseases because of their biological activity, including antimicrobial agent. Some of these bioactive peptides include pelteobagrins, myxinidin, pleurocidin, and pardaxin-P1 and have been proven to be able to inhibit Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) of *Staphylococcus aureus*. **Objective:** This study aims to identify the antimicrobial activity of bioactive peptide molecules through *in silico* against the Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) macromolecules of *Staphylococcus aureus* and interactions of these bioactive peptides that may be involved in this antimicrobial action. **Methods:** The sequencing bioactive peptide was firstly performed for modeling in the form of 3D conformation using PEP-FOLD software. The best conformation of the modeling results was chosen and then a molecular docking study was done on the macromolecule of *Staphylococcus aureus* using PatchDock software. The molecular interactions product were then identified using the BIOVIA Discovery Studio 2020 software. **Results:** The results of molecular docking showed that the myxinidin bioactive peptide has the best affinity with an ACE score -2497.26 kJ/mol. **Conclusion:** The bioactive peptide from yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) was considered to be used as a natural antimicrobial candidate.

Keywords: *Pelteobagrus fulvidraco*, bioactive peptide, penicillin-binding protein 3 (PBP3), *Staphylococcus aureus*

Abstrak

Pendahuluan: Lendir kulit ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*), mengandung peptida bioaktif dan banyak dimanfaatkan dalam pengobatan berbagai penyakit karena memiliki aktivitas biologis, diantaranya sebagai antimikroba. Beberapa peptida bioaktif tersebut, antara lain pelteobagrins, myxinidin, pleurocidin, dan pardaxin-P1 dan telah terbukti mampu menghambat *Penicillin-Binding Protein 3* (PBP3) dari *Staphylococcus aureus*. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi aktivitas antimikroba molekul peptida bioaktif secara *in silico* terhadap makromolekul *Penicillin-Binding Protein 3* (PBP3) dari *Staphylococcus aureus* dan interaksi peptida bioaktif tersebut yang terlibat dalam mekanisme aksi antimikroba. **Metode:** Sekuensing peptida bioaktif terlebih dahulu dilakukan pemodelan ke dalam bentuk konformasi 3D menggunakan *software* PEP-FOLD. Konformasi terbaik hasil pemodelan dipilih untuk kemudian dilakukan studi penambatan molekuler terhadap makromolekul dari *Staphylococcus aureus* menggunakan *software* PatchDock. Interaksi molekuler yang terbentuk selanjutnya diidentifikasi lebih lanjut menggunakan *software* BIOVIA Discovery Studio 2020. **Hasil:** Berdasarkan hasil penambatan molekuler menunjukkan bahwa peptida bioaktif myxinidin memiliki afinitas paling baik dengan ACE score $-2497,26$ kJ/mol. **Kesimpulan:** Peptida bioaktif lendir kulit ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*) dapat dipertimbangkan sebagai kandidat antimikroba alami.

Kata kunci: *Pelteobagrus fulvidraco*, peptida bioaktif, *Penicillin-Binding Protein 3* (PBP3), *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Pilihan terapi yang efektif untuk mencegah infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* hingga saat ini masih terbatas. Hal tersebut menjadi dalam pengendalian *Staphylococcus aureus* (Boucher dkk., 2009). *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram-positif komensal yang berkoloni pada mukosa hidung manusia baik secara permanen atau sementara (Kluytmans dkk., 1997) dan akhirnya memperparah bagian yang terinfeksi (Kuehnert dkk., 2005; Klevens dkk., 2007). Gejala klinis tidak akan muncul sampai sistem kekebalan tubuh terpengaruh (Diefenbeck dkk., 2011). Masalah utama dalam mengendalikan infeksi *Staphylococcus aureus* adalah terjadinya resistensi multi-obat yang disebabkan karena penyalahgunaan antibiotika. Di samping itu juga dapat diakibatkan oleh pengobatan infeksi non-bakteri dengan antibiotika atau tingkat kepatuhan yang kurang terhadap aturan konsumsi obat. Oleh karena itu, diperlukan molekul terapi baru sebagai kandidat antibiotika dalam pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus*. Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa terdapat beberapa molekul peptida bioaktif yang berpotensi sebagai alternatif terbaik untuk mengembangkan terapi infeksi bakteri yang resisten terhadap beberapa obat (Garo dkk., 2007; Coutinho dkk., 2008; Coutinho dkk., 2009).

Penelitian terbaru mengungkapkan bahwa lendir permukaan ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*) mengandung molekul peptida bioaktif seperti pelteobagrins, myxinidin, pleurocidin, dan pardaxin-P1 (Su, 2011). Lendir ini merupakan perlindungan pertama terhadap mikroba yang hidup di air. Selain berguna sebagai penghalang fisik antara ikan dan lingkungannya, lendir ini juga telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba yang dimediasi melalui serangkaian faktor kekebalan tubuh bawaan yang terdiri dari lisozim, lektin, enzim proteolitik, flavoenzim, imunoglobulin, dan protein C-reaktif (Ellis, 2001; Whyte, 2007; Subramanian dkk., 2008). Aktivitas antimikroba molekul peptida bioaktif ini antara lain mampu menghambat pertumbuhan mikroba, seperti bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, jamur, virus, dan parasit. Selain itu, peptida ini juga berperan sebagai imunomodulator untuk meningkatkan imunitas tubuh (Bergsson dkk., 2005; Luders dkk., 2005; Subramanian dkk., 2009).

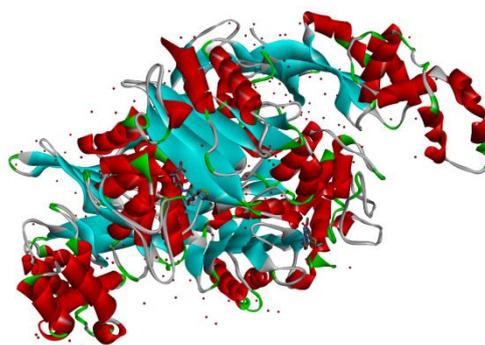
Pada penelitian ini akan dibuktikan lebih lanjut interaksi yang terjadi antara molekul peptida bioaktif dengan struktur reseptor target yang terdapat pada *Staphylococcus aureus* yaitu *Penicillin-Binding*

Protein 3 (PBP3) dari *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (Yoshida dkk., 2012). Studi komputasi dengan memanfaatkan metode penambatan molekuler berbasis protein-peptida dipilih untuk membandingkan molekul peptida bioaktif yang memiliki afinitas dan interaksi paling baik terhadap target reseptor sehingga dapat diperoleh struktur acuan sebagai kandidat peptida antimikroba.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur kristal makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* yang telah membentuk kompleks dengan cefotaxime. Makromolekul protein tersebut diperoleh dari web Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) dengan kode PDB 3VSL dan memiliki resolusi 2,40 Å (Gambar 1) (Yoshida dkk., 2012). Kemudian, molekul peptida bioaktif yang digunakan dalam penelitian ini merupakan peptida bioaktif yang memiliki aktivitas terhadap *Staphylococcus aureus* dan telah dibuktikan melalui penelitian sebelumnya. Molekul peptida bioaktif tersebut adalah pelteobagrins, myxinidin, pleurocidin, dan pardaxin-P1 yang berasal dari lendir permukaan ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Su, 2011).



Gambar 1. Struktur kristal makromolekul protein dari *Staphylococcus aureus* yang membentuk kompleks dengan cefotaxime

Alat

Software yang digunakan dalam penelitian ini meliputi Sistem Operasi Windows 10 dan Linux Ubuntu 18.10, MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2, PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>), PachDock, serta BIOVIA Discovery Studio 2020. Selain itu, *hardware* yang digunakan adalah komputer dengan spesifikasi *processor* Intel (R) Core i3-6100

CPU @ 2.30GHz (4 CPUs), *memory* 4096 MB RAM, Harddisk 320GB, dan VGA Intel HD Graphics 520.

Metode

Preparasi makromolekul protein

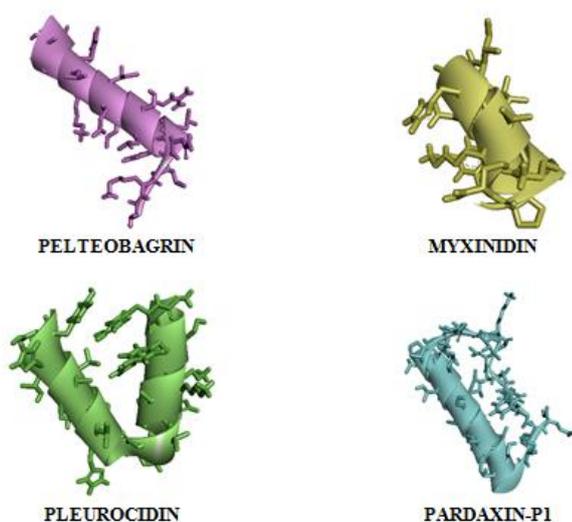
Struktur kristal makromolekul protein yang telah diunduh dari web Protein Data Bank selanjutnya dilakukan preparasi terlebih dahulu menggunakan *software* MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2. Preparasi makromolekul protein ini dilakukan dengan menghilangkan molekul air dan ligan alami, kemudian dilanjutkan dengan menambahkan atom hidrogen polar dan menghitung muatan parsial Kollman (Kurniawan dkk., 2018).

Identifikasi area sisi aktif makromolekul protein

Makromolekul protein yang telah dipreparasi kemudian diidentifikasi dan dievaluasi bagian sisi aktif pengikatan yang berperan terhadap aktivitas antimikroba dengan menggunakan *software* BIOVIA Discovery Studio 2020 (Kemish dkk., 2017). Molekul cefotaxime yang merupakan ligan alami dari makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* digunakan untuk mengidentifikasi dan mengevaluasi area sisi aktif dari makromolekul protein.

Pemodelan molekul peptida bioaktif

Pemodelan molekul peptida bioaktif dilakukan dengan menggunakan *server* PEP-FOLD (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/PEP-FOLD/>) (Gambar 2). *Server* PEP-FOLD merupakan suatu *software* yang digunakan untuk pemodelan sekuensing peptida bioaktif menjadi konformasi 3D menggunakan metode *de novo* dengan jumlah asam amino antara 9 sampai 25 (Chavan & Deobagkar, 2015).



Gambar 2. Struktur molekul peptida bioaktif dari lendir permukaan ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*)

Simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida

Simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida dilakukan menggunakan *software* PatchDock untuk mengamati, mengidentifikasi, dan mengevaluasi afinitas molekul peptida bioaktif terhadap makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus*. Jarak antara bagian permukaan makromolekul protein dan molekul peptida bioaktif dibatasi dengan batas radius maksimum 4.0 Å. Simulasi penambatan molekuler ini menggunakan parameter berdasarkan representasi bentuk molekul, bagian sisi aktif pengikatan makromolekul protein, serta pemilihan dan penilaiannya. Simulasi ini juga dilakukan secara efisien tanpa adanya ikatan yang bersifat rigid antar molekul (Aruleba dkk., 2018).

Analisis hasil simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida

Dari hasil penambatan molekuler berbasis protein-peptida selanjutnya dilakukan identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi terhadap interaksi molekuler yang terjadi antara makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* dengan molekul peptida bioaktif berdasarkan *Atomic Contact Energy* (ACE) *score* (Prabhu & Rajeswari, 2016). Residu asam amino yang bertanggung jawab terhadap interaksi molekuler yang terbentuk diamati dengan *software* BIOVIA Discovery Studio 2020.

HASIL DAN PEMBAHASAN

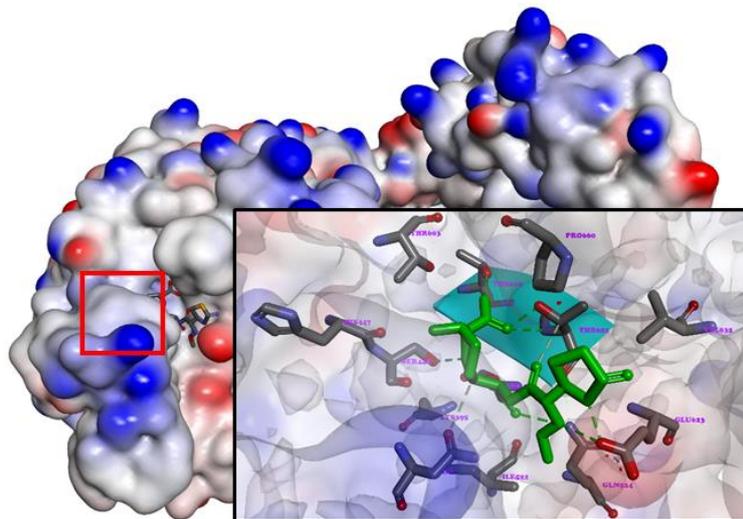
Peptida antimikroba saat ini telah menjadi sumber pengobatan yang sangat penting dan banyak penelitian yang dilakukan terhadap aktivitas terapeutiknya. Dengan demikian, perlu dilakukan evaluasi aktivitas antimikroba terhadap lendir permukaan ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*). Protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* dipilih untuk dipelajari karena merupakan target penting pada bakteri patogen. Di samping itu, sebagian besar bakteri patogenik telah mengalami resistensi terhadap beberapa antibiotika yang tersedia saat ini, karena penyalagunaan atau penggunaannya yang berlebihan. Fenomena ini menjadikan kebutuhan mendesak untuk mengeksplorasi berbagai sumber agen antimikroba yang efektif, tidak toksik, dan hemat biaya (Subramanian dkk., 2008; Subramanian dkk., 2009). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in silico*.

Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa terdapat beberapa molekul peptida bioaktif dari lendir permukaan ikan lele kuning (*Pelteobagrus fulvidraco*) yang telah berhasil dikarakterisasi, dipreparasi, dan dipurifikasi. Proses pembuatan peptida bioaktif ini memanfaatkan proses sintesis organik, *Microwave Assisted Extraction* (MAE), hidrolisis kimia, dan hidrolisis enzim. Selanjutnya dilakukan proses pemurnian peptida bioaktif dengan menggunakan metode kromatografi eksklusi gel, kromatografi penukar ion, dan kromatografi cair kinerja tinggi. Beberapa peptida bioaktif yang memiliki aktivitas terhadap protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus*, diantaranya adalah pelteobagrin, myxinidin, pleurocidin, dan pardaxin-P1 (Su, 2011).

Makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* terlebih dahulu dilakukan preparasi dengan menghilangkan molekul air dan ligan alami yaitu cefotaxime, kemudian tahapan selanjutnya adalah menambahkan atom hidrogen polar, dan menghitung muatan parsial Kollman dengan menggunakan *software* MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2 (Kurniawan dkk., 2018). Tahapan preparasi makromolekul protein ini bertujuan untuk

memastikan bahwa molekul peptida bioaktif dapat menghasilkan afinitas yang baik pada bagian sisi aktif pengikatan makromolekul protein dan membentuk interaksi yang stabil. Selain itu, molekul cefotaxime yang telah membentuk kompleks dengan protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* digunakan sebagai senyawa pembanding untuk mengamati interaksi dan afinitasnya.

Setelah dilakukan preparasi terhadap makromolekul protein dari *Staphylococcus aureus* kemudian dilakukan identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi pada bagian sisi aktifnya dengan menggunakan *software* BIOVIA Discovery Studio 2020 sehingga sifat dan karakteristik dari area pengikatan pada protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* dapat diketahui secara detail. Interaksi yang terjadi antara protein dari *Staphylococcus aureus* dengan cefotaxime (Gambar 3) meliputi 9 ikatan hidrogen (dengan Asn450, Ser488, Gln524, Thr619, Thr621, dan Glu623). Berdasarkan hasil pengamatan dapat diprediksi bahwa residu asam amino tersebut bertanggung jawab sebagai komponen penyusun pada bagian sisi aktif pengikatan makromolekul protein target.



Gambar 3. Bagian sisi aktif pengikatan makromolekul protein dari *Staphylococcus aureus*

Pemodelan struktur tiga dimensi hasil sekuensing molekul peptida bioaktif dilakukan dengan *server* PEP-FOLD. Konformasi peptida bioaktif terbaik dipilih berdasarkan energy sOPEP (*Optimized Potential for Efficient Structure Prediction*) (Thevenet dkk., 2012; Shen dkk., 2014). Energi sOPEP yang telah terintegrasi dalam *server* PEP-FOLD menggambarkan konformasi struktur peptida bioaktif yang dimodelkan mendekati

keadaan aslinya, sehingga diharapkan mampu menghasilkan afinitas dan interaksi yang stabil dengan makromolekul protein target. Berdasarkan hasil pemodelan peptida bioaktif yang terdapat pada Tabel 1 dapat diprediksi bahwa peptida tersebut akan dapat berinteraksi dengan baik pada bagian sisi aktif pengikatan protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus*.

Tabel 1. Nilai energi sOPEP (*Optimized Potential for Efficient Structure Prediction*) molekul peptida bioaktif

Molekul peptida bioaktif	Sekuensing molekul peptida bioaktif	Energi sOPEP (<i>Optimized Potential for Efficient Structure Prediction</i>)
Pelteobagrin	GKLNLFSLRLEILKLFVGAL	-48,74
Myxinidin	GIHDILKYGKPS	-14,75
Pleurocidin	GWGSFFKKAHVGGKHVGKAAL THYL	-47,04
Pardaxin-P1	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSA LSSSGEQE	-61,97

Simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida menggunakan *software* PatchDock dilakukan untuk mengamati afinitas paling baik diantara beberapa molekul peptida bioaktif, serta mengamati interaksi yang terbentuk dengan makromolekul protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus*. Kompleks protein-peptida dengan konformasi terbaik hasil simulasi penambatan molekuler dipilih berdasarkan PatchDock *score*, kemudian molekul peptida bioaktif tersebut dibandingkan berdasarkan *Atomic Contact Energy* (ACE) *score* (Prabhu & Rajeswari, 2016). Data hasil

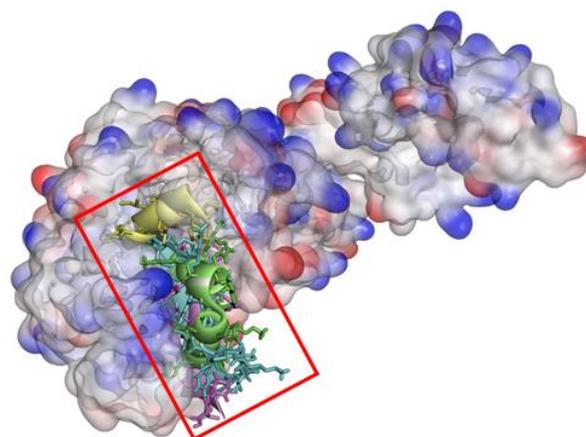
penambatan molekuler pada Tabel 2 menunjukkan bahwa peptida bioaktif myxinidin memiliki afinitas yang lebih baik dibandingkan cefotaxime dan peptida bioaktif lainnya, yaitu dengan ACE *score* -2497,26 kJ/mol. Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh peptida bioaktif pleurocidin yang memiliki ACE *score* positif yaitu 183,05 kJ/mol. Fenomena tersebut dapat disebabkan oleh adanya interaksi yang tidak diinginkan (*unfavorable bond*) antara peptida bioaktif pleurocidin dengan makromolekul protein target (Veeraragavan dkk., 2017).

Tabel 2. Energi bebas pengikatan hasil simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida

Molekul uji	PatchDock <i>score</i>	ACE <i>score</i> (kJ/mol)
Cefotaxime	4742	-1390,47
Pelteobagrin	10050	-176,31
Myxinidin	7310	-2497,26
Pleurocidin	9680	183,05
Pardaxin-P1	10462	-1073,95

Selanjutnya dilakukan identifikasi dan evaluasi terhadap visualisasi kompleks molekul peptida bioaktif dan makromolekul protein target. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna, karena sebagian besar peptida bioaktif berada pada bagian sisi aktif pengikatan protein PBP3 dari *Staphylococcus aureus* (Gambar 4). Apabila dilakukan perbandingan interaksi, peptida bioaktif myxinidin memiliki interaksi yang lebih banyak (Tabel 3). Interaksi yang terbentuk antara peptida bioaktif myxinidin dengan protein target meliputi 8 ikatan hidrogen (dengan Ser392, Ser429, Met446, Ser448, Thr619, Thr621, dan Trp662) dan 6 interaksi hidrofobik (dengan His447, Val658, Pro659, Pro661, dan Trp662). Hasil identifikasi ini membuktikan bahwa interaksi yang terbentuk antara peptida bioaktif myxinidin dan makromolekul protein PBP3 dari

Staphylococcus aureus memiliki ikatan yang stabil pada area sisi aktif pengikatan (Norel dkk., 2001).



Gambar 4. Konformasi molekul peptida bioaktif pada sisi aktif pengikatan makromolekul protein dari *Staphylococcus aureus*

Tabel 3. Interaksi hasil simulasi penambatan molekuler berbasis protein-peptida

Molekul uji	Jumlah interaksi	Residu asam amino
Cefotaxime	10	Ser392, Val606, Thr619, Thr621, Ser634, Tyr636, Pro661, Leu663,
Pelteobagrin	6	Ser392, Asn432, Leu471, Leu518, Thr621, Pro659
Myxinidin	14	Ser392, Ser429, Met446, His447, Ser448, Thr619, Thr621, Val658, Pro659, Pro661, Trp662
Pleurocidin	13	Ser392, Phe421, Leu425, Lys427, Ser429, Asn432, Leu471, Gln524, Thr621, Glu623,
Pardaxin-P1	12	Leu425, Lys427, Ser429, Phe454, Leu471, Pro514, Asp519, Thr621, Pro659

KESIMPULAN

Peptida bioaktif myxinidin memiliki afinitas yang paling baik dibandingkan peptida bioaktif lainnya dengan ACE score $-2497,26$ kJ/mol dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai kandidat antimikroba alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Aruleba, R. T., Adekiya, T. A., Oyinloye, B. E. & Kappo, A. P. (2018). Structural Studies of Predicted Ligand Binding Sites and Molecular Docking Analysis of *Slc2a4* as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*; 19; 386.
- Bergsson, G., Agerberth, B., Jornvall, H. & Gudmundsson, G. H. (2005). Isolation and Identification of Antimicrobial Components from the Epidermal Mucus of Atlantic Cod (*Gadus morhua*). *The FEBS Journal*; 272; 4960-4969.
- Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B. & Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: no ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*; 48; 1-12.
- Chavan, S. G. & Deobagkar, D. D. (2015). An *in silico* Insight into Novel Therapeutic Interaction of LTNF Peptide-LT10 and Design of Structure Based Peptidomimetics for Putative Anti-Diabetic Activity. *PLoS One*; 10; e0121860.
- Coutinho, H. D., Costa, J. G., Lima, E. O., Falcao-Silva, V. S. & Siqueira-Junior, J. P. (2008). Enhancement of the Antibiotic Activity Against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*; 4; 328-330.
- Coutinho, H. D., Costa, J. G., Lima, E. O., Falcao-Silva, V. S. & Siqueira-Junior, J. P. (2009). Herbal Therapy Associated with Antibiotic Therapy: Potentiation of the Antibiotic Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*; 9; 13.
- Diefenbeck, M., Mennenga, U., Guckel, P., Tiemann, A.H., Muckley, T., & Hofmann, G.O. (2011). Vacuum-assisted Closure Therapy for the Treatment of Acute Postoperative Osteomyelitis. *Z Orthop Unfall*; 149; 336-341.
- Ellis, A. E. (2001). Innate Host Defense Mechanisms of Fish Against Viruses and Bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*; 25; 827-839.
- Garo, E., Eldridge, G. R., Goering, M. G., DeLancey, P. E., Hamilton, M. A., Costerton, J. W. & James, G. A. (2007). Asiatic Acid and Corosolic Acid Enhance the Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 51; 1813-1817.
- Kemmish, H., Fasnacht, M. & Yan, L. (2017). Fully Automated Antibody Structure Prediction using BIOVIA Tools: Validation Study. *PLoS One*; 12; e0177923.
- Klevens, R. M., Morrison, M. A., Nadle, J., Petit, S., Gershman, K., Ray, S., Harrison, L. H., Lynfield, R., Dumyati, G., Townes, J. M., Craig, A. S., Zell, E. R., Fosheim, G. E., McDougal, L. K., Carey, R. B. & Fridkin, S. K. Active Bacterial Core surveillance (ABCs) MRSA Investigatorset Al. Invasive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections in the United States. *Jama*; 298; 1763-1771.
- Kluytmans, J., van Belkum, A. & Verbrugh, H. (1997). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, Underlying Mechanisms, and Associated Risks. *Clinical Microbiology Reviews*; 10; 505-520.

