



VOLUME 11

NOMOR 1

EDISI MARET 2025

ISSN: 2356 4814



UNMAS DENPASAR

DAFTAR ISI

ORIGINAL ARTICLES

The Nature of Opioids Used as Pain Management in A Public Hospital in Bali

Desak Ketut Ernawati, Agata Widadatama

1-5

Carrageenan from Balinese Red Seaweed (*Gracilaria* sp.) as Antibacterial against Eight Pathogenic Bacteria

Maria Malida Vernandes Sasadara, Erna Cahyaningsih, Ni Luh Kade Arman Anita Dewi, Putu Era Sandhi Kusuma Yuda, I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani, Debby Juliadi, Ni Kadek Dila Pratiwi Putri, Ni Kadek Nisa Leoni Putri, I Wayan Agus Darmawan, Ni Kadek Pradnya Yanti

6-13

Factors Associated with Length of Stay of Dengue Hemorrhagic Fever Patients at a Regional General Hospital in Bali

Nyoman Budiarta Siada, Rr Asih Juanita

40-47

Topical Analgesic Activity of 70% Ethanol Extract Gel of Mint Leaves (*Mentha piperita*) on White Mice (*Mus musculus*) with Hot Plate Method

Sirilus Deodatus Sawu, Wibowo Wibowo, Fransisca Elsia One Irawan

48-57

In-Vitro Cholesterol Reduction Using Three Dosages of Chitosan from Mangrove Crab Shells (*Scylla serrata*) in Effervescent Granules Suspension

Erna Sri Novyanti, Fateha Rizka Andina, Laura Andrea Subekti, Hilya Nur Imthani

58-66

The Effect of White Turmeric Extract (*Curcuma zedoaria* Rosc.) on Malondialdehyde (MDA) Levels in White Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke

I Made Agus Sunadi Putra, I Putu Tangkas Suwantara, Maria Malida Vernandes Sasadara, Ni Nyoman Wahyu Udayani

67-73

Bioactivities and Molecular Identification from Marine Sediment-Derived Fungi Isolated from Amed and Tulamben Beaches

Ni Made Widya Wulandari, Ni Kadek Dwijayanti, Ni Putu Ananda Eka Putri, I Putu Yogi Astara Putra, Ni Putu Eka Lelliqa, Joko Tri Wibowo, Ida Bagus Nyoman Putra Dwija, Ni Putu Ariantari

74-85

Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from Mangrove (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) Seed Coat and Fruit by DPPH and FRAP Assays

I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani, Ketut Agus Adrianta, Ni Nyoman Wahyu Udayani, Ni Luh Gede Erica Fridayana, Ni Nyoman Yudianti Mendra, Ni Made Dharma Shantini Sueni

86-98

Effectiveness of Brochures in Improving the Knowledge of PKK Mothers in South Danguran on Self-Medication Drug Use and Disposal

Ismah Rahmadhani, Nur Atikah, Dwi Subarti

99-107

REVIEW ARTICLES

Analytical Methods for Revealing the Composition of Fruit Flavor E-Cigarette E-Liquid: A Review

Aghnia Nabila, Mochammad Yuwono, Mochammad Taha Ma'ruf, Shalsa Septia Zulni

14-24

Effectiveness and Side Effects in the Management of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): A Narrative Review

Dwi Arymbhi Sanjaya, Herleeyana Meriyani, Rr. Asih Juanita, Nyoman Budiarta Siada, Lusy Noviani

25-39

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MAHASARASWATI

ORIGINAL ARTICLES

1. [The Nature of Opioids Used as Pain Management in A Public Hospital in Bali](#)
Desak Ketut Ernawati, Agata Widatama
1-5
2. [Carrageenan from Balinese Red Seaweed \(*Gracilaria* sp\). as Antibacterial against Eight Pathogenic Bacteria](#)
Maria Malida Vernandes Sasadara, Erna Cahyaningsih, Ni Luh Kade Arman Anita Dewi, Putu Era Sandhi Kusuma Yuda, I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani, Debby Juliadi, Ni Kadek Dila Pratiwi Putri, Ni Kadek Nisa Leoni Putri, I Wayan Agus Darmawan, Ni Kadek Pradnya Yanti
6-13
3. [Factors Associated with Length of Stay of Dengue Hemorrhagic Fever Patients at a Regional General Hospital in Bali](#)
Nyoman Budiarta Siada, Rr Asih Juanita
40-47
4. [Topical Analgesic Activity of 70% Ethanol Extract Gel of Mint Leaves \(*Mentha piperita*\) on White Mice \(*Mus musculus*\) with Hot Plate Method](#)
Sirilus Deodatus Sawu, Wibowo Wibowo, Fransisca Elsia One Irawan
48-57
5. [In-Vitro Cholesterol Reduction Using Three Dosages of Chitosan from Mangrove Crab Shells \(*Scylla serrata*\) in Effervescent Granules Suspension](#)
Erna Sri Novyanti, Fateha Rizka Andina, Laura Andrea Subekti, Hilya Nur Imtihani
58-66
6. [The Effect of White Turmeric Extract \(*Curcuma zedoaria* Rosc.\) on Malondialdehyde \(MDA\) Levels in White Rats \(*Rattus norvegicus*\) Exposed to Cigarette Smoke](#)
I Made Agus Sunadi Putra, I Putu Tangkas Suwantara, Maria Malida Vernandes Sasadara, Ni Nyoman Wahyu Udayani
67-73
7. [Bioactivities and Molecular Identification from Marine Sediment-Derived Fungi Isolated from Amed and Tulamben Beaches](#)
Ni Made Widya Wulandari, Ni Kadek Dwijayanti, Ni Putu Ananda Eka Putri, I Putu Yogi Astara Putra, Ni Putu Eka Leliqia, Joko Tri Wibowo, Ida Bagus Nyoman Putra Dwija, Ni Putu Ariantari
74-85
8. [Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from Mangrove \(*Xylocarpus granatum* J.Koenig\) Seed Coat and Fruit by DPPH and FRAP Assays](#)
I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani, Ketut Agus Adrianta, Ni Nyoman Wahyu Udayani, Ni Luh Gede Erica Fridayana, Ni Nyoman Yudianti Mendra, Ni Made Dharma Shantini Suena
86-98
9. [Effectiveness of Brochures in Improving the Knowledge of PKK Mothers in South Danguran on Self-Medication Drug Use and Disposal](#)
Ismah Rahmadhani, Nur Atikah, Dwi Subarti
99-107

REVIEW ARTICLES

10. [Analytical Methods for Revealing the Composition of Fruit Flavor E-Cigarette E-Liquid: A Review](#)
Aghnia Nabila, Mochammad Yuwono, Mochammad Taha Ma'ruf, Shalsa Septia Zulni
14-24
11. [Effectiveness and Side Effects in the Management of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis \(MDR-TB\): A Narrative Review](#)
Dwi Arymbhi Sanjaya, Herleeyana Meriyani, Rr. Asih Juanita, Nyoman Budiarta Siada, Lusy Noviani
25-39

The Nature of Opioids Used as Pain Management in A Public Hospital in Bali

Profil Penggunaan Opioid untuk Mengelola Nyeri di Rumah Sakit Negeri di Bali

Desak Ketut Ernawati^{1*}, Agata Widatma²
¹Department of Pharmacology and Therapy, Faculty of Medicine, Universitas Udayana. Jln PB Sudirman Denpasar

²Pharmacy Department RSUD Tabanan Bali, Indonesia. Jln Pahlawan 14 Tabanan

Submitted: 24-10-2024

Reviewed: 28-02-2025

Accepted: 18-03-2025

Keywords: hospital, opioid, pain management.

Kata Kunci: opioid, pengelolaan nyeri, rumah sakit.

Correspondence:

Desak Ketut Ernawati

ketuternawati@unud.ac.id

Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Authors

Abstract

Opioids are the mainstay of pain management, particularly in chronic pain-related and nonrelated cancer. Studies have shown that the number of opioids used globally varies. It was used excessively in some parts, while in others, it was underused. Little study is known on how opioids are used in Indonesia. This study aimed to identify indications of opioids prescribed and types of opioids used, as well as assess the nature of opioid therapy as pain management for chronic and non-related cancer. This retrospective study was conducted in a public hospital in Bali, Indonesia. Data was collected from all inpatients who received opioids in the hospital from 2018 to 2020. Patients' age, gender, as well as opioid information such as types of opioids and used for treatment for cancer or non-cancer patients, were pooled and analyzed descriptively. This study found that fentanyl injection was the most opioid prescribed by anesthesiologists as preoperative medications. Opioids were prescribed mostly for non-cancer patients, and limited opioids were prescribed for cancer patients. Future research is required to evaluate factors that influence opioid prescriptions in hospitals.

Abstrak

Opioids masih merupakan obat yang digunakan untuk mengelola nyeri terutama nyeri kronik baik yang berhubungan maupun tidak dengan kanker. Penelitian telah menunjukkan bahwa jumlah penggunaan Opioid di seluruh dunia berbeda-beda. Di beberapa belahan dunia, Opioids digunakan terlalu banyak, sedangkan di belahan dunia lain digunakan sangat terbatas. Belum banyak penelitian yang pernah dilakukan di Indonesia tentang penggunaan Opioid. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi indikasi peresepan Opioid, jenis Opioid yang digunakan serta rasional penggunaan Opioid untuk mengatasi nyeri baik untuk kanker maupun bukan untuk kanker. Penelitian ini merupakan penelitian retrospektif yang dilakukan di Rumah Sakit Negeri di Bali. Data diambil dari penggunaan Opioid pada pasien rawat inap di rumah sakit dari 2018 sampai 2020. Data yang dikumpulkan antara lain umur, jenis kelamin, jenis Opioid, serta penggunaannya untuk pasien kanker dan tidak. Data dikumpulkan dan dianalisis secara deskriptif. Penelitian ini menemukan bahwa Fentanil Injeksi adalah golongan Opioid yang paling sering diresepkan oleh Dokter Anestesi untuk obat premedikasi operasi. Opioid Sebagian besar diberikan pada pasien non-cancer dan terbatas digunakan pada pasien kanker. Penelitian lebih lanjut dibutuhkan untuk mengevaluasi faktor yang mempengaruhi peresepan Opioid di Rumah Sakit.

How to cite: (citation style AMA 11th Ed.)

Ernawati, DK, Widatama, A. The Nature of Opioids Used as Pain Management in A Public Hospital in Bali. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 1-5, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.10105](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.10105)

INTRODUCTION

Opioids are narcotics drugs that can be used for moderate to severe pain management. This class of drugs is highly regulated across the globe particularly in Indonesia due to high addiction and potentially abuse by certain populations. In the United Kingdom (UK), an observatory study found that over a decade there has been an increase in the use of codeine, tramadol and oxycodone for non-cancer pain.¹ Prescribing factors, patient's age, higher socioeconomic status, fibromyalgia and rheumatoid diseases were contributed to the long-term used of opioids. A narrative review conducted in Indonesia in 2015 showed that opioids were underused to manage pain in cancer patients.²

Some barriers discussed were the complicated regulation on morphine procurement in Indonesia, lack of competency in assessing pain, patient's reluctance to describe their pain, fear of addiction, and lack of competency in prescribing opioids amongst prescribers. The major problem from government regulation was also identified by a study involving medical specialists who treated cancer pain.³ Indriyani *et al.*, also found that lack of training and lack of access to the medicine as barriers to opioids used for cancer pain.³

Opioids has analgetics activities by influencing some receptors particularly mu receptor. ⁴Opioids are classified into three categories based on its potency and affinity to Opioids receptors; Agonist Opioid, Antagonist Opioid and Mixed Agonist -Antagonist Opioid. Strong agonist opioids bound strongly to opioids receptors such as Morphine and Fentanyl. Currently, little is known how opioid is used in Indonesian setting. A study conducted in Banjarbaru found that no morphine tablet was received to the patients and mostly pethidine and fentanyl injections in used in an emergency department, intensive care unit, operation theatre, neurology polyclinic and orthopedy surgery.⁵ This study also indicated the opioids used were minimum due to lack of training and concerns of addictions as well as abuse. To obtain more information on how opioids are used in Indonesia, a medication review from electronics patients' medical records was conducted in a public hospital in Bali.

RESEARCH METHODS

This was a retrospective study on Opioids prescriptions in a mid-tier public hospital in Bali Indonesia. This hospital has electronic medical record systems. Data of patients who received opioids as pain managements both in cancer or non-cancer patients who admitted to the hospitals from January 2018 to June 2020 was included. Incomplete data from the medication records was excluded. Information collected from the medical records were gender, types of Opioids in used, dose, dosage forms, indication, and medical specialists who prescribed the prescriptions. Data was analyzed descriptively to understand the nature of Opioids medication in used in the studied hospital. Ethical approval to this study was granted from Health Research Ethics Committe Faculty of Medicine Udayana University No 1092/UN I4.2.2.VII.14/LT/2022.

RESULT AND DISCUSSIONS

There were 2584 patients' medication records reviewed in the study period. More than 50,4% of the patients were female (1303/2584), and 49.6% were male. This study found that 2420 (93,6%) non cancer patients and only 165 (6,4%) cancer patients received Opioids. **Figure 1** illustrates that the majority of patients (57%) received Fentanyl 100mg and 93,5% of those were for non cancer patients (as seen on **Figure 2**). MST 15 mg tab were the least Opioid prescribed (2%). Interestingly, MST 10mg were prescribed for more than 50% of cancer patients (**Figure 2**). **Figure 3** shows that of the Opioids used in the study hospital, Anaesthesiologist mostly prescribed Fentanyl 100mcg injection (83%) and Morphine 10mg Injection (67%), meanwhile Internists prescribed MST 15mg tab (97%), MST 10mg tab (89%), and Codeine 10mg tab (60%). General practitioners, pulmonary and neurologist prescribed less than 25% of the Opioids prescribed in the study hospital.

This study found that Fentanyl 100 mcg injection was the most prescribed by Anesthesiologists in the study hospital. Fentanyl can used as preoperative anesthesia and analgesia.^{6, 7} However, unexpected adverse reactions of Fentanyl used has been claimed to improve the risk of death due to high potency and rapid onset. Its high potency may be related to Fentanyl's affinity similar to that of Morphine.⁷ In preoperative patients, Fentanyl is used as an adjuvant in the anesthesia process. Cherng examined the onset of epidural anesthesia using pure ropivacaine compared with a combination of ropivacaine plus 100 µg fentanyl adjuvant.⁸ They found that the onset of sensory block in patients with epidural ropivacaine plus Fentanyl is much faster than without Fentanyl. Currently, fentanyl is a drug that is very often used by anesthetists because of the effects of Fentanyl which can be used as an anesthetic drug in pre-operative patients.⁶ It was also found in this study that 83% of fentanyl use was administered by anesthesiology specialists (**Figure 1**) and 93,5% was used in patients without cancer (**Figure 2**). Fentanyl has 50 to 100 times potency than Morphine.⁷ Their used in pain management particularly for cancer patients only for patients who shown tolerance to Opiates. Findings to this study showed that Fentanyl was not used for cancer patients in the study hospital.

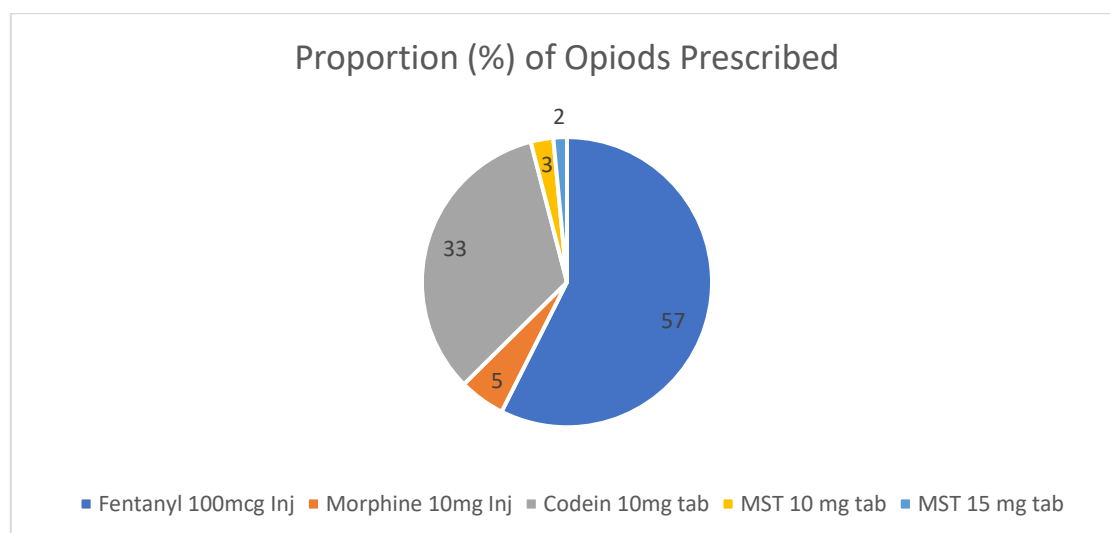


Figure 1. The Proportion of Opioids Prescribed

Codeine was the second most Opioids prescribed in the study hospital but not used in cancer patients. It was found that 33% patients used Codeine 10 mg tablet prescribed by the Internal medicine specialists, general practitioners and pulmonologist. Codeine has a sedative effect which helps reduce the pain sensation. The drug may also combine with Acetaminophen or Aspirin for more effective pain relief. Codeine is useful in the treatment of various disease that produce chronic cough by decreasing the cough frequency and severity in these patients.⁹ This study identified Internists prescribed more than 50% of MST 10mg tablet and almost 30% of MST 15mg tablet for cancer patients. The National Formulary in 2019 stated that Morphine tablet may be given for pain management in cancer patients.¹⁰ This may indicate that only Morphine tablet were available for cancer patients in the study hospital. A review article on breakthrough cancer pain found that rapid onset of opioids was more effective than sustained released tablet.¹¹ In the study hospital, morphine sustained released tablets were prescribed to the cancer patients not the fast rapid onset tablet. This may indicate that patients in the study hospital may suffer more. Additionally, patients with cancer may require palliative care which entails pain managements. A national census on drug availability in Indonesia in 2024 found that access medicine for palliative care was not available in the country.¹² Fanda et al., urged that this required attention particularly in rural area and Eastern Indonesia where access to essential medicine is limited.¹²

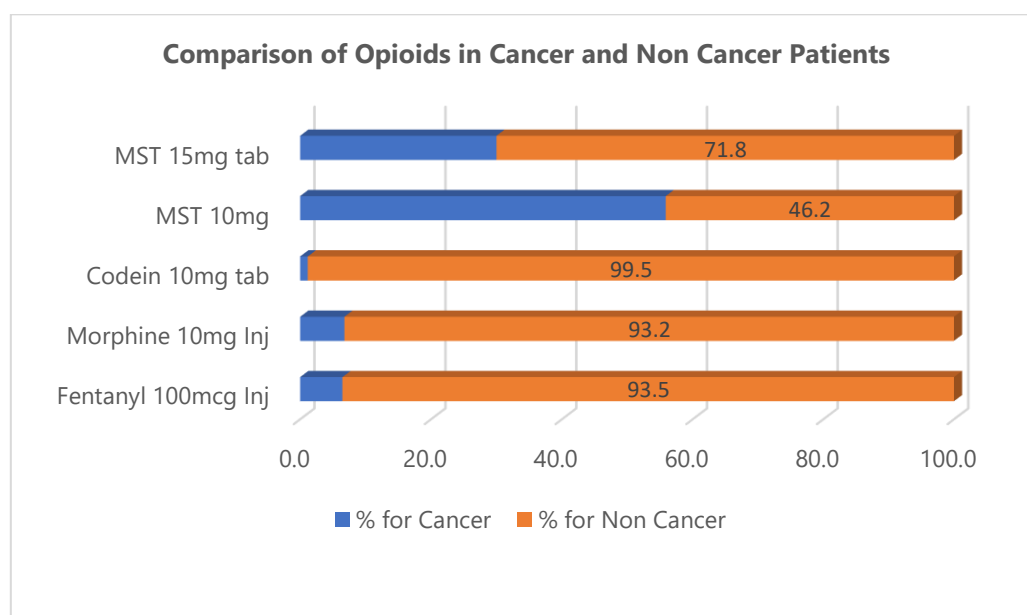


Figure 2. Comparison of Opioids Prescribed for Cancer and Non Cancer Patients

The results of the study showed the majority of Opioids prescribed for non-cancer compared to cancer patients. In malignancy, pain caused by activation of nociceptors is called nociceptive pain; while pain caused by disorders of the nervous system is called neuropathic pain. Nociceptive pain occurs due to potential tissue damage which can be caused by direct pressure on the tumor, trauma, inflammation, or infiltration of healthy tissue and can be in the form of somatic or visceral pain. The used of Opioid for nociceptive pain needs to consider the patients' clinical utility in cancer patients particularly impacting on their immune systems and quality of life.¹³ A recent systematic review and network meta analysis suggested to propose Metadone as the first line for cancer pain management although they warranted for further research is required to confirm their recommendation.¹⁴

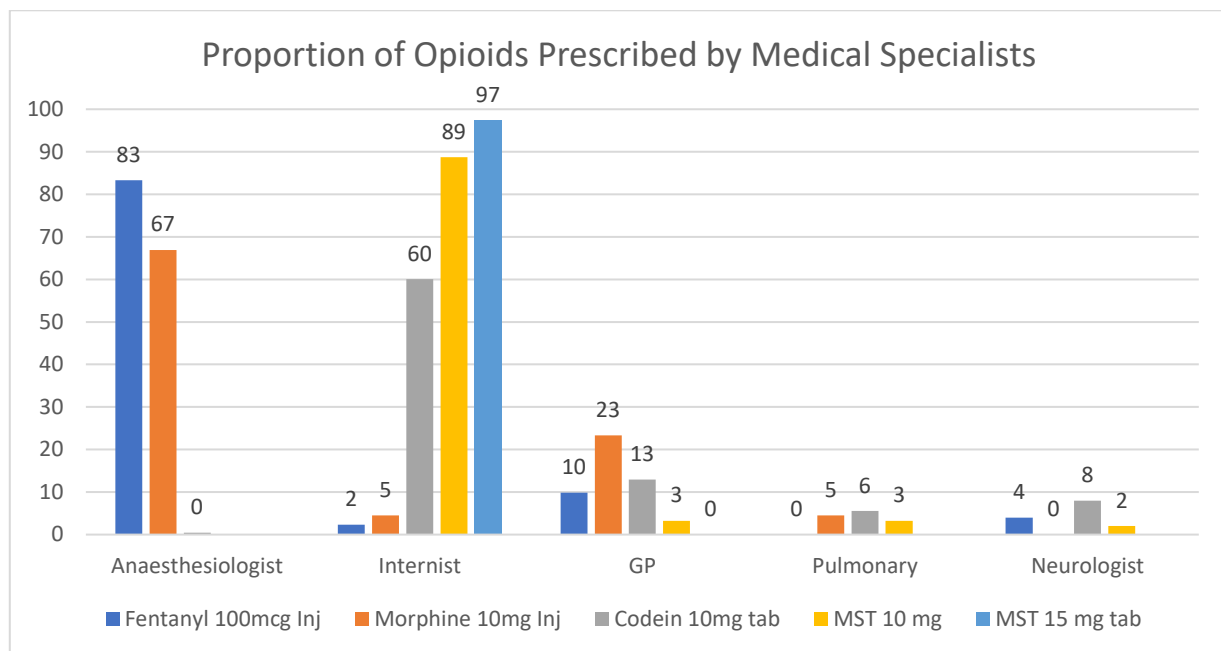


Figure 3. Types of Opioids Prescribed by Medical Specialists

In general, pain management includes pharmacological and non-pharmacological therapy. The World Health Organization (WHO) has provided a stepladder guidelines for pharmacological therapy for pain.¹⁵ For mild pain, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and paracetamol are used. If the pain is not resolved, weak opioids can be given, such as tramadol and NSAIDs. If the pain remains unresolved, then giving an opioid such as morphine should be considered. This study identified that fewer opioids were given to cancer patients compared to non-cancer patients. This result was similar to that of Chenaf et al. findings.¹⁶ They found that the most Opioids were given to non-cancer pain than cancer pain. This may be due to the WHO principle of using anti-pain medication, where only patients whose pain is not resolved with tramadol or NSAIDs are given opioids. However, this cannot be fully concluded because there is no information regarding the severity of pain experienced by patients, especially patients with cancer in the current study due to the nature of retrospective study.

CONCLUSION

This study found that Anaesthesiologist mostly prescribed Opioids Fentanyl 10 mcg as pre-operative medication and Internists prescribed Morphine tablets for cancer patients. The majority of Opioids were given to non-cancer patients compared to cancer patients. It is hoped that the results of this study will provide opportunities for further research into the factors that influence the use of opioid drugs in hospital patients.

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

REFERENCES

1. Jani M, Yimer BB, Sheppard T, Lunt M, Dixon WG. Time trends and prescribing patterns of opioid drugs in UK primary care patients with non-cancer pain: A retrospective cohort study. *PLoS Med*. 2020;17(10):1-16. doi:10.1371/journal.pmed.1003270
2. Setiabudy R, Irawan C, Sudoyo AW. Opioid Use in Cancer Pain Management in Indonesia: a Call For Attention. *Acta Med Indones*. 2015;47(3):244-250.
3. Indrayani L, Setiabudi R, Soetikno V, IRAWAN C. Survei Pengetahuan Dokter Spesialis terhadap Penggunaan Opiat pada Tatalaksana Nyeri Kanker di Rumah Sakit Pemerintah, Jakarta, 2017. *Indonesian Journal of Cancer*. 2018;11(4):159. doi:10.33371/ijoc.v11i4.534
4. Daniel A. Queremel Milani, Donald D. Davis. *Pain Management Medications*. [Updated 2023 Jul 3] In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2025. Accessed March 18, 2025. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560692/?report=reader#_NBK560692_pubdet_
5. Waty A, Suryawati S, Rustamaji. *Penggunaan Analgetika Opioid di Rumah Sakit Umum Daerah Banjarbaru*. Gajah Mada; 2015.
6. MIMS Drugs. *Fentanyl*. 2025th ed.; 2025. Accessed March 18, 2025. <https://www.mims.com/indonesia/drug/info/fentanyl?mtype=generic#>
7. Ramos-Matos CF, Bistas KG, Lopez-Ojeda W. *Fentanyl*. [Updated 2023 May 29]. In: *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing; 2025.
8. Chong CH, Yang CP, Wong CS. Epidural fentanyl speeds the onset of sensory and motor blocks during epidural ropivacaine anesthesia. *Anesth Analg*. 2005;101(6):1834-1837. doi:10.1213/01.ANE.0000184131.06529.35
9. MIMS Online. *Codikaf*. (MIMS Drugs, ed.); 2025. Accessed March 14, 2025. <https://www.mims.com/indonesia/drug/info/codikaf>
10. Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor HK 01.07/MENKES/813/2019. *Formularium Nasional*. Published online 2019.
11. Eko Nugroho T, Adi Wicaksono S. *Breakthrough Cancer Pain: The Current Pharmacological Management*. Vol 14.; 2022.
12. Fanda RB, Probandari A, Yuniar Y, Hendarwan H, Trisnantoro L, Jongeneel N, Kok MO. The availability of essential medicines in primary health centres in Indonesia: achievements and challenges across the archipelago. *The Lancet Regional Health - Southeast Asia*. 2024;22. doi:10.1016/j.lansea.2023.100345
13. Abdel Shaheed C, Hayes C, Maher CG, Ballantyne JC, Underwood M, McLachlan AJ, Martin JH, Narayan SW, Sidhom MA. Opioid analgesics for nociceptive cancer pain: A comprehensive review. *CA Cancer J Clin*. 2024;74(3):286-313. doi:10.3322/caac.21823
14. Imkamp MSV, Theunissen M, Viechtbauer W, van Kuijk SMJ, van den Beuken – van Everdingen MHJ. Shifting Views on Cancer Pain Management: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Pain Symptom Manage*. 2024;68(3):223-236. doi:10.1016/j.jpainsymman.2024.05.022
15. World Health Organization. *WHO Guidelines for the Pharmacological and Radiotherapeutic Management of Cancer Pain in Adults and Adolescents*; 2018.
16. Chenaf C, Kaboré J-L., Delorme J, Pereira B, Mulliez A, Zenut M, Delage N, Ardid D, Eschalier A, Authier N. Prescription opioid analgesic use in France: Trends and impact on morbidity–mortality. *European Journal of Pain*. 2019;23(1):124-134. doi:10.1002/ejp.1291

Carrageenan from Balinese Red Seaweed (*Gracilaria* sp). as Antibacterial against Eight Pathogenic Bacteria

Karagenan Rumput Laut Merah Bali (*Gracilaria* sp.) sebagai Antibakteri terhadap Delapan Bakteri Patogen

Maria Malida Vernandes Sasadara^{1*}, Erna Cahyaningsih¹, Ni Luh Kade Arman Anita Dewi¹, Putu Era Sandhi Kusuma Yuda¹, I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani¹, Debby Juliadi¹, Ni Kadek Dila Pratiwi Putri¹, Ni Kadek Nisa Leoni Putri¹, I Wayan Agus Darmawan¹, Ni Kadek Pradnya Yanti¹

¹Faculty of Pharmacy,
Universitas Mahasarakwati
Denpasar, Jln. Kamboja, No.
11 A, Denpasar, 80233, Bali,
Indonesia

Submitted: 15-12-2024

Reviewed: 22-01-2025

Accepted: 15-03-2025

Keywords: agar well
diffusion, bacteria,
carrageenan, macroalgae,
sulfated polysaccharide,

Kata Kunci: bakteri, difusi
agar sumuran, karagenan,
polisakarida tersulfasi,
rumput laut

Correspondence:

Maria Malida Vernandes
Sasadara

mariasasadara@unmas.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Authors

Abstract

The increase in infection cases every year, coupled with the rise in resistance cases, increases the urgency of exploring antimicrobial agents. *Gracilaria* sp. is a red seaweed that is widely known as one of the potential producers of active metabolites sulfated polysaccharides. Carrageenan is one form of sulfated polysaccharide that has antimicrobial activity. This study was conducted to evaluate the antibacterial activity of carrageenan derived from *Gracilaria* sp. against several pathogenic bacteria, including *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Salmonella typhi*. Carrageenan was extracted from *Gracilaria* sp. samples obtained from the South Denpasar area (Bali) using KOH. An antibacterial activity assay of carrageenan was carried out using an agar well diffusion method with nutrient agar media. Tests were conducted at concentrations of 1 and 5 mg/mL (*E. coli* and *S. epidermidis*), 20, 30, 40 mg/mL (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, and *S. typhi*), 50, 75, and 100 mg/mL (*P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*). Incubation was carried out for 24 hours at $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Data were analyzed statistically by One-Way ANOVA and Kruskal Wallis with a 95% confidence level. The results showed that carrageenan extracted from *Gracilaria* sp. exhibited significant antibacterial activity against several pathogenic bacteria, especially gram-negative bacteria. The antibacterial activity produced in this study was proportional to the increase in concentration, where the inhibitory activity produced increased as the concentration of carrageenan increased. It can be concluded that carrageenan has the potential to be an antibacterial.

Abstrak

Peningkatan kasus infeksi dan resistensi setiap tahun, meningkatkan urgensi untuk mengeksplorasi agen antimikroba. *Gracilaria* sp. merupakan rumput laut merah yang dikenal secara luas sebagai salah satu penghasil metabolit aktif potensial yaitu polisakarida tersulfasi. Karagenan merupakan salah satu bentuk sulfated polisakarida yang memiliki aktivitas antimikroba. Penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri karagenan dari *Gracilaria* sp. terhadap beberapa bakteri patogen yaitu *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Salmonella typhi*. Karagenan diekstraksi dari sampel *Gracilaria* sp. yang diperoleh dari daerah Denpasar Selatan (Bali) dengan menggunakan KOH. Pengujian aktivitas antibakteri karagenan dilakukan dengan metode difusi agar sumuran dengan media nutrisi agar. Pengujian dilakukan pada konsentrasi 1 dan 5 mg/mL (*E. coli* dan *S. epidermidis*), 20, 30, 40 mg/mL (*S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, dan *S. typhi*), 50, 75, dan 100 mg/mL (*P. aeruginosa* dan *K. pneumoniae*). Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu $\pm 37^{\circ}\text{C}$. Data dianalisis secara statistik dengan One-Way ANOVA dan Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian menunjukkan karagenan yang diekstrak dari *Gracilaria* sp. menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap beberapa bakteri patogen, terutama bakteri gram negatif. Aktivitas antibakteri yang dihasilkan pada penelitian ini sebanding dengan peningkatan konsentrasi, dimana aktivitas penghambatan yang dihasilkan semakin meningkat dengan meningkatnya konsentrasi karagenan. Dapat disimpulkan bahwa karagenan memiliki potensi sebagai antibakteria.

How to cite: (citation style AMA 11th Ed.)

Sasadara, MMV, Cahyaningsih, E, Dewi, NLKAA, Yuda, PESK, Wardani, IGAAG, Juliadi, D, Putri, NKDP, Putri, NKNL, Darmawan, IWA, Yanti, NKP. Carrageenan from Balinese Red Seaweed (*Gracilaria* sp). as Antibacterial against Eight Pathogenic Bacteria. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 6-13, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.10349](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.10349)

INTRODUCTION

Infectious diseases are one of the significant public health problems in developed and developing countries. The World Heart Organization (WHO) states that in 2017, as many as 15% of deaths of children

under 5 years old were caused by infectious diseases.¹ Infection management is carried out through the administration of antibacterials. Antibacterials are substances that can inhibit or kill the growth of microorganisms. Antibacterials can also be classified based on the effect given, whether antibacterials can kill the growth of bacterial cells or antibacterials can only inhibit the growth of bacterial cells.²

The use of antibacterials or antibiotics often causes several problems, one of which is resistance. Resistance occurs when the effectiveness of drugs to prevent or treat infections decreases. Bacterial resistance to antibiotics increases the urgency of finding new antibiotics. Natural materials are sources that are widely explored for various biological activities, including antibacterials. One of the natural materials explored is the seaweed plant. Seaweed is one of the seafood commodities that has an essential role in Indonesia because it has extensive advantages, such as being used for food ingredients, the pharmaceutical industry, the cosmetic industry, the textile industry, medicines, and others, and has been marketed both domestically and abroad.³

Seaweeds have various pharmacological activities derived from primary or secondary metabolites. One of the primary metabolites of seaweed is carrageenan. Carrageenan is a natural polysaccharide derived from red algae with a structure characterized by long linear chains of D-galactose and D-anhydrogalactose with anionic sulfate groups, contributing to its bioactivity, including antibacterial effects.⁴ The antimicrobial activity of carrageenan has been attributed to its ability to interact with bacterial cell membranes, leading to cell lysis and growth inhibition.^{5,6} Several studies demonstrated the antibacterial activity of carrageenan against several pathogens, such as *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.⁷⁻⁹

Regarding the background of Bulung Sangu (*Gracilaria* sp.), it is thought that carrageenan derived from *Gracilaria* sp.) also has antibacterial activity against several pathogenic bacteria. This study was conducted to evaluate the antibacterial activity of carrageenan derived from Bulung Sangu (*Gracilaria* sp.) against several pathogenic bacteria, including *E. coli*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Salmonella typhi*.

MATERIAL AND METHOD

Research Materials and Instruments

Instruments Autoclave, McFarland reader.

Materials Samples of red seaweed (*Gracilaria* sp.) obtained from the waters of Serangan (South Denpasar, Bali) nutrient agar (Merck), bacterial culture obtained from the Kerthi Bali Sadhajiwa Health Laboratory Center of Bali Province, sterile distilled water, chloramphenicol antibiotic (Merck), Mg powder, acidified ethanol, amyl alcohol, HCl 2N, Dragendorff reagent, Mayer reagent, FeCl₃ 1%, NaOH 1N.

Research Procedures

1. Carrageenan extraction

Fresh seaweed samples were cleaned of impurities and washed thoroughly under running water several times to reduce salt content. The seaweed samples were then processed into simplicia. Fifteen grams of simplicia was heated with KOH 6% at 60°C for 60 minutes in a beaker glass covered with aluminum foil. The ratio of sample and solvent was kept at 1:30. After heating, the seaweed was washed with running water until it reached pH 7-8. pH was tested on the seaweed using a universal pH. Seaweed with pH 7-8 was again heated with the same heating process. After heating, the solvent was mixed in cold 96% ethanol at as much as 3x the heating solvent's volume, stirred continuously until carrageenan fibers were formed, then allowed to stand for 30 minutes. The carrageenan fibers formed were taken out, aerated, and then oven-dried at 60°C until a constant weight was obtained. The carrageenan obtained was blended and sieved into a homogeneous fine powder. The carrageenan samples were used for secondary metabolite identification testing by tube reaction to confirm the absence of secondary metabolites (flavonoid, alkaloid, saponin, tannin, quinone) in the samples.

