

jfi Jurnal Farmasi Indonesia



Davallia denticulata



Vol. 13 No. 2. Juli 2021

e-ISSN: 2355-696x
p-ISSN: 1412-1107

Editorial Team**Editor-in-Chief**

Prof. Dr. apt. Abdul Mun'im, M.Si.
Universitas Indonesia

Managing Editors

Dr. apt. Fauzan Zein
Universitas Bhakti Kencana

Dr. apt. Rudi Hendra
Universitas Riau

Editorial Members

Prof.Dr. apt. Arry Yanuar, M.Si.
Universitas Indonesia

Prof. Dr. apt. Shirly Kumala, M.Biomed.
Universitas Pancasila

Dr. apt. Christina Avanti, M.Si.
Universitas Surabaya

apt. Hilwan Yuda Teruna, Ph.D.
Universitas Riau

Editor-in-Chief:

Prof. Dr. apt. Abdul Mun'im, M.Si. (Universitas Indonesia; Orcid ID: [0000-0002-6681-9196](#))

Managing Editors:

Dr. apt. Fauzan Zein (Universitas Bhakti Kencana; [0000-0002-7977-488X](#))

Dr. apt. Rudi Hendra (Universitas Riau; Orcid ID: [0000-0002-1103-8261](#))

Editorial Members:

Prof.Dr. apt. Arry Yanuar, M.Si. (Universitas Indonesia; Orcid ID: [0000-0001-8895-9010](#))

Prof. Dr. apt. Shirly Kumala, M.Biomed. (Universitas Pancasila)

Dr. apt. Christina Avanti, M.Si. (Universitas Surabaya; Orcid ID: [0000-0002-1770-8684](#))

apt. Hilwan Yuda Teruna, Ph.D. (Universitas Riau; Orcid ID: [0000-0001-6363-5239](#))

Articles

- **Pengaruh Media Edukasi Terhadap Tingkat Pengetahuan Beyond Use Date 111-117**
Elsa Ignatia Veronica, Sherly Tandi Arrang, Dion Notario
- **Pengaruh Asuhan Kefarmasian Terhadap Outcome Klinis dan Kualitas Hidup pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 118-128**
Khairunnisa, Kiki Rawitri, Wiryanto, Sri Wahyuni
- **Pengaruh Antioksidan dan Kombinasi Pengawet terhadap Stabilitas Ekstrak Cair NADES Biji Kopi Hijau 129-145**
Delly Ramadon, Rosalina Mesusi Septiani, Salsabila Nursyifa Putri, Abdul Mun'im
- **Eksplorasi Efek Etanol Terhadap Survival dan Status Imunitas *Drosophila melanogaster* Reski Amalia Rosa, Nadila Pratiwi Latada, Asbah Asbah, Ahmad Mu'arif, Risfah Yulianty, Firzan Nainu 146-153**
- **Karakterisasi Morfologis dan Molekuler Varietas Kedelai (*Glycine max*) untuk Identifikasi Bahan Baku Obat Tradisional 154-164**
Fuad Soegibudiono Wiradjaja, Oeke Yunita
- **LC-MS Ekstrak Herba Anggrek Macan (*Grammatophyllum scriptum (Lindl.)*) Bl. serta Uji Aktivitas Sitotoksik LC-MS of *Grammatophyllum scriptum (Lindl.)*Bl. and Cytoxic Activity Test 165-173**
Christina de Fretes, Eva Simaremare, Elsyte Gunawan, Verena Agustini, Yusuf Eka Maulana, Nabila Nur Fadhilah
- **Studi Literatur Bahan yang Memengaruhi Waktu Larut Tablet Effervescent Sediaan Herbal 174-184**
Reynelda Juliani Sagala, Putriana Rachmawati, Pretty F.A Kambira

Potensi Penghambatan Sel Kanker Paru dari Ekstrak Davallia denticulata	185-190
Rudi Hendra, Muhammad Afham, Rohimatul Khodijah	
• Formulasi Nasal Spray Anti-Influenza yang Mengandung Nanopartikel Perak Nasal Spray Anti-Influenza Nanopartikel Perak 191-201	
Sutriyo, Wilbert Wylie, Kurnia Sari Setio Putri, Okti Nadia Poetri, Ratika Rahmasari	
• Cost Analysis Terapi Antidiabetik pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Rawat Inap di RSU Anwar Medika..... 202-209	
Marthy Meliana Ariyanti Jalmav, Yuniati Yuniati Hoiriayah	
• Uji Resistensi Nyamuk Aedes aegypti terhadap Cypermetrin 0,05% di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru Tahun 2020 210-215	
Dedes Handayani	
• Artikel Review: Potensi Kurma Sebagai Sumber Nutrasetikal dan Pangan Fungsional	
Marisca Evalina Gondokesumo, Retno Wilujeng Susilowati 216-231	

Pengaruh Media Edukasi Terhadap Tingkat Pengetahuan Beyond Use Date

Elsa Ignatia Veronica¹, Sherly Tandi Arrang^{1*}, Dion Notario¹

Artikel Penelitian

Abstract: The stability of drug preparations is very important to maintain because it can affect the quality, effectiveness, and safety of these drug preparations. If the product's primary packaging is opened, the stability of the preparation is changed. The product's stability duration is correlated with the expiration date. The expiration date of the product after opened from its original packaging or mixed with other preparations is known as the beyond-use date (BUD). Research on the level of public knowledge about BUD still needs to be improved, and the results of several studies show that the community needs to learn and understand BUD. Therefore, a study was conducted to assess differences in the effectiveness of educational media (pocketbook and video) on knowledge related to BUD. Quasi-experimental research design with the type of pre-test & post-test two groups. The number of respondents in this research was 70, divided into two: pocketbooks (35 respondents) and videos (35 respondents). Based on the analysis results, it was found that there was a change in the respondents' knowledge after being given education. As many as 60% of respondents in the pocketbook group had insufficient knowledge before being given education, and after being given education, 74% of respondents had good knowledge ($p=0.01$). In the video group, there was an increase in the good knowledge respondent group; namely, before being given education, the number was 37%, increasing to 43% after being given education ($p=0.01$). The regression analysis showed that educational media significantly influenced respondents' knowledge related to BUD ($p=0.04$). The Education with a pocketbook and video increases knowledge about BUD, but videos provide a better increase in knowledge.

Keywords: beyond use date (BUD), educational media, pocket book, video.

Abstrak: Stabilitas sediaan obat sangat penting untuk dijaga karena dapat mempengaruhi mutu, efektivitas, dan keamanan sediaan obat tersebut. Apabila kemasan primer dari suatu sediaan obat dibuka, maka stabilitas sediaan tersebut beresiko mengalami penurunan. Durasi stabilitas suatu sediaan obat dikorelasikan dengan masa kadaluarsa. Masa kadaluarsa sediaan obat yang sudah dibuka dari kemasan aslinya atau setelah diracik atau dicampur dengan sediaan lain dikenal dengan *beyond use date* (BUD). Penelitian tingkat pengetahuan masyarakat mengenai BUD masih kurang dan hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa masyarakat belum mengetahui dan memahami tentang BUD. Oleh sebab itu, dilakukan penelitian untuk menilai perbedaan efektivitas media edukasi (buku saku dan video) terhadap pengetahuan terkait BUD. Design penelitian quasi eksperimental dengan jenis *pre-test & post-test two group*. Jumlah responden pada penelitian ini adalah 70 orang, dibagi menjadi dua yaitu buku saku (35 orang) dan video (35 orang). Berdasarkan hasil analisis diperoleh bahwa setelah diberikan edukasi terdapat perubahan terhadap pengetahuan responden. Sebanyak 60% responden kelompok buku saku memiliki pengetahuan yang kurang sebelum diberikan edukasi dan setelah diberi edukasi 74% responden memiliki pengetahuan yang baik ($p=0.01$). Dalam kelompok video, terjadi peningkatan dalam kelompok responden pengetahuan baik, yaitu sebelum diberikan edukasi jumlahnya 37%, meningkat menjadi 43% setelah diberikan edukasi ($p=0.01$). Pada analisis regresi diperoleh hasil bahwa media edukasi memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pengetahuan responden terkait BUD ($p=0.04$). Edukasi baik dengan buku saku dan video meningkatkan pengetahuan mengenai BUD, namun video memberikan peningkatan pengetahuan yang lebih baik.

¹ Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Katolik Indonesia Atma Jaya DKI Jakarta, Indonesia

Korespondensi:

Sherly Tandi Arrang
sherly.tandiarrang@atmajaya.ac.id

Kata kunci: beyond use date (BUD), media edukasi, buku saku, video.

Pendahuluan

Beyond Use Date (BUD) adalah waktu kedaluwarsa obat setelah obat diracik, dilarutkan/direkonstitusi, atau setelah kemasan primer sediaan dibuka (1). Kemasan primer merupakan wadah yang bersinggungan langsung dengan obat seperti blister, strip, alumunium foil, botol beserta tutupnya, dan sebagainya (2). BUD sering tidak diketahui oleh masyarakat, sehingga pada pelaksanaannya masyarakat sering menyimpan obat berdasarkan *Expired Date* (ED). BUD berbeda dengan ED. ED adalah periode waktu dimana produk tetap dalam keadaan stabil kekuatan, kualitas, dan kemurniannya tetap terjaga selama disimpan sesuai dengan petunjuk pada kemasan (3). Ketika sediaan obat sudah mencapai ED atau waktu kedaluwarsa, maka obat tersebut sudah tidak layak untuk digunakan karena mutu, efektivitas dan keamanan obat sudah tidak terjamin oleh perusahaan produsen (4). Waktu kedaluwarsa pada obat akan berbeda-beda, tergantung pada bentuk sediaan dan hasil uji stabilitas yang sudah dilakukan perusahaan. Saat kemasan primer dibuka/dirusak, maka stabilitasnya akan berkurang dan memengaruhi waktu simpannya(4,5). Stabilitas dari sediaan obat ini penting, karena hal ini dapat memengaruhi mutu, efektivitas dan keamanan obat (6). Penggunaan obat dengan stabilitas yang baik juga mendukung keberhasilan dari terapi yang dilakukan pasien, karena stabilitas mempengaruhi mutu, efektivitas dan kemanan obat(4).

Edukasi terkait ED serta BUD merupakan tanggungjawab dari Tenaga Teknis Kefarmasian (TTK) dan juga apoteker. Ikatan Apoteker Indonesia (IAI) memiliki program *Gerakan Keluarga Sadar Obat (GKS0)* yaitu Dapatkan, Gunakan, Simpan dan Buang (DAGUSIBU) (7). Berdasarkan penelitian Paradigma Tenaga Teknis Kefarmasian (TTK) tentang BUD obat terdapat sebanyak 65,4% TTK cenderung berpikir bahwa waktu kedaluwarsa obat setelah kemasan primer dibuka adalah mengikuti tanggal kedaluwarsa pada kemasan (8). Penelitian Kajian Pelayanan Informasi Obat di Apotek didapatkan hasil berupa pelayanan informasi obat termasuk dalam kategori buruk, hanya 38,88% responden yang memberikan pernyataan bahwa dijelaskan mengenai cara penyimpanan (9). Berdasarkan

penelitian Gambaran Resep Tanpa BUD di kota Gorontalo, didapat hasil berupa 76,47% tenaga teknis kefarmasian mengatakan tidak ditetapkannya BUD dapat berisiko menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan (10).

Menurut penelitian lainnya yaitu Tingkat Pengetahuan Masyarakat di Kelurahan Oesapa Tentang *Beyond Use Date* Obat didapatkan hasil hanya 33% masyarakat yang memiliki pengetahuan terkait *Beyond Use Date* obat racikan (11). Sehingga dapat dikatakan tingkat pengetahuan masyarakat terkait *Beyond Use Date* sediaan obat masih rendah dan perlu diberikan edukasi oleh TTK serta apoteker. Untuk mendukung tercapainya tujuan edukasi, maka dibutuhkan sarana pendukung untuk membantu masyarakat memahami BUD, salah satunya menggunakan media pembelajaran. Media pembelajaran yang digunakan pada penelitian ini adalah buku saku dan video. Setiap individu memiliki cara belajar yang berbeda, dengan media pembelajaran yang berbeda juga. Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan penelitian tentang efektivitas edukasi *Beyond Use Date* melalui media buku saku dan video.

Metode

Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian kuantitatif dengan desain penelitian eksperimen semu (*quasi experimental design*). Pada penelitian ini dilakukan *pretest & posttest two group* untuk membandingkan tingkat pengetahuan sebelum dan sesudah dilakukan edukasi *Beyond Use Date* dengan intervensi melalui buku saku dan video. Terdapat dua (2) metode statistik yang digunakan, yaitu uji *paired t-test* untuk mengetahui pengaruh edukasi terhadap pengetahuan serta uji regresi linier berganda untuk mengetahui penggunaan media yang lebih baik untuk edukasi BUD.

Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan meliputi media edukasi buku saku dan video, jenis kelamin, usia, pendidikan, pekerjaan, dan gaya belajar. Sedangkan variabel terikat yang diteliti adalah pengetahuan responden.

Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah masyarakat di kecamatan Bekasi Selatan. Sampel

pada penelitian ini adalah masyarakat Kecamatan Bekasi Selatan yang memenuhi kriteria inklusi. Jumlah sampel ditentukan dengan metode analisis regresi linier berganda dan hasilnya dibutuhkan adalah sebanyak 33 responden. Sedangkan jika menggunakan perhitungan sampel berdasarkan analisis *paired t-test*, dibutuhkan 3 pasang (6 responden). Pada penelitian ini digunakan 70 responden. Sebanyak 35 responden pada kelompok buku saku dan 35 responden pada kelompok video.

Kriteria Inklusi dan Eksklusi responden:

1. Kriteria Inklusi:

- Responden berusia 17-55 tahun
- Responden bersedia mengisi kuesioner *pretest-posttest* dan mengikuti penelitian selama seminggu

2. Kriteria Eksklusi:

- Responden bekerja sebagai tenaga kesehatan
- Responden yang tidak dapat menggunakan perangkat pintar dan dapat berkomunikasi dengan baik.

Instrumen Penelitian

Pada penelitian ini, digunakan kuesioner dengan pertanyaan pilihan ganda dalam bentuk *online form* sebagai instrumen penelitian dan disebarluaskan melalui whatsapp.

Hasil dan Pembahasan

Penelitian dilakukan pada bulan Februari-Juni 2021 dengan jumlah responden sebanyak 70 orang dengan rentang usia 17-55 tahun. Peneliti membagi responden kedalam 2 kelompok intervensi, yaitu kelompok buku saku dan kelompok video.

Tabel 1. Distribusi Karakteristik Responden

Karakteristik	Buku Saku (n=35)	Video (n=35)	Total (n=70)
Jenis Kelamin			
Pria	20 (57%)	18 (51%)	38 (54%)
Wanita	15 (43%)	17 (49%)	32 (46%)
Usia			
17-25 tahun	9 (26%)	9 (26%)	18 (26%)
26-35 tahun	8 (23%)	10 (29%)	18 (26%)
36-45 tahun	7 (20%)	8 (23%)	15 (21%)
46-55 tahun	11 (31%)	8 (23%)	19 (27%)
Pendidikan			
SD	-	-	-
SMP	-	-	-
SMA	13 (37%)	8 (23%)	21 (30%)
Perguruan Tinggi	22 (63%)	27 (77%)	49 (70%)
Pekerjaan			
Tidak Bekerja	12 (36%)	13 (37%)	25 (36%)
Bekerja	23 (64%)	22 (63%)	45 (64%)
Gaya Belajar			
Accomodator	4 (11%)	4 (11%)	8 (11%)
Assimilator	5 (14%)	6 (17%)	11 (16%)
Converger	17 (49%)	15 (43%)	32 (46%)
Diverger	9 (26%)	10 (29%)	19 (27%)

Tabel 2. Gambaran Pengetahuan Responden tentang BUD

Tingkat Pengetahuan	Buku Saku (n=35)		Video (n=35)	
	Pretest	Posttest	Pretest	Posttest
Baik	14 (40%)	26 (74%)	13 (37%)	15 (43%)
Kurang	21 (60%)	9 (26%)	22 (63%)	20 (57%)

Data Univariat

Distribusi Karakteristik Responden

Responden yang terdapat dalam penelitian ini ada sebanyak 70 orang. Karakteristik responden meliputi jenis kelamin, usia, pendidikan, pekerjaan, dan gaya belajar (dapat dilihat pada **Tabel 1**). Mayoritas responden adalah pria (54%), usia usia 46-55 tahun (31%), tingkat pendidikan perguruan tinggi (70%), responden dengan status bekerja (64%) dan gaya belajar *converger* (46%). Responden yang bekerja memiliki profesi sebagai karyawan swasta, PNS, guru, supir, hingga *cleaning service*. Sedangkan responden yang tidak bekerja berprofesi sebagai ibu rumah tangga, *job seeker*, pelajar, dan juga mahasiswa.

Gambaran Pengetahuan Responden tentang BUD

Gambaran pengetahuan responden terkait BUD, dipaparkan dalam **Tabel 2**.

Berdasarkan hasil pada kelompok buku saku sebelum diberikan edukasi terdapat sebanyak 21 responden (60%) yang memiliki pengetahuan kurang dan 14 responden yang memiliki pengetahuan yang baik 14 (40%). Setelah diberikan edukasi melalui buku saku terdapat perubahan jumlah responden yang memiliki pengetahuan baik mengenai BUD yaitu sebanyak

26 orang (74%) dan responden dengan pengetahuan kurang sebanyak 9 orang (26%).

Pada kelompok video, sebelum diberikan edukasi terdapat 22 responden (63%) yang memiliki pengetahuan kurang terkait BUD dan 13 responden (37%) dengan pengetahuan yang baik. Setelah diberikan edukasi, terdapat perubahan jumlah responden yang memiliki pengetahuan baik menjadi sebanyak 15 orang (43%) dan responden dengan pengetahuan kurang menjadi 20 orang (57%).

Analisis Bivariat

Distribusi Rata-Rata Pengetahuan Responden Sebelum dan Setelah Edukasi Melalui Buku Saku

Berdasarkan analisis bivariat yang telah dilakukan, didapatkan hasil sebagai berikut (**Tabel 3**).

Dari **Tabel 3** diatas, nilai rata-rata pengetahuan responden sebelum diberikan edukasi buku saku adalah 35,80 dan setelah diberikan edukasi rata-rata pengetahuan adalah 46,64. Rata-rata peningkatan pengetahuan sebelum dan setelah edukasi adalah 41,22. Hasil uji statistik didapatkan nilai *p-value* sebesar 0,01 yang bermakna terdapat perbedaan yang signifikan antara pengetahuan responden sebelum dan setelah edukasi melalui buku saku.

Tabel 3. Distribusi Rata-rata Pengetahuan Responden Sebelum dan Setelah Edukasi Melalui Buku Saku

Pengetahuan	Mean	Mean of diff.	p-value	Interpretasi
Sebelum	35,80	41,22	0,01	Terdapat perbedaan yang signifikan
Setelah	46,64			

Tabel 4. Distribusi Rata-rata Pengetahuan Responden Sebelum dan Setelah Edukasi Melalui Video

Pengetahuan	Mean	Mean of diff.	p-value	Interpretasi
Sebelum	44,89	50,20	0,01	Terdapat perbedaan yang signifikan
Setelah	55,51			

Media buku saku dapat meningkatkan pengetahuan responden karena memiliki kelebihan dapat digunakan oleh semua kalangan, tidak memerlukan peralatan khusus dalam menggunakannya, dan cara penggunaan praktis (12). Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Harsismanto dkk (2019), yang mengatakan bahwa terdapat perbedaan nilai rata-rata pengetahuan responden sebelum dan setelah diberikan edukasi berupa buku saku (13).

Distribusi Rata-Rata Pengetahuan Responden Sebelum dan Setelah Edukasi Melalui Video

Distribusi rata-rata pengetahuan responden dengan media edukasi video adalah sebagai berikut (**Tabel 4**)

Tabel 4 menunjukkan bahwa rata-rata pengetahuan responden sebelum diberikan edukasi adalah 44,89. Sedangkan rata-rata pengetahuan responden setelah diberikan edukasi video adalah 55,51. Rata-rata peningkatan pengetahuan responden setelah diberikan edukasi melalui video adalah 50,20. Berdasarkan hasil uji statistik didapatkan *p*-value sebesar 0,01. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara pengetahuan responden terkait BUD sebelum dan

setelah diberikan edukasi melalui video. Penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Yefrisyam (2018), yang menyatakan bahwa terdapat perbedaan nilai rata-rata pengetahuan responden antara sebelum dan setelah dilakukan edukasi (14). Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Wibowo dan Dyah (2014), juga mengatakan bahwa pemberian edukasi dapat memberikan pengaruh terhadap pengetahuan responden (15).

Analisis Multivariat

Berdasarkan hasil uji regresi linier berganda pada **Tabel 5**, didapatkan hasil berupa media edukasi yang lebih berpengaruh secara signifikan terhadap pengetahuan responden adalah video dengan *p*-value sebesar $0,04 < 0,05$. Hal ini dapat terjadi dikarenakan pada media audio visual melibatkan 2 alat indera yaitu penglihatan dan pendengaran. Sehingga dapat meningkatkan kemampuan responden dalam menangkap informasi yang diberikan (16). Hasil ini sejalan yang dilakukan oleh Ismawati (2015), terkait pengaruh penyuluhan ibu tentang pemberian makanan pendamping ASI, juga menjelaskan bahwa terdapat pengaruh penyuluhan dengan media audio visual dan media leaflet (17).

Tabel 5. Pengaruh Variabel Bebas Terhadap Variabel Terikat

Karakteristik	Estimate std.	p-value
Media Edukasi		
Buku Saku		
Video	6,84	0,04
Usia		
17-25 tahun		
26-35 tahun	-0,60	0,90
36-45 tahun	12,10	0,01*
46-55 tahun	-6,31	0,19
Pendidikan		
SD		
SMP		
SMA		
Perguruan Tinggi	9,53	0,01*
Pekerjaan		
Tidak Bekerja		
Bekerja	7,35	0,04*
Gaya Belajar		
Accomodator		
Assimilator	-5,88	0,35
Converger	-11,63	0,03*
Diverger	-12,91	0,04*

Penelitian lainnya yang dilakukan oleh Saban (2017) terkait penyuluhan tentang anemia melalui buku saku dan video juga memberikan hasil yang serupa dengan penelitian ini, yaitu media video lebih efektif daripada buku saku (18).

Selain media edukasi yang dapat mempengaruhi tingkat pengetahuan responden khususnya BUD, terdapat faktor-faktor lain yang mempengaruhi pengetahuan responden yaitu usia, pendidikan, pekerjaan, dan gaya belajar responden. Menurut Notoatmodjo, pengetahuan dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal. Yang termasuk faktor internal antara lain usia, pendidikan, pekerjaan, minat, dan pengalaman. Dan yang termasuk faktor eksternal adalah faktor lingkungan dan informasi (19). Berdasarkan **Tabel 5**, usia mempengaruhi pengetahuan responden. Terlebih untuk kelompok usia 36-45 tahun yang memiliki pengaruh yang signifikan dengan *p-value* $0,01 < 0,05$. Individu dengan usia yang lebih tua biasanya akan lebih dewasa dan lebih cermat memperhatikan segala sesuatu dibandingkan individu dengan usia yang lebih muda. Meningkatnya usia seseorang juga akan mempengaruhi pola pikir dan meningkatkan daya tangkap seseorang (19). Penelitian ini memiliki hasil yang serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Yeni (2015), terkait faktor-faktor yang berhubungan dengan pengetahuan penggunaan obat generik pada masyarakat yang mengatakan bahwa terdapat hubungan antara usia dengan pengetahuan seseorang (20). Hasil penelitian ini juga sejalan dengan hasil studi yang dilakukan oleh Vallin dkk pada tahun 2016, yang menyatakan bahwa responden yang berusia lebih muda memiliki tingkat pengetahuan yang lebih baik dibandingkan responden yang berusia lebih tua. Hal ini dapat disebabkan oleh pengaruh adanya penurunan fungsi penglihatan, pendengaran, dan kognitif pada individu yang berusia senja (21). Selain usia, hal lainnya yang mempengaruhi tingkat pengetahuan dalam penelitian ini adalah pendidikan formal terakhir dari responden dengan *p-value* $0,01 < 0,05$. Pendidikan mempengaruhi kemampuan seseorang dalam menerima informasi, dimana semakin tinggi pendidikan seseorang maka semakin mudah pula orang tersebut dalam menerima informasi (19). Hasil penelitian ini memiliki hasil

yang serupa dengan penelitian oleh Ivoryanto dkk (2017), yang mengatakan terdapat hubungan antara tingkat pendidikan dengan pengetahuan seseorang (22).

Selain usia dan pendidikan, pekerjaan juga mempengaruhi pengetahuan responden terkait BUD dengan *p-value* sebesar $0,04 < 0,05$. Selain itu, seseorang yang bekerja memiliki daya tangkap dan pola pikir yang lebih baik daripada seseorang yang tidak bekerja. Lingkungan pekerjaan seseorang akan memberikan pengalaman dan pengetahuan baik secara langsung maupun tidak langsung (19). Hasil penelitian ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Yeni (2015), bahwa terdapat hubungan antara pekerjaan dengan pengetahuan responden (20). Dalam penelitian ini, gaya belajar juga mempengaruhi pengetahuan responden terkait BUD. Gaya belajar *converger* (*p-value* = 0,03) dan *diverger* (*p-value* = 0,04) memiliki pengaruh yang signifikan terhadap pengetahuan. Seseorang dengan gaya belajar *converger* cenderung berorientasi pada *abstract conceptualization (thinking)*, *active experimentation (doing)*, serta menyukai tugas-tugas teknis aplikatif. Sedangkan seseorang dengan gaya belajar *diverger*, berorientasi pada *concrete experience (feeling)*, *reflective observation (watching)*, serta menyukai belajar dalam kelompok dan menerima umpan balik yang bersifat personal (23).

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian ini disimpulkan bahwa terdapat peningkatan pengetahuan pada masyarakat terkait *Beyond Use Date* (BUD) setelah diberikan edukasi melalui buku saku dan video (nilai *p* 0,01). Media edukasi berupa video lebih efektif daripada media buku saku dalam meningkatkan pengetahuan masyarakat terkait *Beyond Use Date* (BUD) dengan nilai (*p* 0,04). Faktor lain yang juga mempengaruhi pengetahuan responden terkait BUD adalah usia, pendidikan, pekerjaan, serta gaya belajar.

Referensi

1. USP 41. Pharmaceutical Compounding-Nonsterile Preparation. Chapter 795. 2014.
2. Christina F. Beyond Use Date. Rasional 2012; 10: 17–21.

3. Kementerian Kesehatan RI. Farmakope Indonesia edisi V. 2014.
4. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM). Peraturan Badan Pengawas Obat dan Makanan Nomor 34 tahun 2018 tentang Pedoman Cara Pembuatan Obat yang Baik [Internet]. Badan Pengawas Obat dan Makanan (BPOM); 2018.
5. Vykuntam U. Stability Studies of Pharmaceutical Products. *World J Pharm Res* 2019; 8: 479–492.
6. Zaini AN, Gozali D. Pengaruh Suhu terhadap Stabilitas Obat Sediaan Suspensi. *Farmaka* 2016; 14: 140–148.
7. Ratnasari D, Yunitasari N, Deka PT. Penyuluhan Dapatkan Gunakan Simpan Buang (DAGUSIBU) Obat. *J Community Engagem Employ* 2018; 1: 55–61.
8. Mustafa H. Paradigma Tenaga Teknis Kefarmasian (TTK) Tentang Beyond Use Date (BUD) Obat dengan Memanfaatkan Media Sosial. Politeknik Kesehatan Kemenkes, 2019.
9. Apriansyah A. Kajian Pelayanan Informasi Obat di Apotek Wilayah Kota Tangerang Selatan. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta, 2017.
10. Abdullah KK. Gambaran Resep Tanpa BUD (Beyond Use Date) Menurut Tenaga Kefarmasian di Kota Gorontalo. Universitas Negeri Gorontalo, 2018.
11. Garus AW. Tingkat Pengetahuan Masyarakat RT 40 RW 13 Kelurahan Oesapa Tentang Beyond Use Date Obat. Politeknik Kesehatan Kemenkes, 2018.
12. Anjelita R, Ariyati E. Pembuatan Buku Saku sebagai Media Pembelajaran pada Materi Jamur Kelas X SMA. *J Pendidik dan Pembelajaran Khatulistiwa* 2018; 7: 8.
13. Harsismanto J, Oktavidianti E, Astuti D. Pengaruh Pendidikan Kesehatan Media Video dan Poster Terhadap Pengetahuan dan Sikap Anak dalam Pencegahan Penyakit Diare. *J Kesmas Asclepius* 2019; 1: 75.
14. Yefrisyam. Perbedaan Metode Audio Visual dan Metode Buku Saku Terhadap Pengetahuan Pencegahan Penyakit Diare Pada Siswa Kelas V di SDN 18 Kampung Baru. Politeknik Kesehatan Kemenkes Padang, 2018.
15. Wibowo S, Suryani D. Pengaruh Promosi Kesehatan Metode Audio Visual dan Metode Buku Saku Terhadap Peningkatan Penggunaan Monosodium Glutamat (MSG) pada Ibu Rumah Tangga. *Kesmas* 2014; 7: 55.
16. Fuad AJ. Gaya Belajar Kolb dan Percepatan Belajar. *Psychol Forum UMM*. 2015.
17. Ismawati W. Efektifitas Penggunaan Media Leaflet, Buku Saku, Video untuk Meningkatkan Pengetahuan Pemberian Makanan Pendamping Air Susu Ibu (MPASI) di Desa Kenep Kecamatan Sukoharjo. Muhammadiyah Surakarta, 2018.
18. Saban S. Efektifitas Media Video dan Leaflet Terhadap Pengetahuan Tentang Anemia Siswi SMAN 2 Ngaglik Sleman. Aisyiyah Yogyakarta, 2017.
19. Notoatmodjo S. Kesehatan Masyarakat Ilmu dan Seni. Jkt Rineka Cipta. 2011.
20. Yeni PSI. Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Pengetahuan Penggunaan Obat Generik pada Masyarakat di Wilayah Kerja Puskesmas Padang Panyang Kabupaten Nagan Raya. Universitas Teuku Umar, 2015.
21. Vallin, Martina, P M, et al. Knowledge and Attitudes towards Antibiotic Use and Resistance-A Latent Class Analysis of a Swedish Population-Based Sample. *PLoS ONE*; 11. 2016.
22. Ivoryanto E, Sidharta B, Illahi RK. Hubungan Tingkat Pendidikan Formal Masyarakat Terhadap Pengetahuan dalam Penggunaan Antibiotika Oral. *Pharm J Indones* 2017; 2: 31–36.
23. Austin Z. Development and Validation of the Pharmacists' Inventory of Learning Styles (PILS). *Am J Pharm Educ*; 68(2): 2014.

Pengaruh Asuhan Kefarmasian Terhadap *Outcome* Klinis dan Kualitas Hidup pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2

Khairunnisa^{1*}, Kiki Rawitri², Wiryanto¹, Sri Wahyuni²

Artikel Penelitian

Abstract: The role of pharmacists in pharmaceutical care has been shown to improve therapeutic outcomes in patients with diabetes mellitus (DM) in various countries. This study aims to implementation of pharmaceutical care and determine its impact on clinical outcomes and quality of life of type 2 DM patients at the community pharmacies. This study used a comparative experimental method with a prospective cohort study design before and after intervention on 38 types 2 DM patients who met the inclusion criteria at one of the community pharmacies in Medan city in August-December 2020. Clinical outcome data included random blood glucose (RBG) levels and HbA1c values were obtained from direct examination of the patient, and quality of life data was obtained using the EQ-5D-3L questionnaire. The data were analyzed using the Wilcoxon Signed-Rank test and the Friedman test in the SPSS V22.0. program. The results showed that the mean RBG value before the intervention was 278.58 ± 75.278 mg/dl and after the intervention, there was a decrease of 179.68 ± 14.008 mg/dl ($\alpha < 0.05$), the HbA1c value was $9.021 \pm 1.029\%$ to $8.368 \pm 1.049\%$ ($\alpha < 0.05$). There was a significant increase in the average quality of life index before the intervention from 0.849 ± 0.1266 and after the intervention to 0.967 ± 0.0657 ($\alpha < 0.05$). Based on the results of the study, it was concluded that the implementation of pharmaceutical care had an impact on improving clinical outcomes and quality of life in type-2 DM patients at community pharmacy.

Keywords: pharmaceutical care, type-2 DM, clinical outcome, quality of life.

Abstrak: Peran apoteker dalam asuhan kefarmasian telah terbukti meningkatkan *outcome* terapi pada pasien diabetes melitus (DM) di berbagai negara. Penelitian ini bertujuan untuk menerapkan asuhan kefarmasian dan mengetahui pengaruhnya terhadap *outcome* klinis dan kualitas hidup pasien DM tipe 2 di Apotek. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental komparatif dengan desain penelitian kohort-studi prospektif sebelum dan setelah intervensi terhadap 38 pasien DM tipe 2 yang memenuhi kriteria inklusi di salah satu Apotek di Kota Medan pada bulan Agustus-Desember 2020. Data *outcome* klinis meliputi kadar gula darah (KGD) sewaktu dan nilai HbA1c diperoleh dari pemeriksaan langsung pada pasien, dan data kualitas hidup diperoleh menggunakan kuesioner EQ-5D-3L. Data dianalisis menggunakan uji Wilcoxon Signed Rank dan uji Friedman dalam program SPSS V22.0. Hasil penelitian menunjukkan nilai KGD sewaktu rata-rata sebelum intervensi sebesar $278,58 \pm 75,27$ mg/dl dan setelah intervensi terjadi penurunan menjadi $179,68 \pm 14,01$ mg/dl ($\alpha < 0,05$), nilai HbA1c $9,021 \pm 1,029\%$ menjadi $8,368 \pm 1,049\%$ ($\alpha < 0,05$). Terjadi peningkatan secara signifikan indeks kualitas hidup rata-rata sebelum intervensi sebesar $0,849 \pm 0,126$ dan setelah intervensi menjadi $0,967 \pm 0,065$ ($\alpha < 0,05$). Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa penerapan asuhan kefarmasian berpengaruh terhadap peningkatan *outcome* klinis dan kualitas hidup pada pasien DM tipe 2 di Apotek.

¹ Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara, Medan, Sumatera Utara, Indonesia

² Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al Washliyah, Medan, Sumatera Utara, Indonesia

Korespondensi:

Khairunnisa
khairunnisa7@usu.ac.id

Kata kunci: asuhan kefarmasian, DM tipe 2, *outcome* klinis, kualitas hidup.

Pendahuluan

Diabetes merupakan satu dari empat penyakit tidak menular utama yang mempengaruhi masalah kesehatan secara global (1). Jumlah penderita diabetes melitus (DM) yang berumur di atas 18 tahun secara global mengalami peningkatan dari 108 juta orang pada tahun 1980 menjadi 422 juta orang pada tahun 2014 (2). Berdasarkan data Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) di Indonesia, penderita DM meningkat dari 6,9% pada tahun 2013 menjadi 10,9% pada tahun 2018 dan menurut *International Diabetes Federation* (IDF) Indonesia merupakan peringkat ketujuh tertinggi di dunia yang memiliki penderita DM dengan jumlah penderita sebanyak 10,7 juta jiwa pada tahun 2019 (3,4).

Terapi yang tidak optimal pada pasien DM menyebabkan kadar gula darah tidak terkendali dengan baik, sehingga dapat menyebabkan komplikasi, meningkatkan risiko kematian dini dan secara signifikan berkontribusi terhadap angka kematian, biaya serta kualitas hidup yang rendah (1).

Beberapa penelitian tentang peran asuhan kefarmasian terhadap manajemen pasien penderita DM sudah banyak dilakukan baik di negara maju atau negara berkembang. Penelitian yang dilakukan oleh Mourao et al., (2013) pada enam Unit Kesehatan Primer di Brazil menunjukkan bahwa program asuhan kefarmasian dapat mereduksi nilai HbA1c pada pasien diabetes selama 6 bulan (5).

Penelitian yang sama juga dilakukan oleh Butt et al., (2016) di Klinik Endokrin Universiti Kebangsaan Malaysia *Medical Centre* (UKMMC) menyimpulkan bahwa program jangka pendek asuhan kefarmasian dapat meningkatkan *outcome* klinis pasien DM dan dapat mengendalikan komorbiditas yang akan ditimbulkan. Selama 6 bulan pasien mendapat intervensi oleh farmasis, selanjutnya diukur *outcome* klinisnya untuk mengetahui keberhasilan program. Hasil penelitian menunjukkan bahwa setelah 6 bulan nilai HbA1c pasien mengalami penurunan yang signifikan sebesar $9,66 \pm 1,57\%$ menjadi $8,47 \pm 1,61\%$ ($\alpha<0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa intervensi

apoteker dapat meningkatkan kontrol glikemik dan kualitas hidup pasien DM (6).

Kontribusi apoteker dalam pelayanan asuhan kefarmasian mampu meningkatkan keberhasilan (*outcome*) terapi diabetes, mencegah morbiditas dan mortalitas, meningkatkan kualitas hidup pasien, mencegah kesalahan dan mengurangi biaya pengobatan, meningkatkan kepatuhan dan perilaku pasien (7). Penelitian terkait peran apoteker dalam asuhan kefarmasian pada pasien DM tipe 2 masih terbatas, khususnya di Apotek (5,6). Penelitian ini bertujuan untuk menerapkan asuhan kefarmasian dan mengetahui pengaruhnya terhadap *outcome* klinis dan kualitas hidup pasien DM tipe 2 di Apotek.

Bahan dan Metode

Desain Studi

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental komparatif dengan desain penelitian kohort-studi prospektif sebelum dan setelah intervensi. Penelitian dilakukan pada pasien DM tipe 2 yang menebus resep di salah satu Apotek di Kota Medan pada bulan Agustus-Desember 2020 dan memenuhi kriteria inklusi. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Keperawatan Universitas Sumatera Utara Nomor 2177/VII/SP/2020. Semua pasien yang berpartisipasi dalam penelitian ini menandatangani dan memberikan persetujuan sebagai bukti kesediaan untuk menjadi responden.

Subjek Penelitian

Menurut Borg et al., (2007), khusus untuk penelitian eksperimen dan komparatif diperlukan sampel 15-30 responden (8). Gay et al., (2009) juga menyebutkan bahwa untuk penelitian eksperimen dan komparatif diperlukan sampel 30 responden (9).

Subjek dalam penelitian ini adalah 38 pasien DM tipe 2. Kriteria inklusi pasien yang menjadi responden meliputi: pasien dengan diagnosis DM tipe 2 lebih dari 3 bulan, pasien pria dan wanita berusia >18 tahun, pasien DM tipe 2 dengan atau tanpa komplikasi dan penyakit penyerta, bersedia mengikuti penelitian dengan menandatangani *informed consent*.

Tabel 1. Penilaian *Outcome* Terapi dan Intervensi

Penilaian	Sebelum intervensi	Follow up I	Follow up II	Setelah intervensi
Demografi pasien	✓			
Skrining resep*	✓			
Identifikasi DRPs	✓			✓
<i>Outcome</i> klinis				
– KGD sewaktu (mg/dl)	✓	✓	✓	✓
– HbA1c (%)	✓			✓
Tingkat kepatuhan	✓	✓	✓	✓
Kualitas hidup	✓	✓	✓	✓
Intervensi				
– Konseling, informasi, edukasi (KIE)		✓		✓
– Pemberian brosur/leaflet		✓		
– Telefarma/bertemu pasien langsung	✓	✓		
– Home pharmacy care/ bertemu pasien langsung				✓

Keterangan : *Skrining resep dilakukan jika pasien menerima resep baru

Kriteria eksklusi pasien meliputi: pasien yang tidak bersedia menjadi subjek penelitian, pasien gangguan jiwa dan ibu hamil, pasien dengan komplikasi penyakit ginjal kronik (PGK), penyakit hati, *Human Immunodeficiency Virus-Acquired Immunodeficiency Syndrome* (HIV/AIDS), dan Tuberkulosis (TBC), pasien tidak dapat berkomunikasi dengan apoteker.

Instrumen Penelitian

Outcome Klinis

Penilaian *outcome* klinis meliputi kadar gula darah sewaktu yang diukur menggunakan glukometer *Easy Touch Dual Function®* dan HbA1C yang diukur menggunakan perangkat *BioHermes HbA1C EZ 2.0 Glycohemoglobin Analyzer HbA1C®*.

Kualitas Hidup

Kualitas hidup diukur menggunakan instrumen *European Quality of Life-5 Dimensions 3 Level version* (EQ-5D-3L) yang dikeluarkan oleh EuroQol dari Inggris (10). Kuesioner ini memiliki 5 dimensi yaitu, 1) mobilitas/berjalan, 2) perawatan diri, 3) kegiatan yang biasa dilakukan, 4) rasa kesakitan/tidak nyaman, 5) rasa cemas/depresi dengan masing-masing dimensi memiliki 3 level pertanyaan yaitu 1) tidak masalah, 2) bermasalah sedang dan 3)

bermasalah berat. Tiap level pada dimensi memiliki koefisien yang berbeda. Nilai 100% atau 1,000 mengindikasikan sehat sempurna. Skor kualitas hidup pasien dikelompokkan menjadi 3 kategori yaitu kategori baik (skor $\geq 0,8$), kategori cukup (skor 0,6–0,8), dan kategori buruk (skor $< 0,6$) (11).

Penilaian *Outcome* Terapi dan Intervensi

Penilaian *outcome* terapi dan intervensi yang dilakukan disajikan pada **Tabel 1**.

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan uji *Wilcoxon Signed Rank* dan uji *Friedman*. Uji *Wilcoxon Signed Rank* digunakan untuk melihat pengaruh asuhan kefarmasian terhadap *outcome* klinis (KGD sewaktu dan HbA1c) dan kualitas hidup (*Quality of Life*). Uji *Friedman* digunakan untuk melihat perbedaan pengaruh antar perlakuan yaitu pada tahap sebelum intervensi, *follow up I*, *follow up II*, dan setelah intervensi.

Hasil dan Diskusi

Karakteristik Pasien DM Tipe 2

Penelitian ini melibatkan 38 pasien diabetes melitus tipe 2 yang dilakukan di salah satu Apotek di Kota Medan pada bulan Agustus-Desember 2020 yang memenuhi kriteria inklusi.

Karakteristik pasien DM tipe 2 berdasarkan jenis kelamin, umur, tingkat pendidikan, pekerjaan, lama sakit, dan penyakit penyerta dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Berdasarkan **Tabel 2** diperoleh bahwa mayoritas penderita DM tipe 2 adalah berjenis kelamin perempuan. Syarifuddin et al., (2019) dalam penelitiannya terhadap pasien DM tipe 2 di Kota Medan menemukan lebih banyak perempuan yang mengalami DM tipe 2 yaitu sebesar 66,7% dibanding laki-laki yaitu sebesar 33,3% (12). Hal ini sejalan dengan penelitian Nasution et al., (2018), bahwa mayoritas penderita DM tipe 2 di Kota Medan adalah perempuan sebesar 66% sedangkan laki-laki sebesar 34% (9). Berdasarkan Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas) 2018, prevalensi DM pada perempuan lebih tinggi dibandingkan laki-laki dengan perbandingan 1,78% terhadap 1,21%. Secara fisik, perempuan memiliki peluang lebih besar dalam peningkatan indeks massa tubuh, sindrom siklus bulanan (*premenstrual syndrome*), dan *pasca menopause* yang membuat distribusi lemak menjadi lebih mudah terakumulasi dalam tubuh sebagai hasil dari proses hormonal. Oleh karena itu, prevalensi DM pada perempuan lebih tinggi dibandingkan laki-laki (4,13).

Hasil penelitian ini menunjukkan usia rata-rata pasien DM tipe 2 adalah $54,58 \pm 6,587$ tahun

yaitu berkisar antara 40 sampai 70 tahun. *American Diabetes Association* (ADA) (2020) menyatakan bahwa orang yang berusia di atas 45 tahun memiliki faktor risiko lebih tinggi terhadap perkembangan penyakit tersebut. Berdasarkan Riskesdas 2018, prevalensi DM menunjukkan peningkatan seiring dengan bertambahnya usia penderita yang mencapai puncaknya usia 55 sampai 64 tahun dan menurun setelah melewati rentang usia tersebut (4,14).

Proporsi penderita DM tipe 2 dalam penelitian ini menurut tingkat pendidikan didominasi oleh latar belakang pendidikan SMA dengan mayoritas bekerja sebagai Swasta/Pedagang/Buruh. Hasil penelitian Sihombing et al., (2018) menunjukkan tidak ada korelasi antara tingkat pendidikan dengan kejadian DM tipe 2. Pasien dengan pendidikan tinggi diharapkan memiliki perhatian yang lebih besar terhadap kesehatannya. Latar belakang pendidikan dan pekerjaan tidak menjadi faktor risiko kejadian DM tipe 2 karena pada kenyataannya masih banyak orang berpendidikan tinggi mengabaikan kesehatannya karena berbagai alasan, salah satunya adalah beban kerja dan aktivitas yang berlebihan yang pada akhirnya menyebabkan gaya hidup dan masalah kesehatan yang tidak tertata.

Tabel 2. Karakteristik Pasien DM Tipe 2

Karakteristik	Kategori	Jumlah (Percentase/%)
Jenis Kelamin	Laki-laki	15 (39,5)
	Perempuan	23 (60,5)
Usia	< 45 tahun	2 (5,3)
	45-65 tahun	35 (92,1)
	> 65 tahun	1 (2,6)
Tingkat Pendidikan	SD	3 (7,9)
	SMP	6 (15,8)
	SMA	18 (47,4)
	PT	11 (28,9)
Pekerjaan	PNS/Pemerintah	7 (18,4)
	Swasta/Pedagang/Buruh	18 (47,4)
	Tidak Bekerja	10 (26,3)
	Pensiunan	3 (7,9)
Durasi sakit	<1 tahun	7 (18,4)
	1-5 tahun	18 (47,4)
	>5 tahun	13 (34,2)
Penyakit Penyerta	Dengan Penyerta	28 (73,7)
	Tanpa Penyerta	10 (26,3)

Pada dasarnya dalam mengontrol gula darah tergantung dari kesadaran dan kepatuhan individu melalui *life style* (13,15). Kurangnya aktivitas fisik juga menyebabkan toleransi tubuh terhadap glukosa dan sensitivitas tubuh terhadap insulin semakin berkurang, sehingga hal tersebut dapat menyebabkan orang yang tidak bekerja, seperti ibu rumah tangga, memiliki aktivitas fisik yang kurang dan mengakibatkan tubuhnya kurang sensitif terhadap insulin (16).

Berdasarkan lama menderita DM tipe 2, penelitian ini menunjukkan mayoritas penderita DM tipe 2 memiliki durasi sakit 1 sampai 5 tahun. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Wijaya dkk., (2015) bahwa sebagian besar pasien menderita DM pada rentang 1-5 tahun (39,14%). Lama menderita penyakit DM seringkali kurang menggambarkan proses penyakit sebenarnya. Hal ini dikarenakan banyak sekali pasien DM yang baru terdiagnosa saat mengalami komplikasi, padahal proses perjalanan penyakit telah berlangsung bertahun-tahun sebelumnya namun belum terdiagnosa (17).

Mayoritas penyerta yang diderita pasien DM tipe 2 dalam penelitian ini adalah hipertensi. Hal ini sejalan dengan penelitian Akin et al., (2019) yang menyatakan hipertensi merupakan komorbiditas penyakit DM tipe 2 yang paling utama yaitu sebanyak 84,9%. Pada pasien DM tipe 2, hipertensi seringkali merupakan bagian dari sindrom metabolismik dari resistensi insulin (18,19). Hipertensi mungkin

muncul selama beberapa tahun pada pasien sebelum munculnya penyakit DM tipe 2.

Outcome Klinis pada Pasien DM Tipe 2

Terapi yang rasional dalam pengobatan DM tipe 2 dapat meningkatkan *outcome* klinis yaitu tercapainya kadar gula darah yang terkendali. *Outcome* klinis yang diukur dalam penelitian ini adalah KGD sewaktu dan HbA1c.

Kadar Gula Darah (KGD) Sewaktu Pasien DM Tipe 2

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa KGD sewaktu rata-rata sebelum intervensi adalah $278,58 \pm 75,27$ mg/dl. KGD sewaktu rata-rata pada tahap sebelum intervensi, *follow up I*, *follow up II*, dan setelah intervensi dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Berdasarkan hasil uji *Wilcoxon Signed Rank* diperoleh bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara sebelum intervensi dengan *follow up I*, *follow up I* dengan *follow up II*, *follow up II* dengan setelah intervensi, dan sebelum dengan setelah intervensi dengan nilai signifikansi $\alpha < 0,05$ ($\alpha = 0,000$). Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan antara KGD sewaktu rata-rata sebelum dan setelah intervensi. Terjadi penurunan rata-rata KGD sewaktu pada setiap tahap pengukuran dengan sebelum intervensi sebesar $278,58 \pm 75,27$ mg/dl, *follow up I* sebesar $231,92 \pm 41,63$ mg/dl, *follow up II* sebesar $193,16 \pm 22,44$, dan setelah intervensi sebesar $179,68 \pm 14,01$.

Tabel 3. KGD Sewaktu Rata-Rata Tahap Sebelum Intervensi, *Follow Up I*, *Follow Up II*, dan Setelah Intervensi

Penilaian	Parameter <i>Outcome</i> Klinis		
	KGD sewaktu rata-rata (mg/dl)	Uji Wilcoxon (Asymp.Sig.)	Uji Friedman (Asymp.Sig.)
Sebelum intervensi	$278,58 \pm 75,27$	$\alpha = 0,000$	
<i>Follow up I</i>	$231,92 \pm 41,63$		
<i>Follow up I</i>	$231,92 \pm 41,63$	$\alpha = 0,000$	
<i>Follow up II</i>	$193,16 \pm 22,44$		
<i>Follow up II</i>	$193,16 \pm 22,44$	$\alpha = 0,000$	$\alpha = 0,000$
Setelah intervensi	$179,68 \pm 14,01$		
Sebelum intervensi	$278,58 \pm 75,27$	$\alpha = 0,000$	
Setelah intervensi	$179,68 \pm 14,01$		

Intervensi yang dilakukan apoteker dalam penelitian ini meliputi konseling, informasi, dan edukasi (KIE), pemberian brosur/leaflet, telefarma, dan *home pharmacy care* dapat meningkatkan hasil klinis yang terlihat pada KGD sejak rata-rata pasien mengalami penurunan di setiap tahap pengukuran. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan Ali et al., (2012) di salah satu Apotek komunitas di London bahwa diperoleh penurunan kadar glukosa darah secara signifikan ($p<0,001$) yaitu $9,04 \pm 1,93$ mmol/l menjadi $6,88 \pm 1,05$ mmol/l. Hasil yang sama juga ditemukan pada penelitian Farsaei et al., (2011) di Iran pada grup intervensi sebanyak 87 orang, diperoleh bahwa setelah follow up selama 3 bulan, terjadi penurunan kadar glukosa darah secara signifikan ($p<0,001$) (20,21).

Kontrol glikemik pada penderita DM tipe 2 merupakan dasar utama dalam mengurangi risiko morbiditas dan mortalitas, sehingga dengan kontrol glikemik yang terkendali, maka risiko terkena komplikasi makrovaskular dan mikrovaskular dapat berkurang. Gambaran kontrol glikemik pada pasien setelah dilakukan intervensi dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Berdasarkan **Tabel 4**, terlihat bahwa proporsi kontrol glikemik adalah sama antara KGD terkontrol (<180 mg/dl) dan tidak terkontrol

(>180 mg/dl), masing-masing sebesar 50%. Kontrol glikemik dengan kategori tidak terkontrol yang terjadi pada 19 pasien disebabkan karena *baseline* KGD sewaktu saat sebelum intervensi relatif tinggi (≥ 300 mg/dl), meskipun dengan kategori tidak terkontrol tetapi penurunan kadar gula darah yang terjadi tetap berada dibawah kategori normal pada orang yang terdiagnosis DM (<200 mg/dl).

Nilai HbA1c Pasien DM Tipe 2

Salah satu parameter kontrol glikemik selain KGD sewaktu adalah HbA1c. Pengontrolan DM tipe 2 dengan pemeriksaan kadar HbA1c juga direkomendasikan oleh ADA (2020) sebagai patokan utama untuk pengendalian penyakit DM tipe 2 karena HbA1c dapat menggambarkan kadar glukosa darah dalam rentang waktu 1-3 bulan karena usia sel darah merah yang terikat oleh molekul glukosa adalah 120 hari (14).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nilai HbA1c rata-rata sebelum intervensi adalah $9,021 \pm 1,029\%$. Pengukuran HbA1c dilakukan hanya pada tahap sebelum intervensi dan setelah intervensi dengan rentang waktu pengukuran selama 3 bulan. Nilai HbA1c sebelum dan setelah intervensi dapat dilihat pada **Tabel 5**.

Tabel 4. Gambaran Kontrol Glikemik pada Pasien Setelah Intervensi

Kategori Target KGD sewaktu	Frekuensi (n=38)	Persentase (%)
Terkontrol (<180 mg/dl)	19	50
Tidak terkontrol (≥ 180 mg/dl)	19	50

Tabel 5. Nilai HbA1c pada Pasien DM Tipe 2 Sebelum dan Setelah Intervensi

Parameter outcome klinis	Sebelum Intervensi	Setelah Intervensi	Rata-rata Penurunan	Uji Wilcoxon (Asymp.Sig.)
Nilai HbA1c rata-rata (%)	$9,021 \pm 1,029$	$8,368 \pm 1,049$	$0,652 \pm 0,093$	$\alpha=0,000$

Tabel 6. Kriteria Target Pengontrolan HbA1c Pasien Setelah Intervensi

Kategori Kontrol HbA1c	Frekuensi (n=38)	Persentase (%)
Kontrol baik ($<7\%$)	0	0
Kontrol sedang ($7-9\%$)	31	81,6
Kontrol buruk ($>9\%$)	7	18,4

Berdasarkan uji *Wilcoxon Signed Rank* diperoleh nilai $\alpha < 0,05$ ($\alpha = 0,000$) sehingga disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai HbA1c rata-rata sebelum dan setelah intervensi dengan penurunan sebesar $0,652 \pm 0,093\%$. Hasil ini sejalan dengan studi meta analisis yang dilakukan oleh Yaghoubi et al., (2017) yang menyatakan bahwa dalam program intervensi apoteker jangka pendek (3-6 bulan) diperoleh rata-rata penurunan HbA1c dalam rentang 0,4-0,8% (22). Studi yang dilakukan oleh *United Kingdom Prospective DM Study* (UKPDS) menyatakan setiap penurunan HbA1c 1% akan menurunkan risiko komplikasi mikrovaskular sebanyak 37%, menurunkan kejadian infark miokard sebesar 14%, dan menurunkan risiko kematian sebesar 21%.

Penilaian HbA1c pada penderita DM digunakan untuk mengetahui komplikasi lebih dini dan menilai kepatuhan pengobatan dan pengontrolan oleh penderita DM. Kriteria target pengontrolan HbA1c pasien setelah intervensi dapat dilihat pada **Tabel 6**.

Berdasarkan **Tabel 6** terlihat bahwa setelah intervensi, mayoritas pasien memiliki kontrol HbA1c kategori sedang sebanyak 31 pasien (81,6%) diikuti dengan kontrol HbA1c kategori buruk sebanyak 7 pasien (18,4%). Penelitian ini menunjukkan pengaruh positif asuhan kefarmasian terhadap penurunan HbA1c pada pasien DM tipe 2. Namun, penelitian ini memiliki keterbatasan dalam jumlah subyek yang diikutsertakan dan rentang waktu intervensi.

Penderita DM tipe 2 pada umumnya masih belum menyadari akan pentingnya dilakukan pemeriksaan nilai HbA1c. Mereka berasumsi bahwa hanya dengan kadar gula darah <200 mg/dl sudah cukup aman untuk perkembangan terapi pengobatannya. Apoteker sebagai salah satu mitra kesehatan pasien memiliki tugas penting dalam mengedukasi dan memberikan informasi terkait pengendalian kadar gula darah mandiri, kontrol glikemik, dan kepatuhan minum obat antidiabetes. Studi yang dilakukan oleh Wang et al., (2012) mengungkapkan bahwa terdapat korelasi yang kuat antara kepatuhan pengobatan dengan nilai HbA1c ($p < 0,001$). Pasien dengan kepatuhan pengobatan yang lebih tinggi memiliki rasa peduli terhadap kondisi penyakit

mereka dan menyadari pentingnya kontrol HbA1c (23).

Ketidakpatuhan pasien dalam mengelola diabetes, membuat hasil pemeriksaan HbA1c lebih akurat dibanding pemeriksaan gula darah 2 jam post prandial atau puasa, karena banyak dari pasien yang menyatakan ketika akan kontrol ke fasilitas kesehatan, pasien tersebut selalu menjaga makanan yang dimakan, 2 hari sebelumnya melakukan olahraga, obat selalu diminum atau insulin disuntik selalu tepat waktu, dan tidak terjadi hipoglikemik, sehingga diperoleh hasil pemeriksaan gula darah normal, padahal jika tidak melakukan kontrol ke faskes, pasien menyatakan terkadang kembali lagi ke pola hidup yang tidak sehat. Kontrol HbA1c baik pada pasien DM mampu menjadi motivasi untuk selalu mengubah pola hidup ke arah yang lebih baik (24).

Kualitas Hidup Pasien DM Tipe 2

Kualitas hidup per dimensi dan level pasien DM tipe 2 sebelum intervensi dapat dilihat pada **Tabel 7**.

Berdasarkan **Tabel 7** diperoleh bahwa rata-rata skor indeks kualitas hidup pasien sebelum intervensi pada penelitian ini adalah $0,849 \pm 0,126$, lebih rendah dari yang dilaporkan untuk populasi umum di Indonesia yaitu pada nilai 0,91 dengan kategori kualitas hidup baik (25). Kategori kualitas hidup pasien DM tipe 2 sebelum intervensi disajikan pada **Tabel 8**.

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa tingkat kualitas hidup pasien sebelum intervensi didominasi oleh kategori kualitas hidup baik sebanyak 26 orang (68,42%) diikuti kategori kualitas hidup cukup sebanyak 11 orang (28,94%), dan kategori kualitas hidup buruk terjadi pada 1 orang (2,64%). Terdapat 1 pasien yang memiliki kualitas hidup rendah (skor indeks 0,414), dimana dimensi rasa cemas/ depresi dengan kategori bermasalah berat. Saat dilakukan wawancara sebelum intervensi, pasien mengalami depresi dan gangguan kecemasan yang berat terkait wabah virus corona (SARS-CoV-2) yang sedang melanda dunia. Diketahui bahwa DM merupakan salah satu penyakit tidak menular yang dilaporkan diderita oleh sebagian pasien Covid-19 selain hipertensi (26).

Kualitas hidup pasien pada tahap setelah intervensi disajikan pada **Tabel 9**. Terjadi perbaikan di tiap dimensi kualitas hidup hingga setelah dilakukan intervensi. Rata-rata skor indeks kualitas hidup setelah intervensi adalah $0,967 \pm 0,065$ dengan tingkat kualitas hidup baik. Hasil ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Butt et al., (2016) di Malaysia selama 6 bulan bahwa intervensi apoteker memberikan pengaruh yang besar terhadap peningkatan kualitas hidup pasien DM tipe 2 (6). Kategori kualitas hidup pasien pada tahap sebelum intervensi, follow up, hingga setelah dilakukan intervensi dapat dilihat pada **Tabel 10**.

Tabel 10 menunjukkan bahwa intervensi apoteker sangat berpengaruh terhadap perbaikan tingkat kualitas hidup pasien DM tipe 2 yang dapat dilihat dari hasil statistik uji *Friedman* dengan nilai signifikansi $\alpha < 0,05$ ($\alpha = 0,000$). Dimulai dari tahap sebelum intervensi dan selanjutnya apoteker melakukan follow up selama 3 bulan menunjukkan perbaikan kualitas

hidup yang signifikan. Hal ini dapat dilihat juga dari hasil statistik uji *Wilcoxon Signed Rank* pada sebelum intervensi dengan *follow up I*, *follow up I* dengan *follow up II*, *follow up II* dengan setelah intervensi, dan sebelum dengan setelah intervensi, diperoleh nilai signifikansi $\alpha < 0,05$ ($\alpha = 0,000$).

Berdasarkan hasil tersebut disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara rata-rata indeks kualitas hidup pasien sebelum dan setelah intervensi. Ada beberapa hal yang menyebabkan kualitas hidup pasien DM mengalami peningkatan pada penelitian ini, seperti faktor pasien yang patuh terhadap pengobatannya yang telah diberikan konseling, informasi, dan edukasi serta dikontrol mulai dari kepatuhan penggunaan obat terkait regimen terapi, kesadaran pasien untuk hidup sehat, dan meningkatnya aktivitas fisik serta olahraga pada kesehariannya, dan kepatuhan akan pola makan yang sehat pada pasien DM tipe 2.

Tabel 7. Kualitas Hidup Pasien DM Tipe 2 Sebelum Intervensi

Jumlah Pasien	Dimensi						Skor (nilai indeks per pasien)
	Mobilitas/berjalan	Perawatan diri	Kegiatan yang biasa dilakukan	Rasa sakit/tidak nyaman	Rasa cemas/depresi		
11	1	1	1	1	1	1	1,000
11	1	1	1	1	2	0,848	
1	1	1	1	1	3	0,414	
2	1	1	1	2	1	0,796	
2	1	1	1	2	2	0,725	
1	1	1	2	2	2	0,689	
4	2	1	1	1	1	0,850	
2	2	1	1	1	2	0,779	
3	2	1	1	2	1	0,727	
1	2	1	1	2	2	0,656	
Total (n=38)		Rata-rata skor = $0,849 \pm 0,126$					

Tabel 8. Kategori Kualitas Hidup Pasien DM Tipe 2 Sebelum Intervensi

Kategori Kualitas Hidup	Sebelum Intervensi	
	(n=38)	(%)
Baik	26	68,42
Cukup	11	28,94
Buruk	1	2,64

Tabel 9. Kualitas Hidup Pasien DM Tipe 2 Setelah Intervensi

Jumlah Pasien	Dimensi					Skor (nilai indeks per pasien)
	Mobilitas/ berjalan	Perawatan diri	Kegiatan yang biasa dilakukan	Rasa sakit/ tidak nyaman	Rasa cemas/ depresi	
30	1	1	1	1	1	1,000
5	1	1	1	1	2	0,848
1	1	1	1	2	1	0,796
2	2	1	1	2	1	0,850
Total (n=38)					Rata-rata skor = 0,967 ± 0,065	

Tabel 10. Kategori Kualitas Hidup Pasien DM Tipe 2 pada Tahap Sebelum Intervensi, *Follow Up*, dan Setelah Intervensi

Penilaian	Kategori Kualitas Hidup			Uji Wilcoxon (Asymp. Sig.)	Uji Friedman (Asymp. Sig.)
	Rendah	Sedang	Tinggi		
	Jumlah (%)	Jumlah (%)	Jumlah (%)		
Sebelum intervensi	1 (2,6)	11 (28,9)	26 (68,4)		
<i>Follow up I</i>	1 (2,6)	23 (60,5)	14 (36,8)	α=0,048	
<i>Follow up I</i>	1 (2,6)	23 (60,5)	14 (36,8)		
<i>Follow up II</i>	0 (0)	12 (31,6)	26 (68,4)	α=0,000	
<i>Follow up II</i>	0 (0)	12 (31,6)	26 (68,4)		α=0,000
Setelah intervensi	0 (0)	1 (2,6)	37 (97,4)	α=0,000	
Sebelum intervensi	1 (2,6)	11 (28,9)	26 (68,4)		
Setelah intervensi	0 (0)	1 (2,6)	37 (97,4)	α=0,000	

Apoteker sebagai salah satu mitra kesehatan pasien DM tipe 2 memiliki tugas dan tanggungjawab penuh terhadap outcome klinis dan kualitas hidup pasien. Selama periode penelitian, pasien diberi edukasi dan konseling terkait regimen terapi, efektivitas pengobatan, pola hidup sehat dan aktivitas fisik, serta kepatuhan dalam meminum obat menjadi pilar utama dalam meningkatkan kualitas hidup pasien. Asuhan kefarmasian yang dilakukan apoteker telah memberikan perubahan parameter outcome terapi kearah yang lebih baik dan perlu terus disosialisasikan, karena pada hakikatnya tujuan pengobatan bukan hanya menyembuhkan pasien tetapi juga mengembalikan pasien menjadi orang normal seperti sebelum menderita suatu penyakit (27).

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa penerapan asuhan kefarmasian berpengaruh terhadap peningkatan *outcome* klinis dan kualitas pasien DM tipe 2 di Apotek. Intervensi yang diberikan apoteker pada penelitian ini berupa edukasi dan konseling kepada pasien DM tipe 2.

Referensi

1. World Health Organization. Global Report on Diabetes. ISBN [Internet]. 2016;978:88. Available from: http://www.who.int/about/licensing/%5Cnhttp://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf
2. World Health Organization. Diabetes Mellitus. Fact Sheet N°138. WHO, Geneva. 2018. Available from: <http://www.who.int/m>

- ediacentre/factsheets/fs138/fr/
3. International Diabetes Federation. Diabetes Atlas. Ninth Edition. 2019. Available from: <http://www.diabetesatlas.org>.
 4. Kemenkes RI. Hasil Utama Riset Kesehatan Dasar (Risokesdas). 2018.
 5. Mourão AOM, Ferreira WR, Martins MAP, Reis AMM, Carrillo MRG, Guimarães AG, et al. Pharmaceutical care program for type 2 diabetes patients in Brazil: A randomised controlled trial. *Int J Clin Pharm.* 2013;35(1):79–86.
 6. Butt M, Mhd Ali A, Bakry MM, Mustafa N. Impact of a pharmacist led diabetes mellitus intervention on HbA1c, medication adherence and quality of life: A randomised controlled study. *Saudi Pharm J* [Internet]. 2016;24(1):40–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jps.2015.02.023>
 7. Onyebuchi OB, Chukwuemeka EC, Udoka E, Cyriacus OA. Pharmaceutical Care Documentation in Two Tertiary. *World J Pharm Pharm Sci.* 2015;4(02):53–62.
 8. Borg WR, Meredith D, and Gall JP. (2007). Education Research. New York: Pearson Education, Inc. Page 176.
 9. Gay LR, Geoffrey E, Mills, and Peter A. (2009). Educational Research, Competencies for Analysis and Application. New Jersey: Pearson Education, Inc. Page 133.
 10. Cardoso AF. Assessment of Health-Related Quality of Life using the EQ-5D-3L in Individuals with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes, Metab Disord Control.* 2016;3(2):33–40. <https://doi.org/10.15406/jdmc.2016.03.0064>
 11. Nasution A, Simbolon R, Tanjung HR. Characteristics, Antihyperglycemics Utilization, and Quality of Life in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Admitted to a Primary Health Center. *Indones J Pharm Clin Res.* 2018;1(1):1–10. <https://doi.org/10.32734/idjpcr.v1i1.203>
 12. Syarifuddin S, Nasution A, Dalimunthe A, Khairunnisa. Impact of pharmacist intervention on improving the quality of life of patients with type 2 diabetes mellitus. *Open Access Maced J Med Sci.* 2019;7(8):1401–5. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.140>
 13. Sihombing YR, Nasution A, Harun RR. Economic impact of counseling on the management of patients with type 2 diabetes mellitus admitted to a hospital. *Asian J Pharm Clin Res.* 2018;11(Special Issue 1):94–6. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11s1.26577>
 14. Care M. Disclosures: Standards of Medical Care in Diabetes-2020. *Diabetes Care.* 2020;43(January):S205–6.
 15. Soegondo S. Diagnosis dan Klasifikasi Diabetes Melitus Terkini dalam: Soegondo, S., Soewondo, P., Subekti, I., Editor. Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu bagi dokter maupun edukator diabetes. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2011.
 16. Irene GY, Kuswinarti K, Kusumawati M. Understanding Patients with Type 2 Diabetes Mellitus Using Oral Antidiabetic Drugs. *J Med Heal.* 2020;2(5):61–75. <https://doi.org/10.28932/jmh.v2i5.1110>
 17. Wijaya IN, Faturrohmah A, Agustin WW, Soesanto TG, Kartika D, Prasasti H. Profil kepatuhan pasien diabetes melitus Puskesmas wilayah Surabaya Timur dalam menggunakan obat dengan metode pill count. *J Farm Komunitas* [Internet]. 2015;2(1):18–22. Available from: <http://journal.unair.ac.id/download-fullpapers-jfkb5969c2ab7full.pdf>
 18. Akin S, Böyük C. Prevalence of comorbidities in patients with type-2 diabetes mellitus. *Prim Care Diabetes.* 2020;14(5):431–4. <https://doi.org/10.1016/j.pcd.2019.12.006>
 19. Dipiro JT, Talbert RL, Yee GC, Matzke GR, Wells BG, and Posey LM. Pharmacotherapy: a Pathophysiologic Approach. 11th Edition. USA: Mc GrawHill. 2020.
 20. Farsaei S, Sabzghabaee AM, Zargarzadeh AH, Amini M. Effect of pharmacist-led patient education on glycemic control of type 2 diabetics: A randomized controlled trial. *J Res*

- Med Sci. 2011;16(1):43–9.
21. Ali M, Schifano F, Robinson P, Phillips G, Doherty L, Melnick P, et al. Impact of community pharmacy diabetes monitoring and education programme on diabetes management: A randomized controlled study. *Diabet Med.* 2012;29(9):326–33. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03725.x>
22. Yaghoubi M, Mansell K, Vatanparast H, Steeves M, Zeng W, Farag M. Effects of Pharmacy-Based Interventions on the Control and Management of Diabetes in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Can J Diabetes* [Internet]. 2017;41(6):628–41. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2017.09.014>
23. Wang Y, Lee J, Toh MPH, Tang WE, Ko Y. Validity and reliability of a self-reported measure of medication adherence in patients with Type2 diabetes mellitus in Singapore. *Diabet Med.* 2012;29(9):338–44. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2012.03733.x>
24. Suyono. Penatalaksanaan Diabetes Melitus Terpadu. Jakarta: Penerbit Fakultas Kedokteran UI. 2007.
25. Purba FD, Hunfeld JAM, Iskandarsyah A, Fitriana TS, Sadarjoen SS, Ramos-Goñi JM, et al. The Indonesian EQ-5D-5L Value Set. *Pharmacoeconomics.* 2017;35(11):1153–65. <https://doi.org/10.1007/s40273-017-0538-9>
26. Lei F, George K, Roth M. Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *Lancet* [Internet]. 20AD;8(April):e21. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30116-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30116-8)
27. Syaripuddin M. Peranan Pharmaceutical Care dalam Meningkatkan Hasil Klinis dan Kualitas Hidup Pasien Penderita Diabetes Melitus. *Pus Teknol Interv Kesehat Masy.* 2013;3.2.2013(7):52–9.

Pengaruh Antioksidan dan Kombinasi Pengawet terhadap Stabilitas Ekstrak Cair NADES Biji Kopi Hijau

Delly Ramadon¹, Rosalina Mesusi Septiani², Salsabila Nursyifa Putri²,
Abdul Mun'im^{2*}

Artikel Penelitian

Abstract: Green coffee beans (*Coffea canephora Pierre ex A. Froehner*) contain caffeine and chlorogenic acid which are beneficial for health. These two main ingredients can be extracted using Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) in combination with the Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) method which is environmentally friendly. NADES can be used for extracting green coffee beans, but the solvent cannot be evaporated, thus the result is a liquid extract. During storage, liquid extracts are susceptible to oxidation and bacterial growth so that they can disrupt physical, chemical, and microbiological stabilities. In this study, butylated hydroxytoluene (BHT) was added as a synthetic antioxidant and a combination of methylparaben-propylparaben as preservative to determine its effect on the physical, chemical, and microbiological stability of the NADES liquid extract of green coffee beans, as well as to determine the best storage temperature. The concentrations of BHT added in this study were 10, 20, and 30 ppm. The concentration of the methyl paraben:propyl paraben combination added was 110:55 ppm, 100:50 ppm, and 90:45 ppm. Each extract was stored at storage temperatures of -20°C ± 5°C, 5°C ± 3°C, and 30°C ± 2°C for 54 days. The results showed that the liquid extract added with 30 ppm BHT concentration and a combination of preservatives with a concentration of 110:55 ppm and stored at a storage with the temperature of -20°C ± 5°C which had the best physical, chemical, and microbiological stability. This shows that the addition of BHT and a combination of preservatives can increase the stability of the green coffee bean NADES extract.

Keywords: green coffee beans, BHT, methylparaben, NADES, propylparaben, stability

Abstrak: Biji kopi hijau (*Coffea canephora Pierre ex A. Froehner*) mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang bermanfaat bagi kesehatan. Dua kandungan utama tersebut dapat diekstraksi menggunakan pelarut *Natural Deep Eutectic Solvents* (NADES) yang dikombinasikan dengan metode Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) yang bersifat ramah lingkungan. NADES dapat digunakan untuk mengekstraksi biji kopi hijau, namun pelarutnya tidak dapat diuapkan sehingga hasil akhir yang didapatkan berupa ekstrak cair. Ekstrak cair selama penyimpanan rentan mengalami oksidasi dan pertumbuhan bakteri sehingga dapat mengganggu stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi. Pada penelitian ini, dilakukan penambahan butil hidroksi toluen (BHT) sebagai antioksidan sintetik dan kombinasi metil paraben-propil paraben sebagai pengawet untuk mengetahui pengaruhnya terhadap stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi ekstrak cair NADES biji kopi hijau, serta untuk mengetahui suhu penyimpanan yang paling optimal. Konsentrasi BHT yang ditambahkan pada penelitian ini adalah 10, 20, dan 30 ppm. Konsentrasi kombinasi metil paraben:propil paraben yang ditambahkan adalah 110:55 ppm, 100:50 ppm, dan 90:45 ppm. Masing-masing ekstrak disimpan pada suhu penyimpanan -20°C ± 5°C, 5°C ± 3°C, dan 30°C ± 2°C selama 54 hari. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak cair yang ditambahkan BHT konsentrasi 30 ppm dan kombinasi pengawet konsentrasi 110:55 ppm serta disimpan pada suhu penyimpanan -20°C ± 5°C memiliki stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi paling optimal. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan BHT dan kombinasi pengawet dapat meningkatkan stabilitas ekstrak NADES biji kopi hijau.

Kata kunci: biji kopi hijau, BHT, metil paraben, NADES, propil paraben, stabilitas.

¹Laboratorium Farmasetika dan Teknologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Kampus UI Depok, 16424, Jawa Barat

²Laboratorium Farmakognosi dan Fitokimia, Fakultas Farmasi Universitas Indonesia, Kampus UI Depok, 16424, Jawa Barat

Korespondensi:

Abdul Mun'im
munim@farmasi.ui.ac.id

Pendahuluan

Dua jenis kopi yang memiliki tingkat produksi tinggi adalah kopi arabika dan kopi robusta. Pada biji kopi hijau terdapat dua senyawa utama, yaitu asam klorogenat dan kafein. Kopi robusta mengandung senyawa asam klorogenat dan kafein lebih tinggi dibandingkan kopi arabika. Senyawa kafein dalam kopi hijau berfungsi menstimulasi sistem saraf pusat (1,2). Konsumsi kafein umumnya dikaitkan dengan peningkatan kewaspadaan, kinerja fisik, kapasitas belajar, dan membuat suasana hati yang lebih baik (1). Kemudian terdapat penelitian lain yang juga menunjukkan adanya efek antioksidan, antimikroba, dan antihiperlipidemik pada senyawa kafein (3). Asam klorogenat merupakan salah satu polifenol yang paling banyak terkandung dalam biji kopi hijau yang memiliki aktivitas pada antioksidan, antidiabetes, pengelolaan obesitas, dan antihipertensi (2).

Penggunaan NADES telah terbukti dalam ekstraksi senyawa fenolik dan alkaloid (4,5). Ekstrak yang diperoleh bersifat aman untuk diaplikasikan dalam bidang farmasi, kosmetik, dan industri makanan karena menggunakan pelarut yang merupakan eksipien dalam sediaan farmasi. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Yuniarti dkk pada tahun 2019 telah berhasil mengoptimasi metode ekstraksi senyawa bioaktif dari biji kopi hijau (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) menggunakan pelarut NADES yang terdiri dari campuran kolin klorida dan sorbitol dengan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE). NADES merupakan pelarut yang sulit untuk diuapkan, namun salah satu keuntungan dari pelarut NADES adalah sifatnya yang aman untuk dikonsumsi sehingga ekstrak cair yang dihasilkan tidak memerlukan penguapan pelarut (6).

Namun demikian, ekstrak cair rentan terhadap pertumbuhan mikroba seperti bakteri, terutama apabila terdapat kandungan air di dalamnya (7). Pertumbuhan bakteri dapat mengganggu stabilitas ekstrak dan memengaruhi kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak tersebut (8,9). Konstituen yang terkandung dalam tanaman dapat dimetabolisme oleh bakteri sehingga menyebabkan terjadinya degradasi terhadap konstituen yang terkandung dalam tanaman tersebut (10). Selain itu, mikroba dapat

mengubah karakteristik fisikokimia berupa warna, bau, dan pH dari suatu ekstrak yang menyebabkan terjadinya perubahan yang merugikan pada kualitas ekstrak (10). Selain itu, antioksidan alami yang terkandung dalam ekstrak, yaitu asam klorogenat cukup rentan terhadap oksidasi dan degradasi selama penyimpanan karena senyawa tersebut memiliki sensitivitas tinggi terhadap kondisi lingkungan (11). Oleh karena itu, laju oksidasi dan degradasi harus diminimalkan untuk meningkatkan stabilitas dan menghindari kehilangan kandungan zat aktif serta aktivitas farmakologisnya. Ekstrak cair yang stabil diperlukan untuk hasil analisis yang tepat sebab ekstrak cair rentan terhadap oksidasi yang dipicu oleh adanya udara, panas, dan cahaya (11, 12). Reaksi oksidasi akan menghasilkan radikal bebas yang dapat mengoksidasi zat aktif, mempengaruhi rasa, bau, warna, dan mengurangi *shelf-life* (umur simpan) (12,13, 14).

Salah satu upaya yang dapat dilakukan untuk menjaga stabilitas ekstrak yang berhubungan dengan adanya pertumbuhan mikroba adalah dengan menambahkan pengawet (10). Pengawet yang ditambahkan adalah kombinasi metil paraben dan propil paraben. Kombinasi keduanya dapat memberikan efek antimikroba yang lebih baik (13). Metil paraben dan propil paraben banyak digunakan karena toksisitasnya yang rendah, memiliki aktivitas spektrum yang luas, harganya terjangkau, serta memiliki stabilitas kimiawi yang sangat baik (15). Kemudian, untuk oksidasi dapat dihambat dengan menggunakan antioksidan. Secara bersamaan, perlindungan dari suhu, udara, dan cahaya (13, 14). BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) merupakan antioksidan sintetik yang dapat mempertahankan kualitas bahan secara keseluruhan dengan melindungi zat aktif, memperlambat kerusakan, ketengikan, dan perubahan warna yang disebabkan oksidasi (13). Pada penelitian yang dilakukan Obzansky (1989) dan Türkyilmaz (2015) telah menggunakan BHT sebagai antioksidan sintetik dalam larutan dan efektif pada konsentrasi rendah sehingga ideal digunakan sebagai antioksidan pada larutan. Salah satu studi menunjukkan bahwa BHT dalam ekstrak daun *Mesembryanthemum crystallinum* memiliki aktivitas sebagai antioksidan (16). BHT telah umum digunakan di berbagai bidang

industri, seperti farmasi, makanan, dan kosmetik (17). BHT juga umum digunakan karena memiliki efektivitas yang tinggi, ketersediaannya yang luas, dan harganya yang tidak mahal (13).

Uji stabilitas secara umum bertujuan untuk membuktikan mengenai kualitas zat aktif atau produk jadi yang disimpan di bawah pengaruh berbagai faktor lingkungan seperti suhu, kelembaban, dan cahaya dalam rentang waktu tertentu serta untuk menentukan umur simpan dari produk jadi dan memberikan rekomendasi kondisi penyimpanan yang paling baik. Uji stabilitas produk obat herbal mengacu pada pedoman pengujian stabilitas zat aktif yang telah ada dan produk jadi (18). Namun, terdapat beberapa pengecualian untuk uji stabilitas obat herbal, seperti pengujian pada kondisi penyimpanan dipercepat atau pada kondisi penyimpanan *intermediate* dapat diabaikan untuk *herbal substances* atau *herbal preparations*, jika kondisi penyimpanan di bawah 25°C dapat diberi label dengan jelas. Stress testing biasanya dianggap tidak perlu untuk *herbal substances* atau *herbal preparations* kecuali jika menurut penilaian toksikologi perlu dilakukan (19). Pada pengujian stabilitas dari obat herbal, frekuensi pengujian dapat dikurangi dan disesuaikan (18).

Oleh karena itu, BHT sebagai antioksidan sintetik perlu ditambahkan ke dalam ekstrak cair untuk meningkatkan stabilitas fisik dan kimia dari ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Selain itu, dilakukan juga percobaan lain berupa penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet untuk meningkatkan stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi dari ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik terhadap stabilitas kimia dan fisik ekstrak cair NADES biji kopi hijau serta pengaruh penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet terhadap stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi ekstrak cair NADES biji kopi hijau pada suhu penyimpanan tertentu.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah biji kopi hijau robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang diperoleh dari

kabupaten Lampung Barat, standar asam klorogenat (*Chengdu Biopurify Phytochemicals*), standar kafein (*Chengdu Biopurify Phytochemicals*), kolin klorida (Rongsheng-BioTech. Xi'an, China), D-Sorbitol (Neosorb P 60 W, PT. Barentsz), asetonitril HPLC grade (Merck, Jerman), metanol HPLC grade (Merck, Jerman), asam asetat (Merck, Jerman), etanol *food grade* 96% (Brataco, Indonesia), *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) (Subur Kimia Jaya, Indonesia), metil paraben (Brataco, Indonesia), propil paraben (Brataco, Indonesia), aqua pro injeksi (PT. Ikapharmindi Putramas, Indonesia), dan aquades (Brataco, Indonesia), dan larutan NaCl 0,9% (PT Widatra Bhakti, Indonesia).

Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan antara lain, *Ultrasound-assisted Extraction* (UAE) (Krisbow, China), alat sentrifugasi, KCKT (Agilent 1200 Infinity High Performance Autosampler) yang dilengkapi dengan kolom C-18 Inertsil ODS 3,5 mm (4,6 mm x 150 mm; GI Sciences, Tokyo, Japan), detektor UV-Vis (Agilent 1200 Infinity High Performance Autosampler), kertas saring millipore 0,45 mm (Merck, Jerman), Pipet mikro (Socorex, Swiss), timbangan mikro (Mettler Toledo), 3M *petrifilm aerobic count plate* (Sigma Aldrich), pH meter (Hanna HI 8424), kulkas, *freezer*, *blender* (Miyako), *hotplate* dan *magnetic stirrer* (IKA® C-MAG HS7).

Metode

Penyiapan Bahan Uji

Simplisia biji kopi hijau diserbukkan menggunakan *blender* dan disaring menggunakan penyaring ukuran 40/80 mesh. Hasil serbuk kopi yang telah didapatkan kemudian disimpan pada suhu ruangan di dalam botol tertutup rapat (20, 21).

Ekstraksi Biji Kopi Hijau

Sebanyak 1 g serbuk biji kopi hijau ditimbang kemudian dilarutkan dalam 30 mL larutan NADES. Larutan tersebut kemudian diekstraksi menggunakan UAE selama 60 menit. Hasil ekstraksi disentrifugasi dengan kecepatan putar sebesar 4500 rpm selama 17 menit (21).

Rancangan Variasi Konsentrasi dan Suhu Penyimpanan

Pada penelitian ini terdiri dari dua percobaan. Percobaan pertama, yaitu ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan BHT dengan konsentrasi 10, 20, dan 30 ppm yang secara berturut-turut merupakan ekstrak A, B, C, dan ekstrak tanpa penambahan BHT, yaitu ekstrak D. Kemudian, percobaan kedua, yaitu ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan kombinasi metil paraben:propil paraben dengan konsentrasi 110:55 ppm, 100:50 ppm, dan 90:45 ppm yang secara berturut-turut merupakan ekstrak W, X, Y, dan ekstrak tanpa penambahan pengawet, yaitu ekstrak Z. Masing-masing ekstrak disimpan pada vial kaca tertutup rapat pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (kondisi umum), $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (refrigerator) dan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (freezer) (18). Kemudian masing-masing ekstrak diuji stabilitasnya selama 54 hari pada hari ke-0, 4, 8, 18, 36, dan 54 (22).

Uji Stabilitas Fisik

Pengujian stabilitas fisik dilakukan dengan mengamati bau, warna, homogenitas, dan pengukuran pH dari masing-masing ekstrak (23). Pengujian warna dicocokan dengan *Pantone color chart* (24). Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter (23).

Uji Stabilitas Kimia

Pengujian stabilitas kimia dilakukan dengan melihat kadar asam klorogenat dan kafein dari masing-masing ekstrak. Analisis kuantitatif asam klorogenat dan kafein dilakukan dengan cara larutan sampel dipipet sebanyak 0,4 mL kemudian dilarutkan dengan aqua bidestilata hingga 10 mL. Campuran tersebut dikocok hingga homogen dan difiltrasi menggunakan membran mikropori 0,45 μm . Setelah itu, diambil 20 μL dan diinjeksikan ke kolom KCKT dengan fase gerak

gradien yang ditunjukkan pada **Tabel 1**. Asam klorogenat diukur pada panjang gelombang 326 nm dan kafein diukur pada panjang gelombang 272 nm (21).

Uji Stabilitas Mikrobiologi

Pengujian stabilitas mikrobiologi dilakukan dengan metode uji angka lempeng total (23). Uji ALT dilakukan dengan cara melakukan pengenceran sampel ke dalam 9 mL larutan NaCl 0,9% dalam tabung reaksi sehingga didapatkan pengenceran 10^{-1} . Dari pengenceran 10^{-1} dipipet 1 mL ke dalam larutan NaCl 0,9% sehingga didapatkan pengenceran 10^{-2} kemudian dari pengenceran 10^{-2} dipipet 1 mL ke dalam larutan NaCl 0,9% sehingga didapatkan pengenceran 10^{-3} . Dari setiap pengenceran dipipet 1 mL ke dalam 3M *petrifilm aerobic count plates* dan dibuat duplo kemudian diratakan dengan menggunakan *spreader agar* suspensi tersebar merata. Petrifilm diinkubasi pada suhu 35-37°C selama 24 jam kemudian jumlah koloni yang tumbuh pada petrifilm dihitung. Uji stabilitas mikrobiologi hanya dilakukan pada ekstrak W, X, Y, dan Z.

Validasi Metode Analisis

Uji kesesuaian sistem dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan standar kafein dan asam klorogenat konsentrasi 20 ppm sebanyak 6 kali pengulangan. Lalu parameter yang dilihat adalah jumlah plat teoritis, *tailing factor*, dan %RSD waktu retensi dari kromatogram standar kafein dan asam klorogenat yang didapat (25, 26). Uji linearitas dilakukan dengan dengan cara menginjeksikan larutan standar kafein dan asam klorogenat konsentrasi 10-50 ppm (20). Lalu dibuat kurva kalibrasi sehingga didapatkan persamaan regresi linear $y = a + bx$ dan nilai r (koefisien korelasi) (20, 27).

Tabel 1. Komposisi fase gerak dan waktu yang digunakan.

Lama Waktu (menit)	Pelarut Gradien	
	0,1% asam asetat (pelarut X)	Asetonitril (pelarut Y)
20	90%	10%
10	80%	20%
5	90%	10%

Uji presisi dan akurasi dilakukan secara *inter-day* dan *intra-day*. Persisi dinyatakan sebagai simpangan baku relatif atau koefisien variasi (%KV) (28). Akurasi dapat dilihat berdasarkan hasil uji perolehan kembali (%UPK). Uji akurasi dilakukan dengan metode adisi (29). Preparasi sampel tanpa spike dilakukan dengan cara 0,5 g serbuk biji kopi hijau ditimbang, kemudian diekstraksi menggunakan NADES kolin klorida-sorbitol (4:1) selama 10 menit menggunakan UAE dengan perbandingan pelarut sampel 30:1 mL/g (21). Pembuatan sampel spike dilakukan dengan penambahan masing-masing 3 konsentrasi larutan standar kafein dan asam klorogenat, yaitu 50, 25, dan 12,5 ppm ke dalam ekstrak cair NADES biji kopi hijau dan masing-masing konsentrasi dianalisis sebanyak 3 kali pengulangan (26, 27). Kemudian pada masing-masing larutan sampel dipipet sebanyak 0,4 mL dan dilarutkan dalam aquades bidestilata hingga batas labu ukur 10,0 mL. Lalu disaring menggunakan membran mikropori 0,45 µm dan dianalisis kadar kafein dan asam klorogenat (21).

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ) dapat dihitung secara statistik dengan garis regresi linear kurva kalibrasi (28).

Hasil dan Diskusi

Penelitian ini menggunakan bahan uji berupa biji kopi hijau (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) yang dibeli dari kabupaten Lampung Barat, hal ini dikarenakan kopi robusta mengandung senyawa kafein dan asam klorogenat yang lebih tinggi dibandingkan jenis kopi arabika (1, 30). Pada penelitian ini menggunakan biji kopi hijau yang diperoleh tanpa melalui proses pemanggangan (2). Penggunaan biji kopi hijau bertujuan agar kandungan asam klorogenat yang bersifat termolabil dapat terjaga. Sedangkan kafein bersifat termostabil membuat senyawa ini tidak rusak akibat pemanggangan biji kopi (2, 31). Oleh karena itu, dengan menggunakan biji kopi hijau, kedua kandungan tersebut dapat diperoleh secara optimal.

Penyiapan bahan uji dalam penelitian ini dilakukan dengan cara, menyerbukan simplisia biji kopi hijau robusta menggunakan *blender* agar mendapatkan serbuk halus biji kopi hijau robusta. Pengecilan ukuran simplisia sebelum proses

ekstraksi bertujuan agar dapat memaksimalkan proses transfer senyawa yang terkandung dalam tanaman ke pelarut yang digunakan (32). Kemudian, biji kopi yang telah diserbukkan disimpan dalam wadah tertutup rapat.

Proses ekstraksi biji kopi hijau robusta dengan NADES sebagai pelarut menggunakan metode UAE telah dioptimasi sebelumnya oleh Yuniarti *et al.*, (2019). Pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi biji kopi hijau robusta dalam penelitian ini adalah NADES berbasis kolin klorida dan sorbitol dengan perbandingan molar 4:1. NADES merupakan suatu pelarut yang terdiri dari campuran *hydrogen bond acceptor* (HBA) dan *hydrogen bond donor* (HBD) dengan perbandingan molar tertentu yang mampu berinteraksi melalui ikatan hidrogen sehingga dapat membentuk campuran eutektik dengan titik lebur lebih rendah dari masing-masing komponen penyusunnya sehingga hasil akhir yang didapatkan berupa cairan jernih (6, 33, 34). Penambahan air pada proses pembuatan NADES bertujuan untuk mengurangi viskositas dari NADES karena pada viskositas yang tinggi dapat mengurangi efisiensi pada proses eksstraksi (6). Namun, harus diperhatikan penambahan air agar tidak melebihi batas 50% (v/v) karena pengenceran air yang berlebihan dapat mengganggu ikatan hidrogen dalam NADES dan melemahkan interaksi antara NADES dengan senyawa bioaktif yang diinginkan (6, 35).

Penggunaan NADES sebagai pelarut untuk mengekstraksi senyawa bioaktif yang terdapat dalam biji kopi hijau dikombinasikan dengan penggunaan *ultrasound assisted extraction* (UAE). Penggunaan UAE dalam proses ekstraksi bertujuan untuk mengurangi penggunaan energi dan telah diakui dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi (36). Penggunaan UAE dapat meningkatkan efisiensi proses ekstraksi karena adanya gelombang ultrasonik yang menyebabkan terbentuknya gelembung kavitasi dalam pelarut NADES dan dapat menyebabkan terjadinya kerusakan pada dinding sel tanaman sehingga terjadi pelepasan dan kontak langsung antara senyawa di dalam sel dengan pelarut (37).

Sebelum dilakukan penetapan kadar sampel dalam ekstrak menggunakan HPLC, dilakukan validasi metode analisis terlebih

dahulu. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan bahwa semua parameter berada dalam rentang persyaratan penerimaannya yang tertulis pada **Tabel 2** sehingga dapat disimpulkan metode analisis yang digunakan memenuhi persyaratan untuk uji kesesuaian sistem (26). Pada parameter linearitas diperoleh persamaan regresi linear untuk standar kafein adalah $y = 67,178x - 93,573$ dengan nilai r sebesar 0,9999 dan untuk asam klorogenat diperoleh persamaan regresi linear $y = 50,289x - 203,14$ dengan nilai r sebesar 0,9965. Hasil koefisien korelasi (r) dari kafein dan asam klorogenat dapat diterima dikarenakan memenuhi persyaratan koefisien korelasi, yaitu nilai r >0,99 (29). Berdasarkan hasil uji presisi dan akurasi yang dilakukan secara *intraday* dan *interday* diperoleh koefisien variasi ≤ 2% dan nilai %UPK pada rentang 98-102% sehingga nilai presisi dan akurasi untuk kafein dan asam

klorogenat memenuhi syarat keberterimaan (28). Hasil %KV dan %UPK kafein dan asam klorogenat ditunjukkan pada **Tabel 3**. Pada penelitian ini diperoleh nilai LOD kafein dan asam klorogenat berturut-turut adalah 0,62 ppm dan 4,57 ppm, untuk nilai LOQ kafein dan asam klorogenat berturut-turut adalah 2,08 ppm dan 15,25 ppm.

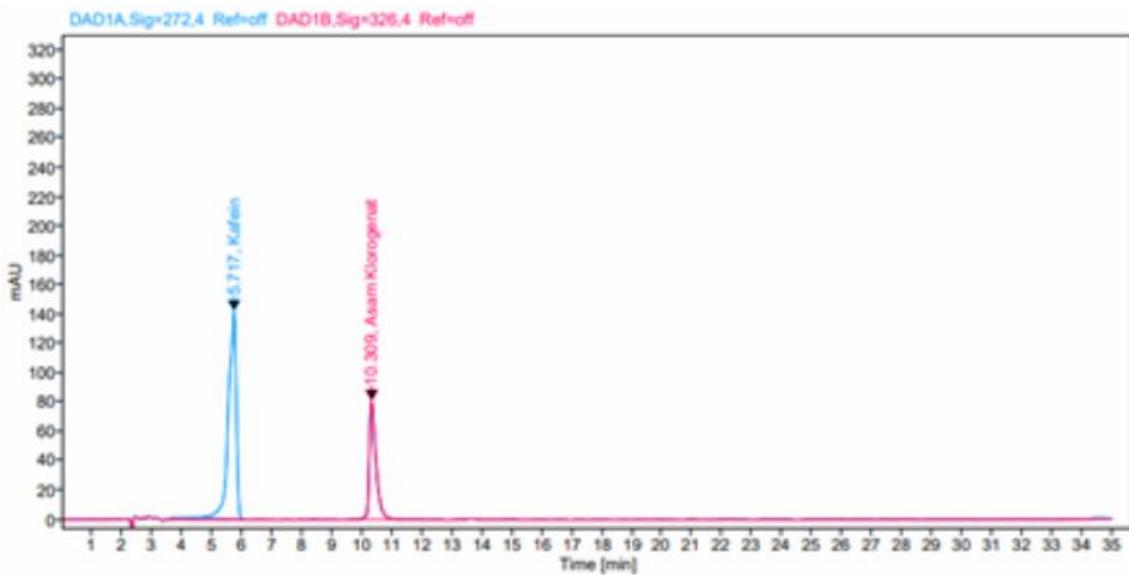
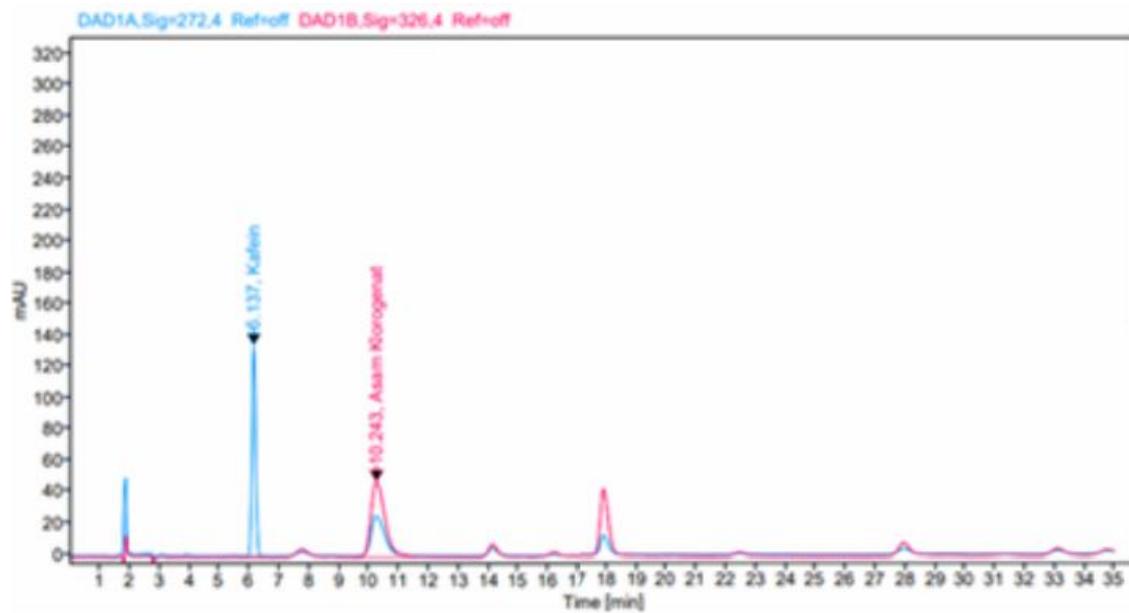
Setelah dilakukan validasi metode analisis, dilanjutkan dengan evaluasi awal untuk ekstrak cair NADES biji kopi hijau. Evaluasi awal pada hari ke-0 dilakukan pada masing-masing ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z. Masing-masing ekstrak dievaluasi organoleptis, homogenitas, pH, dan penetapan kadar kafein serta asam klorogenatnya. Kemudian untuk ekstrak W, X, Y, dan Z terdapat uji tambahan yang dilakukan, yaitu evaluasi mikrobiologi.

Tabel 2. Uji kesesuaian sistem standar kafein dan asam klorogenat.

Standar	Plat teoritis (N) (Rata-rata ± SD)	Tailing Factor (Tf) (Rata-rata ± SD)	%RSD Waktu retensi (%RSD ± SD)	Kesimpulan
Syarat keberterimaan	N > 2000	Tf ≤ 2,0	%RSD < 1,0	Dapat diterima
Kafein	14915,49 ± 1603,35	0,65 ± 0,03	0,75 ± 0,04	Dapat diterima
Asam Klorogenat	71346,89 ± 16769,98	1,39 ± 0,24	0,78 ± 0,08	Dapat diterima

Tabel 3. Hasil koefisien variasi (%KV) dan perolehan kembali (%UPK) kafein dan asam klorogenat.

Analit	Konsentrasi (ppm)	<i>Intra-Day</i>		<i>Inter-Day</i>	
		KV (%)	UPK (%)	KV (%)	UPK (%)
Kafein	12,5	0,23	100,71	0,32	100,53
	25	0,16	99,34	0,35	99,38
	50	0,37	100,33	0,43	99,92
Asam Klorogenat	12,5	0,11	99,72	0,21	101,07
	25	0,23	100,30	0,25	99,54
	50	0,35	100,34	0,47	100,04

a)**b)**

Gambar 1. Kromatogram standar kafein dan asam klorogenat (a) dan sampel uji (b)

Tujuan evaluasi awal, yaitu untuk membandingkan parameter-parameter tersebut sebelum dan sesudah dilakukan uji kestabilan untuk mengetahui stabilitas dari masing-masing ekstrak selama penyimpanan. Hasil evaluasi awal untuk kedelapan ekstrak yaitu memiliki warna, bau, dan homogenitas yang sama. Kedelapan ekstrak berwarna putih kekuningan muda (PMS 100), bersifat homogen, serta memiliki aroma

yang khas, yaitu campuran kopi, NADES, dan etanol. Selanjutnya untuk nilai pH pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu 5,84; 5,85; 5,86; 5,84; 5,59; 5,58; 5,58 dan 5,85. Perolehan kadar kafein pada hari ke-0 untuk ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu $21,42 \pm 0,08$ mg/g; $21,52 \pm 0,08$ mg/g; $21,60 \pm 0,24$ mg/g; $21,56 \pm 0,07$ mg/g; $29,35 \pm 0,29$ mg/g; $28,73 \pm 0,55$ mg/g; $28,45 \pm 0,13$ mg/g;

serta $28,46 \pm 0,05$ mg/g serbuk biji kopi hijau. Kemudian untuk kadar asam klorogenat pada hari ke-0 pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z secara berturut-turut, yaitu $47,93 \pm 0,01$ mg/g; $47,90 \pm 0,01$ mg/g; $47,94 \pm 0,02$ mg/g; $47,94 \pm 0,03$ mg/g; $55,77 \pm 0,22$ mg/g; $55,94 \pm 0,43$ mg/g; $55,74 \pm 0,19$ mg/g; serta $55,62 \pm 0,18$ mg/g serbuk biji kopi hijau. Jumlah cemaran mikroba ekstrak W, X, Y, dan Z hari ke-0 secara berturut-turut berada pada kisaran 310-435 cfu/mL, 425-540 cfu/mL, 460-525 cfu/mL, dan 615-680 cfu/mL. Kromatogram standar kafein dan asam klorogenat dengan sampel ekstrak cair NADES biji kopi hijau ditunjukkan pada **Gambar 1**.

Perubahan warna yang terjadi pada kedalaman ekstrak pada masing-masing suhu penyimpanan selama 54 hari dapat dilihat pada **Tabel 4**. Namun, perubahan warna yang terjadi

pada setiap masing-masing ekstrak tidak terlalu berbeda jauh bila dibandingkan dengan hari ke-0. Secara berurutan ekstrak yang mengalami perubahan warna lebih cepat dan gelap pada percobaan pertama adalah ekstrak D > A > B > C, kemudian percobaan kedua adalah ekstrak Z > Y > X > W. Kemudian kondisi suhu penyimpanan secara berurutan yang paling mempengaruhi perubahan warna lebih cepat dan gelap, yaitu $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C} > 5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C} > -20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$. Hasil menunjukkan bahwa kedalaman ekstrak yang disimpan pada ketiga suhu yang berbeda selama 54 hari tidak menunjukkan terjadinya perubahan bau atau tidak berbau tengik. Hasil uji homogenitas juga menunjukkan ekstrak tetap homogen selama penyimpanan yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan padat (kristal) (38).

Tabel 4. Hasil pengamatan organoleptis ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan selama 54 hari.

Ekstrak	Perubahan Warna		
	$-20^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$	$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	$30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$
A	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
B	Tidak mengalami perubahan	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
C	Tidak mengalami perubahan	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-54 (PMS 106)
D	Tidak mengalami perubahan	Hari ke-36 dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 (PMS 106); Hari ke-36 dan 54(PMS 113)
W	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
X	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
Y	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18, 36, dan 54 (PMS 106)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)
Z	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)	Hari ke-18 dan 36 (PMS 106); Hari ke-54 (PMS 113)

Keterangan: PMS 100 = Putih kekuningan muda; PMS 106 = Putih kekuningan gelap

Perubahan warna dan bau dapat terjadi karena adanya reaksi oksidatif yang menghasilkan radikal bebas (13). Oksidasi itu sendiri dapat dipengaruhi oleh oksigen, suhu, dan cahaya (11). Perubahan warna dapat terjadi karena reaksi oksidasi dari senyawa fenolik, seperti asam klorogenat dengan pengaruh suhu yang semakin tinggi membuat kandungan fenolik pada ekstrak semakin mudah teroksidasi dan menyebabkan pembentukan pigmen yang lebih gelap (39, 40). Selain itu, perubahan warna yang terjadi pada ekstrak cair juga dapat disebabkan karena adanya hasil metabolit yang diproduksi oleh bakteri yang terdapat dalam ekstrak cair tersebut sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna (41). Selain itu, bakteri juga dapat mendegradasi senyawa fenolik yang terkandung dalam ekstrak cair biji kopi hijau sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna pada ekstrak (42).

Pada penelitian ini, ekstrak yang ditambahkan BHT mengalami perubahan warna lebih lambat dibandingkan dengan ekstrak NADES biji kopi hijau tanpa penambahan BHT. Oksidasi dapat diminimalkan dengan penambahan antioksidan untuk menjaga kualitas ekstrak dengan menghambat produk oksidasi sehingga dapat memperlambat perubahan warna dan ketengikan. BHT berperan sebagai *free radical scavengers* yang bereaksi dengan radikal bebas untuk mendonorkan hidrogen pada radikal bebas sehingga dapat memecah rantai radikal bebas dan menghasilkan radikal bebas yang stabil atau non reaktif sehingga dapat mencegah oksidasi lebih lanjut pada ekstrak (13). Selain itu, semakin meningkatnya konsentrasi BHT yang ditambahkan maka perubahan warna juga semakin lambat yang berarti semakin tinggi konsentrasi BHT maka semakin tinggi juga aktivitas antioksidannya sehingga dapat menjaga kestabilan warna lebih baik. Pada penelitian ini, semakin rendah suhu penyimpanan pada ekstrak maka akan semakin lama perubahan warna dapat terjadi. Hal ini disebabkan pada suhu rendah dapat menurunkan laju reaksi oksidasi enzimatik penyebab warna pada ekstrak menjadi lebih gelap (40). Oleh karena itu, keempat ekstrak yang disimpan pada $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ tidak mengalami perubahan warna.

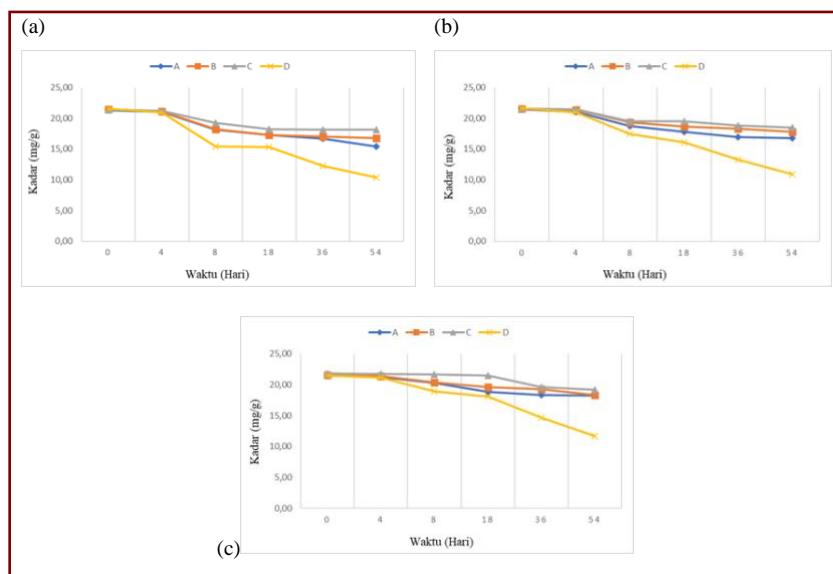
Pada penelitian ini, secara umum ekstrak cenderung mengalami penurunan pH dengan semakin bertambahnya waktu penyimpanan. Penurunan nilai pH ini dapat disebabkan oleh reaksi oksidasi yang terjadi pada senyawa polifenol dalam ekstrak sehingga terjadi pelepasan H⁺ yang dapat menambah keasaman pada ekstrak (39). Selain itu, terjadinya penurunan pH pada ekstrak dapat disebabkan karena adanya pengaruh dari bakteri. Bakteri dapat mengubah pH suatu ekstrak dengan cara memproduksi asam laktat sebagai produk hasil metabolismenya yang dapat menyebabkan terjadinya penurunan pH (43).

Nilai pH yang dihasilkan dari keempat ekstrak A, B, C, dan D pada masing-masing suhu penyimpanan hingga hari ke-54 masih berada pada kisaran pH 5,71-5,62, sedangkan ekstrak W, X, Y berada pada kisaran pH 5,59-5,35, dan ekstrak Z berada pada kisaran pH 5,85-5,62. Terdapat sedikit perbedaan pH antara ekstrak cair NADES biji kopi hijau yang ditambahkan pengawet dengan ekstrak tanpa penambahan pengawet. Hal ini mungkin disebabkan karena struktur dari metil paraben dan propil paraben yang merupakan turunan dari asam p-hidroksibenzoat serta pada struktur metil paraben dan propil paraben terdapat gugus OH yang menyebabkan metil paraben dan propil paraben bersifat sedikit asam dalam suatu larutan (44, 45). Pada kisaran pH 3-9 kandungan asam klorogenat dalam ekstrak cair biji kopi masih stabil dan untuk kafein berada pada kisaran pH 5,5-9 (46, 47). Pengukuran pH itu sendiri bertujuan untuk mengetahui pH dari suatu ekstrak yang berkaitan dengan stabilitas zat aktif yang terkandung dalam ekstrak, dengan demikian nilai pH yang dihasilkan oleh keempat ekstrak pada tiga suhu penyimpanan selama 54 hari masih berada dalam kisaran nilai pH untuk menjaga kestabilan dari asam klorogenat dan kafein sehingga perubahan nilai pH masih dapat diterima.

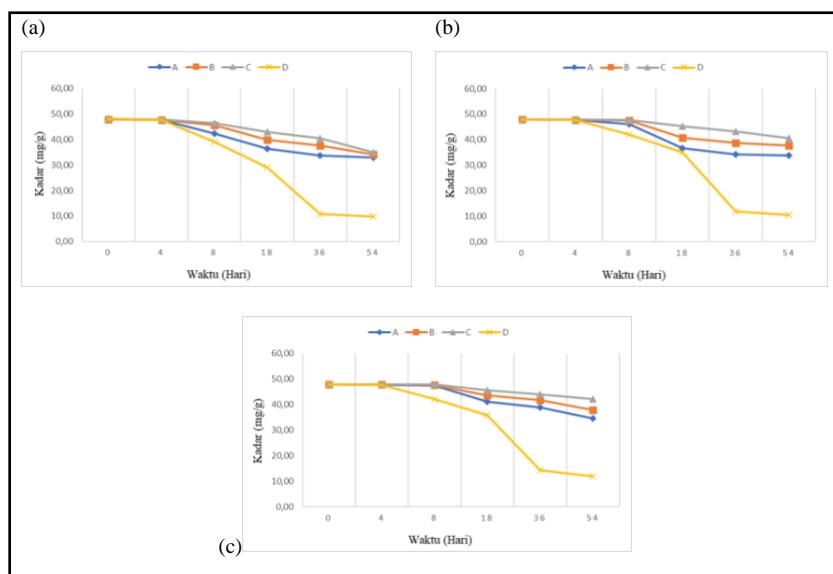
Berdasarkan *guideline* dari European Medicines Agency (EMEA), stabilitas ekstrak dapat dilihat berdasarkan persentase penurunan dari kadar suatu senyawa yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Batas penerimaan untuk menentukan apakah persentase penurunan kadar senyawa dalam ekstrak masih dapat diterima

atau tidak adalah sebesar $\pm 5\%$ dari kadar awalnya (19). Persentase penurunan kadar dalam ekstrak dapat digunakan untuk menentukan umur simpan suatu ekstrak. Kurva pengukuran kadar kafein dan asam klorogenat pada ekstrak A, B, C, D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan selama 54 hari ditunjukkan **Gambar 2 - 5.**

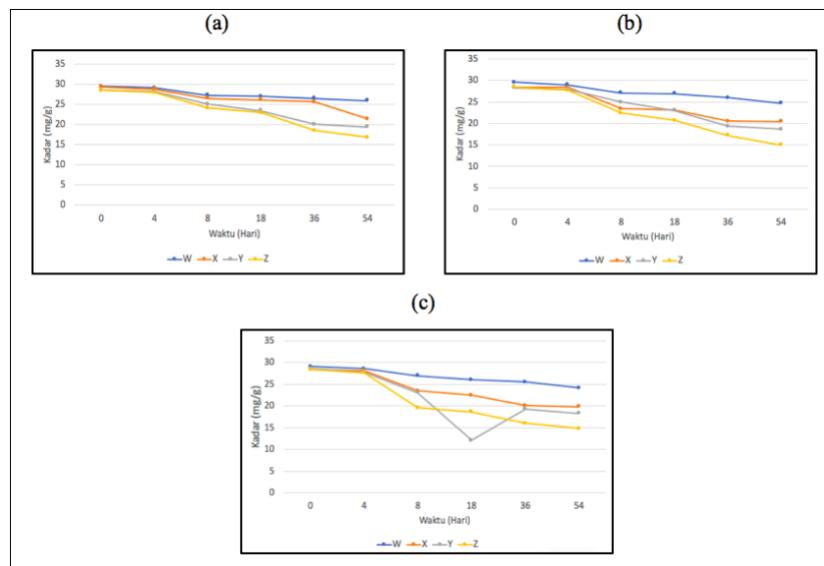
Berdasarkan hasil pengujian dan pengamatan, senyawa kafein pada ekstrak A, B, dan C yang disimpan pada suhu $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ secara berturut-turut stabil hingga hari ke-18, 18, dan 36. Pada suhu $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, senyawa kafein pada ekstrak A, B, dan C stabil hingga hari ke-8. Kemudian, senyawa kafein pada ekstrak D, W, X, Y, dan Z pada ketiga suhu penyimpanan stabil hingga hari ke-8.



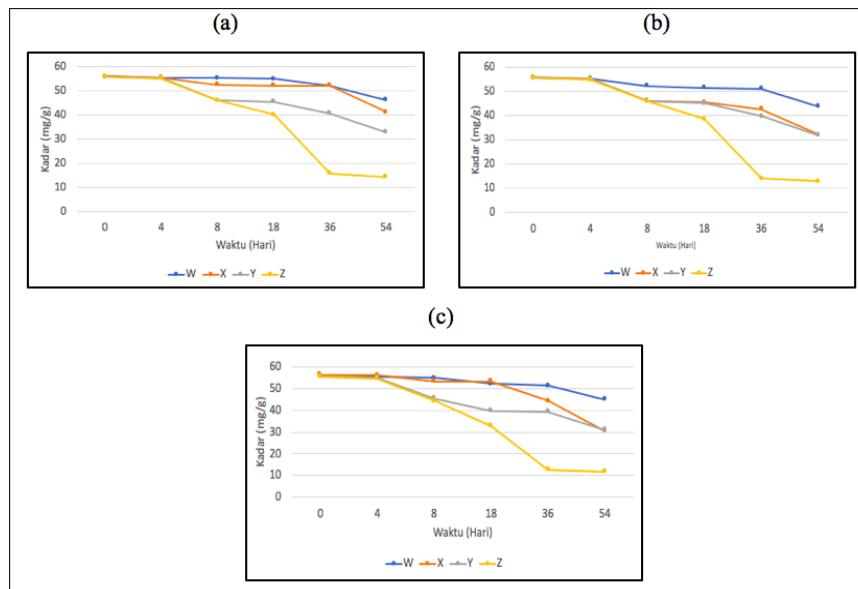
Gambar 2. Kurva pengukuran kadar kafein ekstrak A, B, C, dan D pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (a), $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (b), dan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (c) selama 54 hari



Gambar 3. Kurva pengukuran kadar asam klorogenat ekstrak A, B, C, dan D pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (a), $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (b), dan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (c) selama 54 hari



Gambar 4. Kurva pengukuran kadar kafein ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (a), $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (b), dan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (c) selama 54 hari



Gambar 5. Kurva pengukuran kadar asam klorogenat ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (a), $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (b), dan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ (c) selama 54 hari

Kadar senyawa asam klorogenat pada suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ pada ekstrak A dan B stabil hingga hari ke-18, ekstrak C dan W hingga hari ke-36, serta untuk ekstrak X dan Y stabil hingga hari ke-8. Pada suhu penyimpanan $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, ekstrak A dan B stabil sampai hari ke-18, ekstrak C hingga hari ke-36, ekstrak W, X, dan Y stabil hingga hari ke-8. Pada suhu penyimpanan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, senyawa asam klorogenat ekstrak A

stabil hingga hari ke-8, ekstrak B dan C hingga hari ke-18. Ekstrak W stabil hingga hari ke-18, sedangkan ekstrak X dan Y stabil hingga hari ke-8. Kemudian untuk ekstrak D dan Z pada masing-masing suhu penyimpanan stabil hingga hari ke-8.

