

Vol. 7 No. 1 Juli 2020



Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia

E-ISSN: 2580-8303

P-ISSN: 2406-9388



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



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

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

Penanggung Jawab:

Prof. 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:

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

Sekretaris:

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

Anggota:

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

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

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

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

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

Susmiandri, S.Kom.

Mitra Bestari

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

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

Dr. Tatang Irianti, M.Sc., Apt.

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

Fenita Shoviantari, S.Farm., M.Farm., Apt.

Dr. Isnaeni, MS., Apt.

I Wayan Mudianta, S.Pd., M.Phil., Ph.D.

Dr. Achmad Toto Poernomo, M.Si., Apt.

Dr. Miratul Khasanah, M.Si.

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

Dr. Agnes Nuniek Winantari, S.Si., M.Si., Apt.

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

Purwantiningsih, S.Si., M.Si., PhD., Apt.

Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Gedung Nanizar Zaman Joenoes

Jl. Dr. Ir. H. Soekarno Surabaya 60115

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

Website:

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

Email : jfiki@ff.unair.ac.id

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

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

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

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

Daftar Isi

No	Artikel	Hal
1.	Analisis Biaya Pengobatan Pasien di RSUD Dr. Soedarso Pontianak Diagnosa Demam Tifoid Tahun 2018 Heny Puspasari, Dani Suryaningrat, Muhammad Rizky	1-6
2.	Identifikasi Pengaruh Proses Perebusan dan Penggorengan Kacang Tolo (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp.) terhadap Komposisi Fitosterol Noor Erma Nasution Sugijanto, Citra Hayu Adi Makayasa, Gita Deseria, Rahmania Alrika Ilma Bridgeta, Miftakhul Rohmah Putri, Catur Dian Setiawan, Sugijanto	7-18
3.	Karakteristik dan Stabilitas Fisik Krim <i>Amniotic Membrane Stem Cell Metabolite Product</i> dengan Penambahan SPACE Peptide Nisa Qurrota A'yun, Tristiana Erawati, Cita Rosita Sigit Prakoeswo, Widji Soeratri	19-25
4.	Optimasi Metode KCKT untuk Penetapan Kadar 4-Isobutilasetofenon dan 2-(4-Isobutirilfenil) Asam Propanoat dalam Tablet Ibuprofen Rara Dyah Chrissanti, Asri Darmawati, Mochammad Yuwono	26-34
5.	Validated TLC-Contact Bioautography Method for Identification of Kanamycin Sulfate in Injection Preparation Susanti, Aprelita Nurelli Dwiana, Febri Annuryanti, Asri Darmawati, Isnaeni	35-41
6.	Pengaruh Pemberian Salep Kombinasi Ekstrak Daun <i>Morinda citrifolia</i> dan Batang <i>Euphorbia tirucalli</i> terhadap Penyembuhan Luka Reza Pertiwi, Syalfinaf Manaf, Rochmah Supriati, Hari Marta Saputra, Fitri Ramadhanti	42-50
7.	Efektivitas Pemberian Biocurpain untuk Memperbaiki Status Fungsional pada Pasien Osteoarthritis Rizaldy Taslim Pinzon, Eric	51-58

Analisis Biaya Pengobatan Pasien Diagnosa Demam Tifoid di Instalasi Rawat Inap RSUD Dr Soedarso Pontianak Tahun 2018

Heny Puspasari*, Dani Suryaningrat, Muhammad Rizky
Departemen Farmasi, Akademi Farmasi Yarsi, Pontianak, Indonesia

*Corresponding author: heny24puspasari@gmail.com

Submitted: 8 November 2019

Accepted: 17 Mei 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: Typhoid fever remains to be a digestive tract endemic disease in Indonesia. Since health care costs, especially medicine cost had increased sharply in recent decades, it is important to conduct cost of illness study including in typhoid disease to update cost information related to this illness to healthcare providers and policy makers. **Objective:** This study was aimed to determine the type of drug, the length of stay, and the cost of treatment patients in the hospital Dr. Soedarso. **Method:** Descriptive analysis assessing direct cost with retrospective data collection was conducted based on medical records and patient financial records. **Results:** The types of drugs that were widely used were thiamphenicol antibiotics in 8 patients (19.51%) and cefixime in 6 patients (14.63%). Inpatient with typhoid mostly spent 6 days in hospital (26.87% of 41 patients), whilst the longest length of stay was 9 days (4.87% of 41 patients). The biggest part of cost was hospitalization which was IDR 37,400,300 (41.90% from total cost IDR 89,262,145) and the smallest cost was administration costs with IDR 5,323,000 (5.97%). The average total treatment cost for patients with insurance (BPJS) was IDR 2,179,380. Meanwhile, the average cost of patients without insurance was IDR 2,228,669. **Conclusion:** The average cost of treatment is still somewhat cheaper compared to the standard cost of treatment from the government for BPJS claims. The treatment used was in line with the therapeutic algorithm.

Keywords: cost analysis, treatment, typhoid fever

Abstrak

Pendahuluan: Demam Tifoid merupakan penyakit saluran pencernaan yang endemik di Indonesia. Hal ini karena biaya perawatan kesehatan, terutama biaya obat-obatan telah meningkat tajam dalam beberapa dekade terakhir, sehingga penting untuk dilakukan studi biaya penyakit ini untuk memperbarui informasi terkait biaya kepada penyedia layanan kesehatan dan pembuat kebijakan. **Tujuan:** Penelitian ini untuk mengetahui jenis obat, lama waktu pengobatan, dan biaya pengobatan pasien demam tifoid di instalasi rawat inap RSUD Dr. Soedarso. **Metode:** Penelitian analisis deskriptif biaya langsung (*direct cost*) dengan pengambilan data retrospektif dilakukan berdasarkan data rekam medik dan catatan pembiayaan pasien. **Hasil:** Penelitian menunjukkan bahwa jenis obat yang paling banyak digunakan adalah golongan antibiotik tiamfenikol (8 pasien atau 19,51%) dan cefiksime (6 pasien atau 14,63%) dari 41 pasien. Kebanyakan pasien mendapat perawatan dengan lama 6 hari (26,87% dari 41 pasien), dan waktu rawat inap terlama 9 (4,87 % dari 41 pasien). Komponen biaya terbesar adalah biaya rawat inap yaitu Rp. 37.400.300 dengan persentase 41,90 % dari total biaya Rp. 89.262.145 dan biaya terkecil yaitu biaya administrasi yaitu Rp. 5.323.000 dengan persentase 5,97% dari total biaya. Rata-rata biaya pengobatan per pasien BPJS Rp. 2.179.380 dan rata-rata biaya per pasien umum Rp. 2.228.669. **Kesimpulan:** Biaya pengobatan masih terbilang lebih murah dibandingkan dengan biaya pengobatan berdasarkan tarif dari pemerintah untuk klaim BPJS. Pengobatan yang digunakan juga sudah sesuai dengan algoritma terapi.

Kata kunci: analisis biaya, pengobatan, demam tifoid

PENDAHULUAN

Demam tifoid merupakan penyakit endemik yang disebabkan oleh kuman *Salmonella typhosa* (*Eberthella typhosa*) yang merupakan jenis penyakit infeksi saluran pencernaan yang mengakibatkan peradangan pada bagian usus halus dan lumen usus (Etikasari dkk., 2012).

Biaya kesehatan beberapa waktu ini telah banyak menarik perhatian. Biaya pelayanan kesehatan yang khususnya menyangkut biaya obat telah mengalami peningkatan yang sangat signifikan beberapa tahun terakhir ini dan kecenderungan ini tampaknya akan terus berlangsung. Hal tersebut antara lain disebabkan oleh jumlah pasien yang semakin banyak, adanya perubahan pola pengobatan, sehingga konsekuensinya meningkatnya penggunaan obat, serta terdapat banyaknya obat-obat baru dengan harga lebih mahal (Kemenkes RI, 2006)

Penyakit demam tifoid masih merupakan masalah kesehatan di Kalimantan Barat. Menurut data survei terpadu Penyakit Provinsi Kalimantan Barat, untuk kasus tifoid pada tahun 2012 sebanyak 9.979 kasus, dengan sebaran penyakit di 12 kabupaten kota, 5 kota atau kabupaten dengan kasus tifoid terbanyak antara lain, Kabupaten Sanggau 2.914 (29,20%), Kabupaten Sintang 2.434 (24,39%), Kota Pontianak 1.169 (11,17%), Kabupaten Melawi 1.067 (10,69%), dan Kabupaten Pontianak 632 (6,33%).

Jumlah penderita demam tifoid setiap tahunnya terus meningkat di Kota Pontianak. Berdasarkan laporan tahunan RSUD Dr. Soedarso Pontianak, pada tahun 2010 jumlah kasus baru rawat jalan dan rawat inap ada sebanyak 1.180 penderita dengan 4 orang meninggal dunia, tahun 2011 berjumlah 842 penderita dengan 5 orang meninggal dunia, tahun 2012 berjumlah 922 penderita dengan 2 orang meninggal dunia. Terbanyak penderita demam tifoid berumur 5 - 15 tahun dengan jumlah kasus sebanyak 539 penderita. Total jumlah kasus demam tifoid pada tahun 2012 menempati urutan kedua setelah diare (RSUD Dr. Soedarso, 2015).

Tahun 2013 jumlah kasus baru demam tifoid untuk rawat jalan dan rawat inap ada sebanyak 861 penderita dengan 4 orang meninggal dunia dan pada tahun 2014 dari bulan Januari sampai dengan April jumlah kasus demam tifoid ada sebanyak 150 kasus. Sama seperti tahun 2012 terbanyak penderita demam tifoid berumur 5 - 15 tahun dengan jumlah kasus sebanyak 421 penderita (RSUD Dr. Soedarso, 2015).

Berdasarkan atas biaya perawatan kesehatan, terutama biaya obat-obatan telah meningkat tajam

dalam beberapa dekade terakhir, sehingga penting untuk dilakukan penelitian tentang “Analisis Biaya Pengobatan Pasien Diagnosa Demam Tifoid Di Instalasi Rawat Inap RSUD Dr. Soedarso Pontianak Periode Juli - Oktober Tahun 2018” ini untuk memperbarui informasi terkait biaya kepada penyedia layanan kesehatan dan pembuat kebijakan.

BAHAN DAN METODE

Desain penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif dengan pengambilan data secara retrospektif yang didasarkan pada catatan rekam medik dan catatan pembiayaan.

Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan di Bagian Keuangan dan Rekam Medik RSUD Dr. Soedarso Pontianak Kalimantan Barat pada bulan Januari 2019.

Populasi dan sampel penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh pasien rawat inap di RSUD Dr. Soedarso dengan diagnosa demam tifoid tanpa komplikasi berdasarkan kode di rekam medis Periode Juli - Oktober tahun 2018. Sampel penelitian yaitu bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut. Pada penelitian ini digunakan sampel jenuh. Sampel jenuh adalah teknik penentuan sampel bila semua anggota populasi digunakan sebagai sampel. Hal ini sering dilakukan bila jumlah populasi relatif kecil, kurang dari 30 orang, atau penelitian yang ingin membuat kesalahan yang sangat kecil (Sugiyono, 2016).

Variabel penelitian

Menurut Sugiyono (2016), variabel penelitian adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut. Pada penelitian ini variabel yang diteliti yaitu, sebagai berikut:

1. Jenis obat
2. Pasien
3. Umur pasien
4. Biaya langsung (*direct cost*)
5. Lama waktu rawat inap
6. Biaya obat
7. Biaya rawat inap
8. Biaya administrasi
9. Biaya laboratorium
10. Biaya visite dokter

Teknik dan instrumen pengumpulan data

Pada penelitian ini pengumpulan data atau pengambilan sampel penelitian dilakukan secara

retrospektif dengan cara observasi langsung pada catatan rekam medis dan data keuangan pasien. Instrumen (alat) pengumpulan data yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan formulir observasi atau tabel pengamatan.

Teknik analisis data

Data yang dihasilkan dianalisa secara deskriptif dengan menggunakan hasil data yang telah didapat pada rekam medis dan catatan pembiayaan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Jumlah pasien rawat inap demam tifoid pada periode Juli - Oktober tahun 2018 adalah 41 pasien, dengan pasien tertinggi pada bulan September dengan Jumlah 22 pasien dan pasien terendah pada bulan Agustus 5 pasien. Jumlah pasien demam tifoid dari bulan Juli sampai Oktober tahun 2018 sangat fluktuatif dengan hasil yang berbeda setiap bulan-nya.

Penyakit demam tifoid lebih banyak diderita oleh laki-laki dengan persentase 58,53%. Laki-laki memiliki aktivitas yang lebih tinggi dari pada perempuan

(Nadyah, 2014). Aktivitas lebih tinggi dapat menimbulkan stress, yang berperan terhadap kualitas hidup seseorang.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa jenis obat antibiotik yang banyak digunakan oleh pasien demam tifoid di RSUD Dr. Soedarso Pontianak yaitu pasien banyak menerima terapi antibiotik jenis tiamfenikol sebanyak 19,51% (8 pasien). Antibiotik tiamfenikol adalah jenis antibiotik turunan dari kloramphenicol yang juga aktif terhadap bakteri *Salmonella typhosa*. Pada trilogi penatalaksanaan demam tifoid, pemberian antimikroba yang sering digunakan adalah kloramfenikol dan tiamfenikol (Widodo, 2006). Terapi pasien demam tifoid terbanyak selanjutnya yaitu jenis antibiotik cefiksime sebanyak 14,63% (6 pasien). Cefiksime ialah jenis antibiotik golongan sefalosporin generasi ketiga, antibiotik ini mempunyai aktifitas antimikroba yang baik terhadap bakteri gram negatif *Salmonella typosa* sehingga merupakan obat terapi yang baik untuk pengobatan penyakit demam tifoid (Haluang dkk., 2015).

Tabel 1. Biaya langsung (*direct cost*) pasien BPJS dan umum di instalasi rawat inap RSUD Dr. Soedarso Pontianak dengan diagnosa demam tifoid periode Juli - Oktober tahun 2018

Jenis biaya langsung	N = 41		
	Jumlah biaya	Biaya perpasien	Persentase biaya rata-rata
Administrasi	Rp. 5.323.000	Rp. 129.829	5,96%
Laboratorium	Rp. 10.828.811	Rp. 264.117	12,13%
Obat	Rp. 20.322.388	Rp. 495.668	22,77%
Rawat inap	Rp. 37.400.300	Rp. 912.202	41,90%
Visite dokter	Rp. 15.387.646	Rp. 375.308	17,24%
Total	Rp. 89.262.145	Rp 2.177.125	100%

Keterangan: Persentase biaya rata-rata merupakan persentase jumlah biaya pada setiap jenis biaya langsung untuk semua pasien dibandingkan total biaya langsung untuk semua pasien

Berdasarkan Tabel 1 di atas menjelaskan bahwa biaya langsung (*direct cost*) yang dikeluarkan oleh pasien dengan diagnosa demam tifoid biaya terbesar yang dikeluarkan adalah biaya rawat inap dan biaya terkecil adalah jenis biaya administrasi dari total

keseluruhan biaya langsung yang dikeluarkan oleh tiap-tiap pasien di rumah sakit ini. Jenis biaya ini sama untuk tiap-tiap pasien baik dengan status tanggungan BPJS maupun umum.

Tabel 2. Biaya langsung (*direct cost*) pasien BPJS di instalasi rawat inap RSUD Dr. Soedarso Pontianak diagnosa demam tifoid periode Juli - Oktober tahun 2018

Jenis biaya	N = 35		
	Jumlah biaya	Biaya perpasien	Persentase biaya rata-rata
Administrasi	Rp. 4.405.000	Rp. 129.857	5,81%
Laboratorium	Rp. 8.812.913	Rp. 251.797	11,61%
Obat	Rp. 18.562.259	Rp. 530.350	24,46%
Rawat inap	Rp. 30.613.300	Rp. 874.665	40,34%
Visite dokter	Rp. 13.496.146	Rp. 385.604	17,78%
Total	Rp. 75.889.618	Rp 2.168.274	100%

Keterangan: Persentase biaya rata-rata merupakan persentase jumlah biaya pada setiap jenis biaya langsung untuk semua pasien dibandingkan total biaya langsung untuk semua pasien.

Tabel 2 di atas menjelaskan bahwa biaya langsung (*direct cost*) yang dikeluarkan oleh pasien tifoid dengan status tanggungan BPJS. Jenis biaya terbesar yang dikeluarkan adalah biaya rawat inap dan biaya terkecil adalah jenis biaya administrasi dari total keseluruhan biaya langsung yang dikeluarkan oleh tiap-tiap pasien di rumah sakit ini. Biaya obat-obatan untuk pasien masih terbilang terjangkau dimana biaya obat menempati biaya kedua tertinggi setelah biaya rawat inap. Jenis obat yang digunakan sesuai dengan

tatalaksana terapi yang sesuai dengan algoritma, yang mana pada tatalaksana jenis obat yang banyak digunakan adalah antibiotik tiamfenikol dan cefiksime. Hal ini juga sesuai dengan Widodo (2006) pemberian antimikroba yang sering digunakan dalam trilogi terapi demam tifoid adalah kloramfenikol, tiamfenikol, kotrimoksazol, ampisilin dan amoksisilin, sefalosporin generasi ketiga, golongan fluorokuinolon, dan kortikosteroid.

Tabel 3. Biaya langsung (*direct cost*) pasien umum (tanpa asuransi) di instalasi rawat inap RSUD Dr. Soedarso Pontianak diagnosa demam tifoid periode Juli - Oktober tahun 2018

Jenis biaya langsung	N = 6		
	Jumlah biaya	Biaya perpasien	Persentase biaya rata-rata
Administrasi	Rp. 917.500	Rp. 152.916	6,86 %
Laboratorium	Rp. 2.015.598	Rp. 335.933	15,07 %
Obat	Rp. 1.760.129	Rp. 293.354	13,16 %
Rawat inap	Rp. 6.787.000	Rp. 1.131.166	50,76 %
Visite dokter	Rp. 1.891.500	Rp. 315.250	14, 15 %
Total	Rp. 13.371.727	Rp 2.228.621	100

Keterangan: Persentase biaya rata-rata merupakan persentase jumlah biaya pada setiap jenis biaya langsung untuk semua pasien dibandingkan total biaya langsung untuk semua pasien.

Tabel 3 di atas menjelaskan bahwa biaya langsung (*direct cost*) yang dikeluarkan oleh pasien tifoid dengan status tanggungan umum jenis biaya terbesar yang dikeluarkan adalah biaya rawat inap dan biaya terkecil adalah jenis biaya administrasi dari total keseluruhan biaya langsung yang dikeluarkan oleh tiap-tiap pasien di rumah sakit ini. Biaya terbesar kedua adalah jenis biaya laboratorium, hal ini berbeda

dengan pasien BPJS dimana biaya terbesar kedua adalah biaya obat. Pada pasien umum jenis biaya obat juga masih terbilang terjangkau dimana biaya obat menempati biaya tertinggi ketiga. Hal ini dapat dikarenakan jenis obat yang digunakan juga masih relatif sama dengan jenis obat yang digunakan oleh pasien dengan status tanggungan BPJS.

Tabel 4. Perbandingan total biaya pengobatan pasien di instalasi rawat inap RSUD Dr. Soedarso Pontianak diagnosa demam tifoid periode Juli - Oktober tahun 2018

Jenis biaya langsung	N (BPJS) = 35, N (Umum) = 6		
	Jumlah biaya	Biaya perpasien	Persentase biaya rata-rata
Biaya pasien BPJS	Rp. 75.889.618	Rp. 2.168.274	49,31 %
Biaya pasien umum	Rp. 13.371.727	Rp. 2.228.621	50,69 %
Total	Rp. 89.262.145	Rp 4.408.049	100

Keterangan: Persentase biaya rata-rata merupakan persentase jumlah biaya pada setiap jenis biaya langsung untuk semua pasien dibandingkan total biaya langsung untuk semua pasien.

Total biaya langsung (*direct cost*) demam tifoid pada Tabel 4 diatas berdasarkan hasil yang didapat di RSUD Dr. Soedarso periode Juli - Oktober tahun 2018 pada penelitian ini adalah Rp. 89.262.145 yang dimana penjumlahan dari total biaya pasien umum rawat inap sebesar Rp. 13.371.727 dengan biaya per pasien Rp. 2.228.621 (50,69%) dengan jumlah pasien umum 6 orang pasien, untuk total biaya rawat inap pasien BPJS sebesar Rp. 75.889.618 dengan biaya per pasien Rp. 2.168.274 persentase (49,31%) sebanyak 35 pasien BPJS, dengan demikian perbedaan yang terdapat pada

jumlah biaya keseluruhan demam tifoid disini adalah jumlah pasien yang berbeda jauh antara pasien BPJS dan pasien Umum. Perbedaan nilai rata-rata total biaya rawat inap pasien umum (tanpa asuransi) dan BPJS ini juga dapat juga disebabkan karena banyaknya variasi jumlah biaya dan rawat inap pada setiap pasien. Dari hasil penelitian Tabel 4 di atas, total biaya per pasien demam tifoid di RS. Soedarso yaitu sebesar Rp. 2.177.125 per pasien dengan biaya inap memakan biaya terbesar yaitu Rp. 912.202. Dengan adanya biaya yang masih ditanggung oleh pasien sebanyak

Rp. 2.177.125, tampaknya keseimbangan peningkatan subsidi pemerintah belum mencukupi dan perlu dikaji kembali dalam penentuan besarnya subsidi untuk beberapa tahun selanjutnya. Adanya krisis ekonomi pada tahun ini sangat dirasakan oleh pasien yang tergolong kurang mampu. Biaya rawat inap lebih mahal dibandingkan dengan biaya obat pasien yang lebih murah yaitu Rp. 495.668 per pasien untuk kasus demam tifoid.

Biaya jasa dokter disini merupakan biaya yang diberikan kepada dokter sebagai imbalan atas pemeriksaan dalam menetapkan diagnosa pada pasien. Rata-rata biaya jasa dokter pada penyakit demam tifoid ini yaitu sebesar Rp. 375.308 sedangkan untuk rata-rata pada biaya administrasi disini sedikit lebih rendah dari pada jasa dokter yaitu sebesar Rp. 129.829.

Berdasarkan besaran standar tarif pelayanan kesehatan dalam penyelenggaraan program jaminan kesehatan nasional (JKN), biaya pasien diagnosa demam tifoid yang harus ditanggung perpasien yaitu sebesar Rp. 2.168.274. Rumah Sakit di Kalimantan Barat masuk kedalam regional tiga berdasarkan data dari Kemenkes RI (2014) dan RSUD Dr. Soedarso (2015) adalah golongan rumah sakit tipe B yang memiliki tiga jenis kelas yaitu kelas satu, dua, dan tiga. Biaya tarif yang ditanggung BPJS yaitu Rp. 6.614.500 (Kemenkes RI, 2014) pada tarif kelas 1. Dari hasil penelitian ini didapat bahwa biaya rata-rata per pasien untuk demam tifoid yaitu Rp. 2.168.274 dimana pasien RSUD Dr. Soedarso Pontianak masih memiliki keuntungan dari tunjangan BPJS tersebut, Selain itu, terapi pengobatan yang diberikan sesuai dengan tatalaksana terapi tifoid yaitu pemberian antimikroba yang sering digunakan salah satunya tiamfenikol dan sefalosporin generasi ketiga (Soedarmo dkk., 2008). Berdasarkan penelitian ini dapat dikatakan bahwa biaya pengobatan masih terbelang berada dibawah tarif ketentuan dari pemerintah, Pada penelitian (Yunita dkk., 2018) yang menyatakan bahwa pembiayaan pasien demam tifoid, membutuhkan terapi yang mampu mengatasi infeksi *Salmonella typhi*. Terapi yang digunakan untuk demam tifoid meliputi terapi simtomatik dan antibiotik. Dari penelitian ini didapat pembayaran pasien Jaminan Kesehatan Nasional (JKN) yang menggunakan antibiotik seftriakson lebih rendah, yaitu sebesar Rp 1.866.525 per pasien.

KESIMPULAN

Penggunaan obat yang banyak digunakan pada kasus demam typhoid di RSUD Dr. Soedarso yaitu golongan antibiotik cefiksim dan tiampenikol, dengan

waktu rawat inap pasien paling lama adalah 9 hari, biaya terbesar adalah biaya rawat inap, dan biaya terkecil yaitu biaya administrasi. Biaya pengobatan ini masih terbelang lebih rendah dengan biaya pengobatan masih berada dibawah tarif ketentuan pemerintah untuk klaim BPJS.

DAFTAR PUSTAKA

- Etikasari R, Andayani, T. M. & Mukti, A. G. (2012). Analisis Biaya dan Kesesuaian Penggunaan Antibiotik pada Demam Tifoid di RSUD Kota Yogyakarta. *Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi*; 2; 147-153.
- Haluang, O., Tjitrosantoso, H. & Kojong, N. S. (2015). Analisis Biaya Penggunaan pada Penderita Demam Tifoid Anak di Instalasi Rawat Inap Rsup Prof. Dr. R. D. Kandou Manado Periode Januari 2013 - Juni 2014. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*; 4; 117-125.
- Kemenkes RI. (2014). Permenkes RI No 59 Tentang Standar Tarif Pelayanan Kesehatan dalam Penyelenggaraan Program Jaminan Kesehatan. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Kemenkes RI. (2006). Keputusan Menteri Kesehatan RI Nomor 364/Menkes/SK/V/2006 Tentang Pedoman Pengendalian Demam Tifoid. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Nadyah. (2013). Hubungan Faktor-faktor yang Mempengaruhi Insidens Penyakit Demam Tifoid Di Kelurahan Samata Kecamatan Somba OPU Kabupaten Gowa 2013. *Jurnal Kesehatan UIN Alaudin Makasar*; 7; 305-321.
- RSUD Dr. Soedarso. (2015). Profil RSUD Dr. Soedarso. <http://www.rsudsoedarso.com/2015/01/rumah-sakit-daerah-doktersoedarsopontianak>. Accessed: 13 September 2017.
- Soedarmo, S. S. P., Garna, H., Hadinegoro, S. R. S., Satari, H. I., Dokter, I. & Indonesia, A. (2008). Buku Ajar Infeksi dan Pediatri Tropis Edisi Kedua IDAI. Jakarta: Ikatan Dokter Anak Indonesia.
- Sugiyono. (2016). Metodologi Penelitian Kuantitatif – Kualitatif dan R&D. Bandung: Penerbit Alfabeta.
- Widodo, J. (2006). Demam Tifoid, Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKIU.
- Yunita, W. C., Pramestutie, H. R., Illahi, R. K. & Achmad, A. (2018). Analisis Cost-Minimization Penggunaan Sefotaksim, Seftriakson dan

Levofloksasin pada Pasien Demam Tifoid dengan Status Pembayaran Umum dan Jaminan Kesehatan Nasional : Penelitian dilaksanakan di Rumah Sakit Daerah Kanjuruhan Kepanjen. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*; 4; 11-15.

Identifikasi Pengaruh Proses Perebusan dan Penggorengan Kacang Tolo (*Vigna unguiculata* L. Walp.) terhadap Komposisi Fitosterol

Noor Erma Nasution Sugijanto^{1*}, Citra Hayu Adi Makayasa², Gita Deseria¹, Rahmania Alrika Ilma Bridgeta¹, Miftakhul Rohmah Putri¹, Catur Dian Setiawan³, Sugijanto¹

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

²Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

³Departemen Farmasi Komunitas, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: noor-e-n@ff.unair.ac.id

Submitted: 10 Januari 2020

Accepted: 10 Februari 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) is a multipurpose legume which has hypocholesterolemic effect. It contains high protein also low fat and is usually consumed as food form by boiling and frying them.

Objective: This study aims to investigate the phytosterol composition on boiling and frying process in cowpea also to investigate boiling and frying process effects of cowpea on phytosterol composition. **Methods:** All of the samples were obtained from markets X, Y, and Z, East Java. Each sample was extracted with *n*-hexane, acetone, and chloroform then analysed by Thin Layer Chromatography (TLC), Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), Gas Chromatography-Flame Ionization Detector (GC-FID), and Gas Chromatography-Mass Selective Detector (GC-MSD). **Results:** The TLC and ATR-FTIR analysis showed the phytosterol content in cowpea. GC-FID showed that cholesterol, campesterol, stigmasterol, and sitosterol were identified in raw and boiled from three markets whilst in fried cowpea from one of the markets only contained stigmasterol and sitosterol. GC-MSD showed cholesterol, campesterol, stigmasterol, and sitosterol were identified in raw, boiled, and fried cowpea. **Conclusion:** Raw, boiled, and fried cowpea contained the phytosterol composition, such as cholesterol, campesterol, stigmasterol, and sitosterol. Boiling and frying process of cowpea could affect the phytosterol composition.

Keywords: *Vigna unguiculata* L. Walp., cowpea, phytosterol, boiling, frying

Abstrak

Pendahuluan: Kacang tolo (*Vigna unguiculata* L. Walp.) merupakan polong-polongan multiguna dapat berfungsi sebagai hipokolesterolemik. Kacang tersebut mengandung protein tinggi dan rendah lemak, sebagai bahan makanan dikonsumsi dengan cara direbus maupun digoreng. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi komposisi fitosterol pada kacang tolo yang mentah, direbus, dan digoreng serta mengidentifikasi pengaruh proses perebusan dan penggorengan kacang tolo terhadap komposisi fitosterol. **Metode:** Seluruh sampel diperoleh dari Pasar X, Y, dan Z, area Jawa Timur. Masing-masing sampel diekstraksi dengan *n*-heksana, aseton, dan kloroform kemudian dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR), Kromatografi Gas-Flame Ionization Detector (KG-FID), dan Kromatografi Gas-Mass Selective Detector (KG-MSD). **Hasil:** Analisis KLT dan ATR-FTIR menunjukkan adanya kandungan fitosterol pada kacang tolo. Analisis dengan KG-FID menunjukkan adanya kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan sitosterol pada kacang tolo mentah dan direbus dari Pasar X, Y, dan Z sedangkan kacang tolo yang digoreng dari Pasar X hanya mengandung stigmasterol dan sitosterol. KG-MSD menunjukkan adanya kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan sitosterol pada kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng. **Kesimpulan:** Kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dapat diidentifikasi adanya ke-

empat fitosterol, yaitu kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol. Proses perebusan dan penggorengan kacang tolo berpengaruh terhadap komposisi fitosterol.