2. Antibacterial assay

An antibacterial assay of carrageenan was carried out using the agar well diffusion method with nutrient agar media. The negative control was sterile distilled water, and the positive control was chloramphenicol 15 µg. Bacterial suspension was used at Mc. Farland turbidity 0.5 equivalent to 1.5×10^8 (Colony Forming Unit) CFU/mL. The carrageenan powder was dissolved in distilled water to obtain concentrations of 1 and 5 mg/mL (for *E. coli* and *S. epidermidis* antibacterial assay), 20, 30, 40 mg/ml (for *S. aureus*, *S. pyrogenes*, *E. faecalis*, and *S. typhi*) 50, 75, and 100 mg/mL (for *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*). Incubation was carried out for 24 hours at $\pm 37^\circ\text{C}$. The assay was done in triplicate.

Data Analysis

Measurement of the inhibition zone was carried out with a caliper after the incubation process and calculated with the following calculation:

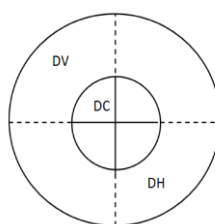


Figure 1. Measurement of the inhibition zone

$$\text{Inhibition zone} = \frac{(Dv - Ds) + (Dh - Ds)}{2} \dots\dots\dots (1).$$

Dv: vertical diameter

Dh: horizontal diameter

Dc: agar well diameter (5 mm)

The diameter of the inhibition zone obtained was classified according to the following table.

Table 1. Inhibition zone classification

Zone diameter (mm)	Inhibition
>20	Very strong
10-20	Strong
5-10	Moderate
<5	Weak

The diameter of the inhibition zone (mm) obtained was compared statistically using SPSS (IBM Statistics version 25) with One-Way ANOVA followed by Bonferroni Post-Hoc Test and Kruskal Wallis followed by Mann Whitney at 95% confidence level by excluding the value of the negative control.

RESULT AND DISCUSSION

The development of antibacterial agents from marine products has attracted significant interest due to the unique biodiversity of the marine ecosystem, which serves as a rich source of bioactive compounds. Marine organisms, including bacteria, fungi, and macroalgae, have been shown to produce a variety of antimicrobial substances that exhibit potent antibacterial activity against various pathogens, including those resistant to conventional antibiotics.

In this study, the antibacterial activity of one marine product, carrageenan, obtained from one of the red algae in Bali, *Gracilaria* sp. This seaweed is known by the regional name Bulung Sangu and is currently widely used in the production of polysaccharide products and daily consumption.¹⁰ The results of the antibacterial

activity assay of carrageenan against several pathogenic bacteria are shown in **Table 2**. In this study, identifying secondary metabolites in carrageenan showed negative results in all metabolites tested. Carrageenan is a form of polysaccharide, a primary metabolite, so secondary metabolite testing shows negative results. These test results indicate that no secondary metabolites are also extracted, which can affect the results of this study.

Table 2. Inhibition zone (mm) of carrageenan

Bacteria	Concentration			Negative Control	Positive Control
	50 mg/mL	75 mg/mL	100 mg/mL		
<i>P. aeruginosa</i>	18.33 ± 3.21 ^a (VS)	23.66 ± 1.15 ^{ab} (VS)	24.00 ± 2.65 ^{ab} (VS)	0.00 ± 0.00	28.66 ± 1.53 ^b (VS)
<i>K. pneumoniae</i>	28.33 ± 2.52 ^a (VS)	33.33 ± 4.16 ^{ab} (VS)	32.67 ± 1.53 ^{ab} (VS)	0.00 ± 0.00	36.33 ± 1.15 ^b (VS)
	1 mg/mL	5 mg/mL			
<i>E. coli</i>	18.00 ± 1.15 ^a (S)	33.00 ± 1.00 ^b (VS)		0.00 ± 0.00	23.00 ± 2.52 ^c (VS)
<i>S. epidermidis</i>	17.50 ± 1.80 ^a (S)	30.30 ± 1.20 ^b (VS)		0.00 ± 0.00	27.00 ± 1.30 ^b (VS)
	20 mg/mL	30 mg/mL	40 mg/mL		
<i>S. aureus</i>	19.02 ± 2.62 ^a (S)	24.72 ± 1.31 ^b (VS)	22.53 ± 4.01 ^b (VS)	0.00 ± 0.00	13.50 ± 0.61 ^a (S)
<i>S. pyogenes</i>	11.08 ± 0.28 ^a (S)	17.10 ± 0.52 ^b (S)	18.35 ± 0.82 ^b (S)	0.00 ± 0.00	10.25 ± 0.05 ^c (S)
<i>E. faecalis</i>	12.08 ± 4.80 ^a (S)	11.70 ± 5.90 ^a (S)	17.80 ± 2.80 ^a (S)	0.00 ± 0.00	5.20 ± 0.60 ^b (M)
<i>S. typhi</i>	11.10 ± 0.81 ^a (S)	16.98 ± 1.28 ^a (S)	17.05 ± 3.50 ^a (S)	0.00 ± 0.00	11.91 ± 1.78 ^a (S)

Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Letters in superscript following the inhibition zone diameter values indicate statistical results where different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between concentrations in the same group of bacteria. Letters behind the values indicate the classification of antibacterial activity (VS (very strong), S (strong), M (moderate), W (weak)).

The data revealed that carrageenan from Balinese red seaweed (*Gracilaria* sp.) showed significant potential against several pathogenic bacteria. The diameter of the inhibition zone varied depending on the concentration of carrageenan and the type of bacteria tested (**Figure 2**). Antibacterial activity classified as very strong, based on the classification in **Table 1**, was observed at high concentrations against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*, with inhibition zone diameters reaching 24.00 mm and 32.67 mm at 100 mg/mL concentration, respectively. Similar activity was also observed against *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria at a 5 mg/mL concentration. However, the activity against bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, and *Salmonella typhi* were classified as strong to moderate at the lower concentration range. In this study, gram-negative bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Enterococcus faecalis*) generally showed higher sensitivity to carrageenan than gram-positive bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhi*). The results of this study are excellent for further development, considering that in some explorations of antibacterial agents, gram-negatives show higher resistance compared to gram-positive bacteria. Gram-negative bacteria have an outer membrane, a formidable barrier against many antibiotics. This outer membrane consists of lipopolysaccharides and phospholipids, which significantly reduce the permeability of these bacteria to various antimicrobial agents, making them inherently more resistant to various classes of antibiotics compared to gram-positive bacteria that do not have such an outer membrane.^{11,12} The peptidoglycan layer in gram-positive bacteria is thicker and more accessible to many antibiotics, such as beta-lactams, which target cell wall synthesis. In contrast, gram-negative bacteria have a thinner peptidoglycan layer but are protected by their outer membrane, which limits the effectiveness of these agents.¹³ This structural barrier is a significant reason why many antibiotics, including vancomycin, are ineffective against gram-negative bacteria.¹⁴

This result also indicates that carrageenan has concentration-dependent antibacterial activity. Antibacterial activity increased as the concentration of carrageenan increased, with the largest inhibition zone diameter at the highest concentration (100 mg/mL). However, the limitation of this study is that the antibacterial activity was not tested at the same concentration, so the activity produced at the same concentration cannot be compared. This study used different concentrations with the concern that there would

be overlapping in the test, disrupting the process of reading the results. Testing through the dilution method is recommended to obtain each pathogenic bacteria's minimum inhibitory concentration (MIC) value.

This activity is thought to be related to the ability of carrageenan to disrupt the bacterial cell membrane through electrostatic interactions between the sulfate groups in carrageenan and the bacterial cell wall, causing cytoplasmic leakage. Carrageenan is a *sulfated polysaccharide*. Sulfated polysaccharides are the most common part of seaweed cell walls.¹⁵ Carrageenan contains primary metabolite compounds such as vitamins, minerals, fiber, alginate, and agar. It is classified into three types based on its structure: kappa, lambda, and iota carrageenan. Carrageenan has the same structure as carbohydrates, where the acid groups contained in carbohydrates will interact electrostatically with the cell membrane which can disrupt the bacterial cell wall so that it leaks into the bacterial cytoplasm.¹⁶

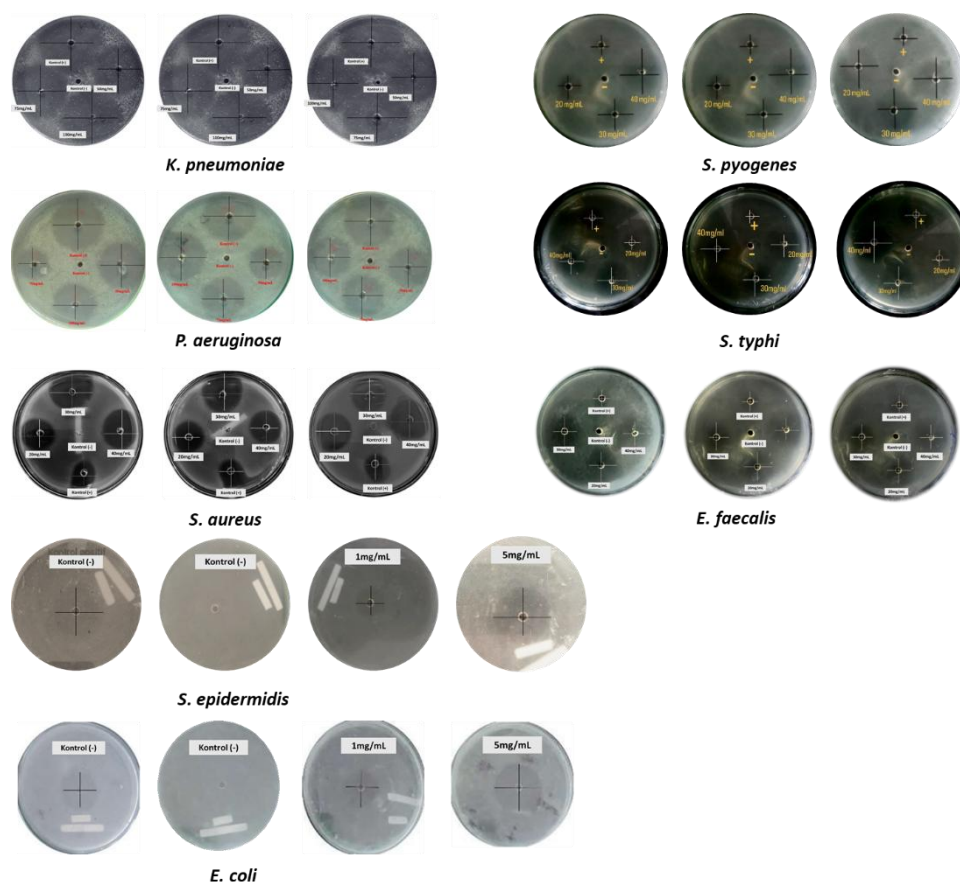


Figure 2. Inhibition of carrageenan against some pathogenic bacteria

The electrostatic interactions between the sulfate groups of carrageenan and the bacterial cell wall are fundamental to its antibacterial activity. Studies have shown that carrageenan can cause cytoplasmic leakage in bacteria, leading to cell lysis.¹⁷ This effect is primarily due to the binding of negatively charged carrageenan to the positively charged components of the bacterial membrane, which disrupts the integrity of the membrane and facilitates the leakage of cytoplasmic contents.^{18,19} The presence of sulfate groups in carrageenan enhances its ability to form complexes with cationic substances, which can further destabilize bacterial membranes.²⁰ Moreover, the structural characteristics of different types of carrageenan, such as kappa (κ), iota (ι), and lambda (λ), influence their antibacterial efficacy. Kappa-carrageenan, for example, has been shown to possess a specific arrangement of sulfate groups that enhances its interaction with bacterial membranes.²¹ The varying degrees of sulfation among these types of carrageenan contribute to their distinct mechanisms of action against bacteria. Kappa-carrageenan is known for its strong gelling properties and its ability to form stable complexes with proteins, which may also play a role in its antibacterial effects.^{22,23}

In addition to direct interactions with bacterial membranes, carrageenan has been observed to modulate immune responses, which can indirectly affect bacterial viability. For example, carrageenan has been shown to influence the production of reactive oxygen species (ROS) in immune cells, which can enhance their bactericidal activity.²⁴ This dual mechanism, which includes the direct disruption of bacterial membranes and modulation of immune responses, highlights the potential of carrageenan as a therapeutic agent against bacterial infections.

Studies have shown that carrageenan can effectively inhibit the growth of both gram-positive and gram-negative bacteria, demonstrating its broad-spectrum antibacterial potential. Research conducted on oligosaccharide carrageenan also found there are various activities, including antitumor, antioxidant, and anticoagulant.^{25–27} Research conducted by Wang et al. (2012) showed that carrageenan has antifungal activity in *Saccharomyces cerevisiae* with a strong category, while antibacterial activity in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria with a weak category, where the concentrations used were 1 mg/mL, 5 mg/mL, and 20 mg/mL. The MIC values for carrageenan against various bacterial strains have been reported, indicating its effectiveness at relatively low concentrations.²⁰ Several studies have also shown that carrageenan can increase a material's antimicrobial activity. Formulating carrageenan as an edible film inhibited *Staphylococcus aureus* sub sp. *aureus* CCM 7110 and *Escherichia coli* CCM 3954.²⁸ Other similar studies showed inhibition of carrageenan edible film against *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, and *P. aeruginosa*.²⁹ The structural characteristics of carrageenan, particularly the arrangement and density of sulfate groups, are crucial for its antibacterial efficacy. Different types of carrageenan, such as kappa (κ), iota (ι), and lambda (λ), exhibit varying degrees of antibacterial activity due to their distinct molecular structures.³⁰ However, this study's limitations include the inability to identify the structure of the carrageenan produced, so the exact mechanism underlying the antibacterial activity cannot be predicted. Research related to this can be carried out as follows to support the results of this study.

CONCLUSION

The results of this study showed that carrageenan extracted from *Gracilaria* sp. exhibited significant antibacterial activity against several pathogenic bacteria, especially gram-negative bacteria. The antibacterial activity produced in this study was proportional to the increase in concentration, where the inhibitory activity produced increased as the concentration of carrageenan increased. The antibacterial activity of carrageenan originates from the electrostatic interaction between the sulfate groups on the carrageenan structure and the bacterial cell wall, which causes membrane damage and cytoplasmic leakage.

ACKNOWLEDGEMENT

Thanks to Universitas Mahasaraswati Denpasar for funding this research (Research Grant K.085/B/01.01/LPPM-Unmas/IV/2023).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Novard MFA, Suharti N, Rasyid R. Gambaran Bakteri Penyebab Infeksi Pada Anak Berdasarkan Jenis Spesimen dan Pola Resistensinya di Laboratorium RSUP Dr. M. Djamil Padang Tahun 2014-2016. *J Kesehat Andalas*. 2019;8(2S):26. doi:10.25077/jka.v8i2s.955
2. Kurama GM, Maarisit W, Karundeng EZ, Potalangi NO. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Benalu Langsung (*Dendrophloe* sp) Terhadap Bakteri *Klebsiella Pneumoniae*. *Biofarmasetikal Trop*. 2020;3(2):27-33. doi:10.55724/j.biofar.trop.v3i2.281
3. Andriani, I Gede Putu Wirawan, Suada IK. Aktivitas In Vitro Anti Jamur Ekstrak Bulung Sangu *Gracilaria* sp . terhadap Jamur Patogen *Fusarium solani* (Mart) Sacc . Cabai Rawit. *J Agroekoteknologi Trop*.

2021;10(2):141-152.

4. Alizadeh K. Development of Composite Sponge Scaffolds Based on Carrageenan (CRG) and Cerium Oxide Nanoparticles (CeO₂ NPs) for Hemostatic Applications. *Biomimetics*. 2023;8(5):409. doi:10.3390/biomimetics8050409
5. Huat LL, Alali NB, Ling RLZ, Feng SS, Teo SS. Analysis of Antimicrobial Activity of Carrageenan Extracted From *Kappaphycus Alvarezii*. *Appl Microbiol Theory & Technol*. Published online 2023:61-72. doi:10.37256/amtt.4120232443
6. Yamashita S, Sugita-Konishi Y, Shimizu M. In Vitro Bacteriostatic Effects on Dietary Polysaccharides. *Food Sci Technol Res*. 2001;7(3):262-264. doi:10.3136/fstr.7.262
7. Azizi S, Mohamad R, Rahim RA, Mohammadinejad R, Ariff A. Hydrogel Beads Bio-Nanocomposite Based on Kappa-Carrageenan and Green Synthesized Silver Nanoparticles for Biomedical Applications. *Int J Biol Macromol*. 2017;104:423-431. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.06.010
8. Pramesti ES, Febriani NA, 'Aisy RN, Salsabila S, Rachmawati VPN, Susilowati E. Synthesis of Silver/K-Caragenan Nanocomposites Assisted With Microwave Irradiation as a Potential Antibacterial Material. *J Phys Conf Ser*. 2022;2190(1):12004. doi:10.1088/1742-6596/2190/1/012004
9. Brychcy E, Malik M, Drozdowski P, Król Z, Jarmoluk A. Physicochemical and antibacterial properties of carrageenan and gelatine hydrosols and hydrogels incorporated with acidic electrolyzed water. *Polymers (Basel)*. 2015;7(12):2638-2649. doi:10.3390/polym7121534
10. Sasadara MMV, Wirawan IGP, Jawi IM, Sritamin M, Dewi NNA, Adi AAAM. Anti-inflammatory Effect of Red Macroalgae *Bulung Sangu* (*Gracilaria* sp.) Extract in UVB-Irradiated Mice. *Pakistan J Biol Sci*. Published online 2020. doi:10.3923/pjbs.2021.80.89
11. Bouymajane A, Filali FR, Majdoub YOE, Ouadik M, Rahou A, Cavò E, Miceli N, Taviano MF, Mondello L, Cacciola F. Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Extracts From Aerial Parts of *Thymus Zygis* Subsp. *gracilis*, *Mentha Suaveolens* and *Sideritis Incana* From Morocco. *Chem Biodivers*. 2022;19(3). doi:10.1002/cbdv.202101018
12. Nazir NS, Murtaza G, Hameed NA, Abbas G. Evaluation of Antibacterial Activity of Liverwort Species of Bagh Azad Jammu and Kashmir (Western Himalaya) Against Pathogenic Bacteria. *GSC Biol Pharm Sci*. 2023;22(2):166-172. doi:10.30574/gscbps.2023.22.2.0052
13. Abusetta A, Alumairi J, Alkaabi MY, Ajeil RA, Shkaidim AA, Akram D, Pajak J, Ghattas MA, Atatreh N, AlNeyadi SS. Design, Synthesis, &in Vitro</i></i> Antibacterial Activity, and Docking Studies of New Rhodanine Derivatives. *Open J Med Chem*. 2020;10(01):15-34. doi:10.4236/ojmc.2020.101002
14. Wu M, Qi G, Liu X, Duan Y, Liu J, Bin L. Bio-Orthogonal AIEgen for Specific Discrimination and Elimination of Bacterial Pathogens via Metabolic Engineering. *Chem Mater*. 2019;32(2):858-865. doi:10.1021/acs.chemmater.9b04520
15. Cunha L, Grenha A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar Drugs*. 2016;14(3). doi:10.3390/md14030042
16. El-Fawal G. Preparation, characterization and antibacterial activity of biodegradable films prepared from carrageenan. *J Food Sci Technol*. 2014;51(9):2234-2239. doi:10.1007/s13197-013-1255-9
17. Huang H, Wang Q, Ning Z, Ma Y, Huang Y, Wu Y, Yang Y, Xiao M, Ye J. Preparation, antibacterial activity, and structure-activity relationship of low molecular weight κ-carrageenan. *Int J Biol Macromol*. 2024;266:131021. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131021
18. Jones OG, Adamčík J, Handschin S, Bolisetty S, Mezzenga R. Fibrillation of B-Lactoglobulin at Low pH in the Presence of a Complexing Anionic Polysaccharide. *Langmuir*. 2010;26(22):17449-17458. doi:10.1021/la1026619
19. Vinceković M, Bujan M, Sikirić MD. Nano- And Microcomplexes of Biopolymer Carrageenans and Dodecylammonium Chloride. *J Polym Eng*. 2011;31(2-3). doi:10.1515/polyeng.2011.028
20. Posokhov YO, Onishchenko A, Chumachenko T, Makieieva N, Kalashnyk-Vakulenko Y, Polikarpova H, Novikova V V, Prokopiuk V, Наконечна OA, Chumachenko D, Tkachenko VL, Menailov I, Tkachenko M, Tkachenko A. Semi-Refined Carrageenan Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Reactive Oxygen Species Production in Peripheral Blood Mononuclear Cells and Cell Membrane Alterations in Leukocytes. *J Pharm Nutr Sci*. 2021;11:175-183. doi:10.29169/1927-5951.2021.11.20
21. Ficko-Blean E, Préchoux A, Thomas F, Rochat T, Larocque R, Zhu Y, Stam M, Genicot S, Jam M, Calteau A, Viart BT, Ropartz D, Pérez-Pascual D, Correc G, Matard-Mann M, Stubbs KA, Rogniaux H, Jeudy A,

- Barbeyron T, Médigue C, Czjzek M, Vallenet D, McBride MJ, Duchaud É, Michel G. Carrageenan Catabolism Is Encoded by a Complex Regulon in Marine Heterotrophic Bacteria. *Nat Commun.* 2017;8(1). doi:10.1038/s41467-017-01832-6
22. Fukada M. Development of Bitter-Taste Masked Instant Jelly Formulations of Diphenhydramine Hydrochloride With Easy-to-Consume Granules. *Chem Pharm Bull.* 2023;71(8):670-674. doi:10.1248/cpb.c23-00247
23. Koralegedara ID, Hettiarachchi CA, Wimalasiri KMS. Synthesis of Nano-Scale Biopolymer Particles From Legume Protein Isolates and Carrageenan. *Food Technol Biotechnol.* 2020;58(2):214-222. doi:10.17113/ftb.58.02.20.6279
24. Ellis A, Mills T, Norton IT, Norton-Welch AB. The Hydrophobic Modification of Kappa Carrageenan Microgel Particles for the Stabilisation of Foams. *J Colloid Interface Sci.* 2019;538:165-173. doi:10.1016/j.jcis.2018.11.091
25. Wang F, Yao Z, Wu H, Zhang S, Zhu N, Gai X. Antibacterial activities of kappa-carrageenan oligosaccharides. *Appl Mech Mater.* 2012;108:194-199. doi:10.4028/www.scientific.net/AMM.108.194
26. Prasedya ES, Miyake M, Kobayashi D, Hazama A. Carrageenan Delays Cell Cycle Progression in Human Cancer Cells in Vitro Demonstrated by FUCCI Imaging. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16(1). doi:10.1186/s12906-016-1199-5
27. Cotas J, Marques V, Afonso MB, Rodrigues CMP, Pereira L. Antitumour Potential of Gigartina Pistillata Carrageenans Against Colorectal Cancer Stem Cell-Enriched Tumourspheres. *Mar Drugs.* 2020;18(1):50. doi:10.3390/md18010050
28. Simona J, Dani D, Petr S, Marcela N, Jakub T, Bohuslava T. Edible Films from Carrageenan/Orange Essential Oil/Trehalose—Structure, Optical Properties, and Antimicrobial Activity. *Polymers (Basel).* 2021;13(3). doi:10.3390/polym13030332
29. Shojaee-Aliabadi S, Hosseini H, Mohammadifar MA, Mohammadi A, Ghasemlou M, Hosseini SM, Khaksar R. Characterization of κ -carrageenan films incorporated plant essential oils with improved antimicrobial activity. *Carbohydr Polym.* 2014;101:582-591. doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.070
30. Ali AJ, Abdulla HI, Al-Nimer MS. The Pharmacological Effects of Kappa Carrageenan on Different Human Cell Lines and Genomic DNA: An in Vitro Study. *Iraqi J Pharm Sci (P-Issn 1683 - 3597 E-Issn 2521 - 3512).* 2021;30(1):189-195. doi:10.31351/vol30iss1pp189-195



Metode Analisis dalam Mengungkap Komposisi Perisa Buah *E-Liquid* Rokok Elektrik: Sebuah Tinjauan

Analytical Methods for Revealing the Composition of Fruit Flavor E-Cigarette E-Liquid: A Review

Aghnia Nabila^{1*}, Mochammad Yuwono², Mochammad Taha Ma'ruf³, Shalsa Septia Zulni¹

¹Sekolah Pascasarjana, Universitas Airlangga, Jl. Airlangga, Airlangga, Kec. Gubeng, Surabaya, 60286, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Jl. Mulyorejo, Mulyorejo, Surabaya, 60115, Indonesia

³Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jln.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

Diajukan: 17-02-2025

Direview: 24-02-2025

Disetujui: 18-03-2025

Kata Kunci: cairan elektronik, komposisi perisa, kromatografi, rokok elektrik.

Keywords: chromatographic, electronic cigarette, electronic liquid, flavouring compounds.

Korespondensi:

Aghnia Nabila
aghnia.nabila-2024@pasca.unair.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

Pemakaian rokok elektrik kini semakin meningkat, salah satunya disebabkan perisa *e-liquid* rasa buah-buahan. Senyawa kimia penyusun perisa tersebut berperan dalam memberikan karakteristik rasa, namun jika terhirup berpotensi memberikan efek negatif terhadap kesehatan. Pemahaman mengenai senyawa kimia apa saja yang terdapat pada perisa *e-liquid* sangat penting untuk mengetahui efek toksisitas rokok elektrik. Artikel ini bertujuan untuk meninjau metode analisis yang telah dilakukan oleh beberapa literatur sebelumnya dalam mengidentifikasi senyawa perisa *e-liquid*. Literatur dikumpulkan melalui pencarian di database ilmiah terkemuka, termasuk ScienceDirect, Scopus, Web of Science, PubMed, dan Google Scholar, dengan menggunakan kata kunci yang relevan. Dari pencarian awal, ditemukan 35 artikel yang relevan, kemudian diseleksi berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi, sehingga diperoleh 10 artikel untuk dianalisis lebih lanjut. Literatur yang dipilih yakni penelitian dengan fokus pada metode kromatografi, khususnya Kromatografi Gas (GC) dan Kromatografi Cair (LC). Pengembangan lebih lanjut, seperti kombinasi GC dengan Spektrometri Massa (MS) dan Spektrometri Mobilitas Ion (IMS), serta LC dengan MS/MS dan Ionisasi Elektrospray (ESI), terbukti meningkatkan sensitivitas dan selektivitas analisis. Temuan ini menekankan pentingnya memilih metode analisis yang tepat terhadap senyawa penyusun perisa buah. Hasil analisis juga membahas kelebihan dan tantangan yang ada, sehingga dapat memberikan panduan dalam memilih metode analisis yang tepat untuk mendorong pengembangan standar keamanan yang lebih baik.

Abstract

The use of e-cigarettes is increasing, one of which is due to fruit-flavored e-liquids. The chemical compounds that make up these flavors play a role in providing flavor characteristics, but if inhaled, they can potentially negatively affect health. Understanding what chemical compounds are found in e-liquid flavors is very important to determine the toxicity effects of e-cigarettes. This article aimed to review the analytical methods that had been carried out by previous studies in identifying e-liquid flavor compounds. Literature was collected through searches in reputable scientific databases, including ScienceDirect, Scopus, Web of Science, PubMed, and Google Scholar, using relevant keywords. From the initial search, 35 relevant articles were found, and then selected based on inclusion and exclusion criteria, resulting in 10 articles for further analysis. The selected literature consisted of research focusing on chromatographic methods, specifically Gas Chromatography (GC) and Liquid Chromatography (LC). Further developments, such as the combination of GC with Mass Spectrometry (MS) and Ion Mobility Spectrometry (IMS), as well as LC with MS/MS and Electrospray Ionization (ESI), were shown to improve the sensitivity and selectivity of the analysis. These findings emphasize the importance of choosing the right analytical method for the compounds to be identified. The results also discuss the advantages and challenges, which can guide in choosing the right analytical method to promote the development of better safety standards.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Nabila, A, Yuwono, M, Ma'ruf, MT, Zulni, SS. Metode Analisis dalam Mengungkap Komposisi Perisa Buah *E-Liquid* Rokok Elektrik: Sebuah Tinjauan. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 14-24, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.11099](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.11099)

PENDAHULUAN

Penggunaan rokok konvensional akhir-akhir ini mulai tergantikan oleh rokok elektrik, terutama di kalangan remaja dan dewasa muda.¹ Varian rokok ini mulai diminati karena merupakan alternatif rokok berbasis tembakau yang mampu memasukkan nikotin dalam tubuh, sehingga dapat menghasilkan efek kepuasan dan relaksasi, seperti rokok konvensional.² Rokok elektrik memanfaatkan penggunaan baterai untuk mengubah larutan cair (*e-liquid*) menjadi aerosol melalui pemanasan.³ Menariknya, *e-liquid* tersedia dalam berbagai rasa dan aroma yang mampu menarik perhatian bagi pengguna, terutama rasa buah-buahan, yang menjadi daya tarik bagi mereka yang ingin berhenti merokok berbasis tembakau.^{4,5} Para pengguna rokok

elektrik juga mulai memilih rokok ini karena dipandang memiliki risiko bahaya yang lebih rendah, namun hal ini masih diperdebatkan kalangan para ahli.³

E-liquid terdiri dari nikotin, gliserol, propilen glikol, serta berbagai senyawa penyusun perisa yang menentukan rasa. Rasa buah merupakan rasa yang umum dalam *e-liquid*.⁶ Rasa tersebut biasa tersusun atas etil maltol, triasetin, vanilin, etil vanilin, benzaldehid, cinnamaldehyd, etil butirrat, atau senyawa lainnya. Meskipun senyawa-senyawa tersebut diizinkan untuk digunakan dalam industri makanan dan aman jika dikonsumsi per oral, penelitian terbaru menunjukkan bahwa paparan melalui penghirupan dapat berdampak negatif terhadap kesehatan tubuh.⁷ Saat terhirup, senyawa penyusun rasa buah ini berpotensi dapat menyebabkan stres oksidatif, peradangan, efek kardiovaskular, masalah pernapasan, hingga kerusakan DNA.⁸⁻¹³ Pemahaman mengenai kandungan apa saja yang terdapat pada perisa menjadi penting untuk diketahui sehubungan dengan potensi senyawa toksik yang terbentuk. Dengan adanya variasi senyawa yang kompleks menyebabkan perlunya penggunaan metode analisis yang tepat dan akurat.

Kandungan perisa buah-buahan pada *e-liquid* telah dianalisis menggunakan metode kromatografi, seperti Kromatografi Gas (GC) dan Kromatografi Cair (LC). Kedua metode analisis ini disamping memiliki kelebihan juga memiliki kekurangan dalam mendeteksi senyawa kimia penyusun perisa pada rokok elektrik. Sejumlah tinjauan literatur sebelumnya telah membahas metode analisis senyawa berbahaya dalam *e-liquid* rokok elektrik, namun kajian yang berfokus pada komponen perisa terutama rasa buah yang kian berkembang masih terbatas¹⁴⁻¹⁷. Penelitian ini bertujuan untuk meninjau metode analisis senyawa penyusun perisa *e-liquid* rokok elektrik serta mengidentifikasi komponen toksik yang sering muncul. Hasil tinjauan ini diharapkan dapat menjadi referensi bagi peneliti dalam memilih metode yang tepat serta bagi industri dalam mendukung regulasi produk yang lebih aman, khususnya di Indonesia yang belum mengatur hal tersebut.

METODE PENELITIAN

Data dalam tinjauan pustaka ini diperoleh dengan menggunakan kata kunci utama, seperti "*Flavor e-liquid compounds*", "*E-liquid chemical composition*", dan "*Components flavour e-liquid analysis*", serta kata kunci relevan lainnya untuk menjangkau berbagai penelitian terkait. Penelusuran dilakukan melalui database ilmiah terkemuka, termasuk ScienceDirect, Scopus, Web of Science, PubMed dan Google Scholar, guna memperoleh literatur terbaru dan terpercaya. Pencarian artikel difokuskan kepada metode kromatografi, khususnya Kromatografi Gas (GC) dan Kromatografi Cair (LC). Kriteria inklusi dalam tinjauan ini adalah artikel yang membahas metode analisis kromatografi (GC-MS dan LC-MS) dalam mengidentifikasi komponen perisa *e-liquid*. Artikel yang digunakan juga harus bersumber dari jurnal terindeks dan rentang waktu publikasi yang dianalisis dari tahun 2015 hingga 2024. Sementara itu, kriteria eksklusi mencakup artikel yang hanya membahas aspek kesehatan tanpa menguraikan metode analisis yang digunakan, studi yang hanya fokus pada nikotin tanpa menyinggung komponen perisa, serta artikel yang tidak tersedia dalam bahasa Inggris atau bahasa Indonesia, serta jenis publikasi seperti artikel review, tesis, short communication, dan correspondence. Dari hasil pencarian awal, ditemukan sejumlah 35 artikel yang relevan dengan topik ini. Setelah melalui proses penyaringan berdasarkan abstrak dan isi lengkapnya, sebanyak 10 artikel terpilih untuk dianalisis lebih lanjut dalam tinjauan ini. Artikel yang akhirnya digunakan mencakup penelitian yang menjelaskan metode analisis, yang digunakan, serta senyawa yang berhasil diidentifikasi dalam perisa *e-liquid*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis komposisi senyawa kimia yang digunakan sebagai agen perisa dalam *e-liquid* memerlukan metode yang sensitif karena kompleksitas campuran senyawa tersebut. Teknik kromatografi, seperti *Gas Chromatography* (GC) dan *Liquid Chromatography* (LC), merupakan metode umum yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa tersebut. Penelitian sebelumnya, telah menunjukkan bahwa kedua metode ini memiliki keunggulan dan keterbatasan masing-masing dalam mengidentifikasi senyawa volatil maupun non volatil. Penulisan ini akan menguraikan efisiensi metode yang digunakan dan senyawa utama yang ditemukan

berserta potensi bahayanya. Hasil analisis komposisi senyawa penyusun perisa dan metode yang digunakan dirangkum dalam **Tabel 1**.

Kromatografi Gas (GC)

Kromatografi gas merupakan teknik analisis yang dapat memisahkan dan menganalisis senyawa tanpa diuraikan terlebih dahulu. Proses ini melibatkan penguapan sampel yang kemudian dipisahkan berdasarkan interaksinya dengan fase diam pada kolom. Kromatografi gas merupakan metode yang sangat cocok untuk menganalisis perisa *e-liquid* yang bersifat volatil karena menawarkan sensitivitas dan selektivitas yang tinggi, terutama jika digabungkan dengan kromatografi massa (MS).¹⁸

Tabel 1. Metode analisis senyawa penyusun perisa buah-buahan pada *e-liquid*

Referensi	Kategori perisa	Senyawa penyusun perisa	Metode	Parameter analisis
19	Jeruk Darah	Ethanol, Ethyl acetate, 1-butanol, Ethyl propionate, 3-Methyl-1-butanol, 1,2-Propanediol, Isobutyl acetate, Ethyl butanoate, Butyl acetate, Ethyl 2-methylbutanoate, 3-Hexen-1-ol (Z), 1-Hexanol, 3-Methylbutyl acetate, 2-Methylbutyl acetate, Ethyl 4-pentenoate, Heptanal, (-)- α -Pinene, 1-Heptanol, (+)- α -Pinene, 6-Methyl-5-hepten-2-one, Myrcene, Ethyl hexanoate, Octanal, Limonene, Eucalyptol, 3-Methylbutyl butanoate*, 1-Octanol, Linalool, Nonanal, Citronellal, Menthon, , Decanal, Geraniol, Carvone, Undecanal	GC-MS dan GC-IMS	• Kolom: HP-5MS UI 30 m x 0.25 mm x 0.5 μm • Gas pembawa: Helium • Laju alir: 35 cm/s • Suhu awal: 50°C • Tahan: 4 menit • Tanjakan: 5°C/min sampai 150°C • Tahan: 61 menit • Tanjakan: 10°C/min sampai 200°C • LOD:
20	Apel kayu manis	Vanilin, Ethyl vanilin, Cinnamaldehyde, Butanoic acid 3-methyl-, ethyl ester, Glycerin, Piperazine, Benzyl alcohol, Maltol, Ethyl maltol, Pyridin, 2-Propenoic acid, Coumarin, 2(3H)-Furanone, 5-hexyldihydro-	GC-MS	• Kolom: HP-5MS 30 m x 0.250 mm x 0.25 μm • Gas pembawa: Helium • Volume injeksi: 250 μL • Suhu Injeksi: 250°C • Suhu awal: 40°C • Tahan: 2 menit • Tanjakan: 10°C/min sampai 170°C • Tahan: 61 menit • Tanjakan: 8°C/min sampai 250°C • Tahan: 5 menit • Tanjakan: 25°C/min sampai 320°C
21	Stroberi popart	Triacetin, Vanilin, Ethyl vanilin	GC-MS	• Kolom: DB-5MS 30 m x 0.25 mm i.d., x 0.25 μm film • Gas pembawa: Helium • Fase gerak: Metanol • Suhu injeksi: 270°C • Suhu gradien oven: 60-250°C
8	Mangga Timun	Ethyl maltol, Furanone, Ethyl citrate, Octadecanoic acid Hexadecanoic acid, Benzoic acid, menthol	GC-MS	• Kolom: HP-5MS 30 m x 0.250 mm x 0.25 μm • Fase gerak: Metanol • Gas pembawa: Helium • Total waktu 18 menit • Volume injeksi: 1 μL • Suhu awal: 60°C • Tahan: 4 menit

Referensi	Kategori perisa	Senyawa penyusun perisa	Metode	Parameter analisis
22	Stroberi	3-Methyl Butanol, beta-Pinene, beta Myrcene, Eucalyptol, Bergamiol, p-Menthan-3-one, (Z)-Geraniol. Isoamyl acetate, Benzaldehyde, Limonene, Geranyl formate, Hexanol, Isoamyl isovalerate, (Z)-3-Hexenyl butyrate, Methyl cinnamate, Ethyl acetate, (Z)-3-Hexen-1-ol, (Z)-3-Hexenyl acetate, Linalool, Ethyl-3-methyl butanoate, Ethyl butanoate, Ethyl-2-methylbutanoate	GC-MS	• Tanjakan: 70°C/min sampai 150°C • Tahan: 2 menit • Tanjakan: 25°C/min sampai 250°C kemudian • Tahan: 5 menit • Tanjakan: 25°C/min sampai 280°C • Suhu awal: 40°C • Tahan: 5 menit • Tanjakan: 8°C/min sampai 230°C • Tahan: 5 menit
23	Jeruk Kelapa	Methyl heptenone, Limonene, citral δ -Decalactone, γ -nonalactone	GC-MS/MS	• Kolom: Phenomenex ZB-5 MSI 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μm film • Gas pembawa: Helium • Mode aliran konstan: 1,0 mL/menit • Suhu awal: 50°C menit • Tahan: 4 menit • Tanjakan: 10°C/min sampai 130°C • Tahan: 3 menit • Tanjakan: 25°C/min sampai 300°C
	Melon	Melonal		
24	Rasberi Stroberi	Citronellol, heksan-1-ol Hedione (cis dan trans), isoamyl butyrate, ethyl caproate, leaf alcohol (cis-3-hexen-1-ol), γ -decalactone, furfuryl alcohol, 2-isopropyl-5-metyloheks-2-enal	GC/MS	• Kolom: Phenomenex ZB-5 MSI 30 m $\times$ 0.25 mm i.d., 0.25 μm film • Gas pembawa: Helium • Mode aliran konstan: 1,0 mL/menit • Suhu awal: 50°C menit • Tahan: 4 menit • Tanjakan: 10°C/min sampai 130°C • Tahan: 3 menit • Tanjakan: 25°C/min sampai 300°C
	Apel	1-amilalcohol, cis-3-hexen-1-ol), cis-3-hexenylacetate, hexyl acetate, isoamyl butyrate, isoamyl isovalerate, isopentyl acetate, leaf aldehyde, n-hexanol		
	Kismis hitam	α,α - dimethylphenethyl butyrate, Benzyl acetate, furaneol, γ -nonalactone, isoamyl butyrate, cis-3-hexen-1-ol, Linalyl acetate, Raspberry ketone, α - terpeneol, Tetrahydrolinalool, Isoamyl isovalerate, Limonene, Furfural, Geranyl propionate, 2-isopropyl-5-methyl-2-hexenal, Anisyl acetate,		
	Pisang	Benzyl acetate, cis-3-hexenylvalerate, citral (cis-and trans), eugenol, isoamyl butirate, isopentyl acetate, ethyl caproate, limonene, α -terpineol, tetrahydrolinalool, hexyl		

Referensi	Kategori perisa	Senyawa penyusun perisa	Metode	Parameter analisis
25	Persik	acetate, geranium propionate, 3,4-dihydrocoumarin	GC-MS	• Kolom: DB-5MS UI 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 mm film • Fase gerak: Metanol • Suhu awal: 35°C • Tahan: 5 menit • Tanjakan: 10°C/min sampai 300°C • Tahan: 3,5 menit
	Semangka	Phenethyl isovalerate, dec, Δ -decalactone, tetrahydrolinalool, isoamyl isovalerate, limonene, α , α -dimethylphenethyl butyrate, γ -dodecalactone		
	Ceri	Melon, cis-3-hexen-1-ol, cis-3-hexenylacetate, citronellol, α -terpineol, isopentyl acetate, Isopentyl acetate, benzaldehyde, benzyl acetate, anisyl acetate, citronellol		
	Lemon	Citral (cis dan trans), limonene, α -terpineol, cis-3-hexenylvalerate, γ -nonalactone		
	Jeruk	Limonene, benzyl acetate, cis-3-hexenylacetate, α -terpineol, tetrahydrolinalool, ethyl caproate		
	Ceri	Benzaldehyde, p-Tolualdehyde, Benzyl alcohol, Limonene, Ethyl butyrate, Benzyl acetate, γ -Undecalactone, Piperonal, Vanilin		
	Anggur	Maltol, Ethyl acetate, Ethyl maltol, Methyl anthranilate, Ethyl isovalerate, Ethyl butyrate		
26	Apel	(E)-2-Hexen-1-ol, (3Z)-3-Hexen-1-ol, Hexyl acetate, Ethyl acetate, Ethyl butyrate, 2-Methylbutyl acetate	HPLC-ESI-MS/MS	• Kolom: Ace® Ultracore™ SuperC18™ (100 × 2.1 mm, 2.5 μm) • Komposisi fase gerak: A: H₂O 0.05% v/v of FA (pH = 3) B: ACN 0.05% v/v of FA • Arus: 0,8 mL/min • Suhu oven: 30°C • Volume injeksi: 5 μL • Gradien fase gerak: 0–2 min (5% B) 2–12 min (5–90%B) • Waktu ekuilibrase: 5 min (5% B)
	Rasberi	2-methylpyrazine		
	Stroberi	Furaneol, Ethyl lactate, Ethyl maltol, 2-methylbutyrate, Methyl cinnamate		
	Apel	Ethyl acetoacetate, Vanilin, β -damascone, Linalool oxide, Ethyl phenylacetate, Maltol, Furaneol		
	Kismis hitam	Linalol, Furaneol, Ethyl maltol, 4-methylacetophenone, Cocal, Methylcyclopentenolone		
	Pisang	Linalol, Vanilin, β -damascone, Nerol + geraniol, Ethyl maltol, Linalool oxide, 4-methylacetophenone, Carvone, 2-acetylpyrrole		
	Persik	2-isopropyl-4-methylthiazole, Linalol, Methylheptenone, γ -hexalactone		
10	Semangka	Ethyl maltol, Melonal, Ethyl vanilin, Diethyl succinate, Nerol + geraniol, Methylheptenone, Linalol	HPLC	-
	Ceri	Vanilin, Ionone α + β , β -damascone, Ethyl maltol, Menthol		
	Lemon	Linalol, Nerol + geraniol, Carvone, Vanilin, Maltol		
	Jeruk	Carvone, Linalol, Nerol + geraniol, Methylsalicylate		
	Ceri	Benzaldehyde		

GC sering digabungkan dengan teknik lain seperti spektroskopi massa atau spektrometri mobilitas ion (IMS). Kombinasi kedua metode ini, sebagaimana dilakukan oleh Augustini et al.,¹⁹ memungkinkan deteksi senyawa pada kadar yang sangat rendah, yakni dengan LOD 1 ng/mL. Pengembangan metode tersebut memungkinkan identifikasi senyawa perisa secara lebih luas dengan sensitivitas dan selektivitas yang tinggi serta biaya yang relatif rendah dibandingkan hanya menggunakan metode GC-MS. Kombinasi ini juga memberikan informasi yang lebih rinci terkait struktur molekul dan sifat senyawa. Akan tetapi, proses identifikasi ini masih tergolong rumit akibat kurangnya tersedia data referensi yang dibutuhkan untuk membandingkan waktu drift dengan referensi, sehingga penggunaannya masih terbatas. Meskipun demikian, metode ini memiliki batas deteksi yang sangat rendah, sehingga perlu dikembangkan lebih lanjut untuk meningkatkan efektivitas analisis.

Metode lainnya juga menggunakan GC-MS yang dimodifikasi dengan teknik *Electron Ionization* (EI).²⁴ Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini sangat efektif, dengan nilai LOD berkisar antara 3–87 ng/mL, yang menjadikannya sensitif dan cocok untuk analisis komposisi perisa *e-liquid* hingga kadar yang kecil. Metode yang lebih canggih, yakni GC-MS/MS dilakukan oleh Aszyk et al.²³ untuk meningkatkan akurasi dan sensitivitas analisis sampel kompleks. Keefektifan metode ini ditunjukkan oleh nilai LOD sebesar 3–562 ng/mL, yang mencerminkan kemampuan analisis pada rentang konsentrasi yang lebih luas dibandingkan metode sebelumnya. Teknik GC-MS/MS memberikan sensitivitas dan selektivitas lebih tinggi dibandingkan GC-MS tunggal karena mampu mengurangi gangguan dalam analisis rasa multivariat.²⁷ Akan tetapi, metode ini memiliki biaya operasional yang relatif lebih tinggi karena kebutuhan pemeliharaan yang canggih dan bahan habis pakai yang lebih mahal.

Perpustakaan data spektra, seperti NIST (National Institute of Standards and Technology), sering digunakan dalam analisis GC-MS untuk mencocokkan spektrum massa senyawa dengan data referensi. Penggunaan perpustakaan ini memungkinkan identifikasi senyawa target maupun non-target dalam komposisi perisa, yang sering kali sangat beragam dan tidak diketahui. Senyawa yang berhasil diidentifikasi oleh spektra tersebut selanjutnya dapat dianalisis secara kuantitatif menggunakan standar otentik.^{21,25} Hasil analisis yang dilakukan tidak mencakup rokok elektrik secara umum, namun dapat mencerminkan tren umum dalam penelitian *e-liquid*. Namun dalam konteks kajian dampak kesehatan, analisis kuantitatif menjadi penting untuk menentukan konsentrasi senyawa dalam *e-liquid*, sehingga dapat memberikan informasi yang lebih akurat mengenai potensi risiko paparan.²⁸

Upaya untuk mencapai analisis yang efektif, beberapa penelitian menggunakan Teknik ekstraksi *Headspace* (HS) dalam pengambilan sampelnya.^{19,22} Teknik tersebut memungkinkan analisis sampel dalam bentuk uap, sehingga lebih efektif dalam menganalisis perisa yang terbentuk selama proses penguapan, seperti yang terjadi saat penggunaan rokok elektrik, maupun dalam cairan itu sendiri. Selain itu, uap juga dapat dihasilkan menggunakan simulator rokok otomatis, yang dirancang untuk meniru kondisi nyata saat *e-liquid* diuapkan. Namun, metode ini lebih kompleks karena memerlukan teknik yang rumit, agar hasil analisis lebih representatif terhadap kondisi penggunaan sebenarnya.²⁰

Kromatografi Cair (LC)

Kromatografi cair adalah teknik pemisahan yang melibatkan penggunaan fase gerak cair untuk memisahkan senyawa berdasarkan interaksinya dengan fase diam. LC dapat secara efisien memisahkan berbagai macam senyawa, termasuk senyawa penyusun perisa yang bersifat non volatil, yang mungkin tidak cocok dianalisis menggunakan kromatografi gas. Instrumen ini dapat diadaptasi untuk berbagai aplikasi, termasuk kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dan spektroskopi massa (MS), sehingga dapat meningkatkan kemampuannya untuk mengidentifikasi dan mengkuantifikasi berbagai senyawa dalam *e-liquid*.^{29,30} Metode ini umum digunakan secara luas di berbagai bidang, seperti farmasi, pangan dan pertanian, hingga ilmu forensik.³¹

Sejauh pengetahuan penulis, hanya terdapat sedikit artikel yang menganalisis komponen perisa *e-liquid* dengan menggunakan LC. Kosmider et al.¹⁰ melakukan penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi

keberadaan benzaldehida dalam perisa rasa ceri, yakni senyawa yang dicurigai dapat menimbulkan efek iritasi saat dihirup. Benzaldehida berhasil dideteksi menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (HPLC) dengan menggunakan aerosol sebagai sampel yang dihasilkan dari simulator merokok otomatis. Pemilihan aerosol dianggap relevan dalam penelitian ini karena dapat merepresentasikan kondisi aktual penggunaan *e-liquid* oleh pengguna, sehingga hasil analisis lebih aplikatif dalam kenyataan. Metode kromatografi cair juga telah dikembangkan dan divalidasi oleh Aszyk et al.²⁶ dengan menggabungkan HPLC dengan spektrometri massa ganda (MS/MS) dan *Electrospray Ionization* (ESI). ESI merupakan teknik ionisasi yang mampu meminimalkan fragmentasi berlebih, sehingga sering digunakan untuk senyawa polar. Hasil analisis yang diperoleh menunjukkan bahwa metode ini yang efektif untuk diaplikasikan karena mampu meningkatkan reproduktibilitas, spesifisitas, dan sensitivitas secara signifikan dibandingkan dengan LC-MS tunggal. Metode ini juga telah terbukti dapat mendeteksi senyawa dengan kadar yang sangat kecil yakni dengan LOD mencapai 1-148 ng/mL. Meskipun metode ini efektif, keterbatasannya terdapat pada biaya operasional yang tinggi dan kebutuhan akan pelarut khusus, sehingga penggunaannya harus disesuaikan dengan kondisi laboratorium dan kebutuhan penelitian.

Perisa *e-liquid* terdiri dari berbagai senyawa, seperti aldehida, ester, keton, dan alkohol, yang masing-masing memberikan karakteristik rasa dan aroma yang khas. Berdasarkan kajian dari artikel yang dikumpulkan, delapan senyawa yang umum muncul dan metode yang digunakan disajikan pada **Tabel 2**. Pemilihan metode analisis tidak hanya bergantung pada sensitivitas alat, tetapi juga harus mempertimbangkan sifat fisikokimia senyawa yang dianalisis. Sebagai contoh, senyawa dengan volatilitas tinggi seperti benzaldehida, etil asetat, isoamil isovalerat, etil butirrat, dan tetrahidrolinalool lebih optimal dianalisis dengan GC karena memungkinkan pemisahan yang lebih efektif. Sebaliknya, senyawa seperti vanillin, etil maltol, dan maltol memiliki volatilitas rendah, sehingga lebih efektif dianalisis menggunakan LC yang mampu menangani senyawa non volatil. Dengan demikian, sifat fisikokimia, seperti volatilitas juga menjadi faktor penting dalam mempertimbangkan pemilihan metode analisis.³²

Tabel 2. Senyawa yang paling sering muncul berdasarkan Tabel 1

Jenis Senyawa	Contoh Senyawa	Metode Deteksi	Rasa Buah
Aldehida	Vanilin	GC-MS	Apel kayu manis, stroberi popart, ceri, apel, dan pisang
		LC-MS	Lemon
	Benzaldehida	GC-MS	Stroberi, dan ceri (muncul 2 kali)
		LC-MS	Ceri
Ester	Ethyl acetate	GC-MS	Jeruk darah, stroberi, anggur, dan apel
	Isoamyl isovalerate	GC-MS	Stroberi, apel, kismis hitam, dan persik
	Ethyl butyrate	GC-MS	Ceri, anggur, dan apel
Keton	Maltol	GC-MS	Apel kayu manis dan anggur
		LC-MS	Apel dan lemon
	Ethyl maltol	GC-MS	Apel kayu manis, mangga dan anggur
		LC-MS	Stroberi, kismis hitam, pisang, semangka, dan ceri
Alkohol	Tetrahidrolinalool	GC-MS	Kismis hitam, pisang, persik, dan jeruk

Memahami komposisi senyawa penyusun perisa sangat penting untuk mengevaluasi potensi bahayanya serta mendukung perumusan regulasi di masa depan. Benzaldehida, misalnya, sering digunakan dalam perisa ceri dalam memberikan aroma yang khas, namun senyawa ini diketahui dapat menyebabkan iritasi pada saluran pernapasan bila dihirup secara berulang dan dengan konsentrasi tinggi.¹⁰ Aldehida lainnya seperti vanilin juga telah diteliti dapat memicu stres oksidatif dan respon inflamasi pada jaringan epitel paru-paru, yang berpotensi menyebabkan kerusakan DNA jika terakumulasi di dalam tubuh.⁸ Selain itu, etil maltol dan maltol yang sering digunakan sebagai pemanis tambahan dalam perisa dapat menimbulkan efek toksikologi serupa.³³⁻³⁵ Ester seperti etil asetat, etil butirrat, dan isoamil isovalerat, meskipun memberikan aroma segar pada

perisa buah seperti apel dan stroberi, memerlukan evaluasi lebih lanjut terkait efek toksikologinya. Senyawa alkohol seperti tetrahidrolinalool memiliki toksisitas rendah dalam makanan, namun efek inhalasi jangka panjang melalui rokok elektrik belum sepenuhnya dipahami, sehingga membutuhkan kajian toksikologi yang lebih mendalam. Pemahaman metode identifikasi komponen penyusun perisa dan potensi bahayanya tidak hanya penting untuk pengembangan penelitian toksikologi, tetapi juga menjadi dasar yang kuat untuk merancang regulasi keamanan.

Selain efek toksik individual, interaksi antar senyawa dalam *e-liquid* juga dapat meningkatkan atau mengurangi toksisitasnya. Sebagai contoh, aldehida perisa seperti benzaldehida dan sinamaldehida dapat bereaksi dengan propilen glikol (PG) dan gliserol (GL) membentuk asetal, yang sering kali memiliki toksisitas lebih tinggi dibandingkan dengan senyawa asalnya³⁶. Kombinasi beberapa perisa juga diketahui meningkatkan sitotoksitas dan produksi spesies oksigen reaktif (ROS) dibandingkan dengan perisa tunggal, yang mengindikasikan adanya efek toksik sinergis³⁷. Selain itu, nikotin dapat berperan dalam memodulasi toksisitas senyawa perisa tertentu. Studi menunjukkan bahwa nikotin dapat mengurangi pembentukan konstituen yang berbahaya dan berpotensi berbahaya (HPHC) dalam *e-liquid* yang mengandung benzaldehida dan vanilin. Nikotin juga diketahui mampu menghambat pembentukan radikal bebas secara bergantung pada konsentrasi, sehingga berpotensi mengurangi stres oksidatif dan toksisitas keseluruhan³⁸. Hal ini menunjukkan bahwa interaksi kompleks antar senyawa dalam *e-liquid* dapat menghasilkan efek toksik yang bervariasi,

Regulasi terkait perisa dalam *e-liquid* bervariasi di setiap negara. Di Amerika Serikat, *Food and Drug Administration* (FDA) telah menetapkan peraturan mengenai pembatasan dan pelabelan kandungan *e-liquid*, terutama yang mengandung zat berbahaya. Salah satu bentuk regulasi ini adalah larangan penjualan rokok elektrik berbasis kartrid dengan perisa tertentu, khususnya rasa buah, kecuali untuk rasa mentol dan tembakau³⁹. Sementara itu, di Uni Eropa, regulasi perisa *e-liquid* diatur oleh *European Tobacco Products Directive* (TPD) 2014/40/EU, yang mewajibkan pelaporan informasi utama produk, termasuk deskripsi rasa, kepada otoritas terkait. Dengan regulasi ini, senyawa penyusun perisa dapat dipantau dan dikontrol dengan lebih ketat⁴⁰. Di Indonesia, hingga saat ini belum ada regulasi khusus yang mengatur perisa dalam rokok elektrik. Tidak terdapat pembatasan eksplisit terhadap rasa yang digunakan, yang terlihat dari luasnya ketersediaan dan pemasaran rokok elektrik dengan berbagai varian rasa, termasuk rasa buah⁴¹. Regulasi yang ada lebih berfokus pada aspek pajak dan distribusi produk, sementara pengawasan terhadap kandungan senyawa dalam *e-liquid* masih terbatas⁴². Penelitian ini menunjukkan bahwa beberapa senyawa dalam perisa *e-liquid* berpotensi menimbulkan bahaya yang signifikan. Oleh karena itu, regulasi di Indonesia sebaiknya mengadopsi pendekatan yang lebih ketat, sebagaimana yang diterapkan di negara-negara lain.

SIMPULAN

Kajian ini membahas metode penentuan komponen perisa buah dalam *e-liquid* yang telah dianalisis menggunakan kromatografi gas dan kromatografi cair, yang telah dikombinasikan dengan teknik lainnya. Selain itu, kajian ini juga mengevaluasi keunggulan dan kelemahan masing-masing metode. Pemilihan metode yang tepat menjadi aspek krusial untuk memastikan analisis yang akurat dan andal dalam penggunaan sehari-hari. Temuan ini penting dalam merumuskan regulasi yang lebih ketat, terutama di Indonesia, sehingga standar keamanan *e-liquid* rokok elektrik dapat ditingkatkan guna melindungi konsumen dari potensi risiko kesehatan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Yoong SL, Hall A, Leonard A, et al. Prevalence of electronic nicotine delivery systems and electronic non-nicotine delivery systems in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Public Health*. 2021;6(9):e661-e673. doi:10.1016/S2468-2667(21)00106-7
2. Ceasar RC, Braymiller JL, Kechter A, et al. Perceiving E-Cigarettes as Safe and Safer Alternative to Cigarettes Among Young Adults. *Substance Use & Addiction Journal*. 2024;45(2):181-190. doi:10.1177/29767342231218533

3. Marques P, Piqueras L, Sanz MJ. An updated overview of e-cigarette impact on human health. *Respir Res.* 2021;22(1). doi:10.1186/s12931-021-01737-5
4. Krüsemann EJZ, Van Tiel L, Pennings JLA, et al. Both Nonsmoking Youth and Smoking Adults like Sweet and Minty E-liquid Flavors More Than Tobacco Flavor. *Chem Senses.* 2021;46. doi:10.1093/chemse/bjab009
5. Landry RL, Groom AL, Vu THT, et al. The role of flavors in vaping initiation and satisfaction among U.S. adults. *Addictive Behaviors.* 2019;99. doi:10.1016/j.addbeh.2019.106077
6. Ma S, Qiu Z, Yang Q, Bridges JFP, Chen J, Shang C. Expanding the E-Liquid Flavor Wheel: Classification of Emerging E-Liquid Flavors in Online Vape Shops. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(21). doi:10.3390/ijerph192113953
7. Dagla I, Gikas E, Tsarbopoulos A. Two Fast GC-MS Methods for the Measurement of Nicotine, Propylene Glycol, Vegetable Glycol, Ethylmaltol, Diacetyl, and Acetylpropionyl in Refill Liquids for E-Cigarettes. *Molecules.* 2023;28(4). doi:10.3390/molecules28041902
8. Muthumalage T, Lamb T, Friedman MR, Rahman I. E-cigarette flavored pods induce inflammation, epithelial barrier dysfunction, and DNA damage in lung epithelial cells and monocytes. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-51643-6
9. Muthumalage T, Prinz M, Ansah KO, Gerloff J, Sundar IK, Rahman I. Inflammatory and oxidative responses induced by exposure to commonly used e-cigarette flavoring chemicals and flavored e-liquids without nicotine. *Front Physiol.* 2018;8(JAN). doi:10.3389/fphys.2017.01130
10. Kosmider L, Sobczak A, Prokopowicz A, et al. Cherry-flavoured electronic cigarettes expose users to the inhalation irritant, Benzaldehyde. *Thorax.* 2016;71(4):376-377. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-207895
11. Holden LL, Truong L, Simonich MT, Tanguay RL. Assessing the hazard of E-Cigarette flavor mixtures using zebrafish. *Food and Chemical Toxicology.* 2020;136. doi:10.1016/j.fct.2019.110945
12. Lee WH, Ong SG, Zhou Y, et al. Modeling Cardiovascular Risks of E-Cigarettes With Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(21):2722-2737. doi:10.1016/j.jacc.2019.03.476
13. Tavaréz ZQ, Croft DP, Li D, et al. Fruit flavors in electronic cigarettes (ECIGs) are associated with nocturnal dry cough: A population longitudinal analysis. *PLoS One.* 2024;19(6 June). doi:10.1371/journal.pone.0306467
14. Strongin RM. Annual Review of Analytical Chemistry E-Cigarette Chemistry and Analytical Detection. Published online 2024. doi:10.1146/annurev-anchem-061318
15. Famele M, Ferranti C, Abenavoli C, Palleschi L, Mancinelli R, Draisci R. The Chemical Components of Electronic Cigarette Cartridges and Refill Fluids: Review of Analytical Methods. *Nicotine & Tobacco Research.* 2015;17(3):271-279. doi:10.1093/ntr/ntu197
16. Deng H, Tang S, Yang F, et al. Recent advances in the analysis of electronic cigarette liquids and aerosols: Sample preparation and chromatographic characterization. *J Chromatogr A.* 2023;1712. doi:10.1016/j.chroma.2023.464495
17. DeVito EE, Krishnan-Sarin S. E-cigarettes: Impact of E-Liquid Components and Device Characteristics on Nicotine Exposure. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2017;15. doi:10.2174/1570159x15666171016164430
18. Eddingsaas N, Pagano T, Cummings C, Rahman I, Robinson R, Hensel E. Qualitative analysis of e-liquid emissions as a function of flavor additives using two aerosol capture methods. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(2). doi:10.3390/ijerph15020323
19. Augustini ALRM, Sielemann S, Telgheder U. Strategy for the identification of flavor compounds in e-liquids by correlating the analysis of GCxIMS and GC-MS. *Talanta.* 2021;230. doi:10.1016/j.talanta.2021.122318
20. Abouassali O, Chang M, Chidipi B, et al. In vitro and in vivo cardiac toxicity of flavored electronic nicotine delivery systems. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021;320(1):H133-H143. doi:10.1152/AJPHEART.00283.2020
21. Winters BR, Kochar TK, Clapp PW, Jaspers I, Madden MC. Impact of E-Cigarette Liquid Flavoring Agents on Activity of Microsomal Recombinant CYP2A6, the Primary Nicotine-Metabolizing Enzyme. *Chem Res Toxicol.* 2020;33(7):1689-1697. doi:10.1021/acs.chemrestox.9b00514

22. Haworth-Duff A, Parkes GMB, Reed NJ. Profiling flavourings in strawberry-flavoured e-liquid using headspace-gas chromatography–mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2023;15(10):1077-1083. doi:10.1002/dta.3451
23. Aszyk J, Kubica P, Woźniak MK, Namieśnik J, Wasik A, Kot-Wasik A. Evaluation of flavour profiles in e-cigarette refill solutions using gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2018;1547:86-98. doi:10.1016/j.chroma.2018.03.009
24. Aszyk J, Woźniak MK, Kubica P, Kot-Wasik A, Namieśnik J, Wasik A. Comprehensive determination of flavouring additives and nicotine in e-cigarette refill solutions. Part II: Gas-chromatography–mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A.* 2017;1517:156-164. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.057
25. Tierney PA, Karpinski CD, Brown JE, Luo W, Pankow JF. Flavour chemicals in electronic cigarette fluids. *Tob Control.* 2016;25(E1):e10-e15. doi:10.1136/tobaccocontrol-2014-052175
26. Aszyk J, Kubica P, Kot-Wasik A, Namieśnik J, Wasik A. Comprehensive determination of flavouring additives and nicotine in e-cigarette refill solutions. Part I: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr A.* 2017;1519:45-54. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.056
27. Fürst P, Bernsmann T, Baumeister D. *Optimization of GC-MS/MS for the Determination of Dioxins and PCBs in Feed and Food and Comparison of Results with GC-HRMS.* Vol 49.; 2016. doi:10.1007/698_2016_460
28. Muthumalage T, Lamb T, Friedman MR, Rahman I. E-cigarette flavored pods induce inflammation, epithelial barrier dysfunction, and DNA damage in lung epithelial cells and monocytes. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-51643-6
29. Lewis SW. *Liquid and Thin-Layer Chromatography.* Vol 3.; 2022. doi:10.1016/B978-0-12-823677-2.00053-2
30. Jaiswal AK, Millo T, Gupta M, Teotia AK, Tanwar TC, Gupta S. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and its forensic applications - A review. *Journal of Forensic Medicine and Toxicology.* 2008;25(2):19-31.
31. Chen X, Wang L. Analysis of the Application of High Performance Liquid Chromatography. In: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* Vol 769. ; 2021. doi:10.1088/1755-1315/769/3/032020
32. Ayala-Cabrera JF, Moyano E, Santos FJ. Gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the determination of fluorotelomer olefins, fluorotelomer alcohols, perfluoroalkyl sulfonamides and sulfonamido-ethanols in water. *J Chromatogr A.* 2020;1609. doi:10.1016/j.chroma.2019.460463
33. Rickard BP, Ho H, Tiley JB, Jaspers I, Brouwer KLR. E-Cigarette Flavoring Chemicals Induce Cytotoxicity in HepG2 Cells. *ACS Omega.* 2021;6(10):6708-6713. doi:10.1021/acsomega.0c05639
34. Durrani K, El Din SMA, Sun Y, Rule AM, Bressler J. Ethyl maltol enhances copper mediated cytotoxicity in lung epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2021;410. doi:10.1016/j.taap.2020.115354
35. Staal YC, Gremmer E, Duijm G, et al. In Vitro Assessment of Translocation and Toxicological Effects of Nicotine and Ethyl Maltol from e-Cigarettes Using Air-Liquid Interface-Cultured Bronchial Epithelial Cells. *Appl In Vitro Toxicol.* 2024;10(1):1-14. doi:10.1089/aivt.2023.0019
36. Erythropel HC, Jabba SV, Dewinter TM, et al. Formation of flavorant-propylene Glycol Adducts with Novel Toxicological Properties in Chemically Unstable E-Cigarette Liquids. *Nicotine and Tobacco Research.* 2019;21(9):1248-1258. doi:10.1093/ntr/nty192
37. Muthumalage T, Prinz M, Ansah KO, Gerloff J, Sundar IK, Rahman I. Inflammatory and oxidative responses induced by exposure to commonly used e-cigarette flavoring chemicals and flavored e-liquids without nicotine. *Front Physiol.* 2018;8(JAN). doi:10.3389/fphys.2017.01130
38. Kerber PJ, Peyton DH. Kinetics of Aldehyde Flavorant-Acetal Formation in E-Liquids with Different E-Cigarette Solvents and Common Additives Studied by ¹H NMR Spectroscopy. *Chem Res Toxicol.* 2022;35(8):1410-1417. doi:10.1021/acs.chemrestox.2c00159
39. Lu X, Sun L, Xie Z, Li D. Perception of the Food and Drug Administration Electronic Cigarette Flavor Enforcement Policy on Twitter: Observational Study. *JMIR Public Health Surveill.* 2022;8(3). doi:10.2196/25697
40. Havermans A, Krüsemann EJZ, Pennings J, De Graaf K, Boesveldt S, Talhout R. Nearly 20 000 e-liquids and 250 unique flavour descriptions: An overview of the Dutch market based on information from manufacturers. *Tob Control.* 2021;30(1):57-62. doi:10.1136/tobaccocontrol-2019-055303

41. Lestari KS, Humairo MV, Agustina U. Formaldehyde Vapor Concentration in Electronic Cigarettes and Health Complaints of Electronic Cigarettes Smokers in Indonesia. *J Environ Public Health*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/9013430
42. Kowitt SD, Anshari D, Orlan EN, et al. Impact of an e-cigarette tax on cigarette and e-cigarette use in a middle-income country: A study from Indonesia using a pre-post design. *BMJ Open*. 2022;12(5). doi:10.1136/bmjopen-2021-055483

Efektivitas dan Efek Samping pada Terapi *Multi-Drug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB): Kajian Literatur

Effectiveness and Side Effects in the Management of Multi-Drug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): A Narrative Review

Dwi Arymbhi Sanjaya^{1*}, Herleeyana Meriyani¹, Rr. Asih Juanita¹, Nyoman Budiarta Siada¹, Lusy Noviani²

¹Fakultas Farmasi,
Universitas
Mahasaraswati
Denpasar, Jln. Kamboja,
No. 11 A, Denpasar,
80233, Indonesia

²Program Studi Farmasi,
Fakultas Kedokteran dan
Ilmu Kesehatan,
Universitas Katolik
Indonesia Atma Jaya,
Jakarta, Indonesia

Diajukan: 07-08-2024

Direview: 15-02-2025

Disetujui: 10-04-2025

Kata Kunci: amikasin,
bedaquiline,
fluorokuinolon, MDR-TB.

Keywords: amikacin,
bedaquiline,
fluoroquinolone, MDR-TB.

Korespondensi:
Dwi Arymbhi Sanjaya
arymbhi@unmas.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB) menyebabkan angka kesembuhan menjadi menurun. Secara global, angka kejadian MDR-TB pada tahun 2015-2020 relatif stabil namun terjadi peningkatan pada tahun 2021. Pada tahun 2020, *World Health Organization* (WHO) memperkirakan terdapat 437.000 kasus MDR-TB di dunia dan jumlah tersebut mengalami peningkatan menjadi 450.000 kasus pada tahun 2021. Adanya berbagai macam rejimen terapi yang direkomendasikan WHO maka perlu dilakukan sebuah kajian literatur yang memberikan gambaran tentang efektivitas terapi dan efek samping penggunaan obat pada kasus MDR-TB. Kajian ini akan memberikan keterbaruan informasi dan dapat dijadikan referensi untuk mengidentifikasi dan mengelola efek samping secara dini. Kajian literatur ini bersifat *narrative review* (kajian naratif) dengan mengumpulkan dan menelaah informasi dari berbagai artikel internasional tentang efektivitas dan efek samping pada penatalaksanaan MDR-TB. Pencarian artikel menggunakan database *PubMed*, *PlosOne*, dan *ScienceDirect* sejak Januari 2014 hingga Juni 2024. Sebanyak enam artikel relevan dari total 609 artikel yang disintesis. Secara deskriptif, efektivitas terapi MDR-TB menggunakan berbagai rejimen terapi dengan obat-obat yang direkomendasikan WHO menunjukkan angka kesembuhan yang tinggi (*cured*>50%). Angka kejadian efek samping pada terapi MDR-TB lebih kecil dibandingkan dengan efektivitas terapi. Namun, pada penelitian yang dilakukan di Rumah sakit di Wuhan Jinyintan-China pada periode Juli 2019-Desember 2020, menunjukkan adanya efek samping yang timbul pada semua subjek penelitian. Efek samping tersebut antara lain: mual dan muntah akibat penggunaan protionamide, gatifloksasin, dan etambutol; hiperurisemia akibat penggunaan pirazinamid, dan hiperpigmentasi akibat klofazimin. Pemilihan rejimen terapi disarankan berdasarkan pada hasil pemeriksaan kultur, kondisi pasien, serta ketersediaan obat di masing-masing negara.

Abstract

Multi-drug-resistant tuberculosis (MDR-TB) leads to a reduced cure rate for tuberculosis treatment. The global number of MDR-TB cases remained relatively stable between 2015 and 2020 but increased in 2021. In 2020, the World Health Organization (WHO) estimated 437,000 MDR-TB cases worldwide, which rose to 450,000 cases in 2021. Various treatment regimens recommended by the WHO require a review of the literature on the efficacy and side effects of drug use in MDR-TB. This review aims to provide updated information that can be used as a reference for the early identification and management of side effects. The article was a narrative review that collected and analyzed information from various international articles on databases such as PubMed, PlosOne, and ScienceDirect from January 2014 to June 2024. A total of six relevant articles were synthesized from 609 articles. The effectiveness of MDR-TB therapy with WHO-recommended drugs has shown a high cure rate (*cured*>50%). The incidence of side effects in MDR-TB therapy is smaller compared to the effectiveness of treatment. However, a study conducted at Wuhan Jinyintan Hospital in China from July 2019 to December 2020 showed that all study subjects experienced side effects. This included nausea and vomiting from protionamide, gatifloxacin, and ethambutol; hyperuricemia from pyrazinamide, and hyperpigmentation from clofazimine. It is recommended that a therapy regimen be selected based on culture test results, patient conditions, and drug availability in each country.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Sanjaya, DA, Meriyani, H, Juanita, RA, Siada, NB, Noviani, L. Efektivitas dan Efek Samping pada Terapi *Multi-Drug-Resistant Tuberculosis* (MDR-TB): Kajian Literatur. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 25-39, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9685](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9685)

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TBC) merupakan penyakit yang disebabkan oleh *Mycrobacterium tuberculosis*, yang dapat menyebabkan infeksi pada paru-paru maupun infeksi di luar paru-paru (ekstra paru). *World Health Organization* (WHO) mencanangkan TBC paru sebagai salah satu kedaruratan dunia (*global emergency*). Berdasarkan laporan dari WHO, pada tahun 2018 terdapat 10 juta kasus TBC dan sebanyak 1,5 juta meninggal akibat TBC.¹ Penyakit ini menduduki urutan ke-13 penyebab kematian dan urutan ke-2 penyakit dengan tingkat mortalitas yang tinggi di dunia.² Pada tahun 2021, Indonesia menempati peringkat ke-2 dengan kasus TB terbanyak di dunia setelah India. Pada tahun 2020 jumlah kasus TB di Indonesia mencapai 824 ribu dan terjadi peningkatan pada tahun 2021 dengan jumlah kasus sebanyak 969 ribu. TBC di Indonesia menempati urutan ke-4 sebagai penyakit penyebab kematian terbanyak setelah diabetes mellitus.³

Peningkatan prevalensi penyakit TBC disebabkan oleh kurangnya pengetahuan penderita tentang bahaya TBC, kepatuhan pasien terhadap pengobatan yang sering diabaikan, dan adanya efek samping obat yang ditimbulkan oleh terapi Obat Antituberkulosis (OAT). Pengobatan TBC membutuhkan pemberian antibiotik dalam jangka panjang. Ketidakepatuhan terhadap penggunaan antibiotik tersebut, akan menimbulkan resistensi terhadap antibiotik. *Multi-drug resistant tuberculosis* (MDR-TB) merupakan penyakit tuberkulosis yang disebabkan oleh *Mycrobacterium tuberculosis* yang telah resisten terhadap isoniazid (INH) dan rifampisin (RIF).⁴

Adanya kasus MDR-TB menyebabkan angka kesembuhan dari TBC menjadi menurun.⁵⁻⁷ Secara global, jumlah pengidap MDR-TB pada tahun 2015-2020 relatif stabil namun terjadi peningkatan pada tahun 2021. Pada tahun 2020, WHO memperkirakan terdapat 437.000 kasus MDR-TB di dunia dan jumlah tersebut mengalami peningkatan menjadi 450.000 kasus pada tahun 2021.² Tidak hanya di dunia, peningkatan kasus MDR-TB juga terjadi di Indonesia dari tahun 2020-2021. Perkiraan kasus MDR-TB pada tahun 2020 sebanyak 24.000 kasus sedangkan pada tahun 2021 meningkat menjadi 28.000 kasus.³

Rejimen terapi pada MDR-TB yang direkomendasikan oleh WHO yaitu menggunakan bedaquiline, pretomanid, linezolid, dan moksifloksasin (BPaLM) selama enam (6) bulan atau pemberian agen oral selama sembilan (9) bulan atau terapi jangka panjang (18-20 bulan) dengan menggunakan tiga (3) obat dari Grup A (levofloksasin atau moksifloksasin, bedaquiline, dan linezolid) dikombinasikan dengan minimal satu (1) obat dari Grup B (klofazimin, dan sikloserin atau terizidone). Apabila tidak dapat menggunakan komposisi dari Grup A dan Grup B, maka dapat ditambahkan obat Grup C (etambutol, delamanid, pirazinamid, imipenem–cilastatin atau meropenem, amikasin atau streptomisin, ethionamide atau protionamide, dan *p-aminosalicylic acid*).⁴

Obat-obat yang digunakan pada MDR-TB, seperti moksifloksasin, linezolid, klofazimin, bedaquiline, delamanid, rifapentine, dan pretonamid sedang dalam uji klinis fase dua dan tiga.⁸ Namun, pada tahun 2022 melalui *WHO consolidated guidelines on tuberculosis-Module 4: Treatment drug-resistant tuberculosis treatment, 2022 update*, obat-obat tersebut telah direkomendasikan untuk digunakan pada terapi MDR-TB.^{9,10} Selain itu, adanya berbagai macam rejimen terapi pada kasus MDR-TB, maka perlu dilakukan sebuah kajian literatur yang memberikan gambaran tentang efektivitas terapi dan efek samping penggunaan obat pada kasus MDR-TB. Terapi pada MDR-TB menggunakan kombinasi obat-obat lini kedua dengan durasi waktu yang berbeda tergantung pada jenis obat yang digunakan. Oleh karena itu, kajian efektivitas dan efek samping pada MDR-TB sangat penting untuk memastikan bahwa rejimen obat yang digunakan mampu mengeradikasi bakteri TBC yang telah resisten. Kajian ini dapat juga dijadikan referensi untuk mengidentifikasi dan mengelola efek samping secara dini.

Kajian literatur tentang efektivitas dan efek samping pada terapi MDR-TB telah banyak dilakukan. Namun, kajian-kajian tersebut hanya mengamati terapi dengan penambahan rejimen tertentu seperti bedaquilin, delamanid, atau linezolid.¹¹⁻¹⁴ Sebuah *systematic review* mengkaji tentang efektivitas dan keamanan terapi MDR-TB, namun hanya pada terapi jangka pendek.¹⁵ Sebuah meta-analisis telah dilakukan, namun hanya mengkaji tentang kejadian obat yang tidak dikehendaki yang berhubungan dengan terapi MDR-TB.¹⁶ Kajian literatur ini memberikan keterbaruan informasi yang akan memberikan gambaran tentang

efektivitas dan efek samping pada terapi MDR-TB pada semua rejimen baik jangka panjang maupun jangka pendek.

METODE PENELITIAN

Kajian literatur ini bersifat *narrative review* (kajian naratif) dengan mengumpulkan dan menelaah informasi dari berbagai artikel internasional tentang efektivitas dan efek samping pada penatalaksanaan MDR-TB. Tahapan yang dilakukan dalam penyusunan kajian literatur ini yaitu, penelusuran artikel, skrining artikel, seleksi artikel, dan sintesis artikel.

Penelusuran Artikel

Tahap penelusuran atau pencarian artikel merupakan suatu proses pencarian artikel secara komprehensif dari beberapa database. Pencarian artikel yang digunakan dalam kajian literatur ini menggunakan database *PubMed*, *PlosOne*, dan *ScienceDirect*. Pencarian artikel dilakukan pada tanggal 10 hingga 18 Juli 2024. Pencarian artikel tidak dilakukan secara manual. Pencarian artikel pada database menggunakan kata kunci dengan bantuan *Boolean Logic*. Artikel yang dikaji dan digunakan adalah artikel yang terpublikasi dari Januari 2014 hingga Juni 2024.

Kata kunci yang digunakan dalam penelusuran artikel dikombinasikan dengan *Boolean Logic*. Kata kunci yang digunakan meliputi (*effectiveness AND tuberculosis AND MDR AND treatment*) dan (*adverse reaction AND tuberculosis AND MDR AND treatment*), serta (*safety AND tuberculosis AND MDR AND treatment*). Seluruh kata kunci yang dikombinasikan dengan *Boolean Logic* digunakan pada seluruh database.

Skrining Artikel

Artikel yang diperoleh dari database dilakukan pemeriksaan duplikasi dengan menggunakan aplikasi *Covidence*® dari *Cochrane*. Artikel yang tidak terduplikasi selanjutnya dilakukan skrining judul dan abstrak. Judul dan abstrak yang tidak relevan dengan rumusan masalah dalam penelitian dikeluarkan. Skrining ini dilakukan oleh satu penulis secara independen. Artikel yang telah melalui skrining judul dan abstrak disaring kembali oleh dua penulis berbeda. Apabila terjadi konflik maka dilakukan diskusi sebelum masuk ke tahap seleksi artikel.

Seleksi Artikel

Tahap ini merupakan tahap untuk memilih artikel dengan menggunakan *Covidence*® dari *Cochrane* sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang dilakukan oleh dua orang penulis. Apabila terjadi konflik, maka pengambilan keputusan dalam seleksi ini melibatkan salah satu penulis yang lain. Artikel yang memenuhi kriteria inklusi yaitu artikel yang dipublikasikan dalam Bahasa Inggris, dapat diakses penuh, menggunakan pasien MDR-TB sebagai subjek penelitian tanpa komplikasi *human immunodeficiency virus* (HIV) dan *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) atau infeksi lainnya, menggunakan pengobatan MDR-TB, serta mencantumkan efektivitas dan efek samping pengobatan MDR-TB. Artikel yang menggunakan subjek penelitiannya pada kelompok pediatrik dan artikel yang menggunakan hewan, artikel dalam bentuk *review*, studi protokol, serta laporan kasus tidak diikutsertakan dalam kajian literatur ini. Penilaian kualitas artikel dilakukan menggunakan instrumen *Critical Appraisal Skills Program* (CASP). Penilaian ini dapat membantu mengidentifikasi potensi bias dan mengevaluasi artikel yang dikaji.¹⁷ Penilaian kualitas artikel dilakukan oleh dua orang penulis. Apabila terdapat perbedaan hasil penilaian, maka proses ini melibatkan salah satu penulis lainnya.

Sintesis Artikel

Data yang disintesis dari setiap artikel yang relevan meliputi tempat dan negara penelitian, tahun pelaksanaan penelitian, jumlah sampel, kriteria inklusi dan eksklusi, jenis intervensi yang diberikan, efektivitas, dan efek samping.

Data efek samping dicatat sebagai seluruh kejadian efek samping yang terjadi beserta obat yang berkontribusi menimbulkan efek samping tersebut. Efektivitas terapi terdiri dari kategori *cured* (sembuh), *completed treatment* (pengobatan tuntas), *failure* (gagal), *default/lost to follow up*, dan *death* (mati) yang

merujuk pada definisi yang ditetapkan oleh WHO. *Cured* (sembuh) didefinisikan sebagai pasien yang telah menerima pengobatan tuntas dengan 5 hasil kultur negatif selama 12 bulan pengobatan dan tanpa adanya bukti kegagalan terapi. *Completed treatment* (pengobatan tuntas) ditentukan dari hasil kultur bakteri pada akhir pengobatan dengan kurang dari tiga hasil kultur negatif. *Failure* (gagal) didefinisikan sebagai pasien yang memiliki hasil kultur sputum positif dalam 12 bulan terakhir dari rangkaian pengobatan atau jika salah satu dari tiga kultur terakhir positif atau pengobatan harus dihentikan karena adanya reaksi klinis dan radiologis atau efek samping. *Default/lost to follow up* didefinisikan sebagai pasien yang pengobatannya dihentikan setidaknya selama 2 bulan berturut-turut karena berbagai alasan. *Death* (mati) didefinisikan sebagai pasien yang meninggal karena berbagai alasan selama pengobatan.^{18,19}

Seluruh data dari artikel yang terpilih disintesis dengan menggunakan matriks sintesis. Matriks ini menyajikan informasi tentang tempat dan negara penelitian, tahun pelaksanaan penelitian, jumlah sampel, kriteria inklusi dan eksklusi, jenis intervensi yang diberikan, efektivitas, dan efek samping disertai dengan angka kejadian (n) dan persentasenya. Data yang terkumpul disajikan dalam bentuk tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 609 artikel diperoleh melalui pencarian di database *PubMed*, *PlosOne*, dan *ScienceDirect*. Setelah dilakukan proses skrining berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi, diperoleh enam artikel yang relevan untuk disintesis. Alur seleksi artikel dalam kajian ini dapat diamati pada **Gambar 1**. Enam artikel yang relevan tersebut memiliki kualitas yang baik berdasarkan penilaian kualitas yang telah dilakukan.

Pada **Tabel 1** dapat diamati karakteristik artikel yang digunakan dalam kajian literatur ini. Penelitian dilakukan di rumah sakit wilayah Asia (China, Thailand, dan Pakistan). Terdapat dua artikel dengan desain penelitian eksperimental dan empat artikel dengan desain observasional.

Tabel 1. Karakteristik Artikel yang Disintesis

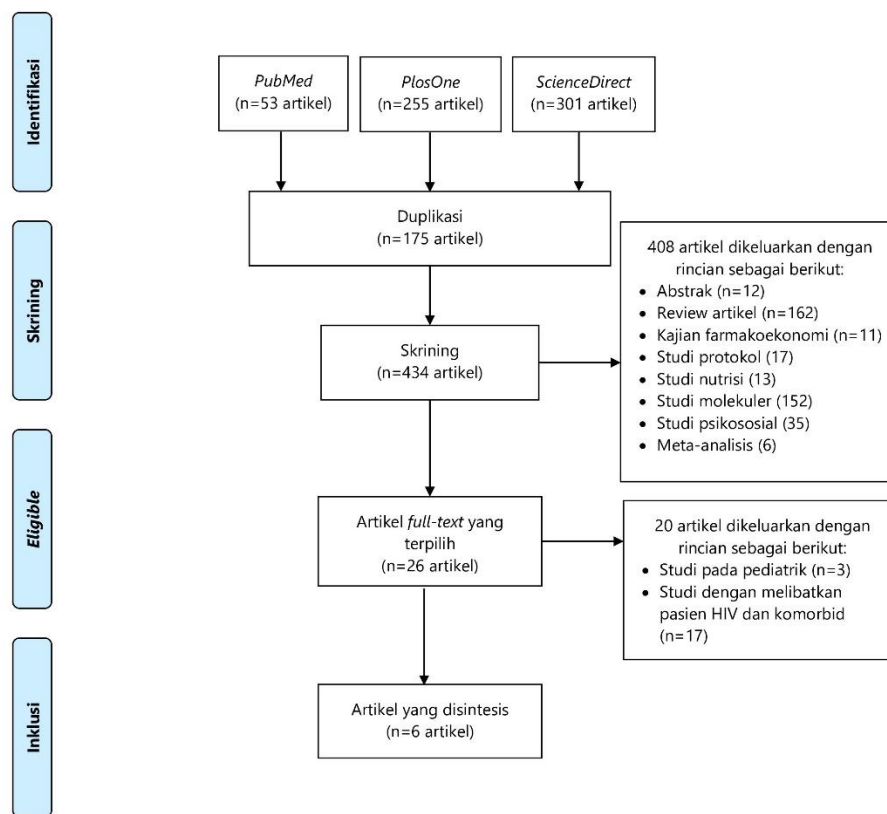
Nama Penulis	Tempat dan Negara Penelitian	Tahun Pengambilan Data
Sun W, Wu Z, Zhou Y, <i>et al.</i>	Rumah sakit di Shanghai-China	Januari 2017-Juni 2018
Yao G, Zhu M, Nie Q, <i>et al.</i>	Rumah sakit di Wuhan Jinyintan-China	Januari 2019-Desember 2019
Sun F, Li Y, Chen Y, <i>et al.</i>	Rumah sakit di China	2014
Sangsayunh P, Sanchat T, Chuchottaworn C, Cheewakul K, Rattanawai S	Klinik di Thailand	Agustus 2021-April 2023
Nie Q, Tao L, Li Y, <i>et al.</i>	Rumah sakit di Wuhan Jinyintan-China	Juli 2019-Desember 2020
Munir MK, Saeed MS, Haider SZ, Shamim S	Rumah sakit di Pakistan	2020

Penatalaksanaan MDR-TB

Penatalaksanaan MDR-TB oleh WHO terdiri dari berbagai macam rekomendasi terapi, yaitu BPaLM selama enam bulan (26 minggu), atau pemberian bedaquiline, pretomanid, dan linezolid (BPaL) jika resisten terhadap fluorokuinolon. Pemberian BPaL dapat dilanjutkan hingga sembilan bulan (39 minggu) jika terdapat keterbatasan dalam konversi kultur dan penilaian respon klinis pada bulan ke-4 hingga ke-6.⁴

Rekomendasi terapi lain yang dapat digunakan dalam penatalaksanaan MDR-TB menurut WHO adalah pemberian agen oral selama 9 bulan. Terapi fase awal dapat diberikan selama empat bulan. Namun, apabila hasil kultur sputum masih positif pada akhir bulan ke-4, maka terapi fase awal dapat diperpanjang menjadi

enam bulan. Terapi fase lanjutan diberikan selama 5 bulan. Terapi fase awal terdiri dari bedaquiline (digunakan hanya 6 bulan saja), levofloksasin atau moksifloksasin, klofazimin, ethionamide, etambutol, isoniazid dosis tinggi, dan pirazinamid (4-6 Bdq_(6bulan)-Lfx/Mfx-Cfz-Z-E-Hh-Eto) atau bedaquiline (hanya diberikan 6 bulan saja), linezolid (hanya diberikan selama 2 bulan pertama), levofloksasin atau moksifloksasin, klofazimin, etambutol, isoniazid dosis tinggi, dan pirazinamid (4-6 Bdq_(6bulan)-Lzd_(2bulan)-Lfx/Mfx-Cfz-Z-E-Hh). Fase lanjutan terdiri dari levofloksasin/moksifloksasin, klofazimin, pirazinamid, dan etambutol (5 Lfx/Mfx-Cfz-Z-E).⁴



Gambar 1. Diagram alur penelusuran artikel

Terapi jangka panjang juga menjadi salah satu rekomendasi terapi pada MDR-TB. Terapi jangka panjang (18-20 bulan) menggunakan 3 obat dari Grup A (levofloksasin atau moksifloksasin, bedaquiline, dan linezolid) dikombinasikan dengan minimal 1 obat dari Grup B (klofazimin, dan sikloserin atau terizidone). Apabila tidak dapat menggunakan komposisi dari Grup A dan Grup B, maka dapat ditambahkan obat Grup C (etambutol, delamanid, pirazinamid, imipenem–cilastatin atau meropenem, amikasin atau streptomisin, ethionamide atau protionamide, dan *p-aminosalicylic acid*).⁴

Apabila mengacu pada hasil sintesis di **Tabel 2**, rejimen terapi MDR-TB yang digunakan mengacu pada penatalaksanaan MDR-TB oleh WHO, namun dengan komposisi obat yang berbeda-beda. Adanya perbedaan terapi pada setiap wilayah dapat disebabkan oleh pola resistensi yang berbeda. Pemilihan terapi pada MDR-TB harus disesuaikan dengan pola resistensi bakteri guna mencapai efektivitas terapi. Selain itu, ketersediaan dan biaya obat, serta kapasitas sistem kesehatan juga merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi perbedaan rejimen terapi MDR-TB pada berbagai wilayah. Rejimen yang intensif dapat diimplementasikan di wilayah yang memiliki sumber daya dan sistem kesehatan yang kuat.^{4,15,20}

Beberapa jenis obat yang digunakan dalam terapi MDR-TB, seperti seperti moksifloksasin, linezolid, klofazimin, bedaquiline, delamanid, rifapentine, dan pretonamid merupakan obat-obat yang sedang dalam uji klinis fase dua dan tiga seperti yang tertera dalam **Gambar 2**.⁸ Penatalaksanaan MDR-TB dengan menggunakan kombinasi obat-obat baru lebih efektif, memiliki profil efek samping yang dapat ditoleransi oleh

pasien, dan memperpendek rejimen pengobatan pasien. Durasi terapi yang panjang menyebabkan rendahnya kepatuhan pasien sehingga dapat menjadi hambatan dalam penatalaksanaan MDR-TB.²¹



Gambar 2. Tahapan uji pre-klinik dan uji klinik obat-obat MDR-TB

Profil Efektivitas pada Pengobatan MDR-TB

Penatalaksanaan MDR-TB yang tersaji dalam **Tabel 2** terdiri dari berbagai macam rekomendasi terapi sesuai dengan pedoman WHO, namun dengan komposisi obat yang bervariasi. Apabila diamati secara deskriptif pada hasil sintesis artikel, efektivitas terapi MDR-TB menggunakan berbagai rejimen terapi dengan obat-obat yang direkomendasikan WHO menunjukkan angka kesembuhan yang tinggi (*cured* > 50%) baik dalam terapi jangka pendek maupun jangka panjang.^{18,19,22–25} Empat penelitian yang dilakukan di rumah sakit di China menunjukkan persentase angka kesembuhan yang bervariasi. Penelitian yang menggunakan rejimen terapi bedaquiline-levofloksasin-linezolid-sikloserin-klofazimin selama 6 bulan hingga 12 bulan, menunjukkan persentase angka kesembuhan tertinggi mencapai 82%.¹⁹ Penelitian yang dilakukan di sebuah Klinik di Thailand yang menggunakan rejimen terapi MDR-TB dengan BPAL menunjukkan persentase angka kesembuhan mencapai 90%.²³ Penelitian yang dilakukan di rumah sakit di Pakistan menggunakan rejimen terapi isoniazid-pirazinamid-etambutol-amikasin-levofloksasin, ethionamide, dan klofazimin selama 9 hingga 11 bulan menunjukkan persentase kesembuhan 75,8%.²⁵

Dalam sebuah *systematic review* yang mengkaji tentang efektivitas pada terapi MDR-TB jangka pendek menyatakan bahwa terapi MDR-TB jangka pendek efektif dalam mengobati MDR-TB. Terapi yang paling efektif menurut kajian tersebut adalah kanamisin-isoniazid-klofazimin-etambutol-protionamide-pirazinamid-gatifloksasin dalam fase intensif selama empat bulan dan klofazimin-etambutol- pirazinamid-gatifloksasin-protionamide dalam fase lanjutan selama delapan bulan. Dalam *systematic review* tersebut tidak ada terapi yang menggunakan bedaquiline.¹⁵ Pada kajian literatur ini, terdapat rejimen terapi MDR-TB yang menggunakan bedaquiline sebagai salah satu rejimen baru yang dirilis oleh WHO.

Bedaquiline merupakan salah satu obat MDR-TB terbaru yang telah disetujui penggunaannya oleh WHO. Bedaquiline mampu menghambat respirasi bakteri bahkan pada bakteri yang tidak aktif melalui penghambatan sintesis adenosine trifosfat (ATP). Bedaquiline direkomendasikan oleh *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) apabila rejimen terapi MDR-TB tidak efektif atau jika terjadi resistensi terhadap fluorokuinolon. Namun, penggunaan bedaquiline hanya dibatasi hingga enam bulan pada kasus MDR-TB.^{21,26}

Penggunaan bedaquiline yang dikombinasikan dengan klofazimin mampu meningkatkan efektivitas bedaquiline terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Namun, penggunaan klofazimin menimbulkan efek samping yang menyebabkan perubahan pada warna kulit, khususnya pada orang Asia. Selain itu, harga klofazimin masih cukup mahal. Oleh karena itu, pada beberapa kasus, klofazimin diganti dengan sikloserin.^{18,19} Sikloserin merupakan Grup B dari terapi MDR-TB yang memiliki efektivitas antibakteri dengan harga yang lebih murah dibandingkan klofazimin.¹⁸

Pada hasil sintesis dapat diamati bahwa seluruh kombinasi terapi melibatkan penggunaan golongan fluorokuinolon. Selain itu, pada kombinasi terapi yang menggunakan bedaquiline, maka tidak digunakan amikasin. Hanya satu artikel yang melaporkan penelitian di rumah sakit di Pakistan dengan penggunaan

kombinasi amikasin dan bedaquiline. Golongan fluorokuinolon (levofloksasin, moksifloksasin, dan gatifloksasin) merupakan golongan antibiotik spektrum luas yang digunakan untuk infeksi saluran nafas. Golongan fluorokuinolon merupakan komponen penting pada rejimen MDR-TB lini kedua yang merupakan salah satu kombinasi dari rejimen terapi BPALM dan merupakan salah satu antibiotik Grup A. Beberapa studi menunjukkan bahwa golongan fluorokuinolon memiliki efektivitas yang sangat baik, khususnya pada pengobatan MDR-TB yang resisten terhadap INH dan berpotensi mempersingkat durasi terapi.^{21,27} Fluorokuinolon mampu menghambat girase *deoxyribonucleic acid* (DNA) dan aktif terhadap mikobakterium persisten yang tidak bereplikasi. Namun, resistensi terhadap fluorokuinolon berkembang sangat cepat dan dapat terjadi resistensi silang, sehingga memerlukan hasil pemeriksaan sensitivitas bakteri terhadap antibiotik golongan fluorokuinolon sebelum digunakan dalam terapi.^{26,28,29}

Amikasin merupakan antibiotik spektrum luas dari golongan aminoglikosida yang bersifat bakterisidal. Amikasin menunjukkan aktivitas yang sangat baik terhadap *Mycobacterium*. Amikasin mampu menghambat sintesis protein penting pada bakteri. Selain itu, amikasin juga mampu mengikat subunit ribosom 30S pada bakteri dan mengganggu pengikatan mRNA dan situs akseptor tRNA yang mengakibatkan terjadinya kesalahan translasi sehingga dapat menghambat sintesis protein bakteri.²⁶

Profil Efek Samping pada Pengobatan MDR-TB

Berdasarkan hasil sintesis pada **Tabel 2**, angka kejadian efek samping pada terapi MDR-TB lebih kecil dibandingkan dengan efektivitas terapi.^{18,19,22–25} Namun, pada penelitian yang dilakukan di Rumah sakit di Wuhan Jinyintan-China pada periode Juli 2019-Desember 2020, menunjukkan adanya efek samping yang timbul pada semua subjek penelitian. Efek samping tersebut antara lain: mual dan muntah akibat penggunaan protionamide, gatifloksasin, dan etambutol; hiperurisemia akibat penggunaan pirazinamid, dan hiperpigmentasi akibat klorfazimin.²⁴ Pada hasil sintesis di **Tabel 2** juga dapat diamati bahwa rejimen terapi yang menggunakan protionamide, fluorokuinolon, dan etambutol menyebabkan efek samping pada saluran pencernaan. Dalam sebuah *systematic review* yang mengkaji efek samping pada terapi MDR-TB yang menggunakan rejimen terapi kanamisin-isoniazid-klorfazimin-etambutol-protionamide-pirazinamide-gatifloksasin menunjukkan bahwa persentase kejadian efek samping pada saluran pencernaan paling tinggi dibandingkan efek samping lainnya.¹⁵

Hasil sintesis pada **Tabel 2** menunjukkan bahwa terdapat tiga artikel yang menyatakan bahwa rejimen terapi yang menggunakan pirazinamid menimbulkan efek samping hiperurisemia. Namun, dari hasil sintesis juga dapat diamati bahwa pirazinamid juga mampu menyebabkan terjadinya peningkatan enzim liver bahkan bersifat hepatotoksik.^{18,22,24} Sebuah kajian literatur tentang efek samping pada terapi MDR-TB menyatakan bahwa hepatotoksik merupakan salah satu efek samping dari penggunaan pirazinamid. Selain itu, penggunaan pirazinamid juga dapat menyebabkan terjadinya elevasi enzim liver dan bersifat hepatotoksik.³⁰

Selain pirazinamid, penggunaan klorfazimin juga memiliki potensi efek samping kerusakan pada liver. Terdapat dua artikel dalam kajian literatur ini yang menunjukkan efek samping kerusakan liver dari rejimen yang mengandung klorfazimin.^{19,24} Terdapat satu artikel yang mengkombinasikan penggunaan klorfazimin dan pirazinamid yang menyebabkan terjadinya hepatotoksitas pada 24 pasien dari total 42 pasien.²⁴ Dalam sebuah *systematic review* yang mengkaji efek samping pada terapi MDR-TB yang menggunakan rejimen terapi kanamisin-isoniazid-klorfazimin-etambutol-protionamide-pirazinamide-gatifloksasin selama 8 bulan dan dilanjutkan selama 4 bulan menunjukkan bahwa efek samping pada liver merupakan efek samping dengan persentase tertinggi yaitu 48,8%.¹⁵ Selain menyebabkan kerusakan pada liver, salah satu efek samping klorfazimin yang sering terjadi adalah hiperpigmentasi. Hal ini disebabkan karena adanya penumpukan klorfazimin di bawah permukaan kulit. Hal ini sejalan dengan sebuah kajian yang menyatakan bahwa hiperpigmentasi merupakan efek samping yang sering terjadi pada penggunaan klorfazimin.³¹

Tabel 2. Kajian Efektivitas dan Efek Samping Pengobatan MDR-TB

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas			Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)		
Sun W, Wu Z, Zhou Y, et al.	Observasional	114 pasien yang terdiri dari: • 36 pasien dengan kasus baru yang diterapi MDR-TB • 78 pasien dengan kasus lama yang diterapi kembali dengan terapi MDR-TB	- Fase awal selama 6 bulan: amikasin, moksifloksasin/levofloksasin, sikloserin, protionamide, pasiniazine, dan pirazinamid - Fase lanjutan selama 12 bulan: moksifloksasin/levofloksasin, sikloserin, protionamide, pasiniazine, dan pirazinamid	- Pasien dengan MDR-TB yang resisten terhadap INH dan RIF - Pasien yang belum mendapatkan injeksi fluorokuinolon - Tidak resisten terhadap fluorokuinolon - Pasien MDR-TB yang telah menerima terapi lini pertama atau tidak pernah menerima terapi lini pertama atau menerima terapi lini kedua kurang dari 1 bulan	- Pasien pre XDR-TB dan XDR-TB yang resisten terhadap fluorokuinolon dan agen injeksi lini kedua - Pasien MDR-TB dengan penyakit serius dan penyakit sistem imun - Pasien TB ekstraparu - Pasien HIV atau pasien yang terinfeksi virus lain - Pasien yang mengkonsumsi agen imunosupresan - Mengkonsumsi fluorokuinolon lenih dari 1 bulan dalam jangka waktu 6 bulan - Pasie hamil, lanjut usia, dan bayi	Cured	86	75,4	Amikasin (n=12) - Kehilangan pendengaran (n=5) - Disfungsi renal (n=7) Pirazinamid (n=6) - Elevasi alanin aminotransferase (n=3) - Gout (n=3) Moksifloksasin (n=2) - Kemerahan pada kulit (n=1) - Gangguan pencernaan (n=1)	18
						Completed treatment	5	4,4		
						Failure	10	8,8		
						Default	11	9,6		
						Death	2	1,8		
Yao G, Zhu M, Nie Q, et al.	Eksprimental	68 pasien	34 pasien dalam Grup eksperimental yang diberikan bedaquilina^a, levofloksasin^b, linezolid^c, sikloserin^d, dan klofazimin^e selama 6 bulan lalu dilanjutkan hingga 12 bulan tanpa bedaquilina.	Pasien MDR-TB dengan kriteria: Usia > 18 tahun, tidak hamil, dan tidak memiliki penyakit jantung,	- Pasien pre XDR-TB dan XDR-TB yang resisten terhadap fluorokuinolon dan agen injeksi lini kedua - Terinfeksi bakteri lain selain <i>mycobacteria</i> - Penyakit komorbid yang parah	Cured pada Grup eksperimental	28	82	- Neuritis optik pada Grup kontrol (n=1) - Gagal fungsi hati pada Grup kontrol (n=1) - Gangguan mental berat dengan kecenderungan bunuh diri pada Grup	19
						Cured pada Grup kontrol	19	56		
						Failure pada Grup eksperimental	5	15		
						Failure pada Grup kontrol	13	38		

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas			Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)		
Sun F, Li Y, Chen Y, <i>et al.</i>	Eksperimental	76 pasien pada Grup Reguler 76 pasein pada Grup optimasi	- Grup Regular: pirazinamid, amikasin, levofloksasin, protionamide, dan klaritromisin atau sikloserin selama 24 bulan - Grup Optimasi-Sensitif terhadap pirazinamid (PZA-S) - Fase intensif selama 6 bulan: pirazinamid, amikasin, levofloksasin, klaritromisin, dan protionamide - Fase lanjutan selama 6 bulan: pirazinamid, levofloksasin, klaritromisin, dan protionamide - Grup Optimasi-Resisten terhadap pirazinamid (PZA-R) - Fase intensif selama 6 bulan: isoniazid, amikasin, levofloksasin, klaritromisin, dan protionamide	liver, ginjal, dan kejiwaan	Pasien HIV-AIDS	Default pada Grup eksperimental	1	3	- eksperimental (n=1) - Mielosupresi pada Grup kontrol (n=1) dan pada Grup eksperimental (n=1)	22
						Default pada Grup kontrol	1	3		
						Death pada Grup eksperimental	0	0		
						Death pada Grup kontrol	1	3		
						Cured pada Grup reguler	37	48,7		
						Cured pada Grup optimasi PZA-S	40	78,4	- Hipokalemia: ➢ Grup reguler (n=25) ➢ Grup optimasi PZA-S (n=5) ➢ Grup optimasi PZA-R (n=4) - Mual dan muntah: ➢ Grup reguler (n=20) ➢ Grup optimasi PZA-S (n=6) ➢ Grup optimasi PZA-R (N=4) - Kerusakan liver: ➢ Grup reguler (n=17) ➢ Grup optimasi PZA-S (n=15) ➢ Grup optimasi PZA-R (n=4) - Arthralgia: ➢ Grup reguler (n=16) ➢ Grup optimasi PZA-S (n=6) ➢ Grup optimasi PZA-R (n=1) - Hipotiroid: ➢ Grup reguler (n=10)	
						Cured pada Grup optimasi PZA-R	14	56,0		
						Completed treatment pada Grup reguler	5	6,6		
						Completed treatment pada Grup optimasi PZA-S	3	3,9		
						Completed treatment pada Grup optimasi PZA-R	2	8,0		

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas			Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)		
			➤ Fase lanjutan selama 6 bulan: isoniazid, levofloksasin, klaritromisin, dan protionamide			Failure pada Grup reguler	29	38,2	➤ Grup optimasi PZA-S (n=6) ➤ Grup optimasi PZA-R (n=3) • Kehilangan pendengaran ➤ Grup reguler (n=10) ➤ Grup optimasi PZA-S (n=5) ➤ Grup optimasi PZA-R (n=3) • Hiperurisemia: ➤ Grup reguler (n=5) ➤ Grup optimasi PZA-S (n=12) ➤ Grup optimasi PZA-R (n=1) • Kemerahan pada kulit: ➤ Grup reguler (n=6) ➤ Grup optimasi PZA-S (n=1) ➤ Grup optimasi PZA-R (n=1)	
						Failure pada Grup optimasi PZA-S	7	13,7		
						Failure pada Grup optimasi PZA-R	6	24,0		
						Default pada Grup reguler	5	6,6		
						Default pada Grup optimasi PZA-S	2	3,9		
						Default pada Grup optimasi PZA-R	3	12		
Sangsay un ^h P, Sanchat T, Chuchot taworn C, Cheewa kul K, Rattana wai S.	Observasional	28 pasien terdiri dari: • 10 BPaL • 18 BPaLM	• Bedaquiline 400 mg sekali sehari selama 2 minggu dilanjutkan 200 mg tiga kali seminggu selama 24 minggu • Linezolid 600 mg sehari sekali selama 26 minggu. Dosis dapat diturunkan atau dapat dihentikan jika mengalami efek samping setelah 8 minggu pemberian	• Pasien MDR-TB tanpa HIV	• Pasien TB ekstraparu • Pasien hamil • Pasien dengan berat badan <35 kg • Menggunakan salah satu obat tuberkulosis kurang dari 1 bulan	Favaroble outcome (Cured dan completed treatment) pada Grup BPaL	9	90	• Mual dan sakit kepala (n=22) • Perpanjangan interval QT: ➤ Grup BPaLM (n=1) • Neuropati: ➤ Grup BPaL (n=2) ➤ Grup BPaLM (n=4) • Gangguan penglihatan: ➤ Grup BPaL (n=1)	23
						Favaroble outcome (Cured dan completed treatment) pada Grup BPaLM	14	77,7		

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas			Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)		
			- Pretomanid 200 mg sehari sekali selama 26 minggu - Moksifloksasin 400 mg sehari sekali selama 26 minggu apabila tidak resisten terhadap fluorokuinolon			Failure pada Grup BPAL	0	0	➤ Grup BPALM (n=2)	
						Failure pada Grup BPALM	1	5,6		
						Death pada Grup BPAL	1	10		
						Death pada Grup BPALM	1	0		
Nie Q, Tao L, Li Y, et al.	Observasional	42 pasien	- Fase intensif selama 4 bulan: amikasin, gatifloksasin, klofazimin, isoniazid, protionamide, etambutol, dan pirazinamid - Fase lanjutan selama 12 bulan: gatifloksasin, klofazimin, etambutol, dan pirazinamid	Pasien MDR-TB berusia >15 tahun	- Pasien hamil - Pasien dengan kondisi klinis yang buruk - Kontraindikasi terhadap obat yang digunakan dalam penelitian - Resisten terhadap fluorokuinolon	Cured: 33	33	-	Protionamide, Gatifloksasin, dan Etambutol - Mual dan muntah (n=42) Pirazinamid - Hiperurisemia (n=42) Klofazimin - Hiperpigmentasi (n=42) Amikasin - Ototoksitas (n=17) - Nefrotoksitas (n=12) Isoniazid - Leukopenia (n=4) - Neuropati peripheral (n=1) Pirazinamid, Protionamide, dan Isoniazid - Hepatotoksitas (n=24) Etambutol	24
						Completed treatment	2	-		
						Failure	6	-		
						Default	1	-		
						Death	0	-		

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas			Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)		
									- Neuritis optik (n=2) Gatifloksasin dan Klofazimin - Perpanjangan interval QT (n=17) Protionamide - Hipotiroid (n=2) - Pireksia (n=1) Isoniazid dan Gatifloksasin - Gejala kejiwaan (n=3)	
Munir MK, Saeed MS, Haider SZ, Shamim S	Observasional	65 dengan pengobatan jangka pendek 66 dengan pengobatan jangka panjang	- Jangka pendek (9-11 bulan): Isoniazid, pirazinamid, etambutol, amikasin, levofloksasin, ethionamide, dan klofazimin. - Jangka panjang (18-24 bulan): Isoniazid, rifampisin, pirazinamid, etambutol, amikasin, levofloksasin, ethionamide, klofazimin, bedaquiline, dan delamanid.	Pasien MDR-TB yang belum mendapatkan pengobatan lini kedua dan tidak intoleran terhadap obat yang diberikan	-	<i>Cured</i> pada terapi jangka pendek <i>Cured</i> pada terapi jangka panjang <i>Completed treatment</i> pada terapi jangka pendek <i>Completed treatment</i> pada terapi jangka panjang <i>Failure</i> pada terapi jangka pendek <i>Failure</i> pada terapi jangka panjang	50 48 9 9 0 4	75,8 73,8 13,6 13,8 0 6,2	- Muntah ➢ Grup jangka pendek (n=16) ➢ Grup jangka panjang (n=26) - Iritasi ➢ Grup jangka pendek (n=0) ➢ Grup jangka panjang (n=9) - Lemah dan lesu ➢ Grup jangka pendek (n=2) ➢ Grup jangka panjang (n=8) - Nyeri sendi ➢ Grup jangka pendek (n=17) ➢ Grup jangka panjang (n=29) - Kehilangan pendengaran	25

Nama Penulis	Desain Penelitian	Jumlah Sampel	Intervensi	Kriteria Inklusi	Kriteria Eksklusi	Efektivitas		Efek Samping (n=angka kejadian)	Referensi
						Kategori	Angka Kejadian (n)	Persentase (%)	
						Death pada terapi jangka pendek	3	4,5	➤ Grup jangka pendek (n=2)
						Death pada terapi jangka panjang	4	6,2	➤ Grup jangka panjang (n=2) • Gangguan penglihatan ➤ Grup jangka pendek (n=) ➤ Grup jangka panjang (n=8)

Keterangan:

XDR-TB: *Extensively Drug Resistance Tuberculosis*

^aBedaquiline 400 mg sekali sehari selama 2 minggu dilanjutkan dengan 200 mg 3 kali seminggu selama 22 minggu

^bLevofloksasin 750 mg sekali sehari untuk pasien dengan berat badan <45 kg dan 1000 mg untuk pasien dengan berat badan >45 kg

^cLinezolid 600 mg sekali sehari

^dSikloserin 250 mg dua kali sehari untuk pasien dengan berat badan <45 kg; 250 mg pada pagi hari dan 500 mg pada malam hari untuk pasien dengan berat badan >45 kg

^eKlofazimin 100 mg sekali sehari

^fProtionamide 300 mg dua kali sehari untuk pasien dengan berat badan <45 kg; 400 mg dua kali sehari untuk pasien dengan berat badan >45 kg

^gEtambutol 750 mg sekali sehari untuk pasien dengan berat badan <45 kg; 1000 mg sekali sehari untuk pasien dengan berat badan >45 kg

Hasil sintesis artikel juga menunjukkan adanya efek samping yang parah sehingga penggunaan obat harus dihentikan. Hal tersebut terjadi pada penggunaan amikasin yang menyebabkan pasien kehilangan pendengaran dan disfungsi renal pada penelitian yang dilakukan di rumah sakit Shanghai-China.¹⁸ Penggunaan amikasin pada MDR-TB menunjukkan efektivitas yang baik, namun, memiliki efek samping yaitu kehilangan pendengaran dan disfungsi ginjal. Dalam sebuah penelitian yang dilakukan di Rumah sakit di Shanghai-China pada periode Januari 2017-Juni 2018, menunjukkan bahwa 1 dari 12 kejadian efek samping kehilangan pendengaran dan disfungsi ginjal bersifat permanen.¹⁸ Efek samping yang ditimbulkan oleh amikasin bergantung pada dosis, sehingga perlu dilakukan pengawasan yang ketat dalam pemberian amikasin.³²

Kajian literatur ini mengamati efektivitas dan efek samping pada terapi MDR-TB baik jangka pendek maupun jangka panjang. MDR-TB merupakan masalah global dengan berbagai tantangan dalam pemilihan terapi. Berbagai manajemen terapi MDR-TB dengan variasi obat dan waktu yang berbeda menunjukkan efektivitas dan efek samping yang bervariasi. Penggunaan obat-obat baru sesuai rekomendasi WHO menunjukkan tingkat penyembuhan yang tinggi. Namun, pengobatan jangka panjang disertai efek samping akan mempengaruhi kepatuhan pasien.^{21,27} Secara menyeluruh dapat diamati bahwa efek samping dapat terjadi pada semua rejimen terapi MDR-TB. Oleh karena itu, terapi MDR-TB harus dipantau secara ketat untuk mengurangi kejadian efek samping.

SIMPULAN

Efektivitas terapi MDR-TB dengan menggunakan berbagai rejimen terapi dengan obat-obat baru yang direkomendasikan oleh WHO menunjukkan angka kesembuhan yang tinggi baik pada terapi jangka panjang maupun jangka pendek, namun terdapat berbagai macam efek samping yang dialami oleh pasien. Terapi MDR-TB dengan rejimen BPaL memiliki persentase angka kesembuhan mencapai 90% dengan kejadian efek samping yang paling rendah yaitu mual dan sakit kepala yang terjadi pada 22 pasien dari 28 pasien, serta neuropati dan gangguan penglihatan yang terjadi pada 1 pasien dari 28 pasien. Namun, pemilihan rejimen terapi sebaiknya berdasarkan pada hasil pemeriksaan kultur, kondisi pasien, serta ketersediaan obat di masing-masing negara. Selain itu, perlu dilakukan monitoring rutin oleh pengawas minum obat untuk meningkatkan kepatuhan pasien agar tercapai efektivitas terapi MDR-TB dan mengurangi risiko efek samping obat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Internal Fakultas Farmasi Tahun 2023/2024.

KONFLIK KEPENTINGAN

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. Global tuberculosis report 2019 (World Health Organization, 2019). Published online 2019.
2. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2022*; 2022.
3. Kemenkes. *Laporan Program Penanggulangan Tuberkulosis Tahun 2021*. Kementerian Kesehatan RI; 2021.
4. World Health Organization. *WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis*; 2022.
5. Agyeman AA, Ofori-Asenso R. Tuberculosis—an overview. *Public Heal Emerg*. 2016;1(November):37-37. doi:10.21037/phe.2016.10.04
6. Bansal R, Sharma D, Singh R. Tuberculosis and its Treatment: An Overview. *Mini-Reviews Med Chem*. 2016;18(1):58-71. doi:10.2174/1389557516666160823160010
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2015. Published online 2015.
8. The Working Group for New TB Drugs. No Title. Clinical Pipeline. 2016. Accessed July 31, 2024. https://www.newtbdrugs.org/pipeline/clinical?field_advancing_value=1&field_submitted_for_registrati on_value%5B%5D=1
9. The U.S. Food and Drug Administration. No Title. FDA approves new drug for treatment-resistant forms of tuberculosis that affects the lungs. 2019. Accessed July 30, 2024. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-new-drug-treatment-resistant-forms-tuberculosis-affects-lungs>
10. The U.S. Food and Drug Administration. No Title. Drug Approval Package. 2020. Accessed July 31, 2024. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2000/21024S5_Priftin.cfm
11. Rahman N, Meng SK, Ahmed IA. Current Review of the Use of Linezolid in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis: Effectiveness and Management of Side Effects. *Int J Biotechnol Biomed*. 2024;1(1):89-102. doi:https://doi.org/10.31674/ijbb.2024.v01i01.005
12. Ari Kusuma Yana IGA, Herawati F. Efektivitas Dan Keamanan Terapi dengan Rejimen Bedaquiline dalam Terapi Multidrug-Resistant Tuberculosis (TB-MDR): Kajian Sistematis. *Pharm J Indones*. 2022;7(2):129-138. doi:10.21776/ub.pji.2022.007.02.8
13. Thariqulhaq MF, Wahyono TYM. The Effectiveness And Safety Of Bedaquiline-Containing Regimens In The Treatment Of Patients With Multi-Drug Resistant Tuberculosis (Mdr-Tb): A Systematic Literature Review. *J EduHealth*. 2023;14(03):1382-1392. doi:https://doi.org/10.54209/jurnaleduhealth.v14i3.2678
14. Sari E, Zakiah N, Santoso P, Barliana MI. Efektivitas Terapi Bedaquilin Dan Delamanid Pada Pengobatan Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR-TB): Sebuah Review. *J Sains dan Teknol Farm Indones*. 2020;9(1).
15. Mahardani PN, Wati DK, Siloam A, Savitri NPA, Manggala AK. Effectiveness and safety of short-term

- regimen for multidrug-resistant tuberculosis treatment: a systematic review of cohort studies. *Oman Med J*. 2022;37(1):e337. doi:<https://doi.org/10.5001/omj.2021.64>
16. Wu S, Zhang Y, Sun F, et al. Adverse events associated with the treatment of multidrug-resistant tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Am J Ther*. 2016;23(2):e521-e530. doi:10.1097/01.mjt.0000433951.09030.5a
 17. Zeng X, Zhang Y, Kwong JSW, et al. The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies, systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: a systematic review. *J Evid Based Med*. 2015;8(1):2-10. doi:<https://doi.org/10.1111/jebm.12141>
 18. Sun W, Wu Z, Zhou Y, et al. A highly effective and inexpensive standardized treatment of multidrug-resistant tuberculosis: a multicenter prospective study in China. *BMC Infect Dis*. 2021;21:1-9. doi:<https://doi.org/10.1186/s12879-021-06553-2>
 19. Yao G, Zhu M, Nie Q, et al. Improved outcomes following addition of bedaquiline and clofazimine to a treatment regimen for multidrug-resistant tuberculosis. *J Int Med Res*. 2023;51(1):03000605221148416. doi:10.1177/03000605221148416
 20. D'Ambrosio L, Bothamley G, Luna JAC, et al. Team approach to manage difficult-to-treat TB cases: experiences in Europe and beyond. *Pulmonology*. 2018;24(2):132-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.10.005>
 21. Tiberi S, Buchanan R, Caminero JA, et al. The challenge of the new tuberculosis drugs. *Presse Med*. 2017;46(2):e41-e51. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.016>
 22. Sun F, Li Y, Chen Y, et al. Introducing molecular testing of pyrazinamide susceptibility improves multidrug-resistant tuberculosis treatment outcomes: a prospective cohort study. *Eur Respir J*. 2019;53(3). doi:10.1183/13993003.01770-2018
 23. Sangsayunh P, Sanchat T, Chuchottaworn C, Cheewakul K, Rattanawai S. The use of BPaL containing regimen in the MDR/PreXDR TB treatments in Thailand. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis*. 2024;34:100408. doi:10.1016/j.jctube.2023.100408
 24. Nie Q, Tao L, Li Y, et al. High-dose gatifloxacin-based shorter treatment regimens for MDR/RR-TB. *Int J Infect Dis*. 2022;115:142-148. doi:10.1016/j.ijid.2021.11.037
 25. Munir MK, Saeed MS, Haider SZ, Shamim S. Comparison of short term and long term multidrug resistant tuberculosis treatment outcomes in tertiary care settings. *J King Saud Univ*. 2024;36(4):103133. doi:10.1183/13993003.01770-2018
 26. Bhanu MLS. Anti-Tuberculosis Drugs and Mechanisms of Action: Review. *IJ Infect Disea*. 2023;4(2):1-7.
 27. Kwon YS, Jeong BH, Koh WJ. Tuberculosis: clinical trials and new drug regimens. *Curr Opin Pulm Med*. 2014;20(3):280-286. doi:10.1097/MCP.0000000000000045
 28. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase inhibitors: fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(9):a025320. doi:10.1101/cshperspect.a025320
 29. Chauhan A, Kumar M, Kumar A, Kanchan K. Comprehensive review on mechanism of action, resistance and evolution of antimycobacterial drugs. *Life Sci*. 2021;274:119301. doi:10.1016/j.lfs.2021.119301
 30. Jones NT, Abadie R, Keller CL, et al. Treatment and toxicity considerations in tuberculosis: A narrative review. *Cureus*. 2024;16(6). doi:10.7759/cureus.62698
 31. Nugraha RV, Yunivita V, Santoso P, Aarnoutse RE, Ruslami R. Clofazimine as a treatment for multidrug-resistant tuberculosis: a review. *Sci Pharm*. 2021;89(2):19. doi:<https://doi.org/10.3390/scipharm89020019>
 32. Hong H, Dowdy DW, Dooley KE, et al. Risk of hearing loss among multidrug-resistant tuberculosis patients according to cumulative aminoglycoside dose. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2020;24(1):65-72. doi:<https://doi.org/10.5588/ijtld.19.0062>

Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Lama Rawat Inap Pasien *Dengue Hemorrhagic Fever* di Salah Satu Rumah Sakit Umum Daerah di Bali

Factors Associated with Length of Stay of Dengue Hemorrhagic Fever Patients at a Regional General Hospital in Bali

Nyoman Budiarta Siada¹, Rr. Asih Juanita^{1*}

¹Fakultas Farmasi,
Universitas Mahasaraswati
Denpasar, Jln. Kamboja,
No. 11 A, Denpasar,
80233, Indonesia

Diajukan: 30-08-2024

Direview: 01-03-2025

Disetujui: 21-04-2025

Kata Kunci: DHF, ringer
laktat, lama rawat inap.

Keywords: DHF, ringer
lactate, length of stay

Korespondensi:

Rr. Asih Juanita

rrasihjuanita@unmas.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

World Health Organization (WHO) melaporkan satu sampai lima juta infeksi dengue selama tahun 2020 sampai tahun 2022. Menurut data Profil Kesehatan Indonesia pada tahun 2020, Provinsi Bali memiliki *Incidence Rate* (IR) DHF terbesar, yaitu sebesar 273,1 kesakitan dan *Case Fatality Rate* (CFR) sebesar 0,2%. Semakin lama masa rawat inap pasien maka semakin besar biaya yang dikeluarkan untuk pengobatan di rumah sakit. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF yang disertai komplikasi dan penyakit penyerta. Penelitian ini merupakan penelitian observasional. Data rekam medis pasien DHF yang disertai komplikasi dan penyakit penyerta dikumpulkan dengan teknik retrospektif dari periode Januari 2020 sampai Desember 2020 selama dirawat inap di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali. Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap meliputi umur, derajat keparahan DHF, komplikasi dan penyakit penyerta, dan jumlah terapi cairan yang digunakan pasien selama dirawat inap. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah lama rawat inap pasien. Hubungan antar variabel bebas dan variabel terikat dianalisis menggunakan regresi logistik dengan tingkat signifikansi yang ditetapkan pada $p < 0,05$. Terdapat 115 pasien rawat inap DHF dengan komplikasi dan penyakit penyerta yang terdiri atas 52% laki-laki dan 48% perempuan. Pasien mayoritas berada pada rentang usia 6-11 tahun (43%). Berdasarkan analisis yang telah dilakukan terdapat faktor yang berhubungan secara signifikan dengan lama rawat inap pasien DHF yaitu penggunaan jumlah terapi cairan ($p=0,02$). Hasil penelitian ini mendukung evaluasi terapi DHF, khususnya dalam pemilihan jenis dan jumlah cairan.

Abstract

The World Health Organization (WHO) reported one to five million dengue infections from 2020 to 2022. According to Indonesian Health Profile data in 2020, the province of Bali had the highest Dengue Hemorrhagic Fever (DHF) Incidence Rate (IR), 273.1 morbidity, and a Case Fatality Rate (CFR) of 0.2%. The longer the patient's stay, the greater the costs are incurred for hospital treatment. Therefore, this study aims to analyze the factors influencing the length of stay of DHF patients with complications and comorbidities. This study was an observational study. Medical record data of DHF patients with complications and comorbidities were collected using a retrospective technique from January 2020 to December 2020 during hospitalization at a regional public hospital in Bali. The independent variables in this study include age, the severity of DHF, complications and comorbidities, and the amount of fluid therapy patients use during hospitalization. The dependent variable in this study is the patient's length of stay. The relationship between the independent and dependent variables was analyzed using logistic regression with a significance level set at $p < 0.05$. There were 115 hospitalized DHF patients with complications and comorbidities, consisting of 52% males and 48% females. Most patients were in the age range of 6-11 years (43%). Based on the analysis that has been carried out, there is a factor that is significantly related to the length of stay of DHF patients, namely the use of the amount of fluid therapy ($p=0.02$). The findings of this study support the evaluation of DHF therapy, particularly in selecting the type and volume of fluids.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Siada, NB, Juanita, RA. Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Lama Rawat Inap Pasien *Dengue Hemorrhagic Fever* di Salah Satu Rumah Sakit Umum Daerah di Bali. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 40-47, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9852](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9852)

PENDAHULUAN

Infeksi dengue merupakan sekelompok penyakit yang disebabkan oleh virus dengue. Virus ini memiliki 4 serotipe yang berbeda (DENV-1 sampai DENV-4) yang telah teridentifikasi bersirkulasi di sebagian belahan dunia terutama pada daerah tropis dan subtropis, termasuk Indonesia. Menurut laporan *World Health Organization* (WHO), infeksi dengue yang terjadi dari tahun 2020 sampai tahun 2022 mencapai satu sampai lima juta kasus per tahunnya.¹ Menurut data Profil Kesehatan Indonesia pada tahun 2020 *Case Fatality Rate* (CFR) *Dengue Hemorrhagic Fever* (DHF) di Indonesia sebesar 0,7% dan suatu provinsi dikatakan memiliki CFR tinggi apabila telah melebihi dari 1%. Berdasarkan angka kesakitan per 100.000 penduduk menurut Provinsi di Indonesia pada tahun 2020, Provinsi Bali memiliki IR terbesar di antara 34 provinsi di Indonesia, yaitu sebesar 273,1 kesakitan dan CFR sebesar 0,2%.² Sedangkan pada tahun 2021 mengalami penurunan dengan IR (*Incidence Rate*) sebesar 59,8 per 100.000 penduduk dan CFR (*Case Fatality Rate*) sebesar 0,15%, hal itu menjadikan Provinsi Bali termasuk dalam tiga provinsi yang memiliki *Incidence Rate* DHF tertinggi setelah Provinsi Riau dan Kalimantan Timur.³

Tingginya angka kejadian penyakit DHF dapat menimbulkan masalah ekonomi serta menjadi ancaman besar pada kesehatan masyarakat. Dampak merugikan ini paling banyak disebabkan karena angka rawat inap di rumah sakit yang tinggi dan sangat dipengaruhi oleh lama rawat inap pasien.⁴ Lama rawat inap merupakan indikator untuk menilai kualitas layanan kesehatan.⁵ Semakin lama masa rawat inap pasien maka semakin besar biaya yang dikeluarkan untuk pengobatan di rumah sakit. Biaya yang dikeluarkan dapat berupa biaya langsung ataupun biaya tidak langsung. Biaya langsung, seperti alokasi dana tidak terencana untuk mengatasi wabah DHF, biaya perawatan medis, seperti biaya rawat inap dan rawat jalan, hilangnya hari kerja produktif karena sakit atau untuk merawat anggota keluarga yang sakit. Sedangkan biaya tidak langsung, seperti peningkatan pengeluaran rumah tangga untuk membeli obat nyamuk bakar dan obat-obatan, penurunan pendapatan rumah tangga karena hilangnya hari kerja.⁶ Menurut sebuah penelitian yang dilakukan oleh Syam & Khair pada tahun 2019 di Rumah Sakit Umum Daerah Barru dengan pasien DHF yang dirawat inap, menjelaskan bahwa lama rawat inap pasien tercepat yaitu 1 hari dan terlama yaitu 9 hari.⁷

Penelitian terkait dengan faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF telah banyak dilakukan. Penelitian yang dilakukan di RSUD Tugurejo Semarang pada tahun 2015-2016 pada pasien anak yang menderita DHF mengamati hubungan antara gejala dan tanda terhadap lama rawat inap. Penelitian tersebut tidak mengamati jenis dan jumlah cairan yang diberikan ke pasien. Hasil dalam penelitian tersebut menunjukkan bahwa gejala dan tanda merupakan faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF di Rumah Sakit.⁵ Penelitian lain yang dilakukan di Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Bantul pada pasien DHF yang dirawat inap menunjukkan penggunaan terapi cairan merupakan faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF.⁸ Namun, penelitian tersebut hanya dilakukan pada pasien pediatrik. Penelitian lain yang dilakukan di Rumah Sakit Wangaya, Denpasar, Bali pada tahun 2023 yang meneliti tentang faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF hanya mengamati pengaruh nutrisi dan penyakit penyerta pada pasien.⁹

Berdasarkan latar belakang di atas, perlu dilakukan penelitian mengenai faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF yang disertai komplikasi dan penyakit penyerta di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali yang mengamati usia, derajat keparahan, komplikasi dan penyakit penyerta, serta jumlah cairan. Penelitian ini akan membantu pihak rumah sakit untuk melakukan evaluasi dan meningkatkan kualitas prediksi lama rawat inap pasien DHF di rumah sakit sehingga dapat meningkatkan kualitas layanan kesehatan.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian observasional melalui pendekatan studi *cross-sectional* yang dilakukan di salah satu Rumah Sakit Umum Daerah di Bali. Penelitian ini telah mendapatkan ijin etik dengan nomor 099/IX.9/KEP/RSW/2022 yang dikeluarkan oleh Komite Etik Penelitian Rumah Sakit. Data dikumpulkan dengan teknik retrospektif yaitu pengambilan data rekam medis pasien DHF yang disertai komplikasi dan

penyakit penyerta periode bulan Januari 2020 sampai Desember 2021 selama dirawat inap di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali. Informasi yang dikumpulkan meliputi jenis kelamin, usia, diagnosis, gejala, jenis komplikasi, jenis penyakit penyerta, lama rawat inap pasien, serta jumlah cairan yang didapatkan oleh pasien selama rawat inap.

Populasi dalam penelitian ini adalah pasien rawat inap DHF yang disertai dengan komplikasi dan penyakit penyerta. Teknik pengambilan sampel dalam penelitian ini menggunakan teknik *total sampling*. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah seluruh pasien dengan diagnosis DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta yang menjalani rawat inap pada bulan Januari 2020-Desember 2021. Pasien dengan data rekam medis yang tidak lengkap (tidak memuat salah satu informasi yang dikumpulkan dari rekam medis), pasien hamil, pasien dengan status meninggal, dan di rujuk ke rumah sakit lain dieksklusi dalam penelitian ini.

Variabel bebas dalam penelitian ini merupakan faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap meliputi umur, derajat keparahan DHF, komplikasi dan penyakit penyerta, dan jenis terapi cairan yang digunakan pasien selama dirawat inap. Derajat keparahan DHF diklasifikasikan berdasarkan Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Infeksi Dengue Pada Anak, Remaja, dan Dewasa.¹¹¹² Variabel terikat dalam penelitian ini adalah lama rawat inap pasien. Data demografi pasien dianalisis menggunakan analisis univariat. Hubungan antar variabel bebas dan variabel terikat dianalisis menggunakan analisis bivariat yaitu regresi logistik menggunakan data kategorik dengan tingkat signifikansi yang ditetapkan pada $p < 0,05$. Jika nilai $p < 0,05$ maka terdapat hubungan antara faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap dengan lama rawat inap pada pasien DHF yang disertai komplikasi dan penyakit penyerta.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali dengan tujuan untuk mengetahui faktor-faktor yang mempengaruhi lama rawat inap pasien DHF yang disertai komplikasi dan penyakit penyerta di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali. Data yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari data rekam medis pasien rawat inap dengan DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta pada tahun 2020-2021 sebesar 143 pasien. Setelah dilakukan seleksi dengan kriteria inklusi dan eksklusi diperoleh 115 pasien. Data pasien yang diperoleh terdiri dari karakteristik pasien yang meliputi jenis kelamin dan usia, serta komplikasi dan penyakit penyerta, lama rawat inap. Selain itu, juga diperoleh data jumlah terapi cairan yang digunakan pasien selama menjalani rawat inap.

Karakteristik pasien DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta di salah satu rumah sakit umum daerah di Bali dapat dilihat pada **Tabel 1**. Jumlah pasien berdasarkan jenis kelamin dengan diagnosis DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta didominasi oleh pasien laki-laki yaitu sebanyak 60 pasien (52,2%) dengan kelompok usia terbanyak yaitu anak-anak (6-11 tahun) sebanyak 49 pasien (42,6%).

Tabel 1. Karakteristik Pasien DHF disertai Komplikasi dan Penyakit Penyerta

Karakteristik	Frekuensi	Persentase (%)
Jenis Kelamin		
Laki-laki	60	52,2
Perempuan	55	47,8
Total	115	100
Usia		
Anak-Anak (6-11 tahun)	49	42,6
Remaja Awal (12-16 tahun)	20	17,4
Remaja Akhir (17-25 tahun)	16	13,9
Balita (0-5 tahun)	14	12,2
Lansia Akhir (56-65 tahun)	6	5,2
Dewasa Awal (26-35 tahun)	5	4,4
Lansia Awal (46-55 tahun)	3	2,6
Dewasa Akhir (36-45 tahun)	2	1,7
Total	115	100

Sejalan dengan penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Umum UKI pada Tahun 2020, yang menunjukkan bahwa dari 94 pasien yang diteliti sebanyak 56 pasien (60%) rawat inap DHF berjenis kelamin laki-laki.¹³ Selain itu, penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Universitas Mataram tahun 2020, menunjukkan bahwa dari 40 pasien yang terdiagnosis DHF lebih banyak dialami oleh laki-laki (52,5%) daripada perempuan.¹⁴ Perempuan memproduksi immunoglobulin dan antibodi yang berbeda. Laki-laki memproduksi hormon androgen yang bersifat immunosupresan sehingga memperkecil risiko penyakit autoimun namun menyebabkan laki-laki lebih sering terkena infeksi dibandingkan perempuan, sedangkan perempuan memproduksi hormon estrogen yang dikelola secara genetika dan hormonal sehingga mempengaruhi sintesis IgG dan IgA menjadi lebih banyak dan menyebabkan perempuan lebih kebal terhadap infeksi dibandingkan dengan laki-laki.¹⁵

Penelitian yang dilakukan di RSUD Ulin Banjarmasin tahun 2017, bahwa angka kejadian pasien DHF banyak dialami oleh anak-anak (6-11 tahun) yaitu sebanyak 31 pasien (41,3%).¹⁶ Penelitian yang serupa juga ditemukan di RSUD Sultan Syarif Mohamad Alkadrie tahun 2018, bahwa kelompok usia terbanyak ialah kategori usia 6-11 tahun yaitu sebanyak 15 pasien DHF (44,1%).¹⁷ Anak-anak lebih rentan terkena infeksi DHF dikarenakan pembentukan antibodi spesifik terhadap antigen pada anak-anak belum sempurna sehingga mempengaruhi kekebalan tubuh terhadap infeksi virus.^{18,19}

Pada **Tabel 2** dapat diketahui bahwa derajat keparahan pasien rawat inap DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta terbanyak didominasi oleh pasien dengan diagnosis DHF *grade* III yaitu sebanyak 49 pasien (71,3%) kemudian diikuti DHF *grade* I sebanyak 47 pasien (18,2%). Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Lewoleba pada bulan Januari 2019-Desember 2020, ditemukan bahwa pasien dengan rawat inap derajat DHF terbanyak sebanyak 31 pasien (38,3%) dan 24 pasien (29,6%) DHF *grade* I.²⁰ Diagnosis derajat keparahan DHF yang berbeda disebabkan karena sebagian besar penentuan diagnosis tergantung dari gejala klinis pasien DHF yang beragam. Hal ini menyebabkan diagnosis klinis yang akurat menjadi suatu tantangan sehingga penting dilakukan penilaian hasil laboratorium dan penilaian gejala klinis pada pasien DHF.²¹

Tabel 2. Derajat Keparahannya pasien DHF

Diagnosis	Frekuensi	Persentase (%)
DHF <i>grade</i> III	49	71,3
DHF <i>grade</i> I	47	18,2
DHF <i>grade</i> II	18	2,6
DHF <i>grade</i> IV	1	7,8
Total	115	100

Merujuk pada **Tabel 3** terkait jenis komplikasi yang terbanyak dialami oleh pasien adalah *hypovolemic shock* yaitu sebanyak 67 pasien (75,3%). Hal yang serupa juga ditemukan pada penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit Ittefaq, Pakistan periode September 2011-Oktober 2011, bahwa jenis komplikasi terbanyak yang dialami oleh pasien DHF adalah *hypovolemic shock* yaitu sebanyak 84 pasien (68,8%).²²

Hypovolemic shock merupakan keadaan berkurangnya perfusi organ dan oksigenasi jaringan yang disebabkan oleh gangguan kehilangan darah atau cairan tubuh. Perubahan awal tanda-tanda vital yang terlihat pada *hypovolemic shock* yaitu hilangnya 10% volume tubuh termasuk peningkatan tekanan darah diastolik dengan tekanan nadi yang menyempit. Saat volume tubuh terus menurun (25%-30% dari volume darah) pasien akan mengalami keadaan syok disertai dengan penurunan tekanan darah sistolik, takikardia, dan oliguria. Akibatnya, pengiriman oksigen ke organ vital tidak dapat memenuhi kebutuhan oksigen. Apabila *hypovolemic shock* tidak segera ditangani, dapat mengakibatkan hipoksia, penurunan kesadaran karena berkurangnya suplai darah ke otak, kerusakan serta kematian jaringan yang *irreversible*, dan berakhir dengan kematian karena berkurangnya volume sirkulasi dalam tubuh.²³

Penyakit penyerta yang banyak ditemukan pada pasien rawat inap DHF adalah tifoid yaitu sebanyak 10 pasien (50%) seperti yang disajikan pada **Tabel 3**. Hal serupa ditemukan pada penelitian yang dilakukan dirawat inap RSUD Sultan Syarif Mohamad Alkadrie Pontianak tahun 2017, bahwa dari 16 pasien DHF dengan

penyakit penyerta, yang paling banyak ditemukan adalah DHF disertai tifoid dengan persentase sebesar 31,25%.²⁴ Apabila tidak segera diobati, DHF disertai tifoid dapat berkembang menjadi komplikasi yang mengancam jiwa seperti perdarahan, kegagalan sirkulasi dan proliferasi usus.^{25,26}

Tabel 3. Jenis Komplikasi dan Penyakit Penyerta Pasien DHF

Karakteristik	Frekuensi	Persentase (%)
Komplikasi DHF		
<i>Hypovolemic Shock</i>	67	75,3
<i>Volume Depletion</i>	8	9,0
<i>Hypovolemic Shock</i> + Efusi Pleura	5	5,6
Efusi Pleura	4	4,5
<i>Hypovolemic Shock</i> + Hipoalbuminemia	2	2,3
<i>Hypovolemic Shock</i> + <i>glynded dengue syndrome</i>	1	1,1
<i>Cardiogenic Shock</i>	1	1,1
<i>Hypovolemic Shock</i> + Efusi pleura + Hipoalbuminemia	1	1,1
Total	89	100
Penyakit Penyerta		
Karakteristik	Frekuensi	Persentase (%)
Tifoid	10	50,0
Kwasihorkor	5	25,0
HIV	2	10,0
Sepsis	1	5,0
Dispepsia	1	5,0
GERD	1	5,0
Total	20	100
Komplikasi DHF dan Penyakit Penyerta		
<i>Hypovolemic Shock</i> + Sepsis	2	33,3
Efusi Pleura + Pneumonia	1	16,7
<i>Hypovolemic Shock</i> + <i>Probable COVID-19</i>	1	16,7
<i>Hypovolemic Shock</i> + Epilepsi	1	16,7
<i>Hypovolemic Shock</i> + Tifoid	1	16,7
Total	6	100

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pemilihan golongan dan jumlah cairan, yang banyak digunakan dalam penatalaksanaan DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta adalah kristaloid (83,5%) yaitu ringer laktat yang digunakan pada 87 pasien (91%) seperti pada **Tabel 4**. Ringer laktat memiliki komposisi elektrolit dan konsentrasi yang serupa dengan cairan ekstraseluler.¹⁴ Hal ini dikarenakan ringer laktat tidak hanya mengandung natrium (Na) dan klorida (Cl), tetapi juga mengandung kalsium (Ca), kalium (K), dan laktat, dengan konsentrasi klorida (Cl) yang sama dengan plasma dan laktat sebagai penyangga sehingga ringer laktat dapat beradaptasi dengan plasma, serta dapat digunakan sebagai resusitasi cairan pada kondisi kehilangan darah (*hypovolemic shock*).²⁷⁻²⁹

Banyak faktor yang berkontribusi terhadap terjadinya penyakit yang disebabkan oleh virus dengue, diantaranya usia, derajat keparahan, komplikasi dan penyakit penyerta serta jenis terapi cairan yang digunakan oleh pasien. Faktor-faktor yang berkontribusi tersebut berindikasi untuk memperberat keadaan infeksi dengue mulai dari demam dengue (DD) menjadi *dengue hemorrhagic fever* (DHF) atau bahkan sampai menjadi sindrom syok dengue (SSD). Faktor-faktor tersebut secara tidak langsung juga berpengaruh terhadap lama rawat inap pasien DHF di rumah sakit.³⁰

Merujuk pada **Tabel 5** terkait pengaruh jumlah terapi cairan terhadap lama rawat inap pasien DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta didapatkan hasil nilai ($p < 0,05$) yaitu sebesar 0,02 yang artinya ada hubungan yang signifikan antara jumlah terapi cairan dan lama rawat inap pasien DHF disertai komplikasi dan penyakit penyerta. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati dkk pada tahun 2019 di Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Bantul pada pasien DHF yang dirawat inap diketahui bahwa analisis uji statistik bernilai $p < 0,004$, yang secara statistik menunjukkan ada hubungan yang bermakna antara penggunaan terapi cairan terhadap lama rawat inap pasien DHF.⁸ Hal ini juga dibuktikan dengan penelitian

yang telah dilakukan oleh Perwira pada tahun 2011 di RSUP Persahabatan-Jakarta Timur pada pasien rawat inap DHF yang mendapatkan hasil penelitian dari uji statistik menunjukkan nilai $p = 0,004$, yang artinya ada hubungan yang bermakna antara pemberian terapi cairan dengan lama rawat inap pasien.³¹

Tabel 4. Jumlah Cairan yang Digunakan Berdasarkan Golongan Cairan

Jumlah Cairan yang Digunakan	Frekuensi	Persentase (%)
Kristaloid		
Ringer Laktat	87	91,0
Futrolit®	2	2,0
Ringer laktat + D5 ¼ NS dilanjutkan Ringer laktat	1	1,0
Ringer laktat diganti D5 ¼ NS	1	1,0
Ringer Laktat diganti Futrolit	1	1,0
NaCl 0,9%	1	1,0
NaCl 0,9% diganti Ringer Laktat	1	1,0
D5 ½ NS diganti KA-EN 3B	1	1,0
KA-EN 3B diganti Ringer Laktat	1	1,0
Total	96	100
Kristaloid dan Koloid		
Ringer Laktat+HES 6%	11	55,0
Ringer Laktat+Albumin 20%	6	35,0
Ringer Laktat+HES 6%+Albumin 20%	1	5,0
Ringer Laktat+HES 6%, diganti NaCl 0,9%	1	5,0
Total	19	100

Hilangnya cairan tubuh pasien karena perembesan plasma pada ruang intravaskular dapat diatasi dengan pemberian salah satu jenis cairan seperti kristaloid (ringer laktat, ringer asetat, cairan salin) ataupun koloid.⁸ Menurut penelitian yang dilakukan di Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Bantul pada tahun 2018 pada pasien rawat inap DHF menyatakan bahwa terdapat perbedaan bermakna pada kelompok pasien yang mendapatkan terapi cairan kristaloid dan pasien yang mendapatkan terapi cairan kombinasi kristaloid dan koloid terhadap lama rawat inap pasien DHF di rumah sakit. Pada kelompok pasien yang mendapat terapi cairan kristaloid rata-rata lama rawat inap di rumah sakit adalah 5 hari sedangkan pada kelompok pasien yang mendapat terapi cairan kombinasi kristaloid dan koloid memiliki rata-rata rawat inap yang lebih singkat yaitu 4 hari. Terapi cairan kombinasi kristaloid dan koloid memberikan pengaruh yang lebih baik terhadap perbaikan klinis dan laboratorium sehingga dapat mengurangi lama rawat inap pasien di rumah sakit.³²

Tabel 5. Pengaruh Faktor yang Mempengaruhi Lama Rawat Inap terhadap Lama Rawat Inap Pasien DHF disertai Komplikasi dan Penyakit Penyerta

Faktor yang Mempengaruhi Lama Rawat Inap	Nilai P	Lower	OR (IK 95%)	Upper
Usia				
Balita (0-5 tahun)	0,269	0,545		7,339
Anak-Anak (6-11 tahun)	0,533	0,384		6,356
Remaja Awal (12-16 tahun)	0,433	0,390		9,013
Remaja Akhir (17-25 tahun)	0,999	0,000		-
Dewasa Awal (26-35 tahun)	1,000	0,000		-
Dewasa Akhir (36-45 tahun)	0,639	0,198		14,054
Lansia Awal (46-55 tahun)	0,832	0,160		9,765
Lansia Akhir (56-65 tahun)	0,989		Pembanding	
Derajat Keparahan				
Grade I	0,723	0,119		21,586
Grade II	0,120	0,797		7,126
Grade III	0,265	0,489		13,389
Grade IV	0,486		Pembanding	
Komplikasi				
Komplikasi				
Komplikasi dan penyakit penyerta	0,418	0,494		5,446
Jumlah Cairan				
Kristaloid (1 cairan)				
Kristaloid + koloid (>1 cairan)	0,02	1,940		17,763

Adapun yang menjadi keterbatasan dalam penelitian ini adalah adanya komplikasi dan penyakit penyerta yang beragam mengakibatkan sulit untuk mencari literatur pembandingan dan sulit untuk menyamakan kondisi pasien DHF pada rumah sakit lain. Selain itu, penelitian ini hanya meneliti beberapa faktor saja, faktor lain yang mungkin berpengaruh tidak diteliti seperti status gizi, imunitas, pemberian vitamin dan suplemen serta status genetika pasien.

SIMPULAN

Lama rawat inap pada pasien DHF dipengaruhi oleh jumlah cairan yang didapatkan oleh pasien. Penelitian ini dapat membantu pihak rumah sakit untuk melakukan evaluasi terapi DHF khususnya pada pemilihan jumlah dan jenis cairan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar yang telah mendanai penelitian ini melalui Program Hibah Internal Fakultas Farmasi Tahun 2023/2024.

KONFLIK KEPENTINGAN

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap artikel ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. *Global Report on Neglected Tropical Diseases 2024: Executive Summary*.; 2024. doi:10.2471/b09040
2. Kemenkes RI. *Profil Kesehatan Indonesia 2020*. Vol 48.; 2021. doi:10.1524/itit.2006.48.1.6
3. Kemenkes RI. *Profil Kesehatan Indonesia 2021*.; 2022.
4. Cahyani S, Rizkianti T, Susantiningsih T. Hubungan Jumlah Trombosit , Nilai Hematokrit dan Rasio Neutrofil-Limfosit Terhadap Lama Rawat Inap Pasien DBD Anak di RSUD Budhi Asih Bulan Januari – September Tahun 2019. *Semin Nas Ris Kedokt 2020*. 2020;1(1):49-59.
5. Tursinawati Y, Ramaningrum G, Aprilia I. Laboratory Finding and Clinical Manifestation Affecting the Length of Stay of Hospitalization on Children With Dengue Hemorrhagic Fever. *Pros Semin Nas Int*. 2017;1(1):130-135.
6. Arianti MD, Prijambodo J, Wujoso H. Relationships between Age , Sex , Laboratory Parameter , and Length of Stay in Patients with Dengue Hemorrhagic Fever. *J Epidemiol Public Heal*. 2019;4(4):307-313.
7. Syam I, Khair H. Faktor-Faktor Yang Berhubungan Dengan Lama Hari Rawat Inap Pada Pasien DBD Di RSUD Barru. *Info Kesehat*. 2019;9(2):158-163.
8. Rahmawati A, Perwitasari DA, Kurniawan NU. Efektivitas Pemberian Terapi Cairan Inisial Dibandingkan Terapi Cairan Standar WHO terhadap Lama Perawatan pada Pasien Demam Berdarah di Bangsal Anak Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Bantul. *Indones J Clin Pharm*. 2019;8(2):91. doi:10.15416/ijcp.2019.8.2.91
9. Kunti DPSA, Suryana K. Factors associated with prolonged length of stay in dengue hemorrhagic fever patients at Wangaya Hospital, Denpasar, Bali. *Int J Adv Med*. 2024;11(4):328-332. doi:10.18203/2349-3933.ijam20241624
10. Hikmawati I, Patima S. Cross Section a Study: The Relationship Between Comorbidities and Hematocrit with the Hospitalization of Patients of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF). *Adv Sci Lett*. 2018;24(1):112-115. doi:10.1166/asl.2018.11934
11. Menteri Kesehatan Republik Indonesia. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Infeksi Dengue Anak dan Remaja. *Pedoman Nas pelayanan Kedokt*. Published online 2021:1-67.
12. Kemenkes RI. *Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Infeksi Dengue Pada Dewasa*. Vol 8.; 2020.
13. Ayu Islammia D putri, Rumana NA, Indawati L, Dewi DR. Karakteristik Pasien Demam Berdarah Dengue Rawat Inap di Rumah Sakit Umum UKI Tahun 2020. *SEHATMAS J Ilm Kesehat Masy*. 2022;1(1):60-70. doi:10.55123/sehatmas.v1i1.37
14. Ningrum DM, Septiana E, Permana DAS, Wahida A. Kajian Pengobatan Dengue Haemoragic Fever (DHF)

- di Rumah Sakit Pendidikan Universitas Mataram. *J Ilmu Kefarmasian*. 2023;4(1):1-6.
15. Aamir M, Masood G, Aamir W, Rasheed A, Ejaz A, Syed S. Gender difference in patients with dengue fever admitted in a teaching hospital, Lahore. *Pakistan J Med Heal Sci*. 2014;8(1):12-15.
16. Halimah Amini N, Hartoyo E. Hubungan Hematokrit Dan Jumlah Trombosit Terhadap Lama Rawat Inap Pasien Dbd Anak Di Rsud Ulin Banjarmasin. *Homeostasi*. 2019;2:407-416.
17. Sari RN, Natalia D, Parinding JT. Hubungan Lama Demam dengan Hasil Pemeriksaan Antigen Nonstruktural 1 Dengue pada Pasien Demam Berdarah Dengue di RSUD Sultan Syarif Mohamad Alkadrie Tahun 2018. *J BiomedikJBM*. 2020;12(3):153. doi:10.35790/jbm.12.3.2020.31186
18. Perdani AL, Hendra A, Mutiar A, Heriani W. Identifying clinical features of fluid status among children with suspect dengue in Indonesia. *Malahayati Int J Nurs Heal Sci*. 2021;4(1):74-78.
19. Martini M, Efriana S, Fajarini R, et al. Genotype Variants Of Dengue Virus On Dengue Hemorrhagic Fever (Dhf) Suspect: Cross Sectional Study In Health Facilities In Semarang City, Indonesia. *Eur J Mol Clin Med*. 2020;7(8):730-740.
20. Trisianti VR, Daten Beyeng RT. The Correlation Between Nutritional Status With Severity of Dengue Infection in Pediatric Patients. *Int J Healthc Sci*. 2022;10(2):14-18.
21. Muller DA, Depelsenaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis*. 2017;215(suppl_2):S89-S95. doi:10.1093/infdis/jiw649
22. Hussain R, Hashir MM, Awan Z, Abid N. Myocarditis in dengue fever - A retrospective review from a tertiary care hospital in Pakistan. *Pakistan J Med Heal Sci*. 2017;11(2):707-710.
23. Andriati R, Trisutrisno D. Pengaruh Resusitasi cairan Terhadap Status Hemodinamik Mean Arterial Pressure (MAP) pada Pasien Syok Hipovolemik di IGD RSUD Balaraja. *Med Surg Concerns*. 2021;1(1):1-13.
24. Munawaroh U, Nurmainah, Untari EK. Gambaran Penggunaan Antibiotik Pada Pasien Anak yang Menderita Demam Berdarah Dengue (DBD) di Instalasi Rawat Inap RSUD Sultan Syarif Mohammad Alkadrie Pontianak Tahun 2017. *J Mhs Farm Fak Kedokt UNTAN*. 2019;4(1):1-15.
25. Vimal S, Vishwanathan V, Dharwadker A. Dengue and Typhoid co-infection Study. *J Med Pharm Allied Sci*. 2022;11(2):4542-4546. doi:10.55522/jmpas.V11I2.2347
26. Chauhan S, Sharma S, . S, Singh P. Concurrent dengue and typhoid infection: study from a tertiary care centre in Muzaffarnagar, India. *Int J Res Med Sci*. 2019;7(5):1615. doi:10.18203/2320-6012.ijrms20191646
27. Nuevo FR, Vennari M, Agrò FE. *How to Maintain and Restore Fluid Balance: Crystalloids*.; 2013. doi:10.1007/978-88-470-2661-2_3
28. Liamis G, Filippatos TD, Elisaf MS. Correction of hypovolemia with crystalloid fluids: Individualizing infusion therapy. *Postgrad Med*. 2015;127(4):405-412. doi:10.1080/00325481.2015.1029421
29. Singh S, Kerndt CC, Davis D. Ringer's Lactate. *React Wkly*. 2022;NA;(1365):40. doi:10.2165/00128415-201113650-00153
30. Nopianto H. *Faktor-Faktor Yang Berpengaruh Terhadap Lama Rawat Inap Pada Pasien Demam Berdarah Dengue Di RSUP Dr Kariadi Semarang*.; 2012.
31. Perwira I. Faktor-faktor yang memepengaruhi lama rawat inap pada pasien yang terinfeksi virus dengue di RSUP Persahabatan , Jakarta Timur. *Tesis Univ Indones*. Published online 2011:20238015.
32. Munawwarah BAA, Perwitasari DA, Kurniawan NU. Efektivitas Cairan Kristaloid dan Koloid Pasien Demam Berdarah Anak di Rumah Sakit PKU Muhammadiyah Bantul. *J Farm Dan Ilmu Kefarmasian Indones*. 2019;5(1):20. doi:10.20473/jfiki.v5i12018.20-29

Aktivitas Analgesik Topikal Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Mint (*Mentha piperita*) pada Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Metode Hot Plate

Topical Analgesic Activity of 70% Ethanol Extract Gel of Mint Leaves (*Mentha piperita*) on White Mice (*Mus musculus*) with Hot Plate Method

Sirilus Deodatus Sawu^{1*}, Wibowo¹, Fransisca Elsia One Irawan¹

¹Program Studi S1 Farmasi,
STIKes Panti Waluya Malang,
Jalan Yulius Usman No. 62,
Klojen, Kota Malang, 65111,
Indonesia

Diajukan: 18-09-2024

Direview: 16-03-2025

Disetujui: 21-04-2025

Kata Kunci: analgesik,
daun mint, *hot plate*,
nyeri.

Keywords: analgesic, hot
plate, mint leaves, pain.

Korespondensi:

Sirilus Deodatus Sawu

sirilussawu@gmail.com



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

Nyeri merupakan salah satu masalah kesehatan yang dialami oleh sepertiga populasi dunia. Penanganan nyeri umumnya dilakukan dengan pemberian obat analgesik yang terbagi menjadi dua kelompok utama, yaitu analgesik opioid dan non-opioid. Namun, penggunaan obat tersebut dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan serta risiko ketergantungan. Salah satu alternatif yang berpotensi dikembangkan adalah analgesik berbasis bahan alam, seperti daun mint (*Mentha piperita*). Hingga saat ini, belum terdapat penelitian mengenai efektivitas ekstrak etanol daun mint sebagai analgesik topikal. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas analgesik topikal ekstrak etanol daun mint dalam bentuk sediaan gel. Uji aktivitas dilakukan melalui model induksi nyeri menggunakan metode *hot plate* pada mencit putih jantan. Gel dengan konsentrasi ekstrak 5%, 10%, dan 15% diuji serta dibandingkan dengan kontrol negatif (basis gel) dan kontrol positif (Voltaren® gel). Pengamatan setelah 30 menit menunjukkan bahwa rerata waktu latensi antara kelompok kontrol positif, konsentrasi 10%, dan 15% berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (p -value < 0,05). Selisih persentase efek maksimal yang mungkin tercapai (*maximal possible effect*-%MEP) antara kelompok 10% dan 15% relatif kecil, sehingga konsentrasi 10% dinilai sudah mampu menghasilkan efek analgesik yang optimal. Dengan demikian, gel ekstrak etanol daun mint konsentrasi 10% menunjukkan aktivitas sebagai analgesik topikal dan berpotensi untuk dikembangkan sebagai sediaan gel analgesik.

Abstract

Pain is one of the most common health problems, affecting approximately one-third of the global population. Pain management is generally carried out through the administration of analgesic drugs, which are classified into two major groups: opioid and non-opioid analgesics. However, the use of these drugs is associated with adverse side effects and a risk of dependence. One potential alternative is the development of natural-based analgesics, such as mint (*Mentha piperita*) leaves. To date, there have been no studies evaluating the effectiveness of ethanol extract of mint leaves as a topical analgesic. This study aimed to assess the topical analgesic activity of ethanol extract of mint leaves formulated into a gel dosage form. Analgesic activity was evaluated using a hot plate-induced pain model in male white mice. Gels containing 5%, 10%, and 15% concentrations of the extract were tested and compared with a negative control (gel base) and a positive control (Voltaren® gel). Observations at 30 minutes post-application revealed that the mean latency times of the 10% and 15% extract groups, as well as the positive control group, were significantly different from the negative control group (p -value < 0.05). The difference in the percentage of maximal possible effect (%MPE) between the 10% and 15% extract groups was relatively small, suggesting that the 10% concentration was sufficient to produce an optimal analgesic effect. In conclusion, the 10% ethanol extract of mint leaves in gel form exhibited topical analgesic activity and holds potential for development as a topical analgesic gel formulation.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11th Ed.):

Sawu, SD, Wibowo, W, Irawan, FEO. Aktivitas Analgesik Topikal Gel Ekstrak Etanol 70% Daun Mint (*Mentha piperita*) pada Mencit Putih (*Mus musculus*) dengan Metode Hot Plate. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 48-57, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9900](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9900)

PENDAHULUAN

Rasa nyeri menunjukkan bahwa tubuh mengalami peradangan, kerusakan jaringan, atau gangguan berat seperti gangguan sistem saraf. Maka nyeri sering dijuluki sebagai tanda bahaya yang membantu melindungi tubuh dari cedera yang lebih serius. Sensasi nyeri bisa menimbulkan ketidaknyamanan seperti sensasi tusukan, sensasi terbakar, sensasi kesetrum, dan lainnya yang mengganggu kualitas hidup pasien atau individu yang merasakan nyeri.^{1,2} Secara global, prevalensi kejadian nyeri mencapai 34,1% atau sepertiga dari penduduk dunia pada tahun 2022.³ Di Indonesia jumlah prevalensi nyeri belum pernah dilakukan penelitian secara pasti, namun data yang ada menunjukkan kejadian nyeri punggung bawah (*low back pain*) mencapai 40%, nyeri rematik mencapai 23,6%-31,3% dan nyeri kanker mencapai 5%.⁴ Studi lain secara konsisten menunjukkan bahwa wanita lebih sering merasakan nyeri daripada pria. Kejadian nyeri meningkat seiring bertambahnya usia, dan kecenderungan nyeri lebih tinggi terjadi pada masyarakat di perdesaan dibandingkan perkotaan.⁵

Nyeri dapat dibagi menjadi dua jenis berdasarkan jenisnya, yaitu nyeri nosiseptif dan nyeri neuropati. Nosisepsi merupakan sinyal saraf yang memungkinkan otak untuk mengidentifikasi rangsangan yang membahayakan dan dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan. Nosiseptor merupakan bagian ujung saraf yang bisa merasakan rangsangan yang berbahaya. Nyeri neuropati atau nyeri saraf disebabkan oleh kerusakan pada sistem saraf somatosensorik, baik pada serat perifer (A β , A δ , dan C) maupun pada neuron sentral, yang mengakibatkan perubahan struktur dan fungsi sehingga menimbulkan nyeri spontan dan peningkatan respons saraf terhadap stimulus berbahaya secara abnormal.^{6,7} Nyeri juga dapat dikelompokkan berdasarkan durasi berlangsungnya nyeri menjadi nyeri akut (kurang dari 3 bulan) dan nyeri kronik (lebih dari 3 bulan).⁸

Penanganan terapi nyeri biasanya melibatkan penggunaan obat penghilang rasa sakit atau biasa disebut analgesik. Analgesik adalah jenis obat yang dimanfaatkan untuk mengurangi atau menghindari rasa sakit tanpa menyebabkan kehilangan kesadaran.¹ Secara umum, obat penghilang rasa sakit dibagi menjadi dua kategori yaitu analgesik non-opioid dan analgesik opioid. Contoh obat-obatan seperti parasetamol dan golongan NSAID termasuk dalam kategori analgesik non-opioid. Sedangkan untuk analgesik opioid memiliki karakteristik yang mirip dengan opium atau morfin. Analgesik opioid dipergunakan untuk mengurangi atau menghilangkan rasa sakit yang tidak teratasi dengan analgesik non opioid, seperti pada kasus patah tulang dan kanker. Contoh analgesik opioid yang sering digunakan adalah kodein dan morfin. Pemilihan terapi analgesik umumnya mengikuti panduan WHO *step ladder*.^{1,9} Perlu diingat dalam penggunaan obat-obatan analgesik seringkali menimbulkan efek samping dan ketergantungan, sehingga penggunaan obat-obatan herbal menjadi salah satu alternatif dalam penanganan nyeri.¹⁰

Tanaman mint (*Mentha piperita*) memiliki potensi sebagai analgesik. Daun mint telah digunakan secara luas dalam pengobatan alternatif untuk mengatasi masalah pencernaan dan sistem saraf, berkat sifat antitumor dan antimikroba, potensi kemopreventif, perlindungan ginjal, efek antialergi, serta kemampuannya meredakan kram, gangguan pencernaan, anoreksia, mual, dan diare.¹¹ Banyak studi telah menunjukkan bahwa minyak peppermint (*peppermint oil*) mengandung berbagai metabolit sekunder. Komponen utama kimia dalam daun mint termasuk *limonene*, *cineole*, *menthone*, *menthofuran*, *isomenthone*, *mentyl acetate*, *isopulegol*, *menthol*, *pulegone*, dan *carvone*. Minyak peppermint dinyatakan sebagai agen pereda nyeri yang efektif yang dapat dioleskan dan digunakan sebagai penyejuk bagi kulit. Minyak peppermint merangsang reseptor dingin pada kulit dan memperlebar pembuluh darah untuk menghasilkan sensasi dingin dan efek analgesik.¹²

Daun mint dipilih untuk penelitian ini dibandingkan tanaman lain yang memiliki potensi serupa terkait aktivitas analgesik karena tanaman ini memiliki sensasi dingin yang dapat membantu meredakan nyeri.¹³ Tanaman ini juga telah banyak digunakan dalam pengobatan tradisional sehingga sudah diketahui memiliki profil keamanan yang baik. Selain itu, tanaman ini juga mudah dijumpai dan dibudidayakan sendiri sehingga lebih bernilai ekonomis. Ekstrak daun mint diketahui memiliki profil keamanan yang sangat baik, termasuk untuk penggunaan secara topikal. Penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan penggunaan daun mint dalam bentuk *peppermint oil* maupun ekstrak air atau ekstrak etanol tidak menimbulkan efek iritasi kulit dan

potensi sensitisasi.^{14,15} Bentuk sediaan gel dipilih sebagai pembawa ekstrak etanol daun mint karena bentuk sediaan ini memiliki kandungan air yang tinggi, sehingga dapat meningkatkan solubilisasi dan difusi senyawa aktif dari ekstrak daun mint ke dalam kulit. Selain itu, sediaan gel juga dapat memberikan sensasi dingin tambahan sehingga dapat meningkatkan efikasi sebagai analgesik. Penggunaan gel sebagai pembawa juga memungkinkan untuk dilakukan variasi terhadap konsentrasi ekstrak etanol daun mint yang hendak diujikan khasiat sebagai analgesik topikal.¹⁶

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait aktivitas analgesik topikal ekstrak etanol daun mint yang diformulasikan dalam bentuk sediaan gel. Penelitian ini berfokus pada aktivitas analgesik ekstrak etanol daun mint secara topikal di mana belum ditemukan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Sehingga ekstrak etanol daun mint dapat dikembangkan sebagai salah satu alternatif pengobatan analgesik dengan pemberian secara topikal apabila ditemukan adanya aktivitas analgesik berdasarkan pengujian yang dilakukan yaitu dengan metode *hot plate*.

METODE PENELITIAN

Rancangan Penelitian

Penelitian ini berupa eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *posttest-only control group* yang menggunakan hewan coba yaitu mencit putih (*Mus musculus*) sebagai obyek penelitian. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret hingga Agustus 2024 di Laboratorium Farmakologi STIKes Panti Waluya Malang.

Ethical Clearance

Penelitian ini telah mendapat persetujuan etik penelitian dari Komite Etik Institusi Universitas Surabaya dengan No. 403/KE/VII/2024.

Alat dan Bahan Penelitian

Alat

Peralatan yang digunakan untuk penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus)[®], blender (Phillips)[®], oven (Memmert)[®], hot plate (Thermo Scientific)[®], vaccum rotatory evaporator (IKA RV[®]), waterbath (Memmert[®]), kertas saring, sendok tanduk, kertas perkamen, spidol, gunting, stopwatch dan alat-alat gelas untuk laboratorium.

Bahan

Daun mint (*Mentha piperita*), etanol 70%, CMC Na, Gliserin, Propilenglikol, Aquades, dan gel voltaren[®]. Hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) dengan kriteria berjenis kelamin jantan, berusia 30-60 hari, berat badan 20-30 gram sebanyak 25 ekor.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Ekstrak Daun Mint

Daun mint yang digunakan adalah yang masih dalam keadaan segar. Daun mint yang sudah dipilah kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C selama 20 jam. Daun mint kering dihaluskan dengan menggunakan blender pada kecepatan 1 selama 2 menit. Selanjutnya daun mint diayak menggunakan ayakan No. 60. Diambil 100 g serbuk daun mint dan dicampur dengan 1 L etanol 70% (1:10 mL). Campuran direndam selama tiga hari atau 72 jam pada suhu ruangan (26-28°C). Setelah itu, campuran disaring menggunakan corong Buchner dengan kertas saring Whatman No. 4. Larutan campuran yang telah disaring diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C untuk menghilangkan pelarut etanol. Selanjutnya, ekstrak pekat diperoleh dengan cara diuapkan menggunakan waterbath pada suhu 50°C selama 180 menit.^{17,18}

Pembuatan Gel Ekstrak Etanol Daun Mint

Penelitian ini akan dibuat sediaan gel analgesik dengan tiga variasi konsentrasi ekstrak etanol daun mint, yaitu 5%, 10%, dan 15%. Formulasi standar menggunakan basis gel *Carboxy Methyl Cellulose Sodium* (CMC Na). Formulasi gel analgesik ekstrak etanol daun mint dapat dilihat pada **Tabel 1**.¹⁹

Tabel 1. Formula Gel Ekstrak Etanol Daun Mint

No	Bahan	Kontrol Negatif	Konsentrasi Ekstrak dalam Gel Formula		
			F1 (5%)	F2 (10%)	F3 (15%)
1	Ekstrak daun mint	-	2,5 g	5 g	7,5 g
2	CMC Na	2,5 g	2,5 g	2,5 g	2,5 g
3	Gliserin	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
4	Propilenglikol	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
5	Aquades ad	50 mL	50 mL	50 mL	50 mL

Pembuatan gel dimulai dengan menimbang semua bahan yang akan digunakan sesuai dengan formulasi yang telah ditentukan. CMC dilarutkan dalam beaker glass yang berisi air yang telah dihangatkan di atas *hot plate* pada suhu 50°C sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga terbentuk massa gel, kemudian ditambahkan ekstrak etanol daun mint sejumlah konsentrasi yang akan dibuat dan tetap dilakukan pengadukan hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan gliserin, propilenglikol dan air dengan pengadukan secara kontinyu hingga terbentuk gel yang homogen. Gel voltaren dengan kandungan Natrium Diklofenak 1% digunakan sebagai kontrol positif. Na Diklofenak merupakan obat dari golongan NSAID yang memiliki efek sebagai analgesik.

Penyiapan Mencit Putih (*Mus musculus*)

Penelitian ini menggunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) dengan kriteria inklusi mencit jantan putih yang sehat, tidak stres dan bergerak aktif, berumur antara 30-60 hari dengan berat badan 20-30 gram. Kriteria eksklusi yaitu mencit putih yang mati atau sakit sebelum penelitian. Mencit putih akan *drop-out* dari penelitian apabila mati, stress atau tampak sakit. Sebanyak 25 ekor mencit putih yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi disiapkan dan dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Sebelum diuji, hewan uji disesuaikan dengan lingkungan kandangnya selama 7 hari. Mencit yang akan diberikan pengujian terlebih dahulu ditimbang berat badan dan dilihat aktivitas mencit. Pada saat pengujian, setiap mencit akan menerima perlakuan sesuai dengan kelompok yang telah ditentukan.²⁰ Setiap mencit hanya diberikan 1 perlakuan sehingga jumlah mencit dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut :²¹

$$\begin{aligned}
 (n-1)(t-1) &\geq 15 \quad \dots\dots\dots(1) \\
 (n-1)(5-1) &\geq 15 \\
 (n-1)(4) &\geq 15 \\
 4n - 4 &\geq 15 \\
 4n &\geq 19 \\
 n &\geq 4,75 \text{ (dibulatkan 5 ekor mencit setiap kelompok)}
 \end{aligned}$$

Keterangan :

n = besar sampel

t = jumlah kelompok

Pengujian Aktivitas Analgesik

Mencit dibagi dalam 5 kelompok perlakuan dimana setiap kelompok perlakuan terdiri dari 5 ekor mencit yaitu:

1. Kelompok I: Dioleskan gel basis CMC Na ke telapak kaki mencit (kontrol negatif)
2. Kelompok II: Dioleskan gel voltaren ke telapak kaki mencit (kontrol positif)
3. Kelompok III: Dioleskan gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 5% ke telapak kaki mencit
4. Kelompok IV: Dioleskan gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 10% ke telapak kaki mencit
5. Kelompok V: Dioleskan gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 15% ke telapak kaki mencit

Setelah dioleskan sesuai dengan perlakuan setiap kelompok, mencit dipegang terlebih dahulu kurang lebih 1 menit untuk penyerapan gel. Mencit kemudian diletakkan diatas *hot plate* dengan suhu 50±5°C. Penundaan waktu antara penyentuhan mencit dengan permukaan panas dan munculnya rasa nyeri seperti perilaku menjilat kaki, gemetar, atau melompat, yang diukur dalam detik sebagai respons latensi. Pengukuran dilakukan

setiap periode waktu tertentu selama dua jam dengan batas waktu 15 detik untuk latensi *hot plate*.²⁰ Selanjutnya dilakukan perhitungan aktivitas analgesik menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Aktivitas Analgesik} = \frac{(T-K)}{(C-K)} \times 100\% \dots\dots\dots(2)$$

Keterangan :

T = Waktu latensi setelah dioleskan gel

K = Waktu latensi pada kelompok kontrol negatif

C = Waktu *cut off* (15 detik)

Analisa Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS versi 26. Data % aktivitas analgesik diuji dengan *Kolmogorov-Smirnov* untuk menilai distribusi data. Setelah itu dilakukan pengujian *Levene* untuk mengetahui keseragaman data. Perbedaan diidentifikasi dengan menggunakan uji *Kruskal Wallis* dan kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan daun mint (*Mentha piperita*) sebagai tumbuhan yang berkhasiat sebagai analgesik. Daun mint yang digunakan dalam penelitian ini telah terlebih dahulu dilakukan determinasi oleh UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu dan hasilnya yaitu spesies yang digunakan adalah *Mentha piperita*. Sebelum diekstraksi serbuk kering daun mint terlebih dahulu dihaluskan dengan tujuan untuk mengecilkan ukuran simplisia sehingga dapat meningkatkan kontak serbuk dan pelarut.²² Ekstraksi dilakukan menggunakan etanol 70% dengan teknik maserasi selama 72 jam dan diperoleh nilai rendemen ekstrak daun mint sebesar 29,98%, memenuhi syarat untuk rendemen ekstrak kental yang ideal, yaitu nilainya tidak kurang dari 10%. Semakin besar nilai rendemen menunjukkan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak dikarenakan pelarut yang digunakan yaitu etanol 70% dapat melarutkan senyawa polar dan non polar.²³ Penggunaan pelarut etanol 70% karena lebih efektif dibandingkan pelarut lain seperti etanol 96% atau air saja dalam mengekstraksi komponen flavonoid, fenolik dan minyak atsiri seperti mentol yang terdapat pada daun mint.^{24,25} Etanol 70% juga mempunyai titik didih yang rendah dan memiliki keamanan yang baik dalam penggunaan.²⁶ Suhu yang digunakan pada pembuatan ekstrak baik pada pengeringan daun mint basah menjadi kering pada oven maupun pemekatan ekstrak etanol daun mint pada *rotary evaporator* adalah 50°C dikarenakan dalam daun mint juga mengandung minyak atsiri dimana dengan peningkatan suhu akan berpengaruh terhadap kandungan minyak atsiri. Selain itu, pemekatan ekstrak etanol daun mint pada *rotary evaporator* dan *waterbath* juga bertujuan untuk menghilangkan pelarut.^{18,27}

Setelah ekstrak kental diperoleh kemudian dibuat sediaan gel dengan menggunakan basis gel CMC-Na. CMC-Na dipilih karena beberapa kelebihan dibandingkan basis-basis yang lain, antara lain basis CMC-Na mudah mengembang dengan prosedur pembuatan yang benar, dapat bercampur dengan zat aktif dan gel yang dihasilkan tampilannya lebih jernih. Selain itu, sifat basis CMC-Na memberikan viskositas yang besar, sehingga gel yang menempel di kulit akan lebih lama. Sediaan gel yang diformulasikan antara lain yang mengandung ekstrak 5%, 10%, 15% dan hanya basis gel sebagai kontrol negatif.²⁸ Pemilihan konsentrasi ekstrak yang digunakan berkaitan dengan kandungan menthol yang terdapat dalam daun mint. Menthol diketahui untuk pemberian secara topikal dengan konsentrasi 2% sampai dengan 16% dapat mengurangi rasa nyeri.²⁹

Pengujian aktivitas analgesik topikal menggunakan mencit (*Mus musculus*). Mencit dibagi dalam 5 kelompok yang terdiri dari kelompok kontrol negatif (mendapatkan basis gel), kontrol positif (voltaren gel), kelompok uji 1 (mendapatkan gel ekstrak etanol daun mint 5%), kelompok uji 2 (mendapatkan gel ekstrak etanol daun mint 10%), dan kelompok uji 3 (mendapatkan gel ekstrak etanol daun mint 15%). Mencit jantan dipilih sebagai sampel penelitian ini karena mencit jantan tidak mengalami siklus estrus sehingga sampel

menjadi lebih seragam, mudah dikontrol dan harapannya akan memberikan hasil yang lebih akurat.³⁰ Metode induksi nyeri yang digunakan adalah *hot plate* dan pengamatan dilakukan pada saat sebelum diberikan perlakuan dan setelah diberikan perlakuan pada menit ke-30, 60, 90, 120 dan 150. Voltaren gel yang mengandung Diklofenak Na 1% digunakan sebagai kontrol positif obat ini merupakan golongan NSAID yang bekerja dengan menghambat aktivitas COX-1 dan COX-2 dengan menghambat sintesis prostaglandin-E₂ (PGE₂) yang berperan dalam patofisiologi nyeri.³¹ *Hot plate* dipilih sebagai metode induksi nyeri karena metode ini dapat memberikan hasil pengujian yang cepat, murah, andal, dan dapat direproduksi yang mengukur latensi reaksi nosiseptik yang ditimbulkan oleh rangsangan termal serta tidak menimbulkan peradangan berlebihan.³² Hasil perlakuan dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Aktivitas Analgesik Tiap Kelompok Perlakuan Berdasarkan Rerata Waktu Latensi Menggunakan Metode *Hot Plate*

No	Kelompok Perlakuan	Rerata Waktu Latensi (detik)					
		0 menit	Setelah 30 menit	Setelah 60 menit	Setelah 90 menit	Setelah 120 menit	Setelah 150 menit
1	KN	5,89 ± 0,08	6,86 ± 0,02	7,28 ± 0,03	7,91 ± 0,02	7,96 ± 0,04	7,82 ± 0,02
2	KP	6,25 ± 0,04	10,36 ± 0,11*	12,53 ± 0,29*	15,00 ± 0,00*	15,00 ± 0,00*	15,00 ± 0,00*
3	F1	5,98 ± 0,20	7,39 ± 0,19	10,70 ± 0,42*	10,70 ± 0,15*	10,01 ± 0,23*	10,49 ± 0,09*
4	F2	6,22 ± 0,16	10,35 ± 0,52*	12,42 ± 0,69*	12,08 ± 0,17*	13,25 ± 0,18*	10,66 ± 0,19*
5	F3	6,26 ± 0,04	11,52 ± 0,29*	12,74 ± 0,50*	13,17 ± 0,38*	13,76 ± 0,21*	10,92 ± 0,36*

Keterangan: KN = kontrol negatif; KP = kontrol positif; F1 = gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 5%; F2 = gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 10%; F3 = gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 15%.

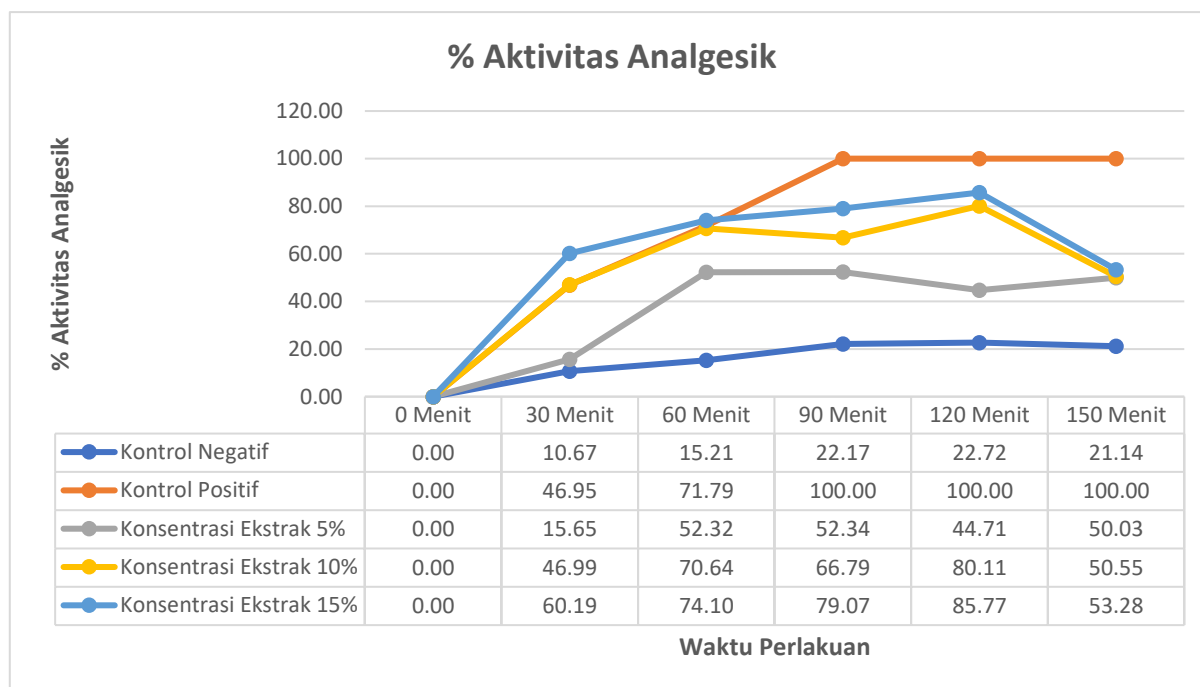
*berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0,05$; *kruskal wallis* dilanjutkan *Mann Whitney*)

Analisa statistik menggunakan uji non parametrik yaitu Uji *Kruskal Wallis* dan dilanjutkan dengan Uji *Mann Whitney* karena data yang diperoleh tidak homogen dan tidak terdistribusi normal. Pada saat belum diberikan perlakuan (t_0), tidak terdapat perbedaan yang signifikan dari ke-5 kelompok terkait rerata waktu latensi ($p\text{-value} > 0,05$). Pada menit ke-0 semua kelompok belum mendapatkan perlakuan atau belum diberikan gel sehingga durasi mencit menunjukkan rasa nyeri berupa menjilat telapak kaki, melompat, atau bergetar pada semua kelompok tidak berbeda. Pengamatan setelah 30 menit menunjukkan bahwa rerata waktu latensi pada kelompok kontrol positif, konsentrasi ekstrak 10% dan konsentrasi ekstrak 15% berbeda secara signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif ($p\text{-value} < 0,05$).

Rerata waktu latensi yang diperoleh setiap kelompok kemudian digunakan untuk menghitung nilai persen *maximal possible effect* (MPE) atau % aktivitas analgesik. Hasil yang diperoleh seperti yang dapat dilihat pada **Gambar 1** menunjukkan pada menit ke-30 dan 60 kelompok uji gel ekstrak etanol daun mint 15% memiliki nilai %MEP tertinggi yaitu sebesar 60,19% dan 74,10% berturut-turut. Pada menit ke-90 hingga 150, kontrol positif memiliki nilai %MEP tertinggi yaitu sebesar 100%. Grafik %MEP kontrol positif meningkat seiring waktu. Sedangkan untuk gel yang mengandung ekstrak daun mint %MEP tertinggi terjadi pada rentang 90-120 menit. Selisih %MEP pada kelompok yang diberikan gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 10% dan konsentrasi 15% relatif tidak terlalu berbeda sehingga gel ekstrak daun mint dengan konsentrasi 10% sudah dapat menghasilkan efek analgesik yang optimal.

Aktivitas analgesik ekstrak etanol daun mint ini juga didukung dari data penelitian yang ada, di mana hasil penelitian oleh Belemkar (2013) menunjukkan kandungan fitokimia dalam ekstrak daun mint antara lain alkaloid, polifenol, flavonoid, tanin, glikosida jantung dan diterpen. Alkaloid merupakan salah satu kelompok fitokimia terbesar dalam tanaman dan sangat efektif dalam pengobatan, hal ini menyebabkan pengembangan obat penghilang rasa sakit yang kuat.³³ Selain alkaloid, aktivitas daun mint sebagai analgesik disebabkan oleh kandungan mentol yang efektif meredakan nyeri dengan meningkatkan ambang rangsangan sel dan menurunkan rangsangan serta transmisi sinaptik.³⁴ Menthol dapat menghambat *voltage-gated calcium channels* yang berperan dalam pengaturan ambang nyeri serta mengaktifkan reseptor κ -opioid sentral yang meningkatkan ambang nyeri sentral.^{35,36} Ekstrak etanol daun mint merupakan analgesik yang baik untuk

dioleskan dan juga sebagai pendingin untuk kulit karena kandungan minyak peppermint merangsang reseptor dingin pada kulit dan melebarkan pembuluh darah sehingga menimbulkan sensasi dingin dan efek analgesik.^{11,37} Mentol juga telah dikenal sebagai aktivator reseptor *transient receptor potential melastatin-8* (TRPM8) jaringan epitel yang disebut juga sebagai reseptor dingin. Kandungan mentol pada ekstrak daun mint mempengaruhi reseptor TRPM8 sehingga menimbulkan efek penghilang rasa sakit dan sensasi dingin.¹³



Gambar 1. Hasil Perhitungan % Aktivitas Analgesik (MPE) Tiap Kelompok Perlakuan

Penelitian ini memberikan data awal bahwasanya ekstrak etanol daun mint memiliki potensi sebagai analgesik topikal sehingga dapat dikembangkan lagi dalam penelitian-penelitian selanjutnya terkait khasiat analgesik topikal tersebut. Konsentrasi ekstrak etanol daun mint sebesar 10% dalam sediaan gel sudah dapat menghasilkan efek analgesik yang optimal namun efek ini belum dapat dikatakan cukup signifikan untuk menjadi alternatif dibandingkan analgesik konvensional seperti NSAID karena masih terbatasnya data penelitian yang ada. Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar pengembangan menjadi produk farmasi, stabilitas sediaan, atau uji toksisitas lebih lanjut.

Penelitian ini telah mempertimbangkan adanya kemungkinan faktor bias yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor seperti kondisi lingkungan dan variabilitas mencit. Kondisi lingkungan dapat menyebabkan mencit menjadi stres. Stres memicu efek modulasi pada persepsi nyeri pada hewan. Nyeri yang sering timbul akibat adanya stres yaitu nyeri visceral.^{38,39} Sehingga dalam penelitian mencit harus dipastikan terbebas dari kondisi stress akibat kondisi lingkungan. Adanya variabilitas mencit misalnya berat badan juga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Berat badan yang berlebih atau obesitas diketahui dapat meningkatkan resiko kejadian nyeri kronis.⁴⁰ Mencit yang digunakan dalam penelitian telah dilakukan penimbangan secara berkala untuk memastikan berat badan sesuai dengan yang ditentukan yaitu 20-30 gram.

Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu metode induksi nyeri yang digunakan hanya *hot plate* sehingga perlu dilakukan pengujian analgesik tambahan lainnya untuk dapat memastikan dan memperkuat data penelitian ini terkait efek analgesik topikal yang dimiliki oleh daun mint seperti uji *tail-flick* atau uji *writhing test*. Sediaan gel yang digunakan sebagai pembawa juga belum dilakukan optimasi karena tujuan utama penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas analgesik topikal dari ekstrak etanol daun mint sehingga penelitian selanjutnya dapat dilakukan optimasi formula.

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun *Mentha piperita* menunjukkan aktivitas analgesik topikal yang signifikan berdasarkan nilai persentase aktivitas analgesik. Analisis statistik menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara gel ekstrak daun mint konsentrasi 10% dan 15% dibandingkan dengan kontrol positif (Voltaren® gel). Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 10% telah mampu memberikan efek analgesik yang optimal. Dengan demikian, gel ekstrak *M. piperita* konsentrasi 10% berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai sediaan analgesik topikal berbahan dasar alami.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan dukungan dalam pelaksanaan penelitian ini, khususnya untuk Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM) Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Panti Waluya Malang sebagai penyandang dana penelitian ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Para penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan antar penulis maupun dengan pihak manapun dalam penyusunan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wardoyo AV, Oktarlina RZ. Tingkat Pengetahuan Masyarakat Terhadap Obat Analgesik Pada Swamedikasi Untuk Mengatasi Nyeri Akut. *J Ilm Kesehat Sandi Husada*. 2019;10(2):156-160. doi:10.35816/jiskh.v10i2.138
2. Sawu S, Wibowo, Irawan F. Pemberdayaan Anggota PKK dalam Penggunaan Obat Antinyeri dan Multivitamin pada Lansia di Kelurahan Kauman Kota Malang. *J Abdimas PHB*. 2024;7(3):733-740.
3. Macchia L, Delaney L, Daly M. Global pain levels before and during the COVID-19 pandemic. *Econ Hum Biol*. 2024;52(November 2023):101337. doi:10.1016/j.ehb.2023.101337
4. Setyaningsih R, Kusuma Astuti R. Studi Deskriptif Tingkat Pengetahuan Ibu Tentang Penanganan Nyeri. *Intan Husada J Ilm Keperawatan*. 2022;10(02):75-82. doi:10.52236/ih.v10i2.242
5. Zimmer Z, Fraser K, Grol-Prokopczyk H, Zajacova A. A global study of pain prevalence across 52 countries: Examining the role of country-level contextual factors. *HHS Public Access*. 2022;163(9):1740-1750. doi:10.1097/j.pain.0000000000002557
6. Yam MF, Loh YC, Tan CS, Adam SK, Manan NA, Basir R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci*. 2018;19(8). doi:10.3390/ijms19082164
7. Gunadi E, Istiana T. Effective pain management in patients. *Medula*. 2024;14(1). doi:10.7748/ns.2017.e10736
8. Huang YL, Tsay WI, Her SH, et al. Chronic pain and use of analgesics in the elderly: A nationwide population-based study. *Arch Med Sci*. 2020;16(2):627-634. doi:10.5114/aoms.2020.92894
9. Kepmenkes. Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tatalaksana Nyeri. Published online 2019.
10. Paul AK, Smith CM, Rahmatullah M, et al. Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *pharmaceuticals*. 2021;14:1-22.
11. Balakrishnan A. Therapeutic uses of peppermint –A review. *J Pharm Sci Res*. 2015;7(7):474-476.
12. Loolaie M, Moasefi N, Rasouli H, Adibi H. Peppermint and Its Functionality: A Review Loolaie. *Arch Clin Microbiol*. 2017;08(04):1-16. doi:10.4172/1989-8436.100053
13. Cheng H, An X. Cold stimuli, hot topic: An updated review on the biological activity of menthol in relation to inflammation. *Front Immunol*. 2022;13(November):1-15. doi:10.3389/fimmu.2022.1023746
14. Johnson W, Bergfeld WF, Belsito D V, et al. Amended Safety Assessment of Mentha piperita (Peppermint)–Derived Ingredients as Used in Cosmetics. *Int J Toxicol*. 2023;42(3_suppl):117S-143S. doi:10.1177/10915818231205837
15. Chumpitazi BP, Kearns GL, Shulman RJ. Review article: the physiological effects and safety of peppermint

- oil and its efficacy in irritable bowel syndrome and other functional disorders. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(6):738-752. doi:10.1111/apt.14519
16. Sukartiningsih YNNT, Edi HJ, Siampa JP. Formulasi Sediaan Gel Ekstrak Etanol Daun Kaliandra (*Calliandra surinamensis* Benth) Sebagai Antibakteri. *Pharmacon.* 2019;8(4):801. doi:10.35799/pha.8.2019.29356
 17. Maqsood S, Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Sumpavapol P, Abushelaibi A. Antioxidant activity of date (*Phoenix dactylifera* var. Khalas) seed and its preventive effect on lipid oxidation in model systems. *Int Food Res J.* 2015;22:1180-1188.
 18. Indratmoko S, Agus Faizal I, Tri Kumala Swandari M. Metode Perbandingan Maserasi Dan Soxhletasi Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) Terhadap Efektivitas Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *J Ilmu Kefarmasian.* 2023;4(1):64-72.
 19. Sangadji S, Wullur AC, Bodhi W. Formulasi Dan Uji Gel Ekstrak Etanol Herba Suruhan (*Peperomia Pellucida* [L.] Kunth) Terhadap Luka Bakar Pada Kelinci (*Oryctolagus Cuniculus*). *PharmaconJurnal Ilm Farm.* 2018;7(1):10-21.
 20. Jayantini NLPEP, Ayundita NPT, Mahaputra IPA, Fatturochman FD, Putra AAGRY. Uji Aktivitas Analgesik Gel Bulung Boni (*Caulerpa* Sp.) Terhadap Mencit Putih (*Mus musculus*). *J Ilm Medicam.* 2021;7(1):27-31. doi:10.36733/medicamento.v7i1.1502
 21. Indratama D, Yenita. Uji Efektivitas Antibiotik Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. *J Pandu Husada.* 2019;1(1):61-65. doi:10.3917/cerpsy.087.0064
 22. Handoyo DLY. The Influence Of Maseration Time (Immeration) On The Vocity Of Birthleaf Extract (*Piper Betle*). *J Farm Tinctura.* 2020;2(1):34-41. doi:10.35316/tinctura.v2i1.1546
 23. Badriyah L, Fariyah D. Optimalisasi ekstraksi kulit bawang merah (*Allium cepa* L) menggunakan metode maserasi. *J Sint Penelit Sains, Terap dan Anal.* 2023;3(1):30-37. doi:10.56399/jst.v3i1.32
 24. Nurhasanah D, Ulvia R, Junita F. The Effect of Ethanol Concentration Variations on The Total Phenolic and Flavonoid Levels of *Bauhinia purpurea* L . Leaf Extract. *J Biotechnol Nat Sci.* 2024;4(2):79-87.
 25. Mirzaei A, Rezanejad MT, Mirzaei N. Phytochemical and antiradical properties of alcoholic and aqueous extracts of red capsicum and *Mentha Piperita*. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* 2015;6(3):174-179.
 26. Maharani I, Kunarto B, Sani EY, Ery P. Pengaruh Rasio Daun Peppermint: Etanol dan Lama Ekstraksi Menggunakan UAE terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak yang Dihasilkan. *J Teknol Has Pertan.* Published online 2019:1-10.
 27. Beigi M, Torki-Harchegani M, Pirbalouti AG. Quantity and chemical composition of essential oil of peppermint (*Mentha × piperita* L.) leaves under different drying methods. *Int J Food Prop.* 2018;21(1):267-276. doi:10.1080/10942912.2018.1453839
 28. Widyaningrum NR, Novitasari M, Puspitasary K. The Differences Of Cmc Na Basis Formula Variation On Physical Properties Of Ethanol Extract Gel Of Peanut Shells (*Arachis Hypogaea* L). *Avicenna J Heal Res.* 2019;2(2):121.
 29. Li Z, Zhang H, Wang Y, Li Y, Li Q, Zhang L. The distinctive role of menthol in pain and analgesia: Mechanisms, practices, and advances. *Front Mol Neurosci.* 2022;15(October):1-19. doi:10.3389/fnmol.2022.1006908
 30. Setiawan MI. Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) Mencegah Kerusakan Mukosa Duodenum Tikus Wistar Yang Dipapar Etanol 40%. *Herb-Medicine J.* 2020;3(2):27. doi:10.30595/hmj.v3i2.7050
 31. El-Mahmoudy A, Gheith I. The anti-nociceptive potential of tilmicosin against chemical-induced but not thermal-induced pain in mice. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2016;29(1):9-16. doi:10.1177/0394632015593232
 32. Modi AD, Parekh A, Pancholi YN. Evaluating pain behaviours: Widely used mechanical and thermal methods in rodents. *Behav Brain Res.* 2023;446:114417. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114417
 33. Belemkar S, Thakre SA, Pata MK. Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activities of Methanolic Extract of *Adhatoda vasica* Nees and *Mentha*. *Inven Rapid Ethnopharmacol.* 2013;2013(2):2-7.
 34. Almatroodi SA, Alsahli MA, Almatroudi A, Khan AA, Rahmani AH. Peppermint, (*mentha × piperita*): Role in management of diseases through modulating various biological activities. *Pharmacogn J.*

2021;13(3):822-827. doi:10.5530/pj.2021.13.104

35. Prasanna X, Sarojini R, Thilagam T, Susila K. Evaluation Of Analgesic Activity Of Mentha Piperita (Aqueous Extract) In Swiss Male Albino Mice. *Int J Sci Res*. 2018;(10):68-69.
36. Mogosan C, Vostinaru O, Oprean R, et al. A comparative analysis of the chemical composition, anti-inflammatory, and antinociceptive effects of the essential oils from three species of Mentha cultivated in Romania. *Molecules*. 2017;22(2). doi:10.3390/molecules22020263
37. Santenna C, Kumar S, Balakrishnan S, Jhaj R, Ahmed SN. A comparative experimental study of analgesic activity of a novel non-steroidal anti-inflammatory molecule – zaltoprofen, and a standard drug – piroxicam, using murine models. *J Exp Pharmacol*. 2019;11:85-91. doi:10.2147/JEP.S212988
38. Moloney RD, O'Mahony SM, Dinan TG, Cryan JF. Stress-induced visceral pain: Toward animal models of irritable-bowel syndrome and associated comorbidities. *Front Psychiatry*. 2015;6(FEB):1-30. doi:10.3389/fpsy.2015.00015
39. Baker BI, Machin KL, Schween-Lardner K. When pain and stress interact: looking at stress-induced analgesia and hyperalgesia in birds. *World's Poult Sci J*. 2019;75(3):457–468. doi:10.1017/S0043933919000382
40. Marques Miranda C, de Lima Campos M, Leite-Almeida H. Diet, body weight and pain susceptibility – A systematic review of preclinical studies. *Neurobiol Pain*. 2021;10:100066. doi:https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2021.100066

In-Vitro Cholesterol Reduction Using Three Dosages of Chitosan from Mangrove Crab Shells (*Scylla serrata*) in Effervescent Granules Suspension

Uji In-Vitro Penurunan Kadar Kolesterol dengan Perbandingan Tiga Dosis Kitosan Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) pada Suspensi Granul Effervescent

Erna Sri Novyanti¹, Fateha Rizka Andina¹, Laura Andrea Subekti¹, Hilya Nur Imtihani^{2*}

¹Diploma Three Program, Department of Pharmacy, Akademi Farmasi Surabaya, Surabaya, East Java, 60232, Indonesia.

²Faculty of Pharmacy, Universitas Hang Tuah, Jl. Arief Rahman Hakim No. 150, Keputih, Sukolilo District, Surabaya, East Java 60111, Indonesia.

Submitted: 26-09-2024

Reviewed: 22-01-2025

Accepted: 21-04-2025

Keywords: chitosan, cholesterol, effervescent, Lieberman Burchard, mangrove crab shell.

Kata Kunci: cangkang kepiting bakau, kitosan, kolesterol, effervescent, Lieberman Burchard.

Correspondence:

Hilya Nur Imtihani

hilya.nur@hangtuah.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Authors

Abstract

Changes in human lifestyle—such as smoking, lack of physical activity, and poor dietary habits—have contributed significantly to the increasing incidence of hypercholesterolemia. Most cholesterol-lowering drugs currently available are chemically synthesized and may be associated with undesirable side effects. Consequently, there is growing interest in developing safer, natural alternatives. Indonesia produces a large volume of crab shell waste, which presents an opportunity for the sustainable production of chitosan, a biopolymer known for its cholesterol-lowering potential. However, chitosan has limited solubility in water, which can hinder its absorption and usability. To address this limitation, chitosan was formulated into an effervescent granule suspension to enhance solubility and improve patient compliance through easier consumption in liquid form. The effervescent granule suspensions were prepared using the wet granulation method. This study aimed to evaluate their cholesterol-lowering effects using the in vitro Lieberman–Burchard method, employing three different chitosan doses: F1 (45 mg), F2 (55 mg), and F3 (75 mg), in order to determine the optimal dosage. The average cholesterol reduction percentages were F1 = 14.66% ± 2.12, F2 = 22.39% ± 6.06, F3 = 13.37% ± 2.99, and simvastatin = 19.02% ± 0.74. Although F2 exhibited the highest cholesterol-lowering activity, the differences among the three formulations were not statistically significant ($p = 0.156$).

Abstrak

Pola hidup manusia yang telah berubah menjadi kebiasaan yang tidak sehat seperti merokok, jarang berolahraga, dan pola makan yang buruk. Hal ini dapat menyebabkan hiperkolesterolemia. Namun, obat penurun kolesterol yang beredar di pasaran berasal dari bahan kimia yang memiliki efek samping tertentu, oleh karena itu diperlukan alternatif lain dari bahan alam. Indonesia memiliki banyak limbah cangkang kepiting yang dapat disintesis menjadi kitosan. Kitosan memiliki efektivitas sebagai penurun kolesterol. Namun, kitosan memiliki sifat kelarutan yang agak sulit dalam air sehingga alternatif sediaan yang dipilih adalah dibuat menjadi suspensi granul *effervescent*. Suspensi granul *effervescent* dibuat dengan metode granulasi basah. Selanjutnya, suspensi tersebut dilakukan uji penurunan kolesterol secara *in-vitro* metode *Lieberman Burchard* dengan simvastatin sebagai kontrol positif. Pada penelitian ini digunakan 3 formula dengan dosis kitosan yang berbeda, yaitu F1 = 45 mg, F2 = 55 mg dan F3 = 75 mg. Rata-rata hasil persentase penurunan kolesterol yaitu F1 = 14,66% ± 2,12; F2 = 22,39% ± 6,06; F3 = 13,37% ± 2.99 dan simvastatin = 19,02% ± 0,74. Dari hasil yang diperoleh dapat diketahui bahwa dosis kitosan 55 mg (F2) memiliki nilai penurunan kolesterol paling tinggi dibandingkan dengan F1 dan F3. Meskipun demikian, tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara hasil ketiga formula dengan nilai p -value yang diperoleh sebesar 0,156.

How to cite: (citation style AMA 11th Ed.)

Novyanti, ES, Andina, FR, Subekti, LA, Imtihani, HN. In-Vitro Cholesterol Reduction Using Three Dosages of Chitosan from Mangrove Crab Shells (*Scylla serrata*) in Effervescent Granules Suspension. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 58-66, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9914](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9914)

INTRODUCTION

The modern lifestyle of people in Indonesia has led to lower awareness of health, especially on diet, so that health problems often arise. Fast food that contains more saturated fat is preferred by the public. If consuming fast food continuously, not balanced with sufficient exercise, there will be a buildup of fat in the blood vessels and cause hypercholesterolemia. Changes in the ratio of Low Density Lipoprotein (LDL) and High Density Lipoprotein (HDL) play a role in the pathogenesis of Coronary Heart Disease (CHD), so it is necessary to manage the amount of Low Density Lipoprotein (LDL) and High Density Lipoprotein (HDL) to avoid preventing coronary heart disease due to the formation of atherosclerotic plaques in the coronary arteries.¹

The diversity of biota that has not been maximally utilized is the shelled animals of the Crustacea group. Crustacean waste is generally a source of chitosan. Mangrove crabs (*Scylla serrata*) are one of the largest groups of animals from the crab community compared to king crabs. Chitin content in shrimp shells reaches 42%-57%, while in crab shells it reaches 50%-60%.²

Chitin obtained from demineralization and deproteination process is converted into chitosan by deacetylation process.³ Chitosan compounds can degrade contaminants, separate wastewater from petroleum residues, serve as seed coatings, exhibit anti-cholesterol and anticoagulant properties, and absorb heavy metals.⁴ Chitosan is biodegradable, not digested by the body and reduces fat content by functioning as an absorbent.

Chitosan has anti-cholesterol effectiveness, research by Agustina (2014),⁵ which compares the administration of chitosan doses of 35 mg, 45 mg and 55 mg in rats fed high trans fatty acid feed, states that chitosan can reduce total cholesterol levels in vivo. In the previous research, mangrove crab shell chitosan extract (*Scylla serrata*) prepared into solid dispersion system that was able to reduce cholesterol levels in vitro test results from a 55 mg chitosan solid dispersion sample: PVP K-30 = 1: 2. which obtained the best result of 29.56%.⁶ This research looked at the comparison of 3 doses of chitosan (45 mg, 55 mg, 75 mg) to find out the most optimal dose for lowering cholesterol.

In this study, chitosan was prepared in suspension dosage form specifically effervescent granule suspension because chitosan have a limit solubility in water so that suspension can be an alternative to water-insoluble active ingredients in liquid formulation.⁷ Effervescent preparations are acid and base formulations that can produce gas when reacting with water. This dosage form was chosen because it provides a fresh sensation and are able to cover the bitter taste of active substances when consumed. This drink is in demand and sells well because of its delicious taste and easy way of serving.⁸ The effervescent granule suspension was prepared by wet granulation method. The wet granulation method is commonly employed when the active pharmaceutical ingredient is resistant to moisture and heat, and exhibits relatively poor flowability and compressibility. The method of making effervescent granules with wet granulation is carried out by separating the acid and base components so that premature carbonation reactions do not occur.⁷

The in vitro test was carried out with the Liberman Burchard test method. The principle of the Liberman Burchard test to identify steroid class compounds, one of which is cholesterol.⁹ Lieberman Burchard uses a mixed reagent of anhydrous acetate and concentrated sulfuric acid. Testing is done using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 200-800 nm.¹⁰

This study aims to compare the effectiveness of chitosan doses of 45 mg, 55 mg, 75 mg and the positive control was Simvastatin 10 mg in reducing cholesterol levels with in vitro tests of effervescent granule suspension of mangrove crab shell chitosan (*Scylla serrata*).

RESEARCH METHOD

Tools. The tools used in this study were analytical balance (OHAUS-PA214), Spectrophotometer UV-Vis (Thermo Genesys 102), Oven (Mettler), Centrifuge (PCL-03), Ultrasonic (GT Sonic), mortar, stamper, beaker glass, stir bar, parchment paper, watch glass, spatula, tweezers, measuring cup, porcelain cup, and erlenmeyer.

Materials. Chitosan was synthesized from discarded mangrove crab (*Scylla serrata*) shells obtained from Layar Restaurant located in Surabaya, Indonesia. Granule effervescent materials such as anhydrous lactose (pharmaceutical grade) was purchased from Pharma Chemical, citric acid (pharmaceutical grade) and tartaric acid (pharmaceutical grade) from Dwilab Indonesia, PVP K-30 (pharmaceutical grade) from Aloin Labora, sodium bicarbonate (pharmaceutical grade) from Mitra Wacana Media, Xanthan Gum (pharmaceutical grade) from Aloin Labora, PEG 6000 (pharmaceutical grade) from Merck, Tween 80 (pharmaceutical grade) from Muda Berkah Jogja, ethanol 70% (pharmaceutical grade) from Medika and Aquadest.

Formulation of Effervescent Granules Suspension

The effervescent granule suspension formulation of chitosan extract of mangrove crab shell (*Scylla serrata*) was made by wet granulation method. Each formula was made with a dose comparison of chitosan to see its effect on the effectiveness of the in vitro test in reducing cholesterol levels. The 3 formulas as listed in **Table 1**.

Table 1 Effervescent Granule Suspension Formula⁷

Material Name	Material Function	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
Chitosan	Active Ingredients	45 mg	55 mg	75 mg
Citric Acid	Acid Source	10	10	10
Tartric Acid	Acid Source	20	20	20
Sodium Bicarbonate	Base Source	30	30	30
PVP K-30	Binder	3	3	3
Xanthan Gum	Suspending Agent	1	1	1
Lactose ad	Fillers/Sweeteners	100	100	100
70% Alcohol	Wetting Agent	qs	qs	qs

Preparation of Effervescent Granule Suspension

Citric acid and tartric acid was put into a mortar and then crushed until homogeneous into an acid mixture. The acid mixture add with PVP K-30, xanthan gum, lactose then stirred until homogeneous and dripped little by little with 70% alcohol to form a callous mass into an acid granule mass. The acid granule mass was sieved with mesh no. 12 sieve into acid granule. The acid granule was placed on a baking sheet and then placed in an oven at 50°C for 30 minutes to become acid granule. Acid granule is sieved with mesh sieve no. 16 until there is no granule left and then put into a container to become acid granule.¹¹

Sodium bicarbonate, PVP K-30, xanthan gum, and lactose were put into a mortar and crushed until homogeneous into a base mixture. The base mixture was dripped with 70% alcohol to form a callous mass into a base granule mass. The base granule mass was sieved with mesh sieve no. 12 to become base granule. The base granule was placed on a baking tray and then placed in an oven at 50°C for 30 minutes to become base granule. Base granule was sieved with mesh sieve no. 16 until there was no granule left and then put into a container to become base granule. Acid granule, base granule, and chitosan according to all formula were put into a tumbling jar and tumbled until homogeneous.¹¹

Chitosan Characterization

Organoleptic Test

Organoleptic test is a test that uses the senses including texture, smell, taste and color produced from chitosan. Then adjusted to international standards, namely the shape of flakes to powder, white or yellowish color. odorless and tasteless.¹²

Moisture content

Chitosan was weighed as much as 1 gram in a porcelain cup then heated in an oven at 105°C for 30 minutes then cooled in a desiccator and then weighed, the process was repeated until the weight was constant.

The quality requirement of chitosan water content is $\leq 10\%$. Calculation of water content can be calculated by the following formula.¹³

$$\% \text{ moisture content} = \frac{a-b}{c} \times 100\%$$

a= weight of container + wet sample (grams)

b= weight of container + dry sample (grams)

c= weight of wet sample

Ash Content Test

The ash content test was carried out by weighing the cup then inserting the sample into the cup. in the cup and then weighed again. Then the cup and sample are heated on over the flame of a burner, then froze in an electric furnace with occasional openings at a maximum temperature of 550°C until complete ashing. opened at a maximum temperature of 550°C until complete ashing. After that cooled in a desiccator, then weighed until a constant weight was obtained. Weighed the results of the cup and sample that has been in the furnace.¹⁴

$$\% \text{ ash content} = \frac{(w1-w2)}{w} \times 100\%$$

w = Sample weight (g)

w1 = Weight of sample + cup after ashing (g)

w2 = Weight of empty cup (g)

Ninhydrin test

Chitosan was weighed as much as 250 mg and then dripped with enough ninhydrin solution and allowed to stand for 5 minutes. Observe the color change that occurs, if the sample changes color to purple, it is true that there is an amine group (NH₂) in the sample.¹⁵

Deacetylation degree test

Chitosan was weighed as much as 250 mg then added 1% KBr and then pulverized. The sample is inserted into the infrared spectroscopy (FTIR) holder and observed the value of the number that appears and the % transmittance Calculation of the degree of deacetylation can be calculated by the following formula.¹⁶

$$\text{Deacetylation Degree (DD)} = 97,67 - \left(26,486 \times \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}}\right)\right)$$

A1655 = wavelength of hydroxy/amine group (NH₂)

A3450 = wavelength of acetyl group (CH₃CO)

In Vitro Measurement of Cholesterol Levels

Preparation of 1000 ppm Cholesterol Standard Solution

Weighing 100 mg of cholesterol powder and then dissolved with 100 mL of chloroform stir until dissolved then stored in the refrigerator at 2-8°C.¹⁰

Determination of Maximum Wavelength

The 1000 ppm cholesterol standard solution that has been made is taken 1 mL and then put into a volumetric flask and then added to 5 mL of chloroform so that it becomes a 100 ppm cholesterol solution. become 100 ppm cholesterol solution. Added 1 mL of acetic anhydride and added 0.1 mL of concentrated H₂SO₄ into the measuring flask then vortexed for 30 seconds and then immersed in cold water and stored in a dark place for 90 minutes. Measured using a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of wavelength of 200-800 nm.^{10,17}

Preparation of Cholesterol Standard Solution Concentration Series

Cholesterol standard solution with a concentration of 1000 ppm made seven concentration series, namely 40 ppm; 50 ppm; 60 ppm; 70 ppm; 80 ppm; 90 ppm; and 100 ppm added 5 mL chloroform. Added 1 mL of acetic anhydride solution to each concentration of solution then vortexed for 30 seconds and immersed in cold water and stored in a dark place for 30 minutes.

Added 0.1 mL of concentrated H₂SO₄ solution to each solution concentration then vortexed for 30 seconds and immersed in cold water and stored in a dark place for 90 minutes. In a dark place for 90 minutes. The absorbance was measured at the maximum λ length that has been determined.¹⁰

Cholesterol Level Measurement In Vitro

Prepared a suspension of effervescent granule formula I, formula II, and simvastatin (positive control) 10 mg then each added 5 mL of 100 ppm cholesterol solution, each mixture was vortexed for 30 seconds and incubated for 60 minutes at 37°C then centrifuged for 5 minutes at 4000 rpm then filtered. Each mixture was taken supernatant as much as 5 mL and then transferred into a closed test tube. Added 1 mL of acetic anhydride to each mixture then vortexed for 30 seconds and immersed in cold water and stored in a dark place for 30 minutes. Added 0.1 mL of concentrated H₂SO₄ to each mixture then vortexed and immersed in cold water and stored in a dark place for 90 minutes. dark place for 90 minutes after storage, each mixture was filtered before being measured. before being measured. The absorbance was measured at the maximum λ length according to the results of previous measurements. previous measurement. Percent reduction in cholesterol levels was calculated by formula.⁶

$$\% \text{ Decreased cholesterol levels} = \frac{\text{Initial cholesterol level} - \text{Final cholesterol level}}{\text{Initial cholesterol level}} \times 100\%$$

Statistical analysis

The data obtained were processed using statistical tests in SPSS. First, a normality test was conducted to see whether the data was normally distributed or not using the Shapiro Wilk test. Then a homogeneity test was conducted using the Levene Test. If the significance value ≥ 0.05 is said to be normal and homogeneous, then a parametric test can be conducted using one-way ANOVA. If the research data is not normally distributed and homogeneous, a nonparametric test Kruskal wallies is carried out.¹⁸

RESULT AND DISCUSSION

The results of chitosan evaluation which includes organoleptic test, moisture content test, ash content test, ninhydrin test, and deacetylation degree test can be seen in the **Table 2**.

Table 2. Evaluation results of mangrove crab (*Scylla serrata*) shell chitosan

Evaluation	Specifications	Results
Organoleptic		
- Shape	Powder	Powder
- Color	Yellowish white	Yellowish white
- Odor	Odorless	Odorless
- Taste	Flavorless	Flavorless
Moisture content (%)	≤ 10	$9,33 \pm 0,5773$
Ash content (%)	≤ 36	$5,93 \pm 0,4509$
Ninhydrin	Purple	Purple
Deacetylation degree (%)	≥ 70	$81 \pm 9,4749$

From the results of the chitosan evaluation that has been carried out, it can be seen that all tests carried out meet the existing specifications starting from the organoleptic test (shape, color, smell, and taste) in the form of powder, yellowish white, odorless, and tasteless,¹² the moisture content results obtained 9.33% (≤ 10), the ash content results obtained 5.93% (≤ 36), the ninhydrin shows a color change to purple,¹⁵ and the deacetylation degree results obtained 81% (≥ 70).¹⁹

This research begins by measuring the maximum wavelength with a concentration of 100 ppm in the range of 300-500 nm. The maximum wavelength obtained was 412 nm. According to the reference the maximum wavelength of cholesterol is at 410 nm.¹⁰ Therefore, the maximum wavelength was chosen around 400 nm, namely 412 nm which shows the highest absorbance value.

After getting the maximum wavelength, the next step is to make a standard curve of cholesterol solution with seven variations. This standard curve can later be used to find a linear regression equation. The

linear regression equation obtained will be used to calculate the levels that have known absorbance. The absorbance of the standard curve shown in the **Table 3**.

Table 3 Absorbance Results of Concentration Series

Concentration (ppm)	Absorbance
40	0,206
50	0,314
60	0,349
70	0,438
80	0,491
90	0,574
100	0,665

Based on the results of the concentration series curve it can be seen that the curve formed is in accordance with Lambert Beer's law, with the results of the value of $a = -0.0759$, $b = 0.0073$, and $r^2 = 0.995$, so that the linear regression equation obtained is $y = 0.0073x - 0.0759$. Standard curve can be seen in **Figure 1**.

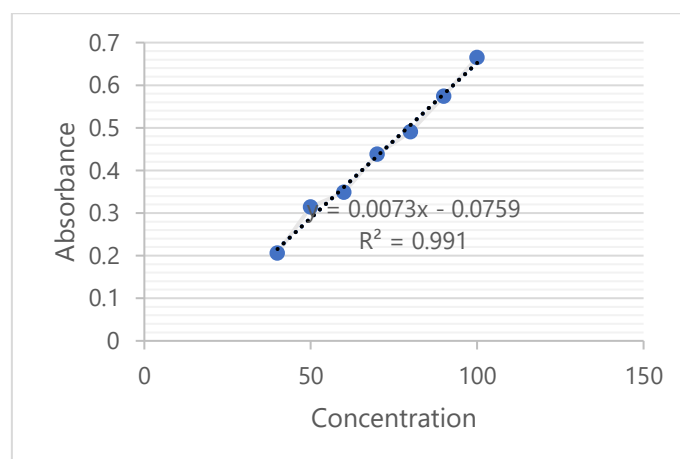


Figure 1. Concentration Series Absorbance Graph

From the correlation coefficient value obtained, it is stated that the correlation coefficient gives linear results because it meets the acceptable criteria of 0.99 or close to 1.00.²⁰ Measurement of cholesterol levels tested in vitro using the Lieberman-Burchard method. Then the results obtained are calculated the final cholesterol level using the linear regression equation that has been obtained. After obtaining the final cholesterol level, the percentage reduction in cholesterol levels of each sample and positive control was calculated. From the observations and calculations that have been made, the absorbance results and the percent reduction in cholesterol levels by chitosan are shown in **Table 4**.

Table 4. Results of in vitro test to reduce cholesterol levels of mangrove crab (*Scylla serrata*) effervescent granule suspension

Sample	Initial cholesterol level	Final cholesterol level		Reduction of cholesterol level		Average Reduction (%)
		Rep 1 (ppm)	Rep 2 (ppm)	Rep 1 (%)	Rep 2 (%)	
F1	100 ppm	86,84	83,82	13,16	16,16	14,66 ± 2,12
F2		73,32	81,90	26,68	18,1	22,39 ± 6,06
F3		84,51	88,75	15,49	11,25	13,37 ± 2,99
Simvastatin 10 mg		81,77	80,12	18,23	19,8	19,02 ± 0,74

From this research obtained that result of average reduction cholesterol level of F2 = 22.39 ± 6.06% is higher than F1 = 14.66% ± 2.12 and F3 = 13.37 ± 2.99 and positive control Simvastatin = 19.02 ± 0.74%. Thus F2 with a dose of 55 mg is better than F1 (45 mg) and F3 (75 mg) to reduce cholesterol levels. This can be caused by the high concentration of hydroxyl groups contained in it, so that it is linear to bind heavy metals

and cations from organic substances such as fats, this is in accordance with research conducted by Agustina (2014) which compared chitosan doses of 35 mg, 45 mg and 55 mg in rats fed high trans fatty acid feed, stating that chitosan 55 mg was proven effective in reducing total cholesterol levels in vivo in rats in the first two weeks of observation with a cholesterol level reduction value of 64.35% compared to chitosan 35 mg with a value of 59.15% and chitosan 45 mg with a value of 61.15%.⁵ In addition, research conducted by Agustina (2014) also said that the maximum dose of chitosan to reduce cholesterol is 55 mg.⁵ This is in accordance with the results obtained in F3 with a dose of 75 mg, where the results obtained lower cholesterol reduction when compared to doses of 45mg and 55mg.

Based on research by Imtihan et al. (2021)⁶ the solid dispersion system of raw crab shell chitosan extract is able to reduce cholesterol levels in vitro test results from the 55 mg chitosan solid dispersion sample: PVP K-30 = 1: 2 which obtained the best result of 29.56% while in the sample of chitosan solid dispersion system 55 mg: PVP K-30 = 1:1 obtained a result of 18.44%. The cholesterol reduction level obtained in the solid dispersion system is higher than the effervescent granule suspension because solid dispersion formulation can improve their solubility by reduction of particle size so that can provide a better effect on lowering cholesterol levels.²¹

Chitosan is able to reduce total cholesterol levels because chitosan plays a role in inhibiting fat absorption. Chitosan has a hypocholesterolemic effect by increasing the excretion of neutral sterols and reducing cholesterol. excretion and reducing cholesterol. Chitosan has polycationic properties. The presence of hydroxyl and amino groups along the polymer chain polymer chain makes chitosan very effective in binding heavy metal ion cations and cations from organic substances (proteins and fats).¹⁵ The main mechanism in chitosan that is thought to reduce cholesterol is by increasing bile acid excretion and reducing cholesterol absorption, similar to how cholestyramine drugs work.²²

Subsequent to the results obtained of the percent reduction in cholesterol levels, the data that has been obtained is then processed using SPSS. The first stage is the normality test using the shapiro wilk method, the results obtained are the data obtained are not normally distributed. After the normality test, the homogeneity test was then carried out using the Levene test method, the results obtained were that the data was not homogeneously distributed. Because the data is not normally distributed and homogeneous, thus the Kruskal Wallis test was applied. And the results obtained were no significant difference between the sample and the positive control simvastatin 10 mg. The result of statistic analysis shown in the **Table 5**.

Table 5 Statistical Test Results

Statistics Test	Sig Requirements	Sig Results	Conclusions
Normality Test	$\geq 0,05$	0,00	Data is not normally distributed
Homogeneity Test	$\geq 0,05$	0,00	Data is not homogeneously distributed
Kruskal Wallis	$< 0,05$	0,156	No significant difference

Conduct a normality test to see whether the data is normally distributed or not using the shapiro wilk test. If the significance value is ≥ 0.05 , the data is normally distributed, while if the significance value is < 0.05 , the data is not normally distributed. The normality test results obtained in F1, F2, F3 and positive control are $0.00 \leq 0.05$, so it can be concluded that the data is not normally distributed. The homogeneity test uses the Levene Test if the significance value ≥ 0.05 then the sample has almost the same variant (homogeneous) while if the significance value < 0.05 then the sample has an inhomogeneous variant. The homogeneity test results obtained are sig $0.00 \leq 0.05$, it can be concluded that the data is not homogeneously distributed¹⁸. Because the data were not normally distributed and homogeneous, the Kruskal Wallies statistical test was conducted. Kruskal wallies test obtained sig results $0.156 > 0.05$ which means there is no significant difference between F1, F2, F3 and positive control so it can be concluded that the different doses of chitosan in F1, F2 and F3 have no significant effect on reducing cholesterol levels.

CONCLUSION

The in vitro test of cholesterol reduction using effervescent granule suspensions containing chitosan extracted from mangrove crab shells (*Scylla serrata*) demonstrated that the 55 mg chitosan dose achieved the highest average percentage reduction in cholesterol levels. Different concentrations of Chitosan, 45 mg, 55 mg, and 75 mg exhibited differences of cholesterol reduction level, however no significant differences were observed among the three formulas, as indicated by a p-value of 0.139.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank for financial support from Akademi Farmasi Surabaya for internal research grants agreement No. 013/AKFAR-SBY/PPPM/50.02/III/2024, and also thank for all facilities from Akademi Farmasi Surabaya.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest regarding this manuscript.

REFERENCES

1. Meidayanti D. Manfaat Likopen Dalam Tomat Sebagai Pencegahan Terhadap Timbulnya Aterosklerosis. *J Med Utama*. 2021;02(03):2-6.
2. Dali S, Safitri NRD, Fawwaz M. Isolasi Kitosan Dari Limbah Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) dan Aplikasinya Terhadap Penyerapan Trigliserida. *J Ilm As-Syifaa*. 2016;8(2):20-27. doi:10.33096/jifa.v8i2.200
3. Agusta I. Ekstraksi Kitosan Dari Limbah Kulit Udang dengan Proses Deasetilasi. *J Chem Eng*. 2021;2(2):38-43.
4. Younes I, Rinaudo M, Harding D, Sashiwa H. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs* 2015, Vol 13, Pages 1133-1174. 2015;13(3):1133-1174. doi:10.3390/MD13031133
5. Agustina. Pengaruh Pemberian Kitosan Terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus (Sprague-dawley) yang Diberi Pakan Tinggi Asam Lemak Trans. *Inst Pertan Bogor*. Published online 2014:1-31.
6. Imtihani HN, Permatasari SN, Prasetya RA. In Vitro Evaluation of Cholesterol-Reducing Ability of Chitosan from Mangrove Crab (*Scylla serrata*) Shell Solid Dispersion using PVP K-30 as a Carrier. *J Farm Galen*. 2021;7(2):99-109. doi:10.22487/j24428744.2021.v7.i2.15597
7. Rani KC, Parfati N, Muarofah D, Sacharia SN. Formulasi Granul Effervescent Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) dengan Variasi Suspending Agent Xanthan Gum, CMC-Na, dan Kombinasi CMC-Na-Mikrokristalin Selulosa RC- 591. *J Sains Farm Klin*. 2020;7(1):39. doi:10.25077/jsfk.7.1.39-51.2020
8. Pratama R, Saputro MR, Sani AR, Robiatul RS, Awaliyah. Pengaruh eksipien terhadap sifat fisik granul effervescent: Review. *An-Najat J Ilmu Farm dan Kesehat*. 2024;2(1):137-154.
9. Sahriwati, Sumarlin, Wahyuni S. Validasi Metode dan Penetapan Kadar Kolesterol Ayam Broiler. *Lutjanus*. Published online 2020:31-40.
10. Adu JK, Amengor CDK, Kabiri N, et al. Validation of a Simple and Robust Liebermann – Burchard Colorimetric Method for the Assay of Cholesterol in Selected Milk Products in Ghana. Published online 2019:1-7. doi:https://doi.org/10.1155/2019/9045938
11. Abdullah HS, Imtihani HN. Formulasi dan Evaluasi Granul Dispersi Padat Ekstrak Kitosan Cangkang Kepiting Bakau (*Scylla serrata*) Dengan Perbandingan Kitosan:PVP K-30 1:2. *J Kefarmasian Akfarindo*. 2022;7(1):45-51. doi:10.37089/jofar.vi0.119
12. Amelia RN, Aryati F, Sastyarina Y. Isolasi dan Karakterisasi Kitosan dari Limbah Cangkang Kerang Asia (*Corbicula fluminea*). *Proceeding Mulawarman Pharm Conf*. 2021;14:267-271. doi:10.25026/mpc.v14i1.583
13. Aguirre-Loredo RY, Rodríguez-Hernández AI, Morales-Sánchez E, Gómez-Aldapa CA, Velazquez G. Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chem*. 2016;196:560-566. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2015.09.065
14. Suresh HN, Mahalingam CA, Priyadharshini P. Physico - chemical Characteristics of Chitosan Extracted from Silkworm Pupae. *Madras Agric J*. 2013;100(10-12):883-886.
15. Agustina S, Swantara I made D, Suartha IN. Isolasi Kitin, Karakterisasi, dan Sintesis Kitosan Dari Kulit Udang. *J Kim*. 2015;9(2):271-278.

16. Heidari F, Razavi M, Bahrololoom ME, et al. Preparation of natural chitosan from shrimp shell with different deacetylation degree. *Mater Res Innov.* 2018;22(3):177-181. doi:10.1080/14328917.2016.1271591
17. Kenny AP. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. *Biochem J.* 1952;52(4):611-619. doi:10.1042/bj0520611
18. Qurnia Sari A, Sukestiyarno Y, Agoestanto A. Batasan Prasyarat Uji Normalitas dan Uji Homogenitas pada Model Regresi Linear. *Unnes J Math.* 2017;6(2):168-177.
19. Imtihani HN, Permatasari SN. Sintesis dan Karakterisasi Kitosan dari Limbah Kulit Udang Kaki Putih (*Litopenaeus vannamei*). *Simbiosis.* 2020;9(2):129. doi:10.33373/sim-bio.v9i2.2699
20. Gupta A, Stead TS, Ganti L. Determining a Meaningful R-squared Value in Clinical Medicine. *Acad Med Surg.* Published online October 27, 2024. doi:10.62186/001C.125154
21. Imtihani HN, Prasetya RA, Permatasari SN. Preparation of Solid Dispersion Systems for Natural Chitosan from Mangrove Crab (*Scylla serrata*) Shell: Physical Characterization and In Vitro Cholesterol-Binding Evaluation. *Res J Pharm Technol.* 2024;17(3):1386-1392. doi:10.52711/0974-360X.2024.00219
22. Mmed GX, Huang Bmed X, Mmed LQ, Mmed JW, Bmed YH. Mechanism study of chitosan on lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2007;16(1):313-317.

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok

The Effect of White Turmeric Extract (*Curcuma zedoaria* Rosc.) on Malondialdehyde (MDA) Levels in White Rats (*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke

I Made Agus Sunadi Putra^{1*}, I Putu Tangkas Suwantara¹, Maria Malida Vernandes Sasadara¹, Ni Nyoman Wahyu Udayani¹

¹Fakultas Farmasi,
Universitas Mahasaraswati Denpasar,
Jln. Kamboja, No. 11 A,
Denpasar, 80233,
Indonesia

Diajukan: 06-01-2025

Direview: 19-02-2025

Disetujui: 21-04-2025

Kata Kunci:

antioksidan, kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.), malondialdehid (MDA).

Keywords:

antioxidant, malondialdehyde (MDA), white turmeric (*Curcuma zedoaria* Rosc.).

Korespondensi:

I Made Agus Sunadi Putra
agussunadi@unmas.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

Asap rokok menghasilkan radikal bebas yang menyebabkan stres oksidatif dan kerusakan berbagai biomolekul tubuh. Peningkatan kadar malondialdehid (MDA) merupakan salah satu penanda terjadinya stres oksidatif. Mekanisme pertahanan tubuh terhadap stres oksidatif melibatkan senyawa antioksidan. Kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) mengandung senyawa antioksidan yang diprediksi mampu menghambat kerusakan oksidatif, namun potensinya secara in vivo masih perlu dibuktikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi pengaruh ekstrak etanol kunyit putih terhadap kadar MDA pada tikus putih jantan (*Rattus norvegicus* strain Wistar) yang dipaparkan asap rokok. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only control* group. Lima kelompok perlakuan terdiri atas kelompok kontrol sehat (P1), kelompok kontrol yang dipaparkan asap rokok tanpa perlakuan (P2), kelompok perlakuan ekstrak kunyit putih dosis 100 mg/kgBB (P3), 200 mg/kgBB (P4), dan kelompok kontrol positif yang diberikan vitamin C (P5). Paparan asap rokok diberikan selama 14 hari, kemudian darah diambil dari vena orbita pada hari ke-15 untuk pengukuran kadar MDA dengan metode ELISA. Rerata kadar MDA (mmol/ml) masing-masing kelompok adalah: 0,118 (P1), 0,121 (P2), 0,094 (P3), 0,059 (P4), dan 0,089 (P5). Hasil analisis ANOVA dan uji post hoc LSD ($\alpha = 0,05$) menunjukkan perbedaan signifikan antara kelompok P2 dan P4 ($p < 0,05$), namun tidak terdapat perbedaan bermakna antara kelompok P3, P4, dan P5. Pemberian ekstrak kunyit putih dosis 200 mg/kgBB menurunkan kadar MDA secara signifikan dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang sebanding dengan vitamin C.

Abstract

Cigarette smoke generates free radicals that induce oxidative stress and damage various biomolecules in the body. An increase in malondialdehyde (MDA) levels is a key marker of oxidative stress. The body's antioxidant mechanisms rely on compounds capable of neutralizing free radicals. White turmeric (*Curcuma zedoaria* Rosc.) contains antioxidant compounds predicted to prevent oxidative damage, though its in vivo potential remains to be proven. This study aimed to evaluate the effect of white turmeric ethanol extract on MDA levels in male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) exposed to cigarette smoke. A post-test only control group design was employed. The rats were divided into five groups: healthy control (P1), smoke-exposed control (P2), extract-treated groups receiving 100 mg/kgBW (P3) and 200 mg/kgBW (P4), and a positive control group receiving vitamin C (P5). Cigarette smoke exposure was administered for 14 days, and blood samples were collected from the orbital vein on day 15. MDA levels were measured using the ELISA method. The mean MDA levels (mmol/ml) for P1 to P5 were 0.118, 0.121, 0.094, 0.059, and 0.089, respectively. ANOVA and post hoc LSD tests ($\alpha = 0.05$) showed a significant difference between P2 and P4 ($p < 0.05$), while no significant differences were found between P3, P4, and P5. In conclusion, white turmeric extract at 200 mg/kgBW significantly reduced MDA levels and demonstrated antioxidant activity comparable to that of vitamin C.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11thEd.):

Putra, IMAS, Suwantara, IPT, Sasadara, MMV, Udayani, NNW. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kunyit Putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Terpapar Asap Rokok. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 67-73, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.10793](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.10793)

PENDAHULUAN

Merokok merupakan salah satu gaya hidup utama yang berpengaruh terhadap kesehatan manusia. Baik secara langsung maupun tidak langsung merokok diketahui dapat menimbulkan gangguan kesehatan. Gangguan kesehatan yang dapat ditimbulkan antara lain dapat berupa iritasi pada mata, hidung, tenggorokan, menstimulasi kambuhnya penyakit asma, kanker paru, gangguan pernapasan, dan batuk yang menghasilkan dahak.¹ Dampak rokok terhadap kesehatan sering disebut sebagai *silent killer*. Pengaruh tersebut timbul secara perlahan, dalam tempo yang relatif lama, tidak langsung dan tidak nampak secara nyata.²

Jumlah perokok setiap tahun cenderung meningkat seiring dengan meningkatnya konsumsi rokok. Angka kematian di dunia akibat rokok mencapai 500 juta orang per tahun. Dalam setiap enam detik terdapat satu kematian akibat rokok. Indonesia sendiri merupakan negara ketiga dengan jumlah perokok aktif tertinggi di dunia, terhitung 614 juta perokok setelah China dan India. Sebanyak 67 persen pria dan 45 persen wanita di Indonesia adalah perokok. Jumlah perokok aktif berbanding lurus dengan jumlah perokok pasif yang terpapar asap rokok. Jumlah penduduk Indonesia yang menjadi perokok pasif lebih dari 97 juta orang.³

Pembakaran rokok akan menimbulkan asap rokok. Asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas. Peran radikal pada asap rokok dalam meningkatkan kerusakan sistem biologis adalah sama dengan peran radikal bebas yang dihasilkan dalam tubuh. Radikal bebas merupakan molekul yang mengandung elektron tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Elektron tidak berpasangan ini membuatnya sangat reaktif. Oleh karena radikal bebas dapat menyerang molekul penting seperti DNA, protein dan lipid, dan oleh karena mereka juga cenderung dapat memperbanyak diri, mereka dapat menciptakan kerusakan yang signifikan.⁴

Penyebab kerusakan sel atau jaringan adalah karena terjadinya stress oksidatif oleh radikal bebas. Sistem biologi dapat terpapar oleh radikal bebas baik yang terbentuk endogen oleh proses metabolisme tubuh maupun eksogen seperti pengaruh paparan asap rokok. Radikal bebas bersifat sangat reaktif, dapat menimbulkan perubahan biokimiawi dan merusak berbagai komponen sel hidup seperti protein, lipid, karbohidrat dan nukleat. Membran sel terutama terdiri dari komponen-komponen lipid. Serangan radikal bebas terhadap komponen lipid akan menimbulkan reaksi peroksidasi lipid yang menghasilkan produk yang bersifat toksik terhadap sel.⁴ Peroksidasi lipid dapat mengganggu fisiologi membran, menyebabkan gangguan pada aliran cairan dan permeabilitas, mengubah transport ion serta menghambat reaksi metabolisme.⁵ Salah satu produk akhir dan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif adalah malondialdehyde (MDA).

Kerusakan oksidatif dapat dicegah dan diatasi dengan pemberian antioksidan. Antioksidan dapat berasal dari dalam dan luar tubuh yang didapatkan dari bahan alami dari tanaman. Salah satunya adalah kunyit putih. Kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) adalah salah satu jenis tanaman dari family *Zingiberaceae* yang penting dan banyak digunakan dalam pengobatan tradisional. *Curcuma zedoaria*. Rosc mempunyai kandungan utama senyawa aril heptanoid (kurkuminoid), flavonoid, minyak atsiri yang terdiri dari senyawa-senyawa flavonoid, seskuiterpen yang terdiri atas: zedoarone, kurdiona, epikurkumenol, kurzerena, kurkumol dan isokurkumenol. Zat-zat ini berfungsi sebagai antiinflamasi, analgetik hepatoprotektor dan antioksidan.⁶⁻⁸

Flavonoid adalah antioksidan eksogen yang telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stres oksidatif. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun secara tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung adalah dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Flavonoid sebagai antioksidan secara tidak langsung yaitu dengan meningkatkan ekspresi gen antioksidan endogen melalui beberapa mekanisme. Salah satu mekanisme peningkatan ekspresi gen antioksidan adalah melalui aktivasi *nuclear factor erythroid 2 related factor 2* (Nrf2) sehingga terjadi peningkatan gen yang berperan dalam sintesis enzim antioksidan endogen seperti misalnya gen SOD (*superoxide dismutase*).⁹

Ekstrak etanol dari kunyit putih memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan bisa menjadi sumber potensial antioksidan alami.¹⁰ Pelarut etanol dapat menghasilkan ekstrak kunyit putih dengan sifat antioksidatif yang paling tinggi dibanding pelarut yang lain.¹¹ Sebagai tanaman yang mengandung antioksidan, kunyit putih diduga dapat menghambat terjadinya kerusakan oksidatif sehingga diperlukan suatu penelitian untuk mengetahui pengaruh ekstrak kunyit putih terhadap kadar MDA akibat paparan asap rokok. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kunyit putih (*Curcuma zedoaria* Rosc.) terhadap kadar MDA (malondialdehyde) pada tikus putih terpapar asap rokok.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian kuasi eksperimental dengan random alokasi dengan lima kelompok eksperimen: tikus sehat (P1), kelompok kontrol yang dipaparkan asap rokok (P2), perlakuan ekstrak dengan dosis 100 mg/kgBB (P3) dan 200 mg/kg BB (P4), serta kelompok kontrol positif dengan pemberian vitamin C (P5). Eksperimen dilakukan selama 14 hari pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan percobaan. Alat dan bahan pada penelitian ini adalah, *rotary evaporator*, pisau, blender, alat gelas, etanol 96%, Kit MDA, CMC-Na. Ijin etik penelitian hewan coba diterbitkan oleh Kemenkes Poltekkes Denpasar Nomor DP.04.02/F.XXXII.25/0510/2024.

Persiapan Sampel

Kunyit putih dicuci dan dipotong dengan ukuran 2-3 cm, dikeringkan menggunakan oven (40°C) dan diblender untuk menghasilkan sampel dalam bentuk serbuk. Sebanyak 50 g sampel yang telah menjadi serbuk dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan rasio 1:5 selama dua hari. Filtratnya diuapkan untuk mendapatkan ekstrak kasar yang kental. Ekstrak tersebut diencerkan dengan larutan CMC-Na 1% untuk menghasilkan konsentrasi 20, 40, dan 60 mg/2ml dengan berat badan tikus rata-rata 200 gram. Volume cairan maksimal yang dapat diberikan peroral pada tikus putih dengan berat badan 200 gram adalah 5ml.

Percobaan Hewan

Penelitian ini menggunakan tikus jantan sehat berusia 2-6 bulan, dengan berat 150-200 gram. Sebanyak 25 tikus dibagi menjadi lima kelompok. Tikus-tikus tersebut diaklimatisasi dalam kondisi lingkungan laboratorium selama 7 hari sebelum eksperimen. Setiap kelompok, kecuali P1 diekspos ke asap rokok selama 14 hari, menggunakan 3 rokok untuk setiap kelompok per hari. Saat terpapar asap rokok, hewan percobaan dipindahkan ke ruangan yang penuh asap rokok yang dilengkapi penghalang untuk memisahkan hewan percobaan dari ujung rokok yang menyala. Asap rokok dapat langsung mengenai hewan percobaan jika hewan tersebut dimasukkan. Asap rokok dihembuskan secara berulang dengan bantuan tabung injeksi hingga rokok habis terbakar. Ekstrak kunyit putih diberikan satu jam setelah terkena paparan asap rokok setiap hari selama 14 hari. Kelompok P2 diberikan air suling, kelompok P3 dan P4 diberikan dengan ekstrak kunyit pada dosis 100 dan 200 mg/kg BB, masing-masing, dan kelompok P5 diberikan vitamin C pada dosis 6,5 mg/kgBB. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Pengambilan sampel darah dilakukan pada hari ke-15 penelitian. Setelah tikus dianestesi secara IM dengan ketamin dan xylazine, darah diambil dari sinus orbital dengan kapiler sebanyak 3 ml, dikumpulkan dalam tabung Eppendorf yang mengandung EDTA dan digunakan untuk mengukur kadar MDA dalam plasma darah. Darah yang dikumpulkan disentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Plasma yang terbentuk dipindahkan ke tabung baru dan disimpan pada -80°C. Larutan buffer dihilangkan dari pellet eritrosit, kemudian eritrosit dilarutkan dengan volume 5X menggunakan ddH₂O. Eritrosit yang terlarut disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm, dan supernatan yang terbentuk disimpan pada -80°C sampai siap dianalisis.

Pengukuran Kadar MDA

Kadar MDA diukur menggunakan MDA ELISA kit dengan kurva standar dari 1,1,3,3-tetrametoksiopropana (TMP) dengan konsentrasi 0,3-0,9 ppm. Sebanyak 1 ml dari setiap larutan kurva standar dan plasma darah direaksikan dengan 1,0 mL TCA 20% dan 1,0 mL TBA 1% dalam asam asetat glasial 50%,

kemudian diinkubasi selama 45 menit pada suhu 95°C dan didinginkan. Larutan tersebut disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 1000 rpm. Supernatan dipisahkan, dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532,2 nm. Konsentrasi sampel diperoleh dengan memplot data absorbansi sampel ke dalam kurva standar.

Analisis Data

Data dianalisis menggunakan ANOVA satu arah dan post hoc LSD dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%, menggunakan SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) untuk Windows versi 24. Nilai signifikan <0,05 dianggap berbeda secara statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stres oksidatif adalah fenomena yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi dan akumulasi senyawa radikal bebas dalam sel dan jaringan serta kemampuan sistem biologis tubuh untuk mendetoksifikasi produk senyawa radikal bebas ini. Stres oksidatif merupakan proses berbahaya yang dapat berdampak negatif pada beberapa struktur seluler, seperti membran, lipid, protein, lipoprotein, dan deoksiribonukleat asam (DNA).¹² Stres oksidatif memainkan peran penting dalam patogenesis beberapa penyakit, seperti kanker paru-paru, penyakit paru obstruktif kronis, dan aterosklerosis.¹³

Merokok dapat meningkatkan stres oksidatif dengan menghasilkan radikal oksigen reaktif dalam asap dan melemahkan sistem pertahanan antioksidan. Asap rokok dapat mengurangi aktivitas SOD serum pada tikus sehat dan meningkatkan kandungan MDA (Malondialdehid).¹⁴ MDA adalah produk akhir dari dekomposisi peroksidasi lipid. Oleh karena itu, MDA biasanya digunakan sebagai indeks untuk menilai tingkat peroksidasi lipid oleh radikal bebas. Penelitian ini mengevaluasi efek ekstrak kunyit putih (*Curcuma Zedoaria* Rosc) terhadap kadar MDA pada tikus putih yang terpapar asap rokok. Tingkat MDA dalam lima kelompok eksperimen ditunjukkan dalam **Tabel 1**. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan kadar MDA antara kelompok perlakuan ekstrak kunyit putih 200mg/kg BB (P4) dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0,05$) dan tidak adanya perbedaan antara kelompok perlakuan kunyit putih P3 dan P4 dengan Kelompok perlakuan dengan Kontrol positif vitamin C. Hasil penelitian membuktikan bahwa Pemberian ekstrak Kunyit putih dosis 100mg/kgBB memiliki efek antioksidan yang sebanding dengan vitamin C dan lebih kuat dibandingkan vitamin C pada pemberian ekstrak kunyit putih dosis 200mg/kgBB.

Tabel 1. Level MDA dari lima kelompok eksperimen

Kelompok Eksperimen	Level MDA (nmol/ml)
P1 (normal)	0.118 ± 0.04
P2 (negatif kontrol)	0.121 ± 0.02
P3 (100mg/kg BW ekstrak)	0.094 ± 0.03
P4 (200mg/kg BW ekstrak)	0.059 ± 0.01*
P5 (vitamin C)	0.089 ± 0.01

Persentasi data rata-rata ± standar deviasi (n=5). (*) menyatakan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (P2)

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kunyit putih menghasilkan aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dari sumber tanaman telah dibuktikan melalui kemampuannya untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 39-41%.¹⁵ Aktivitas antioksidan dari tanaman ini diperkirakan berasal dari berbagai senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya.

Kunyit putih mengandung beberapa fitokimia seperti terpenoid, alkaloid, saponin, flavonoid, glikosida, karbohidrat, fenol, tanin, dan fitosterol.¹⁶ Kehadiran senyawa fenolik dalam tanaman ini memainkan peran penting dalam aktivitasnya sebagai antioksidan. Senyawa fenolik seperti flavonoid dapat berinteraksi dengan ROS/RNS, yang merupakan salah satu senyawa radikal bebas yang dihasilkan dalam tubuh.¹⁷ Senyawa fenolik adalah senyawa yang ditandai dengan lebih dari satu kelompok fenolik (kelompok hidroksil yang terikat pada cincin aromatik) per molekul. Aktivitas antioksidan dari senyawa fenolik dihasilkan oleh

kelompok hidroksil (-OH) pada cincin aromatik, yang bertindak sebagai donor hidrogen atau elektron dan memberikannya kepada radikal bebas atau spesies reaktif lainnya. Mekanisme ini akan menghambat ROS dan kerusakan DNA, protein, dan lipid yang dimediasi oleh ROS, produksi sitokin inflamasi, serta aktivasi jalur transduksi sinyal seperti mitogen-activated protein kinase dan nuclear factor kappa-B (NF-κB)/p65 yang mengatur aktivitas transkripsi.¹⁸ Senyawa fenolik juga dapat mengkelat logam (Cu dan Fe), yang mencegah reaksi Fenton membentuk radikal bebas dari hidrogen peroksida.¹⁹

Terdapat beberapa mekanisme yang diketahui dibalik kemampuan senyawa fenolik sebagai antioksidan, seperti melalui interaksi dengan senyawa radikal bebas, penghambatan enzim yang berperan dalam proses oksidasi, dan aktivitas antioksidan senyawa fenolik yang bergantung pada struktur dan kelompok fungsional. Senyawa fenolik dengan beberapa kelompok hidroksil diketahui memiliki kemampuan untuk mengkelat radikal dan logam berat.²⁰ Senyawa polifenol juga dikenal dapat mengkelat sejumlah besar ROS. Aktivitas antioksidan polifenol terkait dengan kapasitasnya untuk menangkap berbagai ROS. Mekanisme yang terlibat dalam kapasitas antioksidan polifenol mencakup penekanan terhadap pembentukan ROS, baik melalui penghambatan enzim yang terlibat dalam produksinya, penangkapan ROS, atau peningkatan atau perlindungan pertahanan antioksidan.²¹ Polifenol dapat mengurangi aktivitas katalitik enzim yang terlibat dalam pembentukan ROS. Polifenol dapat melindungi terhadap kerusakan oksidatif melalui berbagai mekanisme.²² Pembentukan ROS dilaporkan dapat meningkatkan ion logam bebas dengan mengurangi hidrogen peroksida yang menghasilkan radikal hidroksil yang sangat reaktif. Potensi redoks polifenol yang lebih rendah secara termodinamika mampu mereduksi radikal bebas karena kemampuannya untuk mengkelat ion logam (besi, tembaga, dll.) dan radikal bebas.²¹

Senyawa polifenol juga dapat bereaksi dengan komponen non-polar dari membran plasma, yang terletak di bagian dalam membran hidrofobik. Kemampuan ini lebih lanjut mempengaruhi kecepatan oksidasi lipid dan protein. Beberapa senyawa flavonoid di inti hidrofobik membran dapat mencegah akses oksidan dan melindungi struktur serta fungsi membran.²³ Proses ini merupakan mekanisme utama di mana polifenol dapat berinteraksi secara seluler dan mempengaruhi transduksi sinyal. Interaksi antara polifenol dan aktivitas sintase nitrat oksida (NOS) dimodulasi oleh produksi nitrat oksida (NO). Xanthin oksidase (XO) dianggap sebagai kunci utama untuk radikal bebas, dan beberapa jenis senyawa flavonoid dapat menghambat aktivitas XO. Flavonoid juga dapat mengurangi aktivitas peroksidase dan menghambat pelepasan radikal bebas oleh neutrophil. Salah satu produk akhir dan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stres oksidatif adalah malondialdehyde (MDA). Peroksidasi lipid dapat mengganggu fisiologi membran, menyebabkan gangguan pada aliran cairan dan permeabilitas, mengubah transport ion serta menghambat reaksi metabolisme.²⁴

SIMPULAN

Pemberian ekstrak kunyit putih *Curcuma zedoaria* Rosc. dosis 200 mg/kg BB menghasilkan rerata kadar MDA (malondialdehid) yang lebih rendah dibandingkan kelompok tikus putih yang dipaparkan asap rokok. Pemberian ekstrak kunyit putih (kelompok P3, P4) menghasilkan kadar MDA yang sama bahkan lebih rendah dibandingkan dengan kelompok vitamin C (P4). Pemberian ekstrak Kunyit putih berpengaruh menurunkan kadar MDA tikus putih yang dipaparkan asap rokok dan membuktikan adanya potensi efek antioksidan yang setara dengan antioksidan standar (vitamin C).

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak konflik kepentingan dengan pihak manapun dalam penulisan naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Istiqomah U. *Upaya Menuju Generasi Tanpa Merokok Pendekatan Analisis Untuk Menangulangi Dan Mengantisipasi Remaja Merokok*. Surakarta: CV. Setia Aji.; 2003.

2. Rupinder K. Environmental Tobacco Smoke (ETS)-A Silent Killer. *Int J Life Sci.* 2014;2(2):179–184. www.ijlsci.in
3. Wolrd Health Organization (WHO). WHO Reports On The Global Tobacco Epidemic. *Sci Am.* 2013;272(5):44–51. doi:10.1038/scientificamerican0595-44
4. Emma R, Caruso M, Campagna D, Pulvirenti R, Li Volti G. The Impact of Tobacco Cigarettes, Vaping Products and Tobacco Heating Products on Oxidative Stress. *Antioxidants.* 2022;11(9):1–28. doi:10.3390/antiox11091829
5. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms Of Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/360438
6. Marliani L, Budiana W, Anandari Y. The Effect of Extraction Condition on The Polyphenol Content and Antioxidant Activity of *Curcuma Zedoaria* (Christm.) *Roscoe Rhizome.* *Indones J Pharm Sci Technol.* 2017;4(2):57. doi:10.15416/ijpst.v4i2.12770
7. Lobo R, Prabhu KS, Shirwaikar A, Shirwaikar A. *Curcuma Zedoaria* Rosc. (White Turmeric): A Review Of Its Chemical, Pharmacological and Ethnomedicinal Properties. *J Pharm Pharmacol.* 2008;61(1):13–21. doi:10.1211/jpp/61.01.0003
8. Gharge S, Hiremath SI, Kagawad P, Jivaje K, Palled MS, Suryawanshi SS. *Curcuma Zedoaria* Rosc (Zingiberaceae): A Review On Its Chemical, Pharmacological and Biological Activities. *Futur J Pharm Sci.* 2021;7(1):1–9. doi:10.1186/s43094-021-00316-1
9. Kurutas EB. The Importance of Antioxidants Which Play the Role in Cellular Response Against Oxidative/Nitrosative Stress: Current State. *Nutr J.* 2016;15(1):1–22. doi:10.1186/s12937-016-0186-5
10. Ranjitha A, Asif K, Himaja M. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Rhizome Part of *Curcuma Zedoaria*. *Int J Res Ayurveda Pharm.* 2010;1(2):414–417.
11. Pujimulyani D. Sifat Antioksidatif Ekstrak Kunir Putih (*Curcuma mangga* Val.) dengan Pelarut Aseton, Etanol atau Metanol. *Biota J Ilm Ilmu-Ilmu Hayati.* 2019;XI(1):14–19. doi:10.24002/biota.v11i1.2817
12. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/8416763
13. Isik B, Ceylan A, Isik R. Oxidative Stress In Smokers and Non-Smokers. *Inhal Toxicol.* 2007;19(9):767–769. doi:10.1080/08958370701401418
14. Hu JP, Zhao XP, Ma XZ, Wang Y, Zheng LJ. Effects Of Cigarette Smoke On Aerobic Capacity and Serum MDA Content and SOD Activity Of Animal. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7(11):4461–4465.
15. Tariq S, Imran M, Mushtaq Z, Asghar N. Phytopreventive Antihypercholesterolemic and Antilipidemic Perspectives Of Zedoary (*Curcuma Zedoaria* Roscoe.) Herbal Tea. *Lipids Health Dis.* 2016;15(1):1–10. doi:10.1186/s12944-016-0210-y
16. Mahmoudi T, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M, et al. Effect Of *Curcuma Zedoaria* Hydro-Alcoholic Extract On Learning, Memory Deficits and Oxidative Damage Of Brain Tissue Following Seizures Induced By Pentylentetrazole In Rat. *Behav Brain Funct.* 2020;16(1):1–12. doi:10.1186/s12993-020-00169-3
17. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us? *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/7432797
18. Katiyar D, Singh V, Ali M. Isolation, Characterization and Prediction of Biological Activity of Two New Fatty Esters and a Phenol From the Heartwood of *Pterocarpus Marsupium* Roxb. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2017;9(2):117. doi:10.22159/ijpps.2017v9i2.15938
19. Bosch R, Philips N, Suárez-Pérez JA, et al. Mechanisms Of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies With Phytochemicals. *Antioxidants.* 2015;4(2):248–268. doi:10.3390/antiox4020248
20. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism and Structure-Activity Relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13(10):572–584. doi:10.1016/S0955-2863(02)00208-5
21. Mishra A, Kumar S, Pandey AK. Scientific Validation Of The Medicinal Efficacy Of *Tinospora Cordifolia*. *Sci World J.* 2013;2013. doi:10.1155/2013/292934
22. Kumar S, Sharma AK, Sharma P, AK. Protective Efficacy Of *Solanum Xanthocarpum* Root Extracts Against Free Radical Damage Phytochemical Analysis and Antioxidant Effect. *Cell and Molecular Biol.* 2012;58(1):174–81..
23. Oteiza PI, Erlejan AG, Verstraeten S V., Keen CL, Fraga CG. Flavonoid-membrane interactions: A

- protective role of flavonoids at the membrane surface? *Clin Dev Immunol.* 2005;12(1):19–25. doi:10.1080/10446670410001722168
24. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DEC, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PAM. Flavonoids: A Review Of Probable Mechanisms Of Action and Potential Applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):418–425. doi:10.1093/ajcn/74.4.418



Bioactivities and Molecular Identification from Marine Sediment-Derived Fungi Isolated from Amed and Tulamben Beaches

Bioaktivitas dan Identifikasi Molekuler Jamur yang Diisolasi dari Sedimen di Pantai Amed dan Tulamben

Ni Made Widya Wulandari¹, Ni Kadek Dwijayanti¹, Ni Putu Ananda Eka Putri¹, I Putu Yogi Astara Putra¹, Ni Putu Eka Leliqia¹, Joko Tri Wibowo^{2,3}, Ida Bagus Nyoman Putra Dwija⁴, Ni Putu Ariantari^{1*}

¹Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Udayana, Jl. Raya Kampus Unud, Jimbaran, Badung, Indonesia (80361)

²Research Center for Vaccine and Drugs, National Research and Innovation Agency of Indonesia (BRIN), KST Soekarno Jl. Raya Bogor KM.46, Cibinong, Bogor, Indonesia (16911)

³STIKES Mamba'ul 'Ulum Surakarta. Jl. Ring Road Utara KM 0.3 Tawang Sari Mojosongo Surakarta (57127)

⁴Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Universitas Udayana, Jl. Raya P.B Sudirman, Denpasar, Indonesia (80232)

Submitted: 22-02-2025

Reviewed: 06-03-2025

Accepted: 21-04-2025

Keywords: Antimicrobial, antioxidant, bioactive compounds, marine fungi, marine sediment.

Kata Kunci: Antimikroba, antioksidan, senyawa bioaktif, jamur laut, sedimen laut.

Correspondence:

Ni Putu Ariantari

putu_ariantari@unud.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Authors

Abstract

Marine fungi have demonstrated the ability to produce promising new bioactive compounds. This study aims to isolate fungi from the marine sediments collected from Amed and Tulamben Beaches, Bali, Indonesia and investigate the bioactivity of the fungal extracts. Following fungal isolation, pure isolates were obtained and fermented on rice media containing salt and without salt. Next, secondary metabolites were extracted with ethyl acetate, then separated by liquid-liquid extraction using methanol containing 10% water and *n*-hexane. The resulting MeOH extracts were analyzed for their phytochemical content and tested for their antimicrobial and antioxidant activities using the disc diffusion and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, respectively. In total, three fungal isolates were obtained. Molecular identification from the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the isolates showed the closest relationship to *Aspergillus* sp., *Aspergillus tamarii*, and *Trichoderma* sp. Phytochemical analysis showed all fungal extracts contained alkaloids and polyphenols. Moreover, extract from *Trichoderma* sp. SED-TU (1) (NS) inhibited *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Streptococcus mutans* with inhibition zone diameters of 4.69 ± 0.16 ; 3.51 ± 0.01 , and 3.49 ± 0.25 mm, respectively. Extract from *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM (S) inhibited *Candida albicans* with an inhibition zone of 7.04 ± 0.22 mm and also had strong antioxidant activity with an IC_{50} value of 62.00 ± 0.35 μ g/mL. This study indicates that fungal isolates from marine sediments have great potential as a source of bioactive natural products.

Abstrak

Jamur laut merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif baru yang menjanjikan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi jamur dari sedimen laut yang dikumpulkan dari Pantai Amed dan Tulamben, Bali, Indonesia dan menguji bioaktivitas ekstrak jamur yang diperoleh. Setelah isolasi jamur, isolat murni diperoleh dan difermentasi pada media beras yang mengandung garam dan tanpa garam. Pada akhir fermentasi, metabolit sekunder diekstraksi dengan etil asetat, kemudian dipisahkan dengan ekstraksi cