

Vol. 4 No. 1 Juli 2017



Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia

E-ISSN 2580-8303

P-ISSN 2406-9388



**DITERBITKAN OLEH:
FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA**

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

Penanggung Jawab:

Dr. Umi Athiyah, M.S., Apt

Dewan Redaksi

Ketua:

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

Wakil Ketua:

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

Redaksi Pelaksana

Ketua:

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

Sekretaris:

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

Anggota:

Mahardian Rahmadi, S.Si., M.Sc., Ph.D., Apt.

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

Dr.rer.nat. Maria L.A. D. Lestari, Apt.

Hanni Prihastuti Puspitasari, S.Si., M.Phil.,PhD., Apt.

M. Faris Adrianto, S.Farm., M.Farm., Apt.

Susmiandri, S.Kom.

Mitra Bestari

Pinus Jumaryatno, Ph.D., Apt.

Dr. Iis Wahyuningsih, M.Si., Apt.

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

Dr. Chairun Wiedyaningsih, M.Kes., M.App.Sc., Apt.

Khoirun Nisa, M.Sc., Ph.D.

Myrna adianti, S.Si., M.Kes., Ph.D.

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

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

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

Prof. Dr. Bambang Prajogo EW., MS., Apt.

Dr. Retno Sari, M.Sc., Apt.

**Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
Jl. Dharmawangsa Dalam Surabaya 60286
Tlp. (031) 5033710, Fax. (031) 5020514**

Website:

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

Email : jfiki@ff.unair.ac.id

Informasi Bagi Penulis

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

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

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

Naskah yang terpilih untuk dipublikasikan di JFIKI akan dikirim ke dua *reviewer* yang pakar 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 diedit untuk tata bahasa, tanda baca, gaya cetak, dan format. Seluruh proses pengajuan naskah hingga keputusan akhir untuk penerbitan dilakukan secara *online*.

Daftar Isi

No	Artikel	Hal
1.	Efek Serbuk Bunga Rosella Merah (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) terhadap Ekspresi IL-10 pada Sukarelawan Sehat Nur Azizah Syahrana, Akrom, Endang Darmawan	1-5
2.	Pengaruh Pemberian Kafein Per Oral terhadap Kadar Gula Darah pada Tikus Wistar (<i>Rattus norvegicus</i>) Hiperglikemia Ana Silvi Ni'ma, Gadis Meinar Sari, Lucky Prasetyowati	6-12
3.	Efek Kapsul Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) terhadap Kadar Bilirubin Sukarelawan Sehat Nur Azizah, Endang Darmawan, Laela Hayu Nurani	13-18
4.	Hubungan Tingkat Pengetahuan terhadap Penggunaan Obat Parasetamol Rasional dalam Swamedikasi Irma Nurtiana Syafitri, Ika Ratna Hidayati, Liza Pristianty	19-26
5.	Efek Kondisi Lingkungan Kultur terhadap Produksi Amilase Termotabil oleh <i>Bacillus sphaericus</i> AK-1 Tanah Api Kayangan Bojonegoro Jawa Timur Achmad Toto Poernomo, Isnaeni	27-33
6.	Validation of Thin-Layer Chromatography-Bioautographic Method for Determination of Streptomycin Isnaeni, Andri Astuti, Muhammad Yuwono	34-38
7.	Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons <i>Agelas cavernosa</i> Andhika Dwi Aristyawan, Noor Erma Sugijanto, Suciati	39-43

Efek Serbuk Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Ekspresi IL-10 pada Sukarelawan SehatNur Azizah Syahrana^{1*}, Akrom^{1,2}, Endang Darmawan¹¹Pascasarjana Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta²Pusat informasi dan kajian obat, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

*Corresponding author: nurazizah.syahrana19@gmail.com

Abstract

Background: Rosella calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.) contain phenol and anthocyanin flavonoids that have activity as antioxidants and can stimulate the immune system. **Objective:** The purpose of this study was to investigate the effect of rosella powder capsule on expression IL-10 using pre and post test method on 21 healthy volunteers who fulfilled inclusion criteria and willing to fill informed consent. **Methods:** Volunteers were given rosella powder in capsules form with 500 mg dose for 30 days and IL-10 was examined using flowsitometric method on days 0, 30 and 45. The results were analyzed using SPSS with wilcoxon test. **Results:** The value of IL-10 expression in the 0, 30 and 45 day volunteers were 0.42 ± 0.24 ; 0.83 ± 0.47 and 1.06 ± 0.67 . These results showed that IL-10 expression had an effect on day 0 to 30 ($p < 0.05$) and IL-10 expression did not affect the 30 day of the 45 ($p > 0.05$). **Conclusion:** administration of rosella powder capsules (*Hibiscus sabdariffa* L.) dose 500 mg/day for 30 days increased the expression of IL-10, but within normal limits on healthy volunteers.

Keywords: roselle, IL-10 expression, healthy volunteers**Abstrak**

Pendahuluan: Bunga rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) mengandung fenol dan flavonoid antosianin yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan dapat meningkatkan sistem imun. **Tujuan:** Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh kapsul serbuk bunga rosella terhadap ekspresi IL-10 menggunakan metode *pre and post test* pada 21 sukarelawan sehat yang memenuhi kriteria inklusi dan bersedia mengisi *informed consent*. **Metode:** Relawan diberikan serbuk rosella dalam bentuk kapsul dengan dosis 500 mg selama 30 hari dan dilakukan pemeriksaan IL-10 menggunakan metode flowsitometri pada hari ke-0, 30 dan 45. Hasil dianalisis menggunakan SPSS dengan uji *wilcoxon*. **Hasil:** Nilai ekspresi IL-10 pada sukarelawan hari ke 0, ke-30 dan ke-45 adalah $0,42 \pm 0,24$; $0,83 \pm 0,47$ dan $1,06 \pm 0,67$. Hasil ini menunjukkan ekspresi IL-10 berpengaruh pada hari ke-0 ke-30 ($p < 0,05$) dan ekspresi IL-10 tidak berpengaruh hari ke-30 ke-45 ($p > 0,05$). **Kesimpulan:** pemberian kapsul serbuk rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dosis 500 mg/hari selama 30 hari meningkatkan ekspresi IL-10, tetapi dalam batas nilai normal pada sukarelawan sehat.

Kata Kunci: rosella, ekspresi IL-10, sukarelawan sehat**PENDAHULUAN**

Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) secara empiris berkhasiat sebagai antiseptik, diuretik, meningkatkan daya tahan tubuh, antihipertensi, antikolesterol, antibakteri dan bersifat antioksidan (Hodgson & Kevin, 2006; Kusumastuti, 2014; Rizki dkk., 2017). Rosella memiliki kandungan kimia berupa karbohidrat, asam amino, glikosida, steroid, flavonoid, tanin, fenol, triterpenoid, kuersetin, sianidin, β -karoten, fitosterol, delpinidin, gosiperidin, *hibiscetin*, *hibiscin*, dan *hibiscitrin* (Mahadevan dkk., 2009; Kumar, 2012). Adanya kandungan asam askorbat dan flavonoid

(flavonol dan pigmen antosianin) menjadikan tanaman ini memiliki aktivitas antioksidan alami yang dapat menangkal berbagai radikal bebas dan memiliki efek sistem imun (imunostimulator) (Mardiyah, 2009). Sistem imun adalah sistem yang digunakan tubuh sebagai perlindungan diri terhadap bahaya yang ditimbulkan oleh lingkungan (Baratawidjaja, 2006). Sistem imun terdiri dari sistem imun spesifik (*imunadaptif*) dan sistem imun non spesifik (*innate* atau *natural immunity*). Sistem imun spesifik diperankan oleh limfosit B dan limfosit T. Sel T terdiri dari Th (helper) subset Th1, dan Th2. Sel-sel Th1

memproduksi IL-2, interferon gamma (IFN- γ) dan *tumor necrosis factor-beta* (TNF- β). Sel Th2 mensintesis interleukin (IL) yakni IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 dan IL-13 yang mengoptimalkan produksi antibodi (Ranieri dkk., 2014). Interleukin adalah bagian dari sistem kekebalan yang disebut sitokin yang mengaktifkan sistem kekebalan tubuh. IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi, berfungsi menghambat produksi beberapa jenis sitokin lain (TNF- α , IL-1, IFN- γ , *chemokine*, dan IL-12) dan menghambat fungsi makrofag dalam membantu aktivasi sel T (Couper dkk., 2008; Niikura dkk., 2011).

Penelitian tentang keamanan rosella dilakukan oleh Sari & Moch. (2016) menyatakan nilai *lethal dose* 50 (LD₅₀) ekstrak etanol rosella sebesar 850,90 mg/KgBB terhadap tikus SD (tergolong dalam toksik ringan, LD₅₀ > 500 - 5000 mg) (BPOM RI, 2014a). Hasil uji praklinik di atas diperlukan untuk melanjutkan ke fase uji klinik (BPOM RI, 2014b) dengan tujuan melihat keamanan dan pengaruh kapsul bunga rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari terhadap ekspresi IL-10 pada sukarelawan sehat.

BAHAN DAN METODE

Bahan

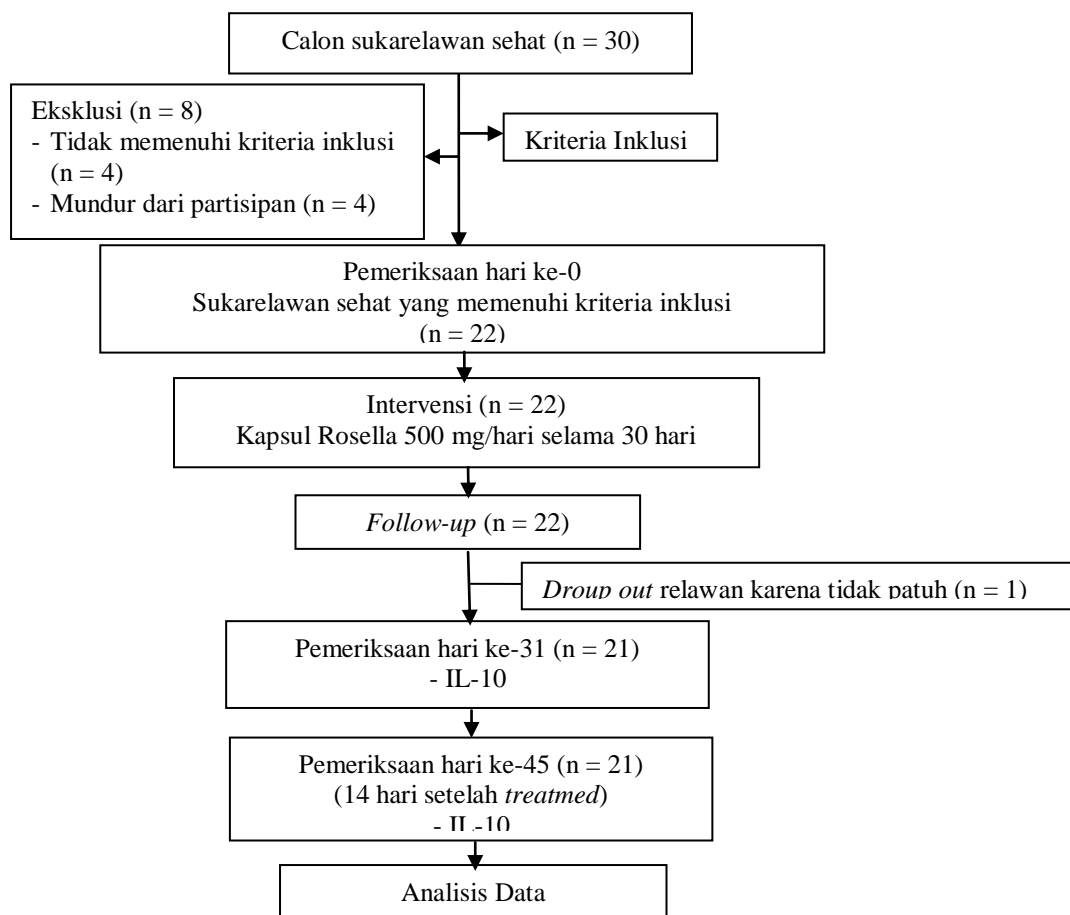
Penelitian ini memperoleh izin dengan terbitnya surat keterangan layak etik (*Ethical Clearance*) bernomor 255/EP-FKIK-UMY/IV/2017. Penelitian ini menggunakan serbuk rosella merah dari PT. Natura (nomor batch: RH162703, kode produk: 5055C).

Alat

Alat untuk pemeriksaan IL-10 *flowcytometri* merek Calibur.

Metode

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan *pre and post test*. Subjek berjumlah 21 orang terdiri 11 orang laki-laki dan 10 orang perempuan yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Serbuk rosella diberikan pada sukarelawan dalam bentuk kapsul dengan dosis 500 mg 1 kali sehari sesudah makan pada malam hari sebelum tidur. Penentuan dosis kapsul rosella berdasarkan penelitian yang dilakukan Nurkhasanah (2015) menyatakan ekstrak etanol rosella dengan dosis 50 dan 100 mg/KgBB berpotensi sebagai agen imunomodulator. Dosis 500 mg yang diperoleh dari konversi dosis tikus ke dosis manusia. Pemberian rosella dilakukan selama 30 hari. *Flowchart* penelitian disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Flowchart penelitian

Kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi sehat dibuktikan dengan pemeriksaan tanda vital didukung oleh pemeriksaan laboratorim klinis meliputi hematologi lengkap, fungsi hati dan fungsi ginjal dan dinyatakan sehat berdasarkan surat keterangan sehat dari dokter, laki-laki dan perempuan usia 18 - 45, IMT 18 - 30 Kg/m², tidak merokok dan bersedia mengisi *informed consent*. Kriteria eksklusi: wanita hamil, tidak minum obat sesuai interval dan petunjuk penggunaan obat, menggunakan herbal lain selama penelitian berlangsung.

Pemeriksaan IL-10

Darah tepi diambil dari *vena cubiti* sebanyak 3 cc. Darah yang sudah terkumpul, ditampung dalam tabung *vacutainer* yang berisi antikoagulan (EDTA). Hasil pengambilan darah relawan pada tabung EDTA dipipet sebanyak 50 µL dimasukkan ke dalam tabung falcon kemudian ditambahkan masing-masing 5 µL reagen antibodi IL-10 PE (*clones: JES3-19F1 antibody*). Campuran tersebut di *vortex* homogeny selama 1 menit, kemudian di inkubasi 15 menit dengan suhu 20 - 25°C (di tempat gelap). Larutan pelisis 50 µL diencerkan 10 x *fluoresce-activated cell sorting* (FACS) dengan aquades sebanyak 450 µL kemudian

dicampur homogen. Setelah masa inkubasi selesai, sampel ditambahkan 450 µL reagen FACS (1x) yang sudah diencerkan, campur homogen kemudian diinkubasi 15 menit dengan suhu 20 - 25°C (di tempat gelap). Setelah masa inkubasi selesai, dilakukan analisis menggunakan alat FACS *flowcytometer*.

Analisis data

Data hasil penelitian dianalisis secara statistik untuk melihat adanya perbedaan *pre and post treatment* pada sukarelawan dengan perbandingan antara sebelum dan sesudah pemberian kapsul ekstrak rosella menggunakan SPSS versi 21. Analisis data diawali dengan uji normalitas menggunakan *shapiro-wilk* dan dilanjutkan menggunakan uji *wilcoxon* pada taraf kepercayaan 95%

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peneliti melibatkan tenaga dokter dalam pemilihan sukarelawan yang terlibat dalam penelitian dan diperoleh sebanyak 21 orang sukarelawan yang ikut serta dalam penelitian. Karakteristik sukarelawan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik sukarelawan sehat yang diberi kapsul ekstrak etanol rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari

No.	Karakteristik sukarelawan	Σ Sukarelawan (n = 21)	Persentase (%)
1	Jenis kelamin		
	Laki-laki	11	52,4
	Perempuan	10	47,6
2	Usia(tahun)		
	a. ≤ 25 tahun	15	71,4
	b. > 25 tahun	6	28,6
3	Rerata Indeks Massa Tubuh (Kg/m ²)	21,25	100
4	Pendidikan		
	SMA	10	47,6
	Perguruan Tinggi	11	52,4
5	Pekerjaan		
	Tidak Bekerja	15	71,4
	Bekerja	6	28,6
6	Status Pernikahan		
	Tidakmenikah	17	81,0
	Menikah	4	19,0

Keterangan uji statistik: distribusi frekuensi

Pengukuran IL-10 dilakukan dengan menggunakan metode flowsitometri. Pengukuran dilakukan sebelum mengkonsumsi kapsul rosella dosis 500 mg/hari (hari ke-0), setelah mengkonsumsi kapsul rosella (hari ke-30) dan 15 hari setelah tidak mengkonsumsi
P-ISSN: 2406-9388
E-ISSN: 2580-8303

kapsul rosella (hari ke-45). Pemeriksaan hari ke-0 bertujuan sebagai baseline (*pre treatment*). Pemilihan 30 hari untuk mengkonsumsi kapsul rosella berdasarkan Resnik (2011) yang menyatakan interval standar penelitian fase 1 adalah 30 hari untuk ukuran

standar keamanan. Pemilihan pemeriksaan hari ke-45 berdasarkan ICH (2010) menyatakan setelah pemberian perlakuan suatu obat dilakukan evaluasi lebih lanjut selama 2 minggu untuk menilai toksisitas dan atau pemulihan yang tertunda. Data hasil

pengukuran ekspresi IL-10 sukarelawan yang diberi kapsul rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari dan 15 hari setelah tidak mengkonsumsi kapsul rosella disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis rata-rata ekspresi IL-10 hari ke-0 - hari ke-30 dan hari ke-30 - hari ke-45 sukarelawan sehat (n = 21)

Parameter	n	Hari ke - (Mean ± SD)			p-value (0-30)	p-value (30-45)
		0	30	45		
IL-10	21	0,42 ± 0,24	0,83 ± 0,47	1,06 ± 0,67	0,01	0,14

Keterangan: uji wilcoxon (p < 0,05)

Hari ke-0 : Sebelum pemberian kapsul ekstrak etanol rosella (*baseline*)

Hari ke-30 : Setelah pemberian kapsul ekstrak etanol rosella

Hari ke-45 : 15 hari setelah pemberian kapsul ekstrak etanol rosella

Hasil analisis yang terlihat pada Tabel 2 menunjukkan rerata kadar IL-10 pada pemeriksaan hari ke-0 sampai hari ke-30 terdapat perbedaan yang bermakna (p < 0,05), sedangkan rerata kadar IL-10 pada pemeriksaan hari ke-30 sampai hari ke-45 tidak terdapat perbedaan yang bermakna (p > 0,05). Kadar IL-10 hari ke-0 (sebelum diberikan kapsul rosella) adalah 0,42 ± 0,24 data ini bisa dianggap sebagai kadar normal IL-10 (*baseline*) pada sukarelawan sehat. Pemeriksaan hari ke-30 setelah mengkonsumsi kapsul rosella kadar IL-10 meningkat dari hari ke-0 sebesar 0,83 ± 0,47, dan hari ke-45 (15 hari setelah tidak mengkonsumsi kapsul rosella) sebesar 1,06 ± 0,67 pada sukarelawan sehat yang diberikan kapsul rosella dosis 500 mg/hari. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar ekspresi IL-10 pada sukarelawan yang diberikan kapsul rosella dosis 500 mg/hari selama 30 hari, namun perubahan ini tidak signifikan secara klinis karena masih dalam batas normal. Nilai ekspresi IL-10 pada sukarelawan sehat yaitu 0,08 - 3,80 % (Muris dkk., 2012).

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Fakeye dkk. (2008) mengemukakan kelopak bunga rosella kering larut air dosis 100 mg/KgBB dapat meningkatkan produksi IL-10. Penelitian Nurkhasanah (2015) menyatakan ekstrak etanol rosella dengan dosis 50 dan 100 mg/KgBB sekali sehari selama 21 hari berpotensi sebagai agen imunomodulator dengan efek peningkatan sekresi IL-10 pada tikus SD. Efek imunostimulator bunga rosella karena kandungan senyawa fenolik dan flavanoid (Chiang dkk., 2003; Mahadevan dkk., 2009).

Peningkatan IL-10 diketahui sebagai mediator penting dalam respon pertahanan. Aktivitas IL-10

terjadi karena menghambat produksi TNF-α dan berpengaruh terhadap sel B untuk memproduksi antibodi (Fakeye dkk., 2008). Mekanisme penghambatan ekstrak rosella terhadap ekspresi protein TNF-α melalui penghambatan aktivasi NF-κβ dengan penghambatan enzim kinase ikβ sehingga tidak terjadi fosforilasi akibatnya dimer NF-κβ (p50 dan p65) tidak terlepas dan selanjutnya tidak terjadi translokasi p50 dan p65 ke dalam inti sel (Sarhini dkk., 2011; Maiti dkk., 2015).

KESIMPULAN

Pemberian kapsul serbuk bunga rosella merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) dosis 500 mg/hari selama 30 hari berpengaruh dengan terjadinya peningkatan terhadap ekspresi IL-10, tetapi dalam batas nilai normal pada sukarelawan sehat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Hibah penelitian unggulan program studi dari LPP Universitas Ahmad Dahlan Tahun 2017 dan Relawan yang berpartisipasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). (2014)a. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Non klinik Secara In Vivo. Jakarta: BPOM.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). (2014)b. Peraturan Kepala

- Badan Pengawas Obat dan Makanan, Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Herbal Nomor 13. Jakarta: BPOM.
- Baratawidjaja, K. G. (2006). *Imunologi Dasar*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Chiang, L. C., Ng, L. T., Chiang, W., Chang, M. Y. & Lin, C. C. (2003). Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds of Plantago Species. *Planta Medica*; 69; 600-604.
- Couper, K. N., Blount, D. G. & Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection, *Journal of Immunology. American Association Of Immunologist*; 180; 5771-5777.
- Fakeye, T. O., Pal, A., Bawankule, D. U. & Khanuja, S. P. (2008). Immunomodulatory Effect of Extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. (Family Malvaceae) in a Mouse Model. *Phytotherapy Research*; 22; 664-668.
- Hodgson, J. & Kevin, D. C. (2006). Dietary Flavonoids: Effects on Endothelial Function and Blood Pressure. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture*; 86; 2492-2498.
- ICH. (2010). M3(R2) Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. *Guidance for Industry*; U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration.
- Kumar, R. (2012). Phytochemical Properties And Antioxidant Activity of Hibiscus Sabdariffa Linn. *International Journal Of Pharmaceutical and Chemical Science*; 1.
- Kusumastuti, E., Juni, H. & Heni, S. (2014). Ekspresi COX-2 dan Jumlah Neutrofil Fase Inflamasi pada Proses Penyembuhan Luka Setelah Pemberian Sistemik Ekstrak Etanolik Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L) Studi in Vivo Pada Tikus Wistar. *Majalah Kedokteran Gigi*; 21; 13-19.
- Mahadevan, N., Shivali & Kamboj, P. (2009). Hibiscus sabdariffa Linn: An overview. *Natural Product Radiance*; 8; 77-83.
- Maiti, S., Dai, W., Alaniz, R. C. & Jayaraman, A. (2015). Mathematical Modeling of Pro- and Anti-Inflammatory Signaling in Macrophages. *Processes*; 3; 1-18.
- Mardiyah. (2009). *Budi Daya dan Pengolahan Rosella*, Cet. I. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Muris, A. H., Jan, D., Joost, S., Jan, W. C., Raymond, H. & Marielle, T. (2012). Intracellular IL-10 Detection in T Cells by Flowcytometry: The Use of Protein Transport Inhibitors Revisited. *Journal of Immunological Methods*; 381; 59-65.
- Niikura, M, Inone, S. I., & Kobayashi, F. (2011). Role of Interleukin-10 in Malaria: Focusing on Coinfection With Lethal and Nonlethal Murine Malaria Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; 2011; 1-8.
- Nurkhasanah. (2015). The Effect of Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Treatment on IL-10 and IL-14 Secretion on Dimethylbenz (A) Anthracene (DMBA) Induced Rat. *International Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*; 7; 402-404.
- Ranieri, E., Popescu & Gigante, M. (2014). CTL Elispot Assay. *Cytotoxic T-Cells*; 1186; 75-86.
- Resnik, D. B. & Greg, K. (2011). A National Registry for Healthy Volunteers in Phase 1 Clinical Trials. *JAMA*; 305; 1236-1237.
- Rizki, M. I., Nurkhasanah, Tedjo, Y., Laela, H. N. & Krisana, K. (2017). Antioxidant Activity of Nanoparticle from Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Calyx Extract Originated Indonesia and Thailand. *Research Journal Of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*; 8; 149-157.
- Sarbini, D. D. J., Sargowo, S. & Rohman. (2011). Efek Penghambatan Ekstrak Teh Rosela Merah terhadap NF- κ B, TNF- α , dan ICAM-1. *Journal of Experimental Life Science*; 1; 56-110.
- Sari, F., Nurkhasanah & Moch. S. B. (2016). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) pada Tikus Sprague Dawley. *Traditional Medicine Journal*; 21; 12-18.

Pengaruh Pemberian Kafein Per Oral terhadap Kadar Gula Darah pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Hiperglikemia

Ana Silvi Ni'ma^{1*}, Gadis Meinar Sari², Lucky Prasetyowati³

¹Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

²Departemen Ilmu Faal, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

³Departemen Ilmu Anatomi dan Histologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: anasilvi45@yahoo.co.id

Abstract

Background: Caffeine is a major ingredient contained in coffee that is a favorite drink of people around the world. The effect of caffeine on blood sugar levels were still unclear whether it could increase or decrease blood sugar levels. Some studies had shown that caffeine could increase blood sugar levels through its effects on decreased insulin sensitivity. On the contrary, other studies had shown that caffeine could provide a protective effect on diabetes mellitus by its effect in improving insulin sensitivity. **Objective:** To investigate the effects of oral caffeine on blood sugar levels in normal and hyperglycemia rats. **Methods:** This study used 36 rats (*Rattus norvegicus*) divided into 4 groups, ie hyperglycemic treated group (K1), hyperglycemic control group (K2), normal treated group (K3) and normal control group (K4). Treated groups (K1 and K3) were given caffeine with a dose of 3.22 mg/200 grams of BB orally daily for 3 days. Blood glucose levels were measured before and after treatment. Data analysis used paired t-test and effect size gives significant result when $p < 0.05$. **Results:** The results showed that oral administration of caffeine had a significant effect on blood sugar levels in normal and hyperglycemic rat. **Conclusion:** The effect of caffeine on blood glucose in normal and hyperglycemic rat were 81.1% and 97.7%, respectively. It was concluded that oral administration of caffeine raised the blood sugar levels in normal and hyperglycemia rat.

Keywords: caffeine, blood glucose, hyperglycemia

Abstrak

Pendahuluan: Kafein adalah zat utama yang terkandung dalam kopi yang merupakan minuman yang digemari oleh masyarakat di seluruh dunia. Pengaruh kafein terhadap kadar gula dalam darah masih belum jelas apakah dapat menaikkan atau menurunkan kadar gula darah. Beberapa penelitian membuktikan bahwa kafein dapat meningkatkan kadar gula darah melalui efeknya terhadap penurunan sensitivitas insulin. Sebaliknya, penelitian lain membuktikan bahwa kafein dapat memberikan efek perlindungan tubuh terhadap diabetes mellitus melalui pengaruhnya dalam meningkatkan sensitivitas insulin. **Tujuan:** Untuk mengetahui efek pemberian kafein per oral terhadap kadar gula darah pada tikus normal maupun tikus hiperglikemia. **Metode:** Penelitian ini menggunakan 36 tikus (*Rattus norvegicus*) yang dibagi menjadi 4 kelompok, yaitu kelompok tikus hiperglikemia yang diberi perlakuan (K1), kelompok tikus hiperglikemia kontrol (K2), kelompok tikus normal yang diberi perlakuan (K3) dan kelompok tikus normal kontrol (K4). Kelompok perlakuan (K1 dan K3) diberi kafein dengan dosis 3,22 mg/200 gram BB per oral setiap hari selama 3 hari. Kadar gula darah diukur sebelum dan setelah perlakuan. Analisis data menggunakan *paired t-test* dan *effect size* yang memberikan hasil signifikan apabila $p < 0,05$. **Hasil:** Hasil menunjukkan bahwa pemberian kafein secara oral memberikan efek yang signifikan terhadap kadar gula darah tikus normal dan hiperglikemia. **Kesimpulan:** Efek pemberian kafein terhadap kadar gula darah pada tikus normal dan hiperglikemia sebesar 81,1% dan 97,7%. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian kafein per oral terhadap kadar gula darah tikus normal dan hiperglikemia dapat meningkatkan kadar gula darah pada tikus normal dan hiperglikemia.

Kata kunci: kafein, kadar gula, hiperglikemia

PENDAHULUAN

Kafein adalah zat utama yang terkandung dalam kopi yang merupakan minuman yang digemari oleh masyarakat di seluruh dunia. Kandungan kafein pada beberapa jenis kopi adalah 95 - 165 mg pada 237 mL kopi yang disajikan dengan cara diseduh, 47 - 64 mg pada 30 mL kopi *espresso*, 63 mg pada 237 mL kopi instan, serta 2 - 5 mg pada 237 mL *decaffeinated coffee* (Mayo Clinic, 2018).

Efek kafein terhadap kadar gula dalam darah masih belum jelas (Urzua dkk., 2012). Terdapat penelitian yang menyatakan bahwa konsumsi kopi, yang merupakan salah satu sumber utama dari kafein dapat meningkatkan sensitivitas insulin (Arnlov, 2017), sehingga menurunkan risiko diabetes (Akash dkk., 2012; Lane dkk., 2008).

Penelitian lain menunjukkan bahwa konsumsi kafein dapat menurunkan sensitivitas insulin melalui beberapa mekanisme yang mungkin disebabkan oleh pengaruh kafein terhadap peningkatan kadar epinefrin dalam plasma (Lane dkk., 2008), peningkatan kebutuhan energi basal, menstimulasi oksidasi lemak dan mobilisasi glikogen pada jaringan otot serta dapat merangsang pelepasan asam lemak bebas dari jaringan perifer (Tjekyan, 2007).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa konsumsi kafein dapat meningkatkan kadar gula darah melalui beberapa mekanisme (Lane dkk., 2008; Tjekyan, 2007). Namun di sisi lain, terdapat beberapa penelitian yang menyatakan bahwa konsumsi kopi, yaitu minuman yang kandungannya utamanya adalah kafein dapat menurunkan kadar gula darah (Arnlov, 2017; Akash dkk., 2012; Lane dkk., 2008). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian kafein per oral terhadap kadar gula darah pada tikus normal dan hiperglikemia.

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah NESCO® *MultiCheck*, NESCO® *MultiCheck Glucose strip test*, kandang tikus, timbangan pengukur berat badan tikus, spuit, gunting, sonde lambung, timbangan digital.

Bahan

Digunakan streptozotocin 65 mg/Kg BB, kafein, dan tikus putih strain wistar.

Metode

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang menggunakan *pre test and posttest with control group design*.

Populasi penelitian adalah tikus (*Rattus novergicus*) putih strain wistar jantan, sehat, umur 8 - 10 minggu, berat 110 - 160 gram yang diperoleh di Unit Hewan Coba Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Total besar sampel adalah 36 ekor yang diambil dengan cara *simple random sampling*.

Terdapat 4 kelompok dengan randomisasi sederhana dengan rincian 2 kelompok kontrol dan 2 kelompok perlakuan. K1 adalah kelompok tikus hiperglikemia yang diberi perlakuan, K2 adalah kelompok tikus hiperglikemia kontrol, K3 adalah kelompok tikus normal yang diberi perlakuan dan K4 adalah kelompok tikus normal kontrol. Kelompok hiperglikemia adalah kelompok tikus yang di induksi dengan streptozotocin 65 mg/Kg BB pada awal percobaan. Perlakuan yang diberikan adalah dengan pemberian kafein per oral dosis 3,22 mg/200 gram BB/hari selama 3 hari pada kelompok perlakuan. Pengecekan kadar gula darah menggunakan alat glukometer dilakukan sebelum dan sesudah perlakuan.

Data dikumpulkan dan dianalisis secara statistik dengan uji normalitas dan uji homogenitas untuk memenuhi asumsi uji parametrik yaitu data berdistribusi normal dan homogen. Kemudian dilakukan uji *paired t-test* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antara data *pre test* dan *post test* untuk kelompok kontrol dan eksperimen dan selanjutnya dilakukan uji *independent t* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata kelompok *post test* data kontrol dan *post test* data eksperimen. Untuk mengetahui besar efek pemberian variabel bebas terhadap sampel, dilakukan perhitungan menggunakan *effect size*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deskripsi data

Pengecekan kadar gula darah dilakukan sebelum dan setelah perlakuan, yaitu pemberian kafein secara peroral dengan dosis 3 mg/200 Kg BB/hari selama tiga hari.

Tabel 1. Kadar gula darah hewan coba sebelum dan sesudah perlakuan (mg/dL)

K1 (Hiperglikemia-Perlakuan)		K2 (Hiperglikemia-Kontrol)		K3 (Normal-Perlakuan)		K4 (Normal-Kontrol)	
<i>Pre test</i>	<i>Post test</i>	<i>Pre test</i>	<i>Post test</i>	<i>Pre test</i>	<i>Post test</i>	<i>Pre test</i>	<i>Post test</i>
483	>600	392	402	102	143	113	130
483	>600	433	450	122	157	97	97
385	557	366	400	104	141	107	107
287	505	375	390	84	155	110	104
505	>600	391	360	122	155	122	107
453	483	370	287	92	115	79	104
420	>600	455	453	105	110	92	99
402	>600	409	433	104	117	127	122
380	596	453	445	84	136	105	101

Tabel 2. Uji normalitas one-sample kolmogorov-smirnov test

Kadar Gula	Kelompok Data	Kolmogorov-Smirnov Test	<i>p-value</i>
Normal	<i>Pre test</i> Kontrol (K4)	0,437	0,991
	<i>Post test</i> Kontrol (K4')	0,930	0,353
	<i>Pre test</i> Eksperimen (K3)	0,588	0,880
	<i>Post test</i> Eksperimen (K3')	0,568	0,904
Hiperglikemia	<i>Pre test</i> Kontrol (K2)	0,602	0,862
	<i>Post test</i> Kontrol (K2')	0,562	0,910
	<i>Pre test</i> Eksperimen (K1)	0,472	0,979
	<i>Post test</i> Eksperimen (K1')	1,112	0,169

Analisis data

Pengujian asumsi

Pengujian normalitas digunakan untuk mengetahui distribusi data dengan menetapkan α sebesar 1% dan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov.

Berdasarkan Tabel 2 diatas, dapat diketahui nilai *p-value* untuk masing-masing kelompok data pada kelompok kadar gula normal masing-masing lebih besar dari 0,001 (1%). Sama halnya untuk kelompok data pada kelompok kadar gula hiperglikemia masing-masing lebih besar dari 0,001 (1%). Sehingga dapat dikatakan bahwa data yang digunakan pada penelitian ini masing-masing berdistribusi normal.

Berdasarkan Tabel 3, dapat diketahui bahwa nilai *p-value* untuk data kontrol pada kadar gula normal (*pre test* dengan *posttest* kontrol) dan nilai *p-value* untuk data eksperimen masing-masing sebesar 0,428 dan 0,262. Sedangkan *p-value* untuk data kontrol pada kadar gula hiperglikemi dan nilai *p-value* untuk data eksperimen masing-masing sebesar 0,479 dan 0,342. Sehingga dapat disimpulkan bahwa varians antara nilai *pratest* dengan nilai *posttest* pada masing-masing data homogen.

Uji homogenitas digunakan untuk mengetahui varians dari beberapa populasi sama atau tidak. Dengan menetapkan α sebesar 1% dan menggunakan uji *Homogeneity of variance* diperoleh nilai *p-value* untuk masing-masing data sebagai berikut:

Tabel 3. Uji homogenitas

Kadar Gula	Data	<i>p-value</i>
Normal	Kontrol	0,428
	Eksperimen	0,262
Hiperglikemia	Kontrol	0,479
	Eksperimen	0,342

Pengaruh pemberian kafein terhadap kadar gula darah

Uji *paired t-test* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata suatu variabel pada waktu yang berbeda dengan syarat memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. normal dan hiperglikemia. Dengan menggunakan $\alpha = 0,01$ diperoleh hasil analisis sebagai berikut.

Pengaruh pemberian kafein terhadap kadar gula darah

Uji *paired t-test* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata suatu variabel pada

waktu yang berbeda dengan syarat memenuhi asumsi normalitas dan homogenitas. normal dan hiperglikemia. Dengan menggunakan $\alpha = 0,01$ diperoleh hasil analisis sebagai berikut.

Tabel 4. Uji *paired t-test*

Kadar Gula	Kelompok	Data	T	p-value
Normal	Kontrol	Pre test – Post test	-0,512	0,623
	Eksperimen	Pre test – Post test	-5,204	0,001
Hiperglikemia	Kontrol	Pre test – Post test	0,0224	0,828
	Eksperimen	Pre test – Post test	-7,049	0,000

Berdasarkan Tabel 4 diatas, dapat diketahui nilai *p-value* yang kurang dari 0,05 pada uji tersebut terdapat pada kelompok eksperimen pada kadar gula normal dan hiperglikemia.

Effect Size Kafein Terhadap Kadar Gula Darah Tikus Normal

Uji independent *t* harus dilakukan sebelum menghitung *effect size*. Pengujian ini dilakukan untuk

mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata kelompok *post test* data kontrol dan *post test* data eksperimen pada tikus berkadar gula normal. Dengan menggunakan $\alpha = 0,05$ diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 5. Independent *t* kadar gula darah normal

Kadar Gula	Kelompok	Rata-rata	SD	T	p-value
Normal	Kontrol	107,889	10,982	4,011	0,001
	Eksperimen	136,556	18,413		

Berdasarkan Tabel 5 diketahui bahwa nilai rata-rata kadar gula pada tikus normal kontrol sebesar 107,889, sedangkan rata-rata kadar gula pada tikus normal perlakuan sebesar 136,556. Nilai *p-value* yang diperoleh melalui uji independent *t* sebesar 0,001 atau lebih kecil dari 0,05. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kafein berpengaruh signifikan terhadap kadar gula pada tikus normal. Selanjutnya penghitungan *effect size* kafein terhadap kadar gula pada tikus normal adalah sebagai berikut:

$$d = 4,011 \sqrt{\left(\frac{9+9}{9 \times 9}\right)\left(\frac{9+9}{9+9-2}\right)} = 2,005$$

Diperoleh *effect size* sebesar 2,005. Jika dilihat pada Tabel *The interpretation of cohen's d* maka angka 2,005 berada pada presentase 81,1%.

Effect size kafein terhadap kadar gula darah tikus hiperglikemia size kafein terhadap kadar gula pada tikus hiperglikemia

Uji independent *t* harus dilakukan sebelum menghitung *effect size*. Pengujian independent *t* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan rata-rata kelompok *post test* data kontrol dan *post test* data eksperimen pada tikus hiperglikemia. Dengan menggunakan $\alpha = 0,05$ diperoleh hasil pada Tabel 6 sebagai berikut:

$$t = 4,011$$

$$n_t = 9$$

$$n_c = 9$$

$$d = t \sqrt{\left(\frac{n_t + n_c}{n_t n_c}\right)\left(\frac{n_t + n_c}{n_t + n_c - 2}\right)}$$

Tabel 6. Independent t kadar gula darah hiperglikemia

Kadar Gula	Kelompok	Rata-rata	SD	T	p-value
Hiperglikemia	Kontrol	402,222	53,446	7,172	0,000
	Eksperimen	571,222	46,267		

Berdasarkan Tabel 6 dapat diketahui bahwa nilai rata-rata kadar gula tikus hiperglikemia kontrol sebesar 402,222, sedangkan rata-rata kadar gula tikus hiperglikemia perlakuan sebesar 571,222. Nilai *p-value* yang diperoleh melalui uji independent t diketahui sebesar 0,000 atau lebih kecil dari 0,05. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kafein berpengaruh signifikan terhadap kadar gula pada tikus hiperglikemia. Selanjutnya penghitungan *effect size* kafein terhadap kadar gula pada tikus hiperglikemia adalah sebagai berikut.

$$t = 4,011$$

$$n_t = 9$$

$$n_c = 9$$

$$d = t \sqrt{\left(\frac{n_t + n_c}{n_t n_c}\right) \left(\frac{n_t + n_c}{n_t + n_c - 2}\right)}$$

$$d = 7,172 \sqrt{\left(\frac{9 + 9}{9 \times 9}\right) \left(\frac{9 + 9}{9 + 9 - 2}\right)} = 3,586$$

Diperoleh *effect size* sebesar 3,586. Jika dilihat pada Tabel *The interpretation of cohen's d* maka angka 3,586 berada pada presentase 97.7%.

Pemeriksaan kadar gula darah pada tikus yang menggunakan glukometer dilakukan sebelum perlakuan dan setelah perlakuan, yaitu pemberian kafein dosis 3,22 mg/200 Kg BB/hari secara per oral. Kelompok hiperglikemia diinduksi menggunakan streptozotocin secara *single dose* dengan dosis 65 mg/Kg BB dan kadar gula darah diukur tiga hari setelah induksi. Hal ini berdasarkan studi yang mengatakan bahwa setelah tiga hari, streptozotocin membuat pancreas membengkak dan sel islet beta pancreas mengalami degenerasi (Akbarzadeh, 2017).

Penelitian ini dilakukan selama 3 hari berdasarkan penelitian sebelumnya yang mengatakan bahwa selama tiga hari kafein dapat memberikan efek terhadap tikus yang telah terinduksi oleh streptozotocin sebelumnya (Kagami, 2017).

Hasil dari penelitian ini setelah dilakukan uji *paired t-test* menunjukkan bahwa pemberian kafein per oral dapat menaikkan kadar gula darah secara

signifikan pada tikus yang memiliki kadar gula normal maupun kadar gula hiperglikemia. Selanjutnya dengan menggunakan uji *Effect Size* didapatkan pengaruh kafein dalam menaikkan kadar gula darah pada tikus yang memiliki kadar gula normal sebesar 81,1% dan pengaruh kafein dalam menaikkan kadar gula darah pada tikus hiperglikemia sebesar 97,7%.

Pengaruh pemberian kafein terhadap kadar gula darah masih menjadi diskusi para peneliti apakah menaikkan atau menurunkan kadar gula darah. Efek kafein terhadap toleransi glukosa masih belum jelas (Urzua dkk., 2012). Menurut Akash dkk (2012), kopi yang merupakan sumber utama dari kafein dapat menunjukkan perlindungan terhadap diabetes (Akash dkk., 2012; Van dkk., 2004). Namun ternyata, selain mengandung kafein, kopi juga mengandung asam klorogenik yang merupakan suatu polifenol. Kadar asam klorogenik pada kopi cukup besar yaitu pada 200 mL kopi adalah sekitar 70 - 350 mg. Polifenol adalah antioksidan yang memiliki fungsi mencegah berbagai penyakit seperti sirosis hati dan diabetes mellitus tipe 2. Senyawa polifenol dapat memperlambat pengeluaran glukosa ke peredaran darah setelah makan (National Center for Biotechnology Information, 2018).

Terdapat beberapa fungsi kafein pada tubuh. Kafein adalah suatu antagonis dari reseptor adenosin. Selain itu, kafein juga merupakan inhibitor enzim fosfodiesterase, memicu pengeluaran kalsium intraseluler ke ekstraseluler dan antagonis dari reseptor benzodiazepine. Kafein juga memicu pengeluaran dari norepinefrin, dopamin, asetilkolin, serotonin, glutamat, GABA dan neuropeptida yang lain. Sebagai antagonis reseptor adenosin, kafein menghambat adenosin untuk menempel ke reseptornya secara non selektif, yaitu menghambat reseptor A1, A2A, A3, A2B (Ribeiro & Sebastiao, 2010).

Adenosin adalah nukleosida purin endogen yang berasal dari seluruh jaringan meliputi hepar, pankreas, otot dan lemak dalam keadaan stress. Adenosin berasal dari pemecahan ATP di ruang ekstraseluler dengan bantuan 2 enzim endonukleotidase, yaitu nukleosid trifosfat difosforilase 1 (ENTPD1) dan ecto 5 nukleotidase (NT5E). Selain itu adenosin juga bisa berasal dari ATP intrasel dengan bantuan 2 enzim

yaitu ENT1 dan ENT2. Peran dari adenosin pada homeostasis glukosa melalui reseptornya adalah mengatur proses sekresi insulin, rilis dan klirens glukosa, glikogenolisis dan glikogenesis. Studi membuktikan bahwa adenosin dapat memicu sekresi insulin dan menurunkan produksi glukosa. Selain itu, adenosin juga berperan dalam metabolisme lipid dan kolesterol (Koupenova & Ravid, 2017).

Reseptor adenosin, terutama A1, berperan dalam mekanisme homeostasis glukosa. Apabila teraktivasi, reseptor ini dapat memodulasi peran insulin dalam transport glukosa ke dalam otot melalui glukosa transporter 4 atau GLUT 4. Reseptor adenosin A1 menstimulasi transport glukosa oleh insulin terutama pada otot skeletal yang berkontraksi. Lebih jauh lagi, reseptor adenosin A1 dapat memfasilitasi ambilan glukosa yang diperantarai oleh insulin ke adiposit dan myocardium. Kafein menghambat kontraksi otot skeletal sebesar 30 - 50% (Dhalla dkk., 2017).

Otot skeletal adalah tempat utama untuk penyimpanan glukosa selain hepar. Saat kondisi istirahat atau basal, ambilan glukosa rendah. Namun, saat otot berkontraksi, kecepatan ambilan glukosa akan meningkat, apalagi ketika kadar insulin tinggi, maka ambilan glukosa akan lebih meningkat lagi. Ketika terjadi kontraksi dan paparan insulin, ambilan glukosa naik daripada hanya terjadi kontraksi saja maupun paparan insulin saja, hal ini merupakan fenomena aditif sinergis. Insulin dan kontraksi secara independendapat memicu transport glukosa melalui peningkatan jumlah transporter glukosa di sarkolema secara aktif maupun peningkatan aktivitas intrinsik transporter (Thong & Laily, 2017).

Saat otot berkontraksi dengan intensitas yang tinggi, otot akan menggunakan ATP sebagai sumber energi. ATP akan terdegradasi menjadi AMP dan adenosin dengan bantuan enzim adenilat kinase dan enzim 5'nukleotidase. Di sarkoplasma, adenosin yang terbentuk akan keluar ke intersisial dan teraktivasi menjadi hormon lokal dan menempel di reseptor adenosin pada sel tertentu. Tanda kemerahan atau hiperemi pada kulit ketika otot berkontraksi merupakan salah satu kontribusi dari melekatnya adenosin pada reseptor adenosin di pembuluh darah sehingga akan mengalami vasodilatasi. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa selain berkontribusi terhadap regulasi vasomotor, reseptor adenosin juga berperan dalam regulasi insulin terutama di otot skeletal (Vergauwen dkk., 2017).

Pada penderita diabetes mellitus, kafein dapat menyebabkan hiperglikemia. Selain mempengaruhi

ambilan glukosa di otot skeletal dan peningkatan lipolisis, kafein juga dapat memicu hormon yang berperan sebagai kounterregulasi glukosa seperti epinefrin, yang menurunkan ekskresi glukosa, sehingga kadar glukosa dalam darah tinggi. Epinefrin adalah suatu hormon yang berperan dalam aktivisasi sistem simpatik. Seperti yang diketahui bahwa insulin adalah hormon penting yang berperan dalam meregulasi kadar gula darah agar tidak meningkat. Insulin dihasilkan oleh sel beta pankreas. Stimulasi simpatis dari epinefrin dapat menurunkan aktivitas sel beta pankreas sehingga produksi insulin akan menurun dan kadar gula darah akan naik (Zaharieva & Riddell, 2013).

KESIMPULAN

Pemberian kafein per oral dapat meningkatkan kadar gula darah tikus hiperglikemia sebesar 97,7% dan tikus normal sebesar 81,1%.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut menggunakan kafein per oral dengan dosis bertingkat untuk mengetahui pengaruh kafein per oral terhadap kadar gula darah dengan dosis yang bervariasi, jangka waktu lebih lama guna mengetahui efek kronis kafein per oral terhadap kadar gula darah, penilaian kenaikan kadar gula darah secara lebih teliti dengan menggunakan metode yang lebih akurat seperti pemeriksaan laboratorium serta diharapkan hasil penelitian ini dapat memberikan masukan untuk mempertimbangkan pengaruh pemberian kafein terhadap kadar gula darah.

DAFTAR PUSTAKA

- Akash, M., Rehman, K. & Chen, S. (2014). Effects of Coffee on Type 2 Diabetes Mellitus by PubMed NCBI. *Nutrition*; 30; 755-763.
- Akbarzadeh, A. (2017). Induction of Diabetes by Streptozotocin in Rats. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*; 22; 60-64.
- Arnlov, Je. (2017). Coffee Consumption and Insulin Sensitivity. *The Journal of the American Medical Association*; 291; 1199-1201.
- Dhalla, A. K., Chisholm, J. W. & Reaven, G. M. (2017). A1 Adenosine Receptor: Role in Diabetes and Obesity. *Handbook of experimental pharmacology*; 193; 271-295.
- Kagami, K. E. (2017). Protective Effect of Caffeine on Streptozotocin-Induced Beta-Cell Damage in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 60; 1161-1165.

- Koupenova, M. & Ravid, K. (2017). Adenosine, Adenosine Receptors and Their Role in Glucose Homeostasis and Lipid Metabolism. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3849123/>. Accessed: 30 September 2017.
- Lane, J., Feinglos, M. & Surwit, R. (2008). Caffeine Increases Ambulatory Glucose and Postprandial Responses in Coffee Drinkers with Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*; 31; 221-222.
- Mayo Clinic. (2018). Caffeine Content for Coffee, Tea, Soda and more. <https://www.mayoclinic.org/healthylifestyle/nutrition-and-healthy-eating/in-depth/caffeine/art-20049372>. Accessed: 9 Februari 2018.
- National Center for Biotechnology Information. (2018). PubChem Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1794427>. Accessed: 9 Februari 2018.
- Ribeiro, J. & Sebastiao, A. (2010). Caffeine and Adenosine. *Journal of Alzheimer's Disease*; 20; S3-15.
- Thong, F. S. & Laily, J. S. (2017). Activation of the A1 Adenosine Receptor Increases Insulin-Stimulated Glucose Transport in Isolated Rat Soleus Muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*; 32; 701-10.
- Tjekyan, R. (2007). Risiko Penyakit Diabetes Mellitus Tipe 2 di Kalangan Peminum Kopi di Kotamadya Palembang Tahun 2006-2007. *Makara, kesehatan*; 11; 54-60.
- Urzua, Z., Trujillo, X., Trujillo, Hernandez, B., Rios, S. M., Onetti, C., Ortiz & Mesina. (2012). Effects of Chronic Caffeine Administration on Blood Glucose Levels and on Glucose Tolerance in Healthy and Diabetic rats. *Journal of International Medical Research*; 40; 2220-2230.
- Van, D. R., Pasman, W. & Verhoef, P. (2004). Effects of Coffee Consumption on Fasting Blood Glucose and Insulin Concentrations: Randomized Controlled Trials in Healthy Volunteers. *Diabetes Care*; 27; 2990-2992.
- Vergauwen, L., Hespel, P. & Richter, E. A. (2017). Adenosine Receptors Mediate Synergistic Stimulation of Glucose Uptake and Transport by Insulin and by Contractions in Rat Skeletal Muscle. *The Journal of Clinical Investigation*; 93; 974-981.
- Zaharieva, D. & Riddell, M. (2013). Caffeine and Glucose Homeostasis during Rest and Exercise in Diabetes Mellitus. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*; 38; 813-82.

Efek Kapsul Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap Kadar Bilirubin Sukarelawan Sehat

Nur Azizah^{1,2*}, Endang Darmawan¹, Laela Hayu Nurani¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

²Akademi Farmasi Muhammadiyah, Kuningan, Jawa Barat

*Corresponding author: mom_zie80@yahoo.co.id

Abstract

Background: *Hibiscus sabdariffa* is one of traditional herbs that has a lot of benefits including immunostimulant effect, because it contains antioxidant compounds including anthocyanin and flavonoid. Based on its activity on preclinical tests, *H.sabdariffa* has been qualified to proceed to clinical trial phase. **Objective:** The study aimed to investigate the effect of ethanol extract capsule of rosella petals (*Hibiscus sabdariffa* L.) on bilirubin levels on 11 healthy male volunteers and 10 healthy female volunteers. **Methods:** This study used pre-and post treatment design. Healthy volunteers consume ethanol extract capsule of rosella petals for 30 days at a dose of 500 mg once daily at night. Bilirubin test was conducted at day 0; 31 and 45, using Jendrassik and Grof method. Results were analyzed using SPSS with paired t-test and Wilcoxon test. **Results:** The result showed that the comparison of the mean value at day 0 and 31, with day 31 and 45, and the comparison of the mean value between day 0 and 45 showed no significant difference regarding total and direct ($p > 0.05$) and indirect bilirubin levels ($p = 0.05$), but this is still within the normal range of values for indirect bilirubin. **Conclusion:** The ethanol extract capsule of rosella petals had no effects on total, direct and indirect bilirubin levels in healthy volunteers.

Keywords: ethanol, *Hibiscus sabdariffa*, bilirubin levels

Abstrak

Pendahuluan: *Hibiscus sabdariffa* adalah salah satu ramuan tradisional yang memiliki banyak manfaat termasuk efek imunostimulan, karena banyak mengandung antioksidan di dalamnya termasuk anthocyanin dan flavonoid. Berdasarkan aktivitasnya pada tes praklinis, *H.sabdariffa* telah memenuhi syarat untuk melanjutkan ke fase uji klinis. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) pada kadar bilirubin 11 sukarelawan sehat pria dan 10 sukarelawan sehat wanita. **Metode:** Penelitian ini menggunakan rancangan pre-post treatment. Sukarelawan sehat mengkonsumsi kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella selama 30 hari dengan dosis 500 mg sekali sehari pada malam hari. Tes Bilirubin dilakukan pada hari ke-0; 31 dan 45, menggunakan metode Jendrassik dan Grof. Hasil dianalisis menggunakan SPSS dengan paired t-test dan uji Wilcoxon. **Hasil:** Perbandingan nilai rata-rata pada hari ke-0 dan 31, dengan hari ke-31 dan 45, dan perbandingan nilai rata-rata antara hari ke-0 dan ke-45 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kadar bilirubin total dan *direct* ($p > 0,05$), sedangkan perbandingan nilai rata-rata untuk kadar bilirubin *indirect* hari ke-0 dan ke-45 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p = 0,05$) akan tetapi kadar bilirubin *indirect* tersebut masih dalam rentang nilai normal. **Kesimpulan:** Kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella tidak mempengaruhi kadar bilirubin total, *direct* dan *indirect* pada sukarelawan sehat.

Kata kunci: etanol, *Hibiscus sabdariffa*, kadar bilirubin

PENDAHULUAN

Hibiscus sabdariffa (rosella) adalah salah satu tanaman tradisional yang memiliki banyak manfaat bagi kesehatan tubuh. Kandungan senyawa yang terdapat dalam rosella terdiri dari antosianin, polisakarida, *hydroxycitric acid*, *hibiscus acid* dan flavonoid yang dapat berperan sebagai antioksidan.

Selain itu juga rosella memiliki kandungan vitamin B1, B2, niasin, vitamin D serta 18 asam amino (Da-Costa-Rocha dkk., 2014; Mardiah dkk., 2009; Rahmawati, 2012). Sifat antioksidan yang dimiliki rosella dapat meningkatkan sistem imun dengan cara melindungi sel-sel tubuh dari radikal bebas dan kerusakan akibat paparan sinar ultraviolet (Mardiah dkk., 2009).

Sifat antioksidan yang dimiliki oleh rosella disebabkan karena kandungan antosianinnya. Penelitian yang dilakukan oleh Wijaya dkk. (2014) membuktikan bahwa antosianin yang terkandung dalam rosella dengan dosis 100 mg/KgBB mampu menurunkan kadar malondialdehide pada tikus yang hiperkolesterol, sedangkan penelitian yang dilakukan oleh Nurkhasanah & Rahardhian (2015), menyatakan bahwa aktivitas antioksidan rosella mampu melindungi hati hewan uji dari kerusakan akibat radikal bebas (DMBA). Efek antioksidan rosella juga mampu melindungi hati dari kerusakan akibat paparan radikal bebas dengan menurunkan kadar enzim-enzim pada hati. Penelitian yang dilakukan oleh Bhavana dkk. (2017) menyatakan bahwa ekstrak air daun rosella merah yang diberikan secara oral tidak menunjukkan adanya kerusakan pada hati tikus yang diinduksi oleh alkohol dengan menurunkan kadar bilirubin. Olanrewaju dkk., (2017) menyatakan bahwa ekstrak metanol kelopak bunga rosella memiliki efek hepatoprotektif dengan menurunkan kadar bilirubin pada tikus yang diinduksi berulang kali dengan etanol.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Nurkhasanah (2015) terhadap hewan uji menyatakan bahwa pada dosis 50 mg/KgBB ekstrak kelopak bunga rosella memberikan potensi terapi sebagai imunostimulator, akan tetapi tidak memberikan potensi toksik (dosis dapat ditoleransi), maka diharapkan ini dapat digunakan pada manusia. Salah satu parameter yang digunakan dalam mentolerir dosis adalah mengetahui adanya perubahan pada fungsi hati (kadar enzim-enzim hati) yang merupakan salah satu rangkaian dalam uji klinik fase I (Robinson dkk., 2009). Efek obat terhadap fungsi hati sangat berkaitan dengan efek toksik dalam penelitian keamanan suatu obat. Pengujian keamanan terhadap obat baru yang berasal dari bahan alam amatlah perlu untuk mengetahui apakah dosis obat tersebut aman untuk digunakan dan tidak menimbulkan efek toksik.

Ekstrak etanol kelopak bunga rosella memiliki nilai toksisitas LD₅₀ sebesar 850,90 mg/KgBB pada tikus *sprague dawley* dengan kategori toksisitas ringan dan tidak memiliki pengaruh terhadap aktivitas enzim SGOT, SGPT, ALP, dan bilirubin (Sari dkk., 2016; Bhavana dkk., 2017) yang mana enzim-enzim tersebut merupakan indikator adanya kerusakan atau kelainan pada hati. Suwandi (2012) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol kelopak bunga rosella pada tikus memiliki LD₅₀ sebesar ≥ 15 g/KgBB hasil tersebut masuk ke dalam kategori praktis tidak toksis. Pemanfaatan rosella seperti saat ini perlu diimbangi

dengan informasi kepastian keamanannya terhadap manusia. Beberapa penelitian yang telah dilakukan terhadap hewan uji menimbulkan pertanyaan mengenai kemanan dari *H. sabdariffa* (rosella) terhadap manusia. Penelitian ini dilakukan untuk dapat mengetahui bagaimana pengaruh setelah mengkonsumsi ekstrak etanol kelopak bunga rosella yang dikemas dalam kapsul terhadap kadar bilirubin sukarelawan sehat.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kapsul yang berisi serbuk ekstrak etanol kelopak bunga rosella terstandari yang di peroleh dari PT. Natura (Product code: 5055C, Batch: RH162703). Reagen yang digunakan untuk mengukur kadar bilirubin adalah reagen bilirubin total dan *direct Clona test*, REF CT 1009050)

Alat

Alat yang digunakan adalah *Random Acces Clinical Analyzer* Metrolab 2300 plus dengan metode Jendrassik dan Grof, tabung mikrosentrifugasi berisi *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) sebagai antikoagulan, spuit 5 cc, tensimeter (Corona), falcon, vortex Mixer (FV-2400 Microspin Biosan, 220 V, 60 Hz)

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian *pre and post treatment*. Subjek yang digunakan adalah sukarelawan sehat yang berjumlah 21 orang terdiri 11 orang laki-laki dan 10 orang perempuan (jumlah tersebut sesuai dengan ketentuan BPOM RI (2014), mengenai jumlah subjek dalam penelitian uji klinik fase I yaitu 20 - 80 orang). Sukarelawan sehat yang dapat mengikuti penelitian ini harus memenuhi kriteria inklusi, yaitu sehat dibuktikan dengan surat keterangan dari dokter, usia 18 - 45, IMT 18 - 30 Kg/m², tidak merokok, tidak mengkonsumsi herbal lain atau vitamin dan suplemen. Kriteria eksklusi dari penelitian ini yaitu wanita hamil dan menyusui, memiliki faktor resiko penyakit imun seperti lupus dan leukemia, memiliki riwayat gangguan fungsi hati dan fungsi ginjal.

Sukarelawan sehat diberi kapsul yang berisi ekstrak etanol kelopak bunga rosella selama 30 hari dengan dosis 500 mg sebanyak 1 kali sehari, setelah makan pada malam hari. Pemeriksaan kadar bilirubin dilakukan pada hari ke-0 (sebelum mengkonsumsi); ke-31 (setelah mengkonsumsi) dan ke-45 (15 hari setelah tidak mengkonsumsi) dengan menggunakan metode metode Jendrassik dan Grof.

Persiapan dan pemeriksaan kesehatan

Penelitian diawali dengan pengajuan *Ethical Clearance* kepada Komite Etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Kelayakan etika dari penelitian ini dibuktikan dengan terbitnya surat keterangan layak etik (*Ethical Clearance*) dengan nomor 255/EP-FKIK-UMY/IV/2017.

Pemeriksaan kesehatan

Relawan yang telah menyetujui *informed consent* diperiksa oleh dokter bersertifikat untuk menentukan kesesuaian kriteria sehat. Kriteria sehat meliputi *vital sign*, yaitu tekanan darah (TD), suhu tubuh, denyut nadi (*heart rate*, HR) dan tingkat pernapasan (*respiration rate*, RR), hasil pemeriksaan dokter dinyatakan dalam surat keterangan sehat dengan didukung oleh pemeriksaan laboratorium klinis yang meliputi bilirubin total, langsung dan tidak langsung.