Kata kunci: *Vigna unguiculata* L. Walp., kacang tolo, fitosterol, perebusan, penggorengan

PENDAHULUAN

Penyakit Jantung Koroner (PJK) merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia, terhitung sebesar 31,4% kematian terjadi pada tahun 2012 (Wadhera dkk., 2016). Data riset kesehatan dasar (Riskesdas) 2018 menunjukkan prevalensi PJK di Indonesia berdasarkan diagnosis dokter pada penduduk semua umur sebesar 1,5% (Badan Litbangkes, 2018). Penyakit ini disebabkan oleh penyempitan dinding arteri koronaria akibat pembentukan plak lemak, sehingga menurunkan aliran darah di pembuluh darah (Setyaji dkk., 2018). Tingginya kadar kolesterol atau disebut juga hiperkolesterolemia merupakan salah satu pemicu terjadinya PJK. Umumnya kondisi hiperkolesterolemia lebih besar terjadi pada wanita (14,5%) dibandingkan pria (8,6%) (Aurora dkk., 2012).

Salah satu faktor penting untuk menjaga kadar kolesterol di dalam tubuh agar tidak melebihi batas normal adalah jenis makanan. Pada beberapa buah, sayur, gandum, dan kacang-kacangan telah dilaporkan dapat membantu menurunkan kadar kolesterol karena mengandung fitosterol dan serat larut air (*soluble fiber*) (Ilmi dkk., 2015; Rahman & Probosari, 2014). Fitosterol merupakan metabolit struktural di membran sel tanaman dan memiliki struktur menyerupai kolesterol. Di dalam tubuh fitosterol dan kolesterol saling bersaing menempati *site*-aktif enzim pengangkut kolesterol, menyebabkan terjadinya pengurangan jumlah kolesterol yang terserap, sehingga kadarnya di dalam tubuh akan menurun (Talreja dkk., 2017).

Fitosterol dapat ditemukan pada berbagai spesies tanaman diketahui berjumlah lebih dari 200 jenis sterol. β -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol merupakan jenis sterol paling dominan terdapat di dalam tanaman (Nestola & Schmidt, 2016). Kandungan sterol total pada kacang-kacangan, diantaranya *pistachio* (276 mg/100 g), *almond* (183 mg/100 g), *hazelnut* (138 mg/100 g), *walnut* (127 mg/100 g), dan kacang tanah (104 mg/100 g) (Marangoni & Poli, 2010). Di sisi lain, Indonesia dikenal sebagai negara kaya akan biodiversitasnya, khususnya plasma nutfah hayati dalam hal ini kacang-kacangan, salah satu jenis kacang yang belum banyak dilaporkan kandungan fitosterolnya adalah kacang tolo.

Kacang tolo (*Vigna unguiculata* L. Walp.) merupakan jenis kacang dengan famili Leguminosae, mengandung komponen bioaktif, yaitu senyawa fenolik berperan sebagai antioksidan untuk melindungi tubuh terhadap berbagai macam penyakit (Gonçalves dkk., 2016). Kacang ini berpotensi sebagai penurun kadar kolesterol dan kadar glukosa di dalam darah (Kumar dkk., 2013). Di Indonesia, produktivitas kacang ini cukup tinggi dan pemanfaatannya biasanya diolah dengan cara direbus untuk dijadikan sayur atau digoreng. Proses perebusan dilakukan dalam air mendidih suhu 100°C selama 30 menit, sedangkan proses penggorengan dengan minyak goreng suhu 190°C selama 5 menit (Dovlo dkk., 1976; Mulyatiningsih, 2007).

Penggunaan panas dalam proses pemasakan, seperti perebusan dan penggorengan dapat mempengaruhi nilai gizi bahan pangan, salah satunya fitosterol (Sundari dkk., 2015). Fitosterol tidak akan mengalami perubahan jika diolah pada suhu lebih rendah dari 100°C, namun apabila dipanaskan pada suhu melebihi 200°C, maka lebih dari 50% sterol akan mengalami perubahan (Thanh dkk., 2006). Telah dipublikasikan, hasil penelitian di dalam kacang tanah direbus kadar sterolnya lebih tinggi dua hingga tiga kali dari kacang tanah mentah (Chen dkk., 2009). Peningkatan sterol ini dapat terjadi karena kehilangan karbohidrat, protein atau mineral di dalam sel kacang tersebut (Normén dkk., 1999). Penurunan sterol dapat terjadi pada sampel yang digoreng dan pada suhu 150°C (Normén dkk., 1999; Thanh dkk., 2006). Kehilangan beberapa sterol dapat terjadi, diakibatkan oleh pemecahan sel dan jaringan tanaman (Normén dkk., 1999).

Tahap awal identifikasi sterol dapat digunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan pereaksi penampak noda tertentu untuk mengetahui kandungan steroid di dalam sampel (Indrayanto dkk., 1994). Metode *Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared* (ATR-FTIR) juga dapat digunakan untuk melihat persentase kemiripan suatu senyawa dengan mengkorelasi sampel dengan standar (Sulistiyani, 2018). Metode analisis lain umumnya digunakan untuk mengidentifikasi fitosterol baik kualitatif maupun

kuantitatif adalah Kromatografi Gas-Flame Ionization Detector (KG-FID) (Inchingolo dkk., 2014). Metode ini memiliki resolusi yang baik, keterulangan, reproduktibilitas, presisi serta akurasi tinggi (Al-Bukhaiti dkk., 2017). Metode lainnya, seperti Kromatografi Gas-Mass Selective Detector (KG-MSD) dapat digunakan untuk mengidentifikasi kemurnian puncak (*peak*) sterol (Inchingolo dkk., 2014). Mengkaji hal-hal tersebut di atas, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi komposisi fitosterol pada kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng serta mengidentifikasi pengaruh proses perebusan dan penggorengan kacang tolo terhadap komposisi fitosterol. Dalam hal ini tidak dilakukan analisis perbedaan lokasi pengambilan sampel kacang tolo dari Pasar X, Y, dan Z terhadap komposisi fitosterol.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Standar kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol (Sigma-Aldrich). Pelarut *n*-heksana p.a, etil asetat p.a, aseton p.a, kloroform p.a, asam klorida p.a, natrium hidroksida p.a, dan plat silika gel 60 F254 diperoleh dari Merck. Penampak noda KLT anisaldehyd-asam sulfat dan aquadest.

Sampel kacang tolo berasal dari tiga pasar di Jawa Timur. Pasar X berlokasi di Tegalsari, Surabaya, Pasar Y di Gunung Sari, Surabaya, dan Pasar Z berlokasi di Madyopuro, Malang. Ketiga sampel kacang tersebut telah diidentifikasi sebagai *Vigna unguiculata* L. Walp. oleh Dr. Sugeng Budiharta, M.Sc. dari Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Purwodadi, Jawa Timur.

Alat

Chromatographic plate 20 cm x 10 cm *Silica Gel* 60 F254 *TLC plate*, Merck (Darmstadt, Germany), *Camag chamber* 20 cm x 10 cm, kapiler 2 μ L. ALPHA II FTIR spektrometer, *Hewlett Packard Gas Chromatograph* 5890 *Series II* dengan *Flame Ionization Detector* (FID) dan kolom HP-5 (*cross-linked 5% phenyl methyl silicone*, 25 m x 0,32 mm x 0,17 μ m *film thickness*), *Gas Chromatograph* 6890N *series-Agilent* 7697A dengan detektor *Agilent* 5973 *inert MSD* dan kolom HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), alat suntik (Hamilton Micro Syringe 10 μ L), *moisture content* (Mettler Toledo), *ultrasonic* (Branson 1510), *vortex* (IKA), dan *centrifuge* (EBA-20).

Metode

Preparasi sampel

Kacang tolo mentah digunakan sebagai kontrol, dihomogenisasi dengan blender kemudian diayak. Kacang tolo diolah dengan merebus kacang di air mendidih suhu 100°C selama 30 menit sedangkan kacang digoreng diolah dengan menggoreng kacang pada minyak panas suhu 190°C selama 5 menit. Setelah dilakukan pemasakan, kacang tolo yang direbus dan digoreng dihomogenisasi dengan blender.

Kadar air pada kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng ditentukan dengan alat Mettler Toledo. Hasil pengukuran kadar air digunakan sebagai dasar perhitungan dalam penimbangan kacang agar diperoleh sampel sejumlah kurang lebih 1 gram berat kering. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali pada seluruh sampel.

Ekstraksi fitosterol

Kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng diekstraksi dengan *n*-heksana selama 15 menit menggunakan ultrasonik, di-vorteks 10 menit, dan di-sentrifugasi pada 2.500 rpm selama 10 menit (tahapan ini diulangi lima kali). Seluruh filtrat dikumpulkan dan diuapkan hingga kering, diperoleh ekstrak *n*-heksana.

Residu kacang tolo diekstraksi dengan aseton menggunakan tahapan yang sama seperti sebelumnya dan diulangi tiga kali. Seluruh filtrat dikumpulkan dan diuapkan hingga kering, diperoleh ekstrak aseton. Selanjutnya residu kacang tolo dihidrolisis dengan asam klorida (HCl) 2 N pada suhu 90-100°C selama 30 menit, didinginkan, dinetralisasi dengan natrium hidroksida (NaOH) 12 N hingga pH 10, dan disaring kemudian filtrat diekstraksi dengan kloroform menggunakan tahapan seperti sebelumnya dan diulangi tiga kali. Seluruh filtrat dikumpulkan dan diuapkan hingga kering, diperoleh ekstrak kloroform (Indrayanto dkk., 1994).

Identifikasi fitosterol dengan KLT

Standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) dan ekstrak *n*-heksana kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform kemudian ditotolkan sebanyak 2-4 μ L pada plat silika gel 60 F254 dan dieluasi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (4:1) v/v kemudian disemprot dengan pereaksi penampak noda anisaldehyd-H₂SO₄ (Indrayanto dkk., 1994).

Identifikasi fitosterol dengan ATR-FTIR

Standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) dan ekstrak *n*-heksana kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dalam kloroform, masing-masing ditempatkan pada *plate platinum* yang dilengkapi dengan material kristal ZnSe. Ujung kristal diposisikan menyentuh larutan dengan sedikit tekanan untuk memastikan adanya kontak penuh antara larutan dan kristal. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 4000 cm^{-1} hingga 600 cm^{-1} . Hasil spektrum inframerah senyawa standar dan sampel dibandingkan kemiripannya sebagai persentase korelasi.

Identifikasi fitosterol dengan KG-FID

Standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) dan ekstrak (*n*-heksana, aseton, dan kloroform) kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dalam kloroform, diidentifikasi dengan KG-FID (*Hewlett Packard Gas Chromatograph 5890 Series II, Flame Ionization Detector (FID)*), dan kolom HP-5 (*cross-linked 5% phenyl methyl silicone, 25 m \times 0,32 mm \times 0,17 μm film thickness*), gas pembawa helium dengan kecepatan alir 1,7 kg/cm^2 , rasio *split* 25 : 1, diinjeksikan 2 μL pada suhu isothermal 290°C dengan waktu analisis 30 menit.

Analisis kualitatif pada ekstrak (*n*-heksana, aseton, dan kloroform) kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dilakukan dengan membandingkan waktu retensi relatif sampel dan standar. Jika waktu retensi relatifnya sama, diperkirakan sampel mengandung senyawa yang sama dengan standar (McNair & Miller, 2009). Hal ini perlu dilakukan analisis lainnya untuk konfirmasi, dalam penelitian ini dengan KG-MSD.

Analisis semi-kuantitatif pada ekstrak *n*-heksana kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dihitung dalam persentase relatif fitosterol berdasarkan rumus (McNair & Miller, 2009):

$$\% \text{ Area X} = \left[\frac{A_x}{\sum_i (A_i)} \right] \times 100$$

% Area X = persentase relatif sterol X (%);

A_x = Area sterol X; A_i = Area sterol total.

Identifikasi fitosterol dengan KG-MSD

Standar (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) dan ekstrak *n*-heksana kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) dalam kloroform, diidentifikasi dengan KG-MSD (*Gas Chromatograph 6890N series-Agilent 7697A, Agilent 5973 inert MSD equipped with a capillary column (30 m \times 0,25 mm i.d \times 0,25 μm film thickness HP-5MS)*), kecepatan alir 9,2 mL/menit , splitless, diinjeksikan 0,4 μL pada suhu 220-270°C dengan kenaikan 10°C/menit menggunakan metode *Selected Ion Monitoring (SIM)*.

Analisis data

Hasil dianalisis dengan *Statistical Product and Services Solutions (SPSS) Statistics 17.0* dengan membandingkan proses pemasakan kacang tolo (mentah, direbus, dan digoreng) terhadap komposisi fitosterol menggunakan *Multivariate Analysis of Variance (MANOVA)*. Nilai signifikansi $< 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fitosterol terdiri dari kerangka steroid sejumlah 27 hingga 30 atom karbon sebagai kerangka utama dengan gugus hidroksil pada posisi C-3, ikatan rangkap pada posisi C-5, dan rantai samping alifatik pada posisi C-17 (Jannah dkk., 2013; Wadikar dkk., 2017). β -sitosterol, kampesterol, dan stigmasterol memiliki kelimpahan di alam sekitar 65%, 30%, dan 3% (Brufau dkk., 2008), namun hal ini dipengaruhi jenis tumbuhannya. Kacang-kacangan memiliki komposisi nutrisi yang baik bagi kesehatan, seperti asam lemak tidak jenuh, serat, mineral, vitamin, fitosterol, dan kandungan bioaktif lainnya, mengkonsumsinya secara rutin, dapat menurunkan resiko penyakit kardiovaskular (Guasch-Ferré dkk., 2017).

Kacang tolo dapat tumbuh dan beradaptasi di daerah tropis dan subtropis dengan kandungan gizi, diantaranya protein 24,6 g, karbohidrat 66,6 g, serat 1,6 g, dan kalsium 0,481 g per 100 g kacang tolo mentah. Proses pemasakan kacang tolo, seperti perebusan dan penggorengan dapat mengurangi kandungan gizi di dalam kacang tolo, sehingga sangat penting untuk memperhatikan cara pengolahan bahan pangan sebelum dikonsumsi agar manfaat nutrisi yang terkandung di dalamnya dapat diperoleh secara optimal (DepKes RI, 1995). Kacang ini oleh masyarakat diolah sebagai bahan campuran pada makanan lodeh, gudeg, lepet ketan, dan bubur juga disajikan dengan digoreng sebagai makanan ringan.

Pada penelitian ini kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dari Pasar X, Y, dan Z diambil untuk mewakili kacang tolo yang dipasarkan di masyarakat namun demikian dalam hal ini tidak dilakukan analisis perbedaan lokasi kacang tolo terhadap komposisi fitosterol. Kacang tolo dihomogenisasikan hingga halus menjadi serbuk kemudian kadar air diukur untuk memperhitungkan penimbangan berat kering sampel pada tahap ekstraksi. Hasil kadar air dan penimbangan kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dapat diamati pada Tabel 1.

Tabel 1. Kadar air dan penimbangan kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng

Pasar	Kacang tolo	Kadar air (%)	Berat kacang (g)		
			I	II	III
X	Mentah	9,46 ± 1,45	1,0020	1,0025	1,0020
	Direbus	57,76 ± 0,52	2,3531	2,3736	2,3593
	Digoreng	1,18 ± 0,98	1,1029	1,1014	1,1012
Y	Mentah	9,45 ± 0,11	1,1913	1,2001	1,1964
	Direbus	52,54 ± 0,20	2,1941	2,1892	2,1909
	Digoreng	1,58 ± 0,01	1,0254	1,0233	1,0239
Z	Mentah	12,22 ± 0,04	1,2387	1,2453	1,2316
	Direbus	56,50 ± 0,31	2,4585	2,4348	2,4394
	Digoreng	3,18 ± 0,04	1,1247	1,1299	1,1275

Kadar air terendah pada kacang tolo digoreng, dibawah 5% disebabkan oleh proses oksidasi cairan pada bahan pangan selama proses penggorengan, sehingga menghasilkan olahan kering (Guallar dkk., 2007). Kadar air di atas 50% pada kacang tolo direbus merupakan kadar air tertinggi karena terjadinya proses difusi panas dan massa air pada matriks kacang, sehingga kadar air meningkat (Pangastuti dkk., 2013). Kandungan air dalam sampel melebihi 18% dapat menurunkan efisiensi ekstraksi (Nagy & Simándi, 2008). Perbedaan kepolaran antara air, bersifat polar, sebagai media proses perebusan dan *n*-heksana, bersifat non-polar, sebagai pelarut pengekstraksi dapat menurunkan efisiensi proses ekstraksi. Upaya yang dapat dilakukan untuk memperoleh hasil ekstraksi secara optimal, melalui proses pengeringan ulang pada suhu 45 - 50°C setelah sampel ditimbang secara seksama. Hal ini bertujuan untuk memperoleh kadar air kurang dari 18% pada kacang tolo direbus.

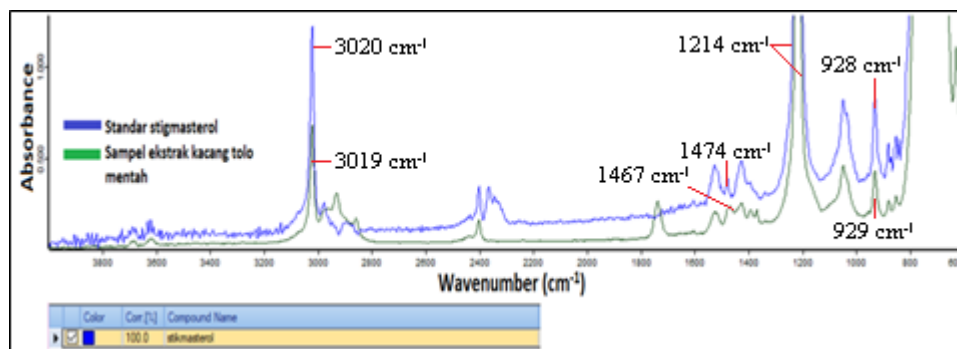
Proses ekstraksi mengacu pada prosedur Indrayanto dkk. (1994), menggunakan pelarut *n*-heksana untuk mengekstraksi fitosterol bebas, selanjutnya digunakan pelarut aseton untuk memastikan fitosterol bebas telah terekstraksi sempurna pada ekstraksi sebelumnya. Selain fitosterol bebas, fitosterol terdapat dalam bentuk terikat (teresterifikasi atau terglisilasi), sehingga dilakukan pemutusan ikatan ester pada fitosterol terikat melalui tahapan hidrolisis menggunakan HCl 2 N pada suhu 90-100°C (Indrayanto dkk., 1994; Moreau dkk., 2002). Proses netralisasi dengan NaOH 12 N dilakukan setelahnya untuk memisahkan senyawa asam karboksilat dari proses hidrolisis agar membentuk garam, sehingga asam karboksilat ini tidak ikut terekstraksi dan akan terlarut dalam fase air. Pelarut kloroform digunakan dalam proses ekstraksi berikutnya untuk memperoleh fitosterol bebas yang telah terlepas dari senyawa lain (Indrayanto dkk., 1994).

Kromatografi lapis tipis digunakan dalam identifikasi awal secara kualitatif untuk mengetahui keberadaan fitosterol di dalam sampel. Dalam pengujian ini, noda sampel berwarna ungu dengan nilai *Retention Factor* (Rf) sampel sama dengan standar, yaitu stigmasterol sebagai pembanding. Bercak noda berwarna ungu menandakan adanya terpenoid atau steroid (Sherma & Fried, 2003). Inti struktur fitosterol adalah steroid dan berdasarkan hasil tersebut keseluruhan sampel mengandung terpenoid atau steroid. Kandungan yang diduga terdapat di dalam sampel adalah golongan sterol. Pemastian keberadaan kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol di dalam sampel dapat diidentifikasi dengan metode analisis selanjutnya.

Identifikasi fitosterol dengan ATR-FTIR digunakan untuk memastikan keberadaan fitosterol pada proses perebusan dan penggorengan kacang tolo. Kolesterol memberikan serapan spesifik, gugus O-H pada 3430 cm⁻¹, gugus C-O pada 1055 cm⁻¹, gugus C=C pada 1464 cm⁻¹, dan gugus C-C pada 955 cm⁻¹ (Ferrero dkk., 2015). Stigmasterol memberikan serapan spesifik, gugus O-H pada 3335 cm⁻¹, gugus C=C pada 1667 cm⁻¹, dan C-H pada 879 cm⁻¹ sedangkan β -sitosterol, gugus O-H pada 3331 cm⁻¹, gugus C=C pada 1654 cm⁻¹, dan gugus C-C pada 1062 cm⁻¹ (Rajput & Rajput, 2012). Hasil identifikasi spektra inframerah ATR-FTIR standar fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) menunjukkan serapan spesifik, gugus O-H pada 3020 cm⁻¹, gugus C-O pada 1214 cm⁻¹, gugus C=C pada 1474 cm⁻¹, dan gugus C-C pada 928 cm⁻¹. Kemiripan spektra inframerah ATR-FTIR pada ke-empat standar fitosterol disebabkan oleh struktur inti steroid di dalam senyawa tersebut relatif sama. Spektra inframerah ATR-FTIR kacang tolo mentah menunjukkan serapan spesifik, gugus O-H pada 3019 cm⁻¹, gugus C-O pada 1214 cm⁻¹, gugus C=C pada 1467 cm⁻¹, dan gugus C-C pada 929 cm⁻¹. Kacang tolo direbus memberikan serapan spesifik,

gugus O-H pada 3019 cm^{-1} , gugus C-O pada 1214 cm^{-1} , gugus C=C pada 1476 cm^{-1} , dan gugus C-C pada 929 cm^{-1} . Kacang tolo digoreng menghasilkan serapan spesifik, gugus O-H pada 3019 cm^{-1} , gugus C-O pada 1214 cm^{-1} , gugus C=C pada 1465 cm^{-1} , dan gugus C-C pada 928 cm^{-1} . Perbedaan bilangan gelombang pada standar dan sampel disebabkan karena adanya pengaruh matriks yang terdapat pada sampel (Duarte dkk., 2002). Hasil identifikasi spektra inframerah ATR-FTIR pada standar dan sampel dianalisis

kemiripannya menggunakan parameter persen korelasi. Dalam pengujian ini, kacang tolo mentah dan direbus menunjukkan persen korelasi 100% terhadap standar sedangkan persen korelasi kacang tolo digoreng sebesar 99,7%. Hal tersebut disebabkan oleh pengaruh minyak, sebagai media proses penggorengan, kemungkinan ikut masuk ke dalam matriks, sehingga mempengaruhi hasil analisis ATR-FTIR. Salah satu contoh hasil persen korelasi antara kacang tolo mentah terhadap stigmasterol dapat diamati pada Gambar 1.



Gambar 1. Spektra inframerah ATR-FTIR persen korelasi kacang tolo mentah dan stigmasterol

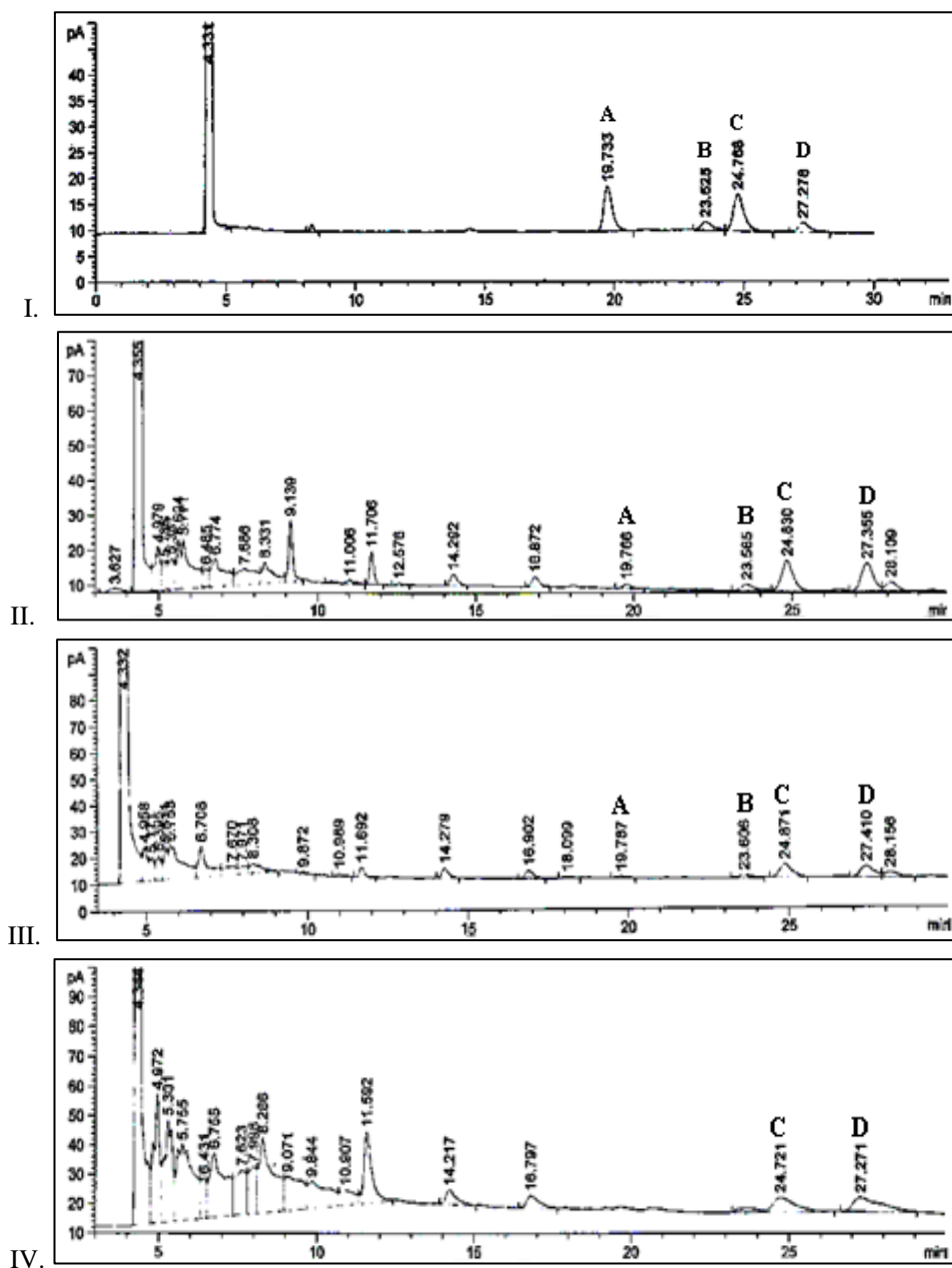
Analisis kualitatif menggunakan KG-FID dilakukan dengan membandingkan waktu retensi relatif sampel dan standar. Waktu retensi relatif standar fitosterol dan sampel dari ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dapat diamati pada Tabel 2 dan Tabel 3. Dalam pengujian ini, waktu

retensi relatif sampel dan standar adalah sama, sehingga sampel memiliki probabilitas senyawa sterol yang sama dengan standar. Kromatogram KG-FID standar fitosterol dan salah satu contoh kromatogram KG-FID ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng disajikan pada Gambar 2.

Tabel 2. Waktu retensi relatif standar fitosterol

Standar	Waktu retensi standar (menit)	Waktu retensi relatif standar*
Kolesterol	19,733	0,80
Kampesterol	23,525	0,95
Stigmasterol	24,768	1,00
β -Sitosterol	27,278	1,10

*Waktu retensi relatif dihitung dengan membandingkan waktu retensi tiap sterol terhadap waktu retensi stigmasterol



Gambar 2. Kromatogram KG-FID (*Hewlett packard gas chromatograph 5890 series II, flame ionization detector* (FID), kolom HP-5 (*cross-linked 5% phenyl methyl silicone, 25 m × 0.32 mm × 0,17 μm film thickness*), gas pembawa helium kecepatan alir 1,7 Kg/cm², rasio *split* 25 : 1, volume injeksi 2 μL, suhu isothermal 290°C selama 30 menit. standar fitosterol (I) dan ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah (II), direbus (III), digoreng (IV). kolesterol (A), kampesterol (B), stigmasterol (C), dan β-sitosterol (D)

Tabel 3. Waktu retensi relatif ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng

Pasar	Kacang tolo	Waktu retensi (menit)											
		Kolesterol			Kampesterol			Stigmasterol			β-sitosterol		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
X	Mentah	19,768	19,751	19,766	23,568	23,545	23,565	24,844	24,816	24,830	27,369	27,342	27,355
	Direbus	19,744	19,773	19,787	23,530	23,578	23,606	24,801	24,837	24,871	27,321	27,355	27,410
	Digoreng	-	-	-	-	-	-	24,721	24,667	24,341	27,271	27,190	26,833
Y	Mentah	19,712	19,882	19,780	23,509	23,554	23,559	24,776	24,861	24,820	27,039	27,404	27,340
	Direbus	19,746	19,848	19,832	23,543	23,663	23,618	24,802	24,900	24,878	27,326	27,450	27,422
	Digoreng	19,702	19,726	19,833	23,511	23,559	23,680	24,761	24,831	24,946	27,261	27,331	27,486
Z	Mentah	19,786	19,717	19,721	23,620	23,500	23,491	24,873	24,759	24,751	27,390	27,273	27,274
	Direbus	19,793	19,811	19,773	23,619	23,629	23,581	24,873	24,888	24,840	27,412	27,413	27,374
	Digoreng	19,684	19,745	19,883	23,493	23,596	23,680	24,739	24,830	24,946	27,247	27,367	27,486
Waktu retensi relatif*		0,80			0,95			1,00			1,10		

*Waktu retensi relatif sampel dihitung dengan membandingkan waktu retensi tiap sterol terhadap waktu retensi stigmasterol

Tabel 4. Persentase fitosterol* ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng

Pasar	Kacang tolo	Kolesterol (%)			Kampesterol (%)			Stigmasterol (%)			β-sitosterol (%)		
		I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
X	Mentah	5,24	3,97	4,67	10,05	10,56	10,95	41,80	42,69	42,69	42,91	41,69	41,69
	Direbus	5,92	5,33	4,86	10,43	9,89	10,16	43,35	44,87	44,58	40,30	39,91	40,40
	Digoreng	-	-	-	-	-	-	50,09	45,27	50,23	49,91	54,73	49,77
Y	Mentah	4,57	9,22	5,00	10,40	8,50	9,83	44,66	41,62	44,27	40,38	40,66	40,90
	Direbus	19,98	5,53	5,40	9,66	9,24	7,92	37,02	47,73	45,24	33,34	37,50	41,44
	Digoreng	2,74	5,65	16,61	11,17	10,26	14,56	39,40	37,27	29,97	46,69	46,82	38,86
Z	Mentah	4,81	5,22	4,40	9,53	9,78	10,37	45,18	45,91	46,42	40,49	39,09	38,81
	Direbus	17,56	6,51	19,76	9,81	9,45	9,15	39,27	45,26	38,02	33,36	38,78	33,07
	Digoreng	13,46	14,90	16,61	10,02	21,07	14,56	31,10	27,36	29,97	45,52	36,66	38,86

*Persentase fitosterol dihitung berdasarkan area sterol yang terdeteksi dibandingkan dengan area sterol total yang terdeteksi

Tabel 4 menunjukkan komposisi fitosterol pada ekstrak *n*-heksana di dalam kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng. Komposisi fitosterol diperoleh dari hasil perhitungan area kromatogram KG-FID secara semi-kuantitatif sebagai kadar relatif fitosterol. Cara perhitungan mengacu pada McNair & Miller (2009) dan juga telah digunakan pada publikasi Kaloustian dkk. (2008) dengan membandingkan area sterol "x" terhadap area sterol total. Kacang tolo digoreng dari Pasar X memiliki perbedaan komposisi fitosterol dibandingkan Pasar Y dan Z, yaitu hanya mengandung stigmasterol dan sitosterol. Perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh proses difusi panas dengan mekanisme transfer panas dari media pemasakan ke dalam bahan disertai laju panas terdifusi keluar masuk ke dalam bahan secara natural untuk mendistribusikan panas ke seluruh bagian produk. Proses ini mengakibatkan terbawanya fitosterol ke media pemasakan, yaitu minyak, sehingga fitosterol berkurang saat proses penggorengan (Fontana dkk., 2001). Terjadinya proses degradasi saat penggorengan pada suhu tinggi juga dapat menyebabkan berkurangnya fitosterol pada bahan (Cantrill & Kawamura, 2008). Pada pengujian ini dilakukan replikasi tiga kali, meskipun bersifat semi kuantitatif, namun pada beberapa sampel terlihat data persentase fitosterol yang cukup bervariasi. Hal ini berkaitan dengan analisis fitosterol dalam sampel dari bahan alam, yaitu kacang tolo dengan kandungan fitosterol relatif kecil, sehingga untuk bahan alam Horwitz (2013) memberikan kelonggaran persen rekovery cukup lebar, yaitu 80-110%.