- Kuehnert, M. J., Hill, H. A., Kupronis, B. A., Tokars, J. I., Solomon, S. L. & Jernigan, D. B. Methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerging Infectious Diseases*; 11; 868-872.
- Kurniawan, F., Miura, Y., Kartasasmita, R. E., Yoshioka, N., Mutalib, A. & Tjahjono, D. H. (2018). In Silico Study, Synthesis, and Cytotoxic Activities of Porphyrin Derivatives. *Pharmaceuticals*; 11; 8.
- Luders, T., Birkemo, G. A., Meyer, J. N., Andersen, O. & Nes, I. F. (2005) Proline Conformation Dependent Antimicrobial Activity of a Proline-Rich Histone H1 N-terminal Peptide Fragment Isolated from the Skin Mucus of Atlantic Salmon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 49; 2399-2406.
- Norel, R., Sheinerman, F., Petrey, D. & Honig, B. (2001). Electrostatic Contributions to Protein-Protein Interactions: Fast Energetic Filters for Docking and Their Physical Basis. *Protein Science*; 10; 2147-2161.
- Prabhu, D. S. & Rajeswari, V. D. (2016). In Silico Docking Analysis of Bioactive Compounds from Chinese Medicine *Jinqi Jiangtang* Tablet (JQJT) using Patch Dock. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 8; 15-21.
- Shen, Y., Maupetit, J., Derreumaux, P. & Tuffery P. (2014). Improved PEP-FOLD Approach for Peptide and Mini-protein Structure Prediction. *Journal of Chemical Theory and Computation*; 10; 4745-4758.
- Su, Y. (2011) Isolation and Identification of Pelteobagrin, A Novel Antimicrobial Peptide from the Skin Mucus of Yellow Catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comparative Biochemistry and Physiology*; 158; 149-154.
- Subramanian, S., Ross, N. W. & MacKinnon, S. L. (2008). Comparison of Antimicrobial Activity in the Epidermal Mucus Extracts of Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*; 150; 85-92.
- Subramanian, S., Ross, N. W., & MacKinnon, S. L. (2009). Myxinidin, A Novel Antimicrobial Peptide from the Epidermal Mucus of Hagfish, *Myxine glutinosa* L. *Marine Biotechnology*; 11; 748-757.
- Thevenet, P., Shen, Y., Maupetit, J., Guyon, F., Derreumaux, P. & Tuffery, P. (2012). PEP-FOLD: An Updated De Novo Structure Prediction Server for Both Linear and Disulfide Bonded Cyclic Peptides. *Nucleic Acids Research*; 40; 288-293.
- Veeraragavan, V., Narayanaswamy, R. & Chidambaram, R. (2017). Predicting the Biodegradability Nature of Imidazole and Its Derivatives by Modulating Two Histidine Degradation Enzymes (Urocanase and Formiminoglutamase) Activities. *Asian Journal Pharmaceutical and Clinical Research*; 10; 383-386.
- Whyte, S. K. (2007). The Innate Immune Response of Finfish – A Review of Current Knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*; 23; 1127-1151.
- Yoshida, H., Kawai, F., Obayashi, E., Akashi, S., Roper, D. I., Tame, J. R. H. & Park, S. Y. (2012) Crystal Structures of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the Apo and Cefotaxime-Bound Forms. *Journal of Molecular Biology*; 423; 351-364.

Karakterisasi Ekstrak Etanol Buah *Citrus amblycarpa* (L), *Citrus aurantifolia* (S.), dan *Citrus sinensis* (O.)

Andhi Fahrurroji^{1*}, Hafrizal Riza²

¹Departemen Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

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

Submitted: 28 Maret 2020

Accepted: 14 Juli 2020

Published: 30 November 2020

Abstract

Background: Sweet citrus fruits (*Citrus amblycarpa* (L)), lime (*Citrus aurantifolia* (S.)), and sambal orange (*Citrus sinensis* (O.)) have enormous potential, especially the content of secondary metabolite compounds. **Objective:** This study aims to determine the specific and non-specific characteristic of extract from various citrus fruits in 60% ethanol solvent. **Methods:** the extract obtained was determined by non-specific parameters and the extract's specific parameters from each extract of the citrus fruit component. **Results:** Based on the observations' results, ethanol extract of 60% peel and seeds and water on the citrus fruit, the highest yield value was obtained in the ethanol extract of 60% sambal orange seeds 25.28%. All samples contained phenolic and flavonoid compounds in the test tube. In the TLC test, the silica gel 60 F254 stationary phases were used to identify saponins with the mobile phase of chloroform : methanol : water (64 : 50 : 1) and identification of flavonoids using the mobile phase of glacial acetic acid : formic acid : water : ethyl acetate (11 : 11 : 27 : 100), both compounds showed positive reactions in all test samples. The moisture content for the orange water sample ranged from 8.149% - 9.748%. **Conclusion:** The highest yield value was obtained in the ethanol extract of 60% chili orange seeds by 25,28%. In the TLC test in the stationary phase of silica gel 60 F 254 to identify saponins and flavonoids, all samples showed a positive reaction, with ash content of all samples in the range 2,722 - 5,442%.

Keywords: sweet orange (*Citrus amblycarpa* (l)), lime fruit (*Citrus aurantifolia* (s.)), sambal orange (*Citrus sinensis* (o.)), specific parameters, non-specific parameters

Abstrak

Pendahuluan: Buah jeruk manis (*Citrus amblycarpa* (L)), jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (S.)), dan jeruk sambal (*Citrus sinensis* (O.)) memiliki potensi yang sangat besar khususnya kandungan senyawa metabolit sekunder. **Tujuan:** Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik spesifik dan non spesifik berbagai jenis buah jeruk tersebut pada pelarut etanol 60%. **Metode:** Ekstrak yang diperoleh ditentukan parameter nonspesifik dan parameter spesifik ekstraknya dari masing-masing ekstrak dari komponen buah jeruk tersebut. **Hasil:** Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan Ekstrak etanol 60% kulit dan biji serta air pada buah jeruk tersebut dengan nilai rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol 60% biji jeruk sambal dengan rendemen yang dihasilkan sebesar 25,28%. Seluruh sampel mengandung senyawa fenolik dan flavonoid pada uji tabung. Pada uji KLT fase diam *silica gel* 60 F₂₅₄ untuk identifikasi saponin dengan fase gerak kloroform : metanol : air (64 : 50 : 1) dan identifikasi flavonoid menggunakan fase gerak asam asetat glisial : asam formiat : air : etil asetat (11 : 11 : 27 : 100) pada kedua senyawa tersebut menunjukkan reaksi positif pada seluruh sampel uji. Kadar air untuk sampel air jeruk berkisar antara 8,149% - 9,748%. **Kesimpulan:** Nilai rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol 60% biji jeruk sambal sebesar 25,28%.

Pada uji KLT fase diam *silica gel* 60 F 254 untuk identifikasi saponin dan flavonoid seluruh sampel menunjukkan reaksi positif. Serta kadar abu seluruh sampel pada rentang 2,722 - 5,442%.

Kata kunci: buah jeruk manis (*Citrus amblycarpa* (L)), buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (S.)), buah jeruk sambal (*Citrus sinensis* (O.)), parameter spesifik, parameter non spesifik

PENDAHULUAN

Perkembangan penggunaan obat-obatan herbal saat ini sangat signifikan. Salah satu alasan dikarenakan memiliki toksisitas yang sangat rendah. Saat ini badan kesehatan dunia (WHO) merekomendasikan dan mendorong penggunaan ramuan tradisional atau obat karena memiliki sumber bahan baku yang besar dan mudah tersedia. Tumbuhan memiliki sifat kandungan yang berbeda tergantung kepada masa tanam, waktu panen, sehingga memiliki aktivitas terapi yang bervariasi sesuai dengan spesies, lokasi geografis dan proses panen (World Health Organization, 1998). Proses identifikasi herbal yang tidak tepat, keberadaan mikroorganisme pada bahan, serta residu pestisida akibat proses pembersihan yang tidak tepat dapat menyebabkan efek samping. Oleh sebab itu, perlu dilakukan standarisasi obat herbal baik simplisia, ekstrak maupun sudah dalam bentuk sediaan. Menurut WHO, secara makroskopis dan deskripsi mikroskopis dari suatu tanaman obat merupakan gambaran kebenaran identitas suatu spesies dan dapat dijadikan sebagai landasan pengujian yang lain (World Health Organization, 1998; Apraj dkk., 2011).

Buah jeruk dalam hal ini jeruk manis (*Citrus sinensis* (O.)), jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (S.)) dan jeruk sambal (*Citrus amblycarpa* (L)) di Kalimantan Barat merupakan salah satu unggulan tanaman yang jumlahnya melimpah di masyarakat. Berdasarkan data dari Kementerian Pertanian produksi jeruk di Indonesia pada rentang tahun 1980 - 2015 meningkat secara signifikan dengan peningkatan 9,94% per tahun. Perkembangan itu terjadi dapat dilihat pada tahun 1980 total produksi jeruk di Indonesia 311.014 ton. Sedangkan pada tahun 2015 sudah menjadi 1,86 juta ton (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2015). Berdasarkan data dari dinas pertanian tahun 2018 tentang tanaman biofarmaka. Tanaman jeruk bukan merupakan produk tersebut meskipun Kalimantan Barat merupakan salah satu sentra tanaman jeruk namun jeruk hanya masih sebatas konsumsi biasa dan belum masuk pada bahan biofarmaka. Jeruk sendiri memiliki kandungan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas berbagai macam indikasi penyakit.

C. aurantifolia mengandung zat fitokimia aktif sebagai berikut: (1) flavonoid termasuk apigenin, hesperetin, kaempferol, nobiletin, quercetin, dan rutin, (2) flavones, (3) flavanon dan naringenin, (4) triterpenoid, dan (5) limonoid (Poulose dkk., 2005). Penelitian lain yang dilakukan Lota mengungkapkan setidaknya 62 senyawa volatil dalam minyak kulit buah dan 59 dalam minyak daun dari beberapa spesies jeruk nipis (Lota dkk., 2002). Adapun kandungan fitokimia dan vitamin dari lima varietas spesies jeruk; *C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. limonum*, *C. aurantifolia*, dan *C. grandis*, diantaranya senyawa bioaktif dalam 100 g jeruk terdiri dari alkaloid (0,4 mg), flavonoid (0,6 mg), tanin (0,04 mg), riboflavin (0,1 mg), tiamin (0,2 mg), fenol (0,4 mg), niasin (0,5 mg), dan asam askorbat (62 mg). Selain itu, buah jeruk ini mengandung protein kasar (18%), serat kasar (8%), karbohidrat (78%), kelembaban (6%), lemak mentah (1%), abu (8%), dan kandungan energi makanan adalah (363 g/kal) buah segar (Narang and Jiraungkoorskul, 2016).

Penggunaan sebagai bahan obat tradisional atau sifat fitokimia dari *C. aurantifolia* dari beberapa tinjauan literatur dapat digunakan sebagai antibakteri, antidiabetik, antijamur, antihipertensi, antiinflamasi, aktivitas anti-lipidemia, antioksidan, anti-parasit, dan antiplatelet. Fungsi lainnya dapat digunakan untuk pengobatan penyakit kardiovaskular, hati, osteoporosis, dan urolitiasis dan bertindak sebagai promotor kesuburan. Selain itu, dapat digunakan untuk aktivitas insektisida (Narang and Jiraungkoorskul, 2016).

Citrus sinensis (O.) (L. Osbeck) atau jeruk manis berasal dari Asia Tenggara, karena terbukti memiliki vitamin C yang sangat tinggi, sehingga dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan alami. Kandungan metabolit penting penting pada jeruk ini seperti naringin 17,33 mg/g limonoid 398,30 mg/g, *synephrine* 2,81 mg/g, Hesperidin 191,53 mg/g, Nobiletin 3,00 mg/g, Tangeretin 0,26 mg/g (Sun dkk., 2013) Selain itu pada jeruk terdapat kandungan polifenol, pektin, dan folasin, kalsium, kalium, tiamin, niasin, dan magnesium. Kandungan tersebut secara biologis dapat mencegah arteriosklerosis, kanker, batu ginjal, bisul perut dan pengurangan kadar kolesterol

darah manusia dan darah tinggi yang meningkatkan kesehatan manusia. Jeruk memiliki manfaat yang sangat banyak dan buah dapat diperoleh hampir sepanjang tahun serta harga buahnya relatif. (Etebu & Nwauzoma, 2014).

Skrining fitokimia juga membuktikan adanya kandungan glikosida pada ekstrak etanol 70% daun *C. amblycarpa*, dimana diduga senyawa glikosida yang terdapat pada tanaman *C. amblycarpa* merupakan glikosida flavonoid. Senyawa glikosida flavonoid yang terdapat dalam jumlah besar pada tanaman *citrus* yaitu neohesperidin, naringin, *neoeriocitrin*, dan ponsirin yang mana senyawa ini memiliki peran menimbulkan rasa pahit pada jeruk. Senyawa glikosida flavonoid memiliki sifat farmakokinetik yaitu kecenderungan membentuk ikatan dengan protein plasma yang rendah sehingga konsentrasi senyawa dalam darah apabila dikonsumsi dapat bertahan lebih lama dimana sifat farmakokinetik ini merupakan sifat yang diinginkan dalam suatu obat. Senyawa glikosida flavonoid yang terdapat pada tanaman *Citrus* memiliki berbagai aktivitas farmakologi seperti antioksidan, antikanker dan antitumor, hepatoprotektif, antiinflamasi, antidiabetes, antiviral, antibakteri dan antifungal (Putra dkk., 2018; Wang dkk., 2017; Xiao dkk., 2016).

Menurut penelitian yang dilakukan Truong pada tahun 2018 menunjukkan bahwa perbedaan pelarut dalam proses ekstraksi akan memberikan perbedaan konsentrasi kandungan metabolit sekunder yang dihasilkan (Truong dkk., 2019).

Berdasarkan acuan di atas peneliti bermaksud untuk penelitian karakteristik spesifik dan non spesifik berbagai jenis buah jeruk tersebut pada pelarut etanol 60% dari buah jeruk baik biji, air dan kulitnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah buah jeruk sambal (*Citrus amblycarpa* (L)), jeruk manis (*Citrus sinensis* (O.)), dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* (S.)), larutan aluminium, asam sulfat pekat (*Merck*), methanol (*Merck*), asam asetat glasial (*Merck*), etanol 96% teknis, larutan FeCl₃ 1%, indikator fenolftalein, kloroform beramonnia 2N serbuk Mg, H₂SO₄ pekat, HCl pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, DMSO 15%, toluena (*Merck*), etil asetat (*Merck*), metanol (*Merck*), larutan gelatin 0,5%, akuades, asam asetat, n-heksan (*Merck*), kloroform, sitroborat, anisaldehyd asam sulfat, dietilamin, pereaksi Liebermann-Burchad,

asam formiat, FeCl₃, plat kromatografi lapis tipis (*Silica Gel F 254 Merck*).

Alat

Peralatan yang digunakan adalah alkoholmeter (Amarell), lemari oven (*Memmert Beschickung-Loading Model 100-800*), *hot plate* (*Thermolyne Hot Plate RC 2240*), kaca arloji, maserator (berbahan kaca), krus proselen, mortir, jarum ose, desikator, sendok tanduk, timbangan analitik (*Precisa* tipe XB 4200C dan *BEL* tipe M254Ai), plat silika gel F₂₅₄ dan bejana KLT, *rotary evaporator* (*Rotavapor II BUCHI*), lampu UV254 nm dan UV366 nm.

Metode

Determinasi tanaman

Identitas dan kebenaran suatu tanaman dapat diketahui melalui determinasi. Determinasi dapat menggunakan tanaman utuh, maupun bagian dari tanaman. Pada penelitian ini determinasi menggunakan buah jeruk tersebut sebagai media. Adapun proses determinasi tersebut dilakukan di Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Tanjungpura Pontianak.

Preparasi bahan

Sebelum dilakukan ekstraksi sampel, maka terlebih dahulu dilakukan preparasi bahan tersebut. Sampel tersebut diantaranya adalah jeruk sambal, jeruk manis, dan jeruk nipis meliputi bagian kulit, biji, dan sari buah jeruk. Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi menggunakan etanol 60%. Ketiga sampel dicuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan. Sampel dipisahkan bagian sari, biji, dan kulitnya. Kulit jeruk nipis (KJN), kulit jeruk sambal (KJS), biji jeruk nipis (BJN) dan biji jeruk sambal (BJS) dipisahkan dari masing masing komponen, kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 40°C. Simplisia yang kering ditandai dengan diremas untuk kulit akan hancur, sedangkan untuk biji sudah terpisah dari masing-masing biji. Kulit jeruk tiap sampel yang telah kering dibuat serbuk dengan diblender agar menjadi serbuk dan kemudian dilewatkan pada ayakan mesh 60. Hasil preparasi sampel dari buah jeruk tersebut yang berupa air jeruk nipis (AJN), air jeruk sambal (AJS) dan air jeruk manis (AJM) dilakukan *freeze drying*.

Ekstraksi kulit jeruk, air jeruk, dan biji jeruk

Simplisia kulit jeruk dan biji jeruk yang sudah diserbukkan ditimbang dan maserasi dalam alat maserator dan ditambah dengan pelarut etanol 60% sambil diaduk dengan batang pengaduk. Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali replikasi dengan penggantian pelarut dilakukan setiap 72 jam dengan pelarut yang sama pada saat maserasi pertama. Hasil

maserat 3 kali replikasi dikumpulkan dan disaring menggunakan corong *buchner* yang telah diberi kertas saring Whatman no 1. Maserat yang telah diperoleh disaring, kemudian dievaporasi dengan hingga terbentuk masa yang pekat. Hasil dari massa tersebut dimasukkan pada desikator untuk membentuk ekstrak. Proses pengeringan berhenti ketika massa yang terbentuk konstan setelah dilakukan penimbangan.

Pengujian skrining fitokimia ekstrak

Proses skrining fitokimia ekstrak dilakukan dengan 2 cara yaitu pertama dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) yang dilakukan untuk melihat parameter spesifik dari ekstrak tersebut. Metode kedua metode uji tabung dan menggunakan penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut air, kadar air, kadar sari yang larut dalam etanol, kadar abu tidak larut asam, dan kadar abu total.

Kromatografi lapis tipis

Pada pengujian menggunakan kromatografi lapis tipis dilakukan beberapa orientasi terutama penggunaan pelarut sebagai fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah *silica gel* 60 F₂₅₄. Pengamatan bercak dilakukan pada sinar tampak (panjang gelombang 380-700 nm), UV254 dan UV366. Adapun fase gerak yang digunakan pada pengujian skrining fitokimia meliputi toluene : etil asetat : dietil amina (7 : 2 : 1) dengan pereaksi semprot : Dragendorff (uji kandungan alkaloid), etil asetat : toluene : asam formiat : air (6:3:1,5:0,5) menggunakan pereaksi semprot: FeCl₃ (uji fenolik), asam asetat glasial : asam formiat : air : etil asetat : (11 : 11 : 27 : 100) dengan sitroborat digunakan sebagai pereaksi semprot (uji flavonoid), kloroform : metanol : air (64 : 50 : 1) pereaksi semprot : Liebermann-Burchard (saponin), n-heksana : etil asetat (4 : 1) disemprot menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard (uji steroid), dan heksana : etil asetat (93 : 7) pereaksi semprot : anisaldehyd asam sulfat (uji terpenoid) (Kaya dkk., 2012; Fauziah, 2006; Safitri, 2016; Wagner & Bladt, 1996; Santosa & Haresmita, 2015).

Penentuan karakteristik non spesifik ekstrak

Penentuan karakteristik ekstrak meliputi penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut air, kadar air, kadar sari yang larut dalam etanol, kadar abu tidak larut asam, dan kadar abu total. Prosedur kerja dari penetapan parameter tersebut menggunakan aturan yang berlaku (Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, 2008; Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000).

Metode uji tabung

Uji alkaloid

Sampel yang diperoleh ditambahkan pelarut dalam beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan pereaksi alkaloid yaitu, pereaksi Mayer (Harborne dkk., 1996).

Uji fenolik

Sejumlah 100 mg sampel uji dilarutkan dengan 1 mL air pada tabung reaksi dan kemudian tambahkan 1-2 tetes besi III klorida (FeCl₃). Jika terbentuk warna biru, hijau, merah atau ungu menunjukkan keberadaan senyawa fenol (Rao, 2016).

Uji flavonoid

Pengujian flavonoid didahului dengan menambahkan magnesium 0,1 mg dan 0,4 mL amil alkohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama) ke dalam sampel ekstrak yang diuji dan ditambahkan 4 mL alkohol kemudian campuran dikocok. Senyawa mengandung flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. (Harborne dkk., 1996).

Saponin

Sampel ekstrak dilarutkan dengan air hingga volume 20 mL kemudian dikocok dengan *roller mixer* selama 5 menit dan apabila terbentuk sabun setinggi 2 cm pada lapisan atas menunjukkan keberadaan saponin (Mir dkk., 2016).

Uji steroid

Sampel ekstrak dilarutkan ke dalam air sehingga membentuk larutan siap untuk di uji. Larutan tersebut diambil sebanyak 2 mL diuapkan, residu yang diperoleh dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, 0,5 mL ditambahkan asam asetat anhidrat kemudian 2 mL asam sulfat P melalui dinding tabung. Cincin biru kehijauan akan terbentuk apabila senyawa mengandung steroid dan cincin kecoklatan atau violet menandakan adanya triterpenoid (Putra dkk., 2018). Warna biru dan hijau untuk steroid (Dwisari dkk., 2016).

Uji terpenoid

Sampel ekstrak yang sudah dilarutkan dalam air diambil sebanyak 2 mL selanjutnya ditambahkan reagen Liebermann-Burchard yang mengandung campuran antara HCl pekat dengan H₂SO₄ pekat. Perubahan warna merah jingga akan muncul jika sampel mengandung triterpenoid (Sangi dkk., 2008).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman merupakan salah satu tahapan untuk mengetahui identitas suatu sampel adalah benar. Sampel yang digunakan dalam determinasi pada penelitian ini adalah buah dari tanaman yang diidentifikasi di laboratorium biologi, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Tanjungpura. Buah yang diambil adalah yang berusia 8 bulan, buah tersebut diperoleh dari desa Pal Sembilan kecamatan Sungai kakap. Berdasarkan hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan termasuk dalam genus *rutaceae*, familia *Citrus* dengan spesies *Citrus amblycarpa* (L), *Citrus aurantifolia* (S.), dan *Citrus sinensis* (O.).

Ekstraksi

Ekstraksi yang dilakukan adalah dengan metode ekstraksi dingin yaitu maserasi. Metode ini dapat digunakan untuk bahan yang tidak tahan terhadap pemanasan, serta penggunaannya relatif sederhana, dan dapat mengekstraksi lebih banyak kandungan metabolit sekunder. Namun tidak semua terkestraksi dengan baik karena pelarut yang digunakan pada suhu kamar. (Nurhasnawati dkk., 2017) Pelarut yang digunakan merupakan pelarut polar yaitu etanol 60%. Pelarut ini dapat menyari senyawa yang memiliki karakteristik polar, semi polar maupun non polar, hal ini disebabkan karena karakter pelarut universal yakni pelarut yang dapat menyari hampir seluruh metabolit sekunder. Penelitian yang dilakukan oleh Do menggunakan variasi pelarut etanol 75% dan 50 % memberikan hasil rendemen lebih banyak pada konsentrasi 50% dengan rendemen 32,98% serta kandungan fenolik total

sebesar 30,30 GAE/g dengan nilai yang tidak signifikan dibandingkan dengan konsentrasi 75%. (Do dkk., 2014). Berdasarkan penelitian yang dilakukan rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol biji jeruk sambal dengan rendemen 25,28%. Pelarut etanol 60% memiliki kandungan air yang relatif kecil sehingga proses evaporasi atau pengeringan lebih cepat dan dapat menghindari pertumbuhan jamur/kapang pada ekstrak. Proses ekstraksi dilakukan selama 72 jam berdasarkan penelitian yang dilakukan pada rentang waktu tersebut (kisaran 3-6 hari) memberikan nilai total fenolik yang optimal. (Kelebek dkk., 2006).

Hasil ekstrak memiliki wujud berwarna kuning hingga coklat tua dengan karakteristik ekstrak kental. Hal ini menandakan bahwa senyawa-senyawa tersebut mengandung salah satu metabolit flavonoid, terutama flavanon dan kalkon berwarna kuning *orange*. Warna kuning kecoklatan menandakan bahwa senyawa-senyawa flavonoid larut dalam ekstrak (Handayani dkk., 2005).

Ekstrak yang digunakan berjumlah 7 sampel yaitu ekstrak etanol kulit jeruk nipis (KJN), kulit jeruk sambal (KJS), biji jeruk nipis (BJN), dan biji jeruk sambal (BJS) dengan 2 diantaranya yaitu hasil *freeze dry* air jeruk nipis (AJN), air jeruk manis (AJM) dan air jeruk sambal (AJS). Hasil organoleptik menunjukkan bahwa ekstrak termasuk dalam kategori ekstrak kental berwarna coklat. Hasil berat ekstrak yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 1. Berdasarkan data pada Tabel 1 menunjukkan bahwa rendemen yang paling banyak dari hasil proses ekstraksi adalah ekstrak etanol 60% biji jeruk sambal dengan rendemen yang dihasilkan sebesar 25,28%.

Tabel 1. Berat ekstrak dan persen rendemen tiap ekstrak etanol 60% buah jeruk sambal, jeruk manis, dan jeruk nipis

Sampel	Berat serbuk yang diekstraksi (g)	Berat ekstrak (g)	%Rendemen
KJN	350,00	20,70	5,91
KJS	350,00	32,30	9,23
BJS	26,50	6,70	25,28
BJN	25,50	1,80	7,06
AJN	65,19	13,50	20,70
AJS	79,13	4,80	6,06
AJM	53,77	8,50	15,80

Skrining fitokimia dengan menggunakan KLT

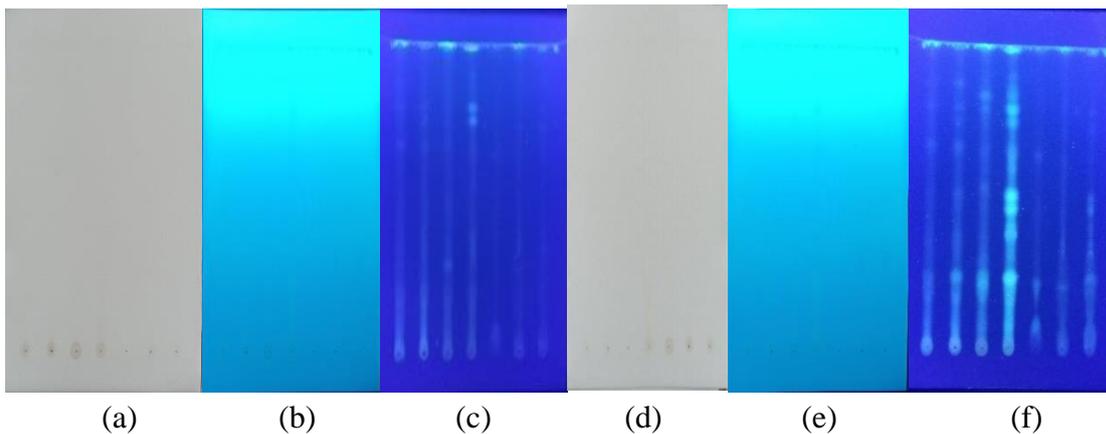
Skrining fitokimia dengan menggunakan kromatografi lapis tipis adalah salah satu identifikasi untuk melihat profil kandungan metabolit sekunder yang ada di dalam suatu sampel. Hasil Identifikasi dapat dijadikan rujukan untuk menentukan bahan spesifik yang ada di dalam ekstrak sampel tersebut.

Berdasarkan Gambar 1 dapat diketahui bahwa sebelum disemprot menggunakan penampak bercak sitroborat tidak terjadi perubahan warna pada sinar UV254 yang dapat dikatakan bahwa sebelum atau setelah disemprot dengan penampak bercak. Hasil tersebut menunjukkan bahwa flavonoid pada sinar UV254 memberikan hasil yang negatif. Sedangkan

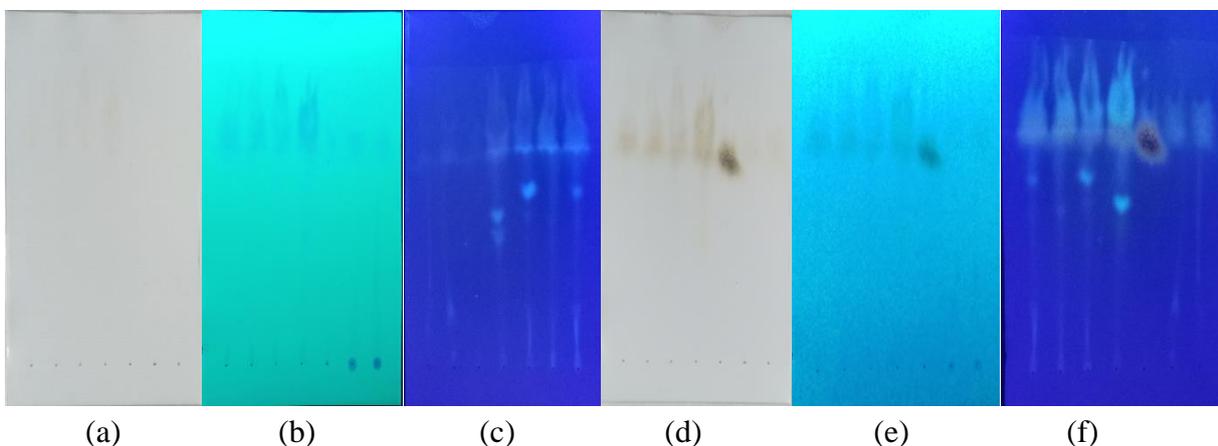
pada UV366 terjadi peredaman fluorosensi dan setelah penyemprotan dengan penampak bercak sitroborat terjadi fluorosensi kuning, hijau atau biru serta warnanya menjadi lebih intensif. Intensitas warna pada setiap jenis ekstrak berbeda menunjukkan bahwa konsentrasi dari flavonoid yang dihasilkan berbeda. (Wagner & Bladt, 1996) Sitroborat digunakan sebagai pendeteksi golongan flavonoid menghasilkan warna kuning terang ketika disinari dengan UV366. Hal ini terjadi karena kromatogram ekstrak etanol jeruk sesudah disemprot sitroborat yang memiliki struktur dasar flavonol yang mengandung 3-OH bebas dengan atau tanpa 5-OH bebas serta mengandung gugus

ortodihidroksi. Ekstrak menunjukkan kemungkinan mengandung senyawa flavonoid berstruktur dasar flavonol dengan gugus orto-dihidroksi (Challice, 1984).

Pada Gambar 3 menunjukkan bahwa seluruh ekstrak buah jeruk mengandung saponin yang tampak pada kromatogram pada sinar UV366 tampak bercak berwarna coklat kehitaman dan intensitas bercak semakin jelas setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard baik disinari tampak, UV254 dan UV366. Adapun nilai Rf dari data kromatogram adalah 0,75, perbedaan intensitas penampakan bercak pada kromatogram tersebut dapat disebabkan karena ada perbedaan konsentrasi saponin di dalam ekstrak.



Gambar 1. Hasil skrining senyawa flavonoid pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk menggunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak asam asetat glasial : asam formiat : air : etil asetat (11:11:27:100) dengan pereaksi penampak bercak sitroborat; (a) sinar tampak (sebelum semprot), (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)

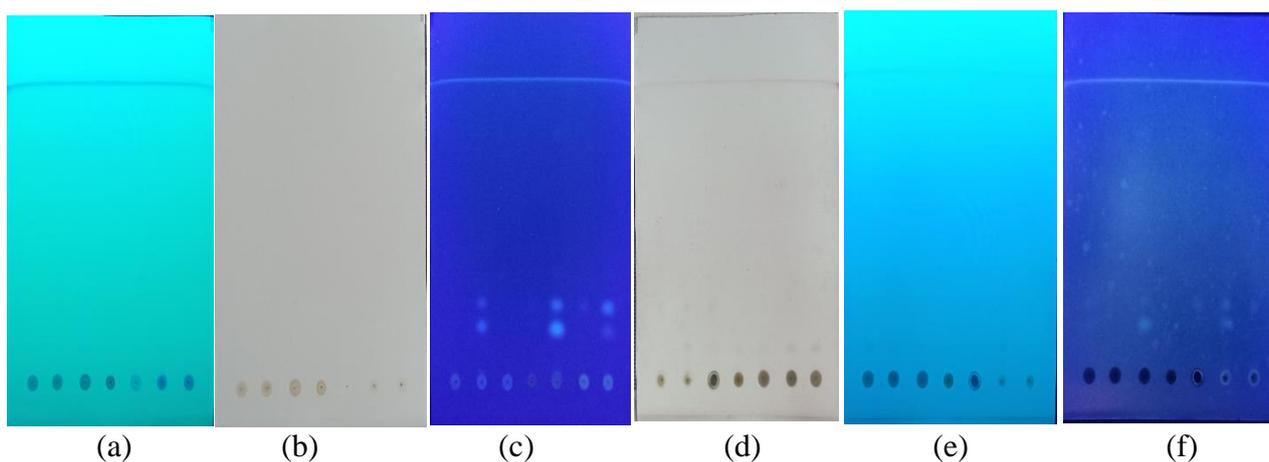


Gambar 2. Hasil skrining senyawa saponin pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk menggunakan fase diam silica gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak kloroform : methanol : air (64 : 50 : 1) dengan pereaksi penampak bercak Liebermann-Burchard; (a) sinar tampak (sebelum semprot), (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) Sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)

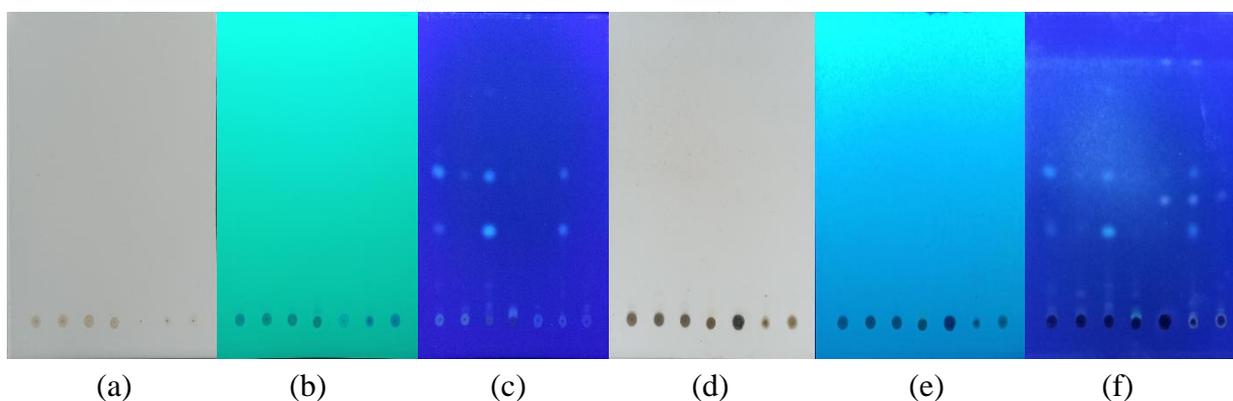
Sampel yang diuji dengan KLT (Gambar 3) menunjukkan hasil yang positif terpenoid pada ekstrak biji jeruk sambal, ekstrak kulit jeruk nipis dan ekstrak air jeruk nipis yang dapat dilihat pada sinar UV366 dengan kromatogram berwarna hijau. Namun tidak tampak pada UV254 dan sinar tampak. Setelah dilakukan penyemprotan menggunakan penampak bercak Anisaldehida-asam sulfat intensitas bercak pada UV366 menurun namun pada sinar tampak berwarna merah keunguan, hal ini disebabkan karena adanya reaksi antara sampel dan pereaksi membentuk kompleks pada daerah sinar tampak (Karthika dkk., 2014). Golongan senyawa terpenoid dan fenol bereaksi dengan Anisaldehida-asam sulfat memberikan warna ungu, biru, merah, kelabu atau hijau tergantung jenis

senyawanya (Irianti dkk., 2016).

Pengujian steroid sampel ekstrak dan air buah jeruk menggunakan KLT diperoleh profil kromatogram (Gambar 4) pada UV366 ekstrak biji jeruk sambal, Ekstrak kulit jeruk nipis, Ekstrak air jeruk nipis berupa warna biru kehijauan yang memberikan 6 spot dan masing-masing memberikan 2 nilai r_f yakni 0,38 dan 0,56. Kemudian setelah disemprot dengan pereaksi Liebermann-Burchard yang menghasilkan warna biru kehijauan yang menunjukkan adanya senyawa steroid dengan jumlah spot kromatogram yang muncul sebanyak 9, pada ekstrak biji jeruk sambal, ekstrak kulit jeruk nipis, ekstrak air jeruk manis, ekstrak air jeruk nipis dan ekstrak air jeruk sambal (Hidayah dkk., 2016).



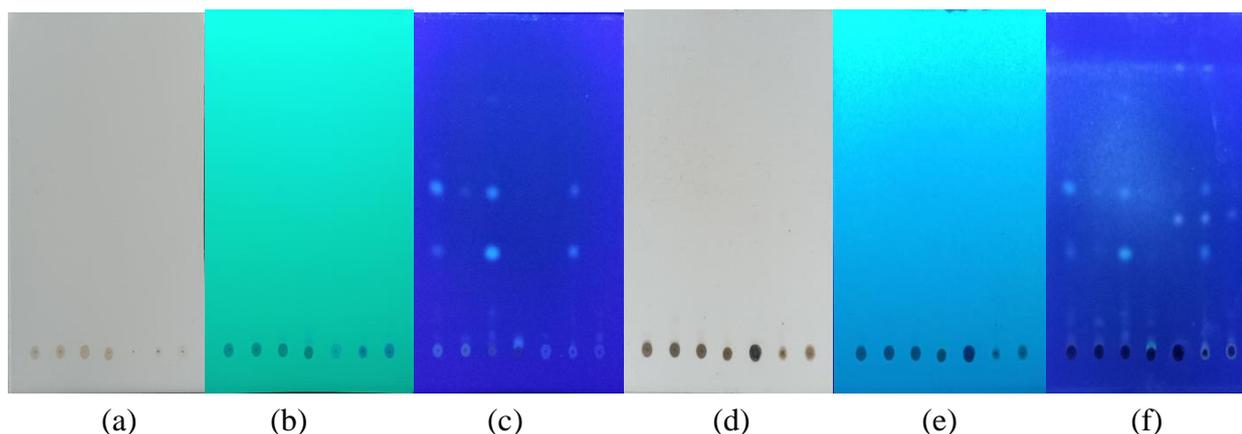
Gambar 3. Hasil Skrining senyawa terpenoid pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk menggunakan fase diam silica gel 60 F_{254} dan fase gerak heksana : etil asetat (93 : 7) dengan pereaksi penampak bercak Anisaldehida-asam sulfat; (a) sinar tampak (sebelum semprot) (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)



Gambar 4. Hasil skrining senyawa steroid pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk menggunakan fase diam silica gel 60 F_{254} dan fase gerak heksana: etil asetat (4:1) dengan pereaksi penampak bercak Liebermann-Burchard; (a) sinar tampak (sebelum semprot), (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)

Berdasarkan pengamatan pada Gambar 5 tampak bahwa hasil kromatogram sebelum direaksikan dengan penampak bercak menggunakan UV366 sebanyak 8 titik dengan nilai rf 0,56; 0,62; 0,81; dan 0,94 berwarna hijau dan biru. kromatogram tersebut muncul pada sampel ekstrak biji jeruk nipis, ekstrak kulit jeruk sambal, ekstrak air jeruk manis, ekstrak air jeruk sambal. Setelah dilakukan penyemprotan dengan pereaksi Dragendorff pola kromatogram yang muncul intensitasnya menurun pada UV366 akibat peredaman pereaksi pada senyawa, reaksi tersebut muncul karena pergeseran panjang akibat derivatisasi pereaksi dan sampel ke arah sinar tampak (Farnsworth, 1966). Namun, dilihat setelah semprot dengan pereaksi Dragendorff di sinar tampak berwarna jingga yang menunjukkan positif alkaloid. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah karena elektron pasangan bebas N₄ mungkin memiliki kadar yang sedikit dalam sampel sehingga proses adsorpsi isomer dan adanya karbonil amida pada lingkungan yang sama dengan isomer. Peristiwa tersebut kemungkinan menyebabkan perbedaan dalam adsorpsi akibat dari ketersediaan oksigen piran yang bervariasi atau gugus karbometoksi (Phillipson & Hemingway, 1975). Perbedaan pola kromatogram dari sampel dapat disebabkan oleh jenis alkaloidnya (Berdasarkan pengamatan pada gambar 6

tampak bahwa hasil kromatogram sebelum direaksikan dengan penampak bercak menggunakan UV366 sebanyak 8 titik dengan nilai rf 0,56; 0,62; 0,81; dan 0,94 berwarna hijau dan biru. kromatogram tersebut muncul pada sampel ekstrak biji jeruk nipis, ekstrak kulit jeruk sambal, ekstrak air jeruk manis, ekstrak air jeruk sambal. Setelah dilakukan penyemprotan dengan pereaksi Dragendorff pola kromatogram yang muncul intensitasnya menurun pada UV366 akibat peredaman pereaksi pada senyawa, reaksi tersebut muncul karena pergeseran panjang akibat derivatisasi pereaksi dan sampel ke arah sinar tampak. (Farnsworth, 1966) Namun, dilihat setelah semprot dengan pereaksi Dragendorff di sinar tampak berwarna jingga yang menunjukkan positif alkaloid. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah karena elektron pasangan bebas N₄ mungkin memiliki kadar yang sedikit dalam sampel sehingga proses adsorpsi isomer dan adanya karbonil amida pada lingkungan yang sama dengan isomer. Peristiwa tersebut kemungkinan menyebabkan perbedaan dalam adsorpsi akibat dari ketersediaan oksigen piran yang bervariasi atau gugus karbometoksi (Phillipson and Hemingway, 1975). Perbedaan pola kromatogram dari sampel dapat disebabkan oleh jenis alkaloidnya (Pamungkas & Murrukmihadi, 2015; Wagner & Bladt, 1996; Wagner & Bladt, 1996).



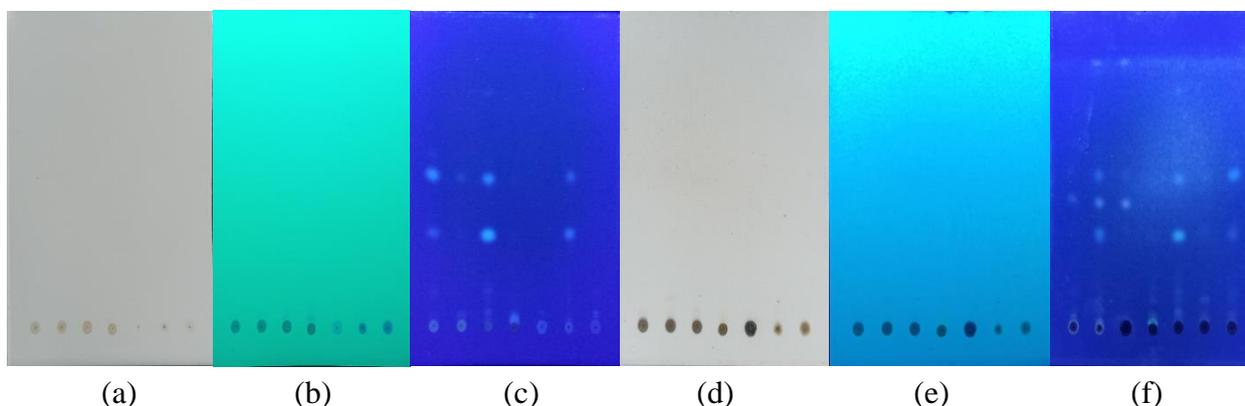
Gambar 5. Hasil skrining senyawa alkaloid pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk menggunakan fase diam silica gel 60 F254 dan fase gerak toluene : etil asetat : dietil amina (7 : 2 : 1) dengan pereaksi penampak bercak Dragendorff; (a) sinar tampak (sebelum semprot), (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)

Pada Gambar 6 terlihat oleh hasil kromatogram dengan UV366 untuk senyawa fenolik pada semua sampel tampak nyata dengan membentuk spot yang berbeda setiap senyawa, hal ini disebabkan bahwa jenis senyawa fenolik setiap sampel uji berbeda. Namun

setelah disemprot dengan FeCl₃ Pola kromatogram tersebut intensitasnya menurun atau terbentuk warna ungu. Perubahan tersebut disebabkan oleh senyawa fenolik memiliki ikatan rangkap terkonjugasi pada saat belum disemprot dengan FeCl₃, ketika setelah

disemprot ikatan tersebut akan lepas dan akan berikatan dengan ion Fe^{3+} yang akan membentuk kompleks dan mengakibatkan pergeseran panjang gelombang (Al-Maliki, 2011). Sedangkan pada sinar tampak setelah semprot berwarna hijau tua kehitaman) (Santosa & Haresmita 2015). Perubahan warna hijau, merah, coklat, ungu, biru, atau hitam yang kuat akan muncul ketika ekstrak yang diuji mengandung senyawa

fenol setelah direaksikan dengan penampak bercak $FeCl_3$. Setelah disemprot $FeCl_3$, pada plat KLT Gambar 6 tampak terjadi perubahan warna yaitu hijau kecoklatan lebih pudar dan biru keunguan menjadi lebih intensif. Hal ini dapat menunjukkan kemungkinan bahwa spot yang muncul tersebut mengandung senyawa fenol (Harborne dkk., 1996).



Gambar 6. Hasil skrining senyawa fenol pada ekstrak etanol 60% kulit, biji buah jeruk serta air jeruk di elusi menggunakan fase diam silica gel 60 F_{254} dan fase gerak etil asetat : toluene : asam formiat : air (6 : 3 : 1,5 : 0,5) dengan pereaksi penampak bercak $FeCl_3$; (a) sinar tampak (sebelum semprot), (b) UV254 (sebelum semprot), (c) UV366 (sebelum semprot), (d) sinar tampak (setelah semprot), (e) UV254 (setelah semprot), (f) UV366 (setelah semprot)

Skrining fitokimia

Skrining Fitokimia merupakan salah satu bentuk standarisasi suatu ekstrak untuk melihat kandungan metabolit yang terdapat dalam suatu tanaman. Skrining ini menjadi dasar untuk melanjutkan pengujian analisis farmakologi, toksikologi serta farmasetika.

Berdasarkan data pada Tabel 2 diketahui bahwa seluruh sampel mengandung senyawa fenolik, hal ini

ditunjukkan dengan perubahan warna sampel dari hijau menjadi biru kehitaman. Seluruh sampel juga menunjukkan mengandung flavonoid yang ditandai dengan perubahan warna sampel menjadi merah pekat. Pada uji flavonoid menggunakan pereaksi magnesium. Pereaksi ini dapat digunakan karena dapat mereduksi terutama senyawa flavonoid dalam suasana asam dengan penambahan HCl (Sopianti, 2018).

Tabel 2. Hasil identifikasi Golongan senyawa ekstrak etanol 60% pada komponen buah *C. amblycarpa* (L.), *C. sinensis* (O.), dan *C. aurantifolia* (S.)

Jenis metabolit sekunder	Ekstrak	Fase gerak	Pereaksi semprot	Deteksi setelah semprot UV 254	Deteksi setelah semprot UV366	Warna bercak	Hasil
Flavonoid	BJS	Asam asetat	Sitroborat	Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	BJN	glasial : Asam		Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	KJN	formiat : Air : Etil		Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	KJS	asetat		Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	AJM	(11:11:27:100)		Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	AJN			Peredaman	Berwarna	Kuning	+
	AJS			Peredaman	Berwarna	Kuning	+
Saponin	BJS	Kloroform : Metanol	Liebermann-Burchard	Peredaman	Berwarna	Coklat Kehitaman	+
	BJN	(64:50:1)	Air	Peredaman	Berwarna	Coklat Kehitaman	+
	KJN			Peredaman	Berwarna	Coklat	+

	KJS				Peredaman	Berwarna	Kehitaman Coklat	+				
	AJM				Peredaman	Berwarna	Kehitaman Coklat	+				
	AJN				Peredaman	Berwarna	Kehitaman Coklat	+				
	AJS				Peredaman	Berwarna	Kehitaman Coklat	+				
Terpenoid	BJS	Heksana : asetat (93:7)	Etil	Anisaldehyd- asam sulfat	Peredaman	Berwarna	Hijau	+				
	BJN				Peredaman	Peredaman	-	-				
	KJN				Peredaman	Berwarna	Hijau	+				
	KJS				Peredaman	Peredaman	-	-				
	AJM				Peredaman	Peredaman	-	-				
	AJN				Peredaman	Berwarna	Hijau	+				
	AJS				Peredaman	Peredaman	-	-				
Steroid	BJS	Heksana : asetat (4:1)	Etil	Liebermann- Burchad	Peredaman	Berwarna	Biru Kehijauan	+				
	BJN				Peredaman	Peredaman	-	-				
	KJN				Peredaman	Berwarna	Biru Kehijauan	+				
	KJS				Peredaman	Peredaman	-	-				
	AJM				Peredaman	Berwarna	Biru Kehijauan	+				
	AJN				Peredaman	Berwarna	Biru Kehijauan	+				
	AJS				Peredaman	Berwarna	Biru Kehijauan	+				
	Alkaloid				BJS	Toluena : asetat : amina (7: 2: 1)	Etil	Dragendorff	Peredaman	Peredaman	-	-
					BJN				Peredaman	Berwarna	Hijau	+
					KJN				Peredaman	Peredaman	-	-
KJS		Peredaman	Berwarna	Biru	+							
AJM		Peredaman	Berwarna	Hijau	+							
AJN		Peredaman	Peredaman	-	-							
AJS		Peredaman	Berwarna	Hijau	+							
Fenolik	BJS	Etil asetat : Toluena : formiat : Air (6: 3: 1,5: 0,5)		FeCl ₃	Peredaman	Berwarna	Biru Keunguan	+				
	BJN				Peredaman	Berwarna	Biru Keunguan	+				
	KJN				Peredaman	Berwarna	Hijau	+				
	KJS				Peredaman	Berwarna	Biru	+				
	AJM				Peredaman	Berwarna	Biru Keunguan	+				
	AJN				Peredaman	Berwarna	Biru Keunguan	+				
	AJS				Peredaman	Berwarna	Biru Keunguan	+				

Keterangan: BJS: biji jeruk sambal; BJN: biji jeruk nipis; KJN: Kulit jeruk nipis; KJS: kulit jeruk sambal; AJM: air jeruk manis; AJN: air jeruk nipis; AJS: air jeruk sambal; fase diam yang digunakan adalah *Silica Gel 60 F₂₅₄*

Kandungan alkaloid didapat pada ekstrak etanol kulit dan biji jeruk namun tidak ditemukan pada sari dari jeruk nipis maupun jeruk sambal. Pada uji Alkaloid ini di dalamnya terdapat atom nitrogen yang bersifat *lone pair electron*. Apabila pasangan ion tersebut berinteraksi dengan ion logam akan membentuk ikatan kovalen koordinat (McMurry, 2004).

Proses pembentukan alkaloid pada pereaksi Mayer diperkirakan karena nitrogen pada alkaloid akan membentuk ikatan ion logam K⁺ dari kalium tetraiodomercurat (II) sehingga terbentuk endapan. Endapan inilah yang tidak terbentuk pada uji yang dilakukan pada semua fraksi, sehingga dapat dikatakan beberapa sampel negatif terhadap alkaloid dengan

pereaksi mayer (Dwisari dkk., 2016). Pada uji saponin dapat diketahui bahwa pada ekstrak kulit jeruk nipis, kulit jeruk sambal dan ekstrak biji jeruk nipis menunjukkan hasil yang positif, hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya buih setelah perlakuan pada lapisan atas ± 2 cm.

Suatu senyawa mengandung saponin karena memiliki permukaan gugus glikosil yang berkarakteristik polar dan gugus steroid dan triterpenoid bersifat nonpolar. Senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar akan bersifat aktif apabila terdapat keberadaan air permukaan sehingga saat dikocok dengan air saponin dapat membentuk misel, dimana struktur polar akan menghadap ke luar

sedangkan gugus nonpolar akan menghadap ke dalam. Pada kondisi inilah saponin akan berbentuk seperti busa (Sangi dkk., 2008). Sedangkan pada sampel yang lain tidak menunjukkan hal yang sama. Seluruh sampel uji pada metode tabung tidak ditemukan kandungan steroid dan terpenoid yang ditunjukkan dengan hasil negatif. Berdasarkan hasil pengujian steroid tidak ditemukan cincin biru kehijauan menandakan dan pada terpenoid tidak terbentuk warna merah jingga.

Hasil pengukuran parameter non spesifik ekstrak

Adapun hasil pengukuran parameter non spesifik ekstrak meliputi kadar sari larut air kadar air, kadar abu, susut pengeringan, abu tidak larut asam, dan kadar sari larut etanol seperti ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data parameter non spesifik ekstrak etanol 60% dan air dari *C. amblycarpa* (L), *C. sinensis* (O.), dan *C. aurantifolia* (S.)

No.	Ekstrak	Susut pengeringan (%)	Kadar air (%)	Kadar abu (%)	Abu tidak larut asam (%)	Abu tidak larut air (%)	Kadar sari larut air (%)
1.	AJM	9,565	9,087	4,985	3,175	18,117	15,984
2.	BJS	17,752	15,961	5,442	3,661	25,156	10,640
3.	KJN	13,496	14,576	3,882	3,404	28,012	11,857
4.	AJS	8,149	8,024	2,722	1,903	20,460	15,647
5.	AJN	9,748	9,443	4,183	1,991	14,858	16,157
6.	KJS	15,413	14,661	2,881	0,929	20,209	16,329
7.	BJN	15,002	15,708	3,333	1,686	21,329	16,749

Berdasarkan pada Table 3 kadar air serbuk simplisia pada ekstrak etanol BJM (22,420% b/b), KJM (15,708% b/b), KJS (14,661% b/b), BJS (15,961% b/b), KJN (14,576% b/b), namun untuk kadar AJM, AJS dan AJN dibawah 10% perbedaan hasil tersebut dapat disebabkan adanya perbedaan cara pengeringan yang dilakukan dan karena karakteristik ekstrak yang bersifat ekstrak kental. Pada air jeruk metode pengeringan yang digunakan dengan metode *freeze dry*. Berdasarkan pada referensi yang sudah ditetapkan untuk kadar air dipersyaratkan kurang dari 10%. Kadar air simplisia dan ekstrak etanol kulit dan biji jeruk akan memiliki stabilitas yang baik apabila kandungannya kurang dari 10%. Kadar tersebut terbukti dapat menghambat pertumbuhan jamur dan kapang serta dapat meningkatkan kualitas ekstrak yang diperoleh (Zainab dkk., 2016). Berdasarkan data WHO menunjukkan bahwa kadar air yang tinggi dapat menyebabkan reaksi enzimatis dan munculnya mikroba sehingga menyebabkan penurunan kualitas simplisia (World Health Organization, 1998).

Kadar abu total menggambarkan adanya kandungan mineral internal dan eksternal pada serbuk maupun ekstrak yang diperoleh dari preparasi awal

hingga diperoleh sampel ekstrak yang mana metode ini didasarkan atas pemanasan sampel pada temperatur dimana senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap (Direktorat Pengawasan Obat Tradisional, 2000). Berdasarkan data yang diperoleh pada Tabel 3 tersebut kadar abu seluruh sampel rata-rata dibawah 5% yakni pada rentang 2,722 - 5,442% menunjukkan bahwa kandungan anorganik di dalam ekstrak sudah relatif rendah karena sebagian besar tidak melebihi ketentuan yang ditetapkan sebesar 5% (Zainab dkk., 2016).

Berdasarkan data pada Tabel 3 menunjukkan bahwa kadar abu tidak larut asam berada pada rentang 0,929 - 3,661%. Abu yang tidak larut asam adalah residu yang diperoleh setelah memanaskan total abu dengan diencerkan menggunakan asam klorida. Kadar abu tidak larut asam digunakan untuk melihat gambaran terutama keberadaan silica yang terdapat dalam sampel yang dapat bersumber dari pasir dan tanah mengandung silika (World Health Organization, 1998). Kadar abu dalam suatu ekstrak tanaman harus seminimal mungkin untuk mencegah terjadinya hal yang tidak diinginkan. Kadar sari larut air merupakan gambaran metabolit sekunder yang terlarut di dalam air.

Berdasarkan data yang diperoleh diketahui bahwa sari larut air berada pada rentang 10,640 - 16,749%. Kandungan metabolit sekunder sampel kulit, biji dan

air *C. amblycarpa (L.)*, *C. sinensis(O.)*, dan *C. aurantifolia (S.)* dapat dilihat pada Tabel 4 berikut.

Tabel 4. Kandungan metabolit sekunder sampel kulit, biji dan air *C. amblycarpa (L.)*, *C. sinensis(O.)*, dan *C. aurantifolia (S.)* dengan menggunakan metode tabung

Parameter	Pustaka	KJN	KJS	BJN	BJN	AJN	AJS	AJM
Alkaloid (Mayer)	Terbentuk endapan berwarna kuning	+	+	+	+	-	-	-
Fenolik	Terbentuk warna biru, hijau, merah atau ungu menunjukkan keberadaan senyawa fenol	+	+	+	+	+	+	+
Flavonoid	Perubahan warna merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya flavonoid	+	+	+	+	+	+	+
Saponin	Terbentuk sabun setinggi 2 cm pada lapisan atas	+	+	-	+	-	-	-
Steroid	Terbentuknya cincin biru kehijauan menandakan adanya steroid	-	-	-	-	-	-	-
Terpenoid	Membentuk warna merah jingga untuk analisis triterpenoid	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: (+) Positif; (-) Negatif

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 60% kulit dan biji serta air pada buah jeruk manis (*Citrus amblycarpa (L.)*), jeruk nipis (*Citrus aurantifolia (S.)*), dan jeruk sambal (*Citrus sinensis (O.)*) dengan nilai rendemen tertinggi diperoleh pada ekstrak etanol 60% biji jeruk sambal dengan rendemen yang dihasilkan sebesar 25,28%. Seluruh sampel mengandung senyawa fenolik dan flavonoid pada uji tabung. Pada uji KLT fase diam *silica gel 60 F 254* untuk identifikasi saponin dengan fase gerak kloroform : methanol : air (64 : 50 : 1) menggunakan penampak bercak Liebermann-Burchard, dan identifikasi flavonoid menggunakan fase gerak asam asetat glasial : asam formiat : air : etil asetat (11 : 11 : 27 : 100) dengan penampak bercak sitroborat, pada kedua senyawa tersebut menunjukkan reaksi positif pada seluruh sampel uji. Serta kadar abu seluruh sampel rata-rata dibawah 5% yakni pada rentang 2,722 - 5,442%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kami ucapkan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura Pontianak atas dukungan dana yang diberikan untuk menuntaskan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Al-Maliki, A. D. M. (2011). Isolation and Identification of Phenolic Compounds from *Elettaria Cardamomum* Seeds and Study of

Their Medicinal Activity Against Pathogenic Bacteria of Prostate Gland. *Journal of Missan Researches*; 8; 13–35.

Apraj, V., Thakur, N. D., Bhagwat, A., Mallya, R., Sawant, L. & Pandita, N. (2011). Pharmacognostic and Phytochemical Evaluation of *Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle PEEL. *Pharmacognosy Journal*; 3; 70–76.

Challice, J. (1984). *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Press.

Direktorat Jenderal Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia (1st ed.)*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat (1st ed.)*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Do, Q. D., Angkawijaya, A. E., Tran-Nguyen, P. L., Huynh, L. H., Soetaredjo, F. D., Ismadji, S. & Ju. Y. (2014). Effect of Extraction Solvent on Total Phenol Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*; 22; 296–302.

Dwisari, F., Alimuddin, A. H. & Harlia. 2016. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Terpenoid Ekstrak Metanol Akar Pohon Kayu Buta-Buta

- (*excoecaria agallocha L.*). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*; 5; 25–30.
- Etebu, E. & Nwauzoma. A. B. 2014. A Review on Sweet Orange (*Citrus sinensis L Osbeck*): Health, Diseases and Management. *American Journal of Research Communication*; 2; 33–70.
- Fauziah, D. T. (2006). Identifikasi dan Skrining Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Ekstrak Etanol Rimpang Kunci Pepet (*Kaempferia Rotunda L.*). *Tesis*; Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 55; 225–276.
- Harborne, J. B., Sudiro, I., Padmawinata, K. & Niksolihin, S. (1996). Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Handayani, S., Sunarto & Kritianingrum, S. (2005). Kromatografi Lapis Tipis untuk Penentuan Kadar Hesperidin dalam Kulit Buah Jeruk. *Jurnal Penelitian Saintek*; 10; 53–68.
- Hidayah, W. W., Kusriani, D. & Fachriyah. E. (2016). Isolasi, Identifikasi Senyawa Steroid dari Daun Getih-Getihan (*rivina humilis L.*) dan Uji Aktivitas Sebagai Antibakteri. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*; 19; 32.
- Irianti, T., Murti, Y. B., Kanistri, D. N., Pratiwi, D. R., Kuswandi & Anggar, R. (2016). Dpph Radical Scavenging Activity of Aqueous Fraction from Ethanolic Extract of Talok Fruit (*muntingia calabura L.*). *Traditional Medicine Journal*; 21; 38–47.
- Karthika K, Jamuna S. & Paulsamy S. (2014). TLC and HPTLC Fingerprint Profiles of Different Bioactive Components from the Tuber of *Solena amplexicaulis*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 3; 198–206.
- Kaya, B. Y., Menemen, & Fz Saltan. (2012). Flavonoid Compounds Identified in *Alchemilla l.* Species Collected in the North-Eastern Black Sea Region of Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*; 9; 418–425.
- Kelebek, H., Canbas, A., Selli S., Saucier, C., Jourdes, M. & Glories, Y. (2006). Effects of Different Maceration Times and Pectolytic Enzyme Addition on the Anthocyanin Composition of *Vitis Vinifera* Cv. Kalecik Karasi Wines. *Journal of Food Engineering*; 77; 1012–1017.
- Lota, M., Serra, D. D. R., Tomi, F., Jacquemond, C. & Casanova, J. (2002). Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemon and Lime Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50; 796–805.
- Mir, M. A., Parihar, K., Tabasum, U. & Kumari, E. (2016). Estimation of Alkaloid, Saponin and Flavonoid, Content in Various Extracts of *crocus sativa*. *Journal of Medicinal Plants Studies*; 4; 171–174.
- McMurry, J. (2004). Organic Chemistry (6th ed.). Belmont: Thomson-Brooks/Cole.
- Narang, N. & Jiraungkoorskul, W. (2016). Anticancer Activity of Key Lime, *Citrus aurantifolia*. *Pharmacognosy Reviews*; 10; 118.
- Nurhasnawati, H., Sukarmi & Handayani, F. (2017). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol (*Syzygium malaccense L.*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*; 3; 91–95.
- Pamungkas, K. & Murrukmihadi, M. (2015). Isolasi dan Penetapan Kadar Alkaloid Ekstrak Etanolik Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) secara Spektrodensitometri. *Traditional Medicine Journal*; 20; 112–118.
- Phillipson, J. D. & Hemingway, S. R. (1975). Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Identification of Alkaloids from Herbarium Samples of the Genus *Uncaria*. *Journal of Chromatography A*; 105; 163–78.
- Poulose, Shibu M., Edward, D. H. & Bhimanagouda, S. P. (2005). Citrus Limonoids Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells and Have Radical Scavenging Activity. *The Journal of Nutrition*; 135; 870–77.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. (2015). Outlook Komoditas Pertanian Subsektor Hortikultura Jeruk by Sekretariat Jenderal Kementerian Pertanian. <http://epublikasi.setjen.pertanian.go.id/epublikasi/outlook/2015/Hortikultura/Outlook%20Jeruk%202015/files/assets/common/downloads/Outlook%20Jeruk%202015.pdf>. Accessed: 17 Februari 2019.
- Putra, G. M. D., Satriawati, D. A., Astuti, N. K. W. & Yadnya-Putra, A. A. G. R.. (2018).

- Standarisasi dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Daun Jeruk Limau (*Citrus amblycarpa* (hassk.) Osche). *Jurnal Kimia*; 12; 187-194.
- Rao, U. S. M. (2016). Phytochemical Screening, Total Flavonoid and Phenolic Content Assays of Various Solvent Extracts of Tepal of *musa paradisiaca*. *Malaysian Journal of Analytical Science*; 20; 1181-90.
- Safitri, D. A. (2016). Pemisahan Senyawa Steroid Fraksi Etil Asetat Mikroalga *Chlorella sp.* Menggunakan Kromatografi Kolom Cara Basah dan Kering. *Skripsi*; Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Sangi, M., Runtuwene, M. R. J., Simbala, H. E. I. & Makang, V. M. A. 2008. Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*; 1; 47-53.
- Santosa, D. & Haresmita, P. P. (2015). Antioxidant Activity Determination *Garcinia dulcis* (Roxb.) Kurz, *Blumeamollis* (D. Don) Merr., *Siegesbeckia orientalis* L., and *Salvia riparia* H.B.K Which Collected from Taman Nasional Gunung Merapi Using DPPH (2,2-Diphenyl-1-Pikril -Hidrazil) and Thin Layer. *Traditional Medicine Journal*; 20; 28-36.
- Sopianti, D. S. (2018). Skrining Fitokimia dan Profil KLT Metabolit Sekunder dari Daun Ruku-Ruku (*Ocimum tenuiflorum l.*) dan Daun Kemangi (*Ocimum sanctum l.*). *Scientia: Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*; 8; 44.
- Sun, Y., Qiao, L., Shen, Y., Jiang, P., Chen, J. & Ye, X. (2013). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Physiological Drop of Citrus Fruits. *Journal of Food Science*; 78; C37-42.
- Truong, D., Nguyen, D. H., Ta, N. T. A., Bui, A. V., Do, T. H. & Nguyen, H. C. (2019). Evaluation of the Use of Different Solvents for Phytochemical Constituents, Antioxidants, and *In Vitro* Anti-Inflammatory Activities of *Severinia buxifolia*. *Journal of Food Quality*; 2019; 1-9.
- Wagner, H. & Bladt. S. (1996). Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, K., Liu, X., Cheng, Y., Luo, J., Deng, X., Zhang, H. & Xu, J. (2017). Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in *Citrus* Species. *Scientific Reports*; 7; 10549.
- World Health Organization. (1998). Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva: World Health Organization.
- Xiao, J., Capanoglu, E., Jassbi, A. R. & Miron, A., (2016). Advance on the Flavonoid C - Glycosides and Health Benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 56; S29-45.
- Zainab, Sulistyani, N. & Anisaningrum. (2016). Penetapan Parameter Standarisasi Non Spesifik dan Spesifik Ekstrak Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis L.*). *Media Farmasi*; 13; 212-26.