Persiapan pengambilan sampel darah

Sampel darah diambil pada median *cubital vein* atau *brachial vein* dengan menggunakan jarum suntik 5 cc untuk darah 4 cc. Sampel kemudian disimpan di tabung mikro sentrifugal yang mengandung EDTA sebagai koagulan. Pemisahan plasma dilakukan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3.500 rpm selama 5 menit, kemudian diambil larutan yang berwarna kuning jernih (serum) (Khasanah, 2016)

Pemeriksaan bilirubin

Penetapan kadar bilirubin ditetapkan berdasarkan metode Jendrassik & Grof (1938) menggunakan alat *autoanalyzer spectrophotometer* dengan prinsip bilirubin akan membentuk senyawa azo berwarna merah dalam larutan alkali dengan adanya garam diazonium asam sulfonat (panjang gelombang 546 nm). Prosedur kerja pemeriksaan bilirubin total adalah campurkan 40 µl reagen nitrit total dengan 1000 µL

reagen bilirubin total kemudian tambahkan 100 µL serum, inkubasi campuran selama 10 - 30 menit pada suhu kamar lalu ukur pada panjang gelombang 546 nm. Prosedur kerja untuk pemeriksaan bilirubin *direct* adalah campurkan 40 µl reagen nitrit *direct* dengan 1000 µL reagen bilirubin *direct* kemudian tambahkan 100 µL serum, inkubasi campuran selama 10 - 30 menit pada suhu kamar lalu ukur pada panjang gelombang 546 nm.

$$\text{Total Bilirubin} = \text{Bilirubin Direct} + \text{Bilirubin Indirect}$$

Analisis data

Analisis data dihitung secara *continue* dengan menyajikan mean ± SD menggunakan statistik SPSS 20. Hasil pemeriksaan bilirubin total, *direct* dan *indirect* pada sukarelawan sehat yang diukur pada hari ke-0 (sebelum mengkonsumsi), hari ke-31 (setelah mengkonsumsi) dan hari ke-45 (15 hari setelah tidak mengkonsumsi) diuji terlebih dahulu normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk*. Selanjutnya, jika data terdistribusi normal dilanjutkan dengan melakukan *paired t-test*, sedangkan jika tidak terdistribusi normal maka analisis dilanjutkan dengan melakukan uji *Wilcoxon* pada taraf kepercayaan 95% (Dahlan, 2014).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan perbandingan rata-rata bilirubin total dan *direct* sukarelawan sehat yang diberi kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna karena nilai $p > 0,05$, sedangkan untuk kadar bilirubin *indirect* ditemukan perbedaan dalam rata-rata antara hari ke 0-45 ($p = 0,05$). Secara klinis tingkat kadar bilirubin masih dalam batas normal. Hasil penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata Nilai Bilirubin Sukarelawan Sehat yang diberi Kapsul Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella (n = 21).

Parameter Fungsi Hati	Rata-rata Nilai Fungsi Hati Sukarelawan Sehat (<i>Mean ± SD</i>)			P value			Nilai Normal
	Hari Ke-0	Hari Ke-31	Hari Ke-45	Hari Ke 0 - 31	Hari Ke 31 - 45	Hari Ke 0 - 45	
Total Bilirubin	0,69 ± 0,46	0,77 ± 0,41	0,74 ± 0,41	0,140	0,639	0,237	≤ 1,4 mg/dL
Direct Bilirubin	0,39 ± 0,10	0,46 ± 0,21	0,42 ± 0,11	0,125	0,363	0,324	≤ 0,4 mg/dL
Indirect Bilirubin	0,22 ± 0,34	0,13 ± 0,19	0,12 ± 0,21	0,186	0,806	0,050	≤ 1,0 mg/dL

Keterangan: Nilai Normal Kadar Bilirubin (Kemenkes RI, 2011)

Pengukuran kadar bilirubin menggunakan alat *Random Acces Clinical Analyzer* Metrolab 2300 plus

dengan metode Jendrassik & Grof (1938). Pengukuran kadar bilirubin dilakukan sebelum sukarelawan sehat

mengonsumsi kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella (hari ke-0), setelah mengonsumsi kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella (hari ke-31) dan setelah 15 hari tidak mengonsumsi kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella (hari ke-45). Data hasil analisis kadar bilirubin yang disajikan pada Tabel 1 menunjukkan adanya perubahan rata-rata nilai bilirubin total, *direct* dan *indirect* sukarelawan sehat. Kadar bilirubin total hari ke-0 adalah 0,69 mg/dL, untuk hari ke-31 adalah 0,77 mg/dL dan hari ke-45 adalah 0,74 mg/dL. Kadar bilirubin *direct* di hari ke-0 adalah 0,39 mg/dL, hari ke-31 adalah 0,46 mg/dL dan hari ke-45 adalah 0,42 mg/dL sedangkan untuk hasil pengukuran kadar bilirubin *indirect* hari ke-0 adalah 0,22 mg/dL, hari ke-31 adalah 0,13 mg/dL dan hari ke-45 adalah 0,12 mg/dL. Hasil analisis perbandingan rata-rata kadar bilirubin total dan *direct* hari ke-0 dan hari ke-31 dengan hari ke-31 dan hari ke-45 dan perbandingan antara hari ke-0 dan ke-45 tidak terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai $p > 0,05$, sedangkan untuk kadar bilirubin *indirect* pada perbandingan hari ke-0 dan ke-45, terdapat perbandingan bermakna karena $p = 0,05$, namun nilai kadar masih dalam rentang nilai normal. Perubahan yang terjadi pada setiap kali pengukuran masih dalam rentang nilai normal sehingga hasil ini dapat disimpulkan bahwa kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella secara klinis relatif aman karena tidak mempengaruhi jumlah kadar bilirubin total, *direct* dan *indirect* pada sukarelawan sehat. Nilai kadar bilirubin normal menurut Kemenkes RI (2011) adalah bilirubin total sebesar $\leq 1,4$ mg/dL, bilirubin *direct* sebesar $\leq 0,4$ mg/dL dan untuk kadar bilirubin *indirect* sebesar $\leq 1,0$ mg/dL.

Hasil penurunan nilai bilirubin yang didapat ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa, ekstrak kelopak bunga rosella memiliki efek hepatoprotektif dengan menurunkan aktivitas bilirubin (Bhavana dkk., 2017 dan Olanrewaju dkk., 2017).

Peningkatan kadar bilirubin *direct* dapat disebabkan obstruksi biliar intrahepatik dan ekstrahepatik, juga disebabkan oleh kerusakan sel-sel parenkim hepar. Bilirubin *indirect* adalah bilirubin yang belum mengalami konjugasi di hepar. Bilirubin *direct* merupakan bilirubin *indirect* yang telah mengalami tiga tahap metabolisme (pengambilan, konjugasi, dan ekskresi), bersifat larut dalam air dan dapat diekskresikan ke dalam urin (Panjaitan dkk., 2011).

Perubahan kadar bilirubin total dan *direct* pada sukarelawan sehat menunjukkan bahwa perubahan tersebut memiliki perbedaan nilai yang tidak bermakna atau perubahan tersebut tidak signifikan karena nilai

$p > 0,05$ sedangkan untuk kadar bilirubin *indirect* pada sukarelawan di hari ke-0-45 menunjukkan adanya perubahan yang signifikan $p = 0,05$ namun kadar bilirubin masih dalam rentang nilai normal. Meskipun secara statistik mengalami perubahan dari tiap-tiap parameter namun secara klinis tidak bermakna. Penurunan kadar bilirubin pada sukarelawan sehat disebabkan karena kandungan antioksidan dan flavonoid dalam ekstrak etanol kelopak bunga rosella sehingga dapat melindungi fungsi hati, ini sejalan dengan penelitian Mardiah dkk. (2009) yang menyatakan bahwa pigmen antosianin yang terkandung dalam rosella berfungsi sebagai antioksidan, yang mampu menjaga fungsi hati dari kerusakan akibat radikal bebas. Selain itu Bhavana dkk. (2017) menyatakan aktivitas hepatoprotektif *Hibiscus sabdariffa* dapat disebabkan oleh adanya bioflavonoid yang memiliki sifat hepatoprotektif.

KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kapsul ekstrak etanol kelopak bunga rosella selama 30 hari tidak memberikan efek terhadap nilai bilirubin total, *direct* dan *indirect* sukarelawan sehat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Hibah penelitian unggulan Program Studi dari LPP Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta tahun 2017.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia (BPOM RI). (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 13 tentang Pedoman Uji Klinik Obat Herbal. Jakarta: BPOM RI.
- Bhavana, G. R., Rajani, Mai, Babu, J. & Bonthagarala, B. (2017). Hepatoprotective Activity of Aqueous Extract of *Hibiscus sabdariffa* on Alcohol Induced Hepatotoxicity in Rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*; 6; 767-778.
- Da-Costa-Rocha, I., Bonnlaender, B., Pischela, I. & Heinrich, M. (2014). *Hibiscus sabdariffa* L. A Phytochemical and Pharmacological review. *Journal Food Chemistry*; 424-443.
- Dahlan, S. (2014). Statistik Untuk Kedokteran dan Kesehatan Edisi. 6. Jakarta: Epidemiologi Indonesia.
- Jendrassik, L. & Grof, P. (1938). Estimation of Total Serum Bilirubin Level by Spectrophotometrically

- in Serum and Plasma. *Biochem Zeitschrift*; 297; 81-89.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (Kemenkes RI). (2011). Pedoman Interpretasi Data Klinik. Jakarta: Kemenkes RI.
- Khasanah, U. (2016). Perbedaan Hasil Pemeriksaan Hitung Jumlah Trombosit pada Darah Vena dan Darah Kapiler dengan Metode Tabung. *Skripsi*; Fakultas Ilmu Keperawatan dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah, Semarang.
- Mardiah, Hasibuan, S., Ashadi, R. W. & Rahayu, A. (2009). Budi Daya dan Pengolahan Rosela Si Merah Segudang Manfaat. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Nurkhasanah. (2015). The Effect of Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Treatment on IL-10 and IL-14 Secretion on Dimethylbenz (α) Antrachene (DMBA). *International Journal Pharmaceutical Science*; 7; 402-402.
- Nurkhasanah & Rahardhian, M. R. R. (2015). Hepatoprotective Effect of *Hibiscus sabdariffa* L Extract on 7,12-dimethylbenz(α)antracene (DMBA) Induced Rat. *International Journal of Biological and Medical Research*; 6; 4705-4708.
- Olanrewaju, E., Anyaehie, B., Ezeh, C. O., Onyekwelu, K. C. & Ezeh, R. C. (2017). Effect of Methanolic Extract of *Hibiscus sabdariffa* in Ethanol-Induced Hepatotoxicity. *African Journal Biomedical Research*; 20; 99-102.
- Panjaitan, R. G. P., Handharyani, E., Chairul & Manalu, W. (2013). Hepatoprotective Activity of *Eurycoma longifolia* Jack. Roots. *Indian Journal of Traditional Knowledge*; 12; 225-230.
- Rahmawati, R. (2012). Budidaya Rosella. Yogyakarta: Penerbit Pustaka Baru Press.
- Robinson, S., Kathryn, C., Shirley, H., Sue S., Derrick Spencer-Briggs, Andy D., Rose H., David E., Brigitte M., Fulcrum P., Sally O., Christopher B. (2009). Guidance on Dose Level Selection of Regulatory General Toxicology Studies for Pharmaceuticals. UK: The Association of the British Pharmaceutical Industry (ABPI) and the British Toxicology Society (BTS).
- Sari, F., Nurkhasanah & Moch, S. B. (2016). Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) dan Pengaruhnya terhadap Fungsi Hepar. *Tesis*; Program Pascasarjana Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Suwandi, T. (2012). Pengembangan Potensi Antibakteri Kelopak Bunga *Hibiscus sabdariffa* L. terhadap *Streptococcus Sanguinis* Penginduksi Ginivitis Menuju Obat Herbal Terstandar. *Disertasi*; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, Jakarta.
- Wijaya, A., Nurani, L. H. & Nurkhasanah. (2014). Aktivitas Antioksidan Sediaan Nanopartikel Kitosan Ekstrak Etanol Kelopak Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) pada Tikus Hiperkolesterol: Pengukuran Kadar Melondialdehid (MDA). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*; 2; 1-6.

Hubungan Tingkat Pengetahuan terhadap Penggunaan Obat Parasetamol Rasional dalam Swamedikasi

Irma Nurtiana Syafitri^{1*}, Ika Ratna Hidayati¹, Liza Pristianty²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang, Malang

²Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: irmanurtiana@gmail.com

Abstract

Background: The most commonly-used medication for self-medication was paracetamol. Paracetamol was used to relieve mild or moderate pain and mild-feverish conditions. **Objective:** This study was to discover the correlation between levels of knowledge and the rational use of paracetamol in self-medication done by the students of the Health Science Department in University of Muhammadiyah Malang. **Methods:** This study was an observational analysis using cross sectional method in which the sampling method employed purposive sampling method, and the instrument for this study was in a form of questionnaires. The study indicated that the students' knowledge related to the rational use of paracetamol in self-medication was as follows good 70% (61 students), quite good 26% (23 students), less good 4% (3 students), and there was no student who fell to "not good" category. The students with positive action (using paracetamol rationally) were 53% (46 students), while 47% (41 students) of them are with negative action (using paracetamol irrationally). **Results:** The result showed that spearman correlation with value of r -count higher than r -table ($0.301 > 0.213$) and significance value less than $\alpha = 0.05$ ($0.005 < 0.050$) with correlation coefficient value 0.301 (30%) indicated that the relationship between variables was low, but certainly existed. **Conclusion:** There was a correlation between the levels of knowledge and the rational use of paracetamol in self-medication practice in the students of Health Science Department at University of Muhammadiyah Malang.

Keyword: knowledge, behavior, action, self-medication, paracetamol

Abstrak

Pendahuluan: Obat yang paling umum digunakan untuk pengobatan sendiri yaitu parasetamol. Parasetamol digunakan untuk menghilangkan nyeri ringan sedang dan kondisi demam ringan. **Tujuan:** Mengetahui hubungan tingkat pengetahuan dengan penggunaan obat parasetamol yang rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan metode *cross sectional* dimana pengambilan sampel dilakukan dengan metode *purposive sampling* dan instrumen yang digunakan berupa kuisioner. Mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan baik tentang obat parasetamol sebesar 70% (61 orang), mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan cukup tentang obat parasetamol sebesar 26% (23 orang), mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan kurang tentang obat parasetamol sebesar 4% (3 orang) dan tidak ada mahasiswa yang berpengetahuan tidak baik. Mahasiswa dengan tindakan positif (penggunaan obat parasetamol rasional) sebesar 53% (46 orang) dan mahasiswa dengan tindakan negatif (penggunaan obat parasetamol tidak rasional) sebesar 47% (41 orang). **Hasil:** Hasil analisis korelasi *spearman* dengan nilai r hitung lebih besar daripada nilai r tabel ($0,301 > 0,213$) dan nilai signifikan kurang dari $\alpha = 0,05$ ($0,005 < 0,050$) dengan nilai koefisien korelasi 0,301 (30%) menunjukkan bahwa hubungan antar variabel rendah. **Kesimpulan:** Terdapat hubungan antara tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

Kata Kunci: pengetahuan, perilaku, tindakan, swamedikasi, parasetamol

PENDAHULUAN

Menurut *World Health Organization* (WHO) swamedikasi merupakan pemilihan dan penggunaan obat, baik obat modern maupun obat tradisional yang digunakan oleh seseorang untuk melindungi diri dari penyakit dan gejala penyakit yang lain. (WHO, 1998).

Swamedikasi memberikan kontribusi yang sangat besar bagi pemeliharaan kesehatan, namun bila tidak dilakukan secara benar justru menimbulkan sesuatu yang tidak diinginkan yaitu tidak sembuhya penyakit atau munculnya penyakit baru karena efek samping dari obat yang digunakan. Dalam melakukan swamedikasi yang aman, efektif dan terjangkau, masyarakat perlu memiliki bekal pengalaman dan keterampilan. Masyarakat mutlak memerlukan informasi yang jelas sumbernya dan terpercaya sehingga penentuan kebutuhan obat dapat diambil berdasarkan alasan yang rasional (Suryawati, 1997). Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik (BPS) (2014) tentang swamedikasi oleh penduduk di peroleh data dari tahun 2002 sampai dengan tahun 2014 untuk pengobatan modern sebesar 86,68% ; pengobatan tradisional 32,90% dan lain-lain 8,13 %. Hasil ini juga didukung oleh indikator kesehatan dari BPS yang mengatakan persentase penduduk yang mengobati sendiri sebesar 72,44% dan Persentase penduduk yang berobat jalan (pergi ke dokter) sebesar 38,21% pada tahun 2004. (Badan Pusat Statistik, 2016). Berdasarkan data tersebut membuktikan bahwa masyarakat sebagian besar lebih memilih untuk melakukan swamedikasi dibanding dengan berobat ke dokter.

Hasil penelitian Imtiaz, dkk. (2013) mengatakan bahwa dari 300 responden yang swamedikasi obat parasetamol menunjukkan persentase 83%, NSAID 67%, antibiotik 50%, vitamin 60%. Penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan obat parasetamol banyak digunakan.

Parasetamol (asetaminofen) merupakan obat bebas, obat dengan golongan ini termasuk obat yang relatif paling aman digunakan, karena dapat diperoleh tanpa resep dokter, selain di apotek dapat juga diperoleh di warung/toko terdekat dan pelayanan kesehatan lainnya. Obat bebas dalam kemasannya ditandai dengan lingkaran berwarna hijau (Depkes RI, 2007). Parasetamol digunakan untuk menghilangkan nyeri ringan sedang dan kondisi demam ringan. (Sweetman, 2009) Selain itu, parasetamol juga termasuk obat analgetik *non* narkotik yaitu memiliki cara kerja dengan menghambat sintesis prostaglandin terutama di Sistem Syaraf Pusat (SSP) (Darsono, 2002).

Pengetahuan berdasarkan konsep perilaku *Lawrence Green* (1980) ialah salah satu dari faktor predisposisi yang berpengaruh terhadap kesehatan seseorang. Pengetahuan/kognitif adalah domain yang sangat penting untuk terbentuknya tindakan seseorang (Notoatmodjo, 2010). Ada beberapa pengetahuan minimal terkait swamedikasi yang sebaiknya dipahami masyarakat, pengetahuan tersebut meliputi tentang mengenali gejala penyakit, memilih produk yang sesuai dengan indikasi dari penyakit, mengikuti petunjuk yang tertera pada etiket brosur obat, memantau hasil terapi dengan kemungkinan efek samping yang ada (Depkes RI, 2007).

Penelitian yang dilakukan oleh Febryery (2012) yaitu hubungan antara tingkat pengetahuan mahasiswa Farmasi di Universitas Muhammadiyah Surakarta terhadap tindakan swamedikasi, mendapatkan hasil katagori baik untuk pengetahuan yaitu sebesar 81%, serta untuk tindakan swamedikasi dengan kategori baik sebesar 73%.

Analisis kerationalan penggunaan obat menurut Lestari (2014), dapat dilihat dari 4T yaitu tepat indikasi penyakit, tepat obat, tepat pasien dan tepat dosis obat.

Melihat gambaran dari tingkat pengetahuan dan besarnya swamedikasi, maka perlu dilakukannya penelitian mengenai hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi, studi ini dilakukan pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

Penelitian ini dilakukan ini dengan dengan latar belakang mahasiswa yang sudah mengerti obat dalam dunia kesehatan yaitu mahasiswa Kedokteran, Farmasi, Fisioterapi, dan Perawat. Berdasarkan pengetahuannya mahasiswa selama ini sudah terbiasa melakukan swamedikasi.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik yaitu dengan pendekatan metode *cross sectional* dimana data yang terkait variabel terikat dikumpulkan dalam waktu yang bersamaan (Notoatmodjo, 2005).

Penelitian ini menggunakan Teknik *Sampling* yaitu *non-probability sampling (purposive sampling)*. Populasi dalam penelitian ini adalah semua mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang (yang meliputi mahasiswa Kedokteran, Farmasi, Perawat, dan Fisioterapi). Sampel yang didapat adalah 87 mahasiswa yang menggunakan obat parasetamol secara swamedikasi dan memenuhi kriteria inklusi yang telah ditentukan. Kriteria inklusi pada penelitian ini yaitu:

1. Mahasiswa/i yang menggunakan obat yang mengandung parasetamol untuk swamedikasi dengan dosis 325 - 650 mg sekali minum.
2. Mahasiswa/i yang pernah menggunakan obat yang mengandung parasetamol maksimal 1 bulan terakhir penggunaannya.
3. Mahasiswa/i kesehatan yang bersedia menjadi responden dan mengisi *informed consent* (Mahasiswa/i Universitas Muhammadiyah Malang angkatan 2013).

Lokasi dari penelitian ini adalah di kampus 2 Universitas Muhammadiyah Malang dan Rumah Sakit Pendidikan Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan Januari - Februari 2017.

Variabel Penelitian pada penelitian ini terdapat dua variabel yang akan diteliti, yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah tingkat pengetahuan mahasiswa kesehatan dalam swamedikasi obat parasetamol. Tingkat pengetahuan disini mencakup seberapa jauh mahasiswa mengetahui mengenai Tepat Dosis (Tepat Jumlah, Tepat Cara Pemberian, Tepat Interval Waktu Pemberian, Tepat Lama Pemberian), Efek Samping, Penyimpanan, Tepat

Tindak Lanjut. Kategori penilaian yaitu: Baik (76% - 100%), cukup baik (56% - 75%), kurang baik (40% - 55%), dan tidak baik (< 40%).

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa kesehatan. Penggunaan obat disini berarti mahasiswa telah melakukan tindakan penggunaan obat parasetamol sehingga dapat dilihat perilaku mahasiswa dalam meminum obat parasetamol dari cara penggunaan obat yang meliputi Tepat Indikasi Penyakit, Tepat Dosis (Tepat Jumlah, Tepat Cara Pemberian, Tepat Interval Waktu Pemberian, Tepat Lama Pemberian), Penyimpanan, Tepat Tindak Lanjut, Sehingga diperoleh dua kategori yaitu: Tindakan positif dan Tindakan negatif.

Instrumen Penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah kuesioner tertutup tentang pengetahuan dan kuesioner tindakan yang menggunakan skala *Likert*, dengan alasan akuratisasi data dalam penelitian. Instrumen tersebut dilakukan uji validitas dan reliabilitas sebelum disebar pada responden penelitian. Kisi-kisi instrumen yang akan dilakukan pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1 dan untuk defenisi operasional variabel dapat dilihat dalam Tabel 2.

Tabel 1. Kisi-kisi instrumen

Variabel Penelitian	Indikator	No. item
Tingkat pengetahuan mahasiswa dalam swamedikasi obat Parasetamol	1. Indikasi Penyakit	1
	2. Tepat Dosis	2,3,4,5
	a) Tepat Jumlah	
	b) Tepat Cara Pemberian	
	c) Tepat Interval Waktu Pemberian	
	d) Tepat Lama Pemberian	
	3. Efek Samping	6
	4. Penyimpanan	7
	5. Tepat Tindak Lanjut	8
Penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa	1. Tepat Indikasi Penyakit	1
	2. Tepat Dosis	2,3,4,5
	a) Tepat Jumlah	
	b) Tepat Cara Pemberian	
	c) Tepat Interval Waktu Pemberian	
	d) Tepat Lama Pemberian	
	3. Penyimpanan	6,7
	4. Tepat Tindak Lanjut	8

Tabel 2. Definisi operasional variabel

Variabel	Defenisi Operasional	Skala Data dan Alat Ukur	Kategori
Tingkat pengetahuan mahasiswa dalam swamedikasi obat Parasetamol	Tingkat pengetahuan mahasiswa tentang swamedikasi obat Parasetamol yang mencangkup : 1. Indikasi Penyakit 2. Tepat Dosis a) Tepat Jumlah b) Tepat Cara Pemberian c) Tepat Interval Waktu Pemberian d) Tepat Lama Pemberian 3. Efek Samping 4. Penyimpanan 5. Tepat Tindak Lanjut	Skala data : Ordinal (skala peringkat) Alat ukur : Kuesioner tingkat pengetahuan dengan pernyataan ya atau tidak	Dilakukan penilaian terhadap kuesioner. Hasil yang diperoleh dikelompokkan menjadi 4 kategori: 1. Baik 76 - 100 % 2. Cukup 56 - 75 % 3. Kurang 40 - 55 % 4. idak Baik < 40%
Penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa	Penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa dengan indikator berikut: 1. Tepat Indikasi Penyakit 2. Tepat Dosis a) Tepat Jumlah b) Tepat Cara Pemberian c) Tepat Interval Waktu Pemberian d) Tepat Lama Pemberian 3. Penyimpanan 4. Tepat Tindak Lanjut	Skala data : Nominal (skala label) Alat ukur : Kuesioner Penggunaan obat parasetamol rasional/Tindakan dengan skala likert	Dilakukan penilaian terhadap kuesioner. Hasil yang diperoleh dikelompokkan menjadi 2 kategori: 1. Tindakan positif bila skor – T ≥ mean T kelompok. 2. Tindakan negatif bila skor – T ≤ mean T kelompok.

Pengumpulan data

Data primer dalam penelitian ini digunakan kuesioner, dimana kuesioner menggunakan pertanyaan tertutup, secara tertulis dan sebelum melakukan pengumpulan data peneliti meminta persetujuan responden (*informed consent*) kemudian dilanjutkan dengan pengisian kuesioner.

Uji validitas dan reliabilitas

Uji validitas menggunakan rumus *Pearson Product Moment* (Arikunto, 2006). Berikut merupakan rumus *Pearson Product Moment* tersebut.

$$r_{xy} = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\{n \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

Kete

rangan :

r_{xy} = indeks korelasi antara dua belahan instrumen

n = jumlah butir pertanyaan

$\sum x$ = jumlah skor pada belah ganjil

$\sum y$ = jumlah skor pada belah genap

P-ISSN: 2406-9388

E-ISSN: 2580-8303

Dari analisis rumus diatas, dapat diketahui jika:

1. Bila r_{xy} hitung < r tabel maka kuesioner tersebut tidak valid.
2. Bila r_{xy} hitung > r tabel maka kuesioner tersebut valid.

Uji reliabilitas membutuhkan 30 responden untuk mencapai kurva normal. Uji reliabilitas yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan rumus *Alpha Cronbach*. Instrumen dinyatakan reliabel bila nilai $\alpha > 0,06$ atau sama dengan 1 (Sugiyono, 2009). Berikut merupakan rumus *Alpha Cronbach*.

$$r_{11} = \left[\frac{k}{k-1} \right] \left[1 - \frac{\sum \sigma_i^2}{\sigma_t^2} \right]$$

Keterangan :

r = reliabilitas instrument

k = banyaknya item yang ditanyakan/banyaknya pertanyaan

$\sum \sigma_i^2$ = jumlah varian butir atau item

σt^2 = varian total

Menurut Tirtion (2006), tingkat reliabelitas dengan metode *Alpha Cronbach* diukur berdasarkan skala Alpha 0 sampai 1, apabila skala tersebut dikelompokkan kedalam lima kelas dengan *range* yang sama, maka urutan kemantapan Alpha dapat diinterpretasikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Tingkat reliabilitas berdasarkan nilai alpha (Triton, 2006)

Alpha	Tingkat Reliabilitas
0.0 – 0.20	Kurang Reliabel
> 0.20 – 0.40	Agak Reliabel
> 0.40 – 0.60	Cukup Reliabel
> 0.60 – 0.80	Reliabel
> 0.80 – 1.00	Sangat Reliabel

Penilaian tingkat pengetahuan

Setiap satu item pertanyaan yang dijawab benar diberi skor 1 dan jika jawaban salah diberi skor 0, kemudian dimasukkan ke dalam rumus :

$$P = \frac{F}{n} \times 100\%$$

Keterangan :

- P = Nilai Persentase
- F = Jawaban Benar
- n = Jumlah soal

Penilaian tindakan (penggunaan obat parasetamol rasional)

Setiap item pertanyaan yang dijawab diberi skor mulai dari 1 sampai 4. Jumlah nilai kemudian dimasukkan ke dalam skala model Likert :

$$T = 50 + 10 \left[\frac{x - \bar{X}}{s} \right]$$

Keterangan :

- X : skor responden pada skala sikap yang akan diubah menjadi skor T
- \bar{X} : mean skor kelompok

s : standar deviasi kelompok

Analisa data

Setelah data diolah, maka data akan dianalisa dengan metode *spearman test* ($\alpha = 0.05$) dengan menggunakan bantuan program *Statistical Product for Service Solution (SPSS) ver. 18 for Windows*. Hasil data yang akan dianalisa dengan metode *spearman* dengan menggunakan program komputer *SPSS (Statistical Product Service Solution) ver.18* dengan interval kepercayaan 95%. Berikut merupakan rumusan hipotesa yang digunakan.

H_0 = Tidak ada hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

H_1 = Ada hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

Dari hasil analisa data diatas dapat diketahui jika:

- 1 Jika $sig > 0,05$ maka H_0 diterima sedang H_1 ditolak, artinya tidak ada hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi.
- 2 Jika $sig < 0,05$ maka H_0 ditolak sedang H_1 diterima, artinya ada hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi

Hasil analisis akan diperoleh nilai koefisien korelasi. Koefisien korelasi ialah pengukuran statistik kovarian atau asosiasi antara dua variabel. Koefisien korelasi menunjukkan kekuatan (strength) hubungan linear dan arah hubungan dua variabel acak. Secara umum koefisien korelasi dilambangkan dengan “r”. Untuk menentukan keeratan hubungan atau korelasi antar variabel, maka diberikan nilai-nilai dari koefisien korelasi (r) pada Tabel 4 (Hasan, 2006).

Tabel 4. Interval nilai koefisien korelasi dan kekuatan hubungan (Hasan, 2006)

No.	Interval Nilai	Kekuatan Hubungan
1.	$ r = 0$	Tidak terdapat korelasi
2.	$0,00 < r \leq 0,20$	Sangat rendah atau lemah sekali
3.	$0,20 < r \leq 0,40$	Rendah atau lemah tapi pasti
4.	$0,40 < r \leq 0,70$	Cukup berarti atau sedang
5.	$0,70 < r \leq 0,90$	Tinggi atau kuat
6.	$0,90 < r \leq 0,100$	Sangat tinggi atau kuat sekali
7.	$ r = 1,00$	Sempurna

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kategori tingkat pengetahuan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi

Berdasarkan Tabel 5 mahasiswa yang pengetahuannya Baik sebanyak 61 orang (70%), mahasiswa yang pengetahuannya Cukup sebanyak 23 orang (26%), mahasiswa dengan pengetahuan Kurang sebanyak 3 orang (3%), dan mahasiswa dengan pengetahuan Tidak Baik tidak ada (0%).

Tabel 5. Kategori tingkat pengetahuan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi

Pengetahuan	Frekuensi (orang)	Persentase (%)
Baik	61	70%
Cukup	23	26%
Kurang	3	3%
Tidak Baik	0	0%
Total	87	100%

Kategori tindakan (penggunaan obat parasetamol rasional)

Berdasarkan Tabel 6 mahasiswa dengan tindakan positif (Penggunaan Obat Parasetamol Rasional) sebanyak 46 orang (53%) dan mahasiswa dengan tindakan negatif (Penggunaan Obat Parasetamol tidak Rasional) sebanyak 41 orang (47%).

Tabel 6. Kategori tindakan (penggunaan obat parasetamol rasional)

Tindakan	Frekuensi (orang)	Persentase (%)
Positif	46	53%
Negatif	41	47%
Total	87	100%

Uji korelasi spearman

Hasil uji *Spearman* hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang dapat dilihat di Tabel 7.

Tabel 7. Hasil uji korelasi spearman

<i>r</i> hitung	<i>Sig</i>	<i>r</i> tabel (df = 85, $\alpha = 0,05$)	Keputusan
0,301	0,005	0,213	H1 Diterima

Nilai *r* hitung yang di dapat lebih besar daripada nilai *r* tabel yaitu $0,301 > 0,213$, dan selain itu nilai signifikansi kurang dari $\alpha = 0,05$ ($0,005 < 0,050$) sehingga dapat dinyatakan bahwa H_1 diterima. Berdasarkan pengujian ini dapat dinyatakan bahwa ada hubungan tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada

mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Koefisien korelasi positif mengindikasikan bahwa terdapat hubungan yang positif antara tingkat pengetahuan dengan perilaku swamedikasi obat. Dengan kata lain, semakin baik pengetahuan mahasiswa tentang swamedikasi obat parasetamol maka semakin positif tindakan atau penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang.

Analisa data *crosstabs*

Hasil analisis SPSS *ver. 18 for Windows* dengan *Crosstabs* untuk penyajian data tingkat pengetahuan dan tindakan (penggunaan obat parasetamol rasional) dalam swamedikasi pada Mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang dapat dilihat di Tabel 8.

Tabel 8. *Crosstabs* tingkat pengetahuan dan tindakan

Pengetahuan		Tindakan		Total
		positif	negatif	
baik	Jumlah	38	23	61
	% Total	43.7%	26.4%	70.1%
cukup	Jumlah	8	15	23
	% Total	9.2%	17.2%	26.4%
kurang	Jumlah	0	3	3
	% Total	.0%	3.4%	3.4%
Total	Jumlah	46	41	87
	% Total	52.9%	47.1%	100.0%

Berdasarkan Tabel 8 diketahui bahwa mahasiswa dengan pengetahuan baik sebanyak 61 orang (38 orang dengan tindakan positif dan 23 orang dengan tindakan negatif pada penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi), mahasiswa dengan pengetahuan cukup sebanyak 23 orang (8 orang dengan tindakan positif dan 15 orang dengan tindakan negatif pada penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi), dan mahasiswa dengan pengetahuan kurang sebanyak 3 orang (3 orang dengan tindakan negatif dan tidak ada mahasiswa dengan tindakan yang positif pada penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi). Jadi total mahasiswa dengan tindakan positif pada penggunaan obat parasetamol dalam swamedikasi sebanyak 46 orang dan mahasiswa dengan tindakan negatif pada penggunaan obat parasetamol dalam swamedikasi sebanyak 41 orang.

KESIMPULAN

Berdasarkan data dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh penulis dapat disimpulkan bahwa :

1. Mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan

baik tentang obat parasetamol sebesar 70% (61 orang), Mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan cukup tentang obat parasetamol sebesar 26% (23 orang), Mahasiswa yang memiliki tingkat pengetahuan kurang tentang obat parasetamol sebesar 4% (3 orang) dan tidak ada mahasiswa yang berpengetahuan tidak baik.

2. Mahasiswa dengan tindakan positif (penggunaan obat parasetamol rasional) sebesar 53% (46 orang) dan mahasiswa dengan tindakan negatif (penggunaan obat parasetamol tidak rasional) sebesar 47% (41 orang).
3. Terdapat hubungan antara tingkat pengetahuan terhadap penggunaan obat parasetamol rasional dalam swamedikasi pada mahasiswa Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Hasil analisis korelasi *spearman* dengan nilai r hitung lebih besar daripada nilai r tabel ($0,301 > 0,213$) dan nilai signifikan kurang dari $\alpha = 0,05$ ($0,005 < 0,050$). Nilai koefisien korelasi 0,301 (30%) menunjukkan bahwa hubungan antar variabel rendah.

DAFTAR PUSTAKA

- Arikunto, S. (2006). *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek*, Edisi VI. Jakarta: PT Rineka Cipta.
- Badan Pusat Statistik. (2014). *Persentase Penduduk yang Mengobati Sendiri Selama Sebulan Terakhir Menurut Provinsi dan Jenis Obat yang Digunakan, 2000-2014*. <http://www.bps.go.id/>. Accessed: 24 April 2016.
- Badan Pusat Statistik. (2015). *Indikator kesehatan 1995-2015*. <http://www.bps.go.id/>. Accessed: 24 April 2016.
- Darsono, L. (2002). *Diagnosis dan Terapi Intoksikasi Salisilat dan Parasetamol*. *Jurnal Kedokteran Maranatha*; 2; 30-38.
- Departemen Kesehatan RI (Depkes RI). (2007). *Pedoman Penggunaan Obat Bebas dan Bebas Terbatas*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Febryery, L. C. (2012). *Evaluasi Hubungan Tingkat Pengetahuan Mahasiswa Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta terhadap Tindakan Swamedikasi Acne Vulgaris*. Skripsi; Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Hasan, I. (2006). *Analisis Data Penelitian dengan Statistik*. Jakarta: Bumi Aksara.
- Imtiaz, S., Salam, N. A., Kamran. (2013). *Conditions, Frequencies, and Sociodemographic Factors Leading Self Medication Practice in Sargodha Area of Punjab Pakistan*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 5; 819-826.
- Lestari, Y. P. (2014). *Swamedikasi Penyakit Maag pada mahasiswa Bidang Kesehatan di Universitas Muhammadiyah Surakarta*. Skripsi; Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah, Surakarta.
- Notoatmodjo, S. (2005). *Metodelogi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Notoatmodjo, S. (2010). *Ilmu Perilaku Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Sugiyono. (2009). *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: CV Alfabeta.
- Suryawati, S. (1997). *Menuju Swamedikasi yang Rasional*. Jogjakarta: Pusat Studi Farmakologi Klinik dan Kebijakan Obat Universitas Gadjah Mada.
- Sweetman, S. C. (2009). *Martindale the Complete Drug Reference 36th ed.* London: Pharmaceutical Press.
- Triton, B. P. (2006). *SPSS 1.3.0 Terapan; Riset Statistik Parametrik*. Yogyakarta: CV Andi Offset.
- WHO. (1998). *The Role of the Pharmacist in Self-Care and Self-Medication*. Netherlands: WHO.

Efek Kondisi Lingkungan Kultur terhadap Produksi Amilase Termotabil oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 Tanah Api Kayangan Bojonegoro Jawa Timur

Achmad Toto Poernomo*, Isnaeni

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: achmad.toto.p@gmail.com

Abstract

Background: Amylase production has been investigated using bacteria isolated from soil Api Kayangan Bojonegoro, East Java. **Objectives:** **Objective:** This study aimed to isolate and identify the bacteria and investigate the effects of culture conditions on amylase activity. **Methods:** The bacteria were cultured in media containing soluble starch as carbon source. The addition of calcium (15 mM) or yeast extract (0.5%) and peptone (2%) to the media and the starch dissolved minerals will reduce the time lag phase and extend the growth and production of amylase. Glucose added to the culture reducing the production of amylase, so that the effect of glucose on these organisms. **Results:** Initial pH media and optimum temperature on amylase production by organisms respectively 7.0 and 50°C. The optimal temperature and pH for the activity of each 50°C and 6.0. Enzyme solution retained 100% activity when incubated at 90°C for one hour and 40% at 60°C for 24 hours. **Conclusion:** Glucose in the culture will decrease the production of amylase.

Keywords: amylase, thermophilic bacterium, thermostable enzyme, *Bacillus sphaericus* ak-1

Abstrak

Pendahuluan: Produksi amilase telah diteliti menggunakan bakteri yang diisolasi dari tanah Api Kayangan Bojonegoro Jawa Timur. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan identifikasi bakteri dan mengetahui efek kondisi kultur pada aktivitas amilase. **Metode:** Bakteri dikulturkan pada media yang mengandung pati terlarut sebagai sumber karbon tunggal. Penambahan kalsium (15 mM) atau ekstrak yeast (0,5%) dan pepton (2%) ke media pati terlarut dan mineral akan mengurangi waktu fase lag dan memperpanjang pertumbuhan dan produksi amilase. Pemberian glukosa pada kultur mengurangi produksi amilase, sehingga menunjukkan bahwa efek glukosa berpengaruh pada organisme ini. **Hasil:** pH media awal dan suhu optimum pada produksi amilase oleh organisme masing-masing 7,0 dan 50°C. Suhu dan pH optimal untuk aktivitas masing-masing 50°C dan 6,0. Larutan enzim dipertahankan aktivitasnya 100% saat diinkubasi pada suhu 90°C selama satu jam dan 40% pada suhu 60°C selama 24 jam. **Kesimpulan:** Pemberian glukosa pada kultur akan menurunkan produksi amilase.

Kata kunci: amilase, bakteri termofilik, enzim termotabil, *Bacillus sphaericus* Ak-1

PENDAHULUAN

Penemuan enzim pendegradasi pati telah menjadikan peningkatan aplikasi amilase dalam berbagai proses industri (Zaferanloo dkk., 2013). Amilase (1,4- α -D-glukan glukonohi drolase, EC 3.2.1.1) menghidrolisis ikatan α -1,4 glukosidik pada pati sebagai substrat amilase (Tymoczko dkk., 2013; Voet dkk., 2013). Amilase secara komersial memiliki aplikasi yang luas pada pembuatan minuman, industri tekstil, dan kertas serta deterjen (Zaferanloo dkk.,

2013). Termotabilitas memegang peranan penting pada industri dan mikroorganisme termofilik sebagai sumber enzim termotabil baru. Penelitian terbaru bahwa amilase termotabil dapat dihasilkan dari mikroorganisme yang mempunyai sifat termofilik dan ekstratermofilik dan sedikit yang diketahui tentang sifat-sifat enzim yang dihasilkan oleh organisme ini. Penelitian ini berhubungan dengan isolasi dan identifikasi bakteri serta menggambarkan efek dari kondisi kultur pada aktivitas amilase.

BAHAN DAN METODE

Kultur media

Cawan petri agar A terdiri dari 2,0% *Bacto-tryptone*, 2,0% ekstrak *Bacto-yeast*, 2,0% NaCl dan 2% agar pada pH 7,0. Ini digunakan untuk seleksi bakteri termofilik.

Cawan petri agar B yang terdiri 2% pati terlarut, 0,2% ekstrak yeast, 0,5% pepton, 0,1% MgSO₄, 0,1% NaCl, 0,025% CaCl₂ dan agar 3% pada pH 7,0. Ini digunakan untuk skrining bakteri yang mampu menghasilkan amilase.

Media cair untuk produksi enzim (g/L): 10,0 pati terlarut, 1,56 NaH₂PO₄·2H₂O, 5,35 NH₄Cl, 0,745 KCl, 0,64 Na₂ SO₄·10H₂O, 0,42 asam sitrat, 0,25 MgCl₂·6H₂O, 2,0x10⁻³ CaCl₂, 2,0x10⁻³ ZnO, 2,5x10⁻² FeCl₃·6H₂O, 1,5 x 10⁻² MnCl₂·4H₂O, 8,0x10⁻⁴ CuCl₂·2H₂O, 2,5x10⁻³ CoCl₂·6H₂O, 2,0x10⁻⁴ NiCl₂·6H₂O, 2,0x10⁻⁴ H₃BO₄, 1,5 x 10⁻³ Na₂Mo₄ dan 1,0x10⁻³ Biotin. pH diatur 7,2 dan media disterilkan dengan autoklaf pada 121°C, 15 psi selama 30 menit.

Isolasi dan determinasi bakteri termofilik yang memproduksi amilase

Suspensi tanah Api Kayangan dalam akuades steril suhu 60°C, dituangkan dan disebar ke cawan petri agar A. Cawan ini diinkubasi pada suhu 55°C selama 48 jam. Koloni yang ditemukan dipindahkan ke cawan petri agar B. Cawan petri ini diinkubasi pada 55°C selama 48 jam. Beberapa koloni bakteri yang memproduksi amilase dipilih setelah cawan petri dituangkan dengan larutan yodium. Strain yang menghasilkan amilase paling tinggi dipilih untuk uji lebih lanjut. Dilakukan karakterisasi fisiologi secara biokimia dan hasilnya akan di determinasi dengan acuan buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, dan diketahui genus dan spesies dari bakteri tersebut.

Kondisi lingkungan kultur

Bakteri akan tumbuh pada cawan petri agar B, seperti yang dijelaskan oleh Mukesh dkk. (2012), dan cawan petri diinkubasi pada suhu 55°C selama 18 jam. Media cair (sekitar 5 mL) dipipet ke dalam cawan petri agar B dan sel-sel diambil menggunakan pipet Pasteur steril. Media cair (sebanyak 50 mL dalam labu Erlenmeyer ca 250 mL) diinokulasi dengan suspensi ini untuk memberikan transmitan 25% pada 470 nm dan inokulum diinkubasi pada 50° C dengan aerasi yang kuat dalam *shaker incubator* kecepatan 250 rpm selama 96 jam. Sebelum uji, sel-sel dipisahkan dengan sentrifugasi 10000 rpm. Supernatan yang jernih

digunakan untuk preparasi enzim kasar. Perlakuan untuk mengetahui pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan bakteri dan produksi amilase dilakukan pada suhu yang bervariasi dari 30° C hingga 60° C, dan pada berbagai nilai pH yang bervariasi 4,0 - 9,0 selama 40 jam.

Berat sel kering

Berat sel kering ditentukan dengan menggunakan metode Srekanth dkk. (Srekanth dkk., 2013). Lima mL Sampel (replikasi 3 kali) disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit dan dicuci sekali dalam akuades steril. Sel-sel disuspensikan kembali dalam akuades steril (2 mL) dan dituangkan ke dalam tabung sebelum ditimbang. Tambahan akuades steril (2x2 mL) untuk memastikan bahwa semua sel yang tersisa dicuci sudah keluar dari tabung. Dikeringkan sampai berat konstan dalam oven pada suhu 105° C. Tabung didinginkan dalam desikator dan ditimbang pada neraca analitik.

Prosedur analisis enzim

Uji amilase didasarkan pada pengurangan intensitas warna biru yang dihasilkan dari hidrolisis amilase pada substrat pati (Shaw dkk., 1995). Reaksi yang terkandung enzim 1 mL (sel bebas supernatan) dan 10 mL larutan kanji 1% diinkubasi pada 50°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 10 mL 0,1 N HCl. Satu mililiter larutan ini ditambahkan ke 10 mL 0,1 N HCl. Dari 1 mL ini ditambahkan ke 10 mL larutan yodium (0,05% yodium dalam 0,5% KI). Kerapatan optik (OD) larutan berwarna biru ditentukan pada panjang gelombang 660 nm. Prosedur yang sama diulangi menggunakan akuades 1 mL sebagai blanko. Satu unit aktivitas amilase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengurangan 1% dari intensitas warna biru larutan pati-yodium pada suhu 50° C dalam 1 menit.

Pengaruh suhu pada aktivitas amilase

Profil aktivitas amilase diperoleh dengan mengukur aktivitas amilase dalam 0,1 M dapar asam sitrat-natrium fosfat, antara suhu 30° C dan 90 ° C. Dan pH 6,0,

Pengaruh pH pada aktivitas amilase

Pengaruh pH pada aktivitas amilase diukur pada suhu 50° C dalam larutan dapar yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

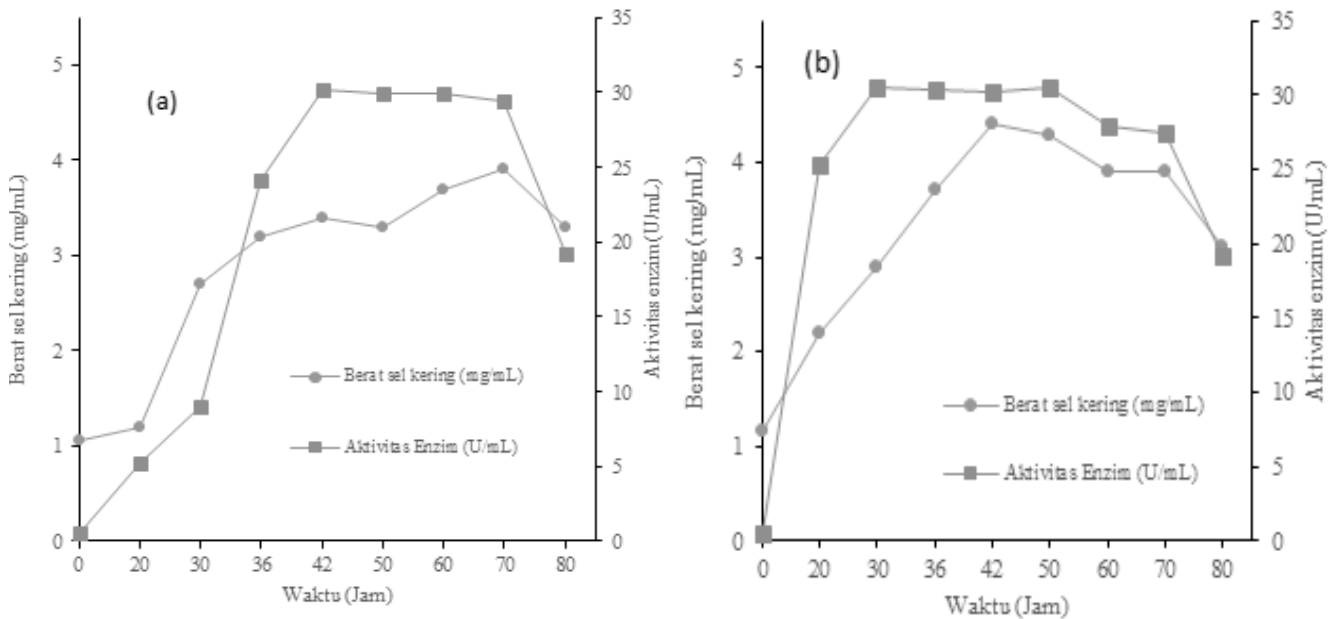
Isolasi dan determinasi bakteri termofilik yang memproduksi amilase

Strain basil Gram-positif, negatif pada tes Voges-Proskauer (pada pH 7,2), dan anaerob fakultatif. Motil aktif, panjang 2,5 - 3,0 um dan lebar sekitar 0,6 um, dengan spora terpusat dan didominasi sporangia silinder yang kecil. strain memiliki kemampuan untuk menghidrolisis baik pati dan gelatin. Katalase positif. Indole tidak dibentuk, dan pembentukan asetoin positif. Nitrat berubah menjadi nitrit. pH akhir setelah pertumbuhan pada larutan glukosa sekitar 5,5 dan pertumbuhan diperoleh dalam larutan nutrisi yang mengandung 7% NaCl. Sel akan tumbuh dalam nutrisi broth pada 30° C hingga 60° C dan optimum pada suhu 50° C selama 24 jam. Dari hasil ini, strain

diidentifikasi sebagai *Bacillus sphaericus* dengan kriteria yang dicantumkan *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Produksi enzim

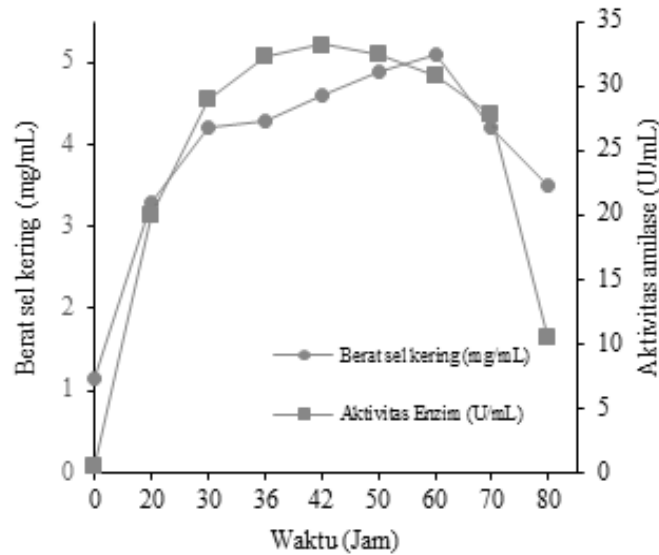
Pengukuran aktivitas amilase dan pertumbuhan sel *Bacillus sphaericus* di sejumlah interval waktu ditunjukkan pada Gambar 1. Awalnya, organisme ditumbuhkan dalam media cair (Gambar 1a) lalu, di media cair ditambah dengan garam kalsium (15 mM) (Gambar. 1b). Penambahan garam kalsium ke media cair dapat meningkatkan pertumbuhan dan produksi amilase. Karena enzim ini dikenal sebagai metalloenzim kalsium, ada kemungkinan hasil yang ditemukan adalah karena semakin tersedianya ion kalsium. Hasil ini mirip dengan temuan (Saha dkk., 2014), dengan kultur *Bacillus amyloliquefaciens*.



Gambar 1. Waktu pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 dalam media cair (a) dan dalam media cair ditambah dengan kalsium (b).

Produksi amilase oleh beberapa mikroorganisme telah berkaitan dengan ada tidaknya berbagai asam amino dan sumber nitrogen kompleks dalam media kultur (Saha dkk., 2014; Mukesh dkk., 2012). Pada

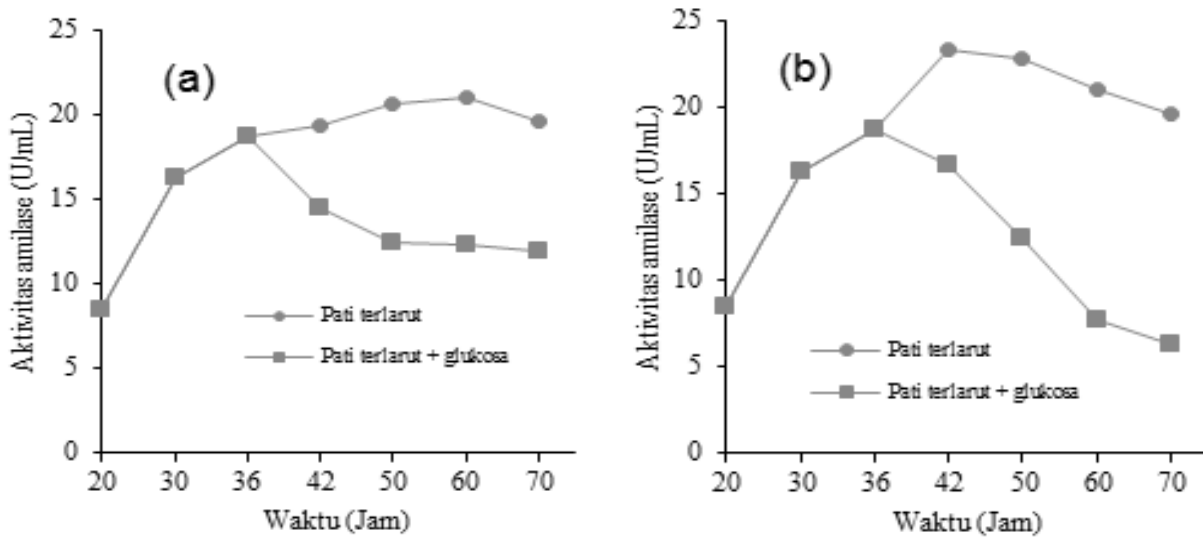
penambahan ekstrak yeast (0,5%) dan pepton (2%) pada media cair akan memperpendek fase lag dan dapat meningkatkan baik berat kering sel dan produksi enzim (Gambar. 2).



Gambar 2. Waktu pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus sphaericus* AK-1 dalam media cair yang ditambah ekstrak yeast dan pepton

Oleh karena itu, hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak yeast dan pepton disukai untuk pertumbuhan dan produksi amilase oleh bakteri ini. Telah dilaporkan bahwa produksi enzim pendegradasi karbohidrat di sebagian besar spesies genus *Bacillus* mengikuti

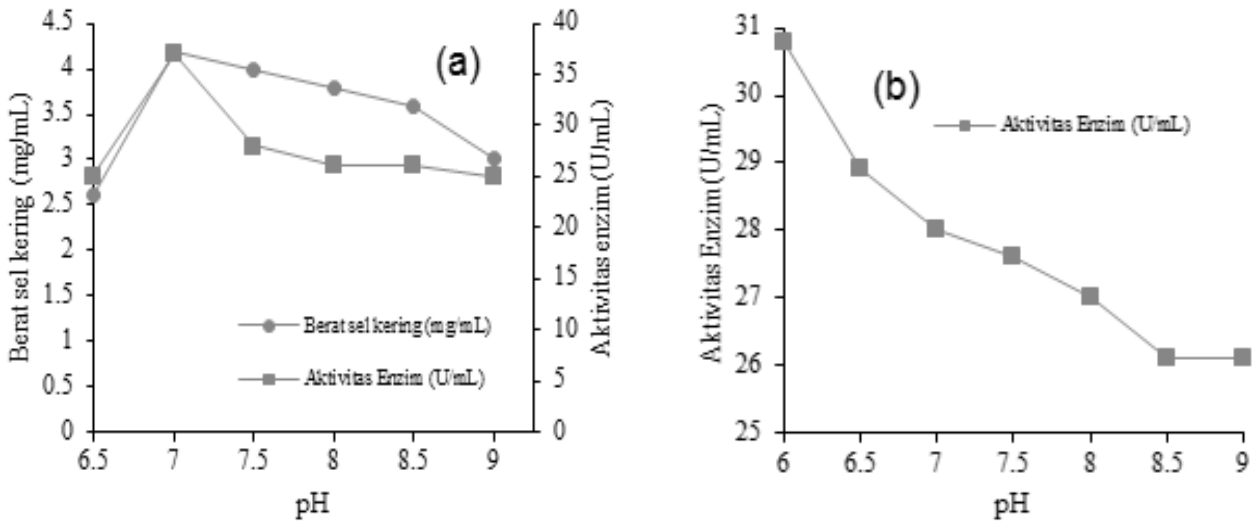
represi katabolik oleh substrat seperti glukosa (Santos dkk., 2003). Hasil ini sesuai dengan hasil penelitian tersebut. Penambahan glukosa (0,5%) pada kultur dapat menurunkan produksi amilase (Gambar. 3).



Gambar 3. Penekanan glukosa pada produksi amilase, sel tumbuh pada media cair dengan 0,5% (a) dan 1,0% (b) pati terlarut

Hasil ini mirip dengan temuan Sivakumar dkk. (Sivakumar dkk., 2012; Bini dkk., 2002), yang mengamati bahwa glukosa menekan produksi amilase pada *Bacillus cereus* dan archaeon hipertermofilik *Sulfolobus solfataricus*. Dikatakan bahwa glukosa

mencegah ekspresi gen amilase dan bukan hanya sekresi enzim yang terbentuk sebelumnya. Organisme tidak tumbuh pada media kultur yang telah diatur dengan pH 4.0, 5.0, 6.0 dan 10.0 (Gambar.4).

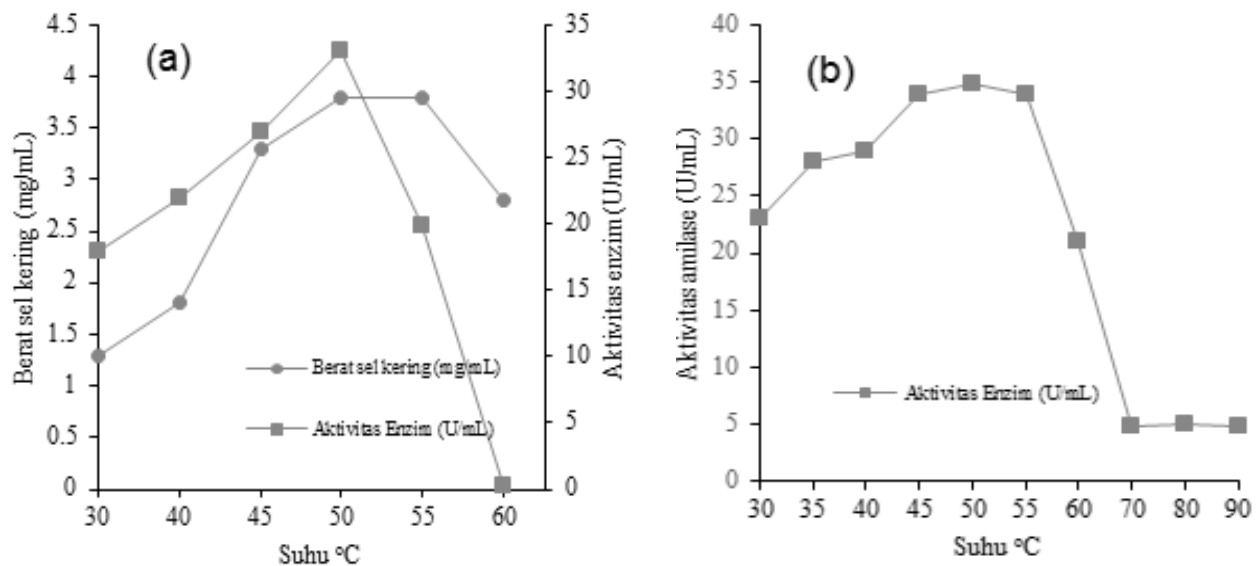


Gambar 4. Pengaruh pH awal medium kultur pada pertumbuhan dan produksi amilase oleh *Bacillus* AK-1 (a) dan pengaruh pH terhadap aktivitas amilase pada suhu 50 ° C (b)

Pada media dimana pertumbuhan bakteri terjadi, pH meningkat setelah 18 jam fermentasi, dan tidak pernah mencapai nilai lebih besar dari 9,0. Aktivitas amilase meningkat selama 72 jam inkubasi pada semua nilai pH. Hasil ini menunjukkan bahwa ada stimulasi sintesis enzim pada pH 7,0 dan bahwa produksi enzim yang lebih tinggi pada pH ini adalah hasil pertumbuhan sel yang meningkat. pH optimum untuk aktivitas amilase adalah antara 6,0 dan 6,5. Ada hampir 73% penurunan aktivitas maksimum pada pH 8,5 atau 9,0.

Genus *Bacillus* dapat menghasilkan enzim dengan aktivitas optimal pada nilai pH serendah 3,5 atau setinggi 10,6 (Dutta dkk., 2006). Pertumbuhan dan

produksi enzim keduanya meningkat dengan suhu di kisaran 30°C hingga 50°C dengan optimal pada suhu 50°C (Gambar. 5a). Dengan demikian, hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu optimum untuk produksi amilase dan pertumbuhan bakteri adalah sama. Peneliti lain juga melaporkan bahwa produksi amilase maksimum terjadi pada suhu pertumbuhan optimum (Saha dkk., 2014). Suhu optimum aktivitas amilase adalah antara 45°C dan 55°C. Penurunan aktivitas amilase diamati pada nilai di atas 60°C (Gambar. 5b).

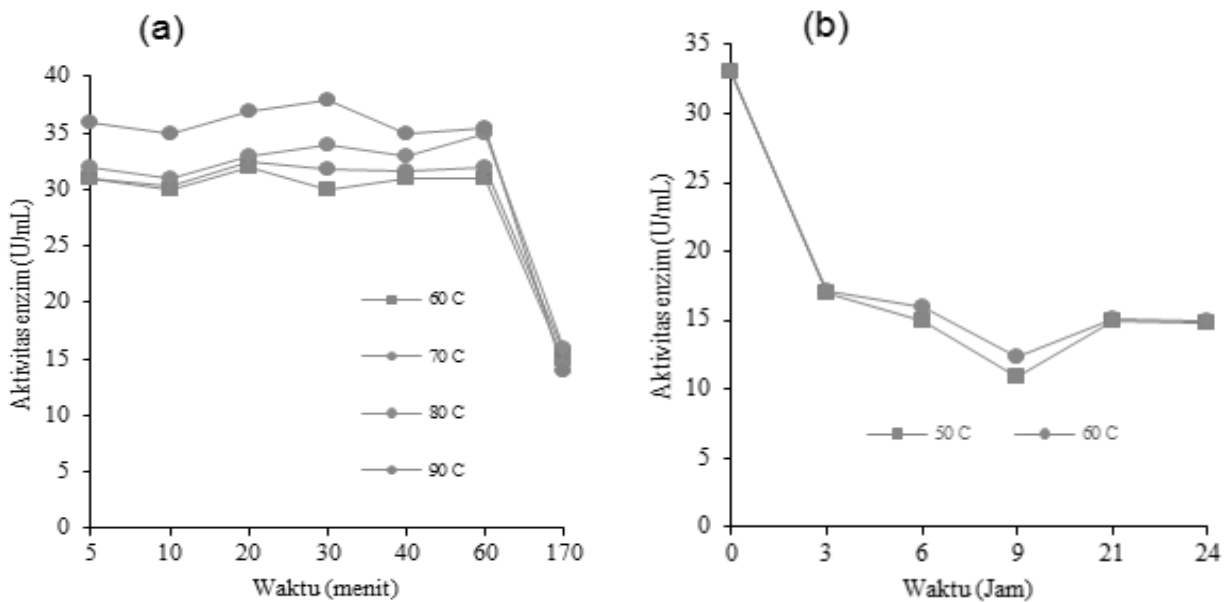


Gambar 5. Pengaruh suhu pada pertumbuhan dan produksi amilase *Bacillus sphaericus* AK-1 (a) dan pengaruh suhu terhadap aktivitas amilase (b)

Menurut hasil penelitian, kondisi yang optimal untuk pertumbuhan sel cukup memadai untuk produksi amilase. Hasil ini berbeda dengan penelitian Alberto dkk. (2002) untuk *Bacillus licheniformis*. Mikroorganisme ini tidak menghasilkan amilase pada 30° C meskipun tumbuh dengan baik pada suhu ini. Selain itu, (Saha dkk., (2014), mempelajari *B. amyloliquefaciens* yang menghasilkan amilase pada suhu sekitar 50° C dan tidak pernah menghasilkan enzim pada suhu lebih rendah dari 45°C (Alberto dkk. 2002). Ekstrak kasar enzim aktivitasnya dipertahankan

100% saat diinkubasi selama satu jam pada suhu 90°C (Gambar. 6a).

Setelah waktu ini aktivitasnya menurun drastis. Setelah 24 jam pada suhu 50°C dan 60°C, enzim dipertahankan 65% dan 62% dari aktivitas awalnya (Gambar. 6b) dan tidak aktif pada inkubasi suhu 95°C selama 10 menit. Stabilitas suhu amilase dari *Bacillus licheniformis* 584 telah dilaporkan oleh Saito (1973). Enzim ini cepat kehilangan aktivitas pada suhu di atas 76° C. Menurut hasil yang disajikan dalam artikel ini, amilase dari *Bacillus sphaericus* AK-1, bersifat thermo stabil.



Gambar 6 Pengaruh suhu pada stabilitas amilase diuji dengan rentang waktu sampai dengan 170 menit (a) rentang waktu sampai dengan 24 jam (b).

KESIMPULAN

pH media awal dan suhu optimum pada produksi amilase oleh organisme masing-masing 7,0 dan 50° C. Suhu dan pH optimal untuk aktivitas masing-masing 50°C dan 6,0. Larutan enzim dipertahankan aktivitasnya 100% saat diinkubasi pada suhu 90°C selama satu jam dan 40% pada suhu 60°C selama 24 jam. Pemberian glukosa pada kultur akan menurunkan produksi amilase.

DAFTAR PUSTAKA

Alberto, C., Cordeiro, M., Lelis, M., Martins, L. & Luciano, A. B. (2002). Production and Properties Of α -Amylase from Thermophilic Bacillus Sp. *Brazilian Journal of Microbiology*; 33; 57–61.
 Bini, E., Dikshit, V., Dirksen, K., Drozda, M. & Blum, P. (2002). Stability of mRNA in the Hyperthermophilic Archaeon Sulfolobus

Solfataricus. *RNA (New York, N.Y.)*; 8; 1129–1136.
 Dutta, T. K., Jana, M., Pahari, P. R. & Bhattacharya, T. (2006). The Effect of Temperature, pH, and Salt on Amylase in *Heliodyptomus viduus* (Gurney) (Crustacea: Copepoda: Calanoida). *Turkish Journal of Zoology*; 30; 187–195.
 Mukesh, K., Andal, P., Suresh, K., Saranya, G., Rajendran, K. & Kalaichelvan, P. (2012). Production, Purification and Characterization of α -Amylase and Alkaline Protease by Bacillus sp . HPE 10 in a Concomitant Production Medium. *Pelagia Research Library*; 2; 376–382.
 Saha, K., Maity, S., Roy, S., Pahan, K., Pathak, R., Majumdar, S. & Gupta, S. (2014). Optimization of Amylase Production from *B. amyloliquefaciens* (MTCC 1270) using Solid State Fermentation. *International Journal of Microbiology*; 2014; 1-7.
 Saito, N. (1973). Thermophilic Extracellular Alfa-

- Amylase from *Bacillus licheniformis*. *Arch Biochem Biophys*; 155; 290–298.
- Santos, E. D. O., Lelis, M. & Martins, L. (2003). Effect of the Medium Composition on Formation of Amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Archives Of Biology Technology*; 46; 129-134.
- Shaw, J., Lin, F., Chen, S. & Chen, H. (1995). Purification and Properties of an Extracellular α -Amylase from *Thermus* sp. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*; 36; 195-200.
- Sivakumar, T., Shankar, T., Vijayabaskar, P., Muthukumar, J. & Nagendrakanna, E. (2012). Amylase Production using *Bacillus cereus* Isolated from a Vermicompost Site. *International Journal of Microbiological Research*; 10; 55–64.
- Sreekanth, M. S., Vijayendra, S. V. N., Joshi, G. J. & Shamala, T. R. (2013). Effect of Carbon and Nitrogen Sources on Simultaneous Production of Alpha-Amylase and Green Food Packaging Polymer by *Bacillus* sp. CFR 67. *Journal of Food Science and Technology*; 50; 404–408.
- Tymoczko, J. L., Berg, J. M. & Stryer, L. (2013). *Biochemistry A Short Course* (Third Ed.). New York: Kate Ahr Parker W. H. Freeman and Company 41 Madison.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of Biochemistry Life at the Molecular* (fourth). John Wiley & Sons, Inc.
- Zaferanloo, B., Virkar, A., Mahon, P. J. & Palombo, E. A. (2013). Endophytes from an Australian Native Plant are a Promising Source of Industrially Useful Enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 29; 335–345.

Validation of Thin-Layer Chromatography-Bioautographic Method for Determination of Streptomycin

Isnaeni*, Andri Astuti, Muhammad Yuwono
Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

*Corresponding author: isna.yudi@gmail.com

Abstract

Background: A simple bio-assay for determination of streptomycin hyphenated with planar chromatography techniques was developed. **Objective:** This study aims to validate the method for identification and determination of streptomycin in injection preparations with TLC-bioautography. **Methods:** Thin Layer Chromatography (TLC) was performed on the silica Gel GF-254 using KH_2PO_4 solution as mobile solvent. The visualization was performed by spraying 2% resorcinol. Direct bi autography was developed using *Escherichia coli* ATCC 25922 as a bacterial test, grown on the nutrient agar medium at 37°C for 24 hours. The method was validated corresponding to linearity, limit of detection (LOD), intra day precision, and accuracy parameters. The accuracy was measured using streptomycin injection as a sample. **Results:** The Results showed that the KH_2PO_4 solution at 7.5% concentration was found to be the optimized solvent with Rf value of 0.5. The linear equation was $y = 10.176x + 4.046$ at 150 - 350 µg/mL concentration range with the linearity coefficient, Limit of Detection, accuracy, and variation coefficient were 0.9907; 40 ppm; $96.37 \pm 2.22\%$ (with an RSD value of 2.31%); and 1.63 respectively. **Conclusion:** The prospective TLC-bioautographic method was applied for the identification and determination of streptomycin in a preparation using a single eluent KH_2PO_4 . The eluent system optimization remains necessary for the identification and determination of the mixture of streptomycin with other antibiotics, such as aminoglycoside groups.

Keywords: validation, TLC-bioautography, streptomycin

INTRODUCTION

TLC-bioautography is a method consisted of chromatographic separation and biological activity determination (Choma, 2005). The method is widely applied for detection of antimicrobial (Choma & Edyta, 2011), antioxidant (Marston, 2011; Cheng & Wu, 2013) and enzyme inhibitory activities (Gu *et al.*, 2015). The TLC-bioautography of antimicrobial substances was performed based on the detection of compound in the chromatogram by using microorganisms as an indicator. Clear zone on the spot position indicates antimicrobial activity of the substances. Validation of the TLC-bioautography method with characteristic parameters namely selectivity, sensitivity, linearity, precision, recovery, and stability is performed by optimizing factors affected the analysis results such as plate type, time and temperature of incubation. The TLC-bioautography method of commonly used for bioactivity screening purposed in natural products (Choma & Edyta, 2011). The method validation for determination of streptomycin by TLC-bioautography has not been reported, although chromatogram profile of the aminoglycoside antibiotics using several solvent

system has been reported by Claes & Vanderhaeghe (1982).

Streptomycin belongs to aminoglycoside antibiotic that widely used to treat infectious diseases in human, animal as well as in plant agriculture (Shafqat *et al.*, 2012). The antibiotic administrates in injection dosage form or powder for solution preparations (Wills, 2005). Determination of streptomycin and its derivatives by HPLC (Whall, 1981), LC-MS/MS (Pendela *et al.*, 2009) and LC-MS (Hormazabal & Ostensvikov, 2013) TLC-Densitometry (Urszula *et al.*, 2009) have been reported. The potency testing in the quality control laboratories is used for determination of aminoglycoside antibiotics such as streptomycin, kanamycin and gentamycin in the pharmaceutical dosage form. The method gives very simple, accurate, and reproducible results. Drug monitoring sometimes is needed to evaluate of effectiveness and side effect after the drug administrated to patient. In case, the drug exists in a mixture with other substances, a valid method is needed to obtain responsible of analysis results. The streptomycin is one of aminoglycoside antibiotics that still used as a first line anti-tuberculosis drug with side effect of nephrotoxicity and ototoxicity (Toman, 2004). Where possible, serum level should be

monitored periodically. The aim of this research are to validate the TLC-bioautography method using single solvent system KH_2PO_4 solution for determination of streptomycin in the dry powder/small volume parenteral dosage form (injection). The result could be implemented for separation of the active compound (streptomycin) from its mixture not only in the dosage form but also in the specimens, like plasma and urine. The use of bacteria test for detecting streptomycin would be specific to distinguish from non-antibiotic compounds. The single solvent (KH_2PO_4 solution) used is relatively safe and cheaper compared to organic solvent.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

Streptomycin sulphate (Sigma) and injection of streptomycin were commercially obtained. Potassium phosphate mono basic (Sigma), distilled water, Nutrient agar (Oxoid), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Health Laboratory, Surabaya), and saline (Sodium chloride 0,9%) solution.

Thin layer chromatography bioautography

A standard stock solution of streptomycin (100 mg/100 mL) was prepared by dissolving 100 mg streptomycin powder in 100 mL distilled water. Concentration of the standard 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was diluted with distilled water to obtain 30, 40, 50, 60, 70, and 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for determination of LOD, while for determination of linearity was performed by dilution of the standard solution to obtain 150, 200, 250, 300, and 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. The sample solution was obtained from the dry powder dosage form (2-gram streptomycin powder in vial), prepared, diluted, and analyzed by the same method as a standard solution. The mobile solvent was prepared in several concentrations for optimization and to choose concentration of the KH_2PO_4 solution 5% or 7.5%.

Suspension of *Escherichia coli* ATCC 25922 was prepared by growing it in a slant medium (nutrient agar, at 35 ± 2 °C for 24 h). The growth cells were suspended in a saline sterile solution and diluted to give a suspension with $25 \pm 2\%$ transmittance at 580 nm using a 1 cm absorption cell and 0.9% NaCl sterile as a blank solution. Seed layer medium was prepared by inoculating 5 μL cell suspension in 7 mL of nutrient agar medium at 48 °C (Susanti *et al.*, 2009); which then overlaid on the surface of nutrient agar based layer medium.

The chromatography of antibiotic standard and samples solution was performed on silica gel F₂₅₄ (Merck), with the KH_2PO_4 solution as the mobile solvent (Isnaeni, 2005). The chromatogram of a developed TLC plate was contacted on a surface of the nutrient agar media inoculated by *Escherichia coli* ATCC 25922 as a test bacterium. (Susanti *et al.*, 2009). The mobile solvent was 7.5% KH_2PO_4 solution. An amount of 10 μL of each sample and standard solution were applied on the TLC plates in a spot and developed using the mobile solvent system. The plates were dried to remove solvent residue on the plates (Suleimana *et al.*, 2010). Resorcinol solution (2%) was used as detection reagent to observe position of purple color spot on the chromatogram plate.

Furthermore, the different chromatography plates free from spray reagent was placed on the surface of test medium containing the suspension of *Escherichia coli* ATCC 25922 and then storage in the refrigerator for 1 hour to allow diffusion of active substances on the test media. The growth of bacterium was appeared on the surface of the test media after incubation overnight, excluding spots of the streptomycin. The diameters (mm) of the clear zone around the spots were measured by calibrated digital caliper (Susanti *et al.*, 2009).

Method validation

The method was validated according to the International Conference on Harmonization (ICH, 2005) for evaluation of the performance attributes like LOD, linearity, accuracy and precision. The LOD is the minimum amount of analyte that can reliably inhibit the test microorganisms. This attribute was done by assaying a serial of standard solution at 30 - 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ range of concentration. This characteristic is applicable for Minimum Inhibition Concentration (MIC) determination. The linearity was evaluated through three independent assays using linear regression analysis and calculated by a least-squares method for five doses of the reference substance. The accuracy means the ability of the method to measure the actual or true value of the analyte. The test was repeated in three consecutive days. Three concentration levels, covering 80% to 120% of the selected range of 250, 300, and 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$, were tested each day. The precision is the degree of agreement among individual test results when the method is applied repeatedly to multiple samplings of a homogenized sample. This parameter was assessed through the repeatability and

intermediate precision and expressed as the relative standard deviation (RSD).

RESULTS AND DISCUSSION

Thin layer chromatography-bioautography

The chromatogram of streptomycin standard solution gave Rf value of 0.50 and 0.33 at 7.5% and 5% concentration of KH₂PO₄ solvent, respectively. It was found that clear zone was appearance sharply at 10 µL and 15 µL containing 0.8 µg and 1.2 µg streptomycin respectively (Figure 1) for both before and after the plate development (Table 1). It should be noted that the clear zone was not detected on the chromatogram at 5 µL sample solution for all concentrations of the eluents.

Table 1. Optimization of sample tested volume on contact bioautography qualitatively with *E.coli* ATCC 25922

Vol. of Samples (µL)	Appearance of clear zone inhibition (qualitatively) at concentration (µg/mL) of				
	80	100	120	140	160
Before and after the plate development					
5	negative				
10	positive				
15	positive				

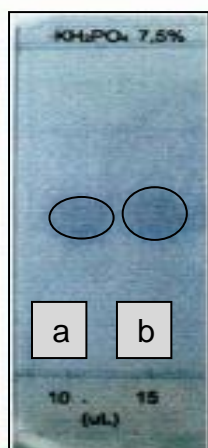


Figure 1. Bioautogram of Streptomycin sulphate on silica gel GF₂₅₄ plate; Eluted by 7.5% KH₂PO₄ solution with *E. coli* ATCC 25922 as a test bacteria; (a) 10 µL sample and (b) 15 µL sample

Method validation

LOD

It was found that the LOD of streptomycin was 40 µg/mL. This value was reflected as Minimum Inhibition Concentration (MIC) of the streptomycin (Table 2).

Table 2. The results of LOD evaluation on the bioautography of streptomycin sulphate with *E.coli* ATCC 25922

Conc. of Samples (µg/mL)	Diameter of clear zone growth inhibition (mm)
< 40	-
40	*7.862
50	8.281
60	8.883
70	10.062
80	10.241

* Diameter of hole/reservoir = 7 mm

Linearity

The standard solution at 150, 200, 250, 300, and 350 µg/mL concentration was used as linearity test. The intra-day precision was determined by loading 10 µL three standard solutions. (n = 3). The mean of the recorded clear zone diameter (mm) was taken for calibration curve; which obtained by plotting against log concentration (Figure 2).

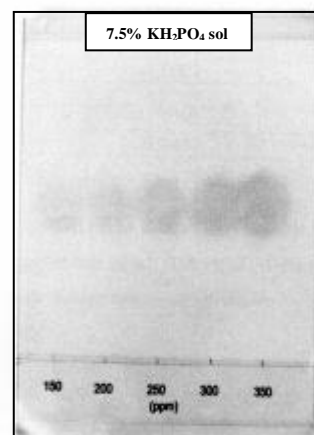


Figure 2. Linearity observed by bioautography on silica gel F₂₅₄ plate; eluted by 7.5% KH₂PO₄ solution with *E. coli* ATCC 25922 at concentration range of streptomycin 150 - 350 µg/mL.

The method resulted a good linearity at 150 - 350 µg/mL range. The linear equation was $y = 10.176x + 4.046$. The correlation coefficient ($r = 0.9907$) and determination of coefficient ($r^2 = 0.9819$) were highly significant.

Accuracy and precision

The accuracy was evaluated by the recovery determination of streptomycin sulphate in the injection dosage form and visualized in Figure 3. The mean accuracy was $96.37 \pm 2.22\%$, with an RSD value of 1.63%.

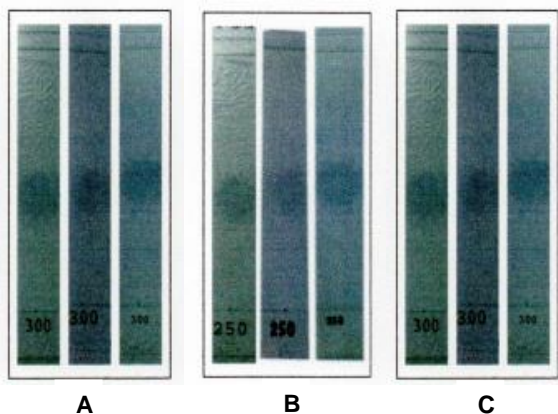


Figure 3. Inter day precision observed by bioautography on silica gel F₂₅₄ plate; developed by 7.5% KH₂PO₄ solution with *E. coli* ATCC 25922; streptomycin concentration of 250, 300, and 350 µg/mL performed by three (A, B, C) independent assays.

The analytical method is usually selected based on analysis purposes, such as qualitative, semi-quantitative or quantitative. On the other hands, equipments and reagents should be considered for development of accessible and useful the method (Suleimana *et al.*, 2010). In this research, KH₂PO₄ solution was used as a single mobile solvent since it is safe, simple and cheaper compare to the organic solvent, such as butanol and methanol.

The KH₂PO₄ solution at 7.5% was then chosen for plate development on the TLC-bioautographic system as recommended by Isnaeni (2005). The lower concentration of the solvent was originally reported by Claes & Vanderhaeghe (1982), by which the streptomycin could be separated from eight other aminoglycoside antibiotics using 15% and 10% aqueous solution of KH₂PO₄ at pH 4.4 and 4.5 respectively. This solvent system gave R_f value of 0.66 and 0.56 respectively. In case of single compound analysis, 7.5% of KH₂PO₄ solution is recommended, but the higher and various concentration are observation needed for mixed compound analyzed.

The agar diffusion or contact bioautography chosen for simplicity reasoning, the technique is carried out in the same manner as common detection of antimicrobial activity or potency by using two layers of agar media.

The chromatogram is placed face down onto the inoculated agar layer incubated by test microorganism (Dewanjee *et al.*, 2015) for a specific period to enable diffusion. Pre-incubation is needed to allow diffusion of the analyte in the chromatogram spot on the surface of agar medium. Then the chromatogram plate was removed from the agar after incubation for certain time.

The *Escherichia coli* ATCC 25922 was selected as the test microorganism because of its susceptibility to streptomycin, yielding sharply and clearly defined zones of growth inhibition, by which more precise measurements achieved (Susanti *et al.*, 2009).

The validation method was performed according to Wills (2005) for parameter evaluation. Current method is valid and accurate; which appropriate acceptance criteria of $\leq 5\%$ (ICH, 2005). Thus, the results obtained of the method were close to the true concentration values of the tested samples. The TLC-Bioautography is a analysis method provided for components exhibiting antimicrobial activity, that performed in situ, in comparison with other commonly used antimicrobial susceptibility activity or potency tests. The bio-assay precision of intra-day repeatability determined on the same days with three different test solutions of streptomycin sulphate was gave good results.

CONCLUSION

Various methods have been developed for the streptomycin determination, but have some disadvantages of being time-consuming and very expensive. The proposed method was found to be rapid, accurate, and repeatable in a hasty manner and techniques. It can be concluded that the simple bioautography detection in thin-layer chromatography with a single solvent system of 7.5% KH₂PO₄ solution pH 4.3 using *Escherichia coli* ATCC 25922 permitted determination of streptomycin in the injection sample validly.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Health Laboratory, Surabaya for providing *Escherichia coli* ATCC 25922 as a test bacterium.

REFERENCES

- Cheng, Z. & Wu, T. (2013). TLC Bioautography: High Throughput Technique for Screening of Bioactive Natural Products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*; 16; 531-49.

- Choma, I. (2005). The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. *Lc Gc Europe*; 18; 482-488.
- Choma, I. M. & Edyta, M. G. (2011). Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1218; 2684-2691.
- Claes, P. J. & Vanderhaeghe, H. (1982). Thin-layer Chromatographic Identification of Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Chromatography*; 248; 483-487.
- Dewanjee, S., Moumita, G., Niloy, B., Ritu, K. & Tarun, K. D. (2015). Bioautography and Its Scope in the Field of Natural Product Chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*; 5; 75-84.
- Gu, L. H., Liao, L. P., Hu, H. J., Annie, S. W. B., Wang, C. H., Chou, G. X. & Wang, Z. T. (2015). A Thin-Layer Chromatography-Bioautographic Method for Detecting Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors in Plants. *Journal of Chromatography A*; 1411; 116-22.
- Hormazabal, V. & Ostensviko. (2013). Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin in Milk and Meat by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*; 23; 2756-64.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2(R1)-ICH Steering Committee. Geneva: Commission of the European Communities, Geneva.
- Isnaeni. (2005). Bioautografi Antibiotika Hasil Fermentasi Mutan Streptomyces Griseus ATCC 10137. *Jurnal Farmasi Airlangga*; 5; 12-16.
- Marston, A. (2011). Thin-Layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry. *Journal of Chromatography A*; 1218; 2676-83.
- Pendela, M., Jos, H., Ann, V. S. & Erwin, A. (2009). LC-MS of Streptomycin Following Desalting of a Nonvolatile Mobile Phase and pH Gradient. *Journal of Separation Science*; 32; 3418-3424.
- Shafqat, U., Arshad, H., Asad, U., Waseem, H. & Khaliq-ur, R. (2012). Simple and Rapid Method on High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for Estimation of Streptomycin Sulphate. *World Applied Sciences Journal*; 19; 645-49.
- Suleimana, M. M., McGaw, L.J., Eloff J. N. & Naidoo, V. (2010). Detection of Antimicrobial Compounds by Bioautography of Different Extracts of Leaves of Selected South African Tree Species. *African Jorunal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*; 7; 64-78.
- Susanti, M., Isnaeni & Poedjiarti, S. (2009). Validation of Bioautographic Method for the Determination of Chloramphenicol. *Indonesian Journal of Medicine*; 1; 15-24.
- Toman, K. (2004). Toman's tuberculosis Case Detection, Treatment, and Monitoring: Questions and Answers. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.
- Urszula, H., Krzek, J., Woltyska, H. & Stachacz, B. (2009). Simultaneous Identification and Quantitative Determination of Selected Aminoglycoside Antibiotics by Thin Layer Chromatography and Densitometry. *Journal of AOAC International*; 92; 1068-1075.
- Whall, T. J. (1981). Determination of Streptomycin Sulfate and Dihydrostreptomycin Sulfate by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 219; 89-100.
- Wills, K. (2005). A Practical Guide to validation. In Easter MC. (Eds.) Rapid Microbiological Methods in the Pharmaceutical Industry. New York: Interpharm/CRC Press.

Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons *Agelas cavernosa*

Andhika Dwi Aristyawan, Noor Erma Sugijanto, Suciati*

Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya

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

Abstract

Background: Sponges from the genus *Agelas* have been reported to have antimicrobial activity, however there is no report on the antimicrobial activity of *Agelas cavernosa*. **Objective:** The aim of the current study is to investigate the antibacterial activity of the ethanolic extract of marine sponge *A. cavernosa*. **Methods:** The antibacterial activity of the extract was determined by using microdilution method against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *P-iodonitrotetrazolium chloride* reagent was added to visualize the presence of living organism. **Results:** The ethanolic extract of sponge *A. cavernosa* inhibited the growth of all bacteria tested, with the highest inhibition against *Pseudomonas aeruginosa* at MIC 150 ppm. **Conclusion:** The ethanolic extract of *A. cavernosa* showed moderate antibacterial activity.

Keywords: antibacterial agent, microdilution, sponge, *Agelas cavernosa*

Abstrak

Pendahuluan: Beberapa spons dari genus *Agelas* telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba, namun belum ada laporan tentang aktivitas antimikroba dari *Agelas cavernosa*. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari spons *Agelas cavernosa*. **Metode:** Aktivitas antibakteri pada ekstrak ditentukan dengan menggunakan metode mikrodilusi terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Pereaksi warna *p-iodonitrotetrazolium chloride* ditambahkan dalam sumuran untuk memvisualisasikan adanya bakteri hidup. **Hasil:** ekstrak etanol dari spons *A. cavernosa* menghambat pertumbuhan ketiga bakteri uji dengan aktivitas antibakteri tertinggi pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan MIC 150 ppm. **Kesimpulan:** Ekstrak etanol *A. cavernosa* menunjukkan aktivitas antibakteri.

Kata kunci: antibakteri, mikrodilusi, spons, *Agelas cavernosa*

PENDAHULUAN

Di Indonesia penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan yang penting (Kemenkes RI, 2011). Setiap tahunnya dilaporkan sembilan juta orang meninggal karena penyakit infeksi, banyak diantaranya anak-anak berusia di bawah lima tahun mengalami infeksi hingga menyebabkan cacat seumur hidup (WHO, 2018). Adanya bakteri yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotika yang dikenal dengan istilah *superbugs* semakin memperparah kasus infeksi, misalnya pada *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus* (NIH, 2014). Oleh karena itu diperlukan adanya penemuan antibiotika baru yang diharapkan dapat mengatasi permasalahan ini. Salah satu sumber alternatif dalam penemuan antibiotika adalah bahan alam baik dari tanaman maupun biota laut.

Indonesia memiliki sumber daya alam bahari yang besar. Terdapat beraneka ragam sumberdaya alam hayati laut yang meliputi 300 jenis karang, lebih dari 200 jenis ikan serta beberapa jenis spons (Mokodompit dkk., 2015). Senyawa dengan berbagai bioaktivitas, anatara lain: antivirus, antibakteri, antikanker, antileukimia, antiinflamasi, insektisida, dan antihelminik telah ditemukan dari spons (Kim, 2012). Hal ini membuat spons menjadi salah satu hewan laut yang menarik untuk diteliti karena berpotensi besar untuk dikembangkan dalam bidang pengobatan salah satunya sebagai antibakteri (Abubakar dkk., 2011).

Beberapa spons dari genus *Agelas* telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri. Ekstrak etanol spons *Agelas nakamurai* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium smegmatis* dengan zona hambat 22 mm (50 mg/disc). Diketahui metabolit

sekunder yang ikut berperan terhadap aktivitas antibakteri tersebut yaitu Agelasine A-F dan alkaloid bromopirol (Yamazaki dkk., 2015). Ekstrak metanol dari spons *Agelas clathrodes* dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri yang bersifat bakterisida terhadap *Escherichia coli*, *Mycobacterium smegmatis* dan bersifat bakteriostatik terhadap *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan metode dilusi. Senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri pada *A. clathrodes* adalah Agelasidine (Medeiros dkk., 2006). Spons *Agelas cornifera* juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen antara lain *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thypi*, *Aeromonas hydrophila*, dan *Vibrio harveyi* (Haris dkk., 2013).

Berdasarkan kajian aktivitas antibakteri dari spons genus *Agelas*, belum ditemukan adanya laporan aktivitas antibakteri dari spons *Agelas cavernosa*. Oleh karena itu penulis tertarik untuk meneliti aktivitas antibakteri dari spons *Agelas cavernosa* yang diambil dari sekitar pulau Barrang Lompo, Makassar, Sulawesi Selatan.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Sampel berupa spons diambil dari perairan di sekitar pulau Barrang Lompo, Makassar, Sulawesi Selatan pada tanggal 17 Mei 2014. Pengambilan sampel ini dilakukan dengan cara *scuba diving* pada kedalaman 10 – 12 m di bawah permukaan air laut. Sampel kemudian dibekukan pada suhu -20°C hingga dilakukan analisa. Identifikasi sampel dilakukan di Laboratorium Ekologi Institut Teknologi Surabaya secara mikroskopis. Sampel spons diidentifikasi sebagai *Agelas cavernosa*.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol (Merck, p.a), asam sulfat (Merck), barium klorida, dimetilsulfoxid (DMSO), larutan kristal violet, larutan lugol, larutan safranin, pereaksi warna INT *p* - *iodonitrotetrazolium chloride*, siprofloksasin *pharmaceutical grade* (kontrol positif untuk bakteri), *nutrient broth*, dan larutan normal salin (0,9% NaCl).

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang diperoleh dari Unit Layanan Pengujian, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga.

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ultrasonik, *rotary evaporator*, *Laminary Air Flow*

Cabinet (LAF), inkubator, *freeze dryer*, autoklaf, *96-well microplate*, mikroskop, dan spektrofotometer.

Ekstraksi

Spons beku dikeluarkan dari freezer dan diletakkan pada suhu ruangan hingga es mencair, lalu spons basah ditimbang (709 g). Permukaan spons dibersihkan dengan cara dibilas menggunakan aquades untuk menghilangkan pengotor mekanis, seperti bintang laut, batu karang kecil, dan kerang. Ukuran spons diperkecil dengan cara dipotong-potong (ukuran sekitar 1cm). Spons selanjutnya dikeringkan dengan *freeze dryer*. Spons kering selanjutnya dihaluskan dengan blender dan diperoleh serbuk kering spons sebanyak 99,5 g.

Serbuk spons kering diekstraksi dengan menggunakan etanol 96% dengan bantuan ultrasonik selama 3 x 10 menit tiap ekstraksi. Filtrat dipisahkan dari residu dengan cara disaring. Residu diekstraksi kembali sebanyak 3 kali dengan metode yang sama. Total volume etanol yang digunakan untuk ekstraksi adalah 2 L. Semua filtrat dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 7,5 g.

Uji antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan metode mikrodilusi menggunakan 3 macam bakteri yaitu: adalah *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Adapun pelaksanaan uji antibakteri ini dibagi dalam 3 tahap.

Penyiapan bakteri uji

Bakteri dibiakkan pada media nutrient agar (NA) pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan pembuatan suspensi bakteri uji dengan cara mengambil biakan bakteri dan dilarutkan dalam larutan salin (0,9% NaCl) secara aseptik. Tingkat kekeruhan suspensi dibandingkan dengan standard 0,5 McFarland secara visual dan dilakukan pengukuran absorban dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm, rentang absorbansi yang diperbolehkan adalah 0,08 – 0,13 yang setara dengan $1-2 \times 10^8$ CFU/mL (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) untuk uji dilusi. Kemudian dipipet sebanyak 100 μl dan ditambahkan media dilusi (*nutrient broth*) hingga 10 ml sehingga diperoleh suspensi mikroba dengan jumlah koloni $1-2 \times 10^6$ CFU/ml (Wiegand dkk., 2008). Suspensi bakteri ini yang selanjutnya digunakan untuk uji aktivitas, dan harus digunakan tidak lebih dari 30 menit setelah pembuatan (Andrews, 2006).

Penyiapan sampel uji

Larutan uji disiapkan dengan delapan macam konsentrasi larutan uji yaitu 2000, 1000, 500, 400, 300, 200, 100, dan 50 ppm. Konsentrasi sampel ini selanjutnya akan menjadi separuhnya di dalam *microplate*, yaitu menjadi 1000, 500, 400, 150, 100, 50 dan 25 ppm. Semua larutan uji dibuat dalam 5% DMSO. Sebagai kontrol positif digunakan larutan siprofloksasin 50 ppm dan kontrol negatif digunakan 5% DMSO. Konsentrasi sampel uji, kontrol positif dan kontrol negatif akan menjadi separuhnya di dalam *microplate* karena dilakukan pengenceran 1:1.

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM)

Konsentrasi hambat minimum merupakan konsentrasi terkecil dari sampel yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini digunakan modifikasi metode mikrodilusi (Ellof, 1998). Sebanyak 50 µL larutan uji dengan konsentrasi berurutan dari besar ke kecil dimasukkan ke dalam sumuran pertama hingga delapan. Pada sumuran sembilan ditambahkan 50 µL larutan kontrol positif, sumuran berikutnya dimasukkan 50 µL larutan kontrol negatif, dan sumuran sebelas dimasukkan 50 µL media dan pada sumuran kedua belas dimasukkan 100 µL media sebagai kontrol media (Gambar 1). Selanjutnya pada masing masing sumuran ditambahkan 50 µL suspensi bakteri uji.

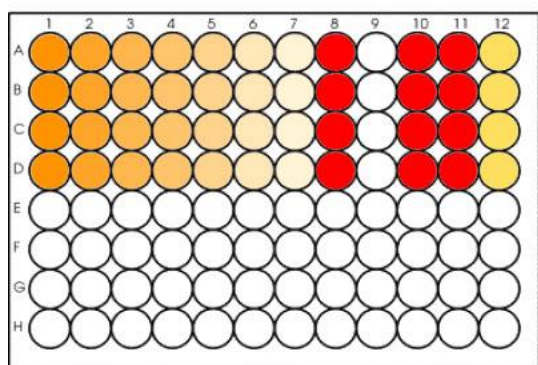
Microplate diinkubasi pada suhu 37°C selama sekitar 24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan yang menandakan adanya pertumbuhan bakteri. Selanjutnya pada setiap lubang *microplate* ditambahkan 20 µl INT (*p - idonitrotetrazolium chloride*) yang telah dilarutkan sebanyak 0,2 mg/ml aquades steril. *96-well microtiter plates* diinkubasi kembali selama 10-60 menit pada suhu 37°C (Ellof, 1998). Apabila pada lubang *plate* terjadi kekeruhan dan disertai dengan perubahan warna menjadi merah setelah penambahan pereaksi warna INT maka menandakan adanya pertumbuhan bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol *A. cavernosa* dilakukan terhadap bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* serta bakteri Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*. Bakteri *P. aeruginosa* digunakan karena termasuk dalam bakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit pneumonia, infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernafasan, sepsis, dan fibrosis kistik (Alhazmi,

2015), sedangkan bakteri yakni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* bakteri ini ditemukan sebagai kontaminan makanan yang dijual secara tidak higienis sehingga sering menyebabkan penyakit saluran cerna dan diare (Tan dkk., 2014). Sebelum digunakan uji, semua bakteri uji diidentifikasi terlebih dahulu menggunakan pewarnaan Gram untuk memastikan bahwa bakteri telah sesuai. Koloni bakteri Gram positif akan berwarna ungu dan koloni bakteri Gram negatif akan berwarna merah. Perbedaan warna ini dikarenakan perbedaan struktur dinding sel bakteri dan perbedaan kandungan asam teiokat antara bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan yang mengandung asam teiokat sehingga dapat menghindari dekolorisasi warna kristal violet oleh alkohol. Sebaliknya untuk bakteri Gram negatif tidak memiliki asam teiokat sehingga mengalami dekolorisasi warna kristal violet oleh alkohol dan terbentuk warna merah pada pewarnaan dengan safranin (Forbes dkk., 2013). Hasil pengamatan menunjukkan bakteri *S.aureus* berwarna ungu dan berbentuk seperti bola yang tersusun berkelompok. Bakteri *E.coli* berwarna merah dan berbentuk batang pendek. Bakteri *P.aeruginosa* berwarna merah dan berbentuk basil-basil. Hasil ini menunjukkan bakteri yang digunakan sudah sesuai.

Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi karena metode ini dapat memberikan hasil 30 kali lebih sensitif dibandingkan dengan metode difusi. Selain itu metode mikrodilusi dapat digunakan untuk analisis semikuantitatif hingga kuantitatif sehingga dapat menentukan KHM, tidak mahal, dan sampel yang digunakan relatif sedikit dibandingkan dengan metode makrodilusi (Ellof, 1998). Pada penelitian ini ditambahkan larutan pereaksi warna INT yang bertujuan untuk mengetahui adanya bakteri hidup secara visual pada setiap sumuran yang ditandai dengan adanya warna merah. Reaksi warna ini terjadi berdasarkan transfer elektron dari NAD⁺ menjadi NADH yang dikatalisa oleh TDH (*Threonine dehydrogenase*) yang berasal dari bakteri. Selama masa aktif pertumbuhan bakteri, elektron ditransfer dari NADH ke INT dan terjadi proses reduksi membentuk kristal formazan yang berwarna merah (Angeh, 2006). Sehingga bila terjadi pertumbuhan bakteri pada uji mikrodilusi ini akan timbul warna merah pada masing-masing lubang *microplate* yang masih ditumbuhi oleh bakteri.



Gambar 1. Penempatan sampel uji dan kontrol pada *microplate* (Ilustrasi setelah penambahan INT).

Keterangan:

- 1: Sampel konsentrasi 1000 ppm
- 2: Sampel konsentrasi 750 ppm
- 3: Sampel konsentrasi 500 ppm
- 4: Sampel konsentrasi 200 ppm
- 5: Sampel konsentrasi 100 ppm
- 6: Sampel konsentrasi 75 ppm
- 7: Sampel konsentrasi 50 ppm (MIC)
- 8: Sampel konsentrasi 25 ppm
- 9: Kontrol + siprofloksasin
- 10: Kontrol -, 2,5% DMSO
- 11: Kontrol pertumbuhan
- 12: Kontrol Media

Hasil yang diperoleh menunjukkan (Tabel 1) bahwa ekstrak etanol *Agelas cavernosa* dapat menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dengan KHM sebesar 150 ppm, *Escherichia coli* dengan KHM sebesar 200 ppm, *Staphylococcus aureus* dengan KHM sebesar 250 ppm. Berdasarkan pustaka, aktivitas antibakteri dapat dibagi menjadi 4 golongan berdasarkan harga KHM yakni KHM <100 ppm (tergolong kuat), KHM 100-500 ppm (tergolong sedang), KHM 500-1000 ppm (tergolong rendah), KHM >1000 ppm (tergolong tidak aktif) (Silva dkk., 2015). Berdasarkan hal tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak spons *A. cavernosa* memiliki aktivitas antibakteri yang sedang terhadap ketiga bakteri tersebut. Beberapa faktor yang mempengaruhi proses uji aktivitas antibakteri antara lain konsentrasi bakteri yang ditambahkan pada agar (jumlah inokulum), adanya patogen kontaminasi, suhu pertumbuhan, waktu inkubasi dan kandungan nutrisi (Bauer dkk., 1996). Selain itu faktor penting yang juga harus diperhatikan untuk mencapai hasil yang baik adalah galur mikroba uji yang digunakan karena pada galur yang berbeda terdapat perbedaan tingkat kepekaan.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri

Sampel	Hasil Pewarnaan		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000 ppm			
500 ppm			
250 ppm			
200 ppm		✓	
150 ppm	✓	✓	
100 ppm	✓	✓	✓
50 ppm	✓	✓	✓
25 ppm	✓	✓	✓
Kontrol +			
Kontrol -	✓	✓	✓
Kontrol tumbuh	✓	✓	✓
MIC	200 ppm	250 ppm	150 ppm

Keterangan:

✓ menunjukkan adanya warna merah pada sumuran

Uji dilakukan dengan tiga kali replikasi masing masing dilakukan secara quadruplo

KESIMPULAN

Ekstrak etanol 96 % spons *Agelas cavernosa* yang diambil dari utara pulau Barrang Lompo, Makassar memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, *S.aureus* dan *P. aeruginosa* dengan aktivitas tertinggi terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan KHM sebesar 150 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

Abubakar, H., Wahyudi A. T. & Yuhana, M. (2011). Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons Jaspis sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. *Ilmu Kelautan*; 16; 35-40.

Alhazmi, A. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*-Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *International Journal of Biology*; 7; 44 – 67.

- Andrews, J. M. (2006). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*; 48; 5-16.
- Angeh, J. E. (2006). Isolation and Characterization of Antibacterial Compounds. *Thesis*; University of Pretoria, South Africa.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turek, M. (1996). Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Diskmethod. *American Journal of Clinical Pathology*; 45; 493-498.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). Performance Standard for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard.10th ed. Pennsylvania.
- Eloff, J. N. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica*; 64; 711-713.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. (2007). Bailey and Scott's: Diagnostic Microbiology. Virginia: Mosby Inc.
- Haris, A., Arniati & Werorilangi, S. (2013). Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode High Troughput Screening (HTS) dengan Indikator MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazolium bromide). *Laporan penelitian*; Universitas Hasanudin, Makassar.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2011). Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 2406/MENKES/PER/XII/2011 Tentang Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik. Jakarta: Kemenkes RI.
- Kim, S. K. (2012). Marine Pharmacognosy: Trends and Applications. New York: CRC Press.
- Medeiros, A. M., Lourenco, A., Tavares, M. R., Joao, M., Curto, M., Savluchinske, F. & Roseiro, C. (2006). Agelasidine A from *Agelas clathrodes*. *Journal of Biosciences*; 61; 472-476.
- Mokodompit, A., Boekoesoe, L. & Mustapa, M. A. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Spons Laut (Porifera:Demospongiae) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Laporan penelitian*; Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo.
- National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services. (2014). Stop the Spread of Superbugs: Help Fight Drug-Resistant Bacteria. <https://newsinhealth.nih.gov/2014/02/stop-spread-superbugs>. Accessed: 21 Juni 2018.
- Silva, N. M. M., Silva, I. S. M., Pires, R. F. S., Vasconcelos, T. L. C., Viana, M. D. M., Campessato, E. A., Conserva, L. M., Rocha., E. M. M., Araujo, E.C., Araujo, Jr.J.X. & Bastos, M.L.A. (2015). In Vitro Evaluation of Antimicrobial, Antioxidant, dan Larvicidal Activities from Extract of *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Biognoniace). *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*; 7; 319-328.
- Tan, S. L., Lee, H. Y., Mahyudin, N. A. (2014). Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Food Handler's Hands. *Food Control*; 44; 203-207.
- Wiegand, I., Hilpert, K. & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and Broth Dilution Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of Antimicrobial Substances. *Nature Protocols*; 3; 163-175.
- World Health Organization. (2018). Antimicrobial Resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Accessed: 28 Maret 2018.
- Yamazaki, H., Abdjul, D. B., Kanno, S. I., Takahashi, O., Kirikosho, R., Ukai, K. & Namikoshi, M. (2015). Structures and Biological Evaluations of Agelasines Isolated from the Okinawan Marine Sponge *Agelas nakamurai*. *Journal of Natural Products*; 79; 1149-1154.

JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

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

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

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

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

PETUNJUK BAGI PENULIS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. **Singkatan (Abbreviations):**

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

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

10. Penulis akan menerima satu eksemplar naskah terbitan.