Dalam pengujian ini, ekstrak aseton dan kloroform kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng menunjukkan tidak adanya puncak sterol yang terdeteksi. Hal tersebut membuktikan seluruh sterol telah terekstraksi sempurna pada ekstraksi *n*-heksana sebelumnya dan tidak terdapat fitosterol terikat di dalam ekstrak kloroform.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi pengaruh proses perebusan dan penggorengan kacang

tolo terhadap komposisi fitosterol. Analisis data menggunakan uji MANOVA dengan membandingkan proses pemasakan (mentah, direbus, dan digoreng) terhadap area fitosterol (kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol) dari kromatogram KG-FID. Hasil analisis statistika menunjukkan perbedaan signifikan pada area sitosterol antara kacang tolo direbus dan digoreng sedangkan pada area kolesterol, kampesterol, dan stigmasterol antara kacang tolo direbus dan digoreng tidak berbeda signifikan. Komposisi fitosterol pada kacang tolo direbus sama dengan kacang tolo mentah dan keduanya tidak berbeda signifikan. Sementara itu, perbedaan komposisi fitosterol pada kacang tolo direbus dan kacang tolo digoreng dapat disebabkan perbedaan suhu saat proses pemasakan kacang tolo, diantaranya proses perebusan pada suhu 100°C sedangkan proses penggorengan pada suhu 190°C.

Penentuan senyawa hasil analisis KG-MSD mengacu pada *European Commission Decision* 2002/657/EC, yaitu dalam identifikasi harus menunjukkan kesamaan empat fragmen spesifik dengan intensitas yang tidak jauh berbeda dengan pembanding *database*. Dalam pengujian ini digunakan *database Wiley 7.0* dari instrumen KG-MSD. Ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dianalisis dengan KG-MSD. Kacang tolo mentah dijadikan acuan sebagai pembanding dengan proses pemasakan, yaitu perebusan dan penggorengan. Hasil analisis menunjukkan inti steroid pada fragmen ion spesifik di *m/z* 255, 271, dan 273 (Zhao dkk., 1989). Senyawa fitosterol pada ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng memiliki fragmen khas dan dapat diamati pada Tabel 5. Fragmen tersebut digunakan untuk mengkonfirmasi kandungan fitosterol dari pengujian KLT dan KG-FID. Dalam pengujian KG-MSD membuktikan bahwa kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng mengandung fitosterol, yaitu kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β -sitosterol.

Tabel 5. Ion molekular dan fragmentasi kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β-sitosterol yang teridentifikasi pada ekstrak *n*-heksana kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng

Ion molekular [M] ⁺ dan fragmen	Senyawa pada kacang tolo (<i>m/z</i>)		
	Mentah	Direbus	Digoreng
Kolesterol			
[M] ⁺	386	386	-
[M-H ₂ O] ⁺	368	368	-
[M-C ₅ H ₇ -H ₂ O] ⁺	303	303	-
[M- <i>side chain</i>] ⁺	275	275	-
[M- <i>side chain</i> -H ₂ O] ⁺	255	255	-
Kampesterol			
[M] ⁺	400	400	-
[M-H ₂ O] ⁺	382	382	-
[M-C ₅ H ₇ -H ₂ O] ⁺	315	-	-
[M- <i>side chain</i>] ⁺	273	273	-
[M- <i>side chain</i> -H ₂ O] ⁺	255	255	-
Stigmasterol			
[M] ⁺	412	412	412
[M-H ₂ O] ⁺	394	394	-
[M-C ₃ H ₇ -H ₂ O] ⁺	351	351	351
[M- <i>side chain</i> -2H] ⁺	271	271	271
[M- <i>side chain</i> -H ₂ O] ⁺	255	255	255
β-sitosterol			
[M] ⁺	414	414	414
[M-H ₂ O] ⁺	396	396	396
[M-C ₃ H ₇ -H ₂ O] ⁺	303	303	303
[M- <i>side chain</i> -2H] ⁺	273	-	273
[M- <i>side chain</i> -H ₂ O] ⁺	255	255	255

KESIMPULAN

Kacang tolo mentah, direbus, dan digoreng dapat diidentifikasi adanya keempat fitosterol, yaitu kolesterol, kampesterol, stigmasterol, dan β-sitosterol. Proses perebusan dan penggorengan kacang tolo berpengaruh terhadap komposisi fitosterol.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Prof. Dr. rer.nat. Gunawan Indrayanto yang telah memfasilitasi penyediaan keempat senyawa standar fitosterol (*Sigma-Aldrich*).

DAFTAR PUSTAKA

Al-Bukhaiti, W. Q., Noman, A., Qasim, A. S. & Al-Farga, A. (2017). Gas Chromatography: Principles, Advantages and Applications in Food Analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*; 6; 123–128.

Aurora, R. G., Sinambela, A. & Noviyanti, C. H. (2012). Peran Konseling Berkelanjutan pada Penanganan Pasien Hiperkolesterolemia. *Journal of the Indonesian Medical Association*; 62; 194–201.

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Badan Litbangkes). (2018). Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI.

Brufau, G., Canela, M. A. & Rafecas, M. (2008). Phytosterols: Physiologic and Metabolic Aspects Related to Cholesterol-Lowering Properties. *Nutrition Research*; 28; 217–225.

Cantrill, R. & Kawamura, Y. (2008). Phytosterols, Phytostanols, and Their Esters. London: Forbes Medi-Tech Inc.

Chen, Q., Gruber, H., Pakenham, C., Ratnayake, W. M. N. & Scoggan, K. A. (2009). Dietary Phytosterols and Phytostanols Alter the Expression of Sterol-Regulatory Genes in SHRSP and WKY Inbred Rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*; 55; 341–350.

Departemen Kesehatan RI (DepKes RI). (1995). Daftar Komposisi Zat Gizi Pangan Indonesia. Jakarta: Direktorat Jenderal Pembinaan Kesehatan Masyarakat.

Dovlo, F. E., Williams, C. E. & Zoaka, L. (1976). Cowpeas: Home Preparation and Use in West Africa. Canada: International Development Research Centre.

- Duarte, M. L., Ferreira, M. C., Marvão, M. R. & Rocha, J. (2002). An Optimised Method to Determine the Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan by FTIR Spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*; 31; 1–8.
- Ferrero, F., Mossotti, R., Innocenti, R., Coppa, F. & Periolatto, M. (2015). Enzyme-aided Wool Dyeing: Influence of Internal Lipids. *Fibers and Polymers*; 16; 363–369.
- Fontana, A. J., Wacker, B. & Champbell, C. S. (2001). Simultaneous Thermal Conductivity, Thermal Resistivity, and Thermal Diffusivity Measurement of Selected Foods and Soils California, USA. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*; 95; 45–48.
- Gonçalves, A., Goufo, P., Barros, A., Domínguez-Perles, R., Trindade, H., Rosa, E. A. S., Ferreira, L. & Rodrigues, M. (2016). Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.), a Renewed Multipurpose Crop for a More Sustainable Agri-food System: Nutritional Advantages and Constraints. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 96; 2941–2951.
- Guallar, C. P., Rodriguez, A. F., Fornes, N. S., Banegas, J. R., Etxezarreta, P. A. & Ardanaz, E. (2007). Intake of Fried Foods is Associated with Obesity in the Cohort of Spanish Adults from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*; 86; 198–205.
- Guasch-Ferré, M., Liu, X., Malik, V. S., Sun, Q., Willett, W. C., Manson, J. A. E., Rexrode, K. M., Li, Y., Hu, F. B. & Bhupathiraju, S. N. (2017). Nut Consumption and Risk of Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*; 70; 2519–2532.
- Horwitz. (2013). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf. Accessed: 10 Januari 2020.
- Ilmi, I. M. B., Ali, K. & Sri, A. M. (2015). Cara Pengolahan Makanan Rumah Tangga Indonesia. Jakarta: Indonesian Food Technology.
- Inchingolo, R., Cardenia, V. & Rodriguez-Estrada, M. T. (2014). Analysis of Phytosterols and Phytostanols in Enriched Dairy Products by Fast Gas Chromatography with Mass Spectrometry. *Journal of Separation Science*; 37; 2911–2919.
- Indrayanto, G., Studiawan, H. & Cholies, N. (1994). Isolation and Quantitation of Manogenin and Kammogenin from Callus Cultures of *Agave amaniensis*. *Phytochemical Analysis*; 5; 24–26.
- Jannah, H., Sudarma, I. M. & Andayani, Y. (2013). Analisis Senyawa Fitosterol dalam Ekstrak Buah Buncis (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Chemical Program*; 6; 70–75.
- Kaloustian, J., Alhanout, K., Amiot-Carlin, M. J., Lairon, D., Portugal, H. & Nicolay, A. (2008). Effect of Water Cooking on Free Phytosterol Levels in Beans and Vegetables. *Food Chemistry*; 107; 1379–1386.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K. & Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography: a Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medical Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*; 18; 126–132.
- Marangoni, F. & Poli, A. (2010). Phytosterols and Cardiovascular Health. *Pharmacological Research*; 61; 193–199.
- McNair, H. M. & Miller, J. M. (2009). Chapter 8. Qualitative and quantitative analysis. In: *Basic Gas Chromatography*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. (2002). Phytosterols, Phytostanols, and Their Conjugates in Foods: Structural Diversity, Quantitatively Analysis, and Health-promoting Uses. *Progress in Lipid Research*; 41; 457–500.
- Mulyatiningsih, E. (2007). Teknik-teknik Dasar Memasak. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta.
- Nagy, B. & Simándi, B. (2008). Effects of Particle Size Distribution, Moisture Content, and Initial Oil Content on the Supercritical Fluid Extraction of Paprika. *Journal of Supercritical Fluids*; 46; 293–298.
- Nestola, M. & Schmidt, T. C. (2016). Fully Automated Determination of the Sterol Composition and Total Content in Edible Oils and Fats by Online Liquid Chromatography-Gas Chromatography-Flame Ionization Detector. *Journal of Chromatography A*; 1463; 136–143.
- Normén, L., Johnsson, M., Andersson, H., Gameren, Y. & Dutta, P. (1999). Plant Sterols in Vegetables and Fruits Commonly Consumed in

- Sweden. *European Journal of Nutrition*; 38; 84–89.
- Pangastuti, H. A., Affandi, D. R. & Ishartani, D. (2013). Karakterisasi Sifat Fisik dan Kimia Tepung Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) dengan Beberapa Perlakuan Pendahuluan. *Jurnal Teknosains Pangan*; 2; 20–29.
- Rahman, M. & Probosari, E. (2014). Perbedaan Kadar Kolesterol LDL dan HDL Sebelum dan Setelah Pemberian Sari Bengkuang (*Pachyrrhizus erosus*) pada Wanita. *Jurnal of Nutrition College*; 3; 587–594.
- Rajput, A. P. & Rajput, T. A. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -sitosterol from Chloroform Extract of Leaves of *Corchorus fascicularis* Lam. *International Journal of Biological Chemistry*; 6; 130–135.
- Setyaji, D. Y., Prabandari, Y. S. & Gunawan, I. M. A. (2018). Aktivitas Fisik dengan Jantung Koroner di Indonesia. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*; 14; 115–121.
- Sherma, J. & Fried, B. (2003). Steroids. In: *Handbook of Thin-Layer Chromatography*, 3rd edition. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Sulistiyani, M. (2018). Spektroskopi *Fourier Transform Infra Red* dengan Metode Reflektansi (ATR-FTIR) pada Optimasi Pengukuran Spektrum Vibrasi Vitamin C. *Jurnal Teknologi dan Manajemen Pengelolaan Laboratorium*; 1; 39–43.
- Sundari, D., Almasyhuri, A. & Lamid, A. (2015). Pengaruh Proses Pemasakan terhadap Komposisi Zat Gizi Bahan Pangan Sumber Protein. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*; 25; 235–242.
- Talreja, T., Kumar, M., Goswami, A., Gahlot, G., Jinger, A. K. & Sharma, T. (2017). Qualitative and Quantitative Estimation of Phytosterols in *Achyranthes aspera* and *Cissus quadrangularis* by HPLC. *The Pharma Innovation Journal*; 6; 76–79.
- Thanh, T. T., Vergnes, M. F., Kaloustian, J., El-Moselhy, T. F., Amiot-Carlin, M. J. & Portugal, H. (2006). Effect of Storage and Heating on Phytosterol Concentrations in Vegetable Oils Determined by GC/MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; 86; 220–225.
- Wadhera, R. K., Steen, D. L., Khan, I., Giugliano, R. P. & Foody, J. M. (2016). A Review of Low-Density Lipoprotein Cholesterol, Treatment Strategies, and Its Impact on Cardiovascular Disease Morbidity and Mortality. *Journal of Clinical Lipidology*; 10; 472–489.
- Wadikar, D., Lakshmi, I. & Patki, P. (2017). Phytosterols: An Appraisal of Present Scenario. *Acta Scientific Nutritional Health*; 1; 25–34.
- Zhao, H., Zhao, S., Sun, C. & Guillaume, D. (1989). Glucosylsterols in Extracts of *Euryale ferox* Identified by High Resolution NMR and Mass Spectrometry. *The Journal of Lipid Research*; 30; 1633–1637.

Karakteristik dan Stabilitas Fisik Krim Amniotic Membrane Stem Cell Metabolite Product dengan Penambahan SPACE Peptide

Nisa Qurrota A'yun¹, Tristiana Erawati^{1*}, Cita Rosita Sigit Prakoeswo^{2,3}, Widji Soeratri¹

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

²Departemen Kesehatan Kulit dan Kelamin, Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

³Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin, RSUD Dr. Soetomo, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: era_ffua@yahoo.co.id

Submitted: 17 Januari 2020

Accepted: 28 Januari 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: The use of growth factors in cosmetics is a promising effort in overcoming aging, and becomes a challenge for its use. Physical characteristics and stability are important parameters in the cosmetic preparations which contain growth factors because they can directly influence the effectiveness of antiaging efficacy. **Objective:** To evaluate the effect of the addition of SPACE peptide at different weight ratio to Amniotic Membrane Stem Cell Metabolite Product (AMSC-MP) (F1 = 1:0; F2 = 1:1; F3 = 1:2; F4 = 1:3) on the characteristics and physical stability of the antiaging cream. **Methods:** The antiaging cream were firstly determined for organoleptic, pH, and spreadibility. Physical stability was evaluates for the antiaging cream during the preparation for 21 days of storage. **Results:** Cream preparations which contains AMSC-MP with SPACE peptide has characteristics; pH range of 5.8 - 6.5 statistical test results showed a significant difference, the spread of the preparation between 5.6 - 7.2 cm test results with the Kruskal Wallis method showed no significant differences, a slight fishy odor, milky white color and soft texture. The results of the stability test on the pH value and the spreadability showed that the cream formula with the addition of various concentrations of SPACE pepide was stable for 21 days storage. **Conclusion:** The increased concentration of SPACE peptide increases the preparation pH but does not affect the spread, odor, color and texture of the preparation. All AMSC-MP cream preparation formulas with SPACE peptide were stable for 21 days of storage.

Keywords: AMSC-MP, cream, physical characteristic, physical stability, SPACE peptide

Abstrak

Pendahuluan: Penggunaan *growth factor* dalam kosmetika adalah upaya yang menjanjikan dalam mengatasi masalah penuaan, namun juga menjadi sebuah tantangan tersendiri untuk pengaplikasiannya. Karakteristik dan stabilitas fisik merupakan parameter yang penting dalam formulasi sediaan, utamanya pada sediaan kosmetika yang mengandung *growth factor* karena dapat berpengaruh langsung terhadap efektifitas kandungan zat aktifnya. **Tujuan:** Mengevaluasi pengaruh perbandingan Amniotic Membran Stem Cell Metabolite Product (AMSC-MP) dan SPACE peptide (F1 = 1:0; F2 = 1:1; F3 = 1:2; F4 = 1:3) terhadap karakteristik dan stabilitas fisik krim antiaging AMSC-MP yang mengandung *growth factor*. **Metode:** Uji karakteristik sediaan dievaluasi dengan parameter organoleptis, pH dan daya sebar. Uji stabilitas fisik dilakukan dengan mengevaluasi karakteristik sediaan selama 21 hari penyimpanan. **Hasil:** Sediaan krim yang mengandung AMSC-MP dengan SPACE peptide memiliki karakteristik; rentang pH 5,8 - 6,5 hasil uji statistik dengan metoda ANOVA satu arah menunjukkan perbedaan bermakna, daya sebar sediaan antara 5,6 - 7,2 cm hasil uji dengan metoda Kruskal Wallis menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna, bau sedikit amis, warna putih susu dan tekstur lembut. Hasil uji stabilitas terhadap nilai pH dan daya sebar menunjukkan bahwa formula krim dengan penambahan berbagai konsentrasi SPACE peptide stabil selama penyimpanan 21 hari. **Kesimpulan:** Peningkatan konsentrasi SPACE

peptide meningkatkan pH sediaan namun tidak mempengaruhi daya sebar, bau, warna dan tekstur sediaan. Semua formula sediaan krim AMSC-MP dengan *SPACE peptide* stabil selama 21 hari penyimpanan.

Kata kunci: AMSC-MP, karakteristik fisik, krim, *SPACE peptide*, stabilitas fisik

PENDAHULUAN

Penuaan adalah sebuah proses biologi kompleks yang merupakan konsekuensi dari pengaruh faktor intrinsik dan dapat dipercepat oleh faktor ekstrinsik. Paparan sinar UV merupakan faktor ekstrinsik utama penyebab terjadinya penuaan (Shin dkk., 2019). Gejala klinis yang terjadi pada penuaan adalah timbulnya kerutan-kerutan (*wrinkle*), perubahan warna kulit, perubahan tekstur serta berkurangnya elastisitas. Terapi yang bisa digunakan untuk mengatasi permasalahan tersebut salah satunya adalah penggunaan kosmetika antiaging yang, mengandung metabolit stem cell (Lee dkk., 2014).

Amniotic Membran *Stem Cell Metabolit Product* (AMSC-MP) adalah produk metabolit dari stem cell yang diambil dari membran amnion (Prakoewo dkk., 2018). Produk metabolit mempunyai keuntungan mengandung komposisi *growth factor* yang sama dengan *stem cell*-nya, serta lebih mudah dibuat karena tidak memerlukan bahan pembawa tertentu untuk mempertahankan *stem cell* tetap hidup (Seo dkk., 2013). Atas dasar potensi AMSC-MP tersebut pada penelitian ini memformulasikan AMSC-MP menjadi kosmetika antiaging dalam bentuk sediaan krim.

Untuk memformulasikan AMSC-MP menjadi bentuk sediaan krim mempunyai permasalahan karena ukuran molekul rata-rata *growth factor* lebih dari 20 kDa, sementara ukuran molekul yang dapat terpenetrasi ke dalam kulit maksimal adalah 500 Da (Bos & Meinardi, 2000). Sehingga perlu penambahan *enhancer* yang dapat memfasilitasi AMSC-MP melewati stratum korneum agar dapat menghasilkan efek yang diharapkan. Penelitian terbaru menemukan sebuah alternatif untuk membantu penetrasi suatu makromolekul ke dalam stratum corneum secara non invasif tanpa menimbulkan efek iritasi pada kulit yaitu dengan menggunakan *skin penetrating peptide enhancer* (SPPs) salah satu contohnya adalah *SPACE peptide*. Pada penelitian *in vitro* dan *in vivo* membuktikan bahwa ketika *SPACE peptide* dikonjugasikan secara langsung dengan siRNA yang mempunyai ukuran molekul > 300 kDa, meningkatkan absorpsi ke dalam kulit dengan cara berinteraksi dengan struktur sekunder protein kulit (Hsu &

Mitragotri, 2011). Sementara mekanisme kerja *SPACE peptide* yang diteliti oleh Kumar dkk. (2015) terbukti dalam bentuk tunggal mempunyai kemampuan meningkatkan afinitas terhadap keratin dan korneosit melalui jalur transeluler sehingga memfasilitasi makromolekul menembus stratum korneum ke dalam epidermis dan dermis. *SPACE peptide* diketahui memiliki toksisitas yang paling rendah dibandingkan dengan *peptide* yang lain (Kumar dkk., 2015). Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, menjadi dasar pemilihan *SPACE peptide* sebagai *enhancer* untuk memfasilitasi AMSC-MP masuk ke dalam stratum korneum. Penelitian ini untuk mengevaluasi pengaruh penambahan konsentrasi *SPACE peptide* terhadap karakteristik dan stabilitas fisik krim antiaging AMSC-MP. Perbandingan konsentrasi AMSC-MP:*SPACE peptide* pada Formula 1 (F1), Formula 2 (F2), Formula 3 (F3) dan Formula 4 (F4) berturut turut adalah 1:0; 1:1; 1:2; 1:3.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki derajat farmasetis kecuali dinyatakan lain; AMSC-MP (dikultur di Bank Jaringan dan Pusat Biomaterial RSUD Dr. Soetomo), *SPACE Peptide* (diimpor dari Medchem Express), asam stearat, setil alkohol, liquid paraffin, gliserin, propilenglikol, fenoxietanol, aquadest, dan air bebas CO₂.

Alat

Alat-alat yang digunakan adalah pH meter (merk SCHOTT CG 842), alat uji daya sebar (Lab.Farmasetika Universitas Airlangga), *stirrer*, cawan porselen, alat-alat gelas, *waterbath* dan pot krim.

Metode

Pembuatan formula krim

Komponen penyusun formula krim dapat dilihat pada Tabel 1. Semua bahan ditimbang terlebih dahulu. Fase Minyak (asam stearat, setil alkohol, *paraffin liquid*), dipanaskan di atas *waterbath* hingga temperatur 70°C (campuran pertama). Fase air (gliserin, propilenglikol, fenoxietanol) dicampur menjadi satu di dalam gelas beker dan dipanaskan

sampai suhu kurang lebih 75°C (campuran kedua). Campuran kedua (fase air) sedikit demi sedikit dimasukkan ke dalam campuran pertama (fase minyak) kemudian dihomogenkan dengan *stirrer* dengan kecepatan 250 rpm selama 20 menit. Selanjutnya campuran diturunkan, diaduk sampai terbentuk masa

krim yang baik. Setelah kurang lebih 30 menit sampai suhu dibawah 40°C, dimasukkan campuran AMSC-MP dengan *SPACE Peptide* pada perbandingan masing-masing kelompok F1(1:0), F2(1:1), F3(1:2) dan F4(1:3), kemudian diaduk hingga homogen.

Tabel 1. Formula sediaan krim *freeze dried* AMSC-MP dengan variasi konsentrasi *SPACE peptide*

Fungsi	Bahan	Jumlah dalam %			
		F1	F2	F3	F4
Bahan aktif	AMSC-MP	0,008	0,008	0,008	0,008
	<i>SPACE peptide</i>	0	0,008	0,016	0,024
	Asam stearat	10	10	10	10
Fase minyak	Setil alkohol	6	6	6	6
	<i>Liquid paraffin</i>	6,6	6,6	6,6	6,6
	<i>Glyserin</i>	5	5	5	5
Fase air	<i>Propilen glycol</i>	30	30	30	30
	<i>Phenoxyethanol</i>	0,1	0,1	0,1	0,1
Pelarut	<i>Aquadest</i>	Ad 100			

Penentuan karakteristik dan stabilitas fisik sediaan krim *antiaging* AMSC-MP

Uji karakteristik sediaan krim *antiaging* AMSC-MP meliputi pengamatan organoleptis, pemeriksaan pH dan pengujian daya sebar yang dilakukan setelah pembuatan sediaan. Sedangkan pada uji stabilitas fisik dilakukan terhadap sediaan selama penyimpanan 21 hari meliputi pengujian pH dan daya sebar pada suhu ruang 30 ± 0,5°C dan RH 70 ± 2%. Kondisi penyimpanan terhindar dari sinar matahari.

Uji organoleptis

Pengujian organoleptis meliputi homogenitas, tekstur, warna, dan bau dari krim AMSC-MP.

Pengukuran pH sediaan

Pengukuran karakteristik pH sediaan dilakukan dengan cara mengencerkan sampel dengan air bebas CO₂ menggunakan perbandingan 1:9. Sampel yang telah diencerkan diukur pHnya menggunakan pH meter digital merk SCHOTT CG 842.

Uji daya sebar sediaan

Pengujian daya sebar dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram sampel kemudian diletakkan diantara 2 plat kaca yang salah satunya berskala. Krim dibiarkan menyebar selama 1 menit, kemudian diukur diameternya. Selanjutnya dilakukan penambahan beban yang semakin meningkat dengan kelipatan 5 gram. Setiap 1 menit setelah penambahan beban, dicatat diameternya, sampai didapatkan diameter yang konstan sehingga cukup untuk mengevaluasi pengaruh beban terhadap daya sebar (Metasari, 2006).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pemeriksaan organoleptis

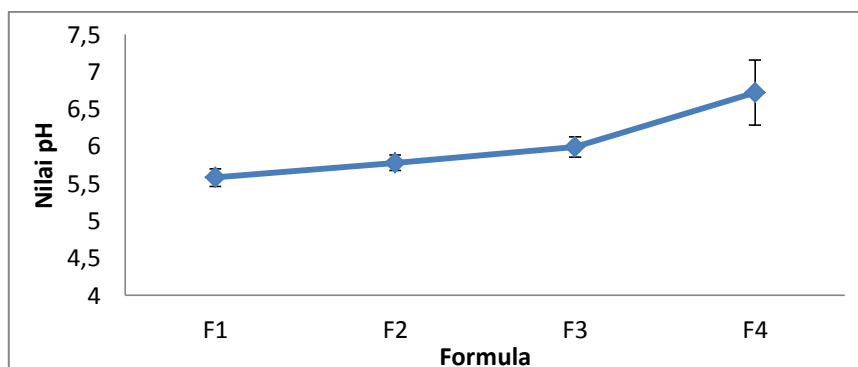
AMSC-MP dalam bentuk *freeze dried* adalah serbuk berwarna putih tulang dengan bau sedikit amis. Sedangkan *SPACE peptide* berbentuk serbuk berwarna putih dan tidak berbau. Dari uji organoleptis krim, masing-masing formula memberikan hasil yang relatif sama yaitu warna putih susu, bau khas sedikit amis, konsistensi semi solid dan bertekstur lembut.

Hasil pemeriksaan karakteristik pH

Hasil pemeriksaan pH sediaan dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1. Nilai pH rata-rata semua formula masuk ke dalam rentang pH normal kulit yaitu 4,5 - 6,8 (Lambers dkk., 2006). Peningkatan konsentrasi *SPACE peptide* diikuti dengan peningkatan nilai pH sediaan. Selanjutnya dilakukan uji normalitas terhadap data pH masing-masing formula. Berdasarkan uji normalitas diketahui bahwa data bersifat parametrik, sehingga dilanjutkan menggunakan uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada nilai pH antar formula (p < 0,05). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda bermakna dilakukan uji *Post Hoc Tukey*. Dari hasil pengujian *Post Hoc Tukey*, diketahui bahwa formula yang berbeda bermakna adalah F4 dengan semua formula lain. Sedangkan F3 tidak berbeda bermakna dengan F2 namun berbeda bermakna dengan F1, sementara F1 tidak berbeda bermakna dengan F2. Sehingga disimpulkan bahwa penambahan konsentrasi *SPACE peptide* meningkatkan pH sediaan.

Tabel 2. Hasil pemeriksaan karakteristik nilai pH formula 1 (F1), formula 2 (F2), formula 3 (F3) dan formula 4 (F4)

Formula	Replikasi pH			Rata-rata ± SD
	I	II	III	
F1	5,47	5,58	5,70	5,58 ± 0,115
F2	5,66	5,82	5,86	5,78 ± 0.106
F3	5,86	5,96	6,15	5,99 ± 0.138
F4	6,77	6,70	6,69	6,72 ± 0,435



Gambar 1. Grafik profil karakteristik nilai pH formula 1 (F1), formula 2 (F2), formula 3 (F3) dan formula 4 (F4)

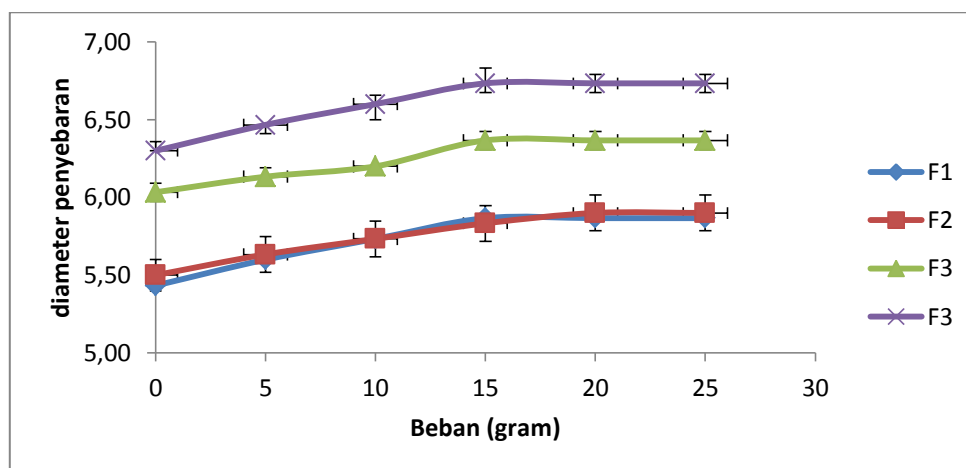
SPACE peptide mempengaruhi nilai pH sediaan karena berdasarkan hasil pengujian mempunyai nilai pH 7,2, akibatnya semakin besar konsentrasinya menyebabkan terjadinya peningkatan nilai pH sediaan. Akan tetapi semua sediaan masih memenuhi rentang pH normal kulit (4,5 - 6,8) (Lambers dkk., 2006) sehingga meminimalkan risiko iritasi pada penggunaan topikal.