Berdasarkan hasil yang didapatkan ekstrak cair NADES biji kopi hijau dengan penambahan BHT 30 ppm dan disimpan pada

suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ memiliki kestabilan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling optimal, yaitu hingga hari ke-36. Hasil persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling rendah pada ketiga suhu penyimpanan secara berturut-turut, yaitu pada ekstrak C > B > A > D. Hasil persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling rendah pada masing-masing ekstrak secara berturut-turut adalah pada suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} > 30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Ekstrak dengan penambahan pengawet, dapat disimpulkan bahwa ekstrak dengan penambahan pengawet kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110 ppm dan 55 ppm pada suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ memiliki kadar kafein dan asam klorogenat paling stabil karena baru mengalami penurunan kadar lebih dari 5% dari kadar awalnya pada hari ke-8 untuk senyawa kafein dan hari ke-36 untuk senyawa asam klorogenat. Secara umum, persentase penurunan kadar kafein dan asam klorogenat sampai hari ke-54, berturut-turut paling besar terjadi pada ekstrak Z > Y > X > W. Sedangkan, persen penurunan kadar kafein berturut-turut pada ekstrak W, X, Y, dan Z sampai hari ke-54 berdasarkan pada suhu penyimpanan secara umum paling besar terjadi pada suhu penyimpanan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C} > -20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Untuk senyawa asam klorogenat, sulit untuk menentukan urutan persentase penurunan kadar dari berbagai suhu penyimpanan karena pada ekstrak W dan X, persentase penurunan kadarnya lebih besar pada suhu $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ dibandingkan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya perubahan suhu yang terjadi pada kondisi penyimpanan $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ sehingga memengaruhi kadar senyawa asam klorogenat yang merupakan senyawa yang bersifat termolabil. Namun, secara umum, persentase penurunan kadar asam klorogenat paling rendah berada pada suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh bahwa penambahan BHT dan suhu penyimpanan rendah pada ekstrak cair NADES biji kopi hijau dapat menjaga kestabilan kimia pada ekstrak lebih lama, menghasilkan persentase penurunan kadar yang lebih kecil, dan menghasilkan kadar senyawa aktif yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak cair NADES biji kopi hijau tanpa

penambahan BHT. Reaksi oksidasi ini dapat menghasilkan radikal bebas yang akan menghasilkan oksidasi zat aktif sehingga akan mengurangi *shelf-life* (umur simpan) dari ekstrak yang didapat (13). Oleh karena itu, penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik ke dalam ekstrak NADES dapat meningkatkan stabilitas kimia pada ekstrak dengan mencegah oksidasi. BHT berperan sebagai antioksidan sintetik yang bekerja sebagai *free radical scavengers* dan akan bereaksi dengan radikal bebas dengan mendonorkan hidrogen pada radikal bebas sehingga menghasilkan radikal bebas yang stabil dan non reaktif dengan begitu dapat menghentikan reaksi oksidasi dan mencegah oksidasi lebih lanjut (13). Penambahan BHT sebagai antioksidan sintetik berperan untuk menjaga kualitas ekstrak dengan memperlambat kerusakan yang disebabkan radikal bebas dan meningkatkan stabilitas kimia yang berpengaruh pada umur simpan pada ekstrak. Selain itu, semakin tinggi konsentrasi BHT yang ditambahkan maka semakin lama juga untuk menjaga kestabilan kimia pada ekstrak yang menunjukkan bahwa semakin tinggi penambahan konsentrasi BHT, maka akan semakin kuat aktivitas antioksidan dalam ekstrak tersebut untuk menjaga kestabilan kimia pada ekstrak. Selain penambahan BHT, metode yang dapat digunakan untuk menghambat oksidasi dapat dilakukan dengan penyimpanan pada suhu rendah (17). Oleh karena itu, ekstrak cair NADES biji kopi hijau dengan penambahan BHT 30 ppm dan disimpan pada kondisi penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ memiliki kestabilan kadar kafein dan asam klorogenat yang paling stabil selama penyimpanan.

Penurunan kadar senyawa kafein dan asam klorogenat juga dapat disebabkan karena adanya pertumbuhan bakteri pada ekstrak. Bakteri dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada kafein karena senyawa kafein merupakan sumber karbon dan nitrogen bagi pertumbuhan bakteri (48). Bakteri mendegradasi senyawa kafein melalui jalur demetilasi dengan bantuan enzim N-demetylase (49). Enzim N-demetylase menyebabkan terjadinya demetilasi berurutan pada tiga kelompok N-metil yang terdapat pada kafein (48). Awalnya kafein diubah menjadi teobromin (3,7-dimetilxantin) dan paraxantin (1,7-dimetilxantin) dengan bantuan enzim N-

demetilase yang melepaskan gugus metil dari posisi N-1 dan N-3 pada molekul kafein (48, 49). Kemudian demetilasi lebih lanjut menghasilkan xanthine dengan 7-metixantine sebagai produk *intermediate* (48). Produk akhir katabolisme kafein berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi bakteri untuk pemeliharaan pertumbuhan dan aktivitas metabolisme (48). Bakteri juga dapat menyebabkan degradasi pada senyawa asam klorogenat karena asam klorogenat merupakan sumber karbon bagi bakteri (50). Degradasi senyawa asam klorogenat dapat terjadi karena adanya aksi esterase dari bakteri yang menyebabkan terjadinya degradasi senyawa asam klorogenat sehingga menghasilkan produk katabolik pertama berupa asam kafeat yang merupakan hasil pecahan dari asam kuinat (51). Terjadinya degradasi pada senyawa kafein dan asam klorogenat dapat memengaruhi kadar senyawa kafein dan asam klorogenat sehingga menyebabkan penurunan kadar terhadap kedua senyawa tersebut. Selain itu, penurunan kadar kafein dan asam klorogenat juga dapat disebabkan karena NADES yang sudah tidak stabil akibat adanya cemaran bakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Radošević *et al.*, 2018 dan Zhao *et al.*, 2015 disebutkan bahwa kolin klorida dan sorbitol yang merupakan golongan gula alkohol sebagai penyusun NADES tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri (52, 53). Sorbitol dapat digunakan sebagai sumber nutrisi nitrogen atau karbon bagi beberapa bakteri dan golongan gula alkohol ini dapat dicerna oleh bakteri (52, 53). Hal ini dapat menyebabkan NADES menjadi tidak stabil sehingga memengaruhi kadar senyawa kafein dan asam klorogenat pada ekstrak.

Berdasarkan hasil pengamatan, kadar kafein dan asam klorogenat dapat lebih terjaga pada ekstrak yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben sebagai pengawet, terutama ekstrak W yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110 ppm dan 55 ppm dan suhu penyimpanan juga merupakan salah satu faktor yang memengaruhi karena suhu penyimpanan yang lebih tinggi dapat mempercepat pertumbuhan bakteri sedangkan temperatur rendah dapat memperlambat proses terjadinya perubahan kimia dan pertumbuhan bakteri (54). Metil paraben dan propil paraben merupakan pengawet sehingga dapat membantu

menjaga kadar kafein dan asam klorogenat dari degradasi senyawa yang disebabkan oleh bakteri. Sampai saat ini, belum diketahui dengan pasti bagaimana mekanisme aksi dari paraben Namun, menurut beberapa literatur, disebutkan bahwa paraben memiliki beberapa mekanisme aksi terhadap bakteri. Mekanisme aksi dari paraben, yaitu paraben dapat menginduksi permeabilisasi membran bakteri sehingga menyebabkan pelepasan molekul intraseluler (55). Hipotesis lain juga menyebutkan bahwa mekanisme kerja paraben pada *phospholipid bilayer* membran sitoplasma menyebabkan peningkatan permbeabilitas dan fluiditas sehingga menyebabkan terjadinya gangguan dan kebocoran transpor membrane (56).

Jumlah cemaran mikroba dari hari ke-0 sampai hari ke-54 yang terdapat pada ekstrak W, X, Y, dan Z pada masing-masing suhu penyimpanan cenderung menurun. Hal ini dapat disebabkan karena adanya penambahan kombinasi metil paraben dan propil paraben pada ekstrak W, X, dan Z. Kombinasi metil paraben dan propil paraben dapat memberikan efek bakterisid (membunuh bakteri), sebaliknya jika metil paraben dan propil paraben penggunaannya tidak dikombinasikan hanya dapat memberikan efek penghambatan pertumbuhan bakteri (57). Sedangkan, pada ekstrak Z yang tidak ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben memiliki jumlah cemaran yang cenderung lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak A, B, dan C yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben. Selain itu, penurunan jumlah cemaran yang terjadi pada ekstrak D dapat disebabkan karena ekstrak kopi itu sendiri telah dibuktikan memiliki aktivitas antimikroba. Senyawa kimia yang terkandung dalam kopi menyebabkan ekstrak kopi memiliki aktivitas antimikroba (58). Senyawa kimia yang memberikan efek antimikroba pada ekstrak kopi adalah senyawa polifenol (59). Senyawa polifenol yang memberikan efek antimikroba diduga bekerja dengan cara menyebabkan perubahan permeabilitas membran bakteri (59). Selain itu, terdapat hipotesis lain yang menyebutkan bahwa senyawa tanin yang terkandung dalam ekstrak kopi dapat mengendapkan protein pada membran sel bakteri (60).

Berdasarkan petunjuk dari *European Medicines Agency*, disebutkan bahwa kriteria penerimaan jumlah cemaran mikroba yang terkandung dalam ekstrak mengikuti kriteria penerimaan yang terdapat pada *European Pharmacopoeia, chapter 5.1.8*. Berdasarkan *European Pharmacopoeia*, Edisi 10, *chapter 5.1.8* disebutkan bahwa kriteria penerimaan jumlah cemaran mikroba dari hasil uji angka lempeng total tidak boleh melebihi 10^5 koloni/mL atau 500.000 koloni/mL. Kriteria penerimaan jumlah cemaran maksimal yang diperbolehkan terkandung dalam ekstrak ini dapat digunakan juga untuk menentukan umur simpan ekstrak. Berdasarkan hal tersebut, dapat disimpulkan bahwa jumlah cemaran mikroba yang terdapat pada ekstrak W, X, Y, dan Z pada suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ yang disimpan dari hari ke-0 sampai hari ke-54 tidak ada yang melebihi batas jumlah penerimaan mikroba dalam ekstrak. Namun, pada hari ke-18, jumlah cemaran pada ekstrak Z yang disimpan pada suhu $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ dan $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ serta ekstrak W, X, dan Y yang disimpan pada suhu $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, jumlahnya terlalu banyak sehingga tidak dapat dihitung. Hal ini mungkin disebabkan karena adanya kesalahan dalam proses penggerjaannya sehingga pada beberapa cawan petri terjadi kontaminasi. Diduga kontaminasi tersebut berasal dari *micropipette* yang digunakan. Namun, secara umum sampai hari ke-54, metil paraben dan propil paraben yang ditambahkan ke dalam ekstrak sebagai pengawet dapat menjaga jumlah cemaran mikroba yang terdapat dalam ekstrak sehingga tidak melebihi batas penerimaannya.

Kesimpulan

Penambahan BHT dan antimikroba (kombinasi metil dan propil paraben) pada ekstrak cair NADES dapat meningkatkan stabilitas ekstrak, baik secara fisik maupun mikrobiologi. Ekstrak cair NADES yang ditambahkan BHT konsentrasi 30 ppm dengan suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ memiliki stabilitas fisik dan kimia yang paling optimal. Sedangkan, untuk ekstrak cair NADES yang ditambahkan kombinasi metil paraben dan propil paraben konsentrasi 110:55 ppm dengan suhu penyimpanan $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ memiliki stabilitas fisik, kimia, dan mikrobiologi yang paling optimal.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ucapan terimakasih kepada Universitas Indonesia dan pihak-pihak terkait yang telah memfasilitasi dan membantu berjalannya penelitian ini.

Referensi

1. Chu YF, editor. Coffee: emerging health effects and disease prevention. John Wiley & Sons; 2012 Mar 27.
2. Garg, Satish K. "Green Coffee Bean." *Nutraceuticals*, 2016, pp. 653-667, 10.1016/b978-0-12-802147-7.00047-4.
3. Lashermes P. Achieving sustainable cultivation of coffee: breeding and quality traits. Burleigh Dodds Science Publishing Limited; 2018.
4. Choi YH, Verpoorte R. Green solvents for the extraction of bioactive compounds from natural products: from supercritical fluid extraction to ionic liquids and deep eutectic solvents. *Current Opinion in Food Science*. 2019 Apr 15;26:87-93.
5. Espino M. M. dl Á. Fernández, FJV Gomez and M. Fernanda Silva. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 2016;76:126-36.
6. Kua Y, Gan S. Natural Deep Eutectic Solvent (NADES) as a Greener Alternative for the Extraction of Hydrophilic (Polar) and Lipophilic (Non-Polar) Phytonutrients. *Key Engineering Materials*. 2019;797:20-28.
7. González CG, Mustafa NR, Wilson EG, Verpoorte R, Choi YH. Application of natural deep eutectic solvents for the "green" extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour and Fragrance Journal*. 2018 Jan;33(1):91-6.
8. Freitas Araujo M, Maria T. Microbial Quality of Medicinal Plant Materials. *Latest Research into Quality Control*. 2012.
9. Thakur L, Ghodasra U, Patel N, Dabhi M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. *Pharmacognosy Reviews*. 2011;5(9):48.
10. European Medicines Agency. Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products.

- European Medicines Agency, Inspections; 2018 p. 1-18.
11. Lourenço SC, Moldão-Martins M, Alves VD. Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications. *Molecules*. 2019;24(24):4132.
12. Obzansky D, Michael. Method for preparing aqueous analytical reagents containing water insoluble antioxidant. European Patent Application. 1989
13. García-García R, Searle S. Preservatives: Food Use. Encyclopedia of Food and Health. 2016;:505-509.
14. Mishra R, Bisht SS. Antioxidants and their characterization. *J. Pharm. Res.* 2011 Aug;4(8):2744-6.
15. Soni MG, Taylor SL, Greenberg NA, Burdock GA. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and chemical Toxicology*. 2002 Oct 1;40(10):1335-73.
16. Ibtissem B, Imen M, Souad S. Dosage of 2, 6-bis (1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (BHT) in the plant extract *Mesembryanthemum crystallinum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010 Jan 1;2010.
17. Yehye WA, Rahman NA, Ariffin A, Abd Hamid SB, Alhadi AA, Kadir FA, Yaeghoobi M. Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European journal of medicinal chemistry*. 2015 Aug 28;101:295-312.
18. European Medicines Agency. Guideline on Stability Testing : Stability Testing of Existing Active Substances and Related Finished Products. European Medicines Agency, Inspections; 2007 p. 1-18.
19. European Medicines Agency. *Guideline on Quality of Herbal Medicinal Products*. 2018.
20. Fitri RA, Lestari TA, Sari Y, Sutriyo S, Mun'Im A. Freeze drying of natural deep eutectic solvent (NADES) extract of green coffee bean (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *Journal of research in pharmacy (online)*. 2020;24(2):225-32.
21. Yuniarti E, Saputri FC, Mun'Im A. Natural deep eutectic solvent extraction and evaluation of caffeine and chlorogenic acid from green coffee beans of *Coffea canephora*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019 Dec 31;81(6):1062-9.
22. Dai Y, Verpoorte R, Choi YH. Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food chemistry*. 2014 Sep 15;159:116-21.
23. Depkes RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat: Jakarta Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Edisi IV. 2000.
24. PMS Color Used for Printing [Internet]. Kartonwerken.nl. 2021 [cited 27 June 2022]. Available from: <http://www.kartonwerken.nl/files/PMS%20Okaart.pdf>
25. Guidance R. Validation of chromatographic methods. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Washington. 1994 Nov 1;2.
26. Seo J, Kim J, Shim J, Yoon G, Bang M, Bae C et al. HPLC Analysis, Optimization of Extraction Conditions and Biological Evaluation of *Corylopsis coreana* Uyeki Flos. *Molecules*. 2016;21(1):94.
27. International Council on Harmonisation. Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology. International Council on Harmonisation; 2005 p. 1-13.
28. Harmita. Analisis fisikokimia: Kromatografi. Jakarta: Kedokteran EGC; 2015.
29. AOAC A. Guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals. Obtenido de <https://doi.org/10.1063/1.4915424>. 2002.
30. Jeszka-Skowron M, Sentkowska A, Pyrzyńska K, De Peña MP. Chlorogenic acids, caffeine content and antioxidant properties of green coffee extracts: influence of green coffee bean preparation. *European Food Research and Technology*. 2016 Aug;242(8):1403-9.
31. Wei F, Tanokura M. Organic compounds in green coffee beans. InCoffee in health and disease prevention 2015 Jan 1 (pp. 149-162).

- Academic Press.
32. Makanjuola SA. Influence of particle size and extraction solvent on antioxidant properties of extracts of tea, ginger, and tea-ginger blend. *Food science & nutrition*. 2017 Nov;5(6):1179-85.
 33. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *Journal of the American Chemical Society*. 2004 Jul 28;126(29):9142-7.
 34. Zhang Q, Vigier KD, Royer S, Jérôme F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*. 2012;41(21):7108-46.
 35. Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food chemistry*. 2015 Nov 15;187:14-9.
 36. Chemat F, Vian M, Cravotto G. Green Extraction of Natural Products: Concept and Principles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012;13(7):8615-8627.
 37. Ruesgas-Ramón M, Figueroa-Espinoza MC, Durand E. Application of deep eutectic solvents (DES) for phenolic compounds extraction: Overview, challenges, and opportunities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2017 May 10;65(18):3591-601.
 38. Dai Y, van Spronsen J, Witkamp, G.-j., Verpoorte, R., Choi, YH. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta*. 2013;766:61-8.
 39. Anggiriani, M. Uji Stabilitas fisik dan aktivitas antioksidan sediaan krim yang mengandung ekstrak etanol daun Sirih (*Piper betle* L.) dengan penambahan BHT pada berbagai konsentrasi. Universitas Indonesia. 2011.
 40. Pardede, E. Penanganan Reaksi Enzimatika Pencoklatan Pada Buah dan Sayur Serta Produk Olahannya. VISI. 2017; 13.
 41. Sandle T. Microbiological challenges to the pharmaceuticals and healthcare. *Pharmaceutical Microbiology*; Woodhead Publishing: Sawston, UK. 2016:281-94.
 42. Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, Gomez HA, Chen CY, Lima GP. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compd. Biol. Act.* 2017 Mar 8;8:1-24.
 43. Ratzke C, Gore J. Modifying and reacting to the environmental pH can drive bacterial interactions. *PLoS biology*. 2018 Mar 14;16(3):e2004248.
 44. Alvarez-Rivera G, Llompart M, Lores M, Garcia-Jares C. Preservatives in Cosmetics. *Analysis of Cosmetic Products*. 2018;:175-224.
 45. Lincho J, Gomes J, Martins RC. Paraben Compounds—Part II: An Overview of Advanced Oxidation Processes for Their Degradation. *Applied Sciences*. 2021 Apr 15;11(8):3556.
 46. Abebe B. Some biochemical compounds in coffee beans and methods developed for their analysis. *International Journal of Physical Sciences*. 2011 Nov 9;6(28):6373-8.
 47. Oryza Oil & Fat Chemical CO., L. Coffee bean extract. Oryza Oil & Fat Chemical CO., LTD. 2013; 1-41.
 48. Gummadi SN, Bhavya B, Ashok N. Physiology, biochemistry and possible applications of microbial caffeine degradation. *Applied microbiology and biotechnology*. 2012 Jan;93(2):545-54.
 49. Dash SS, Gummadi SN. Catabolic pathways and biotechnological applications of microbial caffeine degradation. *Biotechnology letters*. 2006 Dec;28(24):1993-2002.
 50. Ma Y, Wang X, Nie X, Zhang Z, Yang Z, Nie C, Tang H. Microbial degradation of chlorogenic acid by a *Sphingomonas* sp. strain. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2016 Aug;179(8):1381-92.
 51. Ludwig IA, Paz de Peña M, Concepción C, Alan C. Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *Biofactors*. 2013 Nov;39(6):623-32.
 52. Radošević K, Čanak I, Panić M, Markov K, Bubalo MC, Frece J, Srček VG, Redovniković

- IR. Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. Environmental Science and Pollution Research. 2018 May;25(14):14188-96.
53. Zhao Y, Wang J, Ballevre O, Luo H, Zhang W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. Hypertens Res. 2012 Apr;35(4):370-4.
54. Paul-Sadhu S. Impact of low refrigeration temperature on colour of milk. Acta Alimentaria. 2016 Sep;45(3):390-7.
55. Bredin J, Davin-Régli A, Pages JM. Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2005 Jun 1;55(6):1013-5.
56. Mlynarczyk M, Sznitowska M, Watrobska-Swietlikowska D. Antimicrobial Activity of Parabens in Submicron Emulsions Stabilized with Lecithin. Drug Development and Industrial Pharmacy. 2008 Jan;34(4):355-62.
57. Gilliland D, Wan Po AL, Scott E. Kinetic evaluation of claimed synergistic paraben combinations using a factorial design. Journal of Applied Bacteriology. 1992 Mar;72(3):258-61.
58. Almeida AA, Farah A, Silva DA, Nunan EA, Glória MB. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria. Journal of agricultural and food chemistry. 2006 Nov 15;54(23):8738-43.
59. Akhlaghi N, Sadeghi M, Fazeli F, Akhlaghi S, Mehnati M, Sadeghi M. The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An in vitro study. Dental Research Journal. 2019 Sep;16(5):346.
60. Rajesh G, Rao A, Shenoy R, BH MP. Antimicrobial efficacy of *Punica granatum* mesocarp, *Nelumbo nucifera* leaf, *Psidium guajava* leaf and *Coffea Canephora* extract on common oral pathogens: an in-vitro study. Journal of clinical and diagnostic research: JCDDR. 2014 Jul;8(7):ZC65.

Eksplorasi Efek Etanol Terhadap Survival dan Status Imunitas *Drosophila melanogaster*

Reski Amalia Rosa¹, Nadila Pratiwi Latada¹, Asbah Asbah¹, Ahmad Mu'arif¹, Risfah Yulianty², Firzan Nainu^{3*}

Artikel Penelitian

Abstract: High doses of ethanol in the body can elicit damage to organs including the brain, liver and kidneys. In addition, ethanol can trigger the formation of reactive oxygen species (ROS), where excess levels of ROS in the body can promote cell death through the apoptotic pathway. Apoptotic cells that are not phagocytosed will undergo necrosis. In the process of necrosis, cells release DAMPs, endogenous pro-inflammatory molecules and induce the core immune system in *Drosophila* that are homologues to humans, namely Toll, IMD (Immune Deficiency), and JAK-STAT (Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription). The aim of this research is to investigate how ethanol exposure influences gene expression in the Toll, Imd, and JAK-STAT pathways. The results showed that ethanol could affect the survival rate of male and female *Drosophila melanogaster* w¹¹¹⁸. Exposure to ethanol at high concentrations (85%) caused a decrease in the expression of Drs, but not the expression of the Dpt. In addition, TotA expression, but not Upd3, was amplified significantly as the ethanol concentration increased. In conclusion, *Drosophila* experienced a decrease in the survival rate due to ethanol exposure which might be related to the stress response and the immune system which is mediated by certain pathways.

Keywords: fruit fly, ethanol, immune system, Drs, Dpt, TotA, Upd3

¹ Program Studi Sarjana, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245

² Departemen Farmasi Sains dan Teknologi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245

³ Departemen Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan 90245

Korespondensi:

Firzan Nainu
firzannainu@unhas.ac.id

Abstrak: Etanol dengan dosis yang tinggi di dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan pada organ termasuk otak, hati, dan ginjal. Selain itu, etanol dapat memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS), dimana kadar ROS yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan kematian sel melalui jalur apoptosis. Sel apoptosis yang tidak terfagositosis akan mengalami proses nekrosis. Pada proses nekrosis, sel melepaskan DAMPs, molekul endogen pro-inflamasi dan menginduksi sistem imun utama pada *Drosophila* yang homolog pada manusia, yakni Toll, IMD (Immune Deficiency), dan JAK-STAT (Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription). Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui bagaimana pengaruh paparan etanol terhadap ekspresi gen pada jalur Toll, Imd, dan JAK-STAT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, etanol dapat mempengaruhi tingkat kesintasan (keberlangsungan hidup) *Drosophila melanogaster* w¹¹¹⁸ jantan dan betina. Paparan etanol pada konsentrasi tinggi (85%) menyebabkan penurunan ekspresi Drs, namun tidak dengan ekspresi Dpt. Selain itu, ekspresi TotA meningkat secara signifikan, namun tidak dengan ekspresi Upd3, seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol. Sebagai kesimpulan, *Drosophila* mengalami penurunan tingkat kesintasan akibat pemaparan etanol yang kemungkinan berhubungan dengan respon stres serta sistem imun yang diperantara oleh jalur tertentu.

Kata kunci: lalat buah, etanol, sistem imun, Drs, Dpt, TotA, Upd3

Pendahuluan

Etanol (EtOH) dengan rumus molekul $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ merupakan bagian dari kelompok alkohol yang memiliki gugus -OH (hidroksil) yang terikat pada satu atom karbon. Berdasarkan survei *National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions* (NESARC), ditemukan bahwa penderita *Alcohol Use Disorder* (AUD) telah mencapai 36.7% pada usia 30-44 tahun (1). Mengonsumsi alkohol secara terus-menerus akan berisiko mengalami berbagai gangguan, misalnya hati ataupun hepatitis alkohol akut. Selain itu, pada dosis yang berlebih, etanol dapat menyebabkan kerusakan pada organ tubuh seperti hati, otak, ginjal, yang bahkan disertai dengan kematian. Adapun pada dosis rendah, etanol memiliki beberapa efek, yakni munculnya rasa senang atau euforia, dehidrasi, kehilangan fungsi motorik, dan sedasi (1-4).

Etanol telah dicurigai dapat mempengaruhi aktivitas sistem imun, dimana secara spesifik dapat menyebabkan supresi sistem imun (5). Dengan demikian, seseorang yang mengonsumsi minuman/makanan beralkohol mungkin lebih rentan untuk menderita penyakit infeksi, sebagai efek samping imunosupresi akibat penggunaan alkohol. Lebih lanjut, etanol pada kadar tinggi dalam tubuh memicu terbentuknya *reactive oxygen species* (ROS) (6,7). ROS berfungsi sebagai parameter untuk mengukur pembentukan hidroksil radikal, dimana ketika radikal bebas bereaksi dengan DNA, lipid, karbohidrat dan protein dapat menyebabkan kerusakan sel (*cell damage*) (8). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jessica *et al.* (2009), terlihat bahwa paparan etanol pada hewan coba tikus dapat menginduksi stres oksidatif yang selanjutnya memicu apoptosis, sehingga menyebabkan kerusakan pada organ hati (9). Dan pada organisme model *Drosophila melanogaster*, paparan etanol dapat menginduksi apoptosis yang berujung pada penurunan survival (Unpublished results). Namun beberapa pertanyaan masih belum terjawab. Salah satunya adalah bagaimana mekanisme induksi apoptosis secara molekuler pasca paparan etanol dan apakah ini ada kaitannya dengan aktivitas sistem imun?

Apoptosis merupakan proses fisiologis dimana terjadi kematian sel sebagai respon terhadap beberapa kondisi patologis yang berbahaya, seperti inflamasi kronik, aterosklerosis, kanker, permasalahan respirasi, dan neurodegeneratif. Sel yang mengalami apoptosis direspon oleh makrofag dan sel fagosit lainnya melalui proses fagositosis sel apoptosis yang kemudian mengurangi sel-sel mati dengan meminimalkan kerusakan pada sel lainnya. Kemudian, sel yang tidak terfagositosis akan mengalami proses nekrosis. Pada proses nekrosis, sel melepaskan

Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), molekul endogen pro-inflamasi, dan menginduksi respon sistem imun (10,11). Pada kondisi ini, terlihat bahwa apoptosis dapat berkaitan dengan aktivitas sistem imun, seperti yang telah dikomunikasikan oleh peneliti sebelumnya.

Sebelum tahun 2000, penelitian dalam rangka mempelajari respon imun alamiah terhadap suatu antigen, termasuk untuk mamalia, dapat menggunakan organisme model lalat buah *D. melanogaster* (12). Organisme model ini menawarkan berbagai keuntungan seperti memiliki kemiripan genetik dengan manusia sekitar (sekitar 75%), mudah dipelihara, ekonomis dan tidak membutuhkan ruangan pemeliharaan yang besar, tidak membutuhkan kode etik dalam penggunaannya sebagai model uji penelitian, serta memberikan hasil yang dapat diterjemahkan pada hewan uji mamalia maupun secara klinik pada manusia (12-16). Bahkan, lalat ini telah digunakan dalam riset terkait patogen manusia, termasuk SARS-CoV-2 yang menyebabkan COVID-19 (17). Namun keuntungan yang paling utama adalah serangga ini memiliki tiga jalur utama sistem imun yang homolog dengan manusia yakni *Toll pathway* yang homolog dengan sistem imun *Toll-Like Receptor (TLR) pathway* pada manusia, IMD (*Immune Deficiency Pathway* yang homolog dengan TNF (*Tumor Necrosis Factor*) pathway pada manusia, dan JAK-STAT (*Janus Tyrosine Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) seperti Unpaired (*Upd*) yang homolog dengan sitokin dan interleukin pada manusia (18). Berangkat dari berbagai keuntungan tersebut, maka kami memutuskan untuk melakukan penelitian menggunakan *D. melanogaster* sebagai organisme model dalam mengeksplorasi efek pemaparan etanol terhadap sistem imun alamiah dan hubungannya dengan *survival D. melanogaster*.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, oven (Memmert[®]), autoklaf (Hirayama[™]), micropestle (Geneaid[®]), mikropipet (Gilson[™]), vial *Drosophila* (Biologix[®]), microcentrifuge (Tomi), Zoom Stereo Microscope (Motic[™]), BSC kelas II (Faster[™]), Real-Time PCR (Rotor Gene Q[®], Qiagen), pinset (Taiyo electric), timbangan analitik (Sartorius[™]), dan CO₂ Pad (flystuff[™]).

Adapun bahan-bahan yang digunakan, yaitu aquadest, etanol (Emsure[®]ACS, ISO, Reag.Ph EUR), gas CO₂ (Samator[®]), kertas saring, Wizard SV Total RNA Isolation System (Promega[®]), kit GoTaq[®]1-step RT-qPCR system (Promega[™]), mikrotube (genefollower[™]), pakan *D. melanogaster*, Treff tube (TreffLab[™]) satu set

primer *rp49*, *Drs*, *Dpt*, *Upd3*, dan *TotA*, Stopper plugs, tips filter mikropipet (Rainin), dan tube qPCR.

Penyiapan Hewan Uji

Organisme model yang digunakan pada penelitian ini adalah lalat buah *D. melanogaster* dewasa genotip *w¹¹¹⁸* jantan dan betina dengan umur 4-7 hari (diberikan oleh Host and Response Laboratory of the Kanazawa University, Japan). Lalat dipelihara di dalam vial berisi pakan normal yang dibuat menggunakan komposisi tepung jagung (*corn meal*), *brewer's yeast*, glukosa, dan agar. Vial yang berisi lalat kemudian disimpan pada suhu 25°C dengan perbandingan 12:12 (12 jam terpapar cahaya lampu dan 12 jam dengan kondisi tanpa cahaya).

Pemaparan Etanol dan Pengamatan Waktu Kematian

Lalat disiapkan dan dibagi dalam lima kelompok perlakuan meliputi satu kelompok kontrol tanpa perlakuan dan empat kelompok perlakuan yang diberikan etanol dengan konsentrasi yang berbeda. Konsentrasi etanol yang digunakan yaitu 25%, 45%, 65% dan 85%, yang akan dipaparkan secara inhalasi pada *D. melanogaster*. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari minimal tiga vial yang masing-masing berisi 10 ekor lalat (jantan atau betina). Setiap vial ditutup menggunakan dua *stopper plug*. Setelah itu, sebanyak 1 mL etanol diteteskan pada *stopper plug* pertama, kemudian ditutup lagi dengan *stopper plug* kedua dengan jarak 2 cm dari mulut vial. Kemudian, dilakukan uji *survival* selama 60 menit dengan interval 6 menit (menit ke- 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60) dan diamati berapa jumlah lalat yang hidup dan mengalami sedasi dengan parameter lalat tidak bergerak atau dalam keadaan baring tanpa ada gerakan pada sayap. Data yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan *time point* (waktu) yang sesuai untuk proses isolasi RNA lalat.

Isolasi RNA

Untuk setiap kelompok perlakuan, lima ekor lalat jantan dewasa yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube* untuk diproses dalam eksperimen isolasi RNA. Lalat dianestesi menggunakan gas CO₂ kemudian dimasukkan ke dalam buffer untuk selanjutnya di hancurkan menggunakan *micropesle* dan diproses menggunakan kit *Wizard SV Total RNA Isolation System* (Promega®).

Analisis Ekspresi Gen

Untuk menganalisis ekspresi gen *Drs* (Drosomycin), *Dpt* (Diptericin), *totA* (Turandot A), dan *Upd3* (unpaired 3), digunakan metode real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (real

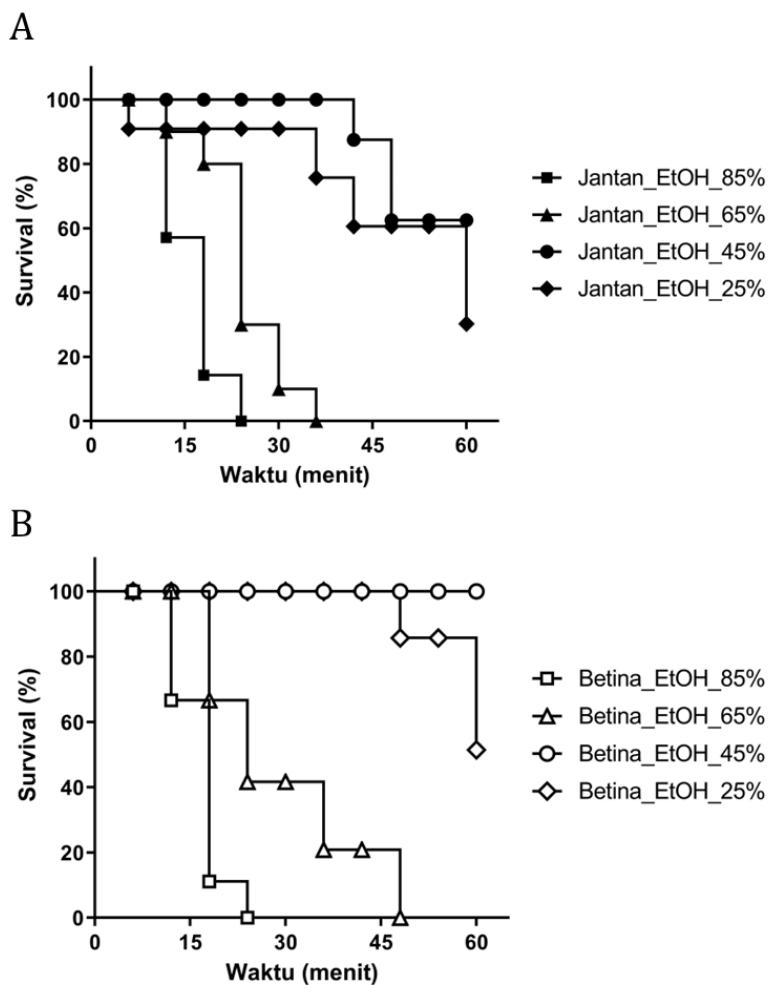
time RT-PCR). Eksperimen ini dilakukan dengan menggunakan kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega®) dengan menggunakan satu set primer *Drs* (5' - TTG TTC GCC CTC TTC GCT GCT CT - 3' untuk forward primer dan 5' - GCA TCC TTC GCA CCA GCA CTT AC - 3' untuk reverse primer), satu set primer *Dpt* (5' - GTT CAC CAT TGC CGT CGC CTT AC - 3' untuk forward primer dan 5' - CCT CCT ATA CCT GTC GTG AAC CC - 3' untuk reverse primer), satu set primer *totA* (reverse primer 5'-GAATAGCCCAGCATAGAGGAC-3' dan forward primer 5'-CCAAATGAATTCTTCAACTGCT-3'), dan satu set primer *Upd3* (reverse primer 5'-GCCCGTTGGTTCTGTAGAT-3' dan forward primer 5'-ACTGGGAGAACACCTGCAAT-3'). Sebagai kontrol internal, maka digunakan satu set primer housekeeping gene *rp49* (*rp49* forward primer: 5'-AGATCGTGAAGAACGCGCACCAAG-3' and *rp49* reverse primer: 5'-CACCAAGGA ACTTCTTGAATCCGG-3'). Reaksi real time RT-PCR dilakukan di dalam tube qPCR dengan volume 10 µL menggunakan mesin RotorGene Q (Qiagen) dengan running profile sebagai berikut: 37°C selama 15 menit, 95°C selama 10 menit, dan 40 rangkaian siklus PCR dimana satu siklus terdiri dari 95°C selama 10 detik, 60°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Setelah 40 siklus usai, kemudian diikuti oleh melt curve analysis dari 60°C hingga 95°C. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode kuantifikasi relatif (relative quantification).

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam eksperimen *survival* diproses menggunakan pendekatan Kaplan-Meier yang dilanjutkan dengan analisis Log-Rank. Data yang diperoleh dalam eksperimen *real time* RT-PCR dianalisis menggunakan Q-Gene dan dilanjutkan dengan One-Way Anova menggunakan GraphPad Prism® 8. Semua analisis statistik dipresentasikan dalam nilai rata-rata (mean) ± standar deviasi (S.D.). Nilai *p values* yang lebih kecil dari 0.05 ditandai sebagai signifikan.

Hasil dan Diskusi

Berdasarkan hasil uji *survival* *D. melanogaster* genotip *w¹¹¹⁸* jantan dan betina yang dipaparkan etanol dengan konsentrasi 25%, 45%, 65% dan 85% (**Gambar 1**) terlihat bahwa baik lalat jantan maupun lalat betina mengalami kematian akibat pemaparan etanol pada berbagai konsentrasi dan tingkat kematian berbanding lurus dengan konsentrasi etanol yang digunakan (*concentration-dependent effect*) (**Gambar 1**). Namun, hasil analisis lebih lanjut memperlihatkan bahwa waktu kematian lalat jantan dan betina berbeda secara signifikan.

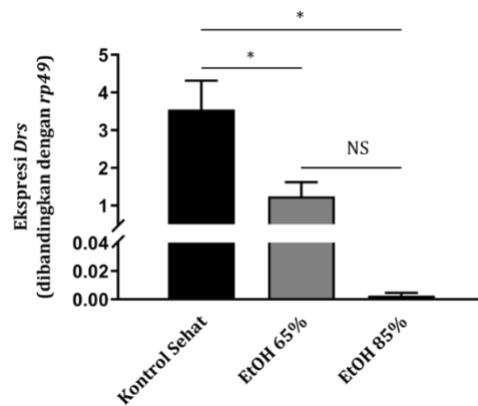


Gambar 1. Survival *Drosophila melanogaster* *w*¹¹¹⁸ jantan (A) dan betina (B) yang dipaparkan etanol pada berbagai varian konsentrasi. EtOH, etanol

Drosophila jantan mengalami kematian lebih cepat dibandingkan dengan *Drosophila* betina, setelah pemaparan etanol pada konsentrasi 25%, 45% dan 65% namun tidak pada konsentrasi 85%, mengindikasikan bahwa etanol menyebabkan penurunan survival dan tergantung pada jenis kelamin (*sex-dependent*) dan tergantung pada konsentrasi (*concentration-dependent*). Efek negatif etanol juga terlihat pada mamalia dan hal ini juga bergantung pada jenis kelamin (REF), seperti yang terlihat pada penelitian ini. Hal tersebut pun didukung oleh hasil analisis farmakokinetik bahwa peningkatan konsentrasi etanol pada betina dapat meningkatkan laju absorpsi atau menurunkan laju metabolisme etanol dan begitupun sebaliknya (19).

Selain dari segi perbedaan seksual, peningkatan waktu kematian juga tergantung pada konsentrasi

etanol yang dipaparkan, semakin tinggi konsentrasi etanol maka semakin dini waktu kematian (**Gambar 1**). Tingginya tingkat kematian yang terjadi dapat disebabkan oleh banyak hal, salah satunya adalah meningkatnya jumlah sel yang mengalami apoptosis (9). Penelitian sebelumnya telah menyebutkan bahwa etanol menyebabkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang kemudian menginduksi terjadinya apoptosis pada sel (7). Hal ini pun terjadi pada penelitian dengan menggunakan hewan uji tikus dimana etanol dapat mengaktifasi jalur apoptosis sekaligus meningkatkan pembentukan autofagosom yang berperan dalam proses autotrofia sebagai respon terhadap stress yang terjadi pada sel (8). Sel yang mengalami apoptosis dan gagal dibersihkan melalui proses fagositosis kemudian berlanjut mengalami nekrosis dan melepaskan DAMPs yang dapat mengaktifasi sistem imun *Drosophila* (20,21).



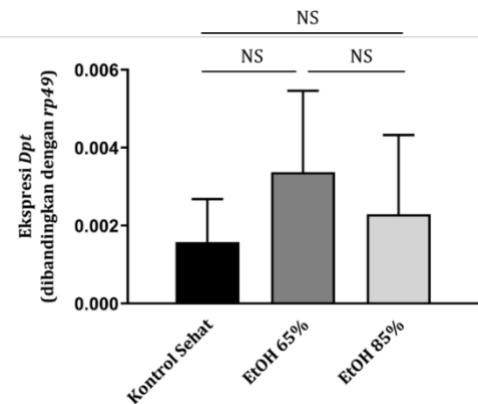
Gambar 2. Level ekspresi gen *Drosomycin* (*Drs*) pada *Drosophila melanogaster* *w¹¹¹⁸* dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; *, P < 0.05; NS, P > 0.05

Untuk menganalisis apakah pemaparan etanol dapat meningkatkan aktivasi sistem imun, maka analisis ekspresi gen sistem imun *Drosophila* pada tiga jalur utama yaitu jalur *Toll*, *Imd* dan *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) pun dilakukan. Pada jalur *Toll*, diperoleh hasil ekspresi gen *Drs* (**Gambar 2**) pada *Drosophila* yang terpapar etanol konsentrasi 85% memiliki ekspresi *Drs* yang lebih rendah dibandingkan dengan *Drosophila* yang dipaparkan etanol konsentrasi 65% dengan perbedaan yang signifikan.

Hal tersebut dapat terjadi karena, pada konsentrasi tinggi etanol dapat menekan aktivasi sistem imun (4,22). Sehingga dapat dikatakan bahwa pada kondisi stres dikarenakan paparan etanol, gen *Drs* mengalami supresi, dan dapat menurunkan survival *Drosophila* serta menyebabkan kematian. Hal tersebut berbanding terbalik dengan hipotesis peneliti, ekspresi gen *Drs* meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi etanol yang memicu aktivasi sistem imun berlebih dan menyebabkan kematian. Oleh karena itu, untuk mengkonfirmasi hal

tersebut perlu dilakukan eksperimen lanjutan menggunakan mutan *Toll Pathway*.

Analisis ekspresi gen jalur *Imd*, yakni gen *Dpt* (*Diptericin*), memberikan hasil bahwa ekspresi gen *Dpt* pada *Drosophila* yang dipaparkan etanol 85% dan 65% tidak berbeda dengan hasil yang diperoleh pada kelompok kontrol tanpa perlakuan (**Gambar 3**). Hasil tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi gen *Dpt* tidak mengalami perubahan akibat paparan etanol. Sebelumnya, telah dilaporkan bahwa stimulasi gen *Dpt* mampu meningkatkan kemampuan *survival* *Drosophila* dengan cara meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, sehingga mampu menghambat peningkatan ROS. Tetapi, secara umum alkohol diketahui sebagai suatu senyawa yang berkontribusi dalam peningkatan ROS yang berujung pada stress oksidatif (7). Berdasarkan hal tersebut peneliti berasumsi bahwa pada stres yang terjadi akibat paparan etanol dapat menyebabkan peningkatan ekspresi gen *Dpt* untuk menekan produksi ROS berlebih. Untuk mengkonfirmasi hal tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan mutan *Imd pathway*.

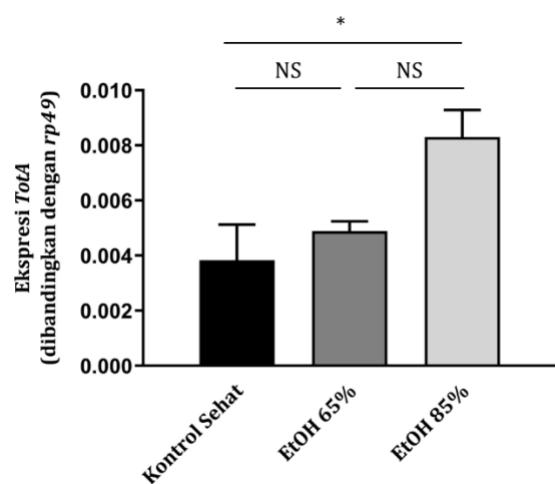


Gambar 3. Level ekspresi gen *Diptericin* (*Dpt*) pada *Drosophila melanogaster* *w¹¹¹⁸* dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; NS = non signifikan

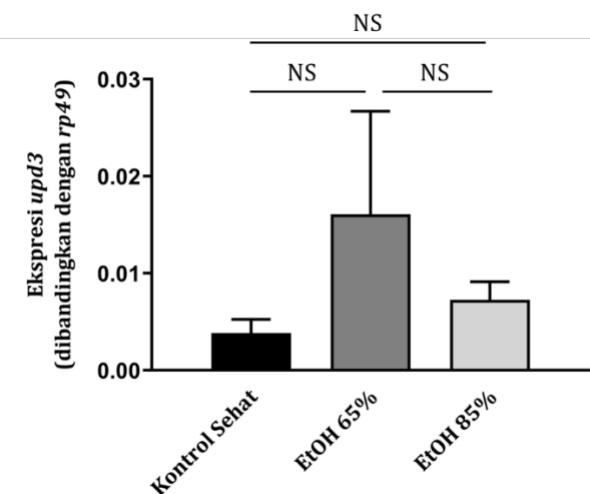
Lebih lanjut, analisis ekspresi gen pada jalur JAK-STAT yakni gen *TotA* (*Turandot A*) (**Gambar 4**) dan gen *upd3* (*unpaired 3*) (**Gambar 5**) memperlihatkan bahwa ekspresi gen *TotA* mengalami peningkatan namun tidak dengan *upd3* setelah pemaparan etanol pada konsentrasi 85%. Sehingga, kemungkinan aktivasi gen *TotA* tidak terjadi melalui jalur *canonical* yang diperantara oleh *upd3*. *TotA* merupakan salah satu *family* gen Turandot dimana gen *TotA* merespon terhadap infeksi bakteri dan fungi, *cold* dan *oxidative stress*, bahan yang mengoksidasi, *aging*, radiasi, luka dan paparan UV yang mampu mengaktifasi sistem imun (23-27). Etanol merupakan salah satu senyawa yang dapat menyebabkan stres pada *Drosophila* dan dibuktikan melalui data yang diperoleh. Etanol pada konsentrasi tinggi kemungkinan menyebabkan

peningkatan ROS kemudian menginduksi kematian atau apoptosis. Selanjutnya, kematian pada jalur apoptosis direspon oleh sitokin, yaitu *Upd3* (pada *Drosophila*) yang kemudian berikatan pada *Dome* dan menginduksi gen *TotA* (23).

Melalui studi ini, sejumlah pertanyaan telah terjawab. Etanol memberikan efek negatif pada kelangsungan hidup *Drosophila* dan hal ini tampaknya tergantung pada jenis kelamin (*sex-dependent*) serta konsentrasi etanol yang digunakan (*concentration-dependent*). Selain itu, lalat buah yang dipaparkan dengan etanol pada konsentrasi tinggi dan letal mengalami malfungsi dalam imunitas: supresi jalur Toll dan induksi pada jalur JAK-STAT.



Gambar 4. Level ekspresi gen *Turandot A* (*TotA*) pada *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸* dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; *, P < 0.05; NS, Non signifikan



Gambar 5. Level ekspresi gen *Unpaired* (*Upd3*) pada *Drosophila melanogaster w¹¹¹⁸* dengan atau tanpa paparan etanol pada konsentrasi 65% dan 85%. EtOH, etanol; NS = non signifikan

Namun, perlu untuk dipahami bahwa studi ini masih menyisakan beberapa pertanyaan yang belum terjawab. Bagaimana mekanisme etanol dapat menyebabkan supresi jalur Toll namun tidak memberikan pengaruh apapun pada jalur Imd? Atau, apakah ada koordinasi antara gen-gen yang berada pada jalur Toll, Imd, dan JAK-STAT dalam kaitannya dengan penurunan *survival* akibat pemaparan etanol.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa paparan etanol menurunkan *survival* *D. melanogaster*, mungkin terjadi akibat peningkatan stres pada sel yang ditandai dengan peningkatan level ekspresi *TotA* namun tidak dengan ekspresi *upd3*, mengindikasikan bahwa kemungkinan terdapat jalur lain yang mengaktifasi *TotA*, tidak melalui perantaraan *Upd3*. Selain itu, analisis gen sistem imun *Drosophila* menunjukkan bahwa ekspresi gen *Drs* dan *Dpt* memiliki perbedaan nyata: terjadi penurunan ekspresi gen *Drs* namun tidak disertai perubahan ekspresi gen *Dpt* pasca pemaparan etanol.

Ucapan Terima Kasih

Penulis ingin berterima kasih kepada Prof. Yoshinobu Nakanishi (Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Japan) atas kesediaanya memberikan lalat buah *D. melanogaster* yang digunakan dalam penelitian ini. Penulis juga ingin menghaturkan rasa terima kasih kepada Prof. Elly Wahyudin (Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin) dan dr. Isra Wahid, Ph.D (Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin) atas bantuannya dalam memfasilitasi penggunaan berbagai fasilitas peralatan penelitian.

Referensi

1. Hasin DS, Grant BF. The National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC) Waves 1 and 2: review and summary of findings. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 2015, **50**, 1609-1640, doi:10.1007/s00127-015-1088-0.
2. Boschuetz N, Cheng S, Mei L, Loy VM. Changes in Alcohol Use Patterns in the United States During COVID-19 Pandemic. *Wmj* 2020, **119**, 171-176.
3. Ratna A, Mandrekar P. Alcohol and Cancer: Mechanisms and Therapies. *Biomolecules* 2017, **7**, doi:10.3390/biom7030061.
4. Romeo J, Wärnberg J, Nova E, Díaz LE, Gómez-Martinez S, Marcos A. Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. *Br J Nutr* 2007, **98 Suppl 1**, S111-115, doi:10.1017/s0007114507838049.
5. Szabo G, Saha B. Alcohol's Effect on Host Defense. *Alcohol Res* 2015, **37**, 159-170.
6. Mooren, FC. Janus Kinases (JAK). In *Encyclopedia of Exercise Medicine in Health and Disease*, Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2012; 10.1007/978-3-540-29807-6_4306pp. 497-497.
7. Chen P, Tu X, Akdemir F, Chew SK, Rothenfluh A, Abrams JM. Effectors of alcohol-induced cell killing in *Drosophila*. *Cell Death Differ* 2012, **19**, 1655-1663, doi:10.1038/cdd.2012.47.
8. Li C, Li J, Xu G, Sun H. Influence of Chronic Ethanol Consumption on Apoptosis and Autophagy Following Transient Focal Cerebral Ischemia in Male Mice. *Scientific Reports* 2020, **10**, 6164, doi:10.1038/s41598-020-63213-2.
9. Cohen JI, Roychowdhury S, DiBello PM, Jacobsen DW, Nagy LE. Exogenous thioredoxin prevents ethanol-induced oxidative damage and apoptosis in mouse liver. *Hepatology* 2009, **49**, 1709-1717, doi:10.1002/hep.22837.
10. Arandjelovic S, Ravichandran KS. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat Immunol* 2015, **16**, 907-917, doi:10.1038/ni.3253.
11. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016, **1863**, 2977-2992, doi:10.1016/j.bbampcr.2016.09.012.
12. Nainu, F. Review : Penggunaan *Drosophila melanogaster* Sebagai Organisme Model Dalam Penemuan Obat. *Jurnal Farmasi Galenika* 2018, **4**, 50-67, doi:10.22487/j24428744.2018.v4.i1.9969.
13. Nainu F, Nakanishi Y, Shiratsuchi A. Fruit fly as a model organism in the study of human diseases and drug discovery. *Journal of Center for Medical Education Sapporo Medical University* 2019, 21-32.
14. Nainu F, Asri RM, Arsyad A, Manggau MA, Amir MN. *In vivo* antibacterial activity of

- green algae *Ulva reticulata* against *Staphylococcus aureus* in *Drosophila* model of infection. *Pharmacognosy Journal* 2018, 10, 993-997, doi:<https://doi.org/10.5530/pj.2018.5.169>.
15. Nainu F, Asri RM, Djide MN, Ahsan M, Arfiansyah R, Sartini S, Alam G. Protective effect of green algae *Ulva reticulata* against *Pseudomonas aeruginosa* in *Drosophila* infection model. *HAYATI Journal of Biosciences* 2019, 26, 163-171, doi:<https://doi.org/10.4308/hjb.26.4.%25x>.
16. Nainu F, Djide MN, Subehan S, Sartini S, Roska TP, Salim E, Kuraishi T. Protective Signatures of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Calyx Fractions against *Staphylococcus aureus* in *Drosophila* Infection Model. *HAYATI Journal of Biosciences* 2020, 27, 306-313, doi:<https://doi.org/10.4308/hjb.27.4.306>.
17. Nainu F, Rahmatika D, Emran TB, Harapan H. Potential application of *Drosophila melanogaster* as a model organism in COVID-19-related research. *Frontiers in Pharmacology* 2020, 11, doi:[10.3389/fphar.2020.588561](https://doi.org/10.3389/fphar.2020.588561).
18. Buchon N, Silverman N, Cherry S. Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat Rev Immunol* 2014, 14, 796-810, doi:[10.1038/nri3763](https://doi.org/10.1038/nri3763).
19. Devineni AV, Heberlein U. Acute ethanol responses in *Drosophila* are sexually dimorphic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109, 21087-21092, doi:[10.1073/pnas.1218850110](https://doi.org/10.1073/pnas.1218850110).
20. Asri RM, Salim E, Nainu F, Hori A, Kuraishi T. Sterile induction of innate immunity in *Drosophila melanogaster*. *FBL* 2019, 24, 1390-1400, doi:[10.2741/4786](https://doi.org/10.2741/4786).
21. Nainu F, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells As an Antiviral Mechanism. *Front Immunol* 2017, 8, 1220, doi:[10.3389/fimmu.2017.01220](https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01220).
22. Roehrs T, Roth T. Sleep, sleepiness, and alcohol use. *Alcohol Res Health* 2001, 25, 101-109.
23. Agaisse H, Perrimon N. The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunol Rev* 2004, 198, 72-82, doi:[10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x](https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0133.x).
24. Brun S, Vidal S, Spellman P, Takahashi K, Tricoire H, Lemaitre B. The MAPKKK Mekk1 regulates the expression of Turandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes Cells* 2006, 11, 397-407, doi:[10.1111/j.1365-2443.2006.00953.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00953.x).
25. Ekengren S, Hultmark D. A family of Turandot-related genes in the humoral stress response of *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 284, 998-1003, doi:[10.1006/bbrc.2001.5067](https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5067).
26. Martin SJ. Cell death and inflammation: the case for IL-1 family cytokines as the canonical DAMPs of the immune system. *Febs j* 2016, 283, 2599-2615, doi:[10.1111/febs.13775](https://doi.org/10.1111/febs.13775).
27. Scholz H, Ramond J, Singh CM, Heberlein U. Functional Ethanol Tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 2000, 28, 261-271, doi:[10.1016/S0896-6273\(00\)00101-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00101-X).

Karakterisasi Morfologis dan Molekuler Varietas Kedelai (*Glycine max*) untuk Identifikasi Bahan Baku Obat Tradisional

Fuad Soegibudiono Wiradjaja¹, Oeke Yunita^{1*}

Artikel Penelitian

Abstract: Many nutrients and active medicinal compounds in soybean (*Glycine max*) reduce the risk of cancer, cardiovascular disease, postmenopausal issues, diabetes, and some neurodegenerative disorders. Soybean protein causes several allergic reactions, which necessitates quality control for traditional medicines and herbal products. Morphological and molecular characterization using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) method were used to control soybean quality. Morphological characterization of 35 soybean varieties from the Research Institute for Various Beans and Tubers (BALITKABI), Malang, East Java, included photos of each variety and seed size, color, hilum color, weight, and special characteristics. RAPD with OPF-3 and OPF-16 primers characterized 35 soybean seed varieties. This study found that morphological characteristics like seed color, hilum color, seed shape, and seed weight are difficult to use to distinguish between varieties, especially if there are no specific features that predominate in these varieties. However, molecular authentication with RAPD can distinguish 35 soybean varieties by the presence of specific polymorphic bands that can only be found in certain varieties.

Keywords: characterization, *Glycine max*, morphology, polymorphism, RAPD

Abstrak: Kedelai (*Glycine max*) mengandung banyak nutrisi dan senyawa aktif berkhasiat obat yang berperan penting dalam mengurangi resiko berbagai jenis kanker, penyakit kardiovaskular, masalah pascamenopause, diabetes, dan beberapa gangguan neurodegeneratif. Beberapa kejadian alergi yang disebabkan oleh protein di dalam kedelai menjadi salah satu pemicu perlunya kontrol kualitas kedelai sebagai bahan baku obat tradisional atau produk herbal. Upaya kontrol kualitas kedelai dilakukan dengan karakterisasi morfologis dan karakterisasi molekuler dengan metode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Karakterisasi morfologis biji kedelai dilakukan pada 35 varietas kedelai dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI), Malang, Jawa Timur, yang mendokumentasikan foto tiap varietas dan karakteristik biji yaitu ukuran dan warna biji, warna hilum, berat biji, dan ciri khusus biji. Karakterisasi molekuler 35 varietas biji kedelai dilakukan dengan menggunakan metode RAPD dengan primer OPF-3 dan OPF-16. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perbedaan ciri morfologis antar varietas, seperti warna biji, warna hilum, bentuk biji, dan bobot biji sulit digunakan untuk mengidentifikasi antar varietas terutama jika tidak ada ciri spesifik yang menonjol pada varietas tersebut, sedangkan autentikasi molekuler dengan RAPD lebih mampu membedakan 35 varietas kedelai yang ditunjukkan dengan adanya pita polimorfik spesifik yang hanya dapat ditemukan pada varietas tertentu.

¹ Laboratory of Pharmaceutical Biology, Faculty of Pharmacy, University of Surabaya.

Korespondensi:

Oeke Yunita
oeke@staff.ubaya.ac.id

Kata kunci: *Glycine max*, karakterisasi, morfologi, polimorfisme, RAPD

Pendahuluan

Kedelai (*Glycine max*) sebagai salah satu bahan baku obat tradisional telah dibuktikan mengandung senyawa isoflavon, fenolik, soyasapogenol, tokoferol (1,2), dengan berbagai aktivitas farmakologis misalnya sebagai antioksidan, antimikroba, immuno-modulator, menurunkan kadar kolesterol (2,3). Bahkan kedelai sebagai “pangan fungsional” dikenal dapat mengurangi risiko berbagai penyakit berbahaya seperti aterosklerosis, osteoporosis, berbagai jenis kanker (kanker payudara, kanker rahim, dan kanker prostat) (4).

Beberapa peneliti mengungkapkan bahwa kedelai mengandung minimal 37 molekul protein yang dapat menimbulkan reaksi alergi pada anak-anak dan perbedaan komposisi protein penyebab alergi (allergen) dapat berasal dari 20 varietas kedelai yang berbeda (5). Penelitian terdahulu menyatakan bahwa 90 kultivar kedelai Brazil menunjukkan adanya perbedaan komposisi protein penyebab alergi yaitu β -conglycinin (6). Hal tersebut menimbulkan adanya kebutuhan kontrol kualitas kedelai yang digunakan sebagai bahan baku obat tradisional atau produk herbal.

Upaya kontrol kualitas bahan baku herbal (tanaman) merupakan upaya krusial dalam menjamin autentifikasi atau kebenaran identitas bahan baku yang dapat berpengaruh selanjutnya pada kualitas, keamanan dan efikasi produk herbal. Upaya tersebut dapat dilakukan dengan pengujian sensoris (pengujian makroskopis-mikroskopis) dan pengujian analitis menggunakan teknik instrumental yang diklasifikasikan menjadi pengujian kandungan kimia menggunakan senyawa penanda (marker) dan/atau pengujian profil senyawa dengan pendekatan metabolomik serta pengujian dengan penanda molekular genetik (DNA) (7,8).

Pengujian dengan penanda molekuler (DNA) yang menggunakan teknik DNA *fingerprinting*, atau dikenal dengan istilah DNA *profiling*, *genetic fingerprinting*, dan DNA *typing*. DNA *fingerprinting* adalah teknik analisis molekuler yang digunakan untuk membedakan individu dari spesies yang sama menggunakan marker/penanda pada DNA. Pada awalnya aplikasi plant DNA *fingerprinting* untuk melakukan identifikasi varietas dan/atau kultivar serta mempertahankan galur *breeding* tanaman, namun pada produksi herbal, pengujian tersebut

juga dapat digunakan untuk kontrol kualitas bahan baku produk herbal, kontrol kualitas bahan herbal selama proses produksi dan identifikasi bahan herbal dalam produk herbal (9).

Polimorfisme DNA tumbuhan dapat dianalisis dengan berbagai metode, salah satunya dengan metode berbasis Polymerase Chain Reaction (PCR). Metode berbasis PCR menghasilkan penanda yang melibatkan amplifikasi *in vitro* dari sebagian urutan DNA dengan bantuan primer spesifik atau acak dan enzim DNA polymerase yang termostabil. Teknik dalam metode ini yang menggunakan primer acak diantaranya Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (7,8).

RAPD adalah modifikasi teknik dari PCR yang menggunakan primer acak tunggal pendek (10 bp) untuk mengamplifikasi DNA genomik total pada suhu annealing yang rendah (37-40°C). Produk amplifikasi (amplikon) yang diperoleh, dipisahkan dan divisualisasikan dengan metode elektroforesis hingga menunjukkan adanya pola larik DNA yang karakteristik (7). Penanda RAPD telah digunakan untuk mengidentifikasi tanaman sebagai bahan baku obat tradisional misalnya *Strychnos ligustrina* (10), *Sauvagesia androgynus* (11), *Eurycoma longifolia* (12), *Aloe* sp. (13), dan *Strychnos minor* (14). RAPD juga dapat mendeteksi mutasi genetik beberapa tanaman misalnya sorghum (15), dan kedelai (16).

Keunggulan RAPD adalah metode ini merupakan analisis kualitatif yang sensitif, cepat dan tidak membutuhkan informasi urutan DNA maupun isotopnya. Metode ini juga tidak membutuhkan DNA dalam jumlah yang banyak dan lebih murah dibandingkan metode lain. Keterbatasan RAPD terletak pada reproduksibilitasnya, namun keterbatasan RAPD tersebut dapat diatasi dengan melakukan optimasi pada metode RAPD (7,9).

Penelitian ini telah melakukan karakterisasi morfologis dan identifikasi penanda RAPD untuk memperoleh pola larik polimorfisme DNA dari beberapa varietas kedelai di Indonesia, yang merupakan tahap awal dari penelitian yang bertujuan untuk memperoleh varietas kedelai hiperalergenik, sehingga kedelai dapat secara aman dikonsumsi sebagai bahan baku dalam obat tradisional.

Bahan dan Metode

Bahan

Varietas kedelai diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi (BALITKABI), Malang, Jawa Timur. Seluruh sampel biji kedelai (*Glycine max*) berasal dari BALITKABI pada hari yang sama. BALITKABI menyediakan 35 varietas kedelai, di mana hanya enam varietas yang merupakan hasil budidaya di BALITKABI, yaitu: Grobongan, Wilis, Burangrang, Anjasmoro, Sinabung dan Ijen, sementara 29 varietas lainnya merupakan koleksi BALITKABI yang diperoleh dari berbagai lokasi di Indonesia, misalnya kedelai varietas Kipas Putih didapatkan dari Aceh. Ekstraksi DNA memerlukan satu set pereaksi dalam kit Nucleospin Plant II, etanol 70%, Water for Injection, buffer TBE, agarosa, etidium bromida, sedangkan amplifikasi DNA dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) memerlukan GoTaq® Green Master Mix 2x, primer RAPD OPF F1-20, loading buffer dan marker 100 bp ladder.

Metode

Karakterisasi Morfologis Biji Kedelai

Sampel biji kedelai diambil pada hari dan lokasi yang sama. Setelah pengambilan sampel, sampel diberi kode yang menunjukkan lokasi dan tanggal pengambilan sampel, dikemas dalam plastik klip, dimasukkan ke dalam box, dan dibawa menuju laboratorium. Selanjutnya sampel disimpan dalam kondisi kering dan tertutup rapat pada lemari pendingin 4°C hingga waktu analisis selanjutnya.

Karakterisasi morfologis biji kedelai dilakukan pada 35 varietas kedelai dengan mendokumentasikan foto tiap varietas dan karakteristik biji yaitu ukuran dan warna biji, warna hilum, berat biji, dan ciri khusus biji.

Karakterisasi Molekuler Biji Kedelai

Sebelum analisis kualitas dan kuantitas DNA dari biji kedelai yang memadai untuk proses amplifikasi PCR – RAPD, dilakukan optimasi dan uji keterulangan, terhadap metode isolasi DNA, baik pada metode CTAB maupun pada kit (17), kemudian dilakukan isolasi DNA dengan metode terpilih, yang diadaptasi dari penelitian sebelumnya (11,18). Isolat diukur kualitas dan kuantitasnya dengan instrumen Nanodrop

Selanjutnya isolat DNA diamplifikasi dengan PCR-RAPD menggunakan primer hasil skrining. PCR-RAPD diawali dengan denaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 35°C selama 1,5 menit dan *extension* pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Tahapan-tahapan tersebut dilakukan sebanyak 44 siklus. Setelah siklus selesai, amplifikasi memasuki tahapan *final extension* dengan menjaga suhu tetap 72°C selama 1,5 menit.

Hasil amplifikasi dielektroforesis dengan gel agarosa dan diamati dengan UV transluminator dan BioDocAnalyze Biometra. Setiap pita DNA yang dihasilkan selanjutnya diberi skor 1 untuk kehadiran pita dan diberi 0 untuk ketidakhadiran pita DNA, kemudian diolah untuk konstruksi dendrogram.

Hasil dan Diskusi

Biji kedelai telah ditanam di BALITKABI pada suhu berkisar 29,3°-29,4°C sesuai dengan suhu optimal untuk pertumbuhan kedelai, yaitu 20°-35°C. Kelembaban udara juga berpengaruh terhadap pertumbuhan biji. Kelembaban yang terukur pada lokasi penanaman di Balitkabi masih kurang optimal untuk pertumbuhan kedelai. Kelembaban optimal berkisar antara 75-90%. Pemberian pupuk dilakukan berdasarkan kondisi tanah untuk memberikan input hara yang sesuai dengan kebutuhan (19).

Berdasarkan hasil wawancara, BALITKABI menggunakan pupuk berjenis pupuk kimia Ponska yang diberikan secara merata pada seluruh varietas yang dibudidayakan untuk meminimalkan keragaman produktivitas tiap tanaman, terutama yang digunakan untuk persilangan yang menghasilkan varietas unggul baru. Sampel biji kedelai yang diperoleh memiliki kondisi lingkungan dan perlakuan yang homogen, sehingga dapat meminimalisasi terjadinya variasi akibat faktor lingkungan dan perlakuan, meski pada penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa tidak ada pengaruh signifikan antara lokasi penanaman daun katuk dengan pola lark DNA yang diperoleh (11).

Seluruh sampel biji kedelai yang diambil dari BALITKABI, diberi kode untuk menghindari terjadinya kemungkinan sampel tertukar. Selain itu, biji dari tiap varietas dikemas secara terpisah untuk meminimalkan terjadinya kontaminasi baik oleh serangga maupun kontaminan lain serta

mencegah terjadinya kontaminasi silang. Sampel biji kedelai juga dikemas dalam wadah tertutup untuk menghindari paparan suhu tinggi pada sampel secara langsung, baik yang disebabkan karena panas dari mesin kendaraan maupun cahaya matahari. Seluruh biji kedelai disimpan dalam lemari pendingin suhu 4°C untuk mencegah kontaminasi serangga serta mempertahankan suhu penyimpanan agar sesuai dengan kondisi penyimpanan pada BALITKABI, di mana seluruh biji disimpan dalam ruang penyimpanan dengan suhu berkisar antara 4°-5°C. Sampel biji kedelai disimpan pada lemari pendingin suhu 4°C juga untuk mempertahankan potensi tumbuh biji serta mencegah perkecambahan biji (20).

Perbedaan ciri morfologis antar varietas, seperti warna biji, warna hilum, bentuk biji, dan bobot biji pada **Gambar 1** dan **Tabel 1**, sulit digunakan untuk mengidentifikasi antar varietas.

Warna biji kedelai sebagian besar adalah kuning dan kuning kehijauan sehingga sangat sulit untuk membedakan antar varietas melalui warna biji (21), kecuali pada varietas tertentu rnisalnya Cikuray yang berwarna hitam. Perbedaan varietas kedelai berdasarkan pengamatan terhadap hilum juga sulit dilakukan

karena meski beberapa varietas memiliki warna hilum yang berbeda mulai dari kuning kecoklatan, coklat, coklat tua, dan putih, namun ukuran hilum cukup kecil, dan cukup banyak varietas dengan warna hilum yang memiliki warna hilum serupa. Ukuran berat biji kedelai juga tidak dapat digunakan untuk membedakan antar varietas kedelai, karena beberapa varietas seperti Cikuray dan Sinabung memiliki bobot yang hampir sama. Hasil optimasi isolasi DNA menunjukkan bahwa metode yang paling optimal untuk isolasi DNA adalah dengan kit Nucleospin yang memberikan kualitas $2,23 \pm 0,012$ dan kuantitas $269,57 \text{ ng}/\mu\text{l} \pm 6,853$.

Isolasi DNA dilakukan dengan kit Nucleospin Plant II. Kualitas DNA biji kedelai yang didapatkan berkisar antara 2,041- 2,651, dengan kualitas DNA paling murni diperoleh pada varietas Anjasmoro. Kualitas DNA hasil isolasi yang didapatkan masih kurang murni karena DNA hasil isolasi dikatakan murni apabila hasil perbandingan absorbansi $\lambda 260 \text{ nm}/\lambda 280 \text{ nm}$ memberikan nilai berkisar antara 1,8-2,0, namun orientasi penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa isolat DNA masih dapat digunakan untuk PCR-RAPD.



Gambar 1. Ragam karakter morfologis biji dari 35 varietas kedelai (*Glycine max*)

- 1: (a) Anjasmoro, (b) Gomitir, (c) Gepak Hijau, (d) Sinabung, (e) Cikuray, (f) Ringgit, (g) Kipas Putih
- 2: (a) Ijen, (b) Merbabu, (c) Tanggamus, (d) Lokon, (e) Muria, (f) Kerinci, (g) Burangrang
- 3: (a) Argomulyo, (b) Dieng, (c) Kawi, (d) Tidar, (e) Jaya Wijaya, (f) Manalagi, (g) Argopuro
- 4: (a) Detam 1, (b) Detam 2, (c) Lumajang Bewok, (d) Mahameru, (e) Panderman, (f) Wilis, (g) Kaba
- 5: (a) Davros, (b) Krakatau, (c) Gepak Kuning, (d) Malabar, (e) Petek, (f) Sindoro, (g) Bromo

Tabel 1. Karakteristik morfologis biji dari 35 varietas *kedelai (Glycine max)*

No	Varietas	Umur panen (hari)	Karakteristik Biji Kedelai				
			Ukuran Biji (mm)	Warna Biji	Warna Hilum	Berat 5 biji (mg)	Ciri-ciri Khusus
1	Anjasmoro	82,5-92,5	7-9	Kuning	Kuning kecoklatan	738,2	Bulat agak gepeng
2	Gumitir	81	5-7	Kuning agak hijau	Coklat	508,1	Agak bulat
3	Gepak Hijau	76	5-7	Kuning muda kehijauan	Coklat	306,9	Agak bulat gepeng
4	Sinabung	88	8-10	Kuning	Coklat	553,6	Lonjong
5	Cikuray	82-85	6-7	Hitam mengkilat	Putih	532,1	Bulat
6	Ringgit	85-90	4-7	Kuning	Coklat tua	407,4	Bulat gepeng
7	Kipas Putih	85-90	7-8	Kuning	Coklat muda	607,6	Bulat telur
8	Ijen	83	7-8	Kuning agak mengkilat	Coklat	584,1	Lonjong
9	Merbabu	85	5-8	Coklat	Coklat	551,7	Lonjong
10	Tanggamus	88	7-9	Kuning	Coklat tua	461,5	Lonjong
11	Lokon	75-80	6-8	Kuning jerami	Coklat	618,9	Bulat telur agak pipih
12	Muria	88	8-9	Kuning	Coklat tua	875,8	Bulat telur agak pipih
13	Kerinci	87	4-6	Kuning	Coklat tua	408,7	Agak bulat, pipih
14	Burangrang	80-82	9-11	Kuning	Putih terang	659,7	Bulat telur
15	Argomulyo	80-82	8-11	Kuning	Putih terang	873,4	Lonjong
16	Dieng	74-78	5-6	Kuning kehijauan	Coklat tua	226,7	Agak bulat
17	Kawi	88	7-8	Kuning	Putih	536,1	Bulat telur
18	Tidar	75	5-7	Kuning kehijauan	Coklat tua	308,1	Lonjong
19	Jaya Wijaya	84-87	6-8	Kuning pucat	Coklat kehitaman	411,5	Bulat telur
20	Manalagi	84	7-8	Kuning	Putih	445,9	Bulat telur
21	Argopuro	84	8-10	Kuning	Coklat muda	770,7	Bulat
22	Detam 1	84	7-8	Hitam	Putih	548,7	Agak bulat mengkilat
23	Detam 2	82	6-8	Hitam	Coklat	628,6	Lonjong kusam
24	Lumajang Bewok	75-80	7-8	Kuning	Coklat	450,6	Lonjong
25	Mahameru	83,5-94,8	8-11	Kuning	Kuning kecoklatan	746,9	Bulat telur pipih
26	Panderman	85	9-10	Kuning muda	Coklat tua	891	Agak bulat
27	Wilis	87	5-8	Kuning	Coklat tua	438,1	Lonjong agak pipih
28	Kaba	85	7-8	Kuning	Coklat	548,6	Lonjong
29	Davros	80-85	6-8	Kuning pucat	Coklat muda	368,2	Lonjong agak pipih
30	Krakatau	82-85	7-8	Kuning	Coklat muda	535,1	Bulat telur pipih
31	Gepak Kuning	73	7-8	Kuning muda kehijauan	Coklat	335,4	Bulat telur
32	Malabar	70	8-10	Kuning mengkilat	Coklat	675,8	Bulat telur agak pipih
33	Petek	75	7-8	Kuning bersih	Coklat	524,7	Bulat telur
34	Sindoro	86	5-7	Coklat	Hitam	340,2	Bulat
35	Bromo	85	9-11	Kuning mengkilat	Coklat muda	758,7	Bulat telur

Konsentrasi DNA biji kedelai yang diperoleh bervariasi dari 214,167 ng/μl pada varietas Kerinci hingga 863,067 ng/μl yang diperoleh dari varietas Cikuray. Konsentrasi DNA tersebut dapat digunakan untuk PCR-RAPD, karena PCR memerlukan 5-25 ng DNA, sementara template DNA yang digunakan sebanyak 9 μl (22).

Kuantitas DNA isolat yang diperoleh menggunakan Kit Nucleospin secara keseluruhan lebih tinggi dibandingkan isolasi DNA yang menggunakan metode konvensional (10, 18). Hal ini diduga karena adanya kolom Nucleospin hijau pada kit. Nucleospin hijau ini terdiri dari kolom dengan fase diam silika yang dapat menahan DNA melalui terbentuknya ikatan antara DNA dengan silika (23).

Tingginya kuantitas isolat DNA juga disebabkan karena tahapan elusi dengan penambahan buffer elusi yaitu PE. Berdasarkan hasil optimasi penambahan PE dilakukan dua tahap elusi masing-masing 25 μl. Tahapan elusi yang dilakukan dua kali biasanya menghasilkan DNA yang lebih banyak dibandingkan dengan elusi yang dilakukan satu kali dengan volume total yang sama (17, 23).

Amplifikasi DNA biji kedelai dilakukan untuk memperbanyak fragmen DNA yang berkomplemen dengan primer RAPD yang digunakan. Larutan isolat DNA diamplifikasi dengan teknik PCR menggunakan arbitrary primer atau Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Teknik ini dipilih karena cukup sederhana dan dapat dikerjakan dalam waktu yang relatif singkat (7, 9).

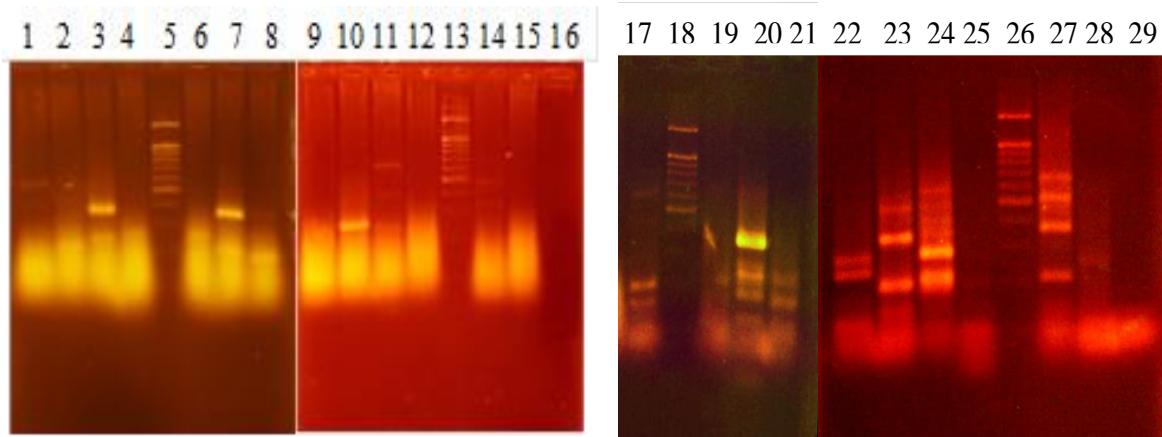
Sebelum melaksanakan amplifikasi DNA, dilakukan tahap skrining primer RAPD dalam kit OPF F1-20 dengan hasil pada **Gambar 2**. Hal ini

dilakukan untuk memilih primer mana yang dapat menempel secara optimal pada DNA biji kedelai sehingga mampu melakukan amplifikasi DNA kedelai dan memberikan pola larik pita DNA (*DNA fingerprint*) yang mampu menunjukkan pola polimorfisme antar sampel. Berdasarkan hasil skrining primer yang telah dilakukan, salah satu primer yang terpilih adalah OPF-3 (5'-CCT GAT CAC C-3') dan OPF-16(5'-GGA GTA CTG G-3'). Hal ini melengkapi studi terkait RAPD pada mutan kedelai pada penelitian dengan metode serupa dengan kit primer OPA (16).

Primer OPF-3 dan OPF-16 menjadi salah satu primer yang dipilih, karena menghasilkan cukup banyak pita (4-12 pita) di mana penelitian serupa (16) menunjukkan adanya 3-8 pita hasil amplifikasi DNA mutan kedelai dengan primer kit OPA. Pemilihan primer juga berdasarkan adanya variasi ukuran molekul DNA yang diduga sebagai pita polimorfik.

Pita polimorfik dapat digunakan untuk membedakan kedelai varietas yang satu dengan varietas yang lain, serta menjadi penanda (*biomarker*) yang spesifik bagi varietas tertentu. Selain itu, pita yang dihasilkan cukup tebal atau jelas, yang menunjukkan bahwa hasil amplifikasi DNA terdapat dalam jumlah yang cukup banyak (11).

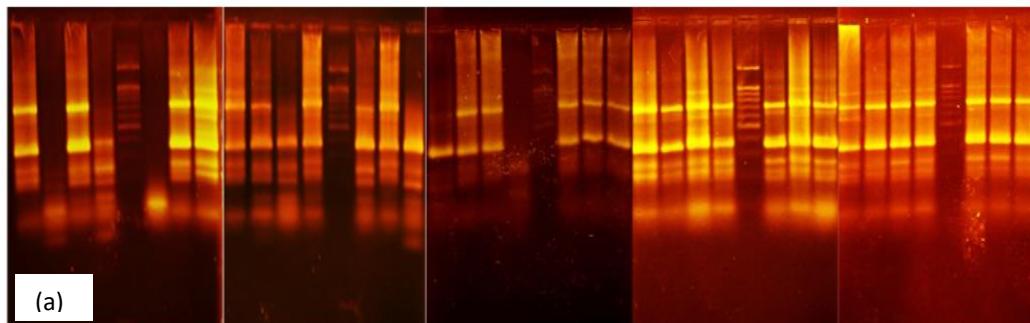
Ketiga puluh lima varietas yang diamplifikasi memberikan beberapa larik DNA dengan berbagai ukuran pasang basa. Keanekaragaman ukuran pasang basa pada primer yang sama dapat terjadi karena perbedaan panjang dan urutan primer RAPD yang digunakan untuk mengamplifikasi fragmen DNA kedelai, yaitu OPF-3 dan OPF-16.



Gambar 2. Hasil skrining primer PCR RAPD

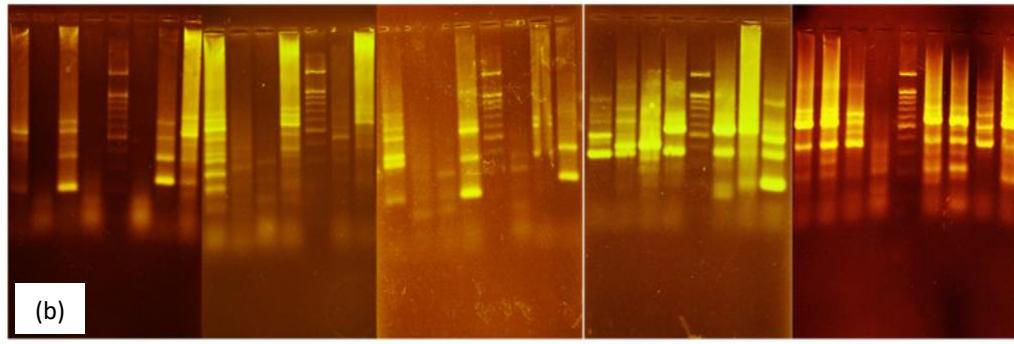
1 = OPF-01	2 = OPF-01	3 = OPF-03	4 = OPF-04	5 = marker	6 = OPF-05
7 = OPF-06	8 = OPF-07	9 = OPF-08	10 = OPF-09	11 = OPF-10	12 = OPF-11
13 = marker	14 = OPF-13	15 = OPF-14	16 = OPF-15	17 = OPF-01	18 = marker
19 = OPF-02	20 = OPF-03	21 = OPF-04z	22 = OPF-05	23 = OPF-06	24 = OPF-07
25 = OPF-15	26 = marker	27 = OPF-16	28 = OPF-17	29 = OPF-18	

1 2 3 4 m 5 6 7 8 9 10 11 m 12 13 14 15 16 17 18 m 19 20 21 22 23 24 25 m 26 27 28 29 30 31 32 m 33 34 36



(a)

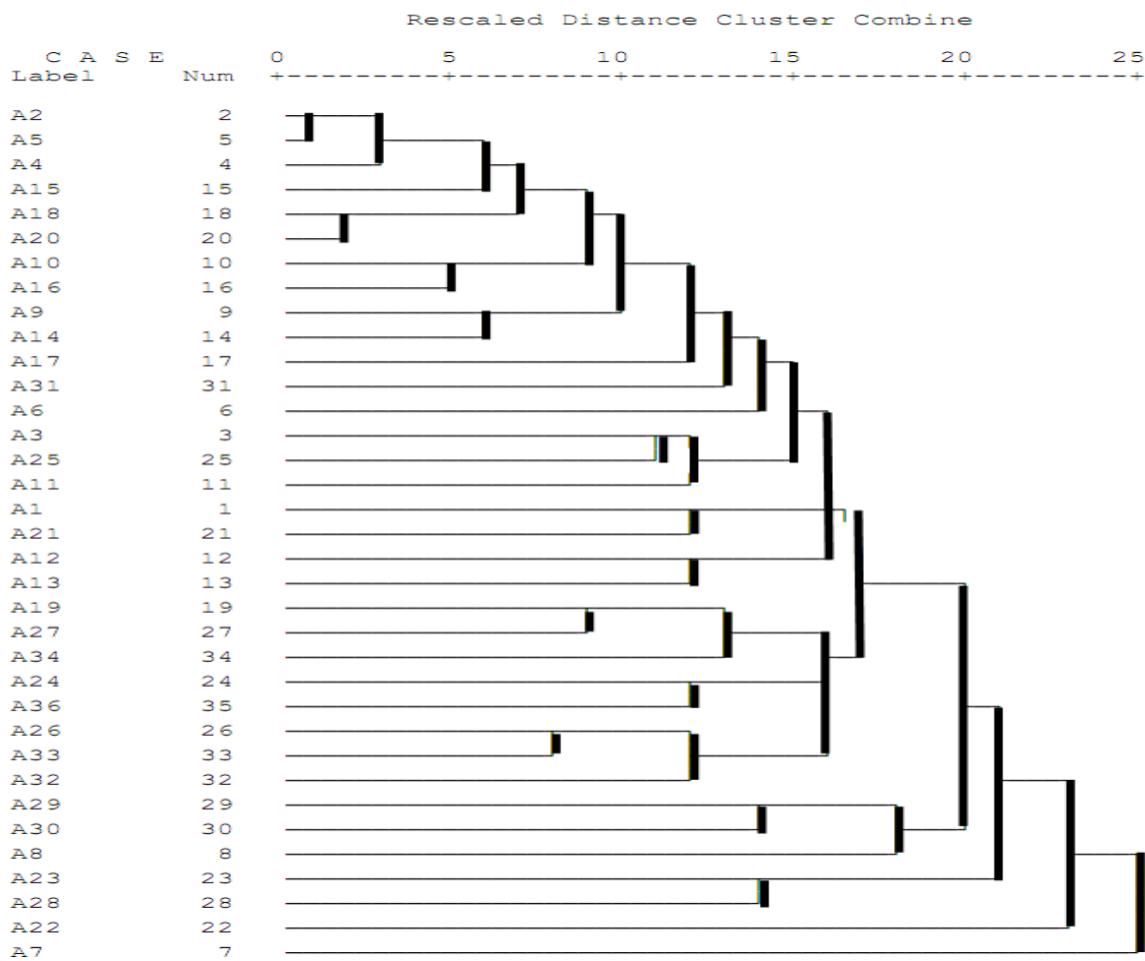
1 2 3 4 m 5 6 7 8 9 10 11 m 12 13 14 15 16 17 m 18 19 20 21 22 23 24 m 25 26 27 28 29 30 31 m 32 33 34 36



(b)

Gambar 3. Hasil amplifikasi PCR 35 varietas biji kedelai dengan primer (a) OPF-3 dan (b) OPF-16

1 = Anjasmoro	6 = Ringgit	12 = Muria	18 = Tidar	24 = Lumajang Bewok	30 = Krakatau
2 = Gomitir	7 = Kipas Putih	13 = Kerinci	19 = Jaya Wijaya	25 = Mahameru	31 = Gepak Kuning
3 = Gepak Hijau	8 = Ijen	14 = Burangrang	20 = Manalagi	26 = Panderman	32 = Malabar
4 = Sinabung	9 = Merbabu	15 = Argomulyo	21 = Argopuro	27 = Wilis	33 = Petek
m = marker	10 = Tanggamus	16 = Dieng	22 = Detam 1	28 = Kaba	34 = Sindoro
5 = Cikuray	11 = Lokon	17 = Kawi	23 = Detam 2	29 = Davros	36 = Bromo



Gambar 4. Dendrogram 35 varietas biji kedelai

A1 = Anjasmoro, A2 = Gomitir, A3 = Gepak Hijau, A4 = Sinabung, A5 = Cikuray, A6 = Ringgit , A7 = Kipas Putih, A8 = Ijen, A9 = Merbabu, A10 = Tanggamus, A11 = Lokon, A12 = Muria, A13 = Kerinci, A14 = Burangrang, A15 = Argomulyo, A16 = Dieng, A17 = Kawi, A18 = Tidar, A19 = Jaya Wijaya, A20 = Manalagi, A21 = Argopuro, A22 = Detam 1, A23 = Detam 2, A24 = Lumajang Bewok, A25 = Mahameru, A26 = Panderman, A27 = Wilis, A28 = Kaba, A29 = Davros, A30 = Krakatau, A31 = Gepak Kuning, A32 = Malabar, A33 = Petek, A34 = Sindoro, A36 = Bromo

Perbedaan jenis primer yang digunakan akan mengamplifikasi DNA pada lokasi yang berbeda-beda pada genom, sehingga menimbulkan berbagai pita dalam pola larik DNA

Primer RAPD yang berukuran pendek, memungkinkan terjadinya proses amplifikasi di berbagai lokasi genom. Semakin pendek urutan fragmen DNA yang diamplifikasi, maka produk hasil amplifikasi memiliki ukuran molekul yang relatif kecil, sehingga saat dielektroforesis dengan gel agarosa, akan cenderung berada mendekati daerah anoda. Apabila fragmen DNA yang diamplifikasi semakin panjang, maka hasil amplifikasi akan memiliki ukuran molekul DNA

yang relatif besar, yang ditunjukkan dengan adanya pita DNA yang masih terletak pada daerah katoda. Primer yang tidak dapat mengamplifikasi DNA cenderung bergerak ke muatan positif (anoda) lebih cepat, sehingga ketika diwarnai dengan etidium bromide tampak mengelompok ke arah anode (9).

PCR-RAPD terhadap 35 varietas kedelai dengan primer OPF-3 dan OPF-16 mampu menunjukkan adanya pita polimorfik spesifik (5,6%) yang hanya dapat ditemukan pada varietas tertentu. Hal ini menunjukkan bahwa kedua jenis primer tersebut masih mampu memberikan pola larik polimorfisme, yang

mampu membedakan beberapa sampel varietas kedelai di Indonesia.

Pita monormofik, yang dapat menjadi marker spesifik untuk spesies kedelai, belum dapat dijumpai pada hasil PCR-RAPD dari 35 varietas kedelai. Hal ini disebabkan karena keterbatasan jenis primer RAPD yang digunakan dalam mengamplifikasi fragmen DNA sampel kedelai.

Dendrogram pada **Gambar 4**, yang dikonstruksi dari pita-pita DNA dalam pola larik yang dihasilkan dari PCR-RAPD ke-35 varietas kedelai menunjukkan adanya kemampuan metode PCR-RAPD dalam membedakan berbagai varietas kedelai, sehingga metode ini dapat mendukung autentikasi varietas kedelai secara morfologis. Hasil PCR-RAPD yang disajikan dalam dendrogram tersebut, mampu menunjukkan tingkat kemiripan antara satu varietas kedelai dengan varietas kedelai lainnya secara lebih teliti pada level genomik, yang relatif tidak dipengaruhi oleh kondisi geografis dan lingkungan tempat tumbuh serta perlakuan paska panen.

Hasil penelitian ini berdampak positif terhadap upaya kontrol kualitas bahan baku herbal dan bahan alam sebagai tahap krusial dalam menjamin autentikasi atau kebenaran identitas bahan baku yang dapat berpengaruh selanjutnya pada kualitas, keamanan dan efikasi produk herbal. Karakterisasi molekuler terhadap bahan baku obat tradisional dapat bersifat species-specific walaupun bahan baku tersebut awalnya sulit dibedakan dengan pengujian berdasarkan karakteristik morfologi, anatomi maupun kandungan kimia, tidak dipengaruhi kondisi lingkungan, pengujian dalam waktu relatif singkat pada sampel dalam jumlah minimal, dan pengujian dapat dilakukan pada bahan baku yang telah diproses menjadi serbuk (7, 8). Pada penelitian selanjutnya terhadap komposisi protein yang bersifat alergenik pada berbagai varietas kedelai, identifikasi varietas kedelai pada level genomik sangat diperlukan dalam upaya mendeteksi varietas-varietas kedelai yang bersifat hipoalergenik, baik dalam bentuk bahan baku (*raw material*) maupun dalam bentuk produk olahan. Identifikasi tersebut dapat menunjang upaya deteksi varietas kedelai secara morfologis dan kimia karena stabilitas molekul DNA yang relatif tinggi, sehingga DNA kedelai masih dapat terdeteksi pada produk kedelai, yang telah mengalami berbagai proses pengolahan (7).

Kesimpulan

Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode RAPD mampu memberikan pola larik polimorfisme DNA pada 35 varietas biji kedelai di Indonesia. Selain itu, penanda RAPD mampu menunjukkan pola larik polimorfisme pada ke-35 varietas biji kedelai, yang mampu membedakan berbagai varietas, misalnya varietas Gepak Hijau, Cikuray, Ringgit, Kipas Putih, Merbabu, Kerinci, Burangrang, Dieng, Manalagi, Argopuro, Detam-1, Lumajang-bewok, Panderman, Kaba, Gepak Kuning, Sindoro dan Bromo.

Penelitian ini dapat dilanjutkan pada varietas-varietas kedelai yang belum digunakan pada penelitian kali ini. Selain itu, dapat pula digunakan primer-primer jenis kit yang berbeda untuk memperoleh primer yang paling optimal dalam melakukan amplifikasi DNA biji kedelai sehingga diperoleh pola larik baik polimorfik maupun monomorfik.

Pada penelitian selanjutnya untuk skrining hipoalergenik, maka dapat dilakukan isolasi protein pada kedelai yang diduga bertanggungjawab sebagai allergen sehingga mRNA dapat diisolasi dan dapat diperoleh urutan pasang basa yang mengkode protein yang dapat menimbulkan reaksi alergi pada biji kedelai.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih diberikan kepada PT. Indofood Sukses Makmur, Tbk. atas dukungan penelitian melalui Indofood Riset Nugraha serta kepada BALITKABI yang telah mendukung dalam penyediaan 35 sampel varietas kedelai.

Referensi

1. Kim EH, Ro HM, Kim SL, Kim HS, Chung IM. 2012. Analysis of Isoflavone, Phenolic, Soyasapogenol, and Tocopherol Compounds in Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) Germplasms of Different Seed Weights and Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 60(23): 6045-6055.
2. Menaria J, Vaghela JS, Agarwal P, Singune SL, Choudhary A. 2020. Phytoconstituents and Antioxidant Activity of Extracts of *Glycine Max* Seeds. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*; 10(1): 178-183.

3. Ahmad A, Hayat I, Arif S, Masud T, Khalid N, Ahmed. 2014. Mechanisms Involved in the Therapeutics Effects of Soybean (*Glycine max*). *International Journal of Food Properties*; 17: 1332-1354.
4. Ponnusha BS, Subramaniyam S, Pasupathi P, Subramaniyam B, Virumandy R. 2011. Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Glycine max* - A Review. *International Journal of Current Biological and Medical Science*; 1(2): 49-62.
5. Houston NL, Lee DG, Stevenson SE, Ladics GS, Bannon GA, McClain S, et al. 2010. Quantitation of Soybean Allergens using Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*; 1-44.
6. Carrao-Panizzi MC, Kwanyuen P, Erhan SZ, Lopes ION. 2008. Genetic Variation and Environmental Effects on Beta - Conglycinin and Glycinin Content in Brazilian Soybean Cultivars. *Pesq. agropec. bras., Brasília*; 43 (9): 1105-1114.
7. Sheorey RR, Tiwari A. 2011. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for Identification of Herbal Materials and Medicines - A Review. *Journal of Scientific and Industrial Research*; 70: 319-326.
8. Pourmohammad A. 2013. Application of Molecular Markers in Medicinal Plant Studies. *Acta Universitatis Sapientiae Agriculture and Environment*; 5: 80-90.
9. Kumari N, Thakur SK. 2014. Randomly Amplified Polymorphic DNA-A Brief Review. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*; 9(1): 6-13.
10. Yunita O, Kresnamurti A. 2005. Identifikasi Tanaman yang Dijual sebagai *Strychnos ligustrina* di Pasar Tradisional Surabaya dengan Metode Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Berkala Penelitian Hayati; 11(1): 19-24.
11. Yunita O, Sulisetiorini. 2013. DNA Fingerprinting on ITS Region of *Sauvagesia androgynus*' nrDNA from East Java, by Random Amplified Polymorphic DNA Method. Proceeding of The International Conference on Natural Sciences, Shaker-Verlag, Germany, 1-6.
12. Rosmaina Zulfahmi. 2013. Genetic Diversity of *Eurycoma longifolia* Jack Based on Random Amplified Polymorphic DNA Marker. *Jurnal Manajemen Hutan Tropika*; 19(2): 138-144.
13. Ezzat SM, El Sayed AM, Salama MM. 2016. Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique to Study the Genetic Diversity of Eight *Aloe Species*. *Planta Medica*; 82(15): 1381-1386.
14. Arumugam T, Jayapriya G, Sekar T. 2018. Molecular Fingerprinting of the Indian Medicinal Plant *Strychnos minor* Dennst. *Biotechnology Reports*; 21, 1-7.
15. Taryono, Cahyaningrum P, Human S. 2011. The Detection of Mutational Changes in Sorghum using RAPD. *Indonesian Journal of Biotechnology*; 16(1): 66-70.
16. Wahyudi D, Hapsari L, Sundari. 2014. RAPD Analysis for Genetic Variability Detection of Mutant Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*; 5(1): 68-77.
17. Machery-Nagel. 2010. Genomic DNA from Plant User Manual, Neumann-Neander: Machery-Nagel.
18. Yunita O, Setiawan B, Evelyn. 2013. Optimization of DNA Extraction from Seeds and Fresh Leaves of Soybean (*Glycine max*). Proceeding of International Biology Conference (IBOC) 2012: Science for Energy, Food, and Environmental Sustainability, Department of Biology, Faculty of Mathematic and Natural Sciences, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, 141-145.
19. Pitojo S. 2003. Benih Kedelai, Yogyakarta: Kanisius
20. Szczerba A, Plazeck A, Pastuszak J, Przemyslaw K, Hornyak M, Dubert F. 2021. Effect of Low Temperature on Germination, Growth, and Seed Yield of Four Soybean (*Glycine max* L.) Cultivars. *Agronomy*; 11(800): 1-17.
21. Putri PP, Adisyahputra Asadi. 2014. Keragaman Karakter Morfologi, Komponen Hasil, dan Hasil Plasma Nutfah Kedelai (*Glycine max* L.). *Bioma*; 10(2), 1-8.

22. Prana TK, Hartati NS. 2003. Identifikasi Sidik Jari DNA Talas (*Colocasia esculenta* L, Schott) Indonesia dengan teknik RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Skrining Primer dan Optimalisasi Kondisi PCR. *Jurnal Natur Indonesia*; 5(2): 107-112.
23. Yunita O, Rochmawati ID, Fadhilah NA, Benarkah N. 2016. Molecular study of intraspecific differences among *Sauropus androgynus* (L.) Merr. from Indonesia revealed by ITS region variability. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*; 30(6): 1212-1216.

LC-MS Ekstrak Herba Anggrek Macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl. serta Uji Aktivitas Sitotoksik

Christina de Fretes¹, Eva Simaremare¹, Elsy Gunawan¹, Verena Agustini^{2*}, Yusuf Eka Maulana^{3,4}, Nabila Nur Fadhilah⁴

Artikel Penelitian

¹ Program Studi Farmasi,
Jurusan Farmasi, Fakultas
MIPA, Universitas
Cenderawasih Jayapura-
Papua

² Program Studi Biologi,
Fakultas MIPA, Universitas
Cenderawasih Jayapura-
Papua

³ Horticulture Laboratory
Department of Agronomy,
Faculty of agriculture,
Universitas Padjajaran,
Sumedang 45363, Indonesia

⁴ Organic chemistry Program,
Institut Teknologi Bandung,
Jalan Ganesha 10, Bandung
40132, Indonesia

Abstract: Tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) It is one of the plants that are favored among the community as ornamental plants because of its beautiful flowers. Tiger orchids have secondary metabolite compounds of alkaloids, flavonoids, and tannins that can be used as traditional medicine. However, research on tiger orchids in the field of pharmacology is still very limited. The purpose of this study is to find out the content of chemical compounds contained in the herb extract of tiger orchids (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) as well as IC_{50} and concentration of tiger orchid herb extract (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) It most effectively kills shrimp larvae (*Artemia salina* Leach.). The sample used was sampled using 96% ethanol. Tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) pregnant 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalcone, Apigenin-7-O- α -L-rhamnose(1→4)-6"-O-acetyl- β -D-glucoside, Kushenol H, Rubrofusarin, 3-Hydroxy baicalein and Luteolin obtained from the results of the analysis using Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS). The results showed that the herb extract of tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) has cytotoxic activity with an IC_{50} value of 150.96 ppm.

Keywords: tiger orchid (*Grammatophyllum scriptum*), cytotoxic, LCMS, *Artemia salina* larvae

Abstrak: Anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) merupakan salah satu tanaman yang digemari di kalangan masyarakat sebagai tanaman hias karena bunganya yang indah. Anggrek macan memiliki senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid dan tannin yang dapat digunakan sebagai pengobatan tradisional. Namun, penelitian mengenai anggrek macan di bidang farmakologi masih sangat terbatas. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak herba anggrek macan secara LC-MS/MS serta nilai IC_{50} dan konsentrasi dari ekstrak herba Anggrek macan yang paling efektif membunuh larva udang (*Artemia salina* Leach.). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengambilan sampel dari kebun Anggrek yang ada di Lingkungan FMIPA Universitas Cenderawasih Papua-Indonesia, selanjutnya sampel dibuat dalam bentuk simplisia, diekstraksi dengan etil asetat. Ekstrak selanjutnya dianalisis dengan LC-MS/MS dan dari ekstrak tersebut juga dilakukan uji sitotoksik dengan metode BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). Hasil penelitian menunjukkan bahwa anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) mengandung 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalcone, Apigenin-7-O- α -L-rhamnose(1→4)-6"-O-acetyl- β -D-glucoside, Kushenol H, Rubrofusarin, 3-Hydroxy baicalein dan Luteolin yang diperoleh dari hasil analisis menggunakan Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Ekstrak herba anggrek macan memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai IC_{50} 150,96 ppm dengan tergolong kurang toksik.

Korespondensi:

Verena Agustini
verena.agustini@gmail.com

Kata kunci: anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum*), BSLT, sitotoksik, LC-MS, larva *Artemia salina*

Pendahuluan

Provinsi Papua memiliki hutan terluas di Indonesia yaitu 34.209.769 ha, di mana hutan ini memiliki tumbuhan kayu dan non kayu khas yang dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional oleh masyarakat setempat (1). Saat ini, pencarian senyawa baru masa depan beralih ke bahan alam (2). Target tanaman tumbuhan yang menjadi sumber obat baru sekarang banyak beralih ke anggrek yang ternyata sejak dulu sudah digunakan sebagai *etnomedicine* dan obat tradisional (3, 4, 5).

Anggrek diketahui banyak mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, glikosida, karbohidrat dan senyawa fitokimia lainnya sehingga sudah dimanfaatkan sebagai *traditional healing* dan *traditional medicine* (6, 7). Anggrek macan merupakan salah satu tanaman hias dari suku Orchidaceae yang banyak diminati karena bentuk dan warnanya yang unik dan cantik (8). Anggrek macan banyak dijumpai di daerah hutan Timur seperti Maluku (9) dan Papua khususnya di daerah Parai, Distrik Biak Timur, Kabupaten Biak Numfor (wilayah adat Saireri).

Menurut penelitian sebelumnya, anggrek macan (*Grammatophyllum scriptum* (Lindl.) Bl.) berpotensi sebagai obat (10, 11) karena mengandung alkaloid, flavonoid dan tannin (12). Menurut penelitian Coe pada tahun 2010, ekstrak yang mengandung alkaloid berpotensi bersifat sitotoksik yang dapat menyebabkan kematian pada hewan uji larva udang pada konsentrasi LC₅₀ di bawah dari 2000 µg/mL dan ekstrak yang tidak mengandung alkaloid namun berpotensi bersifat sitotoksik disebabkan oleh kandungan terpen pada ekstrak sampel (13). Sejauh ini senyawa aktif yang terdapat dalam tanaman ini belum dilaporkan, sehingga perlu secara terus-menerus mengkaji senyawa aktif yang terkadung di dalam anggrek macan.

Uji praklinis toksitas terhadap ekstrak tumbuhan obat merupakan pengujian awal untuk dapat memprediksi tingkat keamanannya sehingga dapat dilanjutkan dengan uji farmakologi lainnya. Uji sitotoksik terhadap ekstrak tumbuhan obat juga dapat dikembangkan untuk obat alternatif antikanker (2, 14, 15, 16).

Pada pengujian ini digunakan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Metode BSLT

merupakan salah satu uji toksitas yang memiliki spektrum aktivitas farmakologi yang luas, prosedur pengujian yang sederhana, cepat serta hasilnya dapat dipertanggungjawabkan untuk skrining toksitas dari ekstrak tanaman dengan menggunakan hewan laut yaitu larva udang *Artemia salina* Leach. Dari perhitungan jumlah larva udang yang mati, nanti akan dikonversikan ke LC (*lethal concentration*) dari ekstrak yang dapat membunuh larva (17, 18).

Metodologi Penelitian

Penyiapan Bahan

Dalam penelitian ini, sampel yang digunakan adalah herba Anggrek Macan. Anggrek ini diambil dari hutan lindung yang ada di Lingkungan FMIPA Universitas Cenderawasih Papua-Indonesia. Sampel dicuci dengan air mengalir hingga tidak terdapat kotoran-kotoran yang menempel (sortasi basah), dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian ditiriskan untuk membebaskan tumbuhan dari sisa-sisa air cucian. Tumbuhan yang telah bersih dan bebas dari sisa air cucian kemudian dikeringkan dengan cara diangin - anginkan. Simplisia kering dibersihkan kembali dari kotoran yang mungkin tidak hilang pada saat pencucian (sortasi kering). Tahap selanjutnya simplisia kering dihaluskan sehingga menjadi simplisia serbuk kemudian disimpan dalam wadah bersih dan tertutup rapat dengan suhu ruang.

Ekstraksi

Sampel yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 100 gram kemudian diekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 1,2 L selama 3 hari sambil diaduk setiap kali 24 jam lalu disaring. Ekstrak yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai kental dan dipekatkan.

Analisis ekstrak herba Anggrek Macam menggunakan cair spektrometri massa tandem (LC-MS/MS)

Sebanyak 0.5 gr ekstrak etil asetat Anggrek Macam dimasukan dalam labu 10 ml kemudian ditambahkan metanol. Sonikasi selama 30 menit, kemudian disaring menggunakan membran filter PTFE 0,22 µm. Sampel yang telah disaring kemudian injeksikan ke dalam sistem UHPLC Waters Aqcuity Tandem Xevo G2S QTOF. Analisis

menggunakan LC-MS/MS dilengkapi dengan pompa biner dan detector spectrometer massa *Quadropole Time of Flight* (MS-QTOF) dengan sumber Ionisasi Elektro Spray (ESI). Analisis sampel menggunakan MS-QTOF dengan mode ionisasi positif dan negative, acquisition range 50-1200 Da, kolom non polar C18 XTerra® RP 18 3,5 μ m, suhu kolom 40°C, eluen yang digunakan adalah Asam format 0,1% dalam asetonitril (A) dan Asam 0,1% aquadest (B) dengan sistem elusi isokratik. Sistem elusi isokratik dilakukan pada 0-1 menit 95: 5 rasio, 0 menit gradien elusi linier A dari 95% hingga 5%, elusi isokratis 6-7 menit 0: 100 rasio, 6-7 menit pelarut elusi gradien linier A dari 0% hingga 100%, min 7,5-9 elusi isokratik 95: 5 rasio, hingga 7,5-9 menit gradien elusi linier A pelarut dari 95% sampai 5%. Eluen diatur pada laju alir 0,6 mL/menit dan volume injeksi 10 μ L. Interpretasi data spektrum massa LC-MS/MS menggunakan software UNIFI yang didalamnya telah memiliki *library* spektrum massa zat aktif bahan alam dari *database* waters (19, 20).

Penetasan Telur *Artemia salina* (Leach.)

Telur *A. salina* Leach. ditetaskan dalam wadah penetas telur dengan dua bagian ruang bersekat, satu bagian ruang gelap dan yang satu terang. Sekat dibuat berlubang dengan diameter 2 mm. Air laut dimasukkan ke dalam wadah serta diaerasi menggunakan aerator. Sejumlah *A. salina* Leach. dimasukkan kedalam satu ruang, kemudian ruang ini ditutup. Sisi yang lain dibiarkan terbuka dan diberi lampu untuk menarik *A. salina* Leach. yang telah menetas melalui lubang sekat. Telur akan menetas setelah kira-kira 24 jam menjadi larva. Larva yang berumur 48 jam dapat digunakan untuk uji toksisitas (17).

Preparasi Sampel Uji

Ekstrak anggrek dibuat larutan stok yaitu masing-masing dengan cara melarutkan 200 mg sampel dalam 200 mL pelarut yang sesuai sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 1000 ppm. Pelarut etil asetat yang digunakan disesuaikan dengan sifat kelarutan sampel. Seri konsentrasi sampel uji dibuat dengan pengambilan volume tertentu dari larutan stok menggunakan mikropipet dan dimasukkan dalam vial. Ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam air

laut sehingga didapatkan konsentrasi 0,10, 50, 100,250, 500, 750 dan 1000 ppm (17).

Uji Sitotoksik dengan Metode BSLT

Uji BSLT dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 gram telur *A. salina* Leach (Supreme plus) ditetaskan dalam 1.000 mL air laut selama 48 jam. Setelah dua hari, telur *A. salina* Leach akan menetas menjadi naupili atau larva *A. salina* Leach dan digunakan untuk uji toksisitas. Larutan ekstrak etanol 96% masing-masing dibuat dengan konsentrasi 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm, dan 1000 ppm dengan kontrol 0 ppm. Larutan kontrol digunakan sebagai acuan untuk melihat pengaruh pelarut terhadap larva *A. salina* Leach. Pengujian dilakukan dengan membuat seri konsentrasi yang telah ditentukan dari masing-masing pelarut kemudian mengisi ke dalam vial sebanyak 5 mL. Pelarut dalam vial diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dengan tujuan agar aktivitas murni dari ekstrak tanpa adanya pengaruh dari pelarutnya. Setiap konsentrasi dari ekstrak menggunakan 10 larva udang sebagai hewan uji sitotoksik, dengan air laut yang ditambahkan sebanyak 4 mL. Perlakuan uji sitotoksik ini dilakukan 10 kali pengulangan untuk mendapatkan data yang baik sehingga dapat dihitung secara statistik dari data yang diperoleh (18).

Uji LC₅₀

Vial yang berisi larutan uji dikeringkan sampai semua pelarutnya menguap. Pengerajan ini dilakukan agar kematian larva tidak dipengaruhi oleh pelarutnya. Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara yang sama tanpa menambahkan ekstrak. Larutan kontrol negatif terdiri atas 5 mL air laut yang berisi pelarut dan 1-2 tetes DMSO 1 % dan 10 ekor larva *A. salina* Leach. Penggunaan DMSO 1 % sebanyak 1-2 tetes (50-100 μ L) berfungsi untuk membantu kelarutan.

Dimetilsulfoksida (DMSO) merupakan cairan tak berwarna yang memiliki rumus $(CH_3)_2SO$ merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar. Larva udang yang digunakan yaitu larva yang berumur 48 jam setelah menetas. Larva yang berumur 48 jam adalah keadaan paling peka hewan uji karena dinding selnya masih lunak sehingga hanya

diperlukan konsentrasi sampel yang kecil untuk menimbulkan efek yang mematikan. Jumlah larva udang yang mati dihitung setelah 24 jam. Jumlah larva udang yang masih hidup setelah diinkubasi dihitung (17). Persen larva udang yang mati dihitung menurut persamaan:

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah larva mati}}{\text{Jumlah larva awal}} \times 100\%$$

Jika terjadi kematian pada kontrol uji dapat dikoreksi dengan rumus Aboot, yaitu :

$$\% \text{ Kematian} = \frac{\text{Jumlah larva (mati - kontrol)}}{\text{Jumlah larva uji}} \times 100\%$$

Analisis Data

Nilai data hasil penelitian adalah data primer yang didapatkan dari jumlah larva *A. salina* Leach. yang mati 24 jam setelah perlakuan pada tiap-tiap konsentrasi ekstrak anggrek aacan. Data dianalisis dengan menggunakan analisis adalah konsentrasi yang diperlukan untuk membunuh 50% larva udang *A. salina* Leach. nilai ditentukan dengan analisis probit. Efek toksisitas terhadap *A. salina* Leach. ditentukan berdasarkan analisis probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan regresi linier antara log konsentrasi dan nilai probit.

$$y = bx + a$$

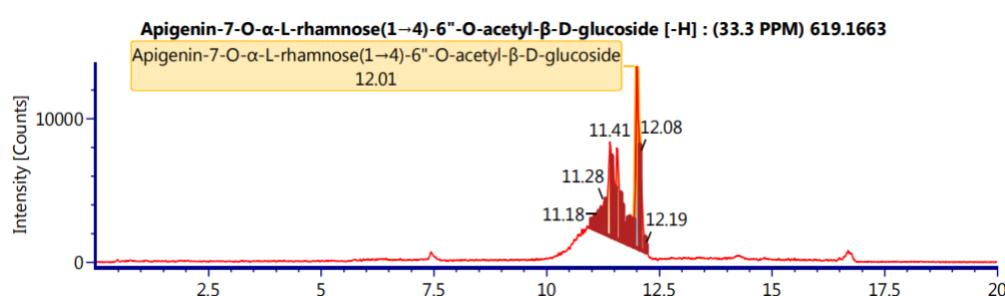
Dimana y = angka probit, dan x = log konsentrasi Persamaan tersebut dapat digunakan untuk mengetahui nilai LC₅₀ komponen herba anggrek macan (*G. scriptum* (Lindl.) Bl.), dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut sehingga diperoleh

konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian (17).

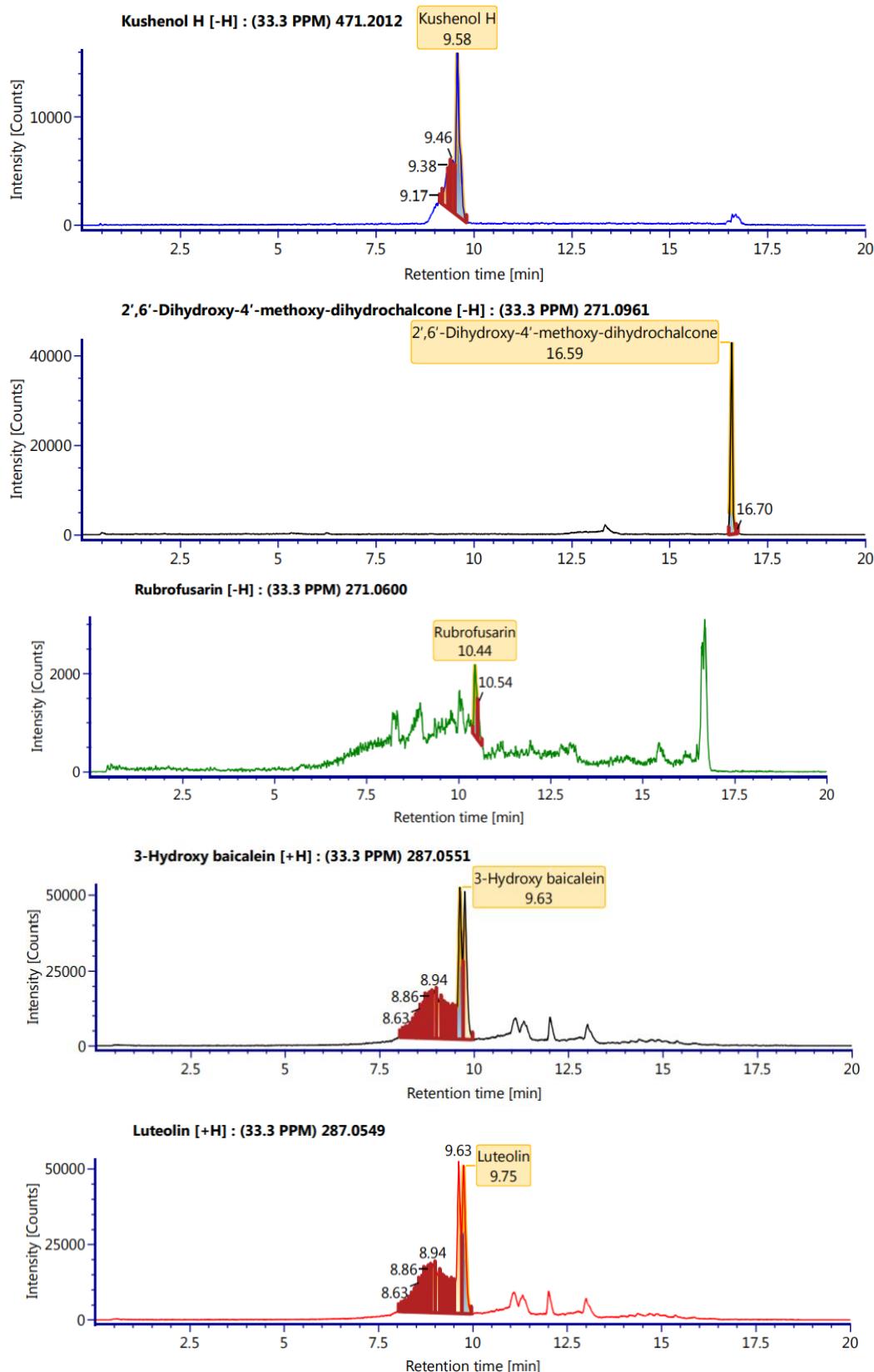
Hasil dan Pembahasan

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah metode maserasi karena pada metode ini tidak menggunakan pemanasan sehingga rusaknya senyawa yang tidak tahan panas dapat dihindari. Serbuk simplisia herba anggrek macan sebanyak 100 gram dimerasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:12 dan dilakukan perendaman selama 3x24 jam, pengadukan dilakukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar serbuk sampel sehingga tetap terjaga adanya derajat perbedaan konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam dan di luar sel (21, 22, 23).

Liquid Chromatograph Mass Spectrometry (LC-MS) ialah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Keuntungan menganalisis menggunakan LC-MS/MS ialah dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi bahkan juga protein (24) (25). Dari hasil analisis ekstrak herba *G. scriptum* (Lindl.) Bl. menggunakan LC-MS/MS diperoleh beberapa senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak sampel yang digunakan. Pengujian kualitatif ini dibandingkan dengan Natural Product Library (26).



Gambar 1. Kromatogram senyawa hasil LC-MS terhadap waktu retensinya



Gambar 1 (.....sambungan). Kromatogram senyawa hasil LC-MS terhadap waktu retensinya

Dari hasil analisis menggunakan LC-MS, ekstrak herba anggrek macan (*G. scriptum* (Lindl.) Bl.) mengandung 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone, Apigenin-7-O- α -L-rhamnose (1 \rightarrow 4)-6"-O-acetyl- β -D-glucoside, Kushenol H, 3-Hydroxy baicalein, Luteolin dan Rubrofusarin (**Tabel 1**). Dimana rubrofusarin merupakan turunan dari poliketida (27). Menurut Wang, poliketida memiliki manfaat sebagai antibiotik serta antikanker (28). Pada genus yang sama, spesies yang berbeda diperoleh isolate Gastrodin, Isovitexin, R-asam-2-benzilamat, dan R-asam eucomic (28).

Pada pengujian penelitian ini digunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). BSLT sering digunakan sebagai uji pendahuluan/praskrining aktivitas biologis yang sederhana untuk menentukan toksisitas suatu senyawa dari sampel dengan menggunakan hewan uji larva udang (*A. salina* Leach.). Hasil yang diperoleh dihitung sebagai nilai LC₅₀ (*Lethal Concentration*), yaitu jumlah konsentrasi ekstrak uji yang dapat menyebabkan kematian larva udang sejumlah 50% setelah masa inkubasi 24 jam (29). Nilai LC₅₀ >1000 ppm dikategorikan tidak beracun (30).

Beberapa kelebihan dari metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) menggunakan larva udang (*A. salina* Leach.) adalah cepat waktu ujinya, mudah, tidak memerlukan peralatan khusus, sederhana (tanpa teknik aseptik), murah (tidak perlu serum hewan), jumlah organisme banyak, memenuhi kebutuhan validasi statistik dengan sedikit sampel, hasilnya *representative* dan dapat dipercaya (17) (30).

Hewan uji larva udang yang digunakan dalam penelitian ini adalah sepuluh ekor larva udang dalam setiap konsentrasi masing-masing ekstrak. Pengujian ini dilakukan sebanyak sepuluh kali pengulangan/replikasi agar mendapatkan data yang akurat dan baik sehingga dapat dihitung secara statistik dari data yang diperoleh. Jumlah larva yang digunakan untuk keseluruhan larutan uji ialah 800 ekor dengan sepuluh kali pengulangan. Kemudian larva yang telah berumur 48 jam dimasukkan ke dalam vial yang berisi larutan uji masing-masing 10 ekor yang

telah ditetes DMSO yang berguna untuk membantu melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non polar (31) (32).

Tingkat mortalitas/kematian larva udang dengan berbagai konsentrasi ekstrak herba anggrek macan (*G. scriptum* (Lindl.) Bl.) disajikan pada **Tabel 2**. Dari nilai probit dan log konsentrasi diperoleh regresi linier $Y=1,997x+0.7169$ dengan $R^2=0.9148$. Berdasarkan hasil perhitungan nilai LC₅₀ dari ekstrak herba anggrek macan diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 150,96 ppm dimana nilai tersebut lebih kecil atau kurang dari 1000 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak herba anggrek macan termasuk dalam kategori toksik dan dapat dikembangkan sebagai tumbuhan yang berpotensi sebagai obat.

Hasil penelitian uji sitotoksik ekstrak herba anggrek macan menunjukkan bahwa LC₅₀ sebesar 150.96 ppm dengan aktivitas toksik. Hal ini mengindikasikan semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin tinggi persen kematian pada hewan uji larva udang. Ekstrak herba anggrek macan memiliki aktivitas toksik dapat didukung juga dengan terkandungnya senyawa metabolit sekunder yang dapat bertindak sebagai *stomach poisoning* atau racun perut. Apabila senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva maka alat pencernaan dari hewan uji tersebut akan terganggu (33). Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam anggrek macan adalah flavonoid, alkaloid dan tannin.

Penelitian sejenis dari anggrek Papua *Dendobium lasianthera* menunjukkan bahwa ekstrak etanol batang *D. lasianthera* memiliki aktivitas sitotoksik dengan nilai LC₅₀ 699,3 ppm, ekstrak etil asetat batang 602,1 ppm, fraksi n-heksana batang LC₅₀ 329,6 ppm, fraksi etanol 96% batang 676 ppm dan fraksi etil asetat daun *D. lasianthera* 833,2 ppm (Agustini et al, 2020). Dari hasil penelitian sebelumnya jika dibandingkan dengan penelitian ekstrak herba anggrek macan, nilai toksisitas anggrek macan lebih toksik karena memiliki senyawa-senyawa di dalam ekstrak etanol lebih kuat menginhibis sel dari larva udang.

Tabel 1. Hasil analisis LC-QTOF/MS ekstrak etanol herba anggrek macan (*G. scriptum* (Lindl.) Bl.)

No	Senyawa	Formula	Waktu retensi (min)	Massa Error	Mode ESI	[M-H ⁺] atau [M+H ⁺] (m/z)
1	2',6'-Dihydroxy-4'-methoxy-dihydrochalcone	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	16.58	-5.5	(-)	271.09610
2	Apigenin-7-O- α -L-rhamnose(1 \rightarrow 4)-6"-O-acetyl- β -D-glucoside	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₅	12.02	-0.9	(-)	619.16626
3	Kushenol H	C ₂₆ H ₃₂ O ₈	9.59	-2.7	(-)	471.20119
4	Rubrofusarin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	10.46	-4.5	(-)	271.0600
5	3-Hydroxy baicalein	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	9.63	0.2	(+)	287.05469
6	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	9.77	-0.5	(+)	287.05512

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat aktivitas sitotoksik dari ekstrak herba anggrek macan (*G. scriptum* (Lindl.) Bl.) dengan metode BS LT. Hasil uji sitotoksik ekstrak herba anggrek macan menunjukkan bahwa nilai LC₅₀ adalah 150,96 ppm. Disimpulkan bahwa ekstrak etanol herba anggrek macam toksik

Ucapan Terima Kasih

Econusa dan Provinsi Papua Barat sebagai pemberi Hibah Penelitian tahun 2021.

Referensi

1. KLHK. Laporan tentang deforestasi di tanah papua pada areal pelepasan kawasan hutan 15. Laporan [Internet]. 2021; Available from: https://www.menlhk.go.id/site/single_post/3606/laporan-tentang-deforestasi-di-tanah-papua-pada-areal-pelepasan-kawasan-hutan
2. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 2016;21(5).
3. Adeleye OA, Femi-Oyewo MN, Bamiro OA, Bakre LG, Alabi A, Ashidi JS, et al. Ethnomedicinal herbs in African traditional medicine with potential activity for the prevention, treatment, and management of coronavirus disease 2019. *Futur J Pharm Sci*. 2021;7(1).
4. Husain F, Sary DP, Fajar, Iswari R, Wahidah BF. Ethnobotanical knowledge of plant ingredients among sellers of jamu Ngadirgo Semarang. *KOMUNITAS Int J Indones Soc Cult* [Internet]. 2020;12(2):150–62. Available from: <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/komunitas>
5. Falah F, Hadiwibowo N. Species Identification of Traditional Medicine Plants for Women'S Health in East Kalimantan: Lesson Learned From Local Wisdom. *Indones J For Res*. 2017;4(1):49–68.
6. Regina Marinta Sinaga, Fikarwin Zuska, Panal Sitorus. Indigenous Healer Knowledge About Illness and The Way to Make Traditional Medicine. *Indones J Med Anthropol*. 2021;2(1):43–7.
7. Tsiring J, Tam N, Tag H, Gogoi BJ, Apang O. Medicinal Orchids of Arunachal Pradesh: a Review. *Bull Arunachal For Res* [Internet]. 2017;32(1 & 2):1–16. Available from: <http://sfribulletin.org.in/wp-content/uploads/2017/07/Vol.-3212-1-16.pdf>
8. Macdonald AD. Theoretical problems of interpreting floral organogenesis of Laportea canadensis . *Can J Bot*. 1974;52(3):639–44.
9. Nurfadilah S. Utilization of orchids of Wallacea region and implication for conservation. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 2020;473(1).
10. Waruruai J, Sipana B, Koch M, Barrows LR, Matainaho TK, Rai PP. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Siwai and Buin districts of the Autonomous Region of Bougainville. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2011;138(2):564–77. Available from: <dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.052>
11. Musharof Hossain M. Therapeutic orchids: Traditional uses and recent advances - An overview. *Fitoterapia* [Internet]. 2011;82(2):102–40. Available from: <dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2010.09.007>
12. Nugraha AS, Triatmoko B, Wangchuk P, Keller PA. Vascular epiphytic medicinal plants as sources of therapeutic agents: Their ethnopharmacological uses, chemical composition, and biological activities. *Biomolecules*. 2020;10(2).
13. Coe FG, Parikh DM, Johnson CA. Alkaloid presence and brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay of medicinal species of eastern Nicaragua. *Pharm Biol*. 2010;48(4):439–45.
14. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(3):200–16.
15. Valle AL. Current methodologies in assessing toxicity of natural products. *Int J Phytocosmetics Nat Ingredients*. 2018;5(1):3–3.
16. Cragg GM, Newman DJ. Drug Discovery and Development from Natural Products: The Way Forward. *11th NAPRECA Symp B*

- Proceedings, Antananarivo, Madagascar [Internet]. 1997;1(5):56–69. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/0d0b/b035b72c23e2091c1179cf64807fe41a37b.pdf>
17. Waghulde S, Kale MK, Patil V. Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants. 2020;2:47.
 18. Sarah QS, Anny FC, Misbahuddin M. Brine shrimp lethality assay. Bangladesh J Pharmacol. 2017;12(2):186–9.
 19. Zubair MS, Maulana S, Widodo A, Pitopang R, Arba M, Hariono M. Gc-ms, lc-ms/ms, docking and molecular dynamics approaches to identify potential sars-cov-2 3-chymotrypsin-like protease inhibitors from zingiber officinale roscoe. Molecules. 2021;26(17).
 20. Alkandahri MY, Maulana YE, Subarnas A, Kwarteng A, Berbudi A. Antimalarial activity of extract and fractions of cayratia Trifolia (L.) domin. Int J Pharm Res. 2020;12(April 2021):1435–41.
 21. Patel K, Panchal N, Ingle DP. Review of Extraction Techniques. Int J Adv Res Chem Sci. 2019;6(3):6–21.
 22. Altemimi A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. Plants. 2017;6(4).
 23. Nn A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. Med Aromat Plants. 2015;04(03):3–8.
 24. Agilent-Technologies. Basics of LC/MS. 1998;
 25. Huang, Henion. Erratum to: "LCIMS and LC/MS/MS Determination of Protein Tryptic Digests." J Am Soc Mass Spectrom. 1990;1(6):498.
 26. Alhendi AS. A review: Protein identification by LC-MS: Principles, instrumentation, and applications. Iraqi J Sci. 2020;61(10):2448–66.
 27. Tanaka H, Ohne Y, Ogawa N, Tamura T. The chemical constitution of rubrofusarin. Agric Biol Chem. 1963;27(1):48–55.
 28. Wang J, Zhang R, Chen X, Sun X, Yan Y, Shen X, et al. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases. Microb Cell Fact [Internet]. 2020;19(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01367-4>
 29. Andini A, Prayekti E, Dyah Wulandari D, Nidianti E. Cytotoxicity Assay Using Brine Shrimp Lethality Test on Collagen-Chitosan Wond Dressing Sterilized By Ultraviolet Light. Indones J Med Lab Sci Technol. 2020;2(1):21–6.
 30. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med. 1982;45(1):31–4.
 31. Company GC. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Solubility Data. 2007;1–20.
 32. Science C. Prediction of compound solubility in Dimethyl sulfoxide using machine learning methods including graph neural networks. 2020;
 33. Supringrum R, Sapri S, Pranamala VA. UJI Toksisitas Akut Ekstrak Etanol Akar KB (Coptosapelta tomentosa Valeton ex K.Heyne) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). J Ilm Manuntung. 2017;2(2):161

Studi Literatur Bahan yang Memengaruhi Waktu Larut Tablet Effervescent Sediaan Herbal

Reynelda Juliani Sagala^{1*}, Putriana Rachmawati¹, Pretty F. A. Kambira¹

Artikel Review

Abstract: The effervescent tablet is an alternative dosage form to deliver the active pharmaceutical ingredients or natural products for therapeutic effects. Moreover, this dosage form is also used in the food industry for nutritional drinks. The tablet is preferred because of its practicality, improve water solubility, refreshing taste, and more easily absorbed than the conventional tablet. Tablet's water dissolving time in the medium will affect the rate and amount of active ingredients. The disintegrating time of effervescent tablets is affected by the concentration of both acid and base elements, the tablet binder's concentration (PVP), the interaction between citric acid and tartaric acid, and the concentration of the base element, the water content over the tablet, and the lubricant's variation. The acid will affect the disintegration time however its imbalance will decrease the freshness. Therefore, an optimal balance of the base and acid element is required to make an effervescent tablet with a good disintegration time and an appropriate refreshing taste.

Keywords: effervescent tablets, disintegration time, refreshing taste

Abstrak: Sediaan tablet effervescent menjadi alternatif pilihan untuk menghantarkan bahan aktif obat baik sintesis maupun yang berasal dari bahan alam agar memberikan efek terapi farmasetika maupun minuman bernutrisi di bidang pangan. Bentuk sediaan ini lebih disukai karena praktis, cepat larut dalam air dan rasa menyegarkan sehingga lebih mudah diabsorbsi dibandingkan dengan bentuk sediaan tablet konvensional. Kecepatan dan jumlah bahan aktif yang dapat diabsorbsi dipengaruhi oleh waktu larut tablet dalam medianya. Waktu larut tablet effervescent dipengaruhi oleh konsentrasi keseimbangan sumber basa dan asam, konsentrasi bahan pengikat (PVP), interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat, konsentrasi sumber basa, kondisi kadar air di sekitar tablet, variasi bahan pelicin. Konsentrasi sumber asam memengaruhi waktu larut tetapi ketidakseimbangan konsentrasi sumber asam dapat mengurangi efek kesegaran. Sehingga perlu optimalisasi sumber asam dan basa agar menghasilkan sediaan tablet effervescent dengan waktu larut yang baik dan memberikan rasa menyegarkan yang sesuai.

¹ Program Studi Farmasi
Universitas Katolik
Indonesia Atma Jaya, Jakarta,
DKI Jakarta, Indonesia

Korespondensi:

Reynelda Juliani Sagala
reynelda.juliani@atmajaya.ac.id

Kata kunci: tablet effervescent, waktu larut, rasa menyegarkan

Pendahuluan

Bentuk sediaan tablet effervescent merupakan bentuk sediaan yang menjadi alternatif pilihan untuk penghantaran zat aktif obat maupun nutrisi yang berasal dari bahan alam maupun sintetik. Bentuk sediaan ini lebih disukai karena praktis, cepat larut dalam air, absorpsi yang lebih mudah apabila dibandingkan dengan bentuk sediaan tablet konvensional, serta memberikan rasa yang menyegarkan seperti pada rasa minuman bersoda.

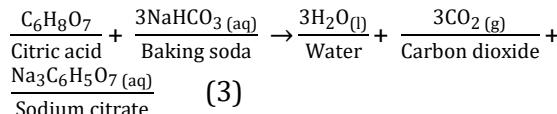
Tablet effervescent adalah tablet tidak bersalut, reaksi cepat antara asam dengan karbonat atau bikarbonat dalam media air akan segera melepaskan gas karbondioksida (1) sehingga tablet akan terdisolusi membentuk larutan. Penggunaan dalam bentuk larutan tentunya lebih nyaman bagi pasien yang mengalami masalah dalam menelan. Tablet effervescent juga menanggulangi beberapa kelemahan sediaan dalam bentuk larutan seperti stabilitas obat dalam larutan, bulky dalam penyimpanan baik di gudang obat jadi atau pun di apotek, kurang nyaman saat dibawa karena berat ataupun dalam proses pengiriman yang memakan biaya tinggi.

Tablet effervescent dapat digunakan untuk penghantaran bahan alami berasal dari tanaman, baik berupa bagian buah, rimpang, daun, kulit buah, biji, dan bahan alami lainnya. Bahan alami ini dapat dimanfaatkan untuk memberikan efek terapi farmasetika maupun minuman bernutrisi di bidang pangan.

Bahan Penyusun Tablet Effervescent

Sumber asam dan basa

Dalam formulasi tablet *effervescent* dibutuhkan bahan baku pembuatan granul yaitu tersusun atas bahan aktif dan bahan-bahan organik sumber asam dan basa. Sumber asam yaitu bahan yang mengandung asam atau yang dapat membuat suasana asam seperti asam sitrat, asam fumarate, asam malat dan asam suksinat. Sumber basa yaitu bahan yang menimbulkan gas CO₂ apabila bereaksi dengan sumber asam, bahan ini adalah bahan karbonat seperti natrium karbonat, natrium bikarbonat, kalium karbonat, kalium bikarbonat, natrium sesquil karbonat, dan natrium glisin karbonat (2).



Pengisi

Bahan lain yang dibutuhkan untuk meningkatkan atau memperoleh massa agar layak untuk dicetak adalah bahan pengisi seperti laktosa, glukosa, dan maltodekstrin. Bahan pengisi dalam sediaan tablet effervescent adalah mudah larut dalam air dan membentuk larutan yang jernih. Seringkali bahan pengisi yang dipilih untuk sediaan tablet effervescent adalah bahan pengisi yang mampu memberikan rasa seperti glukosa atau manitol (4). Laktosa merupakan bahan pengisi yang umumnya memberikan laju pelepasan obat yang baik (5). Laktosa memiliki banyak *grades* yang tersedia di pasar dengan sifat fisik yang berbeda seperti kandungan air, ukuran partikel dan karakteristik laju alir sehingga dapat disesuaikan dengan tujuan pembuatan produk. Laktosa memiliki *grades* anhidrat sehingga sangat memungkinkan untuk tetap digunakan apabila terdapat bahan dalam tablet effervescent yang sensitif terhadap kandungan air (6).

Bahan pengikat (binder)

Bahan pengikat memiliki peran penting dalam pembuatan tablet effervescent untuk memberikan kekompakkan dan daya tahan tablet sehingga menjamin penyatuan partikel serbuk dalam membentuk granul (7). Bahan pengikat yang sering digunakan adalah Polivinil pirolidon (PVP). PVP sebagai bahan pengikat menghasilkan tablet yang tidak keras, waktu disintegrasi cepat sehingga terdisolusi segera dalam tubuh, diabsorbsi, didistribusikan sistemik dan memberikan efek terapi (8). Konsentrasi bahan pengikat PVP akan memengaruhi sifat fisik granul dan tablet effervescent seperti waktu alir dan pengetapan, kekerasan, keseragaman bobot dan waktu larut tablet.

Lubrikan dan glidan

Lubrikan membantu dalam menurunkan gaya gesek antarmuka tablet dengan mesin saat proses cetak sehingga kemungkinan terjadi nya pelengketan masa cetak terhadap punch dan dies menurun. Sedangkan glidan membantu dalam meningkatkan laju alir granul dengan mengisi bagian ruang kosong pada granul sehingga lebih

bulat, meminimalkan gaya *van der Waals* antar granul dan memberikan gaya elektrostatik pada granul sehingga terjadi proses tolak menolak (4).

Bahan tambahan lain

Bahan tambahan lain seperti bahan pewarna, pemberi rasa, dan pemanis dapat ditambahkan untuk memperbaiki penampilan dan rasa yang kurang enak. Jenis pemanis contohnya sukrosa, sakarin, aspartam dan manitol. Penggunaan pemanis dalam tablet effervescent jika ditujukan sebagai obat tradisional dan suplemen untuk anak perlu memerhatikan batas maksimum yang diperbolehkan sesuai dengan Peraturan Kepala BPOM no 12 Tahun 2014. Sedangkan penggunaan pemanis untuk tujuan bidang pangan perlu disesuaikan dengan Peraturan BPOM Nomor 11 Tahun 2019 Tentang Bahan Tambahan Pangan (9)(10).

Metode Pembuatan

Pada umumnya formulasi tablet effervescent mencakup bahan yang mampu melepaskan gas CO₂ (natrium karbonat dan natrium bikarbonat) dan suatu bahan yang mendukung pelepasan gas karbondioksida (asam adipat, asam malat, asam tartrat, asam askorbat, asam fumarate, asam maleat, asam suksinat, atau asam sitrat). Bahan aktif terdapat pada campuran granul effervescent, atau apabila kelarutan zat aktifnya rendah, dapat dikonversi menjadi bentuk garamnya selama proses disolusi (11).

Dalam pembuatan tablet effervescent dilakukan pengempaan campuran bahan aktif dan bahan-bahan organik seperti asam sitrat, asam tartrat dengan natrium bikarbonat. Apabila digunakan sebagai asam tunggal yaitu asam sitrat dan asam tartrat dapat menimbulkan kesukaran menjadi serbuk atau mudah kehilangan kekuatan dan akan mengumpal (2).

Pembuatan granul effervescent dengan metode granulasi basah yaitu diawali dengan pencampuran bahan aktif, sumber asam, pemanis, sebagian pengisi dan sebagian pengikat yang telah dilarutkan hingga massa yang dapat dikepal (*banana breaking*). Kemudian massa diayak dengan ayakan mesh no.14 sebagai granul basah yang akan dikeringkan pada suhu 50°C selama ±18 jam. Granul sumber asam ini

kemudian diayak kering dengan ayakan mesh no.16. selanjutnya, natrium bikarbonat, sebagian laktosa dan sisa pengikat dicampur hingga terbentuk massa yang dapat dikepal (*banana breaking*), selanjutnya prosesnya sama dengan pembuatan granul sumber basa (12).

Selain metode granulasi basah, metode pelelehan dapat digunakan dalam proses penyiapan tablet effervescent. Sumber asam dan basa serta bahan lain yang tahan panas akan dilakukan pengadukan Setelah terbentuk campuran yang homogen, masa tersebut akan dipanaskan pada oven dengan suhu 54°C sambil terus diaduk sampai air kristal dari asam sitrat keluar dan berperan sebagai pengikat antar serbuk. Setelah itu akan dilakukan ayak basah menggunakan ayakan mesh 20, dikeringkan Kembali selama 1 jam menggunakan suhu 54°C dan dilakukan ayak kering menggunakan ayakan mesh 20. Selanjutnya dapat ditambahkan fasa luar (13).

Metode Penelitian

Review ini mencari sumber data primer dari internet dengan menggunakan *Google Scholar* untuk mencari jurnal nasional dan internasional. Penelusuran juga dilakukan secara manual pada daftar pustaka terkait sehingga diperoleh sumber pencarian lain melalui *e-book* atau *e-journal*. Kata kunci pencarian secara online adalah effervescent; waktu larut; sumber asam dan basa tablet effervescent; asam sitrat; asam tartrat; natrium bikarbonat; bahan pengikat tablet effervescent. Kriteria inklusi dalam penelusuran artikel adalah sediaan tablet effervescent dari bahan herbal. Kriteria eksklusi yang digunakan adalah artikel yang mengulas pembuatan sediaan tablet effervescent non herbal.

Hasil dan Diskusi

Pengembangan bentuk sediaan tablet effervescent dengan bahan aktif herbal semakin meningkat karena bentuknya yang lebih disukai dibandingkan dengan sediaan konvensional. Berdasarkan pencarian literatur seperti pada **Tabel 2** terkait pengembangan sediaan tablet effervescent herbal ini terdapat beberapa parameter yang perlu diperhatikan dalam formulasinya.

Tabel 1. Perbandingan persyaratan tablet effervescent antara USP-NF 2021 dengan Farmakope Indonesia

Compendial	USP-NF 2021		Farmakope VI		EP 7.0
Parameter	Tablet effervescent yang menghasilkan sediaan suspensi	Tablet / granul effervescent	Ketentuan umum	Monografi Tablet efervesen Asetosal untuk lautan oral	Ketentuan umum
Apparatus	USP Appartus 2 (Paddle)	Disintegration tester apparatus (basket)		Disintegration tester apparatus (basket)	Disintegration tester apparatus (basket)
Catatan	Jarak paddle 2.5 cm dari dasar	-	Tidak didefinisikan untuk tablet effervescent	-	-
Jumlah tablet	6	6		2	6
Medium	Air 200 mL	Air 200 mL		Air 180 mL pada suhu $17.5\pm2.5^{\circ}\text{C}$	Air 200 mL pada suhu 15-25°C
Kriteria	Tidak lebih dari 5 menit	Tidak lebih dari 5 menit		Tidak lebih dari 5 menit	Tidak lebih dari 5 menit

Waktu larut

Waktu larut tablet effervescent dapat diukur menggunakan alat uji disintegrasi yang sama dengan tablet konvensional menurut beberapa kompendial, namun jika tablet effervescent membentuk suspense ketika terlarut, maka perlu diuji menggunakan USP apparatus 2 atau tipe *paddle*. Medium yang digunakan adalah air dengan jumlah sekitar 180-200 mL. Setiap tablet dilakukan pengujian pada *beaker glass* yang berbeda untuk memperjelas proses pelarutan tablet agar tidak terganggu dengan gelembung karbondioksida yang terbentuk. Hasil perlu ditampilkan dalam bentuk rata rata dan standar deviasinya. Waktu hancur tablet sesuai persyaratan kompendial adalah kurang dari 5 menit atau sesuai monografi sediaan. Sedangkan menurut (14) tablet effervescent yang baik adalah yang terlarut dengan cepat dalam waktu 1-2 menit.

Menurut (15) konsentrasi sumber asam dan basa yang digunakan berhubungan linier dengan kecepatan waktu larutnya. Semakin banyak sumber asam dan basa yang digunakan maka semakin banyak karbondioksida yang dihasilkan.

Semakin banyak karbon dioksida dihasilkan, maka pori yang terbentuk dalam tablet untuk tempat penetrasi air sebagai medium disolusi tablet akan semakin tinggi. Selain itu, karbon dioksida juga memberikan daya dorong bagi masa tablet untuk terdisintegrasi. Peningkatan sumber asam dan basa sampai 45% mampu mempercepat waktu larut namun peningkatan konsentrasi diatas 45% tidak memberikan dampak yang signifikan. Hal tersebut karena reaksi asam dan basa menghasilkan gelembung yang berlebihan sehingga mencegah serbuk atau granul effervescent kontak dengan air sebagai medium disolusi sehingga waktu disintegrasi menjadi lebih panjang (16).

Faktor yang memengaruhi waktu larut tablet effervescent

Penulis merangkum untuk parameter sumber asam dan basa serta konsentrasi optimal bahan pengikat (*binder*) dalam formulasi sediaan effervescent.

Sediaan tablet sebelum diabsoprsi akan mengalami proses disintegrasi dan deagregasi kemudian terlarut dalam medianya.

Tabel 2. Tablet Effervescent untuk Penghantaran Bahan Herbal

Bahan Aktif	Perbandingan Optimal Sumber Asam dan Basa	Konsentrasi Optimal Bahan Pengikat (Binder)	Kesimpulan	Referensi
Jeruk Baby Java 40%	Asam Sitrat 5%:bubuk jeruk baby Java 4%	Maltodekstrin	Keseimbangan kandungan asam dapat mengurangi efek kesegarannya. Efek menyegarkan dipengaruhi oleh konsentrasi sumber asam dan basa. Konsentrasi ini memengaruhi waktu larutnya	-23
Mengkudu (<i>Morinda citrifolia L.</i>)	Asam sitrat 7.2:Asam tartrat 11.2: Na Bikarbonat 25.6	PVP 0.2%	Perbedaan jumlah sumber basa memengaruhi ketebalan tablet dan waktu larutnya	-24
Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus Lamk.</i>)	Asam sitrat 20%: Na bikarbonat 20%	PVP K30 2%	Variasi kandungan sumber basa dan asam memengaruhi waktu larut, total padatan terlarut, kekerasan dan organoleptiknya. Semakin tinggi konsentrasi sumber basa yang ditambahkan maka kelarutan sediaan akan semakin cepat.	-25
Buah Naga (<i>Hylocereus undatus</i>)	Asam sitrat 30%: Na Bikarbonat 30 %	PVP 1%	Semakin tinggi konsentrasi sumber asam tunggal asam sitrat dengan sumber basa yang tetap maka dapat memengaruhi waktu larut	-26
Nanas (<i>Ananas comosus L.(Merr.)</i>)	Asam sitrat 10%: Na Bikarbonat 40%	Maltodekstrin 50%	Penambahan konsentrasi natrium bikarbonat meningkatkan produksi gelembung gas CO ₂	-27
Daun Kersen (<i>Muntingia calabura L.</i>)	Asam sitrat 11.4%: Asam Tartrat 16.8%: Na BIkarbonat 31.8%	PVP 1%	Konsentrasi effervescent mix tidak berpengaruh nyata terhadap waktu larut tablet	-28
Jahe (<i>Zingiber Officinale Roscoe</i>)	Asam sitrat 8.58%: Asam Tartrat 27.17%:Na Bikarbonat 34.45%	PVP 2.5%	Variasi konsentrasi asam basa tidak memengaruhi kualitas tablet yang meliputi keseragaman bobot, kekekrasan, kerapuhan, tetapi berpengaruh terhadap waktu larut tablet.	-29
Biji Melinjo	Asam sitrat 150/2000: Asam Tartrat 600/2000: Na Bikarbonat 750/2000: PEG 6000 2%	PVP 5%	Variasi asam sitrat dan asam tartrat menghasilkan waktu larut tablet effervescent semakin cepat, sedangkan variasi PEG 6000 menghasilkan waktu larut yang cukup lama	-22
Jahe merah (<i>Zingiber officinale Roxb. Var rubrum</i>)	Natrium sitrat 10%; asam fumarate 10%: Na bikarbonat 27.5%	PVP K-30 2.5%	Sumber asam mempercepat waktu larut tablet, tetapi interaksi antara natrium sitrat dan asam fumarate tidak berpengaruh signifikan terhadap waktu larutnya.	-30

Bahan Aktif	Perbandingan Optimal Sumber Asam dan Basa	Konsentrasi Optimal Bahan Pengikat (Binder)	Kesimpulan	Referensi
Temulawak (<i>Curcuma xanthorrhiza</i> Roxb.)	Asam sitrat 9.16%:Asam tartrat 19.16%: Na bikarbonat 32.43%	PVP 3%	Waktu larut tablet tidak lebih dari 5 menit	-31
Cinnamon bark	Asam tartrat 25.1%: Na bikarbonat 38.20%	PVP 5%	Tablet larut selama kurang dari 5 menit	-32
Kelopak Bunga Rosella (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)	Asam sitrat 10%: Asam tartrat 15%: Na bikarbonat 25%	PVP 0.1%	Semakin tinggi kadar PVP dalam tablet, maka semakin lama tablet molarut	-20
Daun katuk (<i>Sauvagesia androgynous</i> L.Merr.)	Asam aitrat 7%: Asam tartrat 23%: Na bikarbonat 30%	PVP 2.5%	Semakin cepat waktu larut apabila semakin besar penambahan sumber asam dan basanya	-15
Kulit Buah Delima Putih (<i>Punica granatum</i> va.album)	Asam sitrat 4%: asam tartrat 3%: Na bikarbonat 6%	PVP 7.5%	Penggunaan asam sitrat yang lebih tinggi mengakibatkan peningkatan waktu larut sedangkan variasi asam sitrat dan asam tartrat tidak berpengaruh terhadap waktu larut tablet effervescent	-33
Kulit Manggis (<i>Garcinia mangostana</i> L.)	Asam sitrat 1%:Asam tartrat 2%: Na bikarbonat 3.4%	PVP	Tablet effervescent ekstrak kulit manggis mampu menurunkan jumlah sel <i>C.albicans</i>	-34
Daun Nangka (<i>Artocarpus heterophyllus</i> L.)	Asam sitrat 13.3%: Asam tartrat 26.7%: Na bikarbonat 40%	PVP K30 2%	Variasi konsentrasi asam sitrat dan asam tartrat memengaruhi sifat fisik granul effervescent	-35
Buah Pare (<i>Momordica charantia</i> L.) dan Buncis (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Asam sitrat 10%: Asam tartrat 14.8%: Na bikarbonat 28%	Dekstrin 20%	Semakin tinggi konsentrasi komponen basa dan asam yang digunakan maka CO ₂ yang dihasilkan semakin banyak	-36
Biji Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill)	Asam tartrat 28.42%: Na bikarbonat 26.58%	PVP 2.5%	Perbedaan konsentrasi sumber asam dan basa memengaruhi kekerasan tablet, waktu larut, dan kerapuhan tablet.	-37
Daun kacang tujuh jurai (<i>Phaseolus lunatus</i> , L.)	Asam sitrat 17.45%: Asam tartrat 17.45%: Na bikarbonat 40.5%	-	Kelembaban udara ruangan Ketika pengujian dapat menyebabkan penurunan kualitas tablet	-38
Rimpang jahe (<i>Zingiber officinale</i> Rosc.)	Asam sitrat 0%: asam tartrat 23.6%: Na bikarbonat 26.4%	PVP 0.13%	Interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat dapat memperbaiki waktu larut yang lebih baik daripada formula dengan asam tunggal	(29)(39)

Jumlah dan kecepatan obat terlarut merupakan faktor penting yang memengaruhi efektivitas sediaan sehingga dalam ulasan ini kami merangkum faktor yang memengaruhi waktu larut tablet effervescent.

- Konsentrasi keseimbangan sumber basa dan asam

Kelarutan asam sitrat dalam air lebih tinggi dan mudah dibentuk granul (17), tetapi pada konsentrasi tertentu kelarutan asam tartrat lebih baik dibandingkan asam sitrat (18). Konsentrasi sumber asam memengaruhi waktu larut tetapi ketidakseimbangan konsentrasi sumber asam dapat mengurangi efek kesegaran. Konsentrasi asam dan basa yang tidak seimbang pada sediaan dapat menyebabkan berkurangnya efek menyegarkan karena ada natrium bikarbonat yang tidak habis bereaksi dengan sumber asam (19).

- Konsentrasi bahan pengikat (PVP)

Konsentrasi bahan pengikat yang terlalu banyak akan menghasilkan massa granul yang keras sehingga cenderung mempunyai waktu hancur yang lama.

PVP merupakan bahan yang paling efektif untuk tablet effervescent (18). PVP bahan yang sesuai digunakan untuk meningkatkan kelarutan bahan obat di dalam air. Akan tetapi perlu diperhatikan konsentrasi bahan pengikat karena semakin tinggi kadar PVP dalam tablet, maka semakin lama tablet melerut (20). Pada umumnya bahan pengikat yang digunakan adalah PVP dan dekstrin (**Tabel 2**).

- Interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat dapat memperbaiki waktu larut.

Dalam pembuatan tablet effervescent dilakukan pengempaan campuran bahan aktif dan bahan-bahan organik seperti asam sitrat, asam tartrat dengan natrium bikarbonat. Apabila digunakan sebagai asam tunggal yaitu asam sitrat dan asam tartrat dapat menimbulkan kesukaran menjadi serbuk atau mudah kehilangan kekuatan dan akan mengumpal (26).

- Konsentrasi sumber basa memengaruhi produksi gelembung gas CO_2 .

Tablet effervescent tidak membutuhkan bahan penghancur dalam formulasinya karena gas yang dihasilkan yaitu karbodioksida

memfasilitasi proses disintegrasi kadar air disekitar tablet.

- Selama proses pembuatan, penyimpanan hingga tablet effervescent belum digunakan oleh pasien, kadar air di sekitar tablet perlu terjaga. Peningkatan kadar air dapat menurunkan kekerasan tablet dan terjadi proses pembentukan gas CO_2 sebelum waktunya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (21) bahwa kelembaban udara ruangan ketika pengujian dapat menyebabkan penurunan kualitas tablet.
- Variasi bahan pelicin memengaruhi waktu larut.

Bahan pelicin ditambahkan untuk meningkatkan aliran bahan memasuki cetakan tablet dan mencegah lekatnya tablet dengan tablet lain dan dengan cetakan. Pelicin yang biasa digunakan adalah PEG (Polietilen Glikol) 6000. Berdasarkan penelitian (22) diketahui variasi PEG 6000 menghasilkan waktu larut yang cukup lama.

Kesimpulan

Sediaan effervescent menjadi alternatif dalam menghantarkan bahan aktif herbal agar mudah digunakan dan memberikan efek menyegarkan. Sediaan tablet sebelum diabsoprsi akan mengalami proses disintegrasi dan deagregasi kemudian terlarut dalam medianya. Kecepatan dan jumlah bahan aktif yang dapat diabsorbsi dipengaruhi oleh waktu larut tablet dalam medianya. Berdasarkan ulasan jurnal yang dilakukan disimpulkan bahwa yang memengaruhi waktu larut adalah konsentrasi keseimbangan sumber basa dan asam, konsentrasi bahan pengikat (PVP), interaksi antara asam sitrat dan asam tartrat, konsentrasi sumber basa, kondisi kadar air di sekitar tablet, variasi bahan pelicin.

Referensi

1. Depkes RI. Farmakope Indonesia edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1995.
2. Ansel H, Allen L, M Vlachou. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery System. Philadelphia: Leipincott Williams and Wilkins; 1999. 175–176 p.
3. Gibson M. Pharmaceutical Preformulation

- and Formulation. Vol. 199, Pharmaceutical Preformulation and Formulation. 2015.
4. HA L, Lachman L, JB S. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets volume 1. HA L, Lachman L, JB S, editors. Vol. 1. New York: Marcel Dekker; 1989.
 5. Syamsul ES, Supomo. Formulation of Effervescent Powder of Water Extract of Bawang Tiwai (*Eleuterine palmifolia*) as A Healthy Drink. Maj Obat Tradis. 2015;19(3):113-7.
 6. Rowe R.C. Handbook of Pharmaceutical Excipients e-book Pharmaceutical. USA: American Pharmacists Assoc. Press; 2009.
 7. Voigt R. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press; 1994.
 8. Putra DJS. Penggunaan Polivinill Pirolidon (PVP) Sebagai Bahan Pengikat Pada Formulasi Tablet Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.). J Farm Udayana. 2019;8(1):14.
 9. BPOM. Peraturan Badan Pengawas Obat Dan Makanan tentang Bahan Tambahan Pangan. Badan pengawas obat dan makanan republik Indones. 2019;1-10.
 10. BPOM. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2014;1-25.
 11. Advankar A, Maheshwari R, Tambe V, Todke P, Raval N, Kapoor D, et al. Specialized tablets: Ancient history to modern developments [Internet]. Drug Delivery Systems. Elsevier Inc.; 2019. 615-664 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814487-9.00013-2>
 12. Parrot E. Pharmaceutical Technology Fundamental Pharmaceutics. 3rd ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company; 1971.
 13. Aslani A, Fattahi F. Formulation, characterization and physicochemical evaluation of potassium citrate effervescent tablets. Adv Pharm Bull. 2013;3(1):217-25.
 14. Lachman, L., Lieberman, H. dan Kanig J. Lachman and Lieberman - The Theory and Practice of Industrial Pharmacy.pdf. Varghese Publishing House. 1987. p. 520-2.
 15. Yulianti DA, Sutoyo S, Kimia J, Matematika F, Alam P, Surabaya UN, et al. Formulasi Tablet Effervescent Ekstrak Daun Katuk (*Sauvopus androgynous* L . Merr .) dengan Variasi Konsentrasi Asam dan Basa Effervescent Tablet Formulation of Katuk (*Sauvopus androgynous* L . Merr .) Leaves Extract with Variation of Acid and Base Conce. 2021;8(1):34-40.
 16. Sun H, Wang X, Wang J, Shi G, Chen L. Influence of the formula on the properties of a fast dispersible fruit tablet made from mango, *Chlorella*, and cactus powder. Food Sci Nutr. 2020;8(1):479-88.
 17. Joseph A. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. J Pharm Sci. 1990;79(11):1044.
 18. Mohrle R. Effervescent tablets in Lieberman., Lachman, L., (eds). New York: Pharmaceutical Dosage Form: Tablet, Vol I, Marcell Dekker Inc; 1989.
 19. Sandrasari D, Zaenal A. Penentuan Konsentrasi Natrium Bikarbonat dan Asam Sitrat pada Pembuatan Serbuk Minuman Anggur Berkarbonasi (Effervescent). Teknol Ind Pertan. 2006;21(2):113-7.
 20. Asiani TW, Nanda TSS, Kurniawan DW. Formulasi Tablet Efervesen dari Ekstrak Etanol Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). J Pembang pedesaan. 2012;12(1):1-9.
 21. Winato BM, Sanjaya E, Siregar L, Fau SKYMV, Mutia DMS. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Serai Wangi (*Cymbopogon nardus*) Terhadap Bakteri Propionibacterium Acnes. BIOLINK (Jurnal Biol Lingkung Ind Kesehatan). 2019;6(1):50.
 22. Apsari PA, Sari DNE, Kusuma AP, Indrati O. Effervescent Tablet Formulation Melinjo Seed Extract (*Gnetum gnemon* L.) Using PEG 6000 As Lubricant and Citric Acid - Tartaric Acids As Acid Sources. J Eksakta. 2018;18(1):30-41.
 23. Catur Romantika R, Wijana S, Gadizza Perdani C. Formulation and Characterization

- of Baby Java Orange (*Cytrus Sinensis L. Osbeck*) Effervescent Tablets Study on Citric Acid Proportion. Ind J Teknol dan Manaj Agroindustri. 2017;6(1):15–21.
24. Tanjung YP, Puspitasari I. Formulasi dan Evaluasi Fisik Tablet Effervescent Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*). J Unpad Farmaka. 2019;17(1):1–14.
 25. Anesakirani A, Pramono YB, Nurwantoro. Karakteristik Fisik dan Organoleptik Tablet Effervescent Buah Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk.). J Teknol Pangan. 2018;2(1):59–63.
 26. Nurochmah S, Radjab NS, Lestari PM. Pengaruh Peningkatan Konsentrasi Asam Tartrat Sebagai Sumber Asam Terhadap Sifat Fisik Granul Effervescent Sari Buah Naga (*Hylocereus undatus*). 2012;1–6.
 27. Oktaviani SR, Dewi YSK, Lestari OA. Karakteristik Fisikokimia dan Sensori Minuman Kesehatan Effervescent Nanas Pada Berbagai Konsentrasi Natrium Bikarbonat [Artikel Ilmiah]. [Pontianak]: Universitas Tanjungpura; 2019.
 28. Fitria Susilowati, Anggun Mahirotun Nur Sholikhah SA. Formulasi Tablet Effervescent Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*) Dengan Variasi Konsentrasi Effervescent Mix. Pharm J Islam Pharm. 2018;2(2):37.
 29. Kholidah S, Khumaidi A. Formulasi Tablet Effervescent Jahe (Z. Officinale Roscoe) Dengan Variasi Konsentrasi Sumber Asam dan Basa. Online J Nat Sci [Internet]. 2014;3(3):216–29. Available from: [http://download.portalgaruda.org/article.php?article=275713&val=741&title=Formulasi%20Tablet%20Effervescent%20Jahe%20\(Z.%20officinale%20Roscoe\)%20Dengan%20Variasi%20Konsentrasi%20Sumber%20Asam%20Dan%20Basa](http://download.portalgaruda.org/article.php?article=275713&val=741&title=Formulasi%20Tablet%20Effervescent%20Jahe%20(Z.%20officinale%20Roscoe)%20Dengan%20Variasi%20Konsentrasi%20Sumber%20Asam%20Dan%20Basa)
 30. Arini HD, Hadisoewignyo L. Optimasi Formula Tablet Effervescent Ekstrak Rimpang Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roxb. Var Rubrum). J Farm Sains Dan Komunitas. 2012;9(2):75–84.
 31. Lynatra C, Wardiyah W, Elisya Y. Formulation Of Effervescent Tablet Of Temulawak Extract (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) With Variation Of Stevia As Sweetener. SANITAS J Teknol dan Seni Kesehat. 2018;9(2):72–82.
 32. Andini S, Rustiani E, Indriati D. the Tablet Formulations Efervesen Extract of *Cinnamon*. J Sci Innovare. 2018;01(02):40–3.
 33. Susilowati, Rizqi Fajri Ramadhani, Andi Sri Suriati Amal F. Formulasi Tablet Effervescent Ekstrak Kulit Buah Delima Putih (*Punica granatum* var. *album*) Dengan Variasi Asam Sitrat Dan Asam Tartrat. Pharm J Islam Pharm. 2018;2(1):22.
 34. Arieputri JA, Kristiana D, Parnaadji RR. Efektifitas Tablet Effervescent Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L) sebagai Pembersih Gigi Tiruan Resin Akrilik terhadap *Candida albicans*. Stomatognatic - J Kedokt Gigi. 2019;16(2):33.
 35. Zuraidah N, Ayu WD, Ardana M. Pengaruh Variasi Konsentrasi Asam Sitrat dan Asam Tartrat terhadap Sifat Fisik Granul Effervescent dari Ekstrak Daun Nangka (*Artocarpus heterophyllus* L.). Proceeding Mulawarman Pharm Conf. 2018;8(November 2018):48–56.
 36. Hayati R, Sari A, Alfina N. Serbuk effervescent kombinasi ekstrak buah pare (*Momordica charantia* L.) dan buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) sebagai nutraceutical. AcTion Aceh Nutr J. 2019;4(1):42.
 37. Permadi YW, Rahmatullah S, Prafitri LD, Azmi RS. Effervescent Granule Formulation Of Alpocate Seed Extract (*Persea americana* Mill.) With Acid-Basic Concentration Variation Formulasi Granul Effervescent Ekstrak Biji Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Variasi Konsentrasi Asam-Basa. Urecol. 2021;1(1):722–38.
 38. Sari DN. Pembuatan minuman fungsional tablet effervescent dari bubuk ekstrak daun kacang tujuh jurai (*Phaseolus lunatus* L.). J Litbang Ind. 2019;9(1):23.
 39. Kartikasari SD, Murti YB, Mada UG. Effervescent Tablets Formulation of Ginger Rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) with Variation of Citric Acid and Tartaric Acid Level. Maj Obat Tradis. 2015;20(2):124–32.

Potensi Penghambatan Sel Kanker Paru dari Ekstrak *Davallia denticulata*

Rudi Hendra¹, Muhammad Afham¹, Rohimatul Khodijah¹

Artikel Penelitian

Abstract: An epiphytic fern known as *Davallia denticulata*, which is a member of the Davalliaceae family, grows on oil palm. It has been reported that several different species within this genus have been used as anticancer agents, antimicrobial agents, and antioxidants. However, there has been no report of any biological activity associated with this species. As a result, the purpose of this study was to extract secondary metabolites and assess the cytotoxicity of the extracts. The maceration method was used to extract this plant with a variety of solvents (methanol, ethyl acetate, and n-hexane), and the MTS assay was utilized to determine the cytotoxicity of this plant in relation to lung cancer (A549 cell line). According to the findings, the extracts exhibited a wide variety of activity toward the A549 cell line. The IC_{50} for the activity of the ethyl acetate extract was found to be 317.59 ppm, whereas the $IC_{50}s$ for the water and n-hexane extracts were 575.41 and 806.06 ppm, respectively. These observations allow for a better understanding of the cytotoxicity of the species, which can then serve as a foundation for further research into the isolation and bioactivity of secondary metabolites.

Keywords: *Davallia denticulata*, extraction, cytotoxicity

Abstrak: Pakis epifit yang dikenal sebagai *Davallia denticulata*, yang merupakan anggota dari keluarga Davalliaceae, tumbuh di kelapa sawit. Telah dilaporkan bahwa beberapa spesies berbeda dalam genus ini telah digunakan sebagai agen antikanker, agen antimikroba, dan antioksidan. Namun, belum ada laporan tentang aktivitas biologis yang terkait dengan spesies ini. Oleh karena itu, tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengekstrak metabolit sekunder dan menguji sitotoksitas ekstrak tersebut. Metode maserasi digunakan untuk mengekstrak tanaman ini dengan berbagai pelarut (metanol, etil asetat, dan n-heksana), dan uji MTS digunakan untuk menentukan sitotoksitas tanaman ini dalam kaitannya dengan kanker paru-paru (cell line A549). Ekstrak menunjukkan berbagai aktivitas menghambat cell line A549. IC_{50} untuk aktivitas ekstrak etil asetat ditemukan sebesar 317,59 ppm, sedangkan IC_{50} untuk ekstrak air dan n-heksana masing-masing sebesar 575,41 dan 806,06 ppm. Pengamatan ini memungkinkan pemahaman yang lebih baik tentang sitotoksitas spesies, yang kemudian dapat berfungsi sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut tentang isolasi dan bioaktivitas metabolit sekunder.

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Riau, Pekanbaru 28283, Riau, Indonesia

Korespondensi:

Rudi Hendra
rudi.hendra@lecturer.unri.ac.id

Kata kunci: *Davallia denticulata*, ekstrak, sitotoksik

Pendahuluan

Davallia merupakan tumbuhan epifit yang tumbuh pada permukaan kulit kayu. Tumbuhan dengan jenis ini juga hidup di atas batu kapur dan jarang ditemukan di tanah. *Davallia* banyak dijumpai di daerah yang mempunyai ketinggian sekitar 300 hingga 2200 m di atas permukaan laut (1). *Davallia* hidup terestrial dan epifit, memiliki akar yang menyerupai akar serabut, batang semu (*rhizome*), tidak berduri, tidak memiliki daun steril, dan tipe daun majemuk. *Davallia* merupakan genus yang memiliki daya adaptasi yang tinggi sehingga mudah tumbuh dengan baik. Selain itu, juga memiliki rimpang yang tahan kering dan menjalar kemana-mana serta menyukai tempat terbuka sehingga mempunyai persebaran yang cukup luas. Contohnya *D. denticulata* dijumpai hidup epifit pada batang sawit (2).

Pada saat ini sudah banyak dilakukan penelitian mengenai bioaktivitas pada tumbuhan epifit salah satunya pada genus *Davallia*. Nugraha (2015) melaporkan bahwa *D. divaricata* Blume memiliki bioaktivitas sebagai antipsoriasis dan antioksidan, *D. solida* memiliki aktivitas antioksidan, antineurotoksisitas dan anti penuaan dini (3). *D. cylindrica* Ching telah diidentifikasi mengandung flavonoid sebanyak 16.44% dengan aktivitas antioksidan sebesar 0.258 mg/ml (hampir sama dengan rutin sebesar 0.25 mg/ml) (4). Chen *et al.* (2008), dalam penelitiannya menunjukkan bahwa akar *D. Solida* dilaporkan memiliki senyawa xanton, flavonoid, dan triterpenoid dengan aktivitas antioksidan IC₅₀ sebesar 15.93 ± 1.21µg (5). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Chai *et al.* (2015), *D. denticulata* memiliki kadar senyawa kimia yang tinggi. Diketahui *D. denticulata* memiliki kandungan total fenolik dan flavonoid 64 % dari beratnya. Tingginya kandungan senyawa metabolit sekunder pada *D. denticulata* menunjukkan bahwa tumbuhan ini memiliki potensi bioaktivitas yang tinggi (6). Cheng *et al.* (2012), melakukan isolasi pada *D. divaricata* dan diperoleh senyawa asam davallat yang dapat menghambat pertumbuhan sel kanker paru A549 cell lines (7).

Pada penelitian sebelumnya, *D. denticulata* memiliki sifat toksisitas dengan menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test (BSLT)*

dengan nilai LC₅₀ 100-200 ppm (8). Berdasarkan laporan yang ada, jika hasil BSLT menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan bersifat toksik maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk pengujian sitotoksik tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif antikanker (9). Oleh karena itu, dalam studi ini kami melaporkan ekstraksi dari beberapa pelarut organik dari spesies *D. denticulata*, dan juga aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker paru A549. Kemotipe molekuler yang terdapat pada satu genus dengan spesies ini akan di bahas dalam kaitannya dengan sifat farmakologis pada penelitian ini.

Bahan dan Metode

Metode

Uji Fitokimia

Uji Fitokimia Uji fitokimia ekstrak kasar daun nilam dilakukan sebagai skrining awal untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam daun nilam sesuai dengan literatur (10).

Ekstraksi

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan paku kaki tupai (*D. denticulata*) yang diambil di batang pohon kelapa sawit yang terdapat di Halaman Fakultas Pertanian, Universitas Riau, Pekanbaru. Tumbuhan ini juga telah diidentifikasi oleh Kepala Laboratorium Botani Jurusan Biologi FMIPA Universitas Riau. *Aerial parts* dari tumbuhan paku kaki tupai yang masih segar dikeringanginkan di udara terbuka yang tidak langsung terkena matahari selama 2 minggu. Daun yang telah kering dihaluskan sampai menjadi serbuk.



Gambar 1. Tumbuhan paku kaki tupai (*Davallia denticulata*)

Sebanyak 10 kg *aerial parts* dari tumbuhan paku kaki tupai dikeringkan dengan cara dijemur tanpa sinar matahari. Setelah kering, sampel diblender hingga halus. Selanjutnya sampel ditimbang dan siap untuk dimaserasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Serbuk sampel sebanyak 3 kg diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Maserasi dilakukan selama 3x24 jam. Setiap 1x24 jam ekstrak disaring dan masing-masing filtrat ditampung. Sebelum disaring sampel dilufrasonifikasi selama 1 jam. Kemudian filtrat tersebut dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kasarnya. Ekstak kasar total *n*-heksana, etil asetat dan metanol ditimbang dengan timbangan analitik.

Sitotoksitas

Cell line kanker paru (A549) merupakan koleksi kultur dari Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik Universitas Padjadjaran. Sel-sel ditanam dalam medium *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM) (Gibco, Paisley, UK) yang mengandung 10% *Fetal Bovine Serum* (Gibco, Paisley, UK) dan 1% larutan *penicillin-streptomycin* (Gibco, Paisley, UK). Uji sitotoksitas dilakukan pada 96-well plates dan biakan dipertahankan pada suhu 37 °C dalam atmosfer 5% CO₂. Sel dengan *confluence* 70-80% diremejakan dengan media baru bebas serum, selanjutnya diinkubasi selama 4 jam, dan kemudian diberi perlakuan dengan 7,8125; 15.625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; dan

1000 µg/mL ekstrak. Setelah 24 jam inkubasi, reagen *Cell Counting Kit-8* (Dojindo, Rockville-MD, USA) ditambahkan dan campuran diinkubasi selama 2 jam. Absorbansi suspensi sel diukur menggunakan spektrofotometer Tecan Infinite (Tecan, Grodig, Austria) pada 450 nm (11).

Hasil dan Diskusi

Uji fitokimia digunakan untuk mendeteksi senyawa metabolit pada tumbuhan berdasarkan golongannya sebagai informasi awal dalam mengetahui senyawa kimia dalam suatu tumbuhan. Hasil identifikasi kandungan kimia tumbuhan paku kaki tupai dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah tumbuhan kaki tupai (*D. denticulata*) yang diambil di batang pohon kelapa sawit. Sampel dilakukan uji fitokimia terlebih dahulu untuk menentukan golongan senyawa metabolit yang terkandung didalamnya. Berdasarkan **Tabel 1** diperoleh bahwa tumbuhan *D. denticulata* memiliki senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, terpenoid/steroid, saponin dan fenolik. Hasil uji kualitatif flavonoid dan fenolik dilakukan dengan cara sampel direndam dengan alkohol dan dipanaskan perlahan-lahan hingga mendidih diatas penangas air. Alkohol digunakan karena sifatnya yang polar dapat mengikat senyawa flavonoid dan fenolik yang bersifat polar. Pada uji flavonoid ditambahkan logam Mg dan beberapa tetes HCl pekat.

Tabel 1. Hasil skrining uji fitokimia tumbuhan paku kaki tupai.

Uji Fitokimia	Hasil Positif Menurut Pustaka (Illing <i>et al.</i> , 2017)(15)	Hasil
Alkaloid	Terbentuk endapan jingga (Pereaksi Dragendorff)	-
	Terbentuk endapan putih (Pereaksi Mayer)	-
Flavonoid	Terbentuknya larutan kuning, jingga atau merah	+
Saponin	Terbentuk busa stabil ± 5 menit	+
Terpenoid/Steroid	Terbentuk larutan warna hijau atau ungu	+
Fenolik	Terbentuknya larutan hitam	+

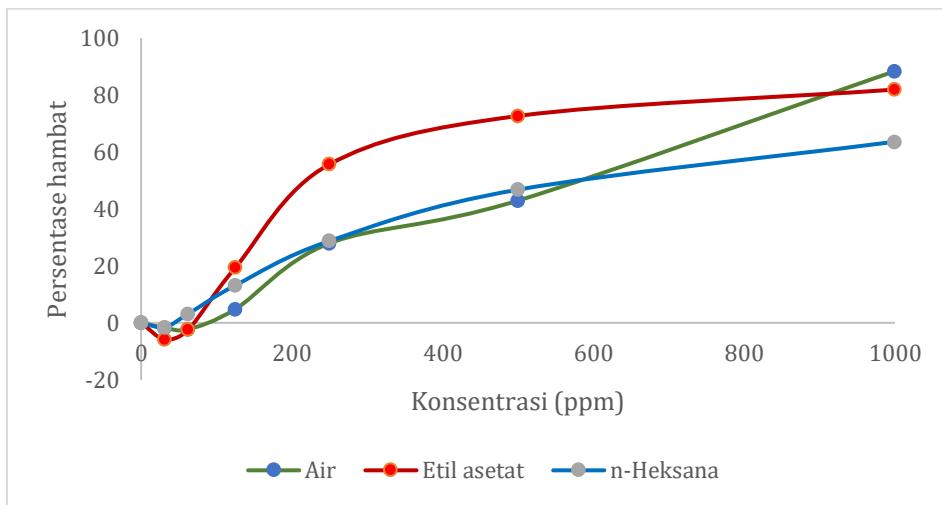
Hasil dijabarkan dengan tanda (+) menunjukkan adanya kandungan senyawa dan (-) tidak ada kandungan senyawa)

Flavonoid merupakan senyawa yang mengandung dua cincin aromatik dengan gugus hidroksil lebih dari satu. Penambahan Mg dan HCl pekat akan mereduksi flavonoid sehingga menghasilkan larutan yang berwarna kuning, jingga atau merah. Sedangkan penambahan beberapa tetes FeCl_3 bertujuan untuk mengidentifikasi fenolik. Senyawa fenol dengan gugus hidroksil akan bereaksi dengan FeCl_3 membentuk larutan berwarna hitam. Uji kualitatif saponin positif ditandai dengan terbentuknya busa yang dapat bertahan selama 5 menit. Busa yang ditimbulkan saponin karena adanya kombinasi struktur senyawa penyusunnya yaitu rantai sapogenin nonpolar dan rantai samping polar yang larut dengan air. Sehingga busa yang ditimbulkan dapat bertahan selama kurang lebih 5-10 menit (Khotimah, 2016). Identifikasi terpenoid/steroid pada tumbuhan kaki tupai memberikan hasil positif ketika ditambahkan pereaksi Lieberman-Buchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat). Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena proses oksidasi melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi. Hasil uji fitokimia untuk flavonoid dan fenolik *D. denticulata* telah dilaporkan sebelumnya dalam penelitian Chai *et al.*, (2015) serta hasil uji steroid/terpenoid sama dengan hasil yang telah dilaporkan pada genus *Davallia* (Cao *et al.*, 2014) (4) (6).

Sebelum ekstraksi metabolit sekunder, sangat penting untuk memperlakukan tanaman yang akan digunakan, karena hal ini berdampak pada

senyawa bioaktif yang diekstraksi. Oleh karena senyawa dalam sampel dapat terdegradasi dengan cepat oleh proses oksidatif, enzimatik, atau polimerisasi, sampel yang digunakan dalam penelitian ini dikering anginkan tanpa aanya pengaruh sinar matahari langsung untuk menentukan aktivitas yang dilakukan (12). Pemilihan pelarut ekstraksi yang tepat diperlukan untuk mengisolasi senyawa bioaktif yang diinginkan dari sampel tanaman. Menurut Tong *et al.* (2014), jenis bahan alami yang dapat diekstraksi dan aktivitas biologis dari ekstrak kasar dipengaruhi oleh pelarut organik yang digunakan. Dalam penelitian ini, spesies diekstraksi dengan pelarut organik polaritas yang berbeda (*n*-heksana, dan etil asetat) untuk memisahkan molekul yang memiliki sifat kepolaran yang berbeda (13).

Pada pengujian sitotoksitas dari beberapa ekstrak dari spesies ini dilakukan terhadap sel kanker paru (A549 cell line) dengan beberapa konsentrasi. Pada **Gambar 2.** menunjukkan bahwa daya hambat pertumbuhan sel kanker A549 tergantung pada konsentrasi ekstrak. Dari hasil di dapatkan bahwa ekstrak etil asetat dan air memiliki kemampuan penghambatan pertumbuhan yang kurang lebih sama, di mana etil asetat dapat menghambat 81,8 % sedangkan ekstrak air menghambat 88,3%. Sedangkan *n*-heksana memiliki kemampuan yang cukup rendang dibandingkan kedua ekstrak tersebut dengan penghambatan 63,6% pada konsentrasi 1000 ppm.



Gambar 2. Pertumbuhan Sel Kanker Paru (A549 Cell line) Terhadap Ekstrak *D. denticulata*

Aktivitas sitotoksik pada cell line A549 dilakukan menggunakan uji MTS. Penelitian telah menunjukkan bahwa uji MTS sitotoksitas secara *in vitro* adalah cara praktis untuk mengevaluasi viabilitas sel. Fitur utama dari tes ini adalah kemudahan penggunaan, presisi, dan hasil toksitas yang cepat. Uji MTS juga dapat menjadi metode yang berharga dalam menilai risiko terhadap kesehatan manusia jika sensitivitas dan spesifitas uji yang memadai ditunjukkan (14). Pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas yang paling tinggi dibandingkan ekstrak air dan *n*-heksana. Hasil ini sejalan dengan hasil pengujian toksitas dengan menggunakan metode BSLT pada penelitian sebelumnya (8). BSLT mendeteksi aktivitas antikanker yang kuat tetapi terbatas dalam kemampuan prediktifnya untuk membedakan antara senyawa antikanker yang kuat hingga sedang dan buruk. Oleh karena itu, BSLT memberikan skrining awal yang cepat untuk sitotoksin yang kuat dan memungkinkan tingkat diskriminasi yang lebih baik pada kanker (9). Meskipun ekstrak etil asetat memiliki tingkat penghambatan yang tinggi, kemampuannya ini masih lebih rendah dibandingkan kontrol positif cisplatin.

Tabel 2. Sitotoksitas dari *Davallia denticulata* ekstrak

Sampel	IC ₅₀ (μ g/mL)
Air	575,41
Etil Asetat	317,59
<i>n</i> -Heksana	806,06
Cisplatin	78,42

Pada penelitian yang dilaporkan oleh Cheng *et al* (2012) melaporkan bahwa senyawa asam davalik yang diisolasi dari *D. divaricata* dan aktivitas penghambat kanker paru (cell lina A549). Senyawa ini secara signifikan menginduksi spesies oksigen reaktif (ROS) serta aktivasi caspase-3, -8, dan -9, sehingga menekan pertumbuhan sel A549 dan meningkatkan aktivitas apoptosis (7). Oleh karena itu, kemungkinan aktivitas penghambatan sel A549 dari spesies *D. denticulata* dikarenakan keberadaan dari senyawa ini. Dimana berdasarkan Kemotipe molekuler antar spesies di

dalam suatu genus memiliki kemungkinan senyawa yang sama. Namun demikian, isolasi senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etil asetat dan pengujian aktivitas sitotoksiknya sangat diperlukan untuk mendukung hasil penelitian ini.

Kesimpulan

Pada penelitian ini telah berhasil mengekstraksi senyawa metabolit dengan menggunakan beberapa pelarut organik. Ekstrak etil asetat memiliki tingkat penghambatan sel kanker paru. Oleh karena itu isolasi senyawa yang bertanggung jawab pada aktivitas tersebut perlu dilakukan lebih lanjut.

Referensi

1. Noraini T, Ruzi A, Nadiah N, Nisa R, Maideen H, Solihani S. Ciri anatomi stip bagi beberapa spesies *Davallia* (Davalliaceae) di Malaysia. Sains Malays. 2012;41:53-62.
2. Sofiyanti N, Iriani D. Davalliaceae (Pteridophyta) di Bukit Batu Kabupaten Siak Provinsi Riau. Repository Universitas Riau. 2013:1-11.
3. Nugraha AS. Natural product studies on tropical and polar plants (Thesis). Wollongong Australia: Wollongong; 2015.
4. Cao J, Xia X, Dai X, Wang Q, Xiao J. Chemical composition and bioactivities of flavonoids-rich extract from *Davallia cylindrica* Ching. Environ Toxicol Pharmacol. 2014;37(2):571-9.
5. Chen Y-H, Chang F-R, Lin Y-J, Hsieh P-W, Wu M-J, Wu Y-C. Identification of antioxidants from rhizome of *Davallia solida*. Food Chem. 2008;107(2):684-91.
6. Chai T-T, Yeoh L-Y, Ismail NM, Ong H-C, Manan FA, Wong F-C. Evaluation of glucosidase inhibitory and cytotoxic potential of five selected edible and medicinal ferns. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2015;14(3):449-54.
7. Cheng A-S, Chang W-C, Cheng Y-H, Chen K-Y, Chen K-H, Chang T-L. The effects of Davallic acid from *Davallia divaricata* Blume on apoptosis induction in A549 lung cancer cells. Molecules. 2012;17(11):12938-49.

8. Hendra R, Khodijah R, Afham M, Fachira R, Sofiyanti N, Teruna HY. Tingkat toksisitas dari beberapa ekstrak tanaman paku kaki tupai (*Davallia denticulata*). Majalah Farmasetika. 2019;4:46-9.
9. Ghisalberti EL. Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. In: Colegate SM, Molyneux RJ, editors. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. Second ed. Florida: CRC Press; 2008. p. 18.
10. Harborne JB. Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. Bandung: Penerbit ITB. 1987;78.
11. Rachmawati H, Sundari S, Nabila N, Tandrasasmita OM, Amalia R, Siahaan TJ, et al. Orf239342 from the mushroom *Agaricus bisporus* is a mannose binding protein. Biochem Biophys Res Commun. 2019;515(1):99-103.
12. Yenn TW, Ring LC, Zahan KA, Rahman MSA, Tan W-N, Alaudin BJS. Chemical composition and antimicrobial efficacy of *Helminthostachys zeylanica* against foodborne *Bacillus cereus*. Nat Prod Sci. 2018;24(1):66-70.
13. Tong W, Zaadah JN, Tan W, Melati K, Latiffah Z, Darah I. Antimicrobial activity of *Phomopsis* sp. ED2 residing in medicinal plant *Orthosiphon stamineus* Benth. Annu Res Rev Biol. 2014;1490-501.
14. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. Toxicology. 1997;124(3):179-92.
15. Illing I, Safitri W, Erfiana E. Uji fitokimia ekstrak buah dengen. Dinamika. 2017;8(1):66-84.

Formulasi Nasal Spray Anti-Influenza yang Mengandung Nanopartikel Perak

Sutriyo¹, Wilbert Wylie¹, Kurnia Sari Setio Putri¹, Okti Nadia Poetri², Ratika Rahmasari^{3*}

Artikel Penelitian

Abstract: Influenza A virus is one of the most common causes of respiratory disease in the world. Even though, vaccines and anti-influenza virus are become the first line for therapy, but the mutation ability of influenza virus is able to cause several outbreaks in the world. Silver nanoparticles (AgNP) have been proven to exhibit antiviral activity, however the use of AgNP in pharmaceutical products is still limited. In this study, we aimed to formulate nasal spray containing AgNP, to evaluate its physicochemical properties, and its antiviral activity toward H5N1 influenza A virus. AgNP were synthesized using chemical reduction method with polyvinyl alcohol as stabilizer, and further prepared into nasal spray product. Physicochemical properties and anti-hemagglutination activity of nasal spray were further evaluated. The nasal spray contained different size of AgNP (less and more than 50 nm) showed physical stability after 28 days storage. However, Anti-influenza evaluation of nasal spray contained AgNP less than 50 nm exhibited better anti-hemagglutination activity against influenza A virus.

¹ Laboratory of Pharmaceutical, Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

² Faculty of Veterinary, Institut Pertanian Bogor University, Indonesia

³ Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Universitas Indonesia, Depok, Indonesia

Korespondensi:

Ratika Rahmasari
ratika.rahamasari@farmasi.
ui.ac.id

Keywords: silver nanoparticles, spray, influenza

Abstrak: Influenza virus merupakan salah satu penyebab penyakit pernapasan menular dengan tingkat transmisi yang cukup tinggi. Meskipun vaksin dan penggunaan obat antiviral merupakan tata laksana utama dalam mengurangi tingkat keparahan penyakit ini, kemampuan influenza A virus untuk bermutasi tetap mampu menyebabkan kejadian luar biasa di beberapa negara. Perak nanopartikel (AgNP) merupakan salah satu logam mineral yang memiliki aktivitas antiinfluenza, namun penggunaannya dalam sediaan obat farmasi masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk memformulasikan AgNP yang dibuat dengan metode reduksi untuk membuat sediaan *nasal spray*, mengevaluasi sifat fisikokimia dan aktivitas anti influenza terhadap virus influenza A H5N1 dari sediaan yang dibuat. Pada penelitian ini AgNP dengan ukuran lebih kecil dan lebih besar dari 50 nm telah berhasil dibuat (11.2 nm dan 90 nm). Setelah diformulasikan, *Nasal spray* dengan kedua ukuran AgNP menunjukkan stabilitas fisikokimia yang baik. *Nasal spray* dengan ukuran AgNP lebih kecil dari 50 nm menunjukkan aktivitas inhibisi hemagglutinin terhadap virus influenza A H5N1 yang lebih baik.

Kata kunci: silver nanoparticles, spray, influenza

Introduction

Influenza is an infectious respiratory disease caused by influenza A and B virus (1). Influenza transmission mainly occurs through droplets produced by infected patients when they talk, sneeze or cough (2). The World Health Organization estimates that annual epidemics of influenza result in 1 billion infections, 3 to 5 million cases of severe illness and 3 to 5 hundred thousand deaths (3). Due to its high transmission rate, handling of influenza is mainly focused on its prevention rather than treatment. Some of the preventive measure includes vaccination, wearing mask, hand washing and disinfection (4). Among those preventive measures, vaccination is the most recommended action to be done annually (5). However, current seasonal influenza vaccines have only sub-optimal effectiveness across all age groups (4). A suggested method for limiting respiratory disease transmission is by the intranasal delivery of antiviral medications or agents (6).

Several studies had been demonstrated the antiviral activity of the silver nanoparticles (AgNP) including against adenovirus, hepatitis B virus, herpes simplex virus, human immunodeficiency virus, influenza A virus, norovirus, poliovirus, respiratory syncytial virus, SARS-CoV-2, chikungunya virus and white spot syndrome virus (7,8). The different form of AgNP which are singular and combination or composite, has been proofed exhibiting anti influenza virus in vitro (9,10). In addition to its form, recent finding showed the smaller size of AgNP, the better antibacterial activity observed. Therefore, application of intranasal delivery such as nasal spray containing silver nanoparticles with suitable viscosity will be prospective to prevent influenza virus infection.

It should be noted that there is still little study on AgNP formulations for nasal spray. Thus, this study aimed to formulate and evaluate activity of a nasal spray product containing silver nanoparticles with different size. The formulation were further evaluated for its physicochemical properties and its antiviral activity toward H5N1 influenza A virus using the hemagglutination inhibition assay (HAI) method.

Materials and Methods

Materials

Materials used in this research were silver nitrate (Merck, Germany), fully hydrolyzed polyvinyl alcohol (viscosity of 4% aqueous solution at 20°C is 15.0 cps, Mw of 89,000 to 98,000) (Sigma-Aldrich, Singapore), sodium borohydride (Merck, Germany), Sodium carboxymethylcellulose (viscosity of 2% aqueous solution at 25°C is 561 cps) (Sigma-Aldrich, Singapore), Sodium chloride (Merck, Germany), Citric acid monohydrate (Golden Sinar Sakti, Indonesia), demineralized water (Brataco, Indonesia), H5N1 virus clade 2.1.3 (Veterinary faculty, Institute Pertanian Bogor, Indonesia), red blood cell (Veterinary Faculty, Institute Pertanian Bogor University, Indonesia), phosphate-buffered saline pH 7,4 composed of sodium phosphate, sodium chloride and potassium phosphate (Sigma-Aldrich, Singapore), avian influenza serum antibody (Veterinary faculty, Institute Pertanian Bogor, Indonesia), Spectrophotometer UV-Vis (Shimadzu UV 1800-PC, Japan), Transmission electron microscope (Tecnai G2 20S-Twin, America), Particle size analyzer (Malvern Mastersizer, England), Atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu AA 6300, Japan), pH meter (Oakton, United States), Viscometer (Cole-Palmer 98965-40, Germany).

H5N1 Influenza A virus was kindly obtained from Veterinary faculty, Institute Pertanian Bogor, Indonesia. Red blood cells were collected from chicken which breed at veterinary faculty, Institute Pertanian Bogor, Indonesia, and kept at 4°C before use.

Method

Synthesis of silver nanoparticles

AgNP were synthesized using chemical reduction method with polyvinyl alcohol as stabilizer. Variation in concentration of AgNO_3 and synthesis condition is described in **Table 1**. Briefly, 10 mL of PVA 2% was added into 20 mL AgNO_3 , and then stirred. The mixture was further added with 0,6 mL NaBH_4 0.2 M, and stirred for 3 hours. Formation of AgNP was confirmed as yellow suspension visually observed.

Table 1. Preparation of silver nanoparticle

Silver Nanoparticle*	Concentration of AgNO ₃ (mM)	Temperature of synthesis (°C)
AgNP F1	0.5	30
AgNP F2	1	60

*AgNP F1 and F2 refer to Silver nanoparticles with expected size less than 50 nm and more than 50 nm.

To optimizing reduction process of AgNO₃, the silver AgNP were stored for a day after the synthesis (11). The AgNP were further stored in airtight glass bottle (12).

Characterization of silver nanoparticles

AgNP morphology were analyzed using the Transmission Electron Microscope. Particle size distribution, polydispersity index and zeta potential of silver nanoparticle was measured using Particle Size Analyzer (Malvern Mastersizer, England) after dilution with demineralized water.

Formation of AgNP was confirmed using UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu UV 1800-PC, Japan) after 5 times dilution of samples with demineralized water. Demineralized water was used as the baseline and UV-Vis spectra of the samples was measured in the wavelength of 200 - 600 nm. Concentration of AgNP in the sample was then measured using atomic absorption spectrophotometry (Shimadzu AA 6300, Japan). AgNP with Particle size distribution less than 50 nm and between 100 nm to 50 nm were further marked as AgNP F1 and AgNP F2, respectively.

Formulation of silver nanoparticles nasal spray

Formulation of nasal spray of silver nanoparticle (AgNP NS) is described as depicted in **Table 2**, respectively. In brief, 184.8 mL demineralize water was heated to 30°C, and then added into 90 mL of silver nanoparticles. The

mixture was then added with 15 mL of NaCl, 7.8 mL of 2M citric acid and 2.4 mL of sodium carboxyl-methyl cellulose (Na-CMC) 1%. The mixture was stirred for 1 hour, and then stored in airtight and lightproof container at room temperature.

Evaluation of silver nanoparticles nasal spray

AgNP nasal spray was evaluated for its pH, viscosity, AgNP content, and spray pattern. pH was measured with pH meter (Oakton, United States), while its viscosity was measured using Cole-Palmer viscometer (Cole-Palmer, Germany), using spindle 1 at 50 rpm (13). AgNP content in nasal spray was measured using atomic absorption spectrophotometer. Spray pattern was performed by measuring diameter of the spraying pattern from a specific range.

Stability study of AgNP nasal spray was performed towards product which stored for 28 days in airtight and lightproof container at room temperature. Samples was taken from AgNP nasal spray at day 0, 7, 14, 21 and 28. Furthermore, its pH, viscosity and antiviral activity was analyzed at those time points.

Antiviral activity of silver nanoparticles nasal spray

Antiviral activity of AgNP nasal spray toward H5N1 influenza A virus was performed in two steps.

Table 2. Formulation of AgNP nasal spray

Ingredient	Concentration (% v/v)
Silver nanoparticles	30
NaCl	5
Citric acid 2 M	2,6
NaCMC 1%	0,8
Demineralized water	61,6

First, hemagglutination assay (HA) was performed to determine the 4 Hemagglutination unit (HAU). Second, hemagglutination inhibition assay (HAI) was performed on AgNP nasal spray formulas to evaluate its activity in inhibiting hemagglutination at red blood cells caused by 4 HAU of H5N1 influenza A virus.

HA was performed with modified Kaufmann *et al* method (14). The steps are as follow: 25 μ L of phosphate buffered saline (PBS) was added to the 96 well plate, from line A1 to A12 and B1 to B12, followed by addition 25 μ L of H5N1 influenza A virus to well A1 and B1. The mixture was diluted by a factor of two from each column to the next column. After each column was diluted in accordance with their concentration, 25 μ L of 1% red blood cell was added from well A1 to A12 and B1 to B12. The 96-well plate was further incubated for 30 minutes at room temperature. Red coloured solution indicates the hemagglutination activity, red coloured precipitate formed at the bottom of the well indicate no hemagglutination activity.

Hemagglutination Inhibition Assay (HAI) was performed with modified Kaufmann *et al* method (14). The steps are as follow: 25 μ L of 1 \times PBS was added to the 96 well plate, from line A1 to A12, B1 to B12, C1 to C12, D1 to D12, E1 to E12 and F1 to F12. Nasal spray product containing silver nanoparticles less than 50 nm (NS F1) was added to A1 and B1, then the product containing silver nanoparticles more than 50 nm (NS F2) was added to C1 and D1. Meanwhile E1 and F1 was added with avian influenza serum antibody, as a control. Each column in line A to D was then diluted by a factor of 2 from each column to the next column. After the dilution was done, 25 μ L of H5N1 influenza A virus was added to all tested wells. The plate was incubated for 30 minutes at room temperature, followed by addition 25 μ L of 1% red blood cells. The plate was incubated for another 30 minutes at room temperature. Inhibition of- or no hemagglutination activity was shown by red colored precipitate formed at the bottom of the well. Hemagglutination activity was shown by red-colored solution.

Statistical analysis

Statistical analysis of particle size distribution, polydispersity index and zeta

potential of silver nanoparticle were calculated directly by software of Particle Size Analyzer (Malvern Mastersizer, England), the data were written as mean. The pH was measured two times, the data were written as Mean \pm Standard deviation.

Results and Discussion

Synthesis and characterization of silver nanoparticles

AgNP were synthesized using chemical reduction method with 2% polyvinyl alcohol as stabilizer. The reduction procedure of AgNO_3 was proceed by NaBH_4 . Ag^+ received electron from NaBH_4 and shift from Ag^+ to AgO (15). Silver (Ag) is an unstable substance and tends to agglomerate, therefore stabilizer was included in the formula of AgNP to prevent and reduce the agglomeration. In this study, polyvinyl alcohol (PVA) was selected as the stabilizer as it well-known for its compatibility and ability to shape-control of AgNP (16).

Formation of AgNP was confirmed by observing the formation of yellow suspension in the solution, and analyzing UV-Vis spectra of the solution as shown in **Figure 1**, respectively. AgNP morphology was also observed which showed its spherical shaped, as depicted in **Figure 2**. AgNP have a unique-optical properties called surface plasmon resonance (SPR) which occurs due to the coherent interaction between electron and light electromagnetic field which cause oscillation at metal surface. SPR properties cause an intense interaction of silver nanoparticles at a certain wavelength in the range of 380 - 450 nm (17, 18). As shown in **Figure 1**, the peak wavelength of silver nanoparticles occurred at 399.20 and 384.70 nm for AgNP F1 and AgNP F2, respectively. Thus, this result confirmed that both formulas successfully produce silver nanoparticles.

Concentration of AgNO_3 and reaction temperature were varied to obtain nanoparticles with various size, as described in **Table 1**. The result showed that the higher concentration of AgNO_3 , the bigger particle size of AgNP, as shown at **Table 3**, respectively.

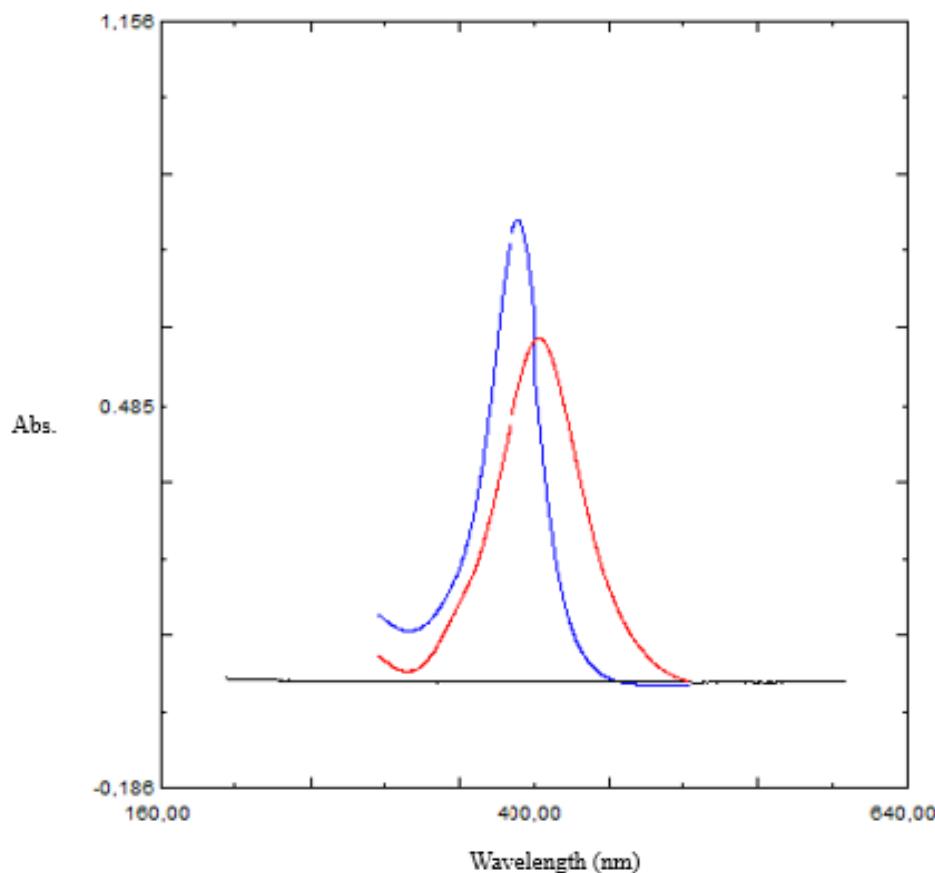


Figure 1. The UV-Vis spectrum of AgNP F1 (D_v90 11.2 nm) indicated by red line; AgNP F2 (D_v90 92.2 nm) indicated by blue line

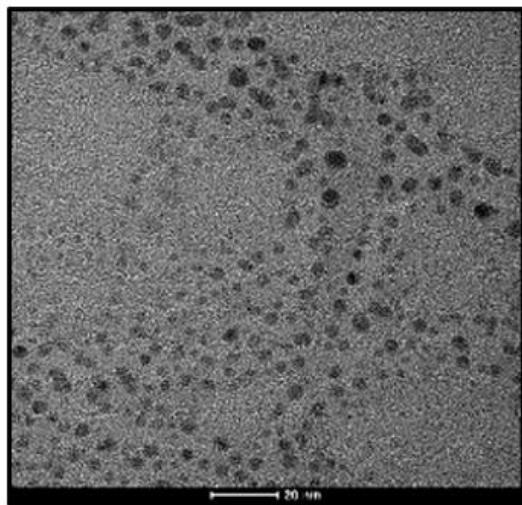
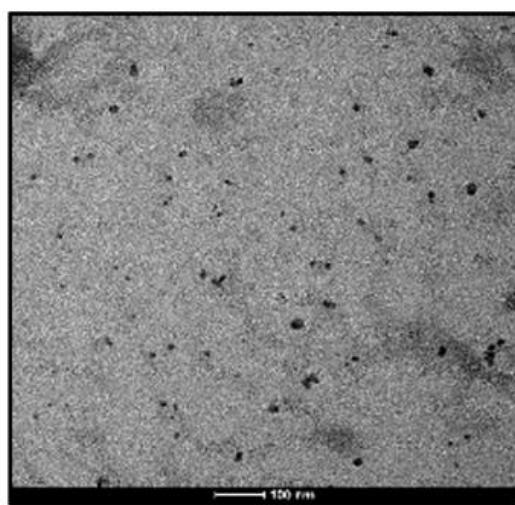
A**B**

Figure 2. Silver nanoparticles morphology of F1 (A) and F2 (B)

Table 3. Characterization of silver nanoparticles (AgNP)

Parameters	AgNP F1	AgNP F2
Particle size (nm)	11.2	92.2
Polidispersity index	0.467	0.450
Zeta potential (mV)	-19.8	-14.3
Ag content ($\mu\text{g/mL}$)	38.64	38.17

Note: AgNP F1 mean AgNP with particle size less than 50 nm; AgNP F2 mean AgNP with particle size more than 50 nm

This result was in accordance to the previous study which combination of high concentration and high temperature produced AgNP with bigger particle size (19,20).

Polydispersity index (PDI) which indicates the size heterogeneity of nanoparticles was also measured, as shown at **Table 3**, respectively. The PDI values < 0.05 are more to mono disperse, meanwhile values > 0.7 are common to heterogeneity distribution of particles size (21). It showed that PDI value of both samples were less than 0.5, which indicates a slightly mono dispersed particle distribution. Zeta potential was also measured to predict the stability of particles in liquid product, since it is related to the interactions between particles in a colloidal system. Nanoparticulate system with high zeta potential values (less than -30 mV or more than +30 mV) are considered as stable. On the other hand, low zeta potential value indicates that the particles tend to attract to each other and aggregate (22).

In addition, at **Table 3**, zeta potential value of AgNP were -19.8 mV and -14.3 mV for the AgNP F1 and F2, respectively. This indicated that both AgNP need to be optimized more to get AgNP with higher stability. However, as expected, the

smaller nanoparticles had higher zeta potential value as they are more stable and less likely to aggregate compared to the larger nanoparticles. Further concentration of AgNP in the solution was also measured. No significant difference of AgNP concentration in F1 and F2 was obtained. Therefore, concentration of AgNO_3 and reaction temperature were only affected physical properties of particles, but not the concentration of AgNP obtained.

Formulation and characterization of silver nanoparticles nasal spray (AgNP NS)

Silver nanoparticle nasal spray (AgNP NS) was prepared by adding AgNP solution into solution containing NaCl, citric acid and Na-CMC. The obtained nasal spray product was then evaluated, and the result is described in **Table 4**, respectively.

Citric acid was added into AgNP nasal spray formula as pH adjuster, to ensure a suitable pH of nasal product. It is suggested that the nasal product has pH 3.5 – 7.5 to prevent disruption of the cilia function in acidic or alkaline environment (23).

Table 4. Characterization of AgNP nasal spray

Parameters	NS F1	NS F2
pH	5.35 ± 0.01	5.29 ± 0.01
Viscosity (cp)	117.1	118.3
Gradient average	1.2305	1.095
Ag content ($\mu\text{g/mL}$)	5.8	7.28

Note: NS F1 mean nasal spray contained AgNP with particle size less than 50 nm; NS F2 mean nasal spray contained AgNP with particle size more than 50 nm

Table 5. Stability of AgNP nasal spray

Parameters	Storage time (days)	NS F1	NS F2
pH	0	5.35 ± 0.01	5.29 ± 0.01
	7	5.40 ± 0.01	5.39 ± 0.01
	14	5.50 ± 0.01	5.35 ± 0.01
	21	5.55 ± 0.02	5.52 ± 0.01
	28	5.58 ± 0.01	5.60 ± 0.01
Viscosity (cp)	0	117.1	118.3
	7	113.8	119.6
	14	114.5	119.1
	21	114.2	117.2
	28	115.6	117.6
HAI test (µg/mL)	0	0.18	0.23
	28	2.9	not detected

Note: NS F1 mean nasal spray contained AgNP with particle size less than 50 nm; NS F2 mean nasal spray contained AgNP with particle size more than 50 nm

Na-CMC 1% was also added into formula as viscosity increasing agent. Viscosity is one of the factors affecting the spraying pattern and effectiveness of a nasal spray product. The greater the viscosity value, the larger the droplet and the spray pattern will be narrower. On the other hand, the lower the viscosity value, the smaller the droplet and the spray pattern will be wider. Moreover, Na-CMC also play as muco-adhesive polymers, to increase residence time of AgNP in nasal cavity and provide adequate time to exhibit antiviral activity (24).

AgNP content in the product at the concentration of 6.25 - 100 µg/mL showed inhibitory effect towards the influenza A virus. However, concentration greater than 25 µg/mL showed cytotoxic effect, which indicates that safety level of usage is under 25 µg/mL (9). Therefore, silver content in the nasal spray was determined ensure that the product is safe to be used without causing any cytotoxic effect. **Table 4**, respectively, showed that Ag concentration in nasal spray were adequate to exhibit inhibitory effect towards the influenza A virus, as well as safe and non-toxic to the cells.

Storage of AgNP nasal spray in room temperature for 28 days showed that pH and viscosity of product were slightly changed, as depicted at **Table 5**, respectively. After 28 days of storage, the

pH of AgNP nasal spray F1 and F2 were increased which might indicated the changed of free Ag in nasal spray. On the other hand, the viscosity of AgNP nasal spray were slightly reduced which might reduce residence time of AgNP in nasal cavity. To consider both of parameters, change in pH and viscosity after 28 days of storage might affect the antiviral activity of AgNP nasal spray.

Antiviral activity test

Several reports suggested that the anti influenza activity of AgNP is due to entry inhibition of influenza virus into the cells which caused by binding of AgNP and Influenza glycoproteins (10,25). Hemagglutination inhibition assay is a classical methodology use for the classification of hemagglutinating viruses and predicting compound(s) ability to protect cells against influenza virus entry (26,27).

Hemagglutination Assay (HA) was performed to determine the dilution in which the 4 HAU can be obtained. The result of HA test is shown in **Figure 3**, respectively. According to WHO, 4 HAU was used as standard amount for hemagglutination inhibition assay (HAI) (14). Thus, this result was then applied for further HAI to assess antiviral activity of AgNP nasal spray at day 0 and day 28.

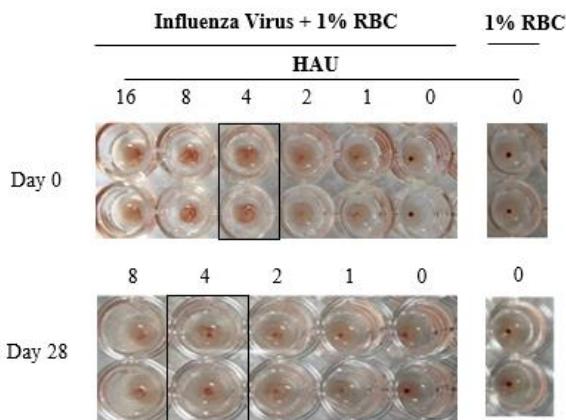


Figure 3. Hemagglutination assay was performed at day 0 and at day 28. A) 4 HAU as mark by black color line at day 0; B) 4 HAU as mark by black-color line at day 28. HAU was referred to hemagglutination unit; RBC was refer to red blood cells.

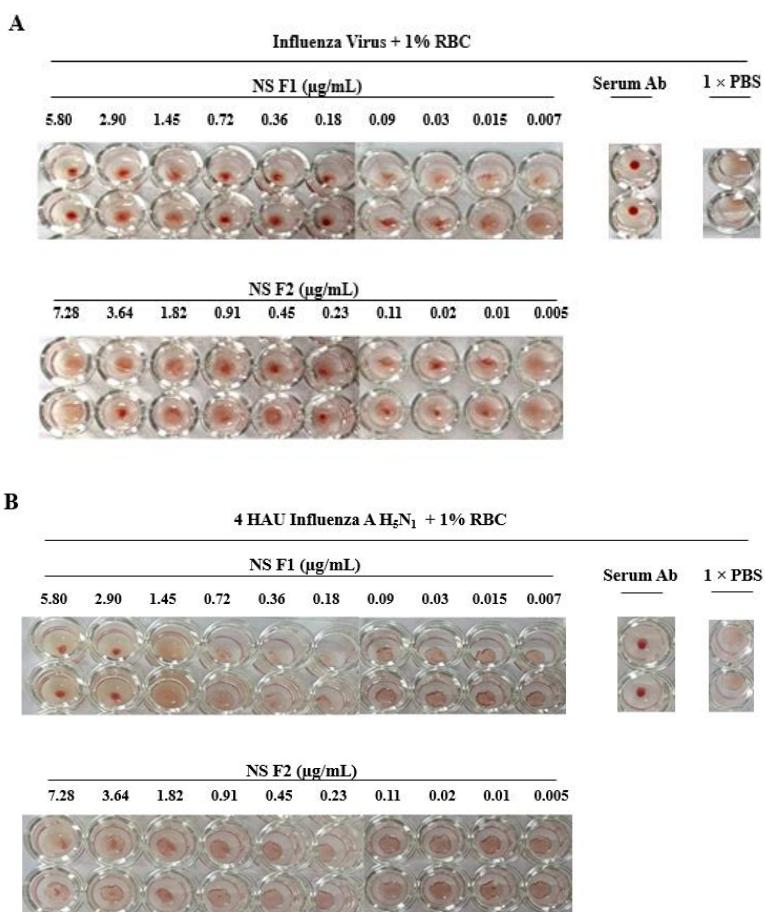


Figure 4 Inhibition of 4 HAU influenza A H5N1 Hemagglutination activity at red blood cells by nasal spray nanoparticle. A) Inhibition of Hemagglutination activity at red blood cells by NS F1 and NS F2 at day 0 post preparation. Hemagglutination inhibition was observed more consistent at addition of NS F1 compare to NS F2; B) Inhibition of Hemagglutination activity in red blood cells occurred at addition of NS F1 only at day 28 post preparation. NS F1 refer to nasal spray contain Ag nanoparticle with size ~11.2 nm; NS F2 refer to nasal spray contain Ag nano particles with size ~92.5 nm; Serum Ab refer to Serum containing influenza A H5N1 antibody; PBS refer to phosphate buffer saline

No hemagglutination activity was indicated by the presence of red-colored precipitate, meanwhile hemagglutination will cause the formation of spread red-colored solution. The HAI results showed difference in effectiveness between the AgNP nasal spray F1 and F2 at day 0 and day 28, as shown by **Figure 4A** and **4B**, respectively. AgNP nasal spray F1 which have smaller size, showed consistent and better activity at day 0 and day 28 compared to AgNP nasal spray F2. The particles with smaller size have a larger surface area, resulting in more unsaturated bond which resulting in easiness binding onto the virus protein. AgNP is predicted to bind and cleave the virus's haemagglutinin disulfide bond which then cause the virus to destabilize (8,28). Thus, the destabilization of Hemagglutination glycoprotein will inhibit the initiation of influenza virus infection which is binding onto the human cell's sialic acid and further replication process.

Based on the comparative result of HAI at day 0 and day 28 as shown at **Figure 4B**, the AgNP nasal spray F1 shown reduction in their HA inhibition effectiveness after 28 days. At day-0 post preparation, AgNP NS F1 was effective at 0.18 µg/mL, meanwhile on day-28, it inhibited the HA influenza virus at 2.9 µg/mL. The effectiveness reduction may cause by the aggregation during storage which due to presence of electrolyte or buffer at a high concentration (29). Therefore, further study should be performed to get optimum formula with better stability. In conclusion, this study showed that in term of Ag nanoparticles, the smaller size of Ag nanoparticles, the more effective HAI activity observed.

Conclusion

Silver nanoparticles nasal spray contained AgNP with particle size less than 50 nm was indicated able to inhibit hemagglutination caused by influenza virus. This result may broaden the information regarding the application of AgNP in the Nasal spray form against Influenza virus. Although, studies on the formulation stability needs to be performed in upcoming research.

Acknowledgement

The author would like to acknowledge Universitas Indonesia for funding this research

through "Hibah PPM Penugasan Universitas Indonesia 2021" with no ST-178/UN2.F15.D/PPM/00/2021.

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

References

1. Ghebrehewet S, MacPherson P, Ho A. Clinical Updates: Influenza. *The BMJ*. 2016; 355.
2. Boktor SW, Hafner JW, Doerr C. Influenza Nursing. 2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459363>.
3. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, García-Sastre A. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 Jun 28;4(1):3.
4. World Health Organization. Non-pharmaceutical public health measures for mitigating the risk and impact of epidemic and pandemic influenza: annex: report of systematic literature reviews (No. WHO/WHE/IHM/GIP/2019.1). World Health Organization. 2019.
5. DiPiro JT, Yee GC, Posey LM, Haines ST, Nolin, TD, Ellingrod V. *Pharmacotherapy A Pathophysiologic Approach*, 11e. *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. New York: McGraw-Hill Education. 2020; 11.
6. Higgins TS, Wu AW, Illing EA, et al. Intranasal Antiviral Drug Delivery and Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A State of the Art Review. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2020;163(4):682-694.
7. Li Y, Lin Z, Zhao M, Xu T, Wang C, Hua L, Wang H, Xia H, Zhu B. Silver Nanoparticle Based Codelivery of Oseltamivir to Inhibit the Activity of the H1N1 Influenza Virus through ROS-Mediated Signaling Pathways. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016; 8(37):24385-93. doi: 10.1021/acsami.6b06613. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27588566.
8. Jeremiah SS, Miyakawa K, Morita T, Yamaoka Y, Ryo A. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochemical*

- and biophysical research communications. 2020; 533(1):195-200.
9. Xiang DX, Chen Q, Pang L, Zheng CL. Inhibitory effects of silver nanoparticles on H1N1 influenza A virus in vitro. Journal of virological methods. 2011;178(1-2):137-142.
10. Mori Y, Ono T, Miyahira Y, Nguyen VQ, Matsui T, Ishihara M. Antiviral activity of silver nanoparticle/chitosan composites against H1N1 influenza A virus. Nanoscale Res Lett. 2013;8(1):93. doi: 10.1186/1556-276X-8-93. PMID: 23421446.
11. Badiyah HI, Seeedeh F, Supriyanto G, Zaidan A. H. Synthesis of Silver Nanoparticles and the Development in Analysis Method. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.2019;217(1).
12. Becaro AA, Jonsson CM, Puti FC, Siqueira MC, Mattoso LHC, Correia DS, Ferreira MD. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management.2015;3:22-29.
13. Pu Y, Goodey AP, Fang X, Jacob K. A Comparison of the Deposition Patterns of Different Nasal Spray Formulations Using a Nasal Cast, Aerosol Science and Technology.2014; 48:9, 930-938. doi: 10.1080/02786826.2014.931566.
14. Kaufmann L, Syedbasha M, Vogt D, Hollenstein Y, Hartmann J, Linnik JE, Egli A. An Optimized Hemagglutination Inhibition (HI) Assay to Quantify Influenza-specific Antibody Titers. J Vis Exp. 2017;1(130):55833. doi:10.3791/55833. PMID: 29286466.
15. Solomon SD, Bahadory M, Jeyarajasingam A. V., Rutkowsky, S. A., Boritz, C., & Mulfinger, L. Synthesis and study of silver nanoparticles. Journal of Chemical. 2007. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>.
16. Kyrychenk A, Paskob DA, Kalugin ON. Poly(vinyl alcohol) as a water protecting agent for silver nanoparticles: the role of polymer size and structure. Phys. Chem. Chem. Phys. 2017;19, 8742. doi: 10.1039/c6cp05562a.
17. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International Journal of Molecular Sciences.2016;17(9).doi.org/10.3390/ijms17091534.
18. Ndikau M, Noah NM, Andala DM, Masika E. Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Using Citrullus lanatus Fruit Rind Extract. International Journal of Analytical Chemistry. 2017; 2017: 8108504. doi: 10.1155/2017/8108504.
19. Gudkov SV, BaimLer IV, Uvarov OV, Smirnova VV, Volkov MY, Semenova AA, Lisitsyn AB. Influence of the Concentration of Fe and Cu Nanoparticles on the Dynamics of the Size Distribution of Nanoparticles. Frontiers in Physics.2020; 8, 622551.
20. Liu H, Zhang H, Wang J, Wei J. Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: deep insight into microscopic kinetics analysis. Arabian Journal of Chemistry.2020;13(1):1011-1019.
21. Mudalige T, Qu H, Haute DV, Ansar SM, Paredes P, Ingle T. Chapter 11 - Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In Micro and Nano Technologies, Nanomaterials for Food Applications, Elsevier. 2019; 313-353, ISBN 9780128141304. doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7.
22. Kulhari H, Pooja D, Prajapati SK, Chauhan AS. Performance evaluation of PAMAM dendrimer based simvastatin formulations. Int J Pharm. 2010; 405(1-2):203-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.040>.
23. Bitter C, Suter-Zimmermann K, Surber C. Nasal drug delivery in humans. Topical Applications and the Mucosa.2011;40:20-35.
24. Gao M, Shen X, Mao S. Factors influencing drug deposition in the nasal cavity upon delivery via nasal sprays. Journal of Pharmaceutical Investigation. 2020; 50(3): 251-259.
25. Mehrbod P, Motamed N, Tabatabaian M,

- Soleimani ER, Amini E, Shahidi M, Kheiri MT. In vitro antiviral effect of "nanosilver" on influenza virus. DARU J Pharm Sci. 2009;17:88–93.
26. Erik A. Karlsson, J. Justin Milner, William D. Green, Jennifer Rebeles, Stacey Schultz-Cherry, Melinda A. Beck, Chapter 10 - Influence of obesity on the response to influenza infection and vaccination, Editor(s): Richard A. Johnston, Benjamin T. Suratt, Mechanisms and Manifestations of Obesity in Lung Disease. Academic Press. 2019;227-259. doi.org/10.1016/B978-0-12-813553-2.00010-5.
27. Spackman E, Sitaras I. Hemagglutination Inhibition Assay. In: Spackman, E. (eds) Animal Influenza Virus. Methods in Molecular Biology. 2020; 2123. doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_2.
28. Flórido M, Chiu J, Hogg P. J. Influenza A Virus Hemagglutinin Is Produced in Different Disulfide-Bonded States. Antioxidants & redox signaling.2021;35(13):1081-1092.
29. Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Che CM. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry.2007;12(4):527-5.

Cost Analysis Terapi Antidiabetik pada Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Rawat Inap di RSU Anwar Medika

Marty Meliana Ariyanti Jalmav^{1*}, Yuniati Hoiriyah¹

Artikel Penelitian

Abstract: Diabetes is a complex chronic disease that requires ongoing medical care with multifactorial risk reduction strategies beyond glycaemic control. This study aims to describe the direct medical costs from the perspective of Anwar Medika General Hospital in type 2 Diabetes Mellitus (DM) patients who use the National Health Insurance (JKN) facility and to see the difference between real costs (total direct medical costs) and INA CBG's costs. The study was retrospective for the past 1 year, namely January-December 2020. The subjects of this study were 54 patients. Mann-Whitney analysis is used to see the suitability of real costs with INA-CBG's tariffs. The results of this study show that the total real cost for JKN type 2 DM patients at Anwar Medika Hospital for the January-December 2020 period is Rp. 269,807,380 and there is a difference between real costs and INA-CBG's costs in class 3 of - 4,190,371 where INA-CBG's costs are -4,190,371. CBG's are less than the real hospital costs. The test results using the Mann-Whitney method show an insignificant difference between real costs and INA-CBG's rates. The result $p=0.458$ where $p>0.05$ is said to be insignificant. This could be due to a cross-subsidy between INA CBG's rate claims of fully unused patients and patients who spend more on treatment costs exceeding INA CBG's rates.

Keywords: type-2 diabetes mellitus, antidiabetic, cost analysis

Abstrak: Diabetes adalah penyakit kronis yang kompleks yang membutuhkan perawatan medis berkelanjutan dengan strategi pengurangan risiko multifaktorial di luar kendali glikemik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui gambaran biaya langsung medis prespektif Rumah Sakit Umum Anwar Medika pada pasien Diabetes Melitus (DM) tipe 2 yang menggunakan fasilitas Jaminan Kesehatan Nasional (JKN) serta melihat perbedaan antara biaya riil (total biaya langsung medis) dengan tarif INA CBG's. Penelitian bersifat retrospektif selama 1 tahun kebelakang yaitu periode Januari-Desember 2020. Subjek dari penelitian ini berjumlah 54 pasien. Analisis Mann-Whitney digunakan untuk melihat kesesuaian biaya riil dengan tarif INA-CBG's. Hasil penelitian ini menunjukkan total biaya riil pada pasien DM tipe 2 JKN di RSU Anwar Medika Periode Januari-Desember 2020 sejumlah Rp.269.807.380 serta terdapat selisih antara biaya riil dengan tarif INA-CBG's pada kelas 3 sebesar -4,190,371 di mana tarif INA-CBG's lebih sedikit dibandingkan dengan biaya riil rumah sakit. Hasil pengujian menggunakan metode Mann-Whitney menunjukkan nilai perbedaan yang tidak signifikan antara biaya rill dengan tarif INA-CBG's. Hasil $p=0,458$ dimana $p>0,05$ dikatakan tidak signifikan. Hal ini dapat disebabkan adanya subsidi silang antara klaim tarif INA CBG's pasien yang tidak terpakai sepenuhnya dengan pasien yang menghabiskan biaya perawatan melebihi tarif INA CBG's.

¹ Universitas Anwar Medika, Jl. By Pass Krian KM 33, Sidoarjo, Jawa Timur

Korespondensi:

Marty Meliana AJ
marthymeliana@uam.ac.id

Kata kunci: diabetes melitus tipe 2, antidiabetik, analisis biaya

Pendahuluan

Diabetes melitus (DM) merupakan salah satu masalah kesehatan yang besar. Pada tahun 2019, diperkirakan 463 juta orang menderita diabetes dan jumlah ini diproyeksikan mencapai 578 juta pada tahun 2030, dan 700 juta pada tahun 2045 (1). Prevalensi pasien pengidap diabetes di Indonesia mencapai 6,2%, Provinsi Jawa Timur dengan prevalensi penderita DM sebesar 2,5% menempati urutan ke-5 paling banyak dan prevalensi DM di Sidoarjo dengan diagnosis DM yaitu sebesar 3,47% dari total penduduk Jawa Timur (2). Berdasarkan hasil observasi di lapangan, penyakit DM di RSU Anwar Medika pada Desember 2020 termasuk penyakit nomor enam terbanyak di Instalasi Rawat Inap dengan total populasi secara retrospektif selama satu tahun (Januari-Desember 2020) sebanyak 120 pasien.

Menurut *American Diabetes Association* (ADA), diabetes menimbulkan beban keuangan yang signifikan bagi individu dan masyarakat. Diperkirakan bahwa biaya tahunan diagnosis diabetes pada tahun 2017 adalah \$327 miliar, termasuk \$237 miliar dalam biaya medis langsung dan \$90 miliar dalam penurunan produktivitas. Pasien diabetes rata-rata memiliki pengeluaran medis 2-3 kali lebih tinggi dibandingkan dengan pasien non diabetes. Biaya tersebut termasuk biaya tidak langsung seperti peningkatan ketidakhadiran dalam bekerja (\$3,3 miliar), penurunan produktivitas (\$26,9 miliar), ketidakmampuan bekerja karena kecacatan terkait penyakit (\$37,5 miliar) dan hilangnya produktivitas karena kematian dini akibat diabetes (\$19,9 miliar). Setelah disesuaikan dengan inflasi, biaya ekonomi diabetes meningkat 26% dari tahun 2012 hingga 2017, hal ini dikarenakan adanya peningkatan prevalensi diabetes dan peningkatan biaya per orang dengan diabetes (3).

Tingginya prevalensi kejadian DM dan besarnya biaya pengobatan yang dibutuhkan menjadi alasan pemerintah dan masyarakat memerlukan suatu jaminan kesehatan dalam bentuk asuransi kesehatan untuk membantu penanganannya.

JKN (Jaminan Kesehatan Nasional) di Indonesia menggunakan sistem asuransi kesehatan sosial sebagai dasar sistem pembayaran pelayanan kesehatan yang lebih mengutamakan peningkatan akses, pemerataan, kualitas, dan efisiensi biaya. Pelaksanaan program JKN menggunakan sistem *casemix* dengan pola pembayaran pelayanan kesehatan Indoensia *Case Base Groups* (INA-CBG's) merupakan sistem pengelompokan penyakit berdasarkan ciri klinis yang sama dan sumber daya yang digunakan dalam pengobatan dengan pola pembayaran bersifat prospektif (4).

Analisis biaya merupakan metode yang menghitung besarnya biaya dalam bentuk rupiah baik yang langsung maupun tidak langsung untuk mencapai suatu tujuan(5). Analisis biaya penyakit merupakan elemen penting dalam proses pengambilan keputusan penyakit kronis, karena dapat mengevaluasi biaya penyakit dan menggambarkan penyakit yang membutuhkan peningkatan alokasi sumber daya untuk pencegahan atau terapi (6).

Berdasarkan penelitian (7). mengemukakan bahwa biaya pemeriksaan patologi klinik menempati posisi kedua teratas dari biaya total pengobatan pasien diabetes melitus dengan tingkat keparahan III, yaitu sebesar 20,85%. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan menyatakan bahwa total biaya riil lebih besar dibandingkan total tarif paket INA CBG's pada pasien diabetes melitus tipe 2 dan faktor yang paling berpengaruh terhadap biaya riil ialah adanya komplikasi dan lamanya pasien dirawat (6).

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian analisis biaya penggunaan antidiabetik pada pasien diabetes melitus tipe-2 di rawat inap RSU Anwar Medika. Hasil penelitian diharapkan dapat mengetahui gambaran kesesuaian biaya yang dikeluarkan rumah sakit (biaya riil) dengan tarif INA-CBGs.

Bahan dan Metode

Bahan

Bahan penelitian menggunakan data dari rekam medis pasien yang sesuai dengan kriteria inklusi pada penelitian ini.

Metode

Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada Bulan Januari-Februari 2021, menggunakan data dari rekam medis pasien selama Januari-Desember 2020.

Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Instalasi Farmasi dan di bagian Casemix RSU Anwar Medika yang terletak di Jalan Raya By Pass Krian KM 33, Semawut, Kabupaten Sidoarjo

Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu data penggunaan obat dan besaran biaya yang digunakan oleh pasien rawat inap BPJS kelas 3 DM tipe 2 di rawat inap RSU Anwar Medika dalam periode Januari-Desember 2020 dengan jumlah kasus 54 pasien.

Kriteria Inklusi

Data pengobatan berupa data resep dan data biaya pengobatan untuk pasien dengan kriteria sebagai berikut:

- a. Pasien DM Tipe 2 di rawat inap RSU Anwar Medika
- b. Pasien penderita DM tipe-2 minimal 1 tahun terakhir yaitu pada bulan Januari-Desember 2020
- c. Merupakan Pasien BPJS dengan kode INA-CBG's E-4-10.
- d. Pasien BPJS Kelas 3

Teknik Sampling

Teknik sampling yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Purposive Sampling*. *Purposive Sampling* adalah teknik penentuan sampel yang didasarkan pada pertimbangan tertentu yang dibuat oleh peneliti sendiri, berdasarkan ciri atau sifat-sifat populasi

Analisis Data

Dalam analisis data penyajian hasil dilakukan secara deskriptif observasional, yakni dengan melihat perbandingan antara biaya medik langsung dengan biaya INA CBG's pada pasien rawat inap BPJS kelas 3 melalui data biaya pengobatan dari bagian keuangan untuk pasien

dengan diagnosa utama DM tipe 2 dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Metode analisa yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis statistik *Mann-Whitney*. Dalam penelitian ini dilakukan pengolahan data dalam bentuk tabel dan grafik dengan *Microsoft Office Excel* dan *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) pada komputer.

Hasil dan Diskusi

Penelitian ini merupakan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui biaya medis langsung pasien BPJS rawat inap DM tipe 2 prespektif RSU Anwar Medika serta untuk mengetahui adanya perbedaan biaya medis langsung dengan tarif INA CBG's.

Jaminan Kesehatan adalah pelayanan yang diberikan oleh Badan Penyelenggara Jaminan Sosial (BPJS) menganut system rujukan dari Fasilitas Kesehatan Tingkat Pertama (FKTP) ke Fasilitas Kesehatan Rujukan Tingkat Lanjutan (FKRTL) yang sesuai dengan kasus serta system rujukan yang berlaku (2). Rumah Sakit Umum Anwar Medika termasuk dalam rumah sakit tipe C yang merupakan fasilitas layanan kesehatan tingkat lanjut dan dijadikan sebagai rumah sakit rujukan bagi pasien dengan berbagai macam komplikasi, sehingga jarang ditemukan pasien yang didiagnosa diabetes melitus murni tanpa penyerta penyakit lain yang mempengaruhi diagnosa utama diabetes melitus. Pengambilan data dilakukan secara retrospektif dari rekam medik pasien peserta BPJS kode INA-CBG's E-4-10 dengan diagnosa utama diabetes melitus yang mendapatkan terapi antidiabetik dan menjalani rawat inap selama periode 2020 dengan rekam medik yang lengkap. Data biaya diambil dari bagian Instalasi Farmasi dan Casemix RSU Anwar Medika.

Dari data hasil penelitian yang diperoleh pasien DM Tipe 2 Di instalasi rawat inap berjumlah 54 pasien yang sesuai dengan kriteria inklusi. Berasarkan **Tabel 1** karakteristik jenis kelamin pasien yang berjenis kelamin perempuan lebih dominan (37 orang, 68,5%) dari pasien yang berjenis kelamin laki-laki (17 orang, 31,5%). Hal ini sesuai dengan penelitian Harijanto (8) dalam penelitiannya menyebutkan bahwa prevalensi diabetes melitus lebih banyak terjadi pada perempuan dibandingkan laki-laki.

Tabel 1. Karakteristik Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 di Instalasi Rawat Inap Peserta JKN di RSU Anwar Medika Sidoarjo

Karakteristik Pasien	Kelompok	Jumlah Pasien	Presentasi
Jenis Kelamin	Laki-Laki	17	31,5%
	Perempuan	37	68,5%
Usia	25	1	1,9%
	26-45	4	7,4%
	46-65	41	75,9%
	>65	8	14,8%
Penyakit Penyerta	Tanpa Penyakit Penyerta	10	18,5%
	Dengan Penyakit	44	81,5%

Hal ini disebabkan karena riwayat diabetes gestasional yang dialami oleh perempuan lebih mudah berkembang menjadi diabetes melitus pada masa mendatang. Selain itu adanya perubahan hormonal pada perempuan pasca menopause menyebabkan terjadinya gangguan pada distribusi lemak sehingga dapat menyebabkan diabetes melitus (8). Resiko kejadian diabetes melitus tipe 2 lebih banyak dialami oleh perempuan karena secara fisik perempuan memiliki peluang lebih besar mengalami kenaikan indeks masa tubuh yang bisa disebabkan oleh hormon atau faktor lainnya (9).

Berdasarkan karakteristik usia paling banyak dialami oleh pasien pada rentang usia 46-65 tahun (41 pasien). Keadaan ini dikarenakan usia di atas 45 tahun merupakan salah satu faktor resiko terjadinya diabetes melitus, diantaranya karena pola hidup yang kurang baik, misalnya pola makan yang tidak teratur, kurang istirahat, dan kurang olahraga (Mawaddah dan Sri, 2015). Sedangkan terkait penyakit penyerta atau penyakit yang menyertai suatu penyakit atau komplikasi dari penyakit utama yang sedang diderita, ditemukan bahwa pasien DM tipe 2 hampir semua mempunyai penyakit penyerta dengan akumulasi 44 pasien DM tipe 2 dengan penyakit penyerta dan 10 pasien DM tipe 2 tanpa penyakit penyerta.

Diagnosa penyakit penyerta pasien diabetes melitus tipe 2 di instalasi rawat inap berjumlah 77 diagnosis. Dari 54 sampel, diagnosa penyakit penyerta pasien diabetes melitus tipe 2 di instalasi rawat inap berjumlah 77 diagnosis. Berdasarkan **Tabel 2** dapat terlihat jumlah penyakit penyerta lebih besar dari jumlah pasien, hal itu menandakan terdapat pasien yang

mengalami komplikasi lebih dari satu jenis penyakit penyerta. Diagnosa penyakit penyerta terbanyak yaitu Hiposmolalitas dan Hiponatremia sebanyak 18 pasien dengan presentase 23,6%. Hiponatremi biasanya berkaitan dengan hiposmolalitas. Kehilangan natrium klorida pada cairan ekstrasel akan menyebabkan penurunan konsentrasi natrium plasma. Kehilangan natrium klorida primer biasanya terjadi pada dehidrasi hipoosmotik seperti pada keadaan berkeringat selama aktivitas berat yang berkepanjangan, diare, muntah, dan penggunaan diuretik secara berlebihan. Konsentrasi natrium plasma dalam tubuh turun dibawah nilai normal yaitu 135-145 meq/l(10). Diagnosa terbanyak kedua yaitu hipokalemia sebanyak 17 pasien dengan presentase 22,3%. Pada penderita diabetes, kalium sangat berguna untuk meningkatkan kepekaan *Exocytosis* insulin pada tahap sekresi insulin, sehingga proses pengurasan gula dalam darah berlangsung efektif, Kalium (K+) juga dapat menurunkan resiko hipertensi serta jantung pada penderita diabetes (11). Dampak yang terjadi jika terdapat gangguan kadar kalium pada penderita DM bisa menyebabkan kadar kalium kurang dari 3,5 mEq/L atau yang disebut Hipokalemia. Kondisi hipokalemia ini dipicu oleh adanya kerusakan sel yang dikarenakan trauma, cedera, pembedahan dan syok. Sehingga kalium di dalam sel (intraseluler) akan keluar dan masuk ke cairan intravaskuler yang pada akhirnya akan diekskresikan oleh ginjal. Kondisi ketidakseimbangan ini akan memicu proses hemostasis dengan cara perpindahan kalium dari plasma masuk ke dalam sel, tujuannya adalah untuk memulihkan keseimbangan kalium seluler.

Tabel 2. Penyakit Penyerta Pasien Diabetes Melitus Tipe II Rawat Inap Peserta JKN di RS Umum Anwar Medika

Penyakit Penyerta	Jumlah Pasien	Presentase
Anemia	5	6,5%
Batu empedu	1	1,3%
Demam Tifoid/Tipes	1	1,3%
Gagal Jantung	1	1,3%
Hemiplegia	2	2,6%
Hipokalemia	17	22,3%
Hipoosmolalitas dan Hiponatremia	18	23,6%
Hipovolemik	6	7,8%
Infeksi Saluran Kemih	2	2,6%
Kista Ginjal	1	1,3%
Nyeri Punggung	2	2,6%
Penyakit Jantung Iskemik	3	3,9%
Pneumonia	8	10,5%
Stroke	1	1,3%
Stroke Infark	3	3,9%
TBC	2	2,6%
Hipertensi	4	5,2%
Jumlah	77	100%

Tabel 3. Penggunaan Terapi Antidiabetik Pasien Diabetes Melitus Tipe 2 Rawat Inap Peserta JKN di RS Umum Anwar Medika

Jenis Antidiabetik	Golongan Antidiabetik	Antidiabetik	Jumlah Pasien	Persentase
Insulin	Insulin Kerja Cepat	Apidra Inj/Unit	27	50%
Insulin – OAD	Insulin Kerja Cepat + Sulfonilurea	Apidra Inj/Unit; Glimepiride 4 mg tablet	2	3,7%
		Apidra Inj/Unit		1,8%
Insulin - OAD – OAD	Insulin Kerja Cepat + Sulfonilurea + Biguanide	Glimepiride 4 mg tablet;Metformin 500 mg tablet +Apidra Inj/Unit	1	12.9
Insulin – Insulin	Insulin Kerja Panjang	Sansulin Log-G/Unit	7	5,5%
Insulin - Insulin – OAD	Insulin Kerja Cepat + Insulin Kerja Panjang + Sulfonilurea	Apidra Inj/Unit; Sansulin Log-G Inj /	3	3.7%
Insulin-Insulin-OAD-OAD	Insulin Kerja Cepat + Insulin Kerja Panjang + Sulfonilurea + Biguanide	Sansulin Log-G Inj /Unit; Glimepiride 2 mg Tablet; Metfotmin 500 mg tablet	1	1.8%
Insulin-Insulin-OAD-OAD	Insulin Kerja Cepat + Insulin Kerja Panjang + Sulfonilurea + Biguanide	Sansulin Log-G Inj /Unit; Glimepiride 4 mg tablet; Metformin 500 mg tablet	1	1.8%
OAD	Sulfonilurea	Glimepiride 2 mg tablet	1	1.8%
Insulin-OAD	Insulin Kerja Cepat + Sulfonilurea	Apidra Inj/Unit; Glimepiride 2 mg tablet	9	16.6%

Gejala yang biasa dijumpai pada pasien hipokalemia antara lain kelemahan otot, lelah, nyeri otot, denyut nadi lemah dan tidak teratur, pernapasan dangkal, hipotensi (5).

Jumlah penggunaan terapi antidiabetik berdasarkan golongan obat pada pasien rawat inap diabetes melitus tipe 2 dapat dilihat pada **Tabel 3** yang menunjukkan penggunaan

antidiabetik di RSU Anwar Medika Periode Januari- Desember 2020 yang paling banyak terdapat pada insulin kerja cepat dengan merek Apidra sebanyak 27 peresepan dengan jumlah presentase sebesar 50%. Penggunaan insulin dalam penatalaksanaan pengobatan DM, diberikan jika kondisi pasien DM memiliki kadar glukosa darah yang sangat tinggi, pasien yang

mengalami komplikasi gagal ginjal kronik, ataupun jika pemberian kombinasi antidiabetes oral tidak menunjukkan penurunan glukosa darah yang signifikan. Pasien yang memiliki kadar glukosa yang tinggi biasanya telah mengalami komplikasi, atau cenderung mengalami komplikasi, oleh sebab itu dalam penatalaksanaannya sebaiknya diberikan antidiabetes golongan insulin, jika kadar glukosa darah sudah relatif stabil, maka dapat dilakukan evaluasi terhadap penggunaan antidiabetes oral. Injeksi apidra banyak digunakan dalam pengobatan DM disebabkan karena memiliki kerja yang cepat (*rapid acting*) sehingga dapat memberikan efek penurunan kadar glukosa postprandial yang lebih cepat dibandingkan insulin reguler serta memiliki keunggulan dalam hal penyuntikannya (12).

Tingginya prevalensi kejadian DM dan besarnya biaya pengobatan yang dibutuhkan menjadi alasan pemerintah dan masyarakat memerlukan suatu jaminan kesehatan dalam bentuk asuransi kesehatan untuk membantu penanganannya. JKN (Jaminan Kesehatan Nasional) menggunakan sistem *casemix* dengan pola pembayaran pelayanan kesehatan Indoensia *Case Base Groups* (INA-CBG's) yang merupakan sistem pengelompokan penyakit berdasarkan ciri klinis yang sama dan sumber daya yang digunakan dalam pengobatan dengan pola pembayaran bersifat prospektif (4). Penggunaan tarif JKN di Rumah Sakit memerlukan perhitungan yang valid agar tidak terjadi kerugian oleh Rumah Sakit yang dapat menurunkan kualitas pelayanannya. Pentingnya dilakukannya analisis kesesuaian biaya untuk melihat adanya perbedaan mengenai biaya riil dengan tarif INA CBG's.

Biaya riil adalah biaya medik langsung yang dikeluarkan oleh rumah sakit bagi pasien. Di RSU Anwar Medika, biaya riil untuk 54 pasien JKN penderita DM tipe 2 yaitu sebesar Rp.269.807.380. Biaya Riil termasuk biaya medis langsung yang terdiri dari biaya akomodasi, biaya pelayanan, biaya radiologi, biaya laboratorium dan penunjang, biaya alat kesehatan, dan biaya BMHP. Pada **Tabel 4** terlihat rincian biaya dari 54 pasien, diantaranya biaya obat sebesar Rp.32.031.227, biaya akomodasi sebesar Rp.53.150.000, biaya pelayanan sebesar Rp.80.252.500, biaya radiologi sebesar Rp.15.140.000, biaya alat kesehatan sebesar Rp.36.466.000, biaya bahan medis habis pakai sebesar Rp.34.391.223, serta biaya laboratorium dan penunjang sebesar Rp.18.376.430. Biaya pelayanan menunjukkan jumlah paling besar diantara biaya lainnya. Biaya pelayanan sendiri terdiri dari prosedur non bedah, konsultasi, keperawatan, dan tenaga ahli. Prosedur non bedah di RSU Anwar Medika adalah semua tindakan yang tidak dilakukan di ruang operasi. Penyebab lain dari membekaknya biaya medis langsung dikarenakan banyaknya pasien yang memiliki penyakit penyerta yang mengakibatkan pasien dirawat lebih lama atau *Length Of Stay* (LOS) meningkat, sehingga biaya yang diperlukan semakin banyak.

Berdasarkan data pada **Tabel 5** dapat diketahui bahwa terdapat selisih antara biaya rill dengan tarif INA-CBG's pada kelas 3 untuk 54 pasien sebesar -4,190,371 rupiah, di mana tarif INA- CBG's lebih sedikit dibandingkan dengan biaya riil rumah sakit. Hal ini dapat dilihat dari jumlah biaya riil rumah sakit yang lebih besar dari tarif INA- CBG's.

Tabel 4. Biaya Riil Pasien Diabetes Melitus Tipe II Rawat Inap Peserta JKN di RSU Anwar Medika.

Jumlah Pasien	Biaya Riil	Jumlah Biaya (Rp)
54	Biaya Obat	32.031.227
	Biaya Akomodasi	53.150.000
	Biaya Pelayanan	80.252.500
	Biaya Radiologi	15.140.000
	Biaya Alat Kesehatan	36.466.000
	Biaya BMHP	34.391.223
	Biaya Laboratorium dan Penunjang	18.376.430
	Total	269.807.380

Tabel 5. Perbedaan Biaya Riil dengan Tarif INA-CBG's Pasien DM Tipe II Rawat Inap Peserta JKN di RS Umum Anwar Medika Kelas 3

Tingkat Keparahan	Kode INA-CBG's	Jumlah Pasien	Rata-Rata LOS	Total Biaya Riil (Rp) (A)	Total Tarif INA_CBG'S (Rp) (B)	Selisih (Rp) (B)-(A)	Sig (p)
I	E-4-10-I	12	4	34,431,577	41,166,000	6,734,432	
II	E-4-10-II	22	6	101,666,310	105,457,000	3,790,690	
III	E-4-10-III	20	6	133,709,493	118,994,000	-14,715,493	0,458
Total		54		269,807,380	265,617,000	-4,190,371	
Rata-Rata				4,996,433	4,918,833		

Menurut Mardilah rumah sakit harus menetapkan tarif layanan dengan mempertimbangkan kemampuan rumah sakit menutup biaya operasional dari pendapatan pelayanan yang diberikan sehingga rumah sakit mampu memberikan pelayanan dengan outcome yang baik. Berdasarkan data tersebut diharapkan rumah sakit dapat melakukan evaluasi kembali agar tidak mengalami kerugian diwaktu yang akan datang serta mempertahankan kualitas pelayanannya (13).

Hasil pengujian menggunakan métode *mann-whitney* menunjukkan nilai $p=0,458$ yang artinya $p>0,05$ sehingga dapat disimpulkan terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara biaya rill dengan tarif INA-CBG's. Hal ini disebabkan adanya subsidi silang beberapa pasien yang memiliki sisa klaim tarif INA CBG's, sehingga dapat menutupi sebagian pasien yang menghabiskan dana melebihi tarif INA CBG's. Berdasarkan data keuangan rumah sakit, biaya pelayanan dan biaya akomodasi rawat inap merupakan aspek penanganan medis dengan biaya yang paling besar.

Hasil dari penelitian ini tidak dapat disamakan dengan rumah sakit lain, dikarenakan setiap pasien diabetes melitus memiliki tingkat keparahan dan komplikasi yang berbeda-beda, juga penggunaan terapi yang berbeda untuk setiap pasien. Hal tersebut yang akan menyebabkan perbedaan pada jumlah biaya riil dan tarif INA-CBG's

Kesimpulan

Dari hasil yang di dapatkan dapat disimpulkan bahwa total biaya medis langsung terapi antidiabetik pada pasien kelas 3 JKN kode INA-CBG's E-4-10 DM tipe 2 rawat inap berdasarkan prespektif RSU Anwar Medika sebesar Rp.269.807.380 dan terdapat selisih antara biaya

rill dengan tarif INA-CBG's pada kelas 3 sebesar -4,190,371 rupiah di mana tarif INA-CBG's lebih sedikit dibandingkan dengan biaya riil rumah sakit. Hasil pengujian menggunakan metode Mann-Whitney menunjukkan nilai $p=0,458$ yang artinya $p>0,05$ yaitu terdapat perbedaan yang tidak signifikan antara biaya rill dengan tarif INA-CBG's. Hal ini dapat disebabkan adanya subsidi silang antara klaim tarif INA CBG's pasien yang tidak terpakai sepenuhnya dengan pasien yang menghabiskan biaya perawatan melebihi tarif INA CBG's.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Yayasan Rumah Sakit Anwar Medika yang sudah mendukung penelitian ini.

Konflik Kepentingan

Tidak ada konflik kepentingan.

Referensi

1. IDF. 2019. Internasional Diabetes Federation diabetes atlas ninth edition 2019.
2. Peraturan Presiden RI. 2018. Peraturan Presiden Republik Indonesia tentang Jaminan Kesehatan (No 82 Tahun 2018).
3. ADA. 2020. Diabetes Care. In: American Diabetes Association.
4. Peraturan Menteri Kesehatan RI. 2014. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia tentang Petunjuk Teknis Siste Indonesian Case Base Group (No 27 Tahun 2014).
5. Peraturan Menteri Kesehatan RI. 2013. Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia tentang Pelayanan Kesehatan pada Jaminan Kesehatan (No 71 Tahun 2013).
6. Hayul H, Andayani TM, Setia. J Farm dan Sains Indones. 2020;3(1).

7. Sari RP. Perbandingan Biaya Riil Dengan Tarif Paket INA- CBG' S dan Analisis Faktor yang Mempengaruhi Biaya Riil Pada Pasien Diabetes Melitus Rawat Inap Jamkesmas di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta. *J Spread.* 2014;4(April):61–70.
8. Achmad Harjanto. 2017. Analisis Efektivitas Biaya Antidiabetik Oral Pada Penderita Diabetes Melitus Tipe 2 Rawat Inap Peserta BPJS di RSUD Sukoharjo Tahun 2016.
9. Fatimah RN. Diabetes Melitus Tipe 2. *J Major.* 2015;4(5):93–101.
10. Rondon-Berrios H, Agaba EI, Tzamaloukas AH. Hyponatremia: Pathophysiology, Classification, Manifestations and Management. *Int Urol Nephrol.* 2014;46(11): 2153-2165.
11. Ningrum D. Gambaran Kadar Kalium Darah Pada Penderita Diabetes Mellitus Tipe 2 Di Rumah Sakit Rawa Lumbu. *J Saf Heal.* 2021;01(November): 36–40.
12. ACCP. 2013. Pharmacotherapy Review Program for Advanced Clinical Pharmacy Practice Pharmacotherapy Review Program for. In: American College of Clinical Pharmacy. p. 1–35.
13. Mardiah. Cost Recovery Rate Tarif Rumah Sakit dan Tarif INA-CBG's Berdasarkan Clinical Pathway pada Penyakit Arteri Koroner di RSUP Dr . Mohammad Hoesin Palembang Tahun 2015. *J ARSI.* 2016;2:245–59.

Uji Resistensi Nyamuk *Aedes Aegypti* terhadap Cypermethrin 0,05% di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru Tahun 2020

Dedes Handayani¹

Artikel Penelitian

Abstract: *Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) is one vector-borne disease caused by the Aedes aegypti mosquito vector. One way to control the Aedes aegypti mosquito vector is to use insecticides. The insecticide used must be known for its efficacy, safety and resistance status. The use of cypermethrin as an insecticide in controlling the Aedes aegypti mosquito at Sultan Syarif Kasim II Airport Pekanbaru needs to know its resistance status. This study aims to determine the resistance status of the Aedes aegypti mosquito to the insecticide cypermethrin at Sultan Syarif Kasim II Airport, Pekanbaru. The method in this research is descriptive with a cross sectional study design. The independent variable was the Aedes aegypti mosquito exposed to insecticide at Sultan Syarif Kasim II Airport Pekanbaru, while the dependent variable was the Aedes aegypti mosquito susceptibility status. The resistance test method refers to The World Health Organization Susceptibility Test criteria. The resistance test using WHO standard impregnated paper showed that the percentage of mosquito that died after being exposed to impregnated paper containing 0.05% Cypermethrin for 24 hours at Sultan Syarif Kasim II Airport Pekanbaru was 81.5% (Tolerant Phase). There has been a tolerance for the use of 0.05% Cypermethrin against the population of Aedes aegypti mosquitoes in Sultan Syarif Kasim II Airport, Pekanbaru.*

Keywords: resistance test, *Aedes aegypti* mosquito, Sultan Syarif Kasim II airport

Abstrak: Latar belakang : Demam Berdarah Dengue (DBD) adalah salah satu penyakit tular vektor yang disebabkan oleh vektor nyamuk *Aedes aegypti*. Salah satu cara pengendalian vektor nyamuk *Aedes aegypti* adalah dengan menggunakan insektisida. Insektisida yang digunakan harus diketahui efikasi, keamanan serta status resistensinya. Penggunaan cypermethrin sebagai insektisida dalam pengendalian nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan Syarif II Pekanbaru perlu diketahui status resistensinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui status resistensi nyamuk *Aedes aegypti* terhadap insektisida cypermethrin di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru. Metode pada penelitian ini adalah deskriptif dengan desain penelitian *cross sectional study*. Variabel bebas adalah nyamuk *Aedes aegypti* yang terpapar insektisida di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru, sedangkan variabel terikat yaitu status resistensi nyamuk *Aedes aegypti*. Metode uji resistensi mengacu pada kriteria Uji *Susceptibility World Health Organization*. Uji resistensi dengan menggunakan *impregnated paper* standar WHO menunjukkan persentase nyamuk yang mati setelah terpapar *impregnated paper* yang mengandung cypermethrin 0,05 % setelah 24 jam di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru adalah 81,5% (Kategori Toleran). Telah terjadi toleransi penggunaan cypermethrin 0,05 % terhadap populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru.

¹ Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru, Riau, Indonesia

Korespondensi:

Dedes Handayani
dedeshandayani1983@gmail.com

Kata kunci: uji resistensi, nyamuk *aedes aegypti*, bandara Sultan Syarif Kasim II

Pendahuluan

Penyakit tular vektor hingga kini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di Indonesia dengan angka kesakitan dan kematian yang cukup tinggi dan berpotensi menimbulkan kejadian Luar Biasa (KLB). Contoh penyakit tular vektor antara lain : Demam Berdarah Dengue (DBD), Malaria, Filariasis, Yellow Fever dan lainnya (2). Pada Tahun 2016 jumlah kasus DBD di Indonesia adalah 204.171 kasus dengan jumlah kematian sebanyak 1.598 orang. Jumlah kasus DBD Tahun 2016 meningkat dari Tahun 2015 (129.650 kasus). Jumlah kematian akibat DBD Tahun 2016 juga meningkat dari Tahun 2015 (1.071 kematian). *Incidence rate* (IR) atau angka kesakitan DBD Tahun 2016 juga meningkat dari Tahun 2015 yaitu 50,78 menjadi 78,85 per 100.000 penduduk. Pada Tahun 2016 *incidence rate* (IR) di Provinsi Riau sebesar 64,14 per 100.000 penduduk (3).

Penyakit DBD disebabkan oleh virus dengue yang terdiri dari empat serotype dan termasuk dalam genus flavivirus yaitu virus DEN-1, DEN-2, DEN-3 dan DEN-4 dari genus Flavivirus. Vektor utama virus dengue adalah Nyamuk *Aedes aegypti* dan *Aedes Albopictus* (4).

Peningkatan jumlah kasus DBD dan semakin bertambahnya wilayah terjangkit dapat disebabkan karena semakin baiknya transportasi penduduk dari suatu daerah ke daerah lain dalam waktu singkat. Transportasi dengan pesawat udara saat ini menjadi pilihan bagi pelaku perjalanan. Bandar udara merupakan areal yang potensial terjadinya penularan penyakit, mengingat penumpang dan barang yang dibawa dari satu Bandar udara ke Bandar udara lain dapat menjadi media penularan penyakit.

Agar area Bandar udara bebas dari vektor maka harus dilakukan pengendalian vektor

penyakit. Pengendalian vektor Nyamuk *Aedes aegypti* dapat dilakukan dengan berbagai cara yakni dengan pengendalian mekanis, pengelolaan lingkungan, penggunaan agent biologis misalnya menggunakan predator yakni ikan pemakan jentik, serta penggunaan insektisida (3).

Penggunaan insektisida kimia merupakan salah satu cara pengendalian vektor penyakit DBD yang disebabkan oleh Nyamuk *Aedes aegypti*. Mengingat penggunaan insektisida yang berbeda pada suatu daerah akan menghasilkan status resistensi yang berbeda pula maka perlu dilakukan uji resistensi. Penggunaan cypermetrin sebagai insektisida yang saat ini digunakan di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru telah menggantikan Malathion yang telah resisten terhadap populasi Nyamuk *Aedes aegypti* (5). Penggunaan Cypermethrin yang merupakan insektisida dari golongan pyretroid juga diperlukan diketahui status resistensinya terhadap populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru.

Bahan dan Metode

Bahan

Adapun bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Telur nyamuk yang dikumpulkan dari ovitrap yang dipasang dilingkungan Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru
2. Jentik nyamuk yang kumpulkan pada wadah yang sengaja di taruh di wilayah Bandara Sultan Syarif Kasim II baik pada area terminal maupun pada areal Perumahan Angkasa Pura
3. Makanan jentik
4. Larutan Gula 10 %

Tabel 1. Alat yang digunakan

No	Pengumpul Telur/ Jentik	Rearing Nyamuk	Uji Resistensi
1	Ovitrap	Kurungan Nyamuk	WHO Susceptibility tes kit
2	Wadah/ botol jentik	Pipet plastic	Impregnated paper cypermetrin
3	Pipet plastik	Cawan plastik	Impregnated paper controller
4	Senter	Handuk	Label
5	Thermometer	Kapas	Aspirator
6	Hygrometer	Senter	Kapas
7	Mikroskop Binokular		Pinset

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari 3 proses yakni : alat pengumpulan telur dan jentik, alat rearing nyamuk serta alat uji resistensi.

Metode

Metode pada penelitian ini adalah deskriptif dengan desain penelitian *cross sectional study* (6). Variabel bebas adalah nyamuk *Aedes aegypti* yang terpapar insektisida di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru, sedangkan variabel terikat yaitu status kerentanan Nyamuk *Aedes aegypti*.

Populasi penelitian ini adalah populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di wilayah Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru. Sampel pada penelitian ini 125 ekor Nyamuk *Aedes aegypti* betina dewasa diambil dari nyamuk yang dibiakkan hingga dewasa dari larva *Aedes aegypti* yang diperoleh di wilayah Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru.

Cara Pengumpulan Telur Nyamuk

Dilakukan pemasangan Ovitrap pada 10 titik di wilayah Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru untuk memerangkap telur Nyamuk *Aedes Aegypti*. Ovitrap dibiarkan selama 4-5 hari. Ovitrap yang sudah mengandung telur nyamuk sehingga berjumlah ± 500 butir dikumpulkan dan dibawa ke laboratorium Pengendalian Resiko Lingkungan Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru untuk dibiakkan. Jentik juga diambil dari kontainer (tempat perindukan nyamuk) wilayah bandara dan di Perumahan Angkasa Pura II Pekanbaru sejumlah ± 500 ekor

Cara Pembibitan Jentik-jentik menjadi Nyamuk Dewasa

Jentik dipelihara dalam gelas plastik/nampan. Diberi makanan jentik hingga menjadi pupa. Jentik yang sudah menjadi pupa dimasukkan ke dalam cawan plastik kemudian diletakkan didalam kandang nyamuk. Kandang nyamuk dialas dengan nampan plastik yang berisi air agar bebas dari semut. Setelah menjadi nyamuk diberi makan larutan gula 10% dengan meletakkan kapas pada bagian atas botol larutan gula (sistem kapilaritas) dan dijaga kelembapannya dengan menaruh handuk lembab pada bagian atas kandang nyamuk.

Tahap Uji Resistensi

Metode uji resistensi mengacu pada kriteria Uji *Susceptibility World Health Organization* (1). Persiapkan 5 pasang tabung *susceptibility* warna hijau dan merah sebagai wadah uji, Tabung hijau adalah tabung penyimpanan dan warna merah adalah tabung kontak yang diberi insektisida (*impregnated paper cypermetrin*). 4 tabung untuk nyamuk uji dan 1 tabung untuk kontrol. Tabung dilapisi kertas HVS yang sudah dilabel, fungsinya agar nyamuk mudah hinggap pada dinding tabung. Permukaan tabung yang licin menyulitkan nyamuk untuk hinggap atau beristirahat. Siapkan *impregnated paper* Sipermetri 5% untuk uji pada 4 tabung uji (warna merah) dan kertas kontrol pada 1 tabung kontrol (warna merah). Masukkan *impregnated paper* dengan pinset (tidak boleh terkena tangan).

Pasang ring pada sisi atas dan bawah tabung. Ambil Nyamuk *Aedes aegypti* betina dewasa dari kandang nyamuk menggunakan aspirator sebanyak 25 ekor untuk masing-masing tabung. Kemudian masukkan kedalam tabung penyimpanan (warna hijau). Pindahkan nyamuk dari tabung penyimpanan (warna hijau) ke tabung kontak (warna merah) dengan cara di tiup keatas dengan sudut 45° . Lakukan perlakuan yang sama pada semua tabung termasuk tabung kontrol. Setelah nyamuk kontak selama 1 jam, kemudian pindahkan kembali kedalam tabung penyimpanan. (tabung hijau).

Amati jumlah nyamuk *knock down* (melumpuhkan) tiap 5, 10, 15, 20, 30 dan 60 menit. Hitung jumlah kematian nyamuk setelah 24 jam pada tabung penyimpanan. Selama penyimpanan kelembaban dijaga dan nyamuk di beri makan larutan gula, dengan cara meletakkan kapas yang sudah dicelupkan dalam larutan gula diatas tabung.

Uji *susceptibility* menurut WHO, kematian 99%-100% adalah rentan/*susceptible*, kematian 80%-98% adalah toleran dan kematian < 80% adalah resisten (6).

Hasil dan Diskusi

Telur Nyamuk *Aedes aegypti* dikumpulkan dari ovitrap yang telah ditempatkan disejumlah titik pada area Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru. Sedangkan jentik dikumpulkan dari

area perkantoran dan area perumahan di sekitar Bandara Sultan Syarif Kasim II di bantu oleh kader Juru Pemantau Jentik (Jumantik) Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru.

Pengumpulan jentik-jentik disekitar perumahan diperoleh dari tempat-tempat perkembangbiakan nyamuk seperti bak mandi, ember, ban bekas dan tong sampah. Telur nyamuk serta jentik yang telah dikoleksi di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru di bawa ke

laboratorium Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru untuk dibiakkan menjadi nyamuk dewasa. Uji resistensi dilakukan terhadap nyamuk dewasa betina yang berumur sekitar 5-8 hari. Adapun jumlah mortalitas Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap setelah dipaparkan dengan Sipermetrin 0,05% selama 1 jam dan diamati setelah 24 jam adalah sebagai berikut:

Hasil uji resistensi nyamuk ditampilkan pada tabel berikut :

Tabel 2. Mortalitas Nyamuk Uji

No	Tabung Uji	Nyamuk Uji	Nyamuk Mati	Nyamuk Hidup	Persentase kematian
1	Tabung 1	25	20	5	80%
2	Tabung 2	25	22	3	88%
3	Tabung 3	25	18	7	72%
4	Tabung 4	25	22	3	88%
		100	82	18	82%

Adapun data untuk uji resistensi pada nyamuk kontrol adalah sebagai berikut :

Tabel 3. Mortalitas Nyamuk Kontrol

NO	Tabung Kontrol	Nyamuk Uji	Nyamuk Mati	Nyamuk Hidup	Persentase kematian
1	Tabung 1	25	1	24	4%

Pada tabung kontrol di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru, terdapat kematian 1 ekor nyamuk dengan persentase kematian sebesar 4%. maka perhitungan resistensi harus dikoreksi dengan rumus Abbot :

$$\frac{\% \text{ kematian nyamuk uji} - \% \text{ kematian nyamuk kontrol}}{100 - \% \text{ kematian nyamuk kontrol}} \times 100\% \\ x = \frac{82\% - 4\%}{100 - 4\%} \times 100\% \\ x = 81,25\%$$

Berdasarkan hasil uji resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap cypermetrin di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru diperoleh nilai mortalitas 81,25 % yang berarti bahwa nyamuk *Aedes aegypti* telah toleran terhadap insektisida Sipermetrin 0,05%. Toleran berdasarkan kriteria WHO yakni mortalitas 80 % - 98 %.

Penelitian ini sejalan dengan penelitian Karauwan dkk, bahwa insektisida cypermetrin telah toleran (mortalitas 94,21 %) terhadap Nyamuk *Aedes aegypti* dewasa di daerah Pasar Tua Bitung (7). Status toleransi cypermetrin terhadap Populasi nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan syarif Kasim II di duga karena

adanya faktor fisiologis. Adanya perbedaan kandungan *myelin* dalam serat saraf vertebrata dan antropoda. Pada serat saraf vertebrata kandungan *myelin* jauh lebih banyak dibanding antropoda sehingga piretrin yang mempunyai kelarutan dalam lemak tinggi akan tertahan dalam *myelin* dan mencegah interaksinya dengan serat saraf. Pada antropoda, kandungan *myelin* dalam serat saraf sangat rendah, piretrin akan langsung berinteraksi dengan serat saraf, terjadi pemblokiran dan menyebabkan paralisis serangan (8).

Status toleransi cypermetrin 0,05% terhadap Populasi nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan syarif Kasim II di juga duga karena adanya faktor biokimia, yakni aktivitas enzim. Aktivitas enzim terjadi pada saat enzim tersebut menghalangi senyawa insektisida untuk mencapai sisi targetnya. Penelitian oleh Karunaratne dan Hemingway tahun 2001 menunjukkan bahwa resistensi insektisida berhubungan dengan adanya peningkatan aktivitas esterase. Adanya peningkatan enzim esterase mengindikasikan

adanya mekanisme detoksifikasi metabolism didalam tubuh serangga (9).

Enzim esterase adalah enzim hidrolase yang mengurai ester pada rantai samping organofosfat. Ada dua mekanisme perubahan enzim sehingga menimbulkan toleransi yakni ; 1. Produksi yang berlebihan sehingga peningkatan metabolism insektisida. 2. Perubahan sifat katalitik enzim menjadi hiperkatalitik terhadap insektisida. Aktivitas enzim esterase non spesifik melalui uji biokimia terhadap nyamuk *Aedes aegypti* di wilayah perimeter dan buffer di Pelabuhan Tanjung Emas Semarang menunjukkan mekanisme peningkatan yang tinggi yakni nilai Absorban Value (AV) berkisar antara 0,70-0,90 (10).

Menurut Soenjono SJ terjadi peningkatan enzim esterase non spesifik yang menghidrolisis subtract α naftil asetet nyamuk *Aedes* sp. Pada empat kelurahan di wilayah kerja KKP Manado (11). Hal senada juga diungkapkan oleh Ikawati dan Widiastuti dimana hasil uji biokimia menunjukkan peningkatan aktivitas enzim esterase pada populasi nyamuk *Ae.Aegypti*. Peningkatan aktifitas enzim esterase menyebabkan efek asetilkolin dihambat oleh enzim esterase, akibatnya mortalitas nyamuk semakin kecil (12).

Adanya dugaan resistensi silang dengan insektisida lain juga merupakan hal yang perlu diwaspadai. Penggunaan Insektisida malathion sejak Tahun 1993 digunakan di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru memungkin terjadinya toleransi terhadap Sipermetrin 0,05% akibat resistensi silang dari penggunaan malathion. Pada Tahun 2016 Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru telah melaksanakan uji resistensi nyamuk *Aedes aegypti* di seluruh wilayah kerja dan diperoleh hasil seluruh wilayah kerja Kantor Kesehatan pelabuhan yang terdiri dari wilayah kerja Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru, Wilayah kerja Pelabuhan Sungai Duku, Wilayah kerja Pelabuhan Siak Sri Indrapura, Wilayah kerja Buatan, Wilayah kerja Tanjung Buton dan Wilayah kerja Selat Panjang telah resisten tehadap malathion (5).

Malation adalah penghambat enzim kolinesterase, dalam tubuh serangga diubah menjadi **malaokson**, yang mempunyai aktivitas

penghambat kolinesterase 10.000 kali lebih kuat dibandingkan senyawa induknya. Pada manusia malation dihidrolisis menjadi asam malation, suatu penghambat kolinesterase lemah. Malathion yang termasuk golongan organofosfat, mekanisme kerjanya menghambat enzim asetilkolinesterase dengan melakukan fosforilasi asam amino serin pada pusat esteratif enzim bersangkutan (8).

Adanya dugaan resistensi silang dengan insektisida lain merupakan hal yang perlu diwaspadai. Hidayati *et al.* membuktikan bahwa nyamuk *Aedes aegypti* yang telah resisten terhadap malathion juga memiliki tingkat resistensi tinggi terhadap DDT dan Feniroin serta resisten sedang dengan insektisida propoksur, toleran terhadap golongan piretroid seperti permetrin dan lamdasihalotrin dan resisten rendah dengan siflutrin (13).

Menurut Ishartadiati, Insektisida kelompok sintetik pirethroid memiliki *target site* yang sama dengan insektisida organofosfat dan organoklorin (14). Kelompok organoklorin salah satu contohnya adalah dikloro dimetil tricloroetan (DDT). DDT dapat menembus lapisan kitin dan melalui limfe, dan lipid saluran syaraf akan sampai pada system saraf pusat serangga. Mula-mula akan terjadi rangsangan kemudian kelumpuhan lalu kematian. Pada penggunaan yang sering , terjadi galur yang resisten, yang dengan bantuan enzim DDT-dehidroklorinasi memutuskan HCl dari klorfenotan dan terbentuk zat 1,1-di- (p-klorfenil) 2,2-dikloreten (DDE) yang tak toksik bagi serangga (8).

Menurut Sayono *et al.* (15) telah terjadi perubahan status resistensi nyamuk *Aedes aegypti* di Kota Semarang. Dimana pada Tahun 2010 insektisida Sipermetrin masih toleran terhadap nyamuk *Aedes aegypti* namun pada Tahun 2012 insektisida Sipermetrin telah resisten pada lima kecamatan yakni Kecamatan Sendangmulyo, Sampangan, Wonosari, Kedungmundu dan Sendangguwo. Hal ini bisa terjadi sebagai salah satu dampak (faktor operasional) dari penggunaan insektisida secara terus menerus baik yang dilakukan oleh pemerintah (*fogging*) maupun yang dilakukan oleh masyarakat (insektida rumah tangga).

Pelaksanaan fogging sebagai upaya pengendalian vektor nyamuk di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru dilakukan setiap triwulan. Namun dalam tahun tertentu juga dilaksanakan lebih dari 4 kali setahun mengingat seringnya Pejabat Negara seperti Presiden, Wakil Presiden, serta para Menteri yang berkunjung ke daerah Riau khususnya Kota Pekanbaru. Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru sering diminta untuk melakukan *fogging* di area bandara beberapa hari sebelum kedatangan para Pejabat Negara tersebut. Frekuensi fogging yang terlalu tinggi harus diwaspadai agar status toleran tidak naik menjadi resistensi.

Kesimpulan

Telah terjadi toleransi penggunaan Sipermetrin 0,05% terhadap populasi Nyamuk *Aedes aegypti* di Bandara Sultan Syarif Kasim II Pekanbaru berdasarkan uji *susceptibility* menggunakan *impregnated paper* standar WHO, dimana mortalitas Nyamuk *Aedes aegypti* adalah 81,25 %.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak telah membantu penelitian ini. Terutama kepada staf pengendalian resiko lingkungan Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pekanbaru. Penelitian ini telah di presentasikan pada Pertemuan Ilmiah Tahunan Ikatan Apoteker Indonesia 2022 pada tanggal 2 Juli 2022.

Referensi

1. WHO. Test Procedures for Insecticide Resistance Monitoring in Malaria Vector Mosquitoes. WHO Press, Geneva. 2013.
2. Kemenkes RI. Pedoman Penggunaan Insektisida (Pestisida) dalam Pengendalian Vektor. Kementerian Kesehatan RI. Jakarta. 2012.
3. Kemenkes RI. Pedoman dan Pengendalian Demam Berdarah Dengue di Indonesia. 2017.
4. Kemenkes RI. Demam Berdarah Dengue. Buletin Jendela Epidemiolog. 2010. 2. 48
5. KKP Pekanbaru. Profil Kantor Kesehatan Pelabuhan Kelas II Pelanbaru Tahun 2016. Pekanbaru. 2016.
6. Sugiyono. Metode Penelitian Kuantitatif, Kualitatif dan R&D. Penerbit Alfabeta, Bandung. 2018.
7. Karauwan IG, B Bernadus, G Wahongan. 2016. Uji Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* Terhadap Cypermethrin di Daerah Pasar Tua Bitung. Jurnal Kedokteran Klinik. 2017. 1. 3
8. Siswandono dan Soekarjo. Kimia Medisinal. Airlangga University Press. Surabaya. 2000.
9. Selvi S, WA Nazni, HL Lee, AH Azahari. Characterization on Malathion and Permethrin Resistance by Bioassays and the variation of esterase activity with the life Stage of Musquito *Culex Quinquefasciatus*. Tropical Biomedicine. 2007.
10. Iswidaty T, Martini, D Widiastuti. Status Resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap Malathion 0,8% di area Perimeter dan Buffer Pelabuhan Tanjung Emas Semarang. Jurnal Kesehatan Masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat. Universitas Diponogoro, Semarang. 2016.
11. Soenjono SJ. Status Kerentanan Nyamuk *Aedes sp.* (Diptera:Culicidae) Terhadap Malathion dan aktivitas enzim esterase non spesifik di Wilayah Kerja Kantor Kesehatan Pelabuhan Bandara Sam Ratulangi Manado. Jurnal Kesehatan Lingkungan Poltekkes Kemenkes Manado. 2011. 1. 1
12. Ikawati B, Widiastuti D. Peta Status Kerentanan *Aedes aegypti* (linn) Terhadap Insektisida Cypermethrin dan Malathion. Jurnal Aspirator. 2015. 7. 1
13. Hidayati H, WA Nazni, HL Lee, AM Sofian. Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with malathion. Trop Biomed. 2011. 2.28
14. Ishartadiati, K. Insect Resistance to DDT. Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, Surabaya. 2007.
15. Sayono S, D Sumanto, D Syafruddin. Distribusi resistensi Nyamuk *Aedes aegypti* terhadap Insektisida Sipermetrin di Semarang. Lembaga Pengembangan Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang. 2012.

Artikel Review: Potensi Kurma Sebagai Sumber Nutrasetikal dan Pangan Fungsional

Marisca Evalina Gondokesumo^{1*}, Retno Wilujeng Susilowati²

Artikel Penelitian

Abstract: Dates are cultivate as a staple food in many countries, especially in the Arabian Peninsula, North Africa, and the Middle East. Dates fruits and date seeds as their by-products have nutritional and health values. It is an abundant source of carbohydrates, dietary fiber, and protein. They are high-source minerals and B complex vitamins, such as thiamine (B1), riboflavin (B2), niacin (B3), pantothenate (B5), pyridoxine (B6), and folate (B9). Based on literature studies, the fruit and seeds of dates are also rich in phytochemicals, such as phenolics, anthocyanins, carotenoids, tocopherols, tocotrienols, and phytosterols. However, date fruits and seeds have not been fully utilized as functional food ingredients with numerous potential to be developed into foods that promote health benefits. Several studies have reported the health benefits of dates in in-vitro and in-vivo conditions. Further research will provide valuable information for the potential utilization of date fruit and seeds as nutritional and functional food ingredients. This review article provides comprehensive information on the bioactive compounds and nutraceutical properties of date fruits and seeds, as well as their potential for use of dates as functional food ingredients.

Keywords: date fruit, date palm, nutraceutical, functional food

Abstrak: Buah kurma adalah tanaman buah tertua di dunia yang dibudidayakan sebagai salah satu makanan pokok dari berbagai negara terutama di kawasan Jazirah Arab, Afrika Utara, dan Timur Tengah. Kurma dan produk sampingannya, seperti biji kurma, memiliki nilai gizi dan efek kesehatan. Kurma termasuk pangan kaya akan karbohidrat, serat pangan, protein, mineral dan vitamin B kompleks seperti tiamin (B1), riboflavin (B2), niasin (B3), pantotenat (B5), piridoksin (B6), dan folat (B9). Selain itu, buah serta biji kurma kaya akan fitokimia, seperti fenolat, antosianin, karotenoid, tokoferol, tokotrienol, dan fitosterol. Namun demikian, buah maupun biji kurma belum sepenuhnya dianggap sebagai bahan pangan fungsional yang potensial untuk dikembangkan menjadi pangan yang menjanjikan untuk kesehatan. Beberapa penelitian melaporkan manfaat kesehatan kurma yang diuji secara in-vitro dan in-vivo. Penelitian lebih lanjut akan memberikan informasi yang berharga untuk pemanfaatan potensi buah dan biji kurma sebagai bahan pangan fungsional. Tinjauan ini menyajikan informasi yang komprehensif tentang senyawa bioaktif dan sifat nutrasetikal kurma, serta telaah potensi kurma sebagai bahan pangan fungsional.

¹ Fakultas Farmasi,
Universitas Surabaya,
Surabaya, Indonesia

² Departemen Histologi,
Fakultas Kedokteran,
Universitas YARSI, Jakarta,
Indonesia

Korespondensi:

Marisca Evalina Gondokesumo
marisca@staff.ubaya.ac.id

Kata kunci: buah kurma, biji kurma, nutrasetikal, pangan fungsional

Pendahuluan

Minat masyarakat dan para peneliti saat ini berfokus pada peningkatan pangan fungsional untuk pencegahan penyakit. Hal ini menyebabkan adanya peningkatan permintaan pangan fungsional untuk meningkatkan kesehatan dan menghambat penyakit kronis. Peningkatan permintaan terhadap pangan fungsional mendorong eksplorasi serta evaluasi lebih jauh terhadap keseluruhan manfaat dari banyak varietas buah dan sayuran. Studi epidemiologis secara konsisten menunjukkan bahwa terdapat korelasi positif dan signifikan antara asupan buah dan sayuran dengan penurunan tingkat kematian penyakit jantung, kanker, dan penyakit degeneratif lainnya serta penuaan (1,2).

Pangan fungsional sendiri dapat dikategorikan sebagai nutrasetikal. Nutrasetikal merupakan penggabungan antara kata nutrisi dan farmasetikal yang dapat didefinisikan sebagai makanan atau bagian dari makanan yang memberikan manfaat kesehatan, termasuk pencegahan dan/atau pengobatan suatu penyakit (3,4). Nutrasetikal dapat berupa makanan yang diperkaya nilai nutrisinya sehingga memberikan keuntungan bagi kesehatan juga dapat mengurangi resiko penyakit kronis. Kebutuhan akan produk-produk nutrasetikal semakin meningkat seiring dengan peningkatan kesadaran masyarakat terhadap pentingnya kesehatan dan upaya pencegahan penyakit. Peningkatan kebutuhan terhadap produk nutrasetikal tentunya mendukung berkembangnya penelitian-penelitian dari berbagai bidang keilmuan sebagai dasar untuk meningkatkan kualitas produk-produk nutrasetikal maupun penemuan baru komponen nutrasetikal yang memberikan dampak bagi kesehatan lebih baik (4,5).

Sumber pangan yang dapat dikategorikan sebagai pangan fungsional adalah makanan sumber serat, antioksidan, vitamin, polifenol, probiotik, prebiotik dan asam lemak tak jenuh (6). Buah termasuk dalam sumber pangan yang mengandung nutrisi diatas sehingga berpotensi sebagai nutrasetikal (7). Kurma sebagai salah satu jenis buah juga memiliki jumlah senyawa polifenol yang tinggi dan juga kaya serat fungsional baik untuk menjaga kesehatan saluran pencernaan (8,9). Hal ini menjadikan kurma

menjadi salah satu tanaman yang memiliki nilai nutrisi dan karakteristik teurapeutik yang tinggi terhadap sejumlah gangguan kesehatan. Ketertarikan pada polifenol terutama dikaitkan dengan kontribusinya terhadap kesehatan manusia melalui berbagai efek biologis yang mencakup aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, anti-mutagenik, dan anti-karsinogenik (10).

Tanaman kurma yang dikenal dengan nama ilmiah *Phoenix dactylifera* (L.) merupakan spesies tumbuhan berkayu yang termasuk dalam famili Arecaceae. Kurma dapat tumbuh di berbagai iklim, namun kualitas terbaik dari tanaman ini tumbuh di iklim kering pada daerah subtropis seperti di kawasan Jazirah Arab, Afrika Utara, dan Timur Tengah. Buah kurma telah dikonsumsi oleh jutaan orang di seluruh dunia dan merupakan makanan pokok selama lebih dari 6000 tahun, terutama di kawasan Timur Tengah dan Afrika Utara (10,11). Berdasarkan data FAOSTAT (2020), negara Mesir merupakan produsen kurma terbesar dunia dengan total produksi mencapai 1.690.959 ton, diikuti oleh Saudi Arabia, Iran, Algeria, Irak dan Pakistan sebagai 6 negara penghasil kurma terbesar di dunia sementara itu, Uni Emirat Arab (UEA) merupakan negara eksportir terbesar kurma di dunia (12,13).

Kurma terdiri dari 70% karbohidrat yang sebagian besar dalam bentuk gula. Pada kebanyakan varietas, kandungan gulanya hampir seluruhnya berupa gula invert sebagai jenis gula yang dapat diserap tubuh manusia dengan cepat (10,14,30). Kurma juga mengandung serat dalam jumlah besar, yaitu sekitar 6,5-11,5% total serat yang terdiri atas 84-94% serat tidak larut dan 6-16% serat mudah larut (15). Buah kurma juga merupakan sumber beberapa mineral, seperti zat besi, potassium, kalium, dan kalsium dan sumber yang kaya antioksidan fenolik (16,17). Berdasarkan hal tersebut kurma sangat berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai pangan fungsional.

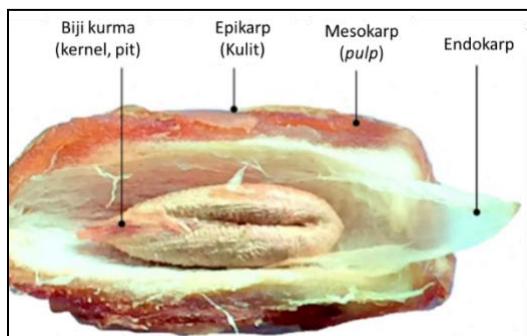
Tinjauan pustaka ini akan memberikan informasi terkini yang terperinci tentang sifat-sifat nutrasetikal dan bioaktif dari tanaman kurma dan potensinya untuk mengembangkan makanan baru dan fungsional. Tujuan akhir dari tinjauan ini adalah untuk mendorong para industrialis dan peneliti untuk mengeksplorasi potensi penggunaan kurma untuk aplikasi praktis

di masa depan pada kesehatan manusia serta pemanfaatan kurma sebagai makanan fungsional dalam berbagai produk.

Pembahasan

Nomenklatur, Klasifikasi dan Struktur Buah Kurma

Menurut UPT Materia Medika Batu, kurma termasuk ke dalam *kingdom Plantae*, *subkingdom Tracheobionta*, *Superdivisi Spermatophyta*, *Divisi Magnoliophyta*, *Class Liliopsida*, *Subclass Arecidae*, *Ordo Arecales*, *Family Arecaceae*, *Genus Phoenix*, *Species Phoenix dactylifera L.* (18,83). Selanjutnya, *The Plant List* mengidentifikasi bahwa *Phoenix dactylifera L.* adalah satu-satunya nama yang diterima untuk pohon kurma, dengan sinonim antara lain: *Phoenix dactylifera* var. *costata* Becc., *Phoenix dactylifera* var. *cylindrocarpa* Mart., *Phoenix dactylifera* var. *gonocarpa* Mart., *Phoenix dactylifera* var. *oocarpa* Mart., *Phoenix dactylifera* var. *oxysperma* Mart., *Phoenix dactylifera* var. *sphaerocarpa* Mart., *Phoenix dactylifera* var. *sphaerosperma* Mart., dan *Phoenix dactylifera* var. *sylvestris* Mart (18,84).



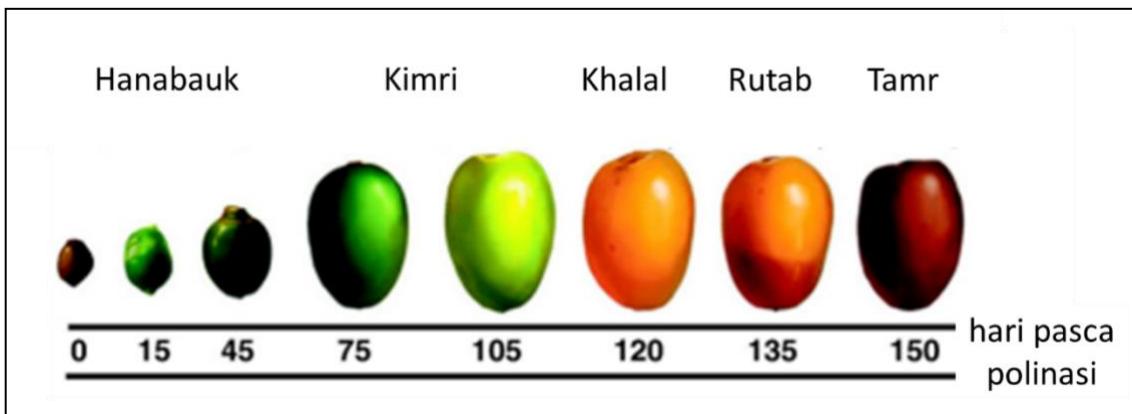
Gambar 1. Anatomi Buah Kurma (Sumber: Modifikasi dari Ghnimi et al, 2017 (14))

Buah kurma tersusun atas perikarp, mesokarp, endokarp dan satu biji (juga disebut kernel, pit, atau *pyrene*) (**Gambar 1**). Mesokarp, yang mewakili sebagian besar daging buah, terdiri dari sel parenkim yang membesar dan terbagi menjadi mesokarp luar dan mesokarp dalam yang ditengahi oleh 3-10 lapisan sel taniniferous (19). Biji memiliki sisi ventral yang ditandai oleh alur dengan kedalaman dan lebar yang bervariasi. Sisi dorsal biji merupakan bagian cembung dengan lubang kecil yang disebut mikropil dan di bawahnya terletak embrio. Benih dari varietas kurma yang berbeda akan memiliki

kedalaman alur dan posisi mikropil (pusat atau perifer) yang berbeda pula.

Terdapat lima tahap perkembangan kurma, terdiri dari Hanabauk, Kimri, Khalal (atau Bisr), Rutab, dan Tamr seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 2** (16,20). Pada tahap Hanabauk, kurma mengandung lebih dari 5% protein, 0,5% lemak dan 3% karbohidrat. Pada tahap Kimri, buah berubah warna menjadi hijau, tetapi cukup keras dan tinggi tanin sehingga tidak layak untuk dikonsumsi. Selain itu, diameter buah meningkat menjadi 20 milimeter dan buah berubah menjadi kurma hijau ukuran penuh dari bentuk berry hijau kecil dengan pengurangan kadar protein, lemak, dan karbohidrat, masing-masing sekitar 2,5%, 0,3%, dan 2,8%. Rata-rata bobot buah pada tahap Kimri meningkat lebih dari 8,5% (17). Tahap ketiga dikenal sebagai tahap fisiologis matang, disebut sebagai Khalal yang keras dan matang. Perubahan warna dari hijau menjadi kuning kehijauan atau merah muda diikuti menjadi merah tergantung pada varietasnya. Umumnya tahap ini berlangsung dari 3 hingga 5 minggu tergantung varietasnya. Kandungan protein dan karbohidrat buah semakin menurun hingga 2,6%, tanpa perubahan yang terlihat pada kadar karbohidrat(16). Pada tahap keempat—Rutab, terlihat perubahan fisiologis tertentu. Ujung di puncak melunak, matang, dan berubah warna menjadi coklat atau hitam. Tahap akhir dan matang sepenuhnya dikenal sebagai tahap Tamr di mana buah menjadi lebih kering dan berwarna lebih gelap, dengan pengurangan kandungan protein, lemak, dan karbohidrat masing-masing menjadi hampir 2%, 0,2%, dan lebih dari 1,5% (21).

Buah kurma dapat dimakan dalam tiga tahapan terakhir, yaitu Khalal, Rutab dan Tamr, setelah penurunan kepahitan, peningkatan rasa manis, dan peningkatan kelembutan, dan sukulen (14). Variasi tahapan Khalal, Rutab, dan/atau Tamr serta waktu panen terbaik bergantung pada masing-masing varietas. Pada tahap Tamr, buah kurma bervariasi dalam hal ukuran, bentuk, warna, tekstur dan rasa tergantung pada varietas dan kondisi agroklimat (23). Jumlah varietas kurma yang tumbuh secara global melebihi 2000 varietas tetapi hanya 10% diantaranya yang sudah dijelaskan dengan lengkap terkait karakteristiknya (14,17).



Gambar 2. Tahapan kematangan buah kurma (Sumber: Modifikasi dari Al-Mssalleem et al., 2013 (22))

Bentuk buah pada fase tamr bervariasi dari oval hingga silinder dengan dimensi dari 3 sampai 11 cm dan diameter 2 sampai 3 cm dan memiliki warna dari kuning, coklat, merah, hingga hitam.

Buah kurma yang bisa dimakan juga memiliki tingkat kekerasan yang berbeda-beda. Hal ini diklasifikasikan menurut kadar airnya pada tahap Tamr, yaitu lunak (kelembaban >30%), semi-kering (kelembaban sekitar 20–30%) dan kering (kelembaban ≤20%, aktivitas air <0,65) (24). Pada metode pengeringan kurma Tamr, proses pengeringan dibagi menjadi beberapa tahap, yakni dikeringkan secara alami di pohon atau dijemur dan yang lainnya adalah "Chuhhara atau Khalal matbookh" dimana pada tahap Khalal pertama, kurma direbus dan kemudian dijemur. Proses pengeringan ini akan mendukung buah memiliki umur simpan lebih lama tanpa mengganggu komposisi nutrisi utama dan metode ini diperaktikkan di Pakistan (25).

Umumnya, buah dari kultivar kurma lunak didominasi oleh gula invert (fruktosa & glukosa) dan mengandung sedikit atau tidak ada sukrosa, sementara varietas kering diduga mengandung proporsi sukrosa yang relatif tinggi. Berdasarkan jenis gula, varietas kurma diklasifikasikan menjadi: a. varietas gula invert yang terutama mengandung gula invert glukosa dan fruktosa (misalnya varietas Barhi dan Saidy), b. varietas gula campuran (misalnya varietas Khadrawy, Halawy, Zahidi, dan Sayer), dan c. varietas gula tebu yang mengandung sukrosa sebagai gula utama (misalnya varietas Deglet Noor dan Deglet Beidha). Namun demikian, masih terdapat beberapa perbedaan dalam mengklasifikasikan varietas berdasarkan kadar air dan jenis gula.

Jumlah gula dan proporsi sukrosa dan gula invert (glukosa dan fruktosa) menentukan kadar air dan tingkat kekerasan buah kurma, varietas dengan sukrosa yang tinggi umumnya lebih keras dibandingkan dengan varietas dengan gula invert tinggi (14,26,27).

Komposisi Gizi dari Kurma

Kurma memiliki nutrisi yang penting karena kaya akan kandungan esensial meliputi karbohidrat, garam dan mineral, serat makanan, vitamin, asam lemak, asam amino, dan protein (28,29,31). Kurma kaya akan karbohidrat dalam bentuk fruktosa, glukosa, manosa, maltosa, dan sukrosa, yang mewakili >80% berat kering (10). Kurma juga dianggap sebagai sumber energi yang baik karena menyediakan gula sederhana, seperti glukosa, yang mudah diserap selama pencernaan dan menyebabkan peningkatan gula darah yang cepat (32). Kandungan gula dari berbagai varietas kurma dapat bervariasi antara 35% dan 88% tergantung pada tingkat pematangannya (33,34). Varietas Deglet Noor mengandung lebih banyak sukrosa tetapi lebih sedikit monosakarida (glukosa dan fruktosa) daripada kurma Allig. Lemine et. Al. (2014) menganalisis 10 varietas kurma dan menemukan bahwa kandungan karbohidrat total tertinggi ada pada varietas Fard, Khunaizy, dan Gash Gaafar (35). Studi lainnya dari Assirey (2015), meneliti 10 varietas kurma mengungkapkan tingkat karbohidrat tertinggi (81,4%) ada pada varietas Burni, diikuti oleh Suqaey (79,7%) dan Khodari (79,4%), sedangkan terendah ada pada varietas Labanah (71,2%) (10,34).

Jumlah protein dan lemak dalam kurma relatif lebih sedikit dibandingkan dengan karbohidrat.

Rata-rata kandungan protein kurma segar dan kering masing-masing adalah 1,50 dan 2,14 g/100 g. Kandungan protein kurma bervariasi antara 1,57% dan 3,51% di antara varietas kurma yang berbeda. Kandungan lemaknya adalah 0,14 g/100 g untuk kurma segar dan 0,38 g/100 g untuk kurma kering. Peningkatan protein dan lemak ini biasanya terjadi setelah proses pengeringan karena hilangnya kelembaban (32). Perbedaan dalam budidaya, kondisi pengeringan, dan metode penentuan komponen protein dan lemak juga mempengaruhi kadar protein dan lemak antar varietas (36).

Meskipun kandungan protein dan lemak pada kurma rendah, buah kurma berkontribusi terhadap asam amino esensial dan asam lemak yang berkualitas tinggi, yang memiliki manfaat penting bagi kesehatan manusia (17). Assirey (2015) melaporkan bahwa glutamat, asparagin, arginin, prolin, glisin, dan alanin ditemukan sebagai asam amino esensial yang dominan, sementara kandungan triptofan terendah pada varietas kurma di Saudi Arabia (34). Namun, penelitian lain oleh Hamad et. al. (2015) melaporkan kandungan asam amino kurma segar menemukan bahwa glisin sebagai asam amino yang paling melimpah, diikuti oleh prolin, alanin, dan lisin dan yang paling sedikit adalah sistein (30). Kurma, khususnya jenis Ajwa mengandung asam amino non-proteinogenik yang akan berikatan dengan antibodi untuk menghasilkan limfosit T, membantu detoksifikasi di hati, dan mengurangi kreatinin dalam tubuh manusia (35,37). Asam amino non-proteinogenik yang teridentifikasi meliputi (2S, 5R)-5-hydroxypipeolic acid, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, g-amino-n-butrylic acid, (2S,4R)-4-152 hydroxyproline, L-pipecolic asam dan 2-aminoetanol. Sejumlah kecil 5-hidroksilisin, L-153 ornitin, b-alanin, (S)-b-asam aminoisobutirat, dan L-allo-isoleusin juga ditemukan (38).

Kurma juga merupakan sumber mikronutrien yang baik dan berkontribusi pada beberapa aspek terapeutik dan fungsi normal tubuh manusia. Kurma kaya akan mineral kalium (K), kalsium (Ca), natrium (Na), besi (Fe), seng (Zn), dan magnesium (44,45,46). Nutrisi minor ini sangat penting untuk fungsi biologis pada manusia, misalnya Na penting dalam proses respirasi, Zn untuk berfungsinya sistem kekebalan tubuh, dan

Fe untuk mengurangi kelelahan fisik. Mineral yang berbeda menunjukkan manfaat terhadap kesehatan dan berperan dalam pembentukan tulang, gigi, jaringan lunak, hemoglobin, otot, dan sel saraf (32,39).

Selain itu, kurma juga merupakan sumber vitamin larut air dalam jumlah sedang seperti B1, B2, B9, A, dan C. Kandungan vitamin dalam daging buah mencapai 10,52 mg dalam 100g (44). Kurma juga mengandung karotenoid seperti betakaroten, lutein, dan neoxanthin sebagai prekursor retinol. Kurma juga diperkaya oleh antioksidan alami seperti asam fenolat, flavonoid, tanin, dan antosianin (46,47). Senyawa fenolik dapat berupa bentuk bebas maupun terikat dan berkontribusi dalam pangan fungsional maupun bahan untuk nutrasetikal. Studi dari Mrabet et al., (2016) dalam menentukan profil fenolik dari berbagai kultivar kurma Tunisia menemukan bahwa semua varietas kaya akan asam protocatechuic, asam syringic, asam vanilat, dan asam galat (41). Lemine et al. (2014) mengidentifikasi konsentrasi asam fenolik dalam kurma pada tahap yang berbeda dan menemukan bahwa tahap khalal menunjukkan kandungan fenolik yang lebih tinggi daripada tahap Tamr yang matang sepenuhnya (35). Mansouri et al (2005) melaporkan bahwa kurma juga mengandung asam xanthoxylin, hydrocaffeic, dan coumaroylquinic bersama dengan isomer asam shikmat yang berbeda (42). Dibandingkan dengan kandungan fenolat pada cranberry, kurma mengandung lebih sedikit jenis senyawa fenolat. Berry mengandung beberapa turunan asam hidroksi benzoat tambahan, sebaliknya, kurma mengandung asam fenolik yang lebih penting secara biologis seperti asam syringic dan asam vallinat yang biasanya tidak ditemukan dalam cranberry ataupun pada buah kering lainnya seperti aprikot, prune, dan pir (43).

Potensi nutrasetikal kurma

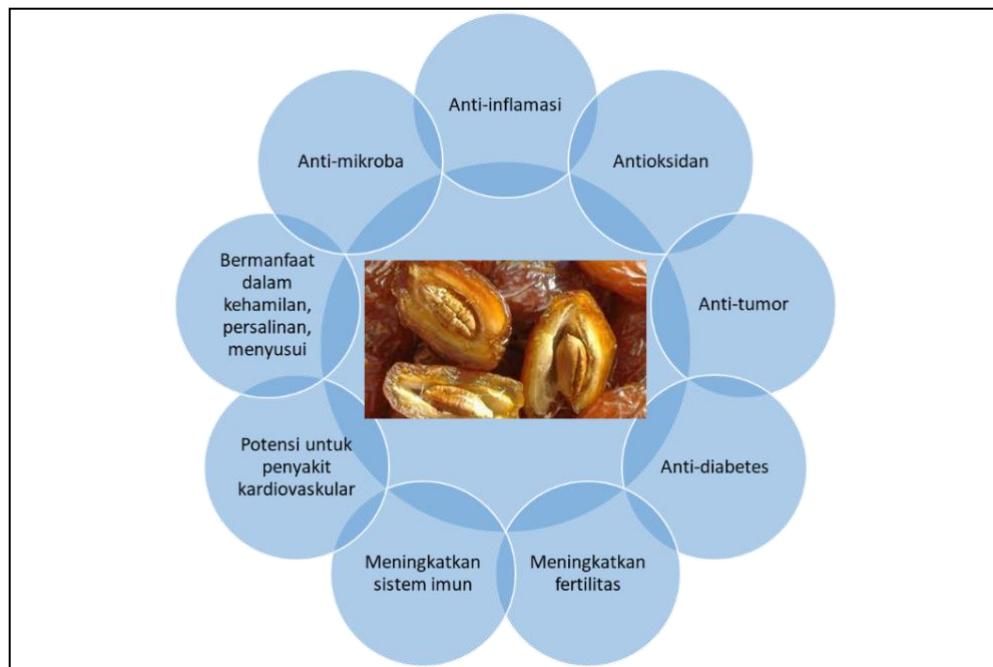
Manfaat kesehatan terkait dengan konsumsi kurma telah diklaim sejak zaman dahulu, beberapa bagian pohon seperti buah, biji, daun, serbuk sari dan turunannya telah digunakan dalam berbagai sistem pengobatan tradisional untuk mengobati berbagai penyakit dan gangguan kesehatan. Secara historis, praktik ini telah dilakukan di Aljazair, Mesir, India, Maroko, Iran, dan Irak. Di Maroko Tenggara,

kurma secara tradisional digunakan untuk mengobati hipertensi dan diabetes. Dalam sistem pengobatan tradisional India (Ayurveda), kurma kering digunakan sebagai antitusif, ekspektoran, penenang, pencahar, diuretik dan pemulih kesehatan. Di Mesir kuno, kurma digunakan sebagai komponen penting dalam berbagai manisan dan tonik, karena diyakini dengan sering mengkonsumsi serbuk sari kurma dan bunga jantan dapat meningkatkan kesuburan (44,48). Selain itu, kurma juga telah dikaitkan dengan pengobatan berbagai macam gangguan kesehatan seperti gangguan perut dan usus, penyakit kencing, sakit tenggorokan, pilek, radang selaput lendir hidung, demam, sakit gigi, peradangan, gonore, edema hati, keracunan alkohol, kelumpuhan, hilangnya kesadaran, gangguan memori, dan gangguan saraf dan mental (17,48-50).

Buah kurma memiliki kandungan antioksidan yang tinggi dan dapat meredakan stres oksidatif yang terkait dengan berbagai penyakit. Serat makanan dan ekstrak polifenol kurma memiliki potensi untuk digunakan sebagai pengganti serat sintetis dan antioksidan dalam industri farmasi dan nutrasetikal. Selain itu, kurma kaya akan fitokimia, termasuk tanin, asam fenolik, senyawa volatil, flavonoid (apigenin,

luteolin, quercetin, anthocyanin), pitosterol (β -sitosterol, isofucosterol, stigmasterol, campesterol), dan karotenoid (lutein, neoxanthin, -karoten, violoxanthin, antheraxanthin). Senyawa polifenol yang beragam dalam kurma membuatnya sangat unik jika dibandingkan dengan buah-buahan lainnya (29,51,52). Matloob & Balakita (2016) menginvestigasi varietas kurma yang berbeda untuk kandungan fenolik total dan mengamati kandungan yang sangat tinggi dibandingkan dengan buah-buahan lain, seperti apel, aprikot, blueberry, mandarin, jeruk, delima, pisang, pepaya, nanas dan anggur merah. Adanya kandungan fenolik yang tinggi pada kurma menunjukkan nilai nutrasetikal kurma lebih tinggi dibandingkan buah lainnya (47,53).

Meskipun banyak kegunaan kurma dalam pengobatan tradisional, bukti klinis atau ilmiah yang dapat digunakan untuk mengkonfirmasi efek tersebut masih sangat terbatas. Namun demikian, eksplorasi senyawa bioaktif kurma yang dilakukan dalam beberapa dekade terakhir telah memberikan gambaran tentang bioaktivitas dari kurma terhadap kesehatan (10). **Gambar 3** menunjukkan penelitian yang tersedia saat ini tentang manfaat kesehatan dari kurma. Beberapa potensi nutrasetikal kurma akan dibahas lebih jauh dalam bagian ini.



Gambar 3. Potensi nutrasetikal kurma

Kurma dengan potensi antioksidan yang tinggi

Kurma dikenal sebagai sumber antioksidan alami seperti karotenoid, fenolat, tokoferol, flavonoid, dan asam askorbat dalam berbagai konsentrasi dan bentuk tergantung pada genotipe kurma dan teknik pengolahan pasca panen (32). Di antara antioksidan alami, tokoferol dianggap sebagai salah satu antioksidan alami yang paling efektif terutama pada fase minyak dari biji kurma dengan potensi anti-oksidatif yang beragam tergantung pada struktur isomernya (17,54).

Biji kurma menunjukkan serat makanan dan kandungan antioksidan tinggi karena adanya fenolik dan flavonoid yang lebih tinggi dari pada bagian daging buah kurma (32,14). Penelitian Djaoudene dan rekan (2019) menemukan bahwa efek antioksidan dari ekstrak biji kurma efektif dalam menghambat enzim tirosinase dan α -glukosidase sehingga berpotensi sebagai agen pemutih kulit, neuroprotektif, anti-hiperglikemik atau antihiperlipidemia (36). Lebih jauh lagi, minyak biji kurma mengandung kandungan tocots (tokoferol + tokotrienol) yang cukup besar dimana alfa-tokotrienol memiliki proporsi yang lebih besar. Tokotrienol berpotensi untuk mengurangi dan mengendalikan risiko beberapa jenis kanker seperti kanker payudara (55). Selain itu, kapsul tokotrienol direkomendasikan kepada orang gemuk untuk mengurangi kolesterol *low-density lipoprotein* (LDL). Potensi antioksidan alfa-tokoferol juga dapat ditingkatkan bila digunakan dalam kombinasi dengan flavonoid seperti myricetin (56).

Asam protocatechuis (PCA), antioksidan polifenol dalam kurma, telah digunakan untuk pengobatan kanker karena mengurangi proliferasi sel tumor. Neoxanthin, lutein, dan beta-karoten dikenal sebagai karotenoid utama yang ditemukan dalam buah kurma dan termasuk prekursor vitamin A, yang bermanfaat dalam penglihatan, fungsi normal sistem kekebalan, pensinyalan seluler, dan reproduksi. Konsentrasi antioksidan ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, di antaranya perubahan iklim, tahap pematangan, dan kondisi panen sehingga setiap kultivar memiliki kadar yang berbeda-beda (14, 57).

Buah-buahan sangat populer sebagai sumber antioksidan. Aktivitas antioksidan beberapa buah secara *in vitro* dan *in vivo* telah dipelajari secara

ekstensif, sementara aktivitas antioksidan kurma baru mulai diteliti dalam beberapa tahun terakhir. Secara *in vitro*, terdapat beberapa metode untuk mengukur aktivitas antioksidan, di antaranya uji *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH), uji *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* (CUPRAC), *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC), uji *2,2'-azino-bis-3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonate acid* (ABTS) dan uji *Ferric-Reducing Ability of Plasma* (FRAP). Aktivitas antioksidan secara *in vivo* diuji menggunakan hewan coba mencit atau tikus (14,36,52).

Penelitian secara *in vitro* salah satunya telah dilakukan oleh Al Harthi et al (2015) dengan mengukur potensi antioksidan 4 kultivar kurma Oman (Faradh, Khasab, Buninja dan Khasab) dengan ekstrak etanol melalui analisis fenolik dengan teknik *High-Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Hasil penelitian mengungkapkan dari varietas yang diuji, konsentrasi yang berbeda dari asam fenolik seperti caffeic, syringic, vanillic, dan asam galat. Senyawa fenolik ini mungkin bertanggung jawab untuk menangkal aktivitas radikal bebas dan efek terapeutik lainnya (16). Penelitian Amira et al (2012) mengukur aktivitas antioksidan, profil senyawa fenolik, dan komposisi fitokimia pada 4 kultivar kurma Tunisia pada tahap perkembangan khalal, rutab, dan tamr menemukan bahwa jumlah senyawa fenolik dan kapasitas antioksidan buah kurma sangat dipengaruhi oleh tahapan pematangannya. Kultivar kurma memiliki kadar senyawa fenolik, komposisi fitokimia, dan aktivitas antioksidan yang berbeda selama pematangan yang sebagian besar berada pada tahap khalal (58). Hal ini diperkuat oleh penelitian Haider et al (2018) yang mempelajari profil biokimia dan potensi antioksidan dari berbagai kultivar kurma Pakistan pada setiap tahap pematangan. Hasil penelitian menunjukkan tren penurunan nilai senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan dari tahap Khalal ke Tamr (59). Hal ini mendukung hipotesis bahwa status nutrisi antioksidan unggulan kurma ada pada tahap khalal.

Penelitian secara *in vivo* menunjukkan bahwa bubuk biji kurma memiliki aktivitas antioksidan yang diujikan pada tikus Wistar jantan dengan diet basal yang terdiri dari 2 g/kg, 4 g/kg, dan

8g/kg bubuk biji kurma. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antioksidan sistem pertahanan organ dan serum meningkat secara signifikan pada tikus yang diberi diet bubuk biji kurma dibandingkan dengan diet lainnya. Selain itu, bubuk biji kurma dapat menurunkan kerusakan oksidatif pada otak tikus, otot, dan hati tanpa mengubah fungsi organ (10). Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan air daging buah kurma secara signifikan meningkatkan status antioksidan serum dengan meningkatkan vitamin C, E, A dan beta-karoten, serta mengurangi kadar malondialdehid serum pada tikus Freund model *adjuvant* artritis (60). Kurma sebagai antioksidan yang efisien telah terbukti secara *in vitro* dan *in vivo*, sehingga diharapkan saat dikonsumsi memiliki aktivitas antioksidan yang kuat pada manusia.

Kadar antioksidan pada kurma juga telah dibandingkan dengan buah-buahan lain yang memiliki antioksidan tinggi sebelumnya. Total aktivitas antioksidan kurma yang diukur menggunakan uji *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC)-fluorescent, berkisar 8212-12.543 M/g dan lebih tinggi daripada buah lain termasuk elderberry dan bilberry (61). Studi lain pada 28 buah di Cina menggunakan uji *ferric reducing/antioxidant power assay* (FRAP) menempatkan kurma menjadi peringkat kedua yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi setelah buah Hawntorn (62). Secara keseluruhan, literatur yang ada dengan jelas menunjukkan bahwa kurma menunjukkan potensi antioksidan yang tinggi baik secara *in vitro* maupun *in vivo*, dan menjadikan buah ini sebagai bahan yang menjanjikan untuk pengembangan nutrasetikal.

Potensi kurma sebagai anti-mikroba

Resistensi mikroba merupakan sebuah tantangan terhadap obat antimikroba. Solusi yang mungkin untuk masalah ini adalah dengan menggunakan beberapa agen antimikroba alami dan ekstrak bioaktif untuk mengetahui tidak ada atau sedikit efek samping yang ditimbulkan. Penelitian Aamir et al (2013) menunjukkan bahwa ekstrak metanol dan aseton dari kurma Ajwa menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, serta efektif melawan penyakit enterik karena menekan aktivitas *Enterococcus faecali* (63). Penelitian lain dari Bokhari et al (2012) menunjukkan bahwa ekstrak

kurma Ajwa dapat menghambat pertumbuhan *F. solani*, *Fusarium*, *A. alternata*, *A. flavus*, dan *Trichoderma sp.* Biji kurma Ajwa menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar 40% terhadap *A. Alternata*; 38% terhadap *F. Fusarium*; dan aktivitas penghambatan ringan terhadap *F. solani* dan *Trichoderma sp.* Ekstrak daun menunjukkan aktivitas penghambatan masing-masing sebesar 51%, 29% dan 38% terhadap *A. alternata* *F. solani* dan *F. Fusarium* secara berturut-turut. Selain itu, perbandingan aktivitas antimikroba antara ekstrak metanol dan aseton biji kurma ekstrak daun menunjukkan hasil lebih tinggi pada ekstrak biji kurma (64). Jassim & Naji (2010) menginvestigasi potensi antimikroba dari kurma terhadap phage *Pseudomonas* dan hasilnya menunjukkan adanya aktivitas antivirus yang efektif dengan konsentrasi penghambatan minimum (MIC) 10 g/ml. Berdasarkan penelitian tersebut ekstrak kurma memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri melalui penghambatan dan inaktivasi lisis phage *Pseudomonas* (65).

Penelitian Belmir at al (2015) menguji pengaruh ekstrak air buah kurma terhadap indeks terapeutik amfoterisin B, yang merupakan obat antijamur untuk infeksi jamur yang serius dan berbahaya. Ekstrak air buah kurma diuji aktivitas antijamur dengan amfoterisin B terhadap ragi *Candida albicans* ATCC 1023. Kemudian dilakukan uji sitotoksitas kompleks pada sel darah merah manusia. Hasilnya menunjukkan peningkatan yang signifikan terhadap aktivitas antijamur yang diberikan ekstrak air kurma dan amfoterisin B dibandingkan dengan amfoterisin B saja pada konsentrasi terapeutik. Selain itu, penambahan ekstrak air kurma dapat melindungi sel darah merah manusia terhadap sitotoksitas yang disebabkan oleh amfoterisin B. Hal ini mungkin disebabkan oleh efek flavonoid dan polisakarida yang ada dalam buah kurma (66).

Penelitian lainnya dari Bouhlali et al (2016) pada beberapa varietas kurma di Maroko menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri Gram positif (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) dan Gram negatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella abony* NCTC

6017). Ekstrak kurma varietas Bousrdon dan Jihl ditemukan memiliki aktivitas penghambatan yang lebih kuat dibandingkan varietas lainnya dengan nilai MIC berkisar antara 2,5 mg/mL dan 10 mg/mL untuk semua strain bakteri yang diuji. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak buah kurma, khususnya ekstrak Jihl dan Bousrdon, tidak hanya merupakan sumber antioksidan yang penting dan memiliki efek perlindungan membran yang tinggi terhadap radikal bebas, tetapi juga merupakan sumber potensial komponen antibakteri. Mengingat implikasi yang kuat bagi kesehatan manusia, penelitian untuk mengkonfirmasi aktivitas antimikroba ekstrak buah dan biji kurma masih sangat diperlukan. Semakin banyak data yang diperoleh terkait antimikroba buah kurma, menjadi sebuah jawaban untuk melindungi manusia terhadap berbagai jenis infeksi mikroba dengan murah dan mudah melalui konsumsi buah kurma atau ekstrak kurma (67).

Potensi kurma sebagai anti-kanker

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa komposisi fitokimia buah kurma memiliki potensi terapeutik terhadap kanker (25). Berdasarkan penelitian Mills et al (1989), peningkatan asupan buah-buahan kering seperti kacang, kismis, lentil, dan kurma sangat terkait dengan penurunan risiko kanker prostat. Bahan kimia beracun menyebabkan terbentuknya radikal bebas dan ROS yang berlebihan sehingga menyebabkan efek karsinogen kuat dan mengakibatkan kanker. Kurma mengandung antioksidan kuat atau disebut sebagai agen kemopreventif ampuh yang mengatasi radikal bebas dan mencegah kerusakan oksidatif makromolekul penting dengan penghambatan karsinogenesis (17,52,68).

Selain itu, zat gizi mikro seperti vitamin dan mineral dalam buah kurma juga berkontribusi terhadap aktivasi mekanisme pertahanan antioksidan secara endogen. Mineral yang ada dalam daging dan biji kurma (magnesium, seng, tembaga, kalium, dan selenium) bertindak sebagai kofaktor untuk enzim untuk meningkatkan aktivitas antioksidan. Serat makanan dalam kurma meningkatkan waktu transit gastrointestinal fekal yang dapat berkontribusi pada aktivitas pencegahan kanker secara *in vivo*. Selain itu, kurma juga

berkontribusi pada aktivasi sistem kekebalan tubuh untuk mencegah kanker yang telah terbukti dapat meningkatkan kekebalan bawaan dan adaptif. Efek imunomodulator kurma ini diyakini sebagai aktivitas polifenol dan polisakarida (10,14,17).

Sejumlah data telah membuktikan efektivitas antikanker dari kurma. Salah satunya di Palestina, konsumsi kurma mentah secara tradisional dianggap sebagai obat kanker payudara (17). Zhang et al. (2013) menentukan potensi penghambatan sikloksigenase kurma menyerupai ibuprofen, aspirin, dan naproxen. Aktivitas antikanker kurma disebabkan oleh kandungan senyawa polifenol yang bekerja dalam meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), Glutathione S-transferases (GST), dan katalase dalam tubuh yang pada gilirannya dapat mengurangi proliferasi sel yang rusak diikuti oleh rendahnya kejadian mutagenesis (68). Selain itu, Eid et al., (2014) melaporkan bahwa ekstrak kurma baik ekstrak kurma utuh maupun ekstrak polifenol membantu dalam penghambatan pertumbuhan sel adenokarsinoma usus besar dan meningkatkan pertumbuhan bakteri menguntungkan (*bifidobacteria* dan *bacteroides*) yang mengarah pada pemeliharaan usus dan pengurangan perkembangan kanker usus besar atau kolorektal (70). Zhang et al. (2017) melaporkan bahwa ekstrak air dan metanol kurma Ajwa pada konsentrasi 100 g/ml menghambat proliferasi sel marginal terhadap garis sel paru-paru, payudara, lambung, dan usus manusia. Kegiatan terapi antikanker kurma ini dapat dikaitkan dengan adanya flavonoid seperti quercetin, steroid, dan polifenol (71).

Potensi kurma sebagai anti-diabetik

Buah kurma adalah salah satu buah yang dilaporkan memiliki potensi yang baik dalam pengobatan diabetes karena adanya polifenol yang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Penggunaan ekstrak tumbuhan alami dapat meningkatkan produksi insulin dan menghambat penyerapan glukosa usus, sehingga memainkan peran penting dalam manajemen diabetes. Senyawa aktif yang ada dalam kurma (misalnya, flavonoid, steroid, fenol, dan saponin) semuanya merupakan agen antidiabetes. Terlepas dari apakah mereka diekstraksi dari kurma atau

sumber lain, senyawa ini tampaknya memberikan manfaat antidiabetes melalui kemampuan menangkap radikal bebas (68,72). Selain untuk mengurangi stres oksidatif, konsumsi ekstrak biji Ajwa yang berkepanjangan mempertahankan fungsi hati dan ginjal. Efek ini mungkin sebagian terkait dengan fakta bahwa senyawa fenolik yang ada pada kurma dan tanaman lain menghambat alfa-glukosidase, sehingga mempengaruhi penyerapan glukosa di usus kecil dan ginjal (25).

Mekanisme aktivitas antidiabetes dalam produk kurma belum sepenuhnya dipahami, tetapi mungkin disebabkan oleh peningkatan output insulin dan penyerapan glukosa yang lebih rendah di usus. Glikosida diosmetin yang berasal dari kurma tampaknya meningkatkan ekskresi insulin dan merangsang glikogen sintase yang berperan dalam mempertahankan homeostasis glukosa darah. Lebih lanjut, mengobati tikus jantan diabetes dengan diosmetin glikosida yang diturunkan dari kurma menyebabkan peningkatan yang signifikan dalam kadar testosteron serum, bersama dengan penurunan yang signifikan dalam aktivitas fosfat total dan asam prostat (10,72).

Potensi kurma lainnya dalam efek terapeutik

Kurma telah digunakan sebagai antihipertensi. Senyawa fitokimia dalam kurma berperan dalam mencegah rangkaian komplikasi akibat penyakit kardiovaskular dengan mengurangi hipertensi, hipercolesterolemia, dan oksidasi lipoprotein (68). Al Yahya et al (2015) mempelajari efek kardioprotektif ekstrak buah kurma terlifilisasi pada varietas Ajwa secara ex-vivo dan in-vivo. Hasil penelitian tersebut menemukan bahwa ekstrak kurma dapat meningkatkan proliferasi sel kardio mioblas hingga 40%; mencegah konsumsi antioksidan endogen; dan menghambat peroksidasi lipid (73).

Penelitian Taleb et al. (2016) melaporkan efek farmakologis dari sirup kurma yang bermanfaat untuk pengobatan beberapa penyakit yang melibatkan peradangan dan angiogenesis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa polifenol yang terdapat dalam sirup kurma mengurangi respons angiogenik dengan menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang dimediasi oleh enzim prostaglandin siklooksigenase-2 (COX-2) dan faktor

pertumbuhan endotel vaskular (VEGF). Ditemukan aktivitas inflamasi pada endotel berkurang dengan pemberian senyawa polifenol sirup buah kurma pada 60 g/mL dan 600 g/mL, serta menekan banyak tahap angiogenesis. Menariknya, sirup kurma tidak menunjukkan efek sitotoksik. Selain itu, senyawa polifenol sirup kurma ditemukan secara signifikan mengurangi ekspresi sel COX-2 dan VEGF yang diinduksi oleh tumor necrosis faktor-alpha (NF-alpha) pada tingkat protein dan ekspresi gen dibandingkan dengan sel yang tidak diberikan sirup kurma. Penelitian lain dari Zhang et al (2013) menunjukkan bahwa komponen ekstrak kurma metanol tampaknya bertanggung jawab atas sifat anti-inflamasi (68).

Kurma juga memiliki potensi untuk melawan alzheimer. Penyakit Alzheimer dikenal sebagai gangguan neurodegeneratif paling umum yang menyebabkan demensia. Penyakit ini ditandai dengan gangguan kemampuan motorik dan emosi akibat kehilangan neuron secara masif yang disebabkan adanya pembentukan plak neurotik dan *neurofibrillary tangles*. Plak masif ini membelah protein prekursor beta-amiloid yang terdiri dari hampir 40 asam amino sebagai amiloid-beta protein ($A\beta$), kemudian terakumulasi membentuk plak amiloid pada pembuluh darah dan di luar neuron otak yang menyebabkan kematian saraf. Produk alami yang menghambat fibrilasi in vitro $A\beta$ dapat meningkatkan fungsi memori pada orang dewasa yang lebih tua dengan risiko demensia tinggi. Investigasi pada beberapa varietas kurma Omani menunjukkan bahwa ekstrak kurma secara signifikan menghambat fibrilasi $A\beta$, walaupun sangat tergantung pada konsentrasi ekstrak. Selain itu, ditemukan bahwa penghambatan maksimum fibrilasi $A\beta$ terjadi pada varietas Khalas diikuti oleh varietas Fardh dan Kasab. Hal ini menjelaskan bahwa kurma bisa menjadi agen terapi potensial baru yang dapat membantu dalam mengobati dan mencegah penyakit Alzheimer, tetapi mekanisme yang mendasari mekanisme kerja masih belum ditentukan sehingga perlu penelitian lebih lanjut (17).

Penggunaan buah kurma sebagai bahan fungsional dalam produk makanan

Beberapa penelitian telah memanfaatkan buah kurma sebagai salah satu bahan dalam

formulasi pangan fungsional. Penelitian dari Gad et al (2010) (74) menggunakan sirup kurma sebagai bagian dari air dalam rekonstitusi susu skim bubuk dalam pengolahan yogurt. Hasilnya menunjukkan bahwa yogurt yang diperkaya dengan 10% sirup kurma memiliki tekstur yang halus, rasa yang agak asam dan manis, serta nilai gizi yang tinggi. Yogurt dengan 10% sirup kurma memiliki kadar antioksidan dan konsentrasi folat yang tinggi dibandingkan dengan yogurt biasa. Penggunaan kurma ini memberikan fungsionalitas yang unik pada yogurt yaitu sebagai pemanis, penyedap dan peningkatan nilai gizi. Aktivitas antioksidan yang tinggi dikaitkan dengan kelimpahan senyawa fenolik dalam buah kurma (10).

Penelitian Nwankeze et al (2015) (75), mengevaluasi kualitas roti dari substitusi gula menggunakan kurma. Berdasarkan penelitian, substitusi gula dengan kurma dapat meningkatkan nilai gizi dari roti dengan kadar serat tinggi dibandingkan roti pada umumnya. Penelitian lain melaporkan bahwa roti muffin yang diformulasikan dengan tepung biji kurma dan tepung hidrolisat biji kurma dapat meningkatkan kandungan serat makanan, aktivitas antiradikal bebas, dan kapasitas penghambatan oksidasi sekunder dibandingkan dengan kontrol (76). Berdasarkan penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa penambahan bahan fungsional dari buah kurma yang kaya dengan serat makanan dan polifenol meningkatkan sifat fungsional dan kesehatan dari produk makanan. Selain itu, konsumsi makanan yang kaya serat telah dilaporkan dapat meningkatkan kesehatan dan mencegah perburukan keadaan akibat peningkatan volume feses, penurunan periode transit usus dan merangsang proliferasi flora usus (10,77).

Di Turki terdapat kopi herbal bernama "Kopi Hurma" yang diperoleh dari biji kurma dan dikonsumsi dengan tujuan untuk meningkatkan daya ingat. Kopi yang terbuat dari bubuk biji kurma juga dipercaya dapat meredakan nyeri asam urat jika dikonsumsi rutin dua kali sehari (78). Kurma juga dianjurkan untuk ibu hamil untuk memperkuat dinding rahim karena konsumsi kurma sebelum dan sesudah melahirkan dapat bertindak sebagai pereda nyeri. Konsumsi kurma juga membantu dalam

pencegahan perdarahan pasca melahirkan. Hal ini menjadi kepercayaan umat islam saat Maryam dianjurkan untuk makan kurma untuk meredakan nyeri persalinannya seperti yang tertulis dalam Al-Qur'an (QS. Maryam, 19:23-26). Produk yang terbuat dari buah kurma seperti sirup, rebusan, atau infus water juga digunakan untuk pengobatan sakit tenggorokan, pilek, dan demam (17).

Penelitian di Indonesia terkait dengan penggunaan kurma sebagai pangan fungsional juga telah banyak dilakukan. Penelitian lain untuk membuat *snack bar* kurma dan probiotik memperlihatkan bahwa *snack bar* kurma memiliki energi yang baik untuk camilan alami olahragawan yang menyediakan energi dan nutrisi yang tinggi untuk atlet (79). Penelitian Cesia & Judiono (2018) melaporkan formulasi es krim kurma untuk dikonsumsi pasien demam berdarah dengue (DBD) karena meningkatkan trombopoietin dan daya tahan tubuh terhadap virus pada pasien DBD (80). Penelitian Fitriyana (2014) menunjukkan bahwa pemberian susu formula edamame dan kurma pada anak-anak dengan berak kurang berusia di bawah 2 tahun secara teratur meningkatkan berat badan responden sebesar 28,33%. Hal ini disebabkan oleh kandungan protein dan zat gizi yang lengkap dari sari edamame dan kurma tersebut serta kandungan antioksidan yang tinggi mencegah dari berbagai macam infeksi sehingga dapat meningkatkan kualitas kesehatan (81).

Defisiensi mikronutrien yang kerap disebut *hidden hunger* atau kelaparan tersembunyi adalah masalah yang menjadi perhatian serius yang mempengaruhi sekitar 2 miliar orang di seluruh dunia dan terutama terjadi di negara-negara berkembang (82). Pemanfaatan kurma yang tepat sebagai makanan dengan manfaat gizi yang tinggi dapat menjadi alternatif terbaik untuk mengatasi rasa lapar yang terpendam tersebut. Selain rasanya yang menyenangkan, kurma adalah makanan berenergi sangat tinggi yang mengandung semua unsur nutrisi penting. Kurma menyediakan sekitar 280 kkal/100 g sementara makan lima kurma dapat menyediakan sekitar 115 kalori dengan hampir semua bentuk nutrisi. Konsumsi kecil buah kurma per hari per orang cukup untuk secara signifikan meningkatkan status gizi dan meningkatkan ketahanan pangsa.

Setiap 100 gram kurma mengandung 3,6 mg zat besi yang dapat mengurangi masalah anemia pada anak-anak usia prasekolah dan wanita hamil di banyak negara kurang berkembang karena zat besi mengontrol sintesis hemoglobin yang ada dalam sel darah merah dan bertanggung jawab untuk mencegah anemia pada kehamilan.

Kesimpulan

Kurma merupakan sumber nutrisi dan mineral, kaya antioksidan seperti fenolat dan karotenoid, dan asam lemak esensial yang berperan penting dalam pemeliharaan kesehatan tubuh sehingga dapat digunakan sebagai bahan pangan fungsional dan nutrasetikal. Penelitian lebih lanjut untuk mengeksplorasi manfaat nutraceutical serta manfaat bagi kesehatan berdasarkan komponen fungsional dan mekanisme aksi bioaktif kurma masih perlu dilakukan. Pengembangan produk pangan fungsional dan produk nutrasetikal olahan yang inovatif berbasis terapeutik biji kurma juga harus digalakkan oleh industri pangan. Industri pangan harus mampu berinovasi dalam pengolahan kurma menggunakan cara yang tepat untuk mengawetkan benih kurma sebagai cara untuk mengatasi kehilangan nutrisinya.

Ucapan Terima Kasih

Penulis berterima kasih kepada semua peneliti yang kami kutip dalam ulasan ini untuk penelitian mereka yang signifikan dan berharga. Kami juga berterima kasih kepada Universitas Surabaya dan Universitas YARSI atas dukungannya dalam membuat artikel ulasan ini.

Referensi

1. Dillard CJ, Bruce German J. Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *J Sci Food Agric.* 2000;80(12):1744–56.
2. Prior RL, Cao G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *HortScience.* 2000;35(4):588–92.
3. Nasri H, Baradaran A, Shirzad H, Kopaei MR. New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *Int J Prev Med.* 2014;5(12):1487–99.
4. Chauhan B, Kumar G, Kalam N, Ansari SH. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *J Adv Pharm Technol Res.* 2013;4(1):4–8.
5. El Sohaimy SA. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal.* 2012;20(5), 691-708.
6. Das L, Bhaumik E, Raychaudhuri U & Chakraborty R. Role of nutraceuticals in human health. *Journal of food science and technology.* 2012;49(2), 173-183.
7. Babbar N, Oberoi HS, & Sandhu SK. Therapeutic and nutraceutical potential of bioactive compounds extracted from fruit residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2015;55(3), 319-337.
8. Shahdadi F, Mirzaei HO, Daraei Garmakhany A. Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *J Food Sci Technol.* 2015;52(3):1814–9.
9. Habib, HM, Platat C, Meudec E, Cheynier V & Ibrahim WH. Polyphenolic compounds in date fruit seed (*Phoenix dactylifera*): characterisation and quantification by using UPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2014; 94(6), 1084-1089.
10. Maqsood S, Adiamo O, Ahmad M, Mudgil P. Bioactive compounds from date fruit and seed as potential nutraceutical and functional food ingredients. *Food Chem [Internet].* 2020; 308:125522.
11. Wahab NAA, Zulkifli NF, Shamaan NA, Hamid NA, Zahir NNM. A systematic review on the beneficial effect of date palm (*Phoenix dactylifera*) consumption on energy metabolism. *Adv Sci Lett.* 2017;23(5):4712–6.
12. Allbed A, Kumar L, & Shabani F. Climate change impacts on date palm cultivation in Saudi Arabia. *The Journal of Agricultural Science.* 2017;155(8), 1203-1218.
13. Food and Agricultural Organization (FAO). FAO Report. 2020.
14. Ghnimi S, Umer S, Karim A & Kamal-Eldin A. Date fruit (*Phoenix dactylifera* L.): An underutilized food seeking industrial

- valorization. NFS journal. 2017;6, 1-10.
15. Ali A, Waly M, Essa MM. Nutritional and Medicinal Value of Date Fruit. Dates. 2018; 380-95.
 16. Al Harthi SS, Mavazhe A, Al Mahroqi H, Khan SA. Quantification of phenolic compounds, evaluation of physicochemical properties and antioxidant activity of four date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties of Oman. J Taibah Univ Med Sci [Internet]. 2015;10(3):346-52.
 17. Younas A, Naqvi SA, Khan MR, Shabbir MA, Jatoi MA, Anwar F, et al. Functional food and nutra-pharmaceutical perspectives of date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit. J Food Biochem. 2020;44(9):1-18.
 18. Taleb H, Maddocks SE, Morris RK, Kanekanian AD. Chemical characterisation and the anti-inflammatory, anti-angiogenic and antibacterial properties of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.). J Ethnopharmacol [Internet]. 2016; 194 (May): 457-68.
 19. Shomer I, Borochov-Neori H, Luzki B, Merin U. Morphological, structural and membrane changes in frozen tissues of madjhoul date (*Phoenix dactylifera* L.) fruits. Postharvest Biol Technol. 1998;14(2):207-15.
 20. Kamal-Eldin A, B Hashim I, & O Mohamed I. Processing and utilization of palm date fruits for edible applications. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture. 2012;4(1), 78-86.
 21. Amira EA, Behija SE, Beligh M, Lamia L, Manel I, Mohamed H, et al. Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. J Agric Food Chem. 2012;60(44):10896-902.
 22. Al-Mssallem IS, Hu S, Zhang X, Lin Q, Liu W, Tan J, et al. Genome sequence of the date palm *Phoenix dactylifera* L. Nat Commun [Internet]. 2013;4:1-9.
 23. Chafi A, Benabbes R, Bouakka M, Hakkou A, Kouddane N, Berrichi A. Pomological study of dates of some date palm varieties cultivated in Figuig oasis. J Mater Environ Sci. 2015;6(5):1266-75.
 24. Abdel-Razzak Z, Al-Attrache H, Rammal G. Association of CYP1A1 and CYP2E1 gene polymorphisms with prostate cancer in a Lebanese population. Int Res J Public Environment Heal. 2015;2(10):135-43.
 25. Khalid S, Khalid N, Khan RS, Ahmed H, Ahmad A. A review on chemistry and pharmacology of Ajwa date fruit and pit. Trends Food Sci Technol [Internet]. 2017;63:60-9.
 26. Eltayeb EA, . ASA, . SAF. Changes in Soluble Sugar Content During the Development of Fruits in Some Varieties of Omani Date Palm (*Phoenix dactylifera*). Pakistan J Biol Sci. 1998;2(1):255-8.
 27. Markhand GS, Abul-Soad AA, Mirbahar AA, Kanhar NA. Fruit characterization of Pakistani dates. Pakistan J Bot. 2010;42(6): 3715-22.
 28. Al Juhaimi F, Özcan MM, Adiamo OQ, Alsawmahi ON, Ghafoor K, Babiker EE. Effect of date varieties on physico-chemical properties, fatty acid composition, tocopherol contents, and phenolic compounds of some date seed and oils. J Food Process Preserv. 2018; 42(4): 1-6.
 29. Parvin S, Easmin D, Sheikh A, Biswas M, Sharma SCD, Jahan MGS & Roy N. Nutritional analysis of date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) in perspective of Bangladesh. American Journal of Life Sciences. 2015;3(4), 274-278.
 30. Hamad I, Abdelgawad H, Al Jaouni S, Zinta G, Asard H, Hassan S, et al. Metabolic analysis of various date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia to assess their nutritional quality. Molecules. 2015;20(8): 13620-41.
 31. Chandrasekaran M, Bahkali HA. Valorization of date palm (*Phoenix dactylifera*) fruit processing by-products and wastes using bioprocess technology - Review. Saudi Journal of Biological Sciences. 2013; 20: 105-120.
 32. Al-Farsi MA, Lee CY. Nutritional and functional properties of dates: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2008;48(10):877-87.
 33. Al-Farsi M, Alasalvar C, Al-Abid M, Al-Shoaily K, Al-Amry M, Al-Rawahy F. Compositional and functional characteristics of dates,

- syrups, and their by-products. *Food Chem.* 2007;104(3):943-7.
34. Assirey EAR. Nutritional composition of fruit of 10 date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars grown in Saudi Arabia. *J Taibah Univ Sci.* 2015;9(1):75-9.
35. Mohamed Lemine FM, Mohamed Ahmed MVO, Ben Mohamed Maoulainine L, Bouna Z el AO, Samb A, Ali AOMS. Antioxidant activity of various Mauritanian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits at two edible ripening stages. *Food Sci Nutr.* 2014;2(6):700-5.
36. Djaoudene, O, López, V, Cácedas, G, Les, F, Schisano, C, Bey, M. B, & Tenore, G. C. (2019). *Phoenix dactylifera* L. seeds: A by-product as a source of bioactive compounds with antioxidant and enzyme inhibitory properties. *Food & function*, 10(8), 4953-4965.)
37. Ali SEM & Abdelaziz DHA. The protective effect of date seeds on nephrotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2014;26(2), 62-68.
38. Chaira N, Smaali MI, Martinez-Tomé M, Mrabet A, Murcia MA, Ferchichi A. Simple phenolic composition, flavonoid contents and antioxidant capacities in water-methanol extracts of Tunisian common date cultivars (*Phoenixdactylifera* L.). *Int J Food Sci Nutr.* 2009;60:316-29.
39. Al-Farsi M, Alasalvar C, Morris A, Baron M, Shahidi F. Comparison of antioxidant activity, anthocyanins, carotenoids, and phenolics of three native fresh and sun-dried date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties grown in Oman. *J Agric Food Chem.* 2005;53(19):7592-9.
40. Oni SO, Ladokun AMAOA, Oyedele OMIOM. Nutritional and Phytochemical Profile of Niger Cultivated Date Palm (*Phoenix Dactilyfera* L.). *J Food Nutr Sci.* 2015;3(3):114.
41. Mrabet A, Jiménez-Araujo A, Fernández-Bolaños J, Rubio-Senent F, Lama-Muñoz A, Sindic M, et al. Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments. *Food Chem.* 2016;196:917-24.
42. Mansouri A, Embarek G, Kokkalou E, Kefalas P. Phenolic profile and antioxidant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*). *Food Chem.* 2005;89(3):411-20.
43. Chang SK, Alasalvar C, Shahidi F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. *J Funct Foods* [Internet]. 2016;21:113-32.
44. Saryono MDW & Rahmawati E. Effects of dates fruit (*Phoenix dactylifera* L.) in the female reproductive process. *International J of Recent Advances in Multidisciplinary Res.* 2016;3(7), 1630-1633.
45. Dogan, Y. and I. Ugulu. Medicinal plants used for gastrointestinal orders in some districts of Izmir Province, Turkey. *Stud. Ethno-Med.* 2013;7: 149-162.
46. Nadeem M, Qureshi TM, Ugulu I, Riaz MN, An QU, Khan ZI, & Dogan Y. Mineral, vitamin and phenolic contents and sugar profiles of some prominent date palm (*Phoenix dactylifera*) varieties of Pakistan. *Pak J Bot.* 2019;51(1), 171-178.
47. Matloob MH, Balakit AAAA-H. Phenolic Content of Various Date Palms Fruits and Vinegars From Iraq. *Int J Chem Sci.* 2016;14(4):1893-906.
48. Echegaray N, Pateiro M, Gullón B, Amarowicz R, Misahrainabgwí JM, Lorenzo JM. *Phoenix dactylifera* products in human health - A review. *Trends Food Sci Technol.* 2020;105(July): 238-50.
49. Gruca M, Blach-Overgaard A, Balslev H. African palm ethno-medicine. *J Ethnopharmacol.* 2015;165:227-37.
50. Qadir A, Shakeel F, Ali A, Faiyazuddin M. Phytotherapeutic potential and pharmaceutical impact of *Phoenix dactylifera* (date palm): current research and future prospects. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2020;57(4):1191-204.
51. Shahdadi F, Mirzaei HO, Daraei Garmakhany A. Study of phenolic compound and antioxidant activity of date fruit as a function of ripening stages and drying process. *J Food*

- Sci Technol. 2015;52(3):1814–9.
52. Vayalil PK. Antioxidant and antimutagenic properties of aqueous extract of date fruit (*Phoenix dactylifera* L. Arecaceae). J Agric Food Chem. 2002;50(3):610–7.
 53. González-Aguilar G, Robles-Sánchez RM, Martínez-Téllez MA, Olivas GI, Alvarez-Parrilla E, De La Rosa LA. Bioactive compounds in fruits: Health benefits and effect of storage conditions. Stewart Postharvest Rev. 2008;4(3).
 54. Nehdi IA, Sbihi HM, Tan CP, Rashid U & Al-Resayes SI. Chemical composition of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seed oil from six Saudi Arabian cultivars. Journal of food science. 2018;83(3), 624-630.
 55. Nehdi I, Omri S, Khalil MI, Al-Resayes SI. Characteristics and chemical composition of date palm (*Phoenix canariensis*) seeds and seed oil. Ind Crops Prod [Internet]. 2010;32(3):360–5.
 56. Marinova E, Toneva A, Yanishlieva N. Synergistic antioxidant effect of α -tocopherol and myricetin on the autoxidation of triacylglycerols of sunflower oil. Food Chem. 2008;106(2):628–33.
 57. Al-Shwyeh HA. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit as potential antioxidant and antimicrobial agents. Journal of pharmacy & bioallied sciences. 2019;11(1), 1.
 58. Amira EA, Behija SE, Beligh M, Lamia L, Manel I, Mohamed H, et al. Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. J Agric Food Chem. 2012;60(44):10896–902.
 59. Haider MS, Khan IA, Jaskani MJ, Naqvi SA, Mateen S, Shahzad U, et al. Pomological and biochemical profiling of date fruits (*Phoenix dactylifera* L.) during different fruit maturation phases. Pakistan J Bot. 2018;50(3):1069–76.
 60. Mohamed D, Al-Okabi S. In vivo evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of different extracts of date fruits in adjuvant arthritis. Pol J Food Nutr Sci [Internet]. 2004;13(4):397–402.
 61. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. J Agric Food Chem. 2001;49(10):4619–26.
 62. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutr Res. 2003;23(12):1719–26.
 63. Javed A, Annu K, Khan MN, Medam SK. Evaluation of the combinational antimicrobial effect of *Annona squamosa* and *Phoenix dactylifera* seeds methanolic extract on standard microbial strains. Int Res J Biol Sci. 2013;2(5):68–73.
 64. Najat A. Bokhari. In vitro inhibition potential of *Phoenix dactylifera* L. extracts on the growth of pathogenic fungi. J Med Plants Res. 2012;6(6):1083–8.
 65. Jassim SAA, Naji MA. In vitro evaluation of the antiviral activity of an extract of date palm (phoenix dactylifera l.) pits on a pseudomonas phage. Evidence-based Complement Altern Med. 2010;7(1):57–62.
 66. Belmir S, Boucherit K, Boucherit-Otmani Z, Belhachemi MH. Effect of aqueous extract of date palm fruit (*Phoenix dactylifera* L.) on therapeutic index of amphotericin B. Phytotherapie. 2016;14(2):97–101.
 67. Bouhlali E dine T, Bammou M, Sellam K, Benlyas M, Alem C, Filali-Zegzouti Y. Evaluation of antioxidant, antihemolytic and antibacterial potential of six Moroccan date fruit (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. J King Saud Univ - Sci. 2016;28(2):136–42.
 68. Zhang C-R, Aldosari SA, Vidyasagar PSP V, Nair KM, Nair MG. Antioxidant and Anti-inflammatory Assays Confirm Bioactive Compounds in Ajwa Date Fruit. J Agric Food Chem. 2013;61(24):5834–40.
 69. Vayalil PK. Date fruits (phoenix dactylifera Linn): An emerging medicinal food. Crit Rev Food Sci Nutr. 2012;52(3):249–71.
 70. Eid N, Enani S, Walton G, Corona G, Costabile A, Gibson G, & Spencer JP. The impact of date palm fruits and their component polyphenols, on gut microbial ecology,

- bacterial metabolites and colon cancer cell proliferation. Journal of nutritional science. 2014;3.
71. Zhang CR, Aldosari SA, Vidyasagar PSPV, Shukla P, Nair MG. Health-benefits of date fruits produced in Saudi Arabia based on in vitro antioxidant, anti-inflammatory and human tumor cell proliferation inhibitory assays. J Saudi Soc Agric Sci [Internet]. 2017;16(3):287–93.
 72. Mia MAT, Mosaib MG, Khalil MI, Islam MA, Gan SH. Potentials and safety of date palm fruit against diabetes: A critical review. Foods. 2020;9(11):1–21.
 73. Al-Yahya M, Raish M, AlSaid MS, Ahmad A, Mothana RA, Al-Sohaibani M, et al. ‘Ajwa’ dates (*Phoenix dactylifera* L.) extract ameliorates isoproterenol-induced cardiomyopathy through downregulation of oxidative, inflammatory and apoptotic molecules in rodent model. Phytomedicine. 2016;23(11):1240–8.
 74. Gad A, Kholif A, Sayed A. Evaluation of the Nutritional Value of Functional Yogurt Resulting from Combination Date Palm Syrup and Skim Milk. Am J Food Technol. 2010;5(4):250–9.
 75. Ekwe CC NE, RU A. Effect of Substitution of Sucrose with Date Palm (*Phoenix dactylifera*)Fruit on Quality of Bread. J Food Process Technol. 2015;06(09).
 76. Ambigaipalan P, Shahidi F. Date seed flour and hydrolysates affect physicochemical properties of muffin. Food Biosci. 2015;12:54–60.
 77. Mrabet A, Rodríguez-Gutiérrez G, Guillén-Bejarano R, Rodríguez-Arcos R, Ferchichi A, Sindic M, et al. Valorization of Tunisian secondary date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments: New fiber concentrates with antioxidant properties. LWT - Food Sci Technol. 2015;60(1):518–24.
 78. Aljaloud S, Colleran HL, Ibrahim SA. Nutritional Value of Date Fruits and Potential Use in Nutritional Bars for Athletes. Food Nutr Sci. 2020;11(06):463–80.
 79. Ibrahim SA, Fidan H, Aljaloud SO, Stankov S, Ivanov G. Application of date (*Phoenix dactylifera* L.) fruit in the composition of a novel snack bar. Foods. 2021;10(5):1–11.
 80. Cesia A, Judiono. Formulasi Es Krim Sari Kurma. J Ris Kesehat Poltekkes Depkes Bandung. 2018;10(1):25–32.
 81. Fitriyana NI. Potensi Bioaktivitas Pangan Fungsional dari Edamame (*Glycine max* L.) dan Kurma (*Phoenix dactylifera* L.) untuk Peningkatan Kualitas Asupan Gizi Kelompok Rawan Pangan 1000 HPK (Ibu Hamil, Ibu Menyusui, Anak dibawah 2 Tahun) di Wilayah Lingkar Kampus Universitas Jember. 2014.
 82. Biesalski HK. Hidden hunger. 2013. In Hidden hunger (pp. 25–50). Springer: Berlin, Heidelberg.
 83. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <<https://tropicos.org>>
 84. The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/>