Hasil pemeriksaan karakteristik daya sebar

Dari hasil pemeriksaan daya sebar pengaruh beban terhadap daya sebar masing-masing Formula pada beban konstan 25 gram dapat dilihat pada Tabel 3 dan Gambar 2, dihasilkan daya sebar $F1 < F2 < F3 < F4$.

Tabel 3. Hasil pengukuran daya sebar formula 1 (F1), formula 2 (F2), formula 3 (F3), dan formula 4 (F4)

Formula	Beban (gram)	Diameter daya sebar (cm)			Diameter rata-rata (cm)
		I	II	III	
F1	-	5,40	5,50	5,40	5,43 ± 0,06
	5	5,50	5,70	5,60	5,60 ± 0,10
	10	5,60	5,80	5,80	5,73 ± 0,11
	15	5,80	5,90	5,90	5,87 ± 0,06
	20	5,80	5,90	5,90	5,87 ± 0,06
	25	5,80	5,90	5,90	5,87 ± 0,06
F2	-	5,40	5,60	5,50	5,50 ± 0,10
	5	5,50	5,70	5,70	5,60 ± 0,11
	10	5,60	5,80	5,80	5,73 ± 0,11
	15	5,70	5,90	5,90	5,83 ± 0,11
	20	5,90	5,90	5,90	5,83 ± 0,11
	25	5,90	5,90	5,90	5,83 ± 0,11
F3	-	6,00	6,00	6,10	6,03 ± 0,06
	5	6,10	6,10	6,20	6,13 ± 0,06
	10	6,20	6,20	6,20	6,20 ± 0,00
	15	6,30	6,40	6,40	6,37 ± 0,06
	20	6,30	6,40	6,40	6,37 ± 0,06
	25	6,30	6,40	6,40	6,37 ± 0,06
F4	-	6,30	6,30	6,30	6,30 ± 0,00
	5	6,40	6,50	6,50	6,47 ± 0,06
	10	6,50	6,60	6,70	6,60 ± 0,10
	15	6,70	6,70	6,80	6,73 ± 0,06
	20	6,70	6,70	6,80	6,73 ± 0,06
	25	6,70	6,70	6,80	6,73 ± 0,06



Gambar 2. Grafik profil karakteristik daya sebar dengan pengaruh penambahan beban pada formula 1 (F1), formula 2 (F2), formula 3 (F3), dan formula 4 (F4)

Selanjutnya dilakukan uji normalitas data, menunjukkan data tidak terdistribusi normal, sehingga dilanjutkan dengan uji statistika Kruskal Wallis. Berdasarkan uji statistik Kruskal Wallis diperoleh nilai $p > 0,05$ artinya tidak ada perbedaan bermakna daya sebar pada data yang berpasangan.

Berdasarkan data yang diperoleh tersebut menunjukkan penambahan *SPACE peptide* tidak memberikan peningkatan signifikan terhadap profil daya sebar. Daya sebar menjadi salah satu faktor penting dalam parameter acceptabilitas sediaan kosmetik.

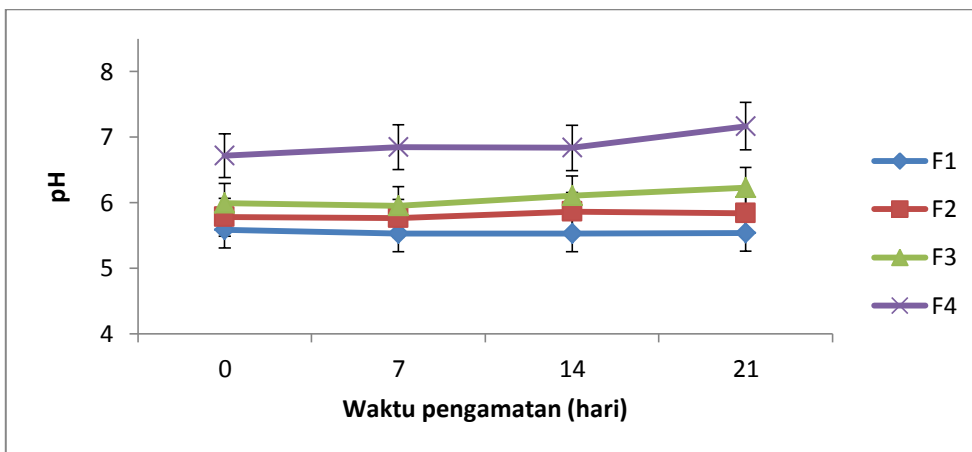
Hasil evaluasi stabilitas pH

Hasil uji stabilitas dengan parameter pH dapat dilihat pada Tabel 4 dan Gambar 3. Hasil analisis

statistik masing-masing Formula menggunakan metode *Paired T-test* menunjukkan bahwa semua formula tidak menunjukkan perbedaan nilai pH bermakna selama proses penyimpanan 21 hari. Sehingga dapat disimpulkan bahwa Formula 1, Formula 2, Formula 3, dan Formula 4 stabil secara fisika pada nilai pH. Nilai pH merupakan salah satu faktor yang penting diperhatikan terutama pada sampel yang mengandung *growth factor*, selain harus dijaga tetap sesuai dengan pH normal kulit agar tidak menimbulkan kekeringan dan iritasi, pH juga dapat mempengaruhi stabilitas dari *growth factor*. *Growth factor* yang merupakan salah satu protein ini dapat terdenaturasi dengan perubahan pH yang ekstrim (Kett dkk., 2004).

Tabel 4. Hasil pengukuran pH formula 1(F1), formula 2(F2), formula 3(F3), dan formula 4(F4) selama penyimpanan pada hari ke-0, ke-7, ke-14 dan ke-21

Formula	Replikasi	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21
F1	1	5,48	5,43	5,43	5,44
	2	5,59	5,44	5,44	5,43
	3	5,70	5,73	5,73	5,74
	Rata-rata ± SD	5,59 ± 0,115	5,53 ± 0,171	5,532 ± 0,173	5,527 ± 0,172
F2	1	5,66	5,68	5,88	5,79
	2	5,82	5,82	5,85	5,88
	3	5,86	5,79	5,87	5,86
	Rata-rata ± SD	5,78 ± 0,106	5,76 ± 0,075	5,87 ± 0,014	5,84 ± 0,051
F3	1	5,87	5,90	6,13	6,14
	2	5,97	5,97	5,99	6,33
	3	6,15	5,98	6,20	6,22
	Rata-rata ± SD	5,99 ± 0,138	5,95 ± 0,014	6,11 ± 0,109	6,23 ± 0,095
F4	1	6,77	6,86	6,89	7,07
	2	6,70	6,76	6,76	7,50
	3	6,69	6,92	6,86	6,94
	Rata-rata ± SD	6,71 ± 0,043	6,84 ± 0,081	6,836 ± 0,069	7,17 ± 0,293



Gambar 3. Grafik profil pengamatan stabilitas pH selama waktu penyimpanan 21 hari

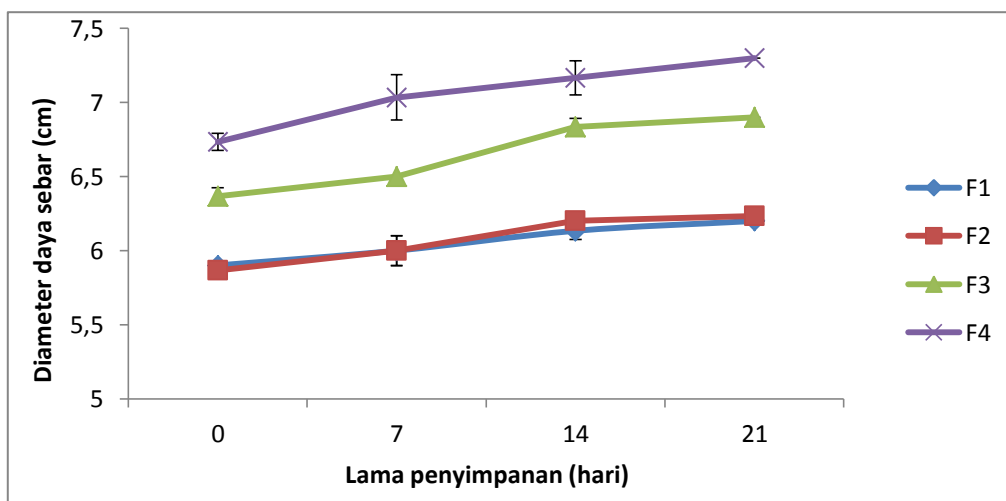
Hasil evaluasi stabilitas daya sebar

Hasil pengujian stabilitas daya sebar krim diamati setiap minggu selama selama 21 hari dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 4. Semua krim mengalami peningkatan daya sebar selama penyimpanan. Berdasarkan grafik pada Gambar 4 antara lama penyimpanan dan luas daya sebar dapat diamati bahwa F1 memiliki slope paling kecil dan F4 memiliki slope

yang paling besar, artinya F1 memberikan kestabilan daya sebar yang lebih baik dibandingkan dengan F4. Sedangkan berdasarkan metode statistik Paired T-test menunjukkan nilai $p > 0,05$ berarti tidak ada perbedaan bermakna pada nilai daya sebar selama penyimpanan 21 hari. Sehingga disimpulkan bahwa semua formula stabil secara fisika pada nilai daya sebar.

Tabel 5. Hasil uji stabilitas daya sebar formula 1 (F1), formula 2(F2), formula 3(F3) dan formula 4 (F4) selama penyimpanan 21 hari

Formula	Rata-rata diameter daya sebar (cm) ± SD			
	Hari ke-0	Hari ke-7	Hari ke-14	Hari ke-21
F1	5,90 ± 0,00	6,00 ± 0,10	6,13 ± 0,06	6,20 ± 0,00
F2	5,87 ± 0,06	6,00 ± 0,10	6,20 ± 0,00	6,23 ± 0,06
F3	6,37 ± 0,06	6,50 ± 0,00	6,83 ± 0,06	6,90 ± 0,00
F4	6,73 ± 0,06	7,03 ± 0,15	7,17 ± 0,12	7,30 ± 0,00



Gambar 4. Grafik Pengukuran stabilitas daya sebar pada penyimpanan selama 21 Hari

Persamaan regresi linier:

F1: $y = 0,1033x + 5,80$; $R = 0,9928$; F2: $y = 0,13x + 5,75$; $R = 0,9705$; F3: $y = 0,1933x + 6,1667$; $R = 0,9693$; F4 : $y = 0,1833x + 6,6$; $R = 0,9761$

KESIMPULAN

Penambahan variasi konsentrasi *SPACE peptide* terhadap masing-masing formula krim antiaging AMSC-MP tidak memberikan perbedaan secara organoleptis. Pada pemeriksaan pH, *SPACE peptide* meningkatkan pH sediaan, namun tidak berpengaruh terhadap daya sebar. Sementara pada pengujian stabilitas fisik menunjukkan bahwa semua Formula stabil selama penyimpanan 21 hari meliputi parameter stabilitas pH dan daya sebar.

DAFTAR PUSTAKA

- Bos, J. D. & Meinardi, M. M. H. M. (2000). The 500 Dalton Rule for the Skin Penetration of Chemical Compounds and Drugs. *Experimental Dermatology*; 9; 165–169.
- Hsu, T. & Mitragotri, S. (2011). Delivery of siRNA and Other Macromolecules Into Skin and Cells Using a Peptide Enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108; 15816–15821.
- Kett, V., McMahon, D. & Ward, K. (2004). Freeze-Drying of Protein Pharmaceuticals - the Application of Thermal Analysis. *Cryo-Letters*; 25; 389–404.
- Kumar, S., Zakrewsky, M., Chen, M., Menegatti, S., Muraski, J. A. & Mitragotri, S. (2015). Peptides as Skin Penetration Enhancers: Mechanisms of Action. *Journal of Controlled Release*; 199; 168–178.
- Lambers, H., Piessens, S., Bloem, A., Pronk, H. & Finkel, P. (2006). Natural Skin Surface pH is on Average Below 5, Which is Beneficial for Its Resident Flora. *International Journal of Cosmetic Science*; 28; 359–370.
- Lee, H. J., Kang, S., Lee, E. G. & Sung, J. H. (2014). Efficacy of Microneedling Plus Human Stem Cell Conditioned Medium for Skin Rejuvenation: A Randomized, Controlled, Blinded Split-face Study. *Annals of Dermatology*; 26; 584–591.
- Prakoeswo, C. R. S., Pratiwi, F. D., Herwanto, N., Citrashanty, I., Indramaya, D. M., Murtiastutik, D., Sukanto, H. & Rantam, F. A. (2018). The Effects of Amniotic Membrane Stem Cell-Conditioned Medium on Photoaging. *Journal of Dermatological Treatment*; 30; 478-482.
- Seo, K. Y., Lee, S. E., Hyu, K. D. & Yoon, M. S. (2013). Skin Rejuvenation by Microneedle Fractional Radiofrequency and a Human Stem Cell Conditioned Medium in Asian Skin: A Randomized Controlled Investigator Blinded Split-face Study. *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*; 15; 25–33.
- Shin, J. W., Kwon, S. H., Choi, J. Y., Na, J. I., Huh, C. H., Choi, H. R., Park, K. C. (2019). Molecular Mechanisms of Dermal Aging and Antiaging Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*; 20; 2126.

Optimasi Metode KCKT untuk Penetapan Kadar 4-Isobutilasetofenon dan 2-(4-Isobutirilfenil) Asam Propanoat dalam Tablet Ibuprofen

Rara Dyah Chrissanti¹, Asri Darmawati², Mochammad Yuwono^{2*}

¹Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan (BPOM) Surabaya, Surabaya, Indonesia

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

*Corresponding author: yuwono05@yahoo.com

Submitted: 17 Januari 2020

Accepted: 17 Februari 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: *Ibuprofen (IBP) is widely used as an antipyretic and pain reliever drug, the drug is sensitive to oxidation and thermal decomposition. The 4-isobutylacetophenone (IBP related compound C) and 2-(4-isobutyrilphenyl) propanoic acid (IBP related compound J) are the IBP organic impurities and their presence in tablet must be fulfilled the limit test requirement. The standard procedure for the impurities analysis need to optimize because of the variation of the tablet matrix could influence the compendia chromatographic performance. Objective:* To obtain a column and HPLC operational condition which are selective, efficient and fulfilled the compendia requirement for IBP and its impurities. **Methods:** *This study was designed to compare the chromatographic performance (resolution, tailing factor and theoretical plate) of several C₁₈ HPLC columns based on the United States Pharmacopoeia (USP) method and requirement for organic impurities determination of ibuprofen tablet. The instrument was Shimadzu Prominence with Photo Diode Array (DAD). Optimum analysis conditions were applied for analysis of 3 different IBP tablet brands. Results:* The optimum condition was achieved through C₁₈-C column of 4.6 x 250 mm, 5 μm using a mobile phase of 1% chloroacetic acid pH 3.0: acetonitrile (45:55, v/v), flow rate of 1.5 mL/min, ambient column temperature, the DAD was set at 254 nm, 10 μL injection volume with analysis time of 11 minutes. Symmetrical peaks were obtained and chromatographic performances met the USP requirement. **Conclusion:** *The optimized method was successfully applied to 3 different marketed tablets dosage form and can be applied for routine testing for monitoring the ibuprofen tablets quality.*

Keywords: *ibuprofen, high performance liquid chromatography, impurities*

Abstrak

Pendahuluan: Ibuprofen (IBP) banyak digunakan sebagai obat anti piretik dan pereda nyeri, obat ini sensitif terhadap oksidasi dan suhu. Cemaran IBP yang keberadaannya dalam tablet harus memenuhi syarat uji batas adalah 4-isobutilasetofenon (IBP RC C) dan 2-(4-isobutirilfenil) asam propanoat (IBP RC J). Variasi matriks tablet seringkali membuat prosedur standar untuk analisis cemaran perlu dioptimasi karena dapat menyebabkan kinerja kromatografi yang tidak memenuhi syarat kompendia. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh kolom dan kondisi operasional KCKT yang selektif, efisien dan memenuhi persyaratan kompendia untuk pengujian IBP dan cemarannya. **Metode:** Penelitian ini dirancang untuk membandingkan kinerja kromatografi (resolusi, faktor ikutan dan jumlah lempeng teoritis) beberapa kolom KCKT C₁₈ yang sesuai persyaratan United States Pharmacopoeia (USP) untuk penetapan cemaran organik dalam tablet ibuprofen. Instrumen KCKT yang digunakan adalah Shimadzu Prominence dengan detektor Photo Diode Array (PDA). Kondisi analisis optimum yang diperoleh diaplikasikan untuk analisis 3 macam sediaan tablet IBP. **Hasil:** Kondisi optimum diperoleh melalui kolom C₁₈-C 4,6 x 250 mm, 5 μm, menggunakan fase gerak larutan asam kloroasetat 1% pH 3,0 : asetonitril (45:55, v/v), laju alir 1,5 mL/menit, suhu kolom ambient, detektor PDA 254 nm, volume injeksi 10 μL dengan waktu analisis 11 menit. Diperoleh puncak-puncak yang simetris dengan kinerja kromatografi yang memenuhi persyaratan USP. **Kesimpulan:** Metode yang telah dioptimasi berhasil

diaplikasikan pada 3 sediaan tablet yang beredar di pasaran dan dapat digunakan untuk pengujian rutin dalam rangka pengawasan kualitas produk obat tablet ibuprofen.

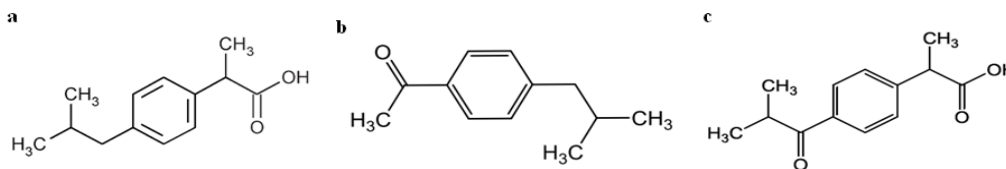
Kata kunci: ibuprofen, kromatografi cair kinerja tinggi, cemaran

PENDAHULUAN

Kualitas, keamanan dan efektivitas adalah faktor yang paling penting untuk produk farmasi (Maggio dkk., 2013). Bahan baku farmasi dihasilkan dari proses sintesis yang berbeda-beda, sehingga bisa memberikan profil cemaran yang tidak sama (Huidobro dkk., 2006). Jaminan atas kualitas dan keamanan obat umumnya dilakukan melalui pengawasan dan pengendalian cemaran secara efektif. (Melo dkk., 2014; Nageswara & Nagaraju, 2003; United States Pharmacopeia, 2019). Produk obat harus memenuhi persyaratan yang berlaku.

Ibuprofen (IBP) sebagai obat anti inflamasi non steroid, banyak digunakan sebagai obat analgesik, anti

piretik dan anti inflamasi karena sifatnya yang efektif, aman dan relatif terjangkau harganya. Ibuprofen merupakan obat yang paling banyak digunakan setelah parasetamol (Hersh & Dionne, 2017). Ibuprofen (Gambar 1a) sensitif terhadap oksidasi dan suhu, dapat terdegradasi menjadi 4-isobutilasetofenon (IBP RC C, Gambar 1b) dan 2-(4-isobutirilfenil) asam propanoat (IBP RC J, Gambar 1c) (Persson Stubberud & Åström, 1998). Penelitian terhadap IBP RC C secara *in vivo* dan *in vitro* menunjukkan bahwa senyawa ini toksik terhadap fibroblast yang dikultur (*connective tissue cells*) serta pada sel darah merah (Castell dkk., 1987; Caviglioli dkk., 2002; Cory, dkk., 2010).



Gambar 1. Struktur molekul dari: a) ibuprofen (IBP); b) 4-isobutilasetofenon (senyawa sejenis C IBP); dan c) 2-(4-isobutirilfenil) asam propanoat (senyawa sejenis J IBP)

Ibuprofen diproduksi dalam berbagai bentuk sediaan dengan berbagai jenis eksipien sesuai formulasinya. Sebagian besar bahan obat diformulasi dalam bentuk tablet, karena mudah dikonsumsi sehingga tingkat kepatuhannya tinggi, formulasinya cepat, ekonomis dan secara umum memiliki stabilitas yang baik (Anderson, 2012). Penyimpanan obat di luar kondisi yang disarankan dapat memicu terjadinya degradasi (Cory dkk., 2010). Secara berturut-turut, kriteria lolos uji batas IBP RC C dan IBP RC J untuk uji cemaran organik pada sediaan tablet IBP menurut USP adalah tidak lebih dari 0,25% dan 0,2% menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (United States Pharmacopeia, 2018).

Penggunaan KCKT lebih populer daripada kromatografi gas, karena dapat diaplikasikan untuk analisis senyawa non volatile dan termolabil (Skoog dkk., 2014). Kolom sebagai tempat terjadinya pemisahan, memegang peranan penting, karena jenis kolom yang sama dari produsen yang berbeda atau bahkan dari produsen yang sama namun berbeda *batch*

dapat menunjukkan profil kromatografi yang berbeda, (Lembke dkk., 2001).

Variasi matriks tablet seringkali menyebabkan prosedur standar untuk analisis cemaran harus dioptimasi guna memberikan profil dan kinerja kromatografi yang memenuhi persyaratan. Beberapa penelitian untuk penetapan cemaran dalam sediaan tablet IBP tunggal menggunakan kolom silika C₁₈ Spherisorb (Merck) dan Zorbax (Agilent) telah dilakukan (Caviglioli dkk., 2002; Cory dkk., 2010; Farmer dkk., 2002). Kebanyakan metode tersebut membutuhkan waktu analisis yang panjang, sehingga tidak sesuai untuk analisis rutin. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang profil kromatografi IBP dan cemarannya dari beberapa kolom C₁₈ yang banyak digunakan di laboratorium pengujian berdasarkan persyaratan USP serta mengoptimasi kondisi pemisahannya menggunakan kolom yang terpilih. Tujuan studi ini adalah untuk memilih kolom yang cocok, cara preparasi sampel yang sederhana serta metode analisis yang sensitif dan akurat untuk penetapan cemaran ibuprofen yang dipersyaratkan

dalam ibuprofen tablet, yaitu IBP RC C dan IBP RC J. Metode yang digunakan adalah KCKT dengan detektor PDA. Kondisi optimum yang diperoleh diterapkan untuk analisis IBP RC C dan IBP RC J dalam 3 sediaan tablet yang beredar di pasaran.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Certified Reference Material IBP RC C (CAS # 38861-78-8) (Sigma-Aldrich) dan IBP RC J (CAS # 65813-55-0), ibuprofen BPFI (Badan POM), asetonitril (ACN) HPLC *grade* (J.T. Baker), asam kloroasetat (Merck), amonium hidroksida pro analisis (Merck), *ultra pure water* diproduksi di laboratorium menggunakan Ultra Clear® TP (Evoqua). Tablet ibuprofen dari 3 industri obat yang berbeda (diperoleh dari industri obat dan apotek).

Alat

Sistem KCKT elusi isokratik dari Shimadzu Prominence dengan *software* LC *Solution* yang dilengkapi pompa (LC 20 AD), detektor PDA (SPD-M 20A), CBM 20A, kolom oven (CTO 20AC), sistem *degasser* (DGU 20A) dan *autosampler* (SIL 20A HT). Kolom KCKT yang akan dibandingkan adalah kolom C₁₈ dengan kode A; B dan C (3 merk yang berbeda dari 2 pabrikan) dengan dimensi 4,6 x 250 mm, 5 µm, pH meter Mettler Toledo-Seven Compact, neraca analitik Sartorius CP 224S dan *micro balance* Sartorius MSA 6 GS. Membran filter MF-Millipore™ GVWP 0,22 µm.

Metode

Pembuatan fase gerak dan pelarut

Fase gerak untuk optimasi dibuat dari campuran asetonitril dengan larutan asam kloroasetat 1% (pH 2,8; 3,0; 3,2) pada beberapa perbandingan (55:45; 60:40; 65:35, v/v). Setelah larutan disaring dengan membran filter 0,22 µm, kemudian digetarkan dengan ultrasonik selama 15 menit. Larutan asam kloroasetat 1% dibuat dengan melarutkan 10 g asam kloroasetat dalam 1000 mL *ultra pure water*, pH larutan diatur dengan larutan amonium hidroksida. Laju alir yang digunakan untuk optimasi metode adalah 1,5 mL/menit, 1,75 mL/menit dan 2,0 mL/menit.

Pembuatan larutan baku pembanding

Larutan stok baku pembanding IBP RC C dan IBP RC J dibuat dengan mencampur baku pembanding IBP RC C dan IBP RC J berturut-turut 200 µg/mL dan 50 µg/mL (tidak ditambahkan dengan baku pembanding IBP BPFI, karena selanjutnya akan digunakan dalam pembuatan kurva kalibrasi untuk perhitungan kadar) kemudian dilarutkan dengan pelarut

sesuai fasa gerak dalam labu ukur yang sesuai. Setelah digetarkan dengan ultrasonik selama 15 menit, ditambahkan pelarut sampai tanda. Larutan baku pembanding campuran (IBP, IBP RC C dan IBP RC J) untuk uji kesesuaian sistem (UKS) dipreparasi dalam labu ukur yang sesuai dengan membuat campuran yang mengandung 10.000 µg/mL IBP BPFI dan masing-masing 10 µg/mL baku pembanding IBP RC C dan IBP RC J yang dipipet dari larutan stok baku pembanding. Larutan di injeksikan 10 µL ke dalam sistem kromatografi dengan replikasi 6 kali. Larutan ini digunakan untuk optimasi metode dan UKS.

Larutan baku campur IBP RC C dan IBP RC J untuk pembuatan kurva kalibrasi dipreparasi dengan melakukan pengenceran larutan stok baku pembanding dalam labu ukur yang sesuai dengan pelarut yang sama sampai diperoleh rentang konsentrasi 0,1 - 13 µg/mL. Kurva kalibrasi merupakan hubungan antara konsentrasi (x) dan rata-rata area puncak (y). Larutan disaring dengan membran *filter milipore* GVWP 0,22 µm sebelum diinjeksikan sebanyak 10 µL dalam sistem kromatografi.

Pembuatan larutan sampel

Preparasi sampel dilakukan dengan menimbang 20 tablet dan menghitung bobot rata-rata tablet. Setelah tablet dihaluskan, ditimbang teliti sejumlah serbuk tablet setara dengan berat IBP untuk konsentrasi 10.000 µg/mL IBP dalam labu ukur 25,0 mL. Setelah ditambah dengan lebih kurang 15 mL pelarut, digetarkan dengan ultrasonik selama 15 menit, dibiarkan mendingin sampai suhu kamar dan ditambah pelarut sampai tanda. Pada penelitian ini dilakukan pengujian terhadap tiga macam tablet ibuprofen dari produsen yang berbeda. Masing-masing sampel dipreparasi dengan replikasi 3 kali. Setiap larutan disaring dengan membran filter GVWP 0,22 µm sebelum diinjeksikan sebanyak 10 µL.

Sistem kromatografi

Kondisi analisis diadopsi dari USP untuk penetapan IBP RC C dan IBP RC J dalam sediaan tablet ibuprofen. Persyaratan USP untuk UKS adalah simpangan baku relatif (RSD) IBP RC C dan IBP RC J serta IBP tidak lebih dari 6,0%, resolusi (Rs) IBP RC J – IBP dan IBP – IBP RC C adalah tidak kurang dari 2,5 dan waktu retensi relatif (RRT) IBP RC J, IBP dan IBP RC C berturut-turut adalah 0,47; 1,0 dan 1,62. Kondisi kromatografi untuk pemilihan kolom (selektifitas) dan kondisi terpilih setelah dioptimasi ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Sistem kromatografi

Parameter	Metode Selektivitas Kolom (USP)	Metode Hasil Optimasi
Kolom	C ₁₈ (250 mm x 4,60 mm, 5 µm).	C ₁₈ - C (250 mm x 4,60 mm, 5 µm).
Fase gerak	Larutan asam kloroasetat 1% pH 3.0 : asetonitril (40:60, v/v)	Larutan asam kloroasetat 1% pH 3.0 : asetonitril (45:55, v/v)
Detektor (panjang gelombang)	PDA, 254 nm	PDA, 254 nm
Laju alir	2,0 mL/menit	1,5 mL/menit
Volume injeksi	10 µL	10 µL
Waktu analisis	5 menit	11 menit

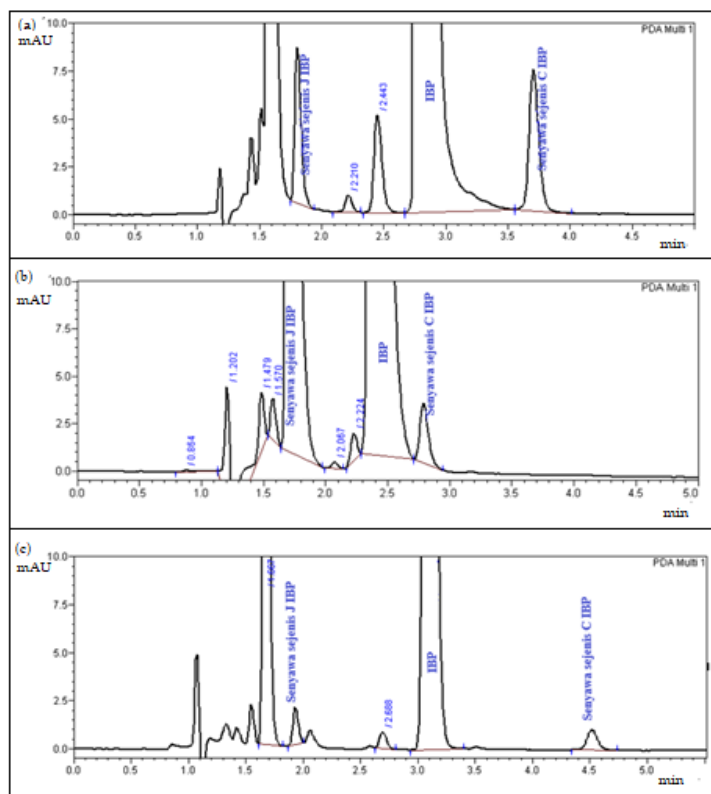
HASIL DAN PEMBAHASAN

Beberapa penelitian untuk penetapan cemaran dalam ibuprofen telah dilakukan. Metode KCKT elusi gradien digunakan pada penelitian Caviglioli dkk. (2002) dengan waktu analisis selama 70 menit. Lamanya waktu analisis menyebabkan metode ini kurang sesuai diterapkan untuk analisis rutin. Penelitian Cory dkk. (2010) menggunakan kolom C₁₈ dengan panjang kolom 15 cm dan waktu analisis 20 menit. Dimensi kolom tersebut tidak sesuai dengan metode standar kompendia, demikian pula dengan fase gerak dan pelarut yang digunakan sehingga validasi metode diperlukan untuk metode tersebut. Sedangkan data validasi metode tidak terdapat dalam penelitian tersebut. Kolom C₁₈ dengan dimensi yang sama seperti penelitian Cory dkk. (2010) digunakan pada penelitian Jahan dkk. (2014) dengan fase gerak yang berbeda, namun penelitian ini lebih fokus pada analisis famotidin dan ibuprofen dalam sediaan tablet dan bukan cemaran ibuprofen (IBP RC C dan IBP RC J) (Jahan dkk., 2014).

Monografi pengujian cemaran organik ibuprofen (IBP RC C dan IBP RC J) dalam sediaan tablet menurut USP 41 digunakan sebagai acuan dalam penelitian ini dengan beberapa perubahan untuk mengoptimasi kinerja kromatografi. Dalam metode USP, valerofenon digunakan sebagai baku internal namun pada penelitian ini valerofenon tidak digunakan sebagai baku internal. Selektifitas kolom dilakukan dengan membandingkan profil kromatogram dan pemisahan IBP dari cemarannya (IBP RC C dan IBP RC J) menggunakan sistem kromatografi seperti tertera dalam Tabel 1. Kolom yang digunakan adalah kolom C₁₈ dengan dimensi yang sama yaitu kolom dengan kode A, B dan C. Hasil uji selektifitas kolom tersaji pada Gambar 2 dan Tabel 2. Data tersebut menunjukkan bahwa kesamaan dimensi dan jenis fase diam (C₁₈) kolom dapat memberikan profil kinerja dan kromatogram puncak yang berbeda. Hal ini dapat dipengaruhi oleh matriks sampel yang bervariasi, sehingga optimasi perlu dilakukan untuk memperoleh profil dan kinerja kromatografi yang memenuhi persyaratan.

Tabel 2. Profil kinerja KCKT menggunakan kolom A, B, C dan sistem kromatografi sesuai USP

Parameter	Kolom			Kriteria Keberterimaan	
	A	B	C		
<i>RRT</i>	Senyawa sejenis J IBP	0,64	0,71	0,62	0,47
	IBP	1,00	1,00	1,00	1,00
	Senyawa sejenis C IBP	1,32	1,16	1,46	1,62
<i>Rs</i>	Senyawa sejenis J IBP	-	1,3	2,4	
	IBP	2,5	1,4	2,9	≥ 2,5
	Senyawa sejenis C IBP	1,3	2,7	8,6	
<i>N</i>	Senyawa sejenis J IBP	4565	3112	4096	
	IBP	5904	4043	6668	≥ 2000
	Senyawa sejenis C IBP	9599	6749	9768	

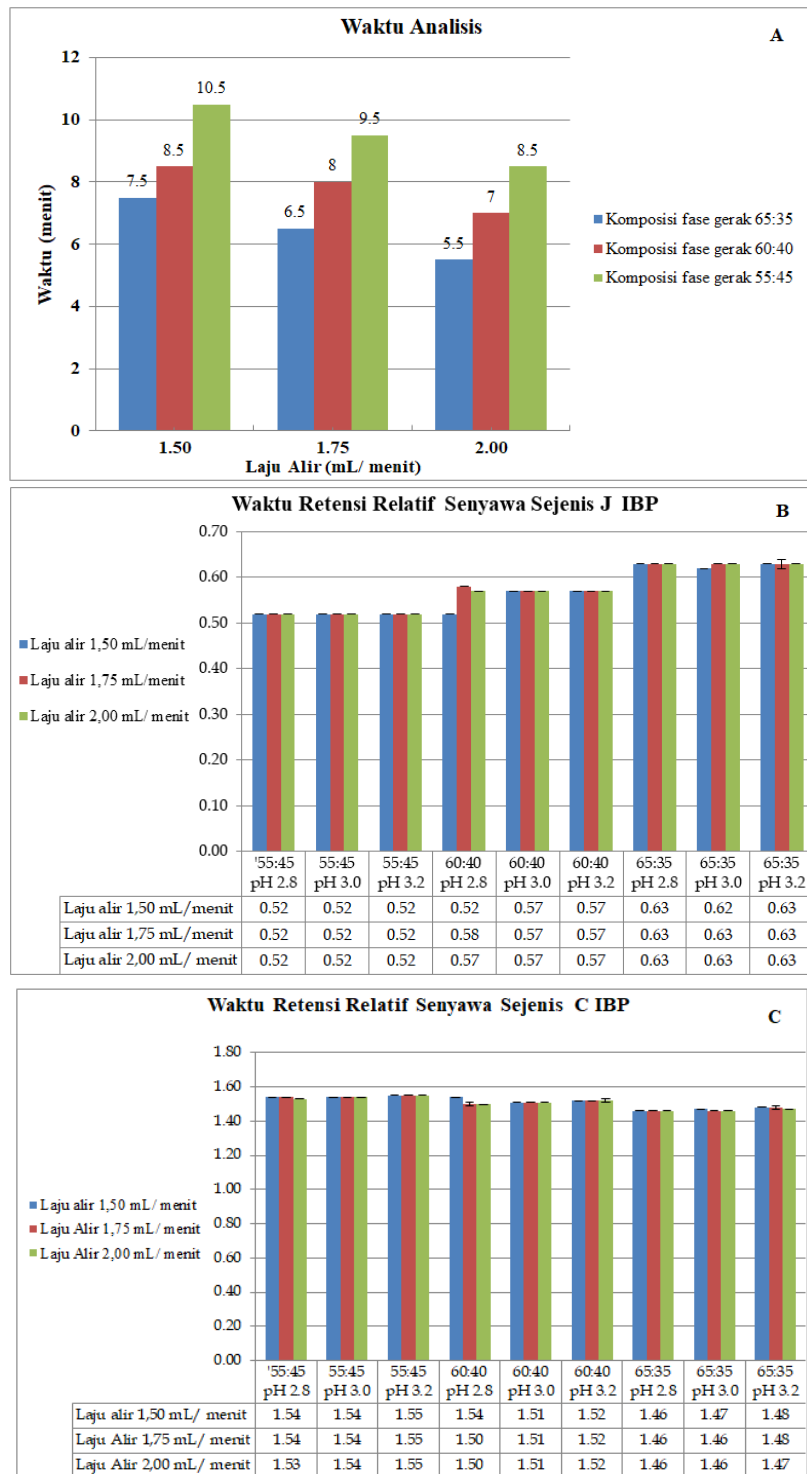


Gambar 2. Kromatogram senyawa sejenis J IBP, IBP, dan senyawa sejenis C IBP dari sampel tablet menggunakan sistem kromatografi sesuai USP. (a) Kolom C₁₈-A; (b) Kolom C₁₈-B; (c) Kolom C₁₈-C

Beberapa faktor dapat mempengaruhi performa kolom, yaitu pada pH tinggi (di atas pH 8) silika dapat terlarut sedangkan pada pH < 2 menyebabkan hidrolisis ikatan siloksan meskipun modifikasi kimia sudah dilakukan untuk meningkatkan stabilitasnya sampai dengan pH 10 (Kazakevich & LoBrutto, 2007; Moldoveanu & David, 2017). Gambar 2a dan 2b menunjukkan pemisahan puncak-puncak target yang belum sempurna, sedangkan dari Tabel 2 dapat di amati bahwa performa KCKT (resolusi dan jumlah lempeng teoritis) terbaik diperoleh dari penggunaan kolom C dimana RRT puncak target pada kolom tersebut paling mendekati persyaratan USP. Sehingga kolom terpilih adalah kolom C, namun dari profil puncak target menunjukkan optimasi masih diperlukan.

Optimasi metode dilakukan pada sistem kromatografi meliputi perubahan pada rasio komposisi fase gerak, pH larutan asam kloroasetat dan laju alir fase gerak dengan menginjeksikan larutan baku campur UKS sebanyak 10 µL. Hasil optimasi metode yang tersaji pada Gambar 3 menunjukkan bahwa waktu analisis tidak dipengaruhi oleh perubahan pH pada

komposisi dan laju alir fase gerak yang sama. Semakin rendah komposisi fase organik dari fase gerak, maka RRT analit semakin mendekati persyaratan kompendia. Fase gerak yang paling optimum untuk analisis adalah 55% asetonitril : 45% larutan asam kloroasetat pH 3,0 dengan laju alir 1,5 mL/menit. Perubahan tersebut masih memenuhi persyaratan *method adjustment* dalam USP. Fase gerak tersebut menghasilkan bentuk puncak analit simetris, pemisahan memuaskan serta RRT mendekati kriteria USP. Meskipun, waktu analisis menjadi lebih lama. Metode tersebut diaplikasikan untuk pengujian IBP RC C dan IBP RC J dalam sediaan ibuprofen tablet. UKS dilakukan terlebih dahulu untuk memastikan bahwa sistem telah siap sebelum pelaksanaan pengujian, dengan menginjeksikan larutan UKS yang baru dipreparasi. Hasil UKS dapat diamati pada Tabel 3, sedangkan profil salah satu kromatogram dari baku UKS dan sampel ditunjukkan pada Gambar 4. Hasil UKS memenuhi kriteria keberterimaan yang menunjukkan bahwa sistem sudah siap untuk digunakan.

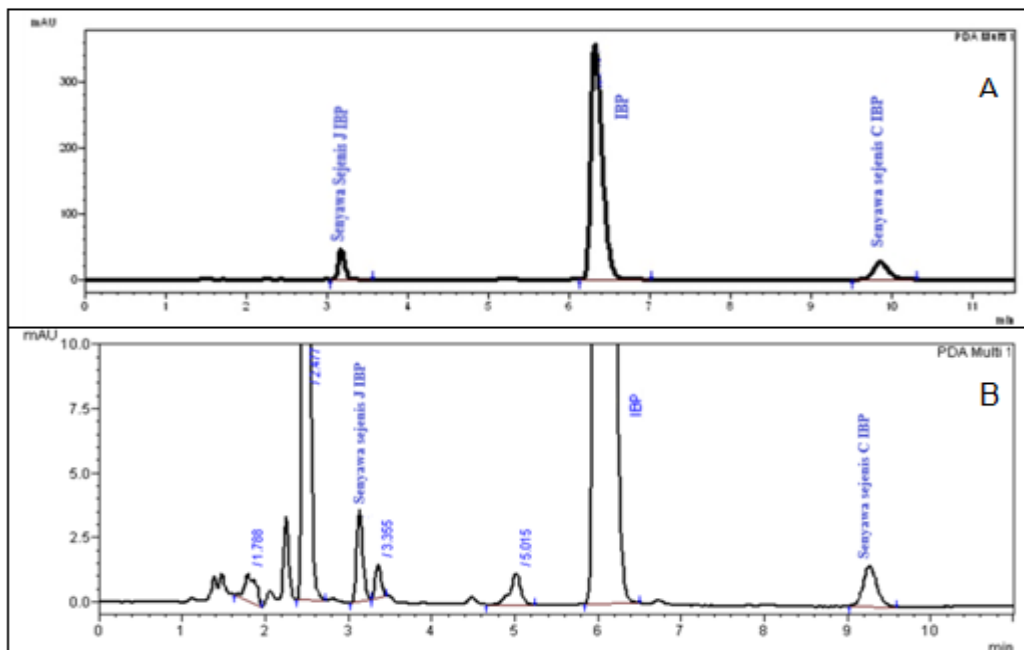


Gambar 3. Profil kondisi optimasi pada komposisi fase gerak dan laju alir yang berbeda. (A) waktu analisis; (B) *relative RT* dari senyawa sejenis J IBP; (C) *Relative RT* dari senyawa sejenis C IBP

Tabel 3. Hasil uji kesesuaian sistem

Parameter	Hasil*			Kriteria keberterimaan		
	Senyawa sejenis J IBP	IBP	Senyawa sejenis C IBP	Senyawa sejenis J IBP	IBP	Senyawa sejenis C IBP
t _R (menit)	3,187	6,217	9,601	-	-	-
RSD t _R (%)	0,25	0,17	0,15	≤ 6,0%	≤ 6,0%	≤ 6,0%
Area	274054	3743113	356678	-	-	-
RSD area (%)	0,35	0,15	0,29	≤ 6,0%	≤ 6,0%	≤ 6,0%
Tf	1,31	1,72	1,22	≥ 2,5	≥ 2,5	≥ 2,5
Rs	14,43		11,47	≥ 2,5		≥ 2,5
N	6689	8864	13879	Makin tinggi nilainya, efisiensi pemisahan semakin baik		

*Merupakan rata-rata dari 6 replikasi injeksi; RSD adalah *Relative Standard Deviation*; Rs merupakan resolusi puncak senyawa sejenis J IBP dengan IBP dan IBP dengan senyawa sejenis C IBP



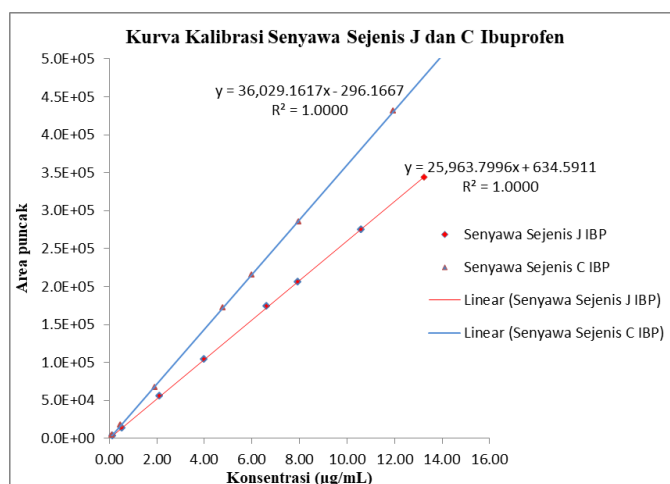
Gambar 4. Profil kromatogram larutan baku UKS (A) dan sampel (B) dengan metode yang optimum

Kurva kalibrasi dari larutan baku campur IBP RC C dan IBP RC J dipreparasi pada rentang konsentrasi untuk IBP RC C adalah 0,12 - 13,94 µg/mL dan IBP RC J adalah 0,13 - 13,24 µg/mL, seperti yang dapat diamati pada Tabel 4 dan Gambar 5. Kurva kalibrasi menunjukkan adanya hubungan yang linier antara

konsentrasi dengan area puncak dari IBP RC C dan IBP RC J yang ditunjukkan dengan kedekatan nilai koefisien korelasi (R²) dengan 1,0000. Persamaan linier untuk IBP RC C adalah 36.029,1617x - 296,1667 dengan R² = 1,0000 sedangkan IBP RC J adalah 25.963,7996x + 634,5911 dengan R² = 1,0000.

Tabel 4. Kurva kalibrasi senyawa sejenis J IBP dan senyawa sejenis C IBP

Senyawa sejenis J IBP		Senyawa sejenis C IBP	
Konsentrasi (µg/mL)	Area puncak	Konsentrasi (µg/mL)	Area puncak
0,1324	3513	0,1195	4621
0,5295	14046	0,4781	17530
2,1180	55764	1,9123	67807
3,9712	104202	4,7808	172042
6,6187	173860	5,9760	215226
7,9424	206554	7,9680	285002
10,5899	274919	11,9520	430913
13,2374	344209	13,9440	502570
y = 25.963,7996x + 634,5911; R ² = 1,0000		y = 36.029,1617x - 296,1667; R ² = 1,0000	



Gambar 5. Kurva kalibrasi senyawa sejenis J dan C IBP (konsentrasi vs area puncak)

Metode yang telah dioptimasi ini diaplikasikan pada pengujian sampel tablet ibuprofen dari tiga produsen yang berbeda, masing-masing dengan replikasi 3 kali. Prosedur USP pada preparasi sampel meliputi proses sentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit, namun dalam penelitian ini sentrifugasi tidak dilakukan, sebab cairan sampel dapat dengan mudah di filtrasi menggunakan membran berpori 0,22 µm. Penelitian yang dilakukan oleh Massad dkk. (2002) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan hasil analisis antara sampel yang disentrifugasi dengan yang langsung difiltrasi melalui membran filter untuk

memisahkan padatan dari larutan sampel (Massad dkk., 2002). Kuantisasi IBP RC C dan IBP RC J dilakukan dengan membandingkan area puncak dari target dengan baku pembanding. Syarat keberterimaan menurut USP 41 untuk IBP RC C adalah tidak lebih dari 0,25% dan IBP RC J adalah tidak lebih dari 0,2%. Monografi Farmakope Indonesia edisi V untuk sediaan tablet IBP, hanya mencantumkan persyaratan untuk IBP RC C yaitu tidak lebih dari 0,1% (Farmakope Indonesia, 2014). Hasil analisis semua sampel tablet adalah memenuhi syarat dan dapat diamati pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil pengujian sampel tablet ibuprofen

Sampel	Senyawa sejenis J IBP		Senyawa sejenis C IBP	
	Kadar (%)	Syarat (%)	Kadar (%)	Syarat (%)
SPL tablet A	5,68E-04		-	
SPL tablet B	5,85E-02	≤ 0,20E+01	6,16E-03	≤ 0,25E+01
SPL tablet C	-		-	

KESIMPULAN

Tidak semua kolom KCKT mampu memberikan performa yang baik sesuai dengan persyaratan metode standar kompendia untuk analisis cemaran obat. Metode KCKT yang selektif dan *repeatable* dengan detektor PDA untuk pengujian cemaran organik ibuprofen (IBP RC C dan IBP RC J) dalam sediaan tablet telah diperoleh dalam penelitian ini. Profil kromatografi yang memuaskan dapat dicapai, meliputi bentuk puncak yang simetris, pemisahan (resolusi), jumlah lempeng teoritis dan faktor ikutan dengan waktu analisis 11 menit. Metode tersebut telah berhasil diaplikasikan untuk menganalisis beberapa produk obat ibuprofen dalam sediaan tablet yang berada di pasaran, sehingga metode ini dapat digunakan secara efektif untuk analisis rutin.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada pihak-pihak yang telah banyak membantu dalam penelitian ini. Ucapan terima kasih juga disampaikan penulis kepada Badan POM RI dan khususnya Balai Besar POM di Surabaya atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson, N. G. (2012). Final Product Form and Impurities. In: Anderson NG (ed.). *Practical Process Research and Development*; 365–395. Jacksonville: Elsevier.

Castell, J. V., Gomez-L., M. J., Miranda, M. A. & Morera, I. M. (1987). Photolytic degradation of Ibuprofen. Toxicity of the Isolated Photoproducts on Fibroblast and Erythrocytes.

- Photochemistry and Photobiology*; 46; 991–996.
- Caviglioli, G., Valeria, P., Brunella, P., Sergio, C., Attilia, A. & Gaetano, B. (2002). Identification of Degradation Products of Ibuprofen Arising from Oxidative and Thermal Treatments. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 30; 499–509.
- Cory, W. C., Harris, C. & Martinez, S. (2010). Accelerated Degradation of Ibuprofen in Tablets. *Pharmaceutical Development and Technology*; 15; 636–643.
- Farmakope Indonesia. (2014). Tablet Ibuprofen (Edisi 5). Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Farmer, S., Anderson, P., Burns, P. & Velagaleti, R. (2002). Forced Degradation of Ibuprofen in Bulk Drug and Tablets: Determination of Specificity, Selectivity, and the Stability-Indicating Nature of the USP Ibuprofen Assay Method. *Pharmaceutical Technology North America*; 26; 28–42.
- Hersh, E. V & Dionne, R. A. (2017). Nonopioid Analgesics. In: Hersh EV, Dionne RA (ed.). *Pharmacology and Therapeutics for Dentistry*; 257–275. St. Louis: Elsevier.
- Huidobro, A. L., Rupérez, F. J. & Barbas, C. (2006). Tandem Column for the Simultaneous Determination of Arginine, Ibuprofen and Related Impurities by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1119; 238–245.
- Jahan, M. S., Islam, M. J., Begum, R., Kayesh, R. & Rahman, A. (2014). A Study of Method Development, Validation, and Forced Degradation for Simultaneous Quantification of Paracetamol and Ibuprofen in Pharmaceutical Dosage form by RP-HPLC Method. *Analytical Chemistry Insights*; 9; 75–81.
- Kazakevich, Y. & LoBrutto, R. (2007). Stationary Phases. In: Kazakevich Y, LoBrutto R (ed.). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*; 75–132. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Lembke, P., Günter, H., Cabrera, K., Brunner, W. & Muller, E. (2001). Handbook of Analytical Techniques. In: Gunzler H. & Williams A. (ed.). *Handbook of Analytical Techniques*; 261–326. Weinheim: Wiley-VCH.
- Maggio, R. M., Vignaduzzo, S. E. & Kaufman, T. S. (2013). Practical and Regulatory Considerations for Stability-indicating Methods for the Assay of Bulk Drugs and Drug Formulations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*; 49; 57–70.
- Massad, L., Anderson, P., Ward, J., Burns, P. & Velagaleti, R. (2002). Validation of Changes to the USP Assay Method for Ibuprofen Tablets: Extraction and Filtration Techniques. *Pharmaceutical Technology*; 26; 90–100.
- Melo, S. R. D. O., Homem-De-Mello, M., Silveira, D. & Simeoni, L. A. (2014). Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*; 68; 221–238.
- Moldoveanu, S. C. & David, V. (2017). RP-HPLC Analytical Columns. In: Moldoveanu SC, David V (eds.). *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*; 279–328. Amsterdam: Elsevier.
- Nageswara, R. R. & Nagaraju, V. (2003). An Overview of the Recent Trends in Development of HPLC Methods for Determination of Impurities in Drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 33; 335–377.
- Persson, S., K. & Åström, O. (1998). Separation of Ibuprofen, Codeine Phosphate, Their Degradation Products and Impurities by Capillary Electrophoresis II. Validation. *Journal of Chromatography A*; 826; 95–102.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler F. J. & Crouch, S. R. (2014). Fundamentals of Analytical Chemistry. Belmont-USA: Mary Finch.
- United States Pharmacopeia. (2018). Ibuprofen Tablets Monographs (USP 41-NF). Rockville: United States Pharmacopeia.
- United States Pharmacopeia. (2019). Impurities in Drug Substances and Drugs Products (USP 42-NF). Rockville: United States Pharmacopeia.

Validated TLC-Contact Bioautography Method for Identification of Kanamycin Sulfate in Injection Preparation

Susanti, Aprelita Nurelli Dwiana, Febri Annuryanti, Asri Darmawati, Isnaeni*

Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

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

Submitted: 7 Februari 2020

Accepted: 15 April 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: TLC-contact bioautography is one of an effective method for identification antibiotics, by which many antibiotics could be identification and determination simultaneously. **Objective:** To evaluate kanamycin sulfate in injection preparations based on its inhibitory activity against *Escherichia coli* ATCC 8739 as test organism. **Methods:** Sample and standard solutions were spotted onto TLC silica gel 60 F254 plate and developed in 10% potassium dihydrogen phosphate solution as mobile phase. The TLC-contact bioautography method was validated according to USP guidelines by considering specificity, LOD, LOQ, linearity, accuracy and precision parameters. **Results:** The TLC-contact bioautography method was found to be high sensitivity with LOD of 0.75 μg and LOQ 2.31 μg . Linearity range of 100-350 $\mu\text{g/mL}$ with $r = 0.9993$ and linear regression equation was $y = 0.0019x + 0.0338$. The recovery obtained from addition of blank samples by three different concentrations of kanamycin sulfate standard was 101.40% \pm 2.02%. The precision of the method was good with coefficient of variation 0.080%. The TLC-contact bioautography method was supported by determination of kanamycin sulfate potency ratio in the injection preparation and kanamycin sulfate standard using 3-3 design. Random block design obtained the potential for kanamycin sulfate in injection preparations compared to kanamycin sulfate standard was 100.6%. **Conclusion:** The TLC-contact bioautography for kanamycin sulfate in injection preparations could be applied to the quality control analysis of the investigated drugs.

Keywords: kanamycin sulfate, TLC-contact bioautography, *Escherichia coli*

Abstrak

Pendahuluan: KLT-bioautografi kontak merupakan salah satu metode yang efektif untuk mengidentifikasi antibiotik secara simultan. **Tujuan:** Untuk mengevaluasi kanamisin sulfat dalam sediaan injeksi berdasarkan aktivitas antibiotik menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 8739 sebagai organisme uji. **Metode:** Larutan sampel dan larutan standar ditotolkan pada pelat KLT silika gel 60 F254 dan dielusi dalam larutan kalium dihidrogen fosfat 10% sebagai fase gerak. Validasi metode KLT-bioautografi kontak mengacu pada USP yang meliputi parameter spesifisitas, LOD, LOQ, linearitas, akurasi, dan presisi. **Hasil:** Metode KLT-bioautografi kontak memiliki sensitivitas tinggi dengan LOD 0,75 μg dan LOQ 2,31 μg . Rentang linearitas 100-350 $\mu\text{g/mL}$ dengan nilai $r = 0,9993$ dan persamaan regresi linier adalah $y = 0,0019x + 0,0338$. Uji perolehan kembali diperoleh dari penambahan sampel blanko dengan tiga konsentrasi standar kanamisin sulfat yang berbeda adalah 101,40% \pm 2,02%. Presisi metode baik dengan koefisien variasi 0,080%. Metode KLT-bioautografi kontak didukung oleh penentuan rasio potensi kanamisin sulfat dalam sediaan injeksi dan standar kanamisin menggunakan desain 3-3. Rancangan blok acak memperoleh rasio potensi kanamisin sulfat dalam sediaan injeksi dibandingkan dengan standar kanamisin sulfat adalah 100,6%. **Kesimpulan:** Metode KLT-bioautografi kontak untuk kanamisin sulfat dalam sediaan injeksi dapat diaplikasikan pada analisis kontrol kualitas dari obat yang dianalisis.

Kata kunci: kanamisin sulfat, KLT-bioautografi kontak, *Escherichia coli*

INTRODUCTION

Kanamycin belongs to the aminoglycoside antibiotics, which works by growth preventing or killing pathogenic bacteria, such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* spp., as well as other bacteria. Kanamycin injection is usually used for serious bacterial infections for which other medicines may not work. However, it may also cause some serious side effects, including damage to hearing, sense of balance, and kidneys.

This medicine inhibits bacteria protein synthesis by tightly binding to the 30S ribosomal RNA, which causes misreading of the genetic code. The use of this medicine is for short-term only (usually 7 to 10 days) and is to be administered only under supervision of the doctor. Therapeutic drug monitoring is needed, because of its narrow therapeutic range. Therefore, a fast and accurate method is the important way for ensuring adequate therapy (Papich, 2016)

Several methods have been applied for determine kanamycin in different matrices such as gas chromatography (Stead, 2000), enzyme-linked immunosorbent assay (Chen *et al.*, 2008), spectrophotometry (Omar *et al.*, 2013), liquid chromatography-mass spectrometry (Santos & Ramos, 2016), high performance liquid chromatography (Zhang *et al.*, 2019) and among others. Although these methods are sufficiently accurate, most of their applications is low sensitive. Therefore, simple and fast, but specific and very sensitive method is needed for identification the kanamycin sulfate.

Thin-layer chromatography combined with densitometry has been reported by Hubicka *et al.* (2009) for identification and quantitative determination of kanamycin. The method has high sensitivity with LOD < 1.5 µg and the precision of the determination was very good (Hubicka *et al.*, 2009)

Thin-layer chromatography combined with a biological detection method, it is known as TLC-bioautography. This method is an effective method for identification of antibiotics and belongs to microbiological screening methods commonly used for detection of antibiotics activity. This method very sensitive and specific which performed with a minimum sample. Bioautography measures antibacterial properties of analyzed substances, i.e. inhibits bacterial growth (Choma & Grzelak, 2011). TLC-direct bioautography and TLC-immersion bioautography are specifically used for microorganisms that can grow directly on the TLC

plate. While TLC-contact bioautography can be used for microorganisms that can grow directly or indirectly on the TLC plate (Marston, 2011).

This method has been successfully applied to kanamycin sulfate analysis in injection preparations. This method was supported by determination of potential ratio between kanamycin sulfate in injection preparations and kanamycin sulfate standard, by which the growth of *Escherichia coli* ATCC 8739 as a test organism was inhibited.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Kanamycin sulfate p.g. (PT. Meiji), *Escherichia coli* ATCC 8739, kanamycin injection (PT. Meiji) obtained from pharmacy, potassium dihydrogen phosphate (Merck), nutrient broth (Merck), nutrient agar (Merck), sodium chloride (Merck) and distilled water (Otsuka).

Instrumentation

Chamber 10 x 10 x 6 cm³ (Camag), TLC silica gel 60 F₂₅₄ plate (Merck), incubator (Mettler), autoclave (Huxley HV-340 Speedy), vortex (Thermo), micropipet (Socorex) and spectrophotometer (Lovibond Spectro PC 22).

Preparation of growth media

Eighteen grams of agar and 8 g of nutrient broth were dissolved in 1000 mL distilled water, mixed and heated with stirred until homogeneous. The media was sterilized by autoclave at 121°C for 15 minutes.

Preparation of bacterial inoculum

Escherichia coli ATCC 8739 were inoculated on nutrient agar slant media and incubated at 35-37°C for 24 hours. The bacterial suspension was prepared by adding 10 mL of sodium chloride 0.9% solution to the 24 hours culture and shaking with vortex until the entire colony was removed from the surface of the agar media. The optical density of colony suspension was measured at 580 nm and adjusted to obtain 25% transmittant.

Preparation of standard solutions

An accurately weighed 0.1 g of kanamycin sulfate and dissolved in 100 mL distilled water for obtaining 1000 µg/mL stock of standard solution. A serial dilution was made to obtained 10, 250, and 500 µg/mL of standard solution.

Preparation of sample solution

An amount of kanamycin sulfate vial content equivalent to 0.025 g kanamycin sulfate was dissolved in 10 mL aqua pro injections.

Optimization of mobile phase

Optimization of mobile phase was carried out using 10% and 12% of potassium dihydrogen phosphate solution respectively. The Kanamycin sulfate standard solution of 500 µg/mL was spotted as much as 10 µL on the TLC plate, and then developed in the mobile phase. The eluted plate was dried.

TLC-contact bioautography

Ten microliters of standard and test solution were spotted on the TLC plate, then developed with selected eluent of potassium dihydrogen phosphate solution. After the eluent front was reached, the TLC plate was dried aseptically to remove the eluent from the silica gel 60 F₂₅₄. The TLC plate was placed on the inoculated agar surface with 5 µL *Escherichia coli* ATCC 8739 inoculum and stored in refrigerator for 2 hours to allow diffusion process. Furthermore, the plate was removed and the petri dish was incubated at 37°C for 16 hours. The growth inhibitory zone diameter was measured.

Method validation

Selectivity

The specificity of TLC-contact bioautography was established by analyzed of streptomycin sulfate and kanamycin sulfate standard solutions simultaneously on the silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate. Elution was carried out with 10% potassium dihydrogen phosphate solution. The selectivity of streptomycin sulfate and kanamycin sulfate was assessed by resolution (R_s) value.

LOD and LOQ

The LOD and LOQ of TLC-contact bioautography was determine by analyzed of kanamycin sulfate standard solutions on the silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate. Elution was carried out with 10% potassium dihydrogen phosphate solution. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was limit of detection.

Linearity

The linearity of TLC-contact bioautography was determine by analyzed of kanamycin sulfate standard solutions on the silica gel 60 F₂₅₄ TLC plate to obtain concentration 100, 150, 200, 250, 300 and 350 µg/mL. Elution was carried out with 10% potassium dihydrogen phosphate solution. Inhibitory zone plotted

against corresponding amount to obtain the calibration plot.

Accuracy

The recovery of kanamycin sulfate at different levels in sample, pre-analyzed sample was spiked with 80%, 100%, and 120% extra kanamycin sulfate standard and analyzed by use of the TLC-contact bioautography.

Precision

The precision of TLC-contact bioautography was assessed by repeatability (intraday precision). The repeatability was performed by analyzed of three different concentration levels of kanamycin sulfate (150, 175, and 200 µg/mL) under the same operating conditions over a short interval of time (the same day). The precision was evaluated as the coefficient of variation (CV).

Potency ratio of antibiotic

Five microliters of test bacteria inoculum 25% transmitant was inoculated on 8000 µL of melted nutrient agar media, vortexed homogenous. The cylinders placed from each other 20 - 25 mm apart. A standard solutions (S1:S2:S3) and sample solutions (U1:U2:U3) were dropped 20 µL. Incubation at 35 - 37°C for 24 hours. The growth inhibitory zone diameter was measured. Statistical analysis of data using the formula equation (1).

$$\text{Potency ratio} = \text{Antilog } \mu \times 100 \% \dots\dots\dots(1)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of mobile phase

The results of optimization of the mobile phase showed by Figure 1. If the mobile phase is able to separate the analyte from the sample matrix. This is indicated by the value of R_f = 0.2-0.8 and spot is not tailing (Sherma & Fried, 2013). A 12% potassium dihydrogen phosphate solution has R_f value 0.7 and has a tailing spot, while 10% potassium dihydrogen phosphate solution has R_f value 0.4 and has not tailing spot. The results of obtained R_f values confirm that, of all concentration of mobile phases, the mobile phase which containing 10% potassium dihydrogen phosphate solution was suitable for identification of kanamycin sulfate.

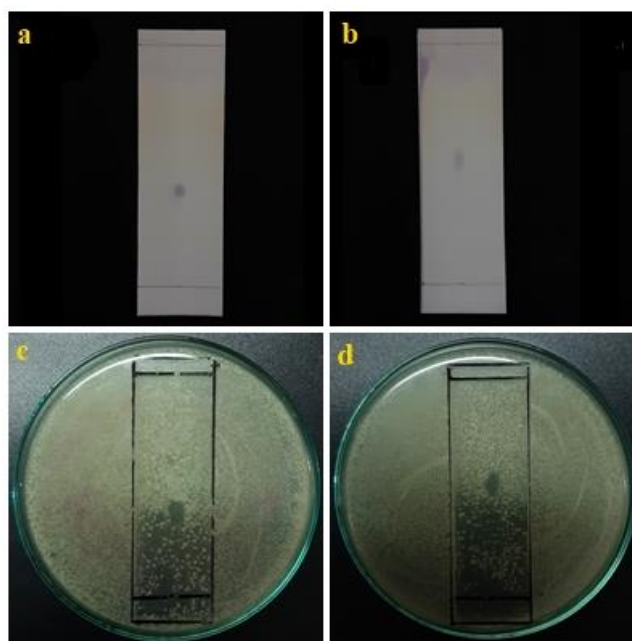


Figure 1. Result of chromatogram of mobile phase using (a) 10 % potassium dihydrogen phosphate solution and (b) 12 % potassium dihydrogen phosphate solution. TLC-bioautogram of mobile phase using (c) 10 % potassium dihydrogen phosphate solution and (d) 12 % potassium dihydrogen phosphate solution

Validation of the proposed method

The proposed TLC-contact bioautography for determination kanamycin sulfate in injection preparations was validated according to USP guidelines with respect to selectivity, LOD, LOQ, linearity, accuracy and precision.

Selectivity results showed R_s value was 3.47. The method satisfies the selective requirement if value of $R_s \geq 2.00$, which means that the two analytes has been separated well. The results are summarized in Table 1.

Table 1. Result of resolution (R_s) value of streptomycin (STR) and kanamycin (KAN)

Sample	Rf (STR)	Rf (KAN)	R_s
Kanamycin sulfate	-	0.4	-
Kanamycin sulfate + streptomycin sulfate	0.7	0.4	3.47

LOD was determined by minimum inhibitory concentration of kanamycin sulfate analyzed using TLC-contact bioautography was 0.70 μg while LOQ was 2.31 μg .

Linearity of the TLC-contact bioautography method was determined by plotting concentration of kanamycin sulfate standard (x) versus growth inhibitory zone diameter (y), as shown in Figure 2. The plot (n = 5) was linear for kanamycin sulfate in the range from 100 to 350 $\mu\text{g/mL}$ with correlation coefficients (r) was 0.9993.

Accuracy of the method is determined by recovery. The recovery from addition of blank samples at three different concentrations of kanamycin sulfate was obtained 101.40% and SD = 2.02. The results are summarized in Table 2. The precision of the method (% CV) was assessed by repeatability. If the method gives a coefficient of variation < 2%, then it gives good precision (Gandjar & Rochman, 2007). In this method the coefficient of variation was 0.080%. From these data the TLC-contact bioautography method meets the requirements.

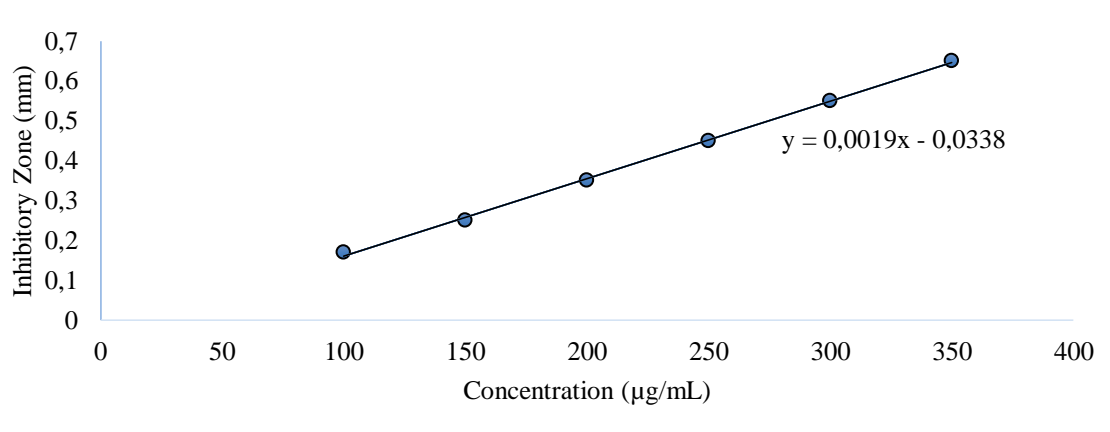


Figure 2. Linear regression of kanamycin sulfate standard analyzed by TLC-contact bioautography using *Escherichia coli* ATCC 8739 as test organism

Table 2. Evaluation of the accuracy of TLC-contact bioautography method

Sample	Conc (µg/mL)	Inhibition zone diameter (cm)	% Recovery
Kanamycin sulfate	150	3.02	98.53
		3.02	98.53
		3.02	98.53
	175	3.60	101.40
		3.60	101.40
		3.60	101.40
	200	3.75	97.50
		3.75	97.50
		3.75	97.50

Application to pharmaceutical dosage forms

TLC-contact bioautography method developed for the determination of kanamycin sulfate was reliable by only using single solvent, specific and very sensitive method for identification kanamycin sulfate. The

results of identification of kanamycin sulfate in injection preparations showed positive containing kanamycin sulfate. The results are summarized in Table 3.

Table 3. Evaluation of the precision of TLC-contact bioautography method

Sample	Conc (µg/mL)	Inhibition zone diameter (cm)	% CV
Kanamycin sulfate	150	3.05	0.006
		3.02	
		3.02	
	175	3.12	0.080
		3.60	
		3.60	
	200	3.45	0.050
		3.75	
		3.75	

Potency ratio of antibiotic

After measuring the diameter of the inhibitory zone showed by Table 4, the percentage of potential antibiotic test can be calculated by Table 5. The results of ratio of kanamycin sulfate standard and kanamycin in injection preparations showed by Figure 3. Kanamycin in injection preparation is considered good if it has the potential to inhibits bacterial growth in the

range of 90% to 115% (Ministry of Health of the Republic of Indonesia, 2014). The results of the calculation of the percentage of antibiotic potential in this study was 100.6%. Therefore, kanamycin in injection preparations is appropriate because it is in the range listed in accordance with Indonesia Pharmacopoeia fifth edition.

Table 4. Evaluation of identification kanamycin sulfate by TLC-contact bioautography method

Sample	Replication	Inhibition zone diameter (mm)	Conc (µg/mL)
Kanamycin injection	1	1.25	640.10
	2	1.25	640.10
	3	1.05	534.84
	Mean	1.18	605.01

Table 5. The result of measurement inhibitory zone of kanamycin injection using *Escherichia coli* ATCC 8739 as test organism

Petri dishes	Inhibition zone diameter (mm)					
	S ₁	S ₂	S ₃	U ₁	U ₂	U ₃
1	20.50	21.40	22.10	20.05	21.05	22.40
2	20.75	21.45	22.70	20.25	21.70	22.05
3	20.80	21.05	22.70	20.55	21.50	22.10
4	20.30	21.50	22.20	20.80	21.50	22.10
Σ	82.35	85.40	89.70	81.65	85.75	88.65
Mean	20.59	21.35	22.43	20.41	21.44	22.16

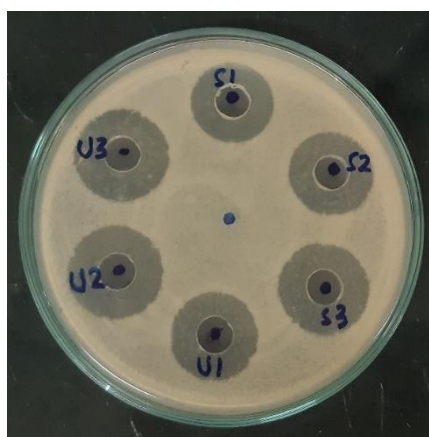


Figure 3. Result of ratio of kanamycin sulfate standard (S) and kanamycin in injection preparations (U) using *Escherichia coli* ATCC 8739 as test organism on nutrient agar media. S1 and U1 = 40 µg/mL; S2 and U2 = 60 µg/mL; S3 and U3 = 90 µg/mL.

CONCLUSION

The TLC-contact bioautography for determination kanamycin sulfate in injection preparations was validated according to USP guidelines meet the method was validated to meet requirements which include selectivity, LOD, LOQ, linearity, accuracy and precision. The TLC-contact bioautography method was supported by determination of kanamycin potency ratio in the injection preparation. Moreover, this method could be applied to the quality control analysis of the investigated drugs.

REFERENCES

Chen, Y., Wang, Z., Wang, Z., Tang, S., Zhu, Y. & Xiao, X. (2008). Rapid Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunoassay for Kanamycin and Tobramycin in Swine Tissues. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry; 56; 2944–2952.
 Choma, I. M. & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography Detection in Thin-layer Chromatography. *Journal of Chromatography A*; 1218; 2684–2691.
 Gandjar, I. G. & Rochman, A. (2007). *Pharmaceutical Chemistry Analysis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
 Hubicka, U., Krzek, J., Woltynska, H. & Stachacz, B. (2009). Simultaneous Identification and Quantitative Determination of Selected Aminoglycoside Antibiotics by Thin-layer Chromatography and Densitometry. *Journal of AOAC International*; 92; 1068-75.
 Marston, A. (2011). Thin-layer Chromatography with Biological Detection in Phytochemistry. *Journal of Chromatography A*; 1218; 2676–2683.
 Ministry of Health of the Republic of Indonesia. (2014). *Indonesia Pharmacopoeia (5th edition)*. Jakarta: Ministry of Health of the Republic of Indonesia.

- Omar, M. A., Nagy, D. M., Hammad, M. A. & Aly, A. A. (2013). Validated Spectrophotometric Methods for Determination of Certain Aminoglycosides in Pharmaceutical Formulations. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 3; 151–161.
- Papich, M. G. (2016). Kanamycin Sulfatein: Saunders Handbook of Veterinary Drugs. London: Elsevier.
- Santos, L. & Ramos, F. (2016). Analytical Strategies for the Detection and Quantification of Antibiotic Residues in Aquaculture Fishes: A Review. *Trends in Food Science and Technology*; 52; 16–30.
- Sherma, J. & Fried, B. (2013). Handbook of Thin-layer Chromatography. New York: Marcel Dekker.
- Stead, D. A. (2000). Current Methodologies for the Analysis of Aminoglycosides. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*; 747; 69–93.
- Zhang, X., Wang, J., Wu, Q., Li, L., Wang, Y. & Yang, H. (2019). Determination of Kanamycin by High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*; 24; 1–24.

Pengaruh Pemberian Salep Kombinasi Ekstrak Daun *Morinda citrifolia* dan Batang *Euphorbia tirucalli* terhadap Penyembuhan Luka

Reza Pertiwi^{1*}, Syalfinaf Manaf², Rochmah Supriati², Hari Marta Saputra², Fitri Ramadhanti³

¹Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Bengkulu Indonesia

²Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Bengkulu, Bengkulu, Indonesia

³Rumah Sakit Umum Daerah Tais, Kabupaten Seluma, Provinsi Bengkulu, Indonesia

*Corresponding author: rpertiwi@unib.ac.id

Submitted: 16 Maret 2020

Accepted: 5 Mei 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: Wound healing is a process of replacing dead or damaged tissue through the process of cell regeneration. The branches of *Euphorbia tirucalli* contains alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins, while *Morinda citrifolia* contains alkaloids, tannins, saponins, flavonoids, and triterpenoids. The ability of ointment combination of *Morinda citrifolia* leaves extract and the stem of *Euphorbia tirucalli* can accelerate wound healing. **Objective:** This study aimed to determine the effective formulation and the effect of ointment combination extract on *Morinda citrifolia* leaves and the stem of *Euphorbia tirucalli* extracts on the healing of rats' superficial incision wound. **Methods:** 28 male white rats divided into 7 treatment groups. Group K (-) without treatment, group K (+) given Povidone Iodine 10%, F1 with ointment of *Euphorbia tirucalli* stem extract, F2 with ointment *Morinda citrifolia* leaf extract, P3 with ointment combination *Morinda citrifolia* leaves and *Euphorbia tirucalli* stem 0.75:0.25; F4 with ointment combination *Morinda citrifolia* leaves and *Euphorbia tirucalli* stem extract 1:1, and F5 giving ointment combination with *Morinda citrifolia* leaves and *Euphorbia tirucalli* stem 0.25:0.75. Histopathology observation of incised wound skin was descriptively analyzed by comparing the treatment and the control group. **Results:** Formulation III is the effective formulation where on the 5th and 6th day the wound started to close while on the 7th and 8th day the wound completely closed. **Conclusion:** The use of ointment formulations affects the regeneration of superficial incision wound healing cells through the inflammatory phase, TNF- α , re-vascularization, and proliferation phase.

Keywords: *Euphorbia tirucalli*, *Morinda citrifolia*, wound healing, superficial incision wound healing

Abstrak

Pendahuluan: Penyembuhan luka adalah proses terjadinya penggantian jaringan yang rusak atau mati dengan jaringan yang baru melalui proses regenerasi sel. Ranting *Euphorbia tirucalli* mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin, sedangkan *Morinda citrifolia* memiliki kandungan alkaloid, tanin, saponin, flavonoid serta triterpenoid. Kemampuan kandungan dari kombinasi salep ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* diduga dapat mempercepat penyembuhan luka dan periode fibroblas, neovaskularisasi dan epitelisasi. **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui formulasi salep yang efektif dan pengaruh salep kombinasi ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* terhadap penyembuhan luka insisi dangkal pada tikus. **Metode:** Sebanyak 28 ekor tikus jantan dibagi kedalam 7 kelompok perlakuan. Kelompok K(-) tanpa perlakuan, kelompok K(+) dengan pemberian Povidon Iodine 10%, F1 dengan pemberian salep kombinasi ekstrak batang *Euphorbia tirucalli*, F2 dengan pemberian salep ekstrak daun *Morinda citrifolia*, F3 dengan pemberian salep kombinasi ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* perbandingan 0,75:0,25; F4 dengan pemberian salep kombinasi ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* dengan perbandingan 1:1 dan F5 dengan pemberian salep kombinasi ekstrak daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* perbandingan 0,25:0,75. Pengamatan histopatologi kulit tikus dianalisis secara deskriptif

dengan membandingkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. **Hasil:** Formulasi salep yang efektif adalah formulasi III dimana hari ke-5 dan hari ke-6 luka sudah mulai menutup sedangkan pada hari ke-7 dan 8 luka sudah menutup. **Kesimpulan:** Pemberian salep kombinasi daun *Morinda citrifolia* dan batang *Euphorbia tirucalli* efektif dalam menyembuhkan luka insisi dangkal melalui fase inflamasi, TNF- α , re-vaskularisasi dan fase proliferasi.

Kata kunci: *Euphorbia tirucalli*, *Morinda citrifolia*, penyembuhan luka, luka insisi dangkal

PENDAHULUAN

Penyembuhan luka adalah proses terjadinya penggantian jaringan yang rusak atau mati dengan jaringan yang baru melalui proses regenerasi sel. Proses penyembuhan dari sel parenkim dengan mengganti sel yang rusak dengan sel yang baru dan sama sehingga fungsi tubuh atau jaringan akan pulih kembali dengan sempurna dikenal sebagai regenerasi. Proses yang kemudian terjadi pada jaringan yang rusak tersebut ialah proses penyembuhan dan regenerasi sel yang terjadi sebagai respon fisiologis tubuh. Proses penyembuhan luka terdiri dari tiga fase yaitu inflamasi, proliferasi atau granulasi dan fase remodeling (Sjamsuhidajat & Jong, 2010).

Fase inflamasi merupakan reaksi awal bila tubuh terkena luka (Ambiyani, 2013). Fase ini terjadi segera setelah cedera dan dapat berlangsung sampai 4 - 6 hari (Broughton dkk., 2006). Fase proliferasi dimulai setelah respon akut dari hemostasis dan inflamasi mulai berhenti, ancap-ancang perbaikan luka mulai dilakukan dengan angiogenesis, fibroplasia dan epitelisasi. Fase ini dimulai sekitar hari ketiga yang ditandai dengan peningkatan drastis dari koloni sel dan produksi kolagen. Produksi kolagen sebenarnya telah dapat dideteksi mulai sepuluh jam setelah trauma, mencapai puncaknya pada hari ketujuh, dimana luka telah terisi penuh oleh jaringan kolagen (Lawrence & Lowenstein, 2001). Fase *Remodeling* merupakan fase terpanjang penyembuhan luka yaitu pematangan proses, yang meliputi perbaikan yang sedang berlangsung pada jaringan granulasi yang membentuk lapisan epitel yang baru dan meningkatkan tegangan pada luka (Ueno dkk., 2006).

Penanganan luka dapat dilakukan dengan memberikan antiseptik, antibiotik, dan perawatan luka pada umumnya dengan pemberian *povidone iodine* yang berfungsi sebagai antiseptik yang dapat membunuh mikroorganisme seperti bakteri, jamur, virus, protozoa, dan spora bakteri (Putra, 2016).

Mengkudu adalah satu dari tanaman tropikal yang memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder

tannin, alkaloid, saponin, flavonoid serta triterpenoid (Soni & Singhai, 2012). Pada kulit, flavonoid dapat menghentikan pendarahan dari luka dan meningkatkan aktivitas vitamin C sebagai antioksidan (Nabilla, 2014). Tanin dan saponin diketahui juga berperan sebagai antimikroba dan antioksidan, meningkatkan kontraksi luka dan meningkatkan kecepatan epitelisasi (Thakur dkk., 2011). Daun segar mengkudu secara tradisional dikonsumsi sebagai obat untuk patah tulang, luka sayat, luka bakar dan nyeri (Rasal dkk., 2008).

Batang *Euphorbia tirucalli* mengandung glikosida, saponin, dan asam elagat (Dalimartha, 2003), ranting patah tulang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Absor, 2006). Senyawa aktif dari *Euphorbia tirucalli* yaitu saponin yang dapat mempengaruhi kolagen dengan menghambat produksi jaringan luka yang berlebihan sebagai tahap awal perbaikan jaringan (Setyoadi & Sartika, 2010). Senyawa aktif tanin juga berpengaruh dalam penyembuhan luka yang bermanfaat sebagai *astringent* (Suprpto, 2012).

Kemampuan kombinasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang diduga dapat mempercepat penutupan luka dan periode fibroblas, neovaskularisasi dan epitelisasi yang belum terungkap secara ilmiah sampai saat ini, sehingga penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang bentuk formulasi salep dalam mempercepat kesembuhan luka sayat tikus jantan melalui penutupan luka dan periode fibroblas, neovaskularisasi dan epitelisasi.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan adalah ekstrak daun mengkudu, ekstrak batang patah tulang, Alkohol 70 %, etanol 96%, Povidon Iodine 10%, vaselin album, adeps lanae, Aquades, formalin 10%, etanol 96%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, etanol absolut 1, alkohol absolut 2, blok paraffin I dan II, xylol I, II, III, IV, V, kaca objek, kaca penutup, HE, canada balsem, kain

kasa, makanan dan minum standar untuk tikus, air panas, serbuk Mg, HCl pekat, larutan FeCl₃ 10%, HCl 2N, kertas saring, aluminium foil, kloroform.

Alat

Alat yang digunakan adalah kandang tikus, timbangan analitik, gelas ukur, *waterbath*, saringan, blender, sarung tangan, *cuttonbud*, batang pengaduk, gunting, mata pisau, alat cukur, kamera digital, blok parafin, mikrotom, inkubator, mikroskop trinokuler, pipet volumetrik, tabug reaksi, mortar, sutil, lempeng kaca, *killing bottle*.

Metode

Pembuatan ekstrak daun mengkudu

Daun mengkudu yang masih segar dipilih dan dikumpulkan sebanyak 1 Kg. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%.

Pembuatan ekstrak batang patah tulang

Pembuatan ekstrak batang patah tulang dengan mengambil batang patah tulang yang muda sebanyak 1 Kg. Batang patah tulang yang sudah kering diblender dan diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut alkohol 70%.

Formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang

Formulasi salep dibuat dengan mengacu pada formulasi dari Akhtar dkk. (2014) dalam Rakhim (2016) yang kemudian dimodifikasi. Dosis ekstrak yang digunakan dalam formulasi salep yaitu 10%. Sediaan salep dibuat menjadi 5 formulasi berbeda dengan variasi konsentrasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Formulasi sediaan salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang

Komposisi	Formulasi salep (gram)				
	F1	F2	F3	F4	F5
Ekstrak daun mengkudu	0	2,0	1,5	1	0,5
Ekstrak batang patah tulang	2,0	0	0,5	1	1,5
Vaselin album	15,3	15,3	15,3	15,3	15,3
Adeps lanae	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
Jumlah	20				

*F1: Formulasi salep ekstrak batang patah tulang; F2: Formulasi salep ekstrak daun mengkudu; F3: Formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang perbandingan 0,75:0,25; F4: Formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang perbandingan 1:1; F5: Formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang perbandingan 0,25:0,75.

Preparasi tikus jantan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus jantan (*Rattus novergicus*) Sprague Dawley sebanyak 28 ekor yang terbagi dalam 7 kelompok perlakuan. Bulu daerah punggung tikus dicukur sampai licin, kemudian dibersihkan menggunakan kapas beralkohol 70%. Setelah itu, punggung tikus dilukai menggunakan mata pisau yang steril, sepanjang 1 cm sedalam 0,2 cm.

Pemberian formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan ekstrak batang patah tulang

Pemberian salep berdasarkan pada formulasi salep dengan ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang yang terdiri dari:

1. Kelompok 1 (K-) adalah kelompok yang merupakan kontrol negatif tanpa pemberian perlakuan.
2. Kelompok 2 (K+) adalah kelompok yang merupakan kontrol positif dengan pemberian *Povidon Iodine* 10% sebanyak 2 tetes.

3. Kelompok 3 (P1) adalah kelompok yang diberi salep dengan ekstrak batang patah tulang.
4. Kelompok 4 (P2) adalah kelompok yang diberi salep dengan ekstrak daun mengkudu.
5. Kelompok 5 (P3) adalah kelompok tikus jantan yang diberi salep dengan perbandingan ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang 0,75:0,25.
6. Kelompok 6 (P4) adalah kelompok tikus jantan yang diberi salep dengan perbandingan ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang 1:1.
7. Kelompok 7 (P5) adalah kelompok tikus jantan yang diberi salep dengan perbandingan ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang 0,25:0,75.

Pemberian perlakuan dilakukan 2 kali sehari (pagi dan sore) dan pengamatan luka dilakukan sekali sehari.

Pembuatan preparat histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dengan pengambilan sampel organ kulit tikus pada hari ke 2 dan 8 yang dipotong sampai dengan subkutan dengan

ketebalan kurang lebih 3 mm dan panjang 2 cm. Semua hewan percobaan dieuthanasia dengan *killling bottle*. Daerah punggung yang diambil kulitnya, dibersihkan terlebih dahulu dari bulu yang mulai tumbuh kembali.

Kulit dimasukkan dalam kain kasa, didehidrasi dan direndam dalam larutan etanol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, 100%, 100% dan 100% masing-masing selama 60 menit pada suhu kamar, Proses selanjutnya dilakukan penjernihan (*clearing*) menggunakan xylol selama 15 menit pada suhu kamar sebanyak tiga kali. Setelah proses *clearing* dilakukan proses infiltrasi dengan parafin cair sebanyak 3 kali pembedahan masing-masing 60 menit dalam inkubator suhu 60°C. Jaringan kemudian dibenamkan dalam parafin cair dan didinginkan dalam suhu kamar sehingga menjadi blok parafin. Selanjutnya dilakukan proses *embedding* dan pemotongan dengan mikrotom arah horisontal dengan ketebalan 3 μ . Pengecatan toluidin *blue* dilakukan dengan prosedur sebagai berikut : parafin dihilangkan dengan *xylol*, kemudian dimasukkan dalam etanol 100%, 95% dan 70% masing-masing selama 5 menit, kemudian dimasukkan dalam aquades. Pengecatan dengan toluidin *blue* selama 40-60 menit dalam oven suhu 600° C, kemudian dimasukan ke dalam etanol 70%, 95% dan 100%. Setelah diberi Canada balsam ditutup dengan dek glass (Ahmad, 2009).

Pengamatan histopatologi

Pengamatan histopatologi kulit luka insisi dangkal tikus dilakukan dengan pengambilan sampel organ kulit tikus pada hari ke 2 dan 8 yang dipotong sampai dengan subkutan dengan ketebalan kurang lebih 3 mm dan panjang 2 cm. Semua hewan percobaan dieuthanasia dengan *killling bottle*. Daerah punggung yang diambil kulitnya, dibersihkan terlebih dahulu dari bulu yang mulai tumbuh kembali.

Analisis data

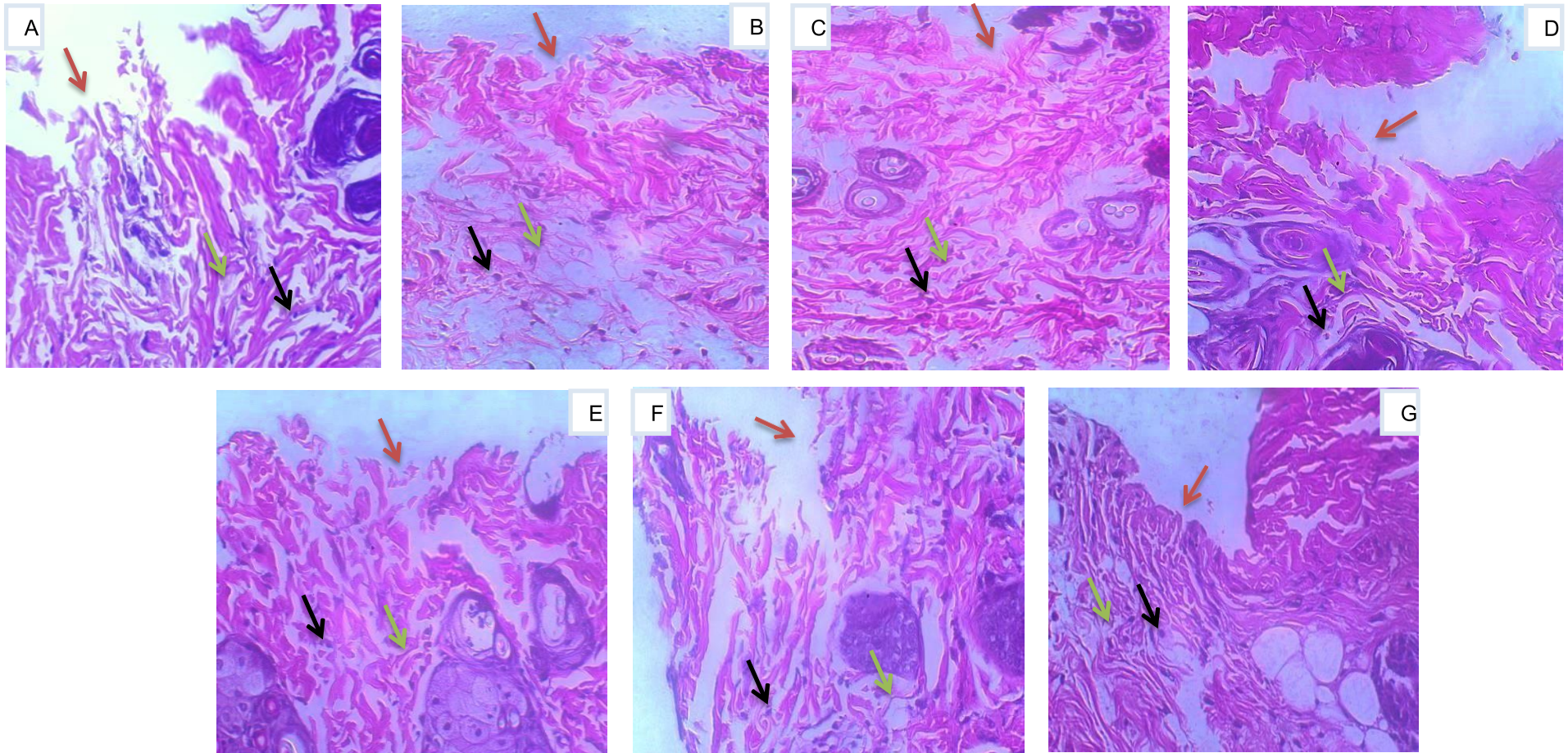
Hasil histopatologi yang diperoleh dalam penelitian ini dianalisis dengan membandingkan antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

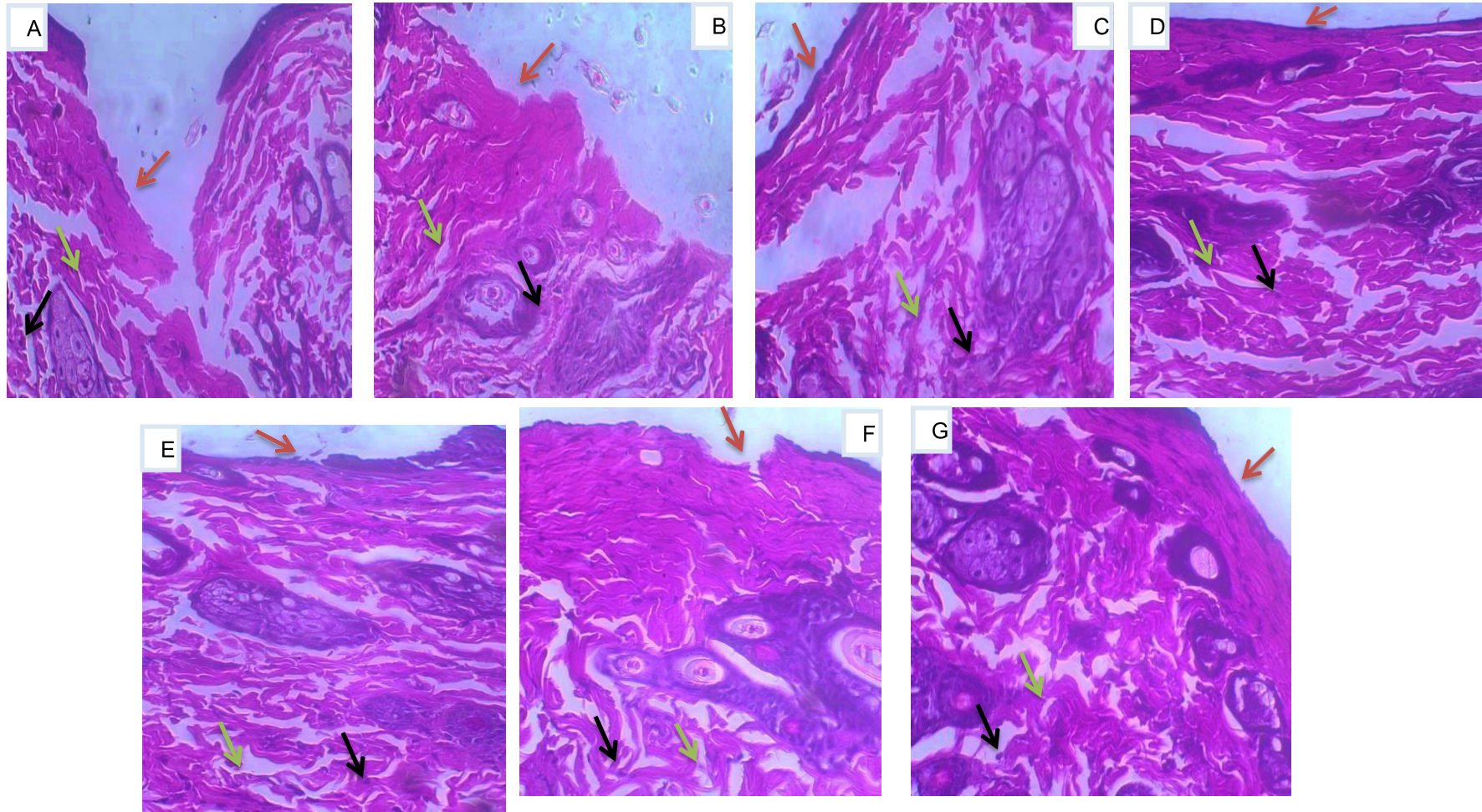
Penanganan luka insisi dengan menggunakan bahan yang terdapat di alam dapat dibuat dalam sediaan salep yaitu salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang. daun mengkudu dan batang patah tulang terdapat senyawa aktif metabolit sekunder berupa saponin, flavonoid dan tannin yang berperan dalam penyembuhan luka.

Saponin dapat merusak permeabilitas membran yang mengakibatkan dinding sel bakteri rusak atau hancur sehingga saponin diduga memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan antiseptik (Absor, 2006). Flavonoid juga diduga mempunyai kemampuan sebagai antibakteri karena kemampuannya yang dapat merusak susunan perubahan mekanisme permeabilitas pada dinding sel bakteri yang terjadi pada luka, selain itu flavonoid disebut sebagai antiseptik dan memiliki aktivitas biologis seperti antioksidan (Djamil dkk., 2012). Tanin diduga mempunyai kemampuan sebagai *astringent*, antioksidan dan antibakteri (Absor, 2006).

Pengamatan hari ke-2 (Gambar 1) histopatologi kulit tikus luka insisi dangkal setelah perlakuan ini terjadi fase inflamasi respon seluler, pada bagian lapisan epidermis terlihat epitel rusak dan dilapisan dermis terlihat fibroblas. Fibroblas yang terdapat pada kelompok kontrol negatif belum terlihat secara jelas sedangkan pada kontrol positif fibroblas sudah terlihat secara jelas dan fibroblas pada kelompok kontrol positif lebih banyak daripada fibroblas kelompok perlakuan. Hal ini dimungkinkan karena fase inflamasi berjalan normal (0-3 hari), tidak mengalami gangguan, dan fungsi dari sel-sel yang berperan pada respon seluler, termasuk perangsangan terbentuknya berbagai *Growth Factor* tidak terhambat, sehingga dapat meneruskan kepada fase selanjutnya (fase proliferasi) dengan cepat pada kelompok kontrol positif maupun kelompok kontrol.



Gambar 1. Histologi kulit tikus luka insisi dangkal hari ke-2 hasil pewarnaan HE (400x) : →Epidermis yang rusak, →fibroblas, →neovaskularisasi.
A) kontrol negatif, B) kontrol positif, C) formulasi I, D) formulasi II, E) formulasi III, F) formulasi IV, G) formulasi V



Gambar 2. Histologi kulit tikus luka insisi dangkal hari ke-8 hasil pewarnaan HE (400x) : → epidermis yang rusak → fibroblas, → neovaskularisasi.
A) kontrol negatif, B) kontrol positif, C) formulasi I, D) formulasi II, E) formulasi III, F) formulasi IV, G) formulasi V

Penggunaan basis salep yaitu vaselin album dan adeps lanae diketahui dapat membantu perbaikan luka. Hal ini dikarenakan sifat adeps lanae yang membantu penyerapan zat aktif untuk dapat masuk ke kulit, sedangkan vaselin album membantu salep untuk dapat bertahan lama dikulit sehingga penyerapan zat aktif dapat maksimal (Sentat & Permatasari, 2015).

Pengamatan hari ke-8 (Gambar 2) histopatologi kulit tikus luka insisi dangkal setelah perlukaan terjadi fase proliferasi yang ditandai dengan jaringan dermis yang sudah mulai terinvasi dan terbentuknya epitelisasi, pada bagian lapisan epidermis terjadi proses epitelisasi kecuali pada kelompok kontrol negatif dan pada bagian lapisan dermis sudah terinvasi dengan jaringan granulasi. Epitel yang terdapat pada kelompok kontrol negatif belum mengalami epitelisasi dan masih terlihat celah luka, namun jaringan dermis sudah mulai terinvasi oleh jaringan granulasi, pada kelompok kontrol positif belum terlihat epitel tumbuh namun pada bagian epidermis bawah sudah mulai

terinvasi dan pada bagian dermis sudah terinvasi oleh jaringan granulasi sedangkan pada kelompok perlakuan dengan fomulasi I, epitel sudah mengalami epitelisasi tetapi jaringan dermis belum sepenuhnya terinvasi oleh jaringan granulasi, pada kelompok perlakuan dengan formulasi II, IV dan V, epitel sudah mengalami epitelisasi namun belum sempurna dan jaringan dermis telah sepenuhnya terinvasi oleh jaringan granulasi, pada kelompok perlakuan dengan formulasi III, epitel sudah mengalami epitelisasi yang mendekati sempurna dan jaringan dermis telah sepenuhnya terinvasi oleh jaringan granulasi. Keadaan ini karena adanya berbagai antioksidan kuat ditambah dengan antibakteri yang terdapat pada daun mengkudu dan batang patah tulang, membantu fase inflamasi berjalan normal dan mempercepat terjadinya fase proliferasi, sehingga migrasi dan proliferasi sel-sel epidermal tidak terhambat. Hasil pengamatan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Penilaian parameter pada hasil preparat hari ke-2 dan ke-8

Kelompok perlakuan	Hari ke-	Penilaian parameter		
		Fibroblas	Neovaskularisasi	Epitelisasi
Kontrol Negatif	2	+	++	-
	8	+	++	-
Kontrol Positif	2	+++	++	-
	8	+	+	-
P1	2	++	++	-
	8	+	++	++
P2	2	+	+++	-
	8	+	++	+
P3	2	++	++	-
	8	+	+	++
P4	2	++	++	-
	8	+	+	+
P5	2	++	++	-
	8	+	+	+

Keterangan :

- + : Terdapat fibroblas, neovaskularisasi, dan epitelisasi
- ++ : Terdapat banyak fibroblas, neovaskularisasi, dan epitelisasi
- +++ : Terdapat lebih banyak fibroblast dan neovaskularisasi
- : Tidak terbentuk epitelisasi

Pada salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tannin dan saponin yang bekerja secara sinergis dalam membantu penyembuhan luka insisi dangkal dalam regenerasi sel. Flavonoid berperan dalam fase inflamasi, tanin berperan dalam proses angiogenesis atau neovaskularisasi (re-vaskularisasi) dan saponin bereperan dalam proses fibroblas yang akan menjadi

epitel (re-epitelisasi) (Suprpto 2012; Soni & Singhai, 2012; Sibi dkk., 2012).

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam batang patah tulang dan daun mengkudu dapat ditentukan dengan metode skrining fitokimia. Senyawa metabolit sekunder yang dianalisis meliputi flavonoid, tanin dan saponin. Hasil skrining fitokimia batang patah tulang dan daun mengkudu dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Hasil uji fitokimia batang patah tulang

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Flavonoid	+	Berwarna Jingga
Tanin	+	Berwarna Biru Tua
Saponin	+	Terdapat Sedikit Buih yang Stabil

Tabel 4. Hasil uji fitokimia daun mengkudu

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Flavonoid	+	Berwarna Jingga
Tanin	+	Berwarna Hijau Kehitaman
Saponin	++	Terdapat Banyak Buih yang Stabil

KESIMPULAN

Formulasi salep kombinasi ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang dapat memperbaiki histopatologi kulit pada luka insisi dangkal dalam penyembuhan luka pada tikus. Formulasi salep yang paling efektif adalah formulasi III dengan perbandingan ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang 0,75:0,25 yang terlihat dari penurunan jumlah fibroblas, penurunan neovaskularisasi menjadi vaskularisasi dan peningkatan proses epitelisasi (pembentukan sel epitel) secara signifikan (Tabel 2).

Pemanfaatan formulasi kombinasi salep ekstrak daun mengkudu dan batang patah tulang, berpengaruh terhadap regenerasi sel penyembuhan luka insisi dangkal pada tikus putih jantan yang melalui beberapa fase penyembuhan yaitu fase inflamasi, TNF- α , re-vaskularisasi dan fase proliferasi, yang ditandai dengan ditemukannya fibroblas, neovaskularisasi dan epitelisasi secara histopatologi dalam 2 satuan waktu pengambilan.

UCAPAN TERIMAKASIH

Dengan selesainya penelitian ini, kami ucapkan terima kasih kepada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Bengkulu atas fasilitas yang diberikan untuk membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Absor, U. (2006). Aktifitas Antibakteri Batang Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* Linn). *Skripsi*; Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor, Bogor

Ahmad, A. J. (2009). *Histoteknik Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Akhtar, M. M., Srivastava, S., Sinha, P., Singh, K. D., Luqman, S., Tandon, S. & Yadav, P. N. (2014). Antimicrobial Potential of Topical Formulation Containing Essential Oil of *Encalyptus citriodora* Hook, *Journal of Annals Phytomedicine*; 3; 37-42.

Ambiyani, W. (2013). Pemberian Salep Ekstrak Daun Mengkudu Meningkatkan Proses Regenerasi Jaringan Luka pada Tikus Putih Galur Wistar jantan. *Tesis*; Fakultas Kedokteran Universitas Udayana Bali, Bali.

Broughton, I. I. G., Janis, J. E. & Attiger, C. E. (2006). Wound Healing: An Overview. *Plastic Reconstruction Surgery*; 117; 1-32.

Dalimartha, S. (2003). Atlas Tumbuhan Obat Indonesia (Jilid 4). Jakarta: Pustaka Bunda.

Djamil, R., Wahyudi, P. S., Wahono, S. & Hanari, M. (2012). Antioxidant Activity of Flavonoid from *Anredera cordifolia* (Ten) Steenis Leaves. *International Research Journal of Pharmacy*; 3; 241- 243.

Lawrence, W. T. & Lowenstein, A. (2001). Wounds: Biology, Pathology, and Management. In: Norton JA, Bollinger RR, Chang AE, Lowry SF, Mulvihill SJ, Pass HI, Thompson RW (ed.). *Surgery: Basic Science and Clinical Evidence*; 221-236. New York: Springer-Verlag.

Nabilla, R. F. (2014). Pengaruh Pemberian Salep Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) terhadap Re-epitelisasi pada Luka Bakar Tikus Sprague Dawley. *Skripsi*; Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah, Jakarta.

Rakhim, M. (2016). Formulasi Sediaan Salep Minyak Atsiri Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dan Uji

- Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*; Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.
- Rasal, V. P., Sinnathambi, A., Ashok, P. & Yeshmaina, S. (2008). Wound Healing dan Antioxidant Activities of *Morinda citrifolia* Leaf Extract in Rats. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*; 7; 49-52.
- Putra, F. M. (2016). Penggunaan Chlorhexidine 0,2% dengan Povidone Iodine 1% Sebagai Dekontaminasi Mulut Terhadap Kolonisasi *Staphylococcus aureus* Pada Pasien Pasca Operasi Anestesi Umum. *Nurse Line Journal*; 1; 177.
- Sentat, T. & Permatasari, R. (2017). Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap Penyembuhan Luka Bakar pada Punggung Mencit Putih Jantan (*Mus musculus*). *Jurnal Ilmiah Manuntung*; 1; 100-106.
- Setyoadi & Sartika, D. D. (2010). Efek Lumatan Daun Dewa (*Gynura segetum*) dalam Memperpendek Waktu Penyembuhan Luka Bersih pada Tikus Putih. *Jurnal Keperawatan Soedirman*; 5; 127-135.
- Sibi, G., Chatly, P., Adhikari, S. & Ravikumar, K. R. (2012). Phytoconstituent and Their Influence Antimicrobial Properties of *Morinda citrifolia* L. *Research Journal of Medicinal Plant*; 6; 441-448.
- Sjamsuhidajat, R. & Jong, W. D. (2010). Buku Ajar Ilmu Bedah (Edisi 3). Jakarta: EGC.
- Soni, H. & Singhai, A. K. (2012). A Recent Update of Botanicals for Wound Healing Activity. *International Research Journal of Pharmacy*; 3; 1-7.
- Suprpto, A. K. (2012). Efek Salep Ekstrak Metanoldan Salep Serbuk Daun Sosor Bebek (*Kalanchoe pinnata* (Lamk)) terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Mencit. *Tesis*; Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Maranatha, Bandung.
- Thakur, R., Jain, N., Pathak, R. & Sandhu, S. S. (2011). Practices in Wound Healing Studies of Plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*; 2011; 1-17.
- Ueno, C., Hunt, T. K. & Hopf, H. W. (2006). Using Physiology to Improve Surgical Wound Outcomes. *Plastic and Reconstructive Surgery*; 117; 59S-71S.

Efektivitas Pemberian *Biocurpain* untuk Memperbaiki Status Fungsional pada Pasien Osteoarthritis

Rizaldy Taslim Pinzon^{1*}, Eric²

¹Departemen Neurologi, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta, Indonesia

*Corresponding author: drpinzon17@gmail.com

Submitted: 23 Maret 2020

Accepted: 11 Mei 2020

Published: 25 Juni 2020

Abstract

Background: Osteoarthritis (OA) is a progressive arthritis that decreases quality of life. This disease can not be cured and is limited and can only reduce pain experienced by patients. The drug that is often used is non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), these medicines can not be separated from side effects if used in the long term. An effective and safe drug is needed to improve functional status in osteoarthritis patients. **Objective:** To compare the effectiveness of *biocurpain* which has a marketing authorization number TR172599281 with NSAIDs to improve functional status in the treatment of OA patients. **Methods:** A Randomized Control Trial (RCT) involving OA patients. The treatment used were *Biocurpain* (*Curcuma longa* 350 mg and *Boswellia serrata* 150 mg) and NSAIDs (*Ibuprofen* 400 mg). Subjects were randomized into 2 groups (Group 1 received *Biocurpain* and group 2 received NSAIDs). Functional status measurement using Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC). **Results:** There were 67 subjects that participated in this study, 5 subjects were lost to follow-up and 3 subjects could not continue the study due to side effects. 59 subjects completed the trial (group 1: 29 subjects and group 2: 30 subjects). There were no significant differences between groups in improving functional status ($p: 0.771$), the use of rescue medication ($p: 0.370$), the incidence of adverse events at visit II ($p: 0.215$) and visit III ($p: 0.537$) on OA subjects. Group 2 showed more subjects experiencing side effects. **Conclusion:** *Biocurpain* as effective as NSAIDs to improve functional status in OA patients.

Keywords: osteoarthritis, *Curcuma longa*, *Boswellia serrata*, NSAIDs, WOMAC

Abstrak

Pendahuluan: Osteoarthritis (OA) merupakan penyakit radang sendi progresif yang menurunkan kualitas hidup. Penyakit ini tidak dapat disembuhkan dan terbatas hanya mengurangi nyeri yang dialami oleh pasien. Obat yang sering digunakan adalah non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), namun penggunaan obat tersebut tidak terlepas dari efek samping jika digunakan dalam jangka panjang. Maka diperlukan obat yang efektif dan aman untuk memperbaiki status fungsional pada pasien osteoarthritis. **Tujuan:** membandingkan efektivitas dari pemberian *Biocurpain* yang memiliki Nomor Izin Edar (NIE) TR172599281 dengan NSAIDs untuk memperbaiki status fungsional pada terapi pasien OA. **Metode:** Penelitian ini menggunakan metode *Randomized Control Trial* (RCT) yang melibatkan pasien OA. Perlakuan yang diberikan berupa *Biocurpain* (*Curcuma longa* 300 mg dan *Boswellia serrata* 150 mg) dan NSAIDs (*ibuprofen* 400 mg). Subjek diacak menjadi 2 kelompok (kelompok 1 memperoleh *Biocurpain* dan kelompok 2 memperoleh NSAIDs). Pengukuran status fungsional menggunakan *Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index* (WOMAC). **Hasil:** Terdapat 67 subjek yang mengikuti penelitian ini, 5 subjek *lost to follow up* dan 3 subjek tidak dapat melanjutkan penelitian karena efek samping yang dirasakan. Sebanyak 59 subjek mengikuti penelitian hingga selesai (kelompok 1 berisi 29 subjek dan kelompok 2 berisi 30 subjek). Tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok dalam memperbaiki status fungsional ($p: 0,771$), penggunaan *rescue medication* ($p: 0,370$), kejadian efek samping pada visit II ($0,215$) dan visit III ($0,537$) pada subjek OA. Kelompok 2 menunjukkan lebih banyak subjek yang

mengalami efek samping. **Kesimpulan:** *Biocurpain* memiliki efektivitas yang setara dengan NSAIDs dalam memperbaiki status fungsional pada pasien OA.

Kata kunci: osteoarthritis, *Curcuma longa*, *Boswellia serrata*, NSAIDs, WOMAC

PENDAHULUAN

Osteoarthritis (OA) adalah penyakit sendi degeneratif yang berhubungan dengan peradangan (Rahimnia dkk., 2014). OA dianggap penyakit radang sendi yang paling umum, merupakan radang sendi progresif yang lambat, membatasi pergerakan sendi dan mengurangi kualitas hidup secara signifikan (Ashfold & Williard, 2014). Prevalensi OA pada negara Asia berkisar 36,1 hingga 46,8% (Kuptniratsaikul dkk., 2014). Prevalensi masalah sendi di Indonesia sebesar 7,3% dan di Yogyakarta sebesar 5,9% (Kemenkes RI, 2018).

OA merupakan penyakit yang tidak dapat disembuhkan pengobatan konvensional terbatas pada penggunaan *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), suntikan kortikosteroid, dan analgesik. Terapi dengan NSAIDs dan analgesik seperti *acetaminophen* dapat menyebabkan efek samping, terutama jika digunakan dalam jangka panjang (Akuri dkk., 2017). Reaksi efek samping yang muncul seperti *gastrointestinal* (GI), dispepsia, ulserasi, pendarahan saluran cerna atas, perforasi lambung atau duodenum (Kuptniratsaikul dkk., 2014). Setelah mempertimbangkan potensi efek samping NSAIDs dan durasi perawatan yang panjang, akan lebih baik jika menggunakan obat yang lebih aman dan memiliki profil kesehatan yang baik (Pinzon & Sanyasi, 2018).

Obat-obatan tradisional yang menggunakan senyawa tanaman menawarkan alternatif yang lebih aman untuk mengelola berbagai penyakit kronis. Salah satu formulasi yang telah dievaluasi adalah kombinasi *Curcuma longa* dan *Boswellia serrata*. Serangkaian penelitian telah menunjukkan bahwa ekstrak *Curcuma longa* yang mengandung *curcumin* merupakan agen anti inflamasi dan antioksidan dengan keamanan yang dapat diterima dengan baik. Ekstrak *Boswellia serrata* juga terbukti aman dan efektif dalam meredakan nyeri pada pasien OA (Karlupudi dkk., 2018). *Curcumin* memiliki kemampuan untuk menekan peradangan akut dan kronis. Penelitian *in vitro* tentang *curcumin* menunjukkan aksi anti inflamasi pada sel-sel pembuluh darah manusia. Aktivitas anti inflamasi dari *curcumin* merupakan hasil gabungan dari beberapa mekanisme. *Curcumin* memodulasi respon inflamasi dengan menurunkan aktivitas COX-2, menghambat produksi

sitokin inflamasi dan menekan aktivasi NF- κ B (Ross, 2016). Aktivitas *Boswellia serrata* muncul dari asam *boswellic* (AKBA), AKBA adalah penghambat jalur lipoksigenase dari metabolisme arakidonat dan memiliki sifat anti inflamasi dan anti kanker yang signifikan (Kizhakkedath, 2013).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah *Biocurpain* 500 mg dengan Nomor Izin Edar (NIE) TR172599281 yang memiliki kandungan *Curcuma longa* 350 mg dan *Boswellia serrata* 150 mg memiliki efektivitas yang setara dengan NSAIDs dalam memperbaiki status fungsional di Rumah Sakit Bethesda Yogyakarta dan Rumah Sakit Panti Rapih Yogyakarta menggunakan lembar *Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index* (WOMAC) untuk mengukur nyeri, kekakuan, dan gangguan fungsional

BAHAN DAN METODE

Bahan

Obat yang digunakan adalah *Biocurpain Force* 500 mg dengan kandungan *Curcuma longa* 350 mg dan *Boswellia serrata* 150 mg, NSAIDs (ibuprofen 400 mg) dan parasetamol (500 mg) sebagai *rescue medication*.

Alat

Menggunakan *Case Report Form* (CRF) yang berisi data diri pasien, kriteria inklusi dan eksklusi, lembar WOMAC, *rescue medication*, dan efek samping

Rancangan penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *Randomized Control Trial*. Subjek dibagi menjadi 2 kelompok secara acak. Terapi yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Biocurpain* (350 mg *Curcuma longa* dan 150 mg *Boswellia serrata*) dan NSAIDs (400 mg ibuprofen atau 50 mg natrium diklofenak). Setiap obat diminum 2 kali sehari selama 4 minggu. Sebanyak 20 tablet parasetamol 500 mg diberikan kepada setiap subjek sebagai *rescue medication*, pasien mengonsumsi parasetamol 3 kali sehari jika merasakan nyeri setelah obat perlakuan tidak mengurangi nyeri yang dirasakan. Randomisasi dilakukan dengan bantuan kalkulator OpenEpi.

Subjek penelitian

Ukuran sampel minimal yang diperlukan dalam penelitian ini dihitung dengan bantuan kalkulator ukuran sampel dari halaman web <https://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm> menggunakan data rata-rata dan standar deviasi skor WOMAC merujuk dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya. Pada penelitian (Srivastava dkk., 2016), didapatkan rata-rata skor WOMAC pada kelompok kombinasi *Curcuma longa* dan *Boswellia serrata* sebesar 4,51 dan pada NSAIDs sebesar 12,05. Nilai standar deviasi berturut-turut sebesar 0,26 (kombinasi *Curcuma longa* dan *Boswellia serrata*) dan 0,21 NSAIDs. Data tersebut kemudian dimasukkan sebagai input data pada kalkulator penghitung ukuran sampel. Dari hasil perhitungan kalkulator, persyaratan sampel minimum yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sebesar 44 subjek untuk taraf kepercayaan 95%.

Teknik pengumpulan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah *nonprobability sampling* dengan

consecutive sampling, yaitu dengan cara mengambil semua subjek yang tersedia yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang sudah ditetapkan (Sharma, 2014). Subjek penelitian ini adalah pasien OA di Rumah Sakit Bethesda Yogyakarta dan Rumah Sakit Panti Rapih Yogyakarta dengan memperhatikan beberapa kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi meliputi pasien pria atau wanita, usia > 18 tahun (dewasa), memiliki tingkat *Kellgren-Lawrence* (KL) 2-3 (berdasarkan radiologi lutut). Kriteria eksklusi meliputi pasien yang menolak untuk mengikuti penelitian, pasien yang hipersensitif dengan *Curcuma longa*, *Boswellia serrata* dan NSAIDs, mengikuti percobaan klinik lain, tidak dapat memberikan persetujuan dan mengisi kuesioner, sedang hamil atau rencana untuk hamil selama penelitian berlangsung, dan mendapat terapi nyeri lain dalam 24 jam.

Tabel 1. Tabel *western ontario and mcmaster universities osteoarthritis index* (WOMAC)
Skala: 0 = tidak ada, 1 = sedikit, 2 = sedang, 3 = berat, 4 = sangat berat

Nyeri	1.	Berjalan	0	1	2	3	4
	2.	Menaiki tangga	0	1	2	3	4
	3.	Tidur di malam hari	0	1	2	3	4
	4.	Istirahat	0	1	2	3	4
	5.	Saat menumpu dan menapak	0	1	2	3	4
Kekakuan	1.	Kekakuan pagi hari	0	1	2	3	4
	2.	Kekakuan malam hari	0	1	2	3	4
Fungsi fisik	1.	Kesulitan naik tangga	0	1	2	3	4
	2.	Kesulitan turun tangga	0	1	2	3	4
	3.	Kesulitan dari posisi duduk ke berdiri	0	1	2	3	4
	4.	Kesulitan berdiri	0	1	2	3	4
	5.	Kesulitan duduk di lantai	0	1	2	3	4
	6.	Kesulitan berjalan di permukaan datar	0	1	2	3	4
	7.	Kesulitan naik/turun tangga	0	1	2	3	4
	8.	Kesulitan berbelanja	0	1	2	3	4
	9.	Kesulitan memakai kaos kaki	0	1	2	3	4
	10.	Kesulitan melepas kaos kaki	0	1	2	3	4
	11.	Kesulitan bangun dari tempat tidur	0	1	2	3	4
	12.	Kesulitan berbaring ditempat tidur	0	1	2	3	4
	13.	Kesulitan duduk	0	1	2	3	4
	14.	Kesulitan aktivitas mandi	0	1	2	3	4
	15.	Kesulitan melakukan BAK/BAB	0	1	2	3	4
	16.	Kesulitan melakukan tugas berat	0	1	2	3	4
	17.	Kesulitan melakukan tugas ringan	0	1	2	3	4

Variabel

Profil demografis meliputi jenis kelamin, usia, pekerjaan, status nikah, latar belakang pendidikan, komorbiditas dan derajat *osteoarthritis*. Derajat *osteoarthritis* diukur menggunakan skala *Kellgren-Lawrence* (KL). WOMAC merupakan instrumen yang mudah diberikan guna untuk mengevaluasi hasil

intervensi OA baik konservatif maupun pembedahan, WOMAC terdiri dari 24 item, 5 item untuk mengukur nyeri, 2 item untuk mengukur kekakuan, dan 17 item untuk mengukur fungsi fisik (Tabel 1). Subjek akan diminta untuk menjawab pertanyaan seputar rasa sakit, kekakuan atau gangguan fungsional yang dialami dalam 4 jam sebelumnya (Ackerman, 2009). Setiap

pertanyaan memiliki 5 subskala (0 = tidak ada, 1 = sedikit, 2 = sedang, 3 = berat, 4 = sangat berat) (Ebrahimzadeh dkk., 2014). Rentan skor untuk nyeri, kekakuan dan fungsi fisik berturut-turut adalah 0 - 20, 0 - 8, dan 0 - 68 dengan total keseluruhan skor sebesar 96, semakin tinggi skor WOMAC menunjukkan semakin parah gejala OA yang dirasakan. Penelitian ini telah disetujui oleh komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia. Nomor kelaikan etik penelitian adalah 867/C.16/FK/2018. Gambar 1 menunjukkan alur penelitian dan jumlah subjek yang mengikuti penelitian hingga selesai.

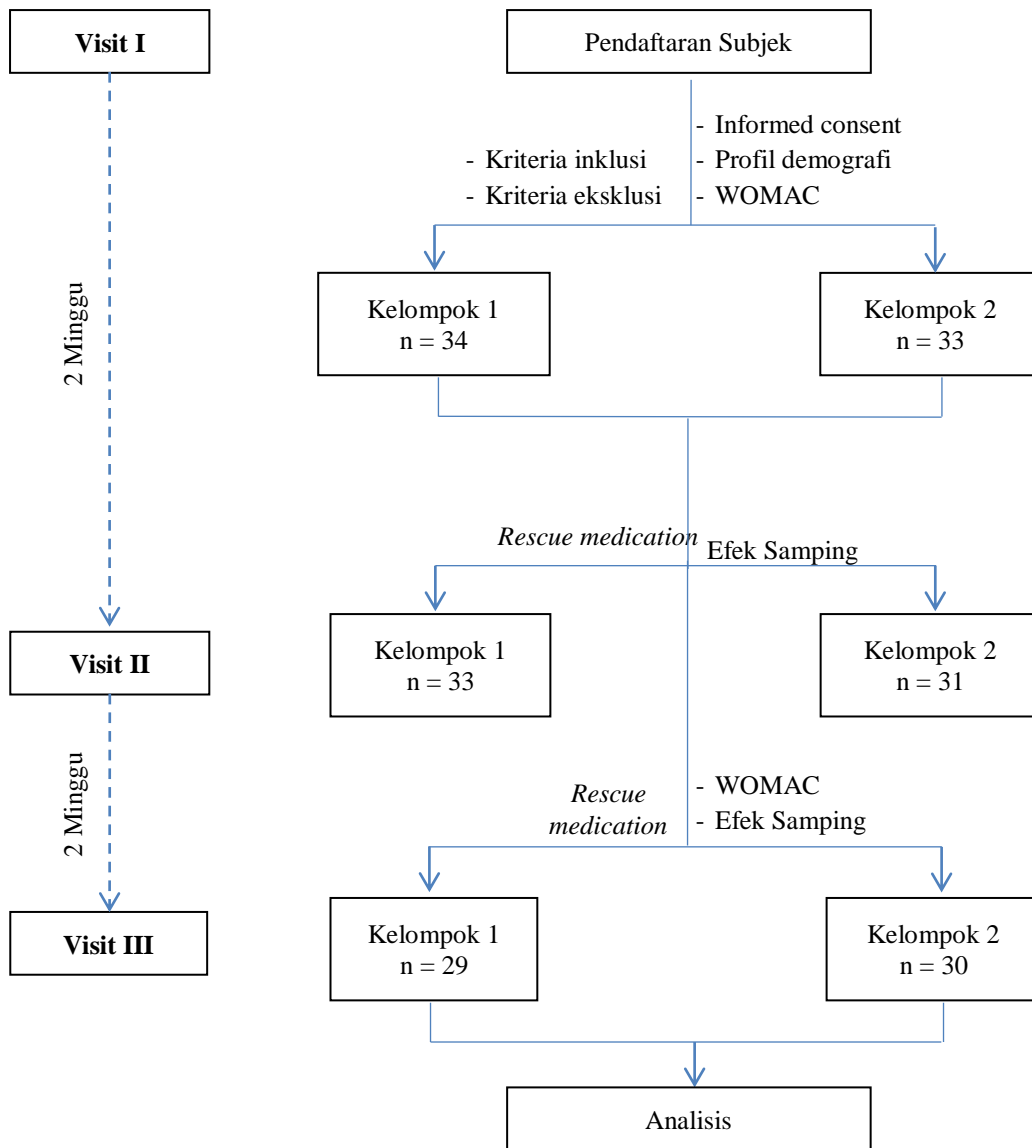
Analisis data

Analisis data menggunakan prinsip *intention to treat*, semua pasien yang telah diacak akan dianalisis,

baik selama perlakuan mengalami gangguan, dihentikan sebelum waktu penelitian selesai atau tidak terjadi sama sekali (Kabisch dkk., 2011). Setelah melewati test normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk*, analisis variabel menggunakan *t test* atau *wilcoxon*. Tingkat signifikansi ditetapkan pada $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Terdapat 67 subjek pada awal penelitian yang didominasi oleh perempuan (76,1%) dengan rerata usia 64 tahun dan tingkat KL II (56,7%). Gambar 1 menunjukkan alur penelitian terkait terkait dengan subjek. Terdapat 3 pasien yang dieksklusi dari penelitian karena efek samping (1 dari kelompok I dan 2 dari kelompok II) yang dirasakan dan 5 pasien *lost to follow up* (4 dari kelompok I dan 1 dari kelompok II).



Gambar 1. Alur penelitian

Pada Tabel 2 menunjukkan Karakteristik dasar subjek, terdapat 67 subjek pada awal penelitian yang didominasi oleh perempuan (76,1%) dengan rata-rata usia 64 tahun, menikah (76,1%), tingkat *Kellgren-Lawrence* (KL) II (56,7%), dan hipertensi (52,2%). Hasil diatas menunjukkan usia, jenis kelamin status nikah, pekerjaan, tingkat KL dan komorbiditas lain tidak memiliki hubungan dengan OA. Usia merupakan faktor utama seseorang terkena OA. Ada berbagai faktor yang menunjukkan hubungan antara usia dengan terjadinya OA seperti kerusakan oksidatif, penipisan tulang rawan, melemahnya otot, dan penurunan rangsangan (Palazzo dkk., 2016). Bertambahnya usia menyebabkan ketegangan dari tulang rawan menurun sehingga mengakibatkan akumulasi dari *glycation* yang

menyebabkan kerusakan dari tulang rawan dan kemampuan tubuh untuk memperbaiki kartilago berkurang, seiring bertambahnya usia (Ahmad dkk., 2018). Bertambahnya usia juga menyebabkan prevalensi wanita lebih besar kemungkinan untuk terkena OA dikarenakan faktor hormonal (berkurangnya volume tulang rawan, kehilangan tulang atau berkurangnya massa otot) dan semakin faktor hormonal ini meningkat setelah menopause (Palazzo dkk., 2016). Penurunan kadar estrogen yang signifikan setelah menopause mengakibatkan peningkatan insiden OA pada wanita diatas 50 tahun, pada kondrosit terdapat reseptor estrogen yang menunjukkan bahwa sel-sel ini juga dipengaruhi oleh estrogen (Ahmad dkk., 2018).

Tabel 2. Karakteristik dasar

Karakteristik	<i>Curcuma longa</i> dan <i>Boswellia serrata</i> n (%)	NSAIDs n (%)	Total n (%)	P
Usia	64 ± 9,3	64 ± 9,5	64 ± 9,3	0,988 ^a
Jenis Kelamin	Laki-laki	7 (21,2)	16 (23,9)	0,614 ^b
	Perempuan	25 (73,5)	51 (76,1)	
Status	Menikah	29 (85,3)	51 (76,1)	0,080 ^b
	Cerai	3 (8,8)	13 (19,4)	
	Belum menikah	2 (5,9)	3 (4,5)	
Pekerjaan	Pegawai negeri sipil	2 (5,9)	2 (3)	0,254 ^b
	Pengusaha	4 (11,8)	7 (10,4)	
	Pegawai swasta	3 (8,8)	4 (6)	
	Pensiun	7 (20,6)	22 (32)	
	Pengangguran	1 (2,9)	2 (3)	
	Lainnya	17 (50)	30 (44,8)	
Tingkat KL	Tingkat II	18 (52,9)	38 (56,7)	0,527 ^b
	Tingkat III	16 (47,1)	29 (43,3)	
Komorbiditas Lain	Hipertensi	17 (50)	35 (52,2)	0,710 ^b
	Diabetes melitus	3 (8,8)	9 (13,4)	0,261 ^b
	Kardiovaskular	5 (14,7)	11 (16,4)	0,701 ^b
	Gastrointestinal	10 (29,4)	15 (22,4)	0,162 ^b
	Lainnya	7 (20,6)	6 (8,8)	13 (19,4)

^a T Test tidak berpasangan

^b Tes *chi-square*

p menggunakan taraf kepercayaan 95%

(%) persentase jumlah pada masing-masing karakteristik

Tabel 3 menunjukkan efektivitas dari masing-masing kelompok yang dilihat dari rata-rata skor WOMAC pada visit I dan visit III. Hasil dari penelitian ini menunjukkan penurunan skor WOMAC yang signifikan pada kelompok I dan kelompok II setelah pemberian 4 minggu, namun tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok. Hasil dari penelitian ini serupa dengan penelitian (Kizhakkedath, 2013) dimana baik kelompok kombinasi *Curcuma longa* dan *Boswellia serrata* serta kelompok NSAIDs efektif dalam memperbaiki status fungsional. Hal ini

dikarenakan kandungan Curcumin pada *C. longa* dapat menghambat efek substansi yang berhubungan dengan jalur inflamasi seperti *cyclooxygenase* (COX) (Kuptniratsaikul dkk., 2014). Curcumin memodulasi respon inflamasi dengan menurunkan aktivitas *cyclooxygenase* (COX-2), menghambat produksi sitokin inflamasi seperti interferon, interleukin dan faktor nekrosis tumor (Ross, 2016). Sedangkan aktivitas dari *Boswellia serrata* muncul dari adanya kandungan asam *boswellic*, dimana asam *3-O-acetyl-11-keto-boswellic* (AKBA) adalah yang paling aktif.

AKBA menghambat jalur lipoksigenase dari metabolisme arakidonat dan memiliki efek antiinflamasi dan antikanker yang signifikan. Sehingga,

Boswellia serrata menghambat penurunan kadar glikosaminoglikan yang berfungsi untuk memperbaiki tulang rawan (Kizhakkedath, 2013).

Tabel 3. Perbandingan skor WOMAC sebelum dan sesudah pemberian terapi pada kedua kelompok

Kelompok	WOMAC visit I	WOMAC visit II	p ^a
<i>Biocurpain</i>	35,3 ± 17,5	23,5 ± 21,5	0,001*
NSAIDs	35,7 ± 20,4	25,3 ± 22,5	0,005*

* signifikan

^a t test berpasangan

Tabel 4 menunjukkan delta (Δ) WOMAC yang diperoleh dari pengurangan skor WOMAC pada Visit I dan visit III. Rata-rata Δ WOMAC tertinggi dapat dilihat pada kelompok *Biocurpain*. Hasil tersebut menunjukkan tidak terdapat perbedaan secara statistik skor Δ WOMAC antar kelompok. Hasil dari penelitian ini juga sesuai dengan penelitian (Kizhakkedath, 2013) dimana tidak terjadi perbedaan penurunan skor

WOMAC yang signifikan antar kelompok. Penelitian (Kuptniratsaikul dkk., 2014) juga menunjukkan bahwa *Curcuma longa* memiliki efektivitas yang sama dengan ibuprofen dalam terapi pasien OA. Penelitian yang dilakukan oleh (Ross, 2016) juga menunjukkan bahwa ekstrak *curcumin* memiliki efektivitas yang sama dengan ibuprofen untuk mengobati nyeri pada pasien OA.

Tabel 4. Perbandingan selisih (Δ) WOMAC pada visit iii dan visit i pada kedua kelompok

Kelompok	Rerata Δ WOMAC	p ^a
<i>Biocurpain</i>	11,7 ± 18,1	0,771
NSAIDs	10,4 ± 19,9	

^a t test tidak berpasangan

Tabel 5 menunjukkan rata-rata sisa *rescue medication* yang telah digunakan oleh pasien, penggunaan *rescue medication* tertinggi terjadi pada kelompok NSAIDs, tidak terdapat perbedaan secara statistik penggunaan *rescue medication* antar kelompok. *Rescue medication* sering digunakan untuk mengelola nyeri yang dialami oleh pasien yang tidak terkontrol setelah menggunakan obat peralihan. Mengukur penggunaan *rescue medication* memberikan informasi penting untuk mengetahui kekokohan efek analgesik, obat analgesik yang efektif harus mengurangi

kebutuhan penggunaan *rescue medication* (Kivitz dkk., 2019). Pada penelitian ini, kelompok I menunjukkan konsumsi *rescue medication* yang lebih sedikit jika dibandingkan dengan NSAIDs. Hasil dari penelitian ini sesuai dengan (Kizhakkedath, 2013) yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara statistik pemberian *rescue medication* pada kedua kelompok, dan penelitian (Onakpoya dkk., 2017) juga menunjukkan bahwa pemberian kombinasi *Curcuma longa* dan *Boswellia serrata* dapat menurunkan penggunaan *rescue medication*.

Tabel 5. Perbandingan Penggunaan Parasetamol Sebagai *Rescue Medication*

Kelompok	Rerata sisa <i>rescue medication</i>	p ^a
<i>Biocurpain</i> (n: 29)	7 ± 6,8	0,370
NSAIDs (30)	5 ± 5,8	

^a tes *Man-whitney*

Tabel 6 menunjukkan kejadian efek samping yang dirasakan oleh masing-masing kelompok. Nyeri perut merupakan gejala efek yang paling sering dirasakan oleh kelompok NSAIDs (n = 7). Tiga subjek tidak dapat mengikuti penelitian dikarenakan efek samping yang dirasakan (satu dari kelompok *Biocurpain* dan satu dari kelompok NSAIDs), tidak terdapat efek samping yang serius pada penelitian ini. Terdapat satu efek samping yang berhubungan dengan *Biocurpain* yaitu pusing dan lima efek samping yang berhubungan

dengan NSAIDs yaitu nyeri pada bagian perut. Tabel 6 menunjukkan tidak terdapat perbedaan secara statistik efek samping yang timbul pada antar kelompok pada visit II (p: 0,215) dan visit III (p: 0,537). Nyeri perut lebih sering dialami oleh kelompok NSAIDs dikarenakan NSAIDs menghambat sintesa prostaglandin melalui inhibisi *cyclooxygenase* (enzim COX-1 dan COX-2). COX-1 adalah enzim yang terlibat dalam produksi prostaglandin gastroprotektif dan berada secara terus-menerus di mukosa gastrik.

Sedangkan COX-2 tidak selalu ada dalam jaringan, namun akan muncul apabila dirangsang oleh mediator inflamasi. Penghambatan COX-1 akan menyebabkan peningkatan risiko perdarahan karena ada hambatan agregasi platelet. Penghambatan COX-2 akan berefek antiinflamasi dan analgesik (DiPiro dkk., 2011). Kelompok NSAIDs juga menyebabkan lebih banyak pasien yang dikeluarkan dari penelitian karena efek samping yang timbul. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, dimana jumlah efek samping seperti nyeri pada bagian perut atau ketidaknyamanan secara signifikan lebih tinggi pada kelompok NSAIDs

jika dibandingkan dengan kelompok *Curcuma longa* (Kuptniratsaikul dkk., 2014). Pada penelitian (Shep dkk., 2019) juga menunjukkan bahwa subjek yang menerima *curcumin* lebih sedikit mengalami efek samping terkait GI jika dibandingkan dengan subjek yang menerima NSAIDs. Hal tersebut dapat disebabkan karena efek protektif *curcumin* terhadap mukosa lambung. *Curcumin* menghambat sekresi interleukin 6 (yang mengaktifkan neutrofil, limfosit dan monosit yang berperan pada kerusakan jaringan pada lambung).

Tabel 6. Perbandingan Kejadian Efek Samping pada Kedua Kelompok

Kelompok	Visit II	p ^a	Visit III	p ^a
<i>Biocurpain</i> (n: 4)	2 (pusing dan urtikaria)	0,215	2 (mual, dan kehilangan nafsu makan, pusing)	0,537
NSAIDs (n: 7)	5 (nyeri pada bagian perut)		2 (nyeri pada bagian perut)	

^a tes *chi-square*

Kelebihan dari penelitian ini adalah dilakukan randomisasi, perancu terbagi sama antar kedua kelompok uji. Penelitian ini masih memiliki keterbatasan dimana penelitian ini adalah penelitian *open label* sehingga tidak dilakukan pembutaan (*blinding*) saat dilakukan randomisasi, jika tidak dilakukan *blinding* akan memungkinkan terjadinya bias informasi.

KESIMPULAN

Pemberian *Biocurpain* memiliki efektivitas yang setara dengan NSAIDs dalam memperbaiki status fungsional pada pasien *osteoarthritis*.

DAFTAR PUSTAKA

Ackerman, I. (2009). Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC). *Australian Journal of Physiotherapy*; 55; 213.

Ahmad, I. W., Rahmawati, L. D. & Wardhana, T. H. (2018). Demographic Profile, Clinical and Analysis of Osteoarthritis Patients in Surabaya. *Biomolecular and Health Science Journal*; 1; 34–39.

Akuri, M. C., Barbalho, S. M., Val, R. M. & Guiguer, E. L. (2017). Reflections About Osteoarthritis and *Curcuma longa*. *Pharmacognosy Reviews*; 11; 8–12.

Ashfold, S. & Williard, J. (2014). Osteoarthritis : A Review. *Walter Kluwer Health*; 39; 1–8.

Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G. & Posey, M. (2011) *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach* (8th edition). New York: Mc Graw

Hill.

Ebrahimzadeh, M. H., Makhmalbaf, H., Birjandinejad, A., Keshtan, F. G., Hoseini, H. A. & Mazloumi, S. M. (2014). The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) in Persian Speaking Patients with Knee Osteoarthritis. *The Archives of Bone and Joint Surgery*; 2; 57–62.

Kabisch, M., Ruckes, C., Seibert-grafe, M. & Blettner, M. (2011). *Randomized Controlled Trials*; 108; 663–668.

Karlapudi, V., Prasad, M. A. V., Sengupta, K., Davis, B. A. & Raychaudhuri, S. P. (2018). A Placebo-Controlled Double-Blind Study Demonstrates the Clinical Efficacy of a Novel Herbal Formulation fo Relieving Joint Discomfort in Human Subjects with Osteoarthritis of Knee. *Journal Of Medicine Food*; 21; 1–10.

Kemenkes RI. (2018). Hasil Utama RISKESDAS 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.

Kivitz, A. J., Conaghan, P. G., Cinar, A., Lufkin, J. & Kelley, S. D. (2019). Rescue Analgesic Medication Use by Patients Treated with Triamcinolone Acetonide Extended-Release for Knee Osteoarthritis Pain: Pooled Analysis of Three Phase 2/3 Randomized Clinical Trials. *Pain and Therapy*; 8; 271–280.

Kizhakkedath, R. (2013). Clinical evaluation of a Formulation Containing *Curcuma longa* and *Boswellia serrata* Extracts in the Management of Knee Osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*; 8; 1542–1548.

- Ackerman, I. (2009). Western ontario and mcmaster universities osteoarthritis index (WOMAC). *Australian Journal of Physiotherapy*, 213.
- Ahmad, I. W., Rahmawati, L. D., & Wardhana, T. H. (2018). Demographic Profile , Clinical and Analysis of Osteoarthritis Patients in Surabaya. *Biomolecular and Health Science Journal*.
- Akuri, M. C., Barbalho, S. M., Val, R. M., & Guiguer, E. L. (2017). Reflections about Osteoarthritis and *Curcuma longa*. *Pharmacognosy Reviews*, 8-12.
- Ashfold, S., & Williard, J. (2014). Osteoarthritis: A Reviews. *Walter Kluwer Health*, 3-9.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., & Posey, M. (2011). *Pharmacotherapy: A Patophysiologic Approach* 8 Edition . New York: Mc Graw Hill.
- Ebrahimzadeh, M. H., Makhmalbaf, H., Birjandinejad, A., Keshtan, F. G., Hoseini, H. A., & Mazloumi, S. M. (2014). The Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) in Persian Speaking Patients with Knee Osteoarthritis. *The archives of bone and joint surgery*, 57-62.
- Kabisch, M., Ruckes, C., Seibert-grafe, M., & Blettner, M. (2011). *Randomized Controlled Trials*. *Deutsches Aerzteblatt*.
- Karlapudi, V., Prasad Mungara, A. V., Sengupta, K., Davis, B. A., & Raychaudhuri, S. P. (2018). A Placebo-Controlled Double-Blind Study Demonstrates the Clinical Efficacy of a Novel Herbal Formulation fo Relieving Joint Discomfort in Human Subjects with Osteoarthritis of Knee. *Journal of Medicinal Food*, 511-520.
- Kelley, S. D., Cinar, A., & Lufkin, J. (2019). Rescue Analgesic Medication Use by Patients Treated with Triamcinolone Acetonide Extended-Release for Knee Osteoarthritis Pain : Pooled Analysis of Three Phase 2 / 3 Randomized Clinical Trials. *Pain and Therapy*.
- Kemeskes RI. (2018). Hasil Utama RISKESDAS 2018. Jakarta: Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kizhakkedath, R. (2013). Clinical Evaluation of a Formulation Containing *Curcuma longa* and *Boswellia serrata* Extracts in the Management of Knee Osteoarthritis. *Molecular Medicine Reports*; 8; 1542-1548.
- Kuptniratsaikul, V., Dajpratham, P., Taecharpornkul, W., Buntragulpoontawee, M., Lukkanapichonchut, P., Chootip, C., Saengsuwan, J., Tantayakon, K. & Laongpech, S. (2014). Efficacy and Safety of *Curcuma domestica* Extracts Compared With Ibuprofen in Patients with Knee Osteoarthritis: A Multicenter Study. *Clinical Interventions in Aging*; 9; 451–458.
- Onakpoya, I. J., Spencer, E. A., Perera, R. & Heneghan, C. J. (2017). Effectiveness of Curcuminoids in the Treatment of Knee Osteoarthritis: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *International Journal of Rheumatic Diseases*; 20; 420–433.
- Palazzo, C., Nguyen, C., Colau, M. M., Rannou, F. & Poiraudeau, S. (2016). Risk Factors and Burden of Osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*; 59; 134–138.
- Pinzon, R. T. & Sanyasi, R. D. L. R. (2018). *Curcuma longa* for Arthritis Pain: Systematic Review of Randomized Controlled Trial Study. *Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 4; 528–534.
- Rahimnia, A. R., Panahi, Y., Alishiri, G., Sharafi, M. & Sahebkar, A. (2014). Impact of Supplementation with Curcuminoids on Systemic Inflammation in Patients with Knee Osteoarthritis: Findings from a Randomized Double-blind Placebo-controlled trial. *Drug Research*; 65; 521–525.
- Ross, S. M. (2016). Turmeric (*Curcuma longa*): Effects of *Curcuma longa* Extracts Compared with Ibuprofen for Reduction of Pain and Functional Improvement in Patients with Knee Osteoarthritis. *Holistic Nursing Practice*; 30; 183–186.
- Sharma, S. (2014) *Nursing Research and Statistic*. India: Reed Elsecier India Privvate Limited.
- Shep, D., Khanwelkar, C., Gade, P. & Karad, S. (2019). Safety and Efficacy of Curcumin Versus Diclofenac in Knee Osteoarthritis: A Randomized Open-label Parallel-arm Study. *Trials*; 20; 1–11.
- Srivastava, S., Saksena, A. K., Khattri, S., Kumar, S. & Dagur, R. S. (2016). *Curcuma longa* Extract Reduces Inflammatory and Axidative Stress Biomarkers in Osteoarthritis of Knee: A Four-month, Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial. *Inflammopharmacology*; 24; 377–388.

JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

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

SECRETARIAT: d/a Fakultas of Pharmacy, Campus C Universitas Airlangga
Jl. Dr. Ir. H. Soekarno, Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115 Email: jfiki@ff.unair.ac.id

Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia (JFIKI) receives manuscript from the results of research, surveys, and literature reviews that are closely related to the health sector, particularly the pharmaceutical field. JFIKI is published every six months. The manuscript published is a selection result that has been approved by the Editorial Board and has never been published in other publications.

The manuscript is submitted via JFIKI's open journal system (OJS) website, which can be accessed via the following page: <https://e-journal.unair.ac.id/JFIKI/>

AUTHOR GUIDELINES

1. Before submitting the manuscript, the author(s) are required to fill out copyright form (or originality form) and cover letter (in 'document template' file) which format can be downloaded on the right side of our website through the following page <https://e-journal.unair.ac.id/JFIKI/> Later when submitting the manuscript, those forms must be included (included in the manuscript file).
2. Manuscript is written in Microsoft Word program. Font type: Times New Romans, 10 regular points, justify, line spacing using multiple 1.2. Chemical structures can be made with Chemdraw. Photos and images are in jpg/jpeg format and graphics can be presented using excel.
3. Image and table files are placed separately from the manuscript.
4. Image including graphic is made separate from the manuscript. The title of the image is written at the bottom of the picture with the Arabic numerical serial number.
5. Table and description: table must be intact on one page. The title of the table is written at the top of the table in Arabic numerical serial number.
6. The manuscript is written in Indonesian or English, arranged in the following order:
 - a. **Title.** Written with 'Title Case' (Capital letter must be used in every initial word except conjunctions), bold, and maximum of 18 words.
 - b. **Author's names.** Written without title, first name is written in lowercase except the first letter, last name is written in all

Author Guidelines (English version)

capital letters, and author's institution must be completely written.

If the authors are from different institutions, use signs such as ^{1,2,3}, and so on behind the names of each writer. The author who is the correspondence address is marked * and must be accompanied by the address of the complete institution and *e-mail*.

c. **Abstract:** Written both in English and Indonesian languages, containing a maximum of 250 words. **Abstract in English** is organized as follows: Background, Objective, Method, Result, and Conclusion. **Abstract in Indonesian** is organized as follows: Pendahuluan, Tujuan, Metode, Hasil, dan Kesimpulan.

d. **Keywords:** 1 – 5 keywords.

e. **INTRODUCTION**

Containing background and research objectives.

f. **MATERIALS AND METHODS**

Containing explanations about: **Material(s)** (state the origin and qualifications); **Tool(s)** (only those that determine the results of the study; state their name, brand, and qualifications); **Method(s)** (procedures for conducting research, in this section also write a certificate of ethics if the research involves experimental animals).

g. **RESULTS AND DISCUSSION**

Containing the explanation of the results of all the stages described in the method section.

h. **CONCLUSION**

Containing a summary of what is obtained from the results of research and what needs to be further studied.

i. **ACKNOWLEDGEMENT**

Containing several sentences to appreciate those who help conducting the research.

j. **BIBLIOGRAPHY** (see instruction)

Using the citation standard application (Mendeley/Endnote) is a must. References of at least 80% comes from SCIENTIFIC PUBLICATIONS in the form of journals from the latest 5 years maximum counted since the manuscript submission to JFIKI.

6. **Citations in the article are** indicated by the author's last name followed by the year. If the citation has more than two authors, write the last name of the main author followed by et al. (if in English) and dkk. (if in Indonesian). Then, write the year. For example:

Cell suspension culture of *Solanum mammosum* has the ability to biotransform salicylamide to glycosides (Syahrani dkk., 1997)

7. **Bibliography** is arranged alphabetically by the main name of the main author.

a. **Magazines/journals (standard journal article):** full last name, followed by other name abbreviations taken from the first letters of the name, year of publication, article title, magazine/journal name (do not abbreviate but write it completely),

Author Guidelines (English version)

volume (italicized), and page number.

For example:

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. **Book:** all the names of the authors are mentioned (full last name, followed by first name abbreviation), year of publication, article title, editor's name, book title, volume (italicized), edition, publisher, city, and page number. For example:

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. **Electronic material.** For example:

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

- d. **Undergraduate thesis, graduate thesis, dissertation, or poster as well as others.**

For example:

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

8. **Abbreviations.** Using abbreviations is not recommended except for standard units of measurement (e.g. g, mg, mL, kg, or cm). Abbreviations used must be defined in parentheses when they are first mentioned in abstract section and again in the script. Abbreviations must be written back on the description of the figure or table, if any. A list of abbreviations used and definitions must be included as part of the text.

9. **Manuscripts received will be corrected,** given notes, and sent back to the author for correction. The author needs to send back the manuscript that has been corrected in printed form and file form.

10. The author will receive a copy of the published manuscript.

JURNAL FARMASI DAN ILMU KEFARMASIAN INDONESIA

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

SEKRETARIAT: d/a Fakultas Farmasi Kampus C Universitas Airlangga

Jl. Dr. Ir. H. Soekarno, Mulyorejo, Surabaya, Jawa Timur 60115 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 melalui website *open journal system* (OJS) milik JFIKI, yang dapat diakses melalui laman berikut <https://e-journal.unair.ac.id/JFIKI/>

PETUNJUK BAGI PENULIS

1. Sebelum naskah melakukan submit, penulis diwajibkan untuk mengisi **copyright form, cover letter** (ada dalam file *document template*) yang formatnya dapat di download pada sebelah kanan halaman website kami melalui laman berikut <https://e-journal.unair.ac.id/JFIKI/> nantinya saat mensubmit naskah form-form tersebut harus disertakan (diletakkan didalam file manuskrip/naskah).
2. 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.
3. File gambar dan tabel ditempatkan terpisah dari file naskah.
4. Gambar termasuk grafik dibuat terpisah dari naskah, maksimum 1 halaman dan minimum ¼ halaman. Judul gambar ditulis di bagian bawah gambar dengan nomor urut angka arab.
5. Tabel dan keterangan: tabel harus utuh dalam satu halaman. Judul tabel ditulis di bagian atas tabel dengan nomor urut angka arab.
6. Naskah dapat 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 18 kata.
 - b. **Nama penulis/para penulis** (tanpa gelar; nama depan ditulis dengan huruf kecil kecuali huruf pertama, sedangkan nama

Petunjuk bagi Penulis (Versi berbahasa Indonesia)

- 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 dua bahasa yaitu bahasa Inggris dan bahasa Indonesia (baik pada naskah berbahasa Inggris maupun Indonesia), 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, pada bagian ini tuliskan juga sertifikat uji etik jika penelitian melibatkan hewan coba).
- 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)
Wajib menggunakan aplikasi standar sitasi (Mendeley/Endnote). Pustaka minimal 80% berasal dari PUBLIKASI ILMIAH berupa Jurnal dengan tahun maksimal 5 tahun terakhir terhitung sejak submit manuskrip di JFIKI.
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:

Petunjuk bagi Penulis (Versi berbahasa Indonesia)

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.int/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 Andrografolida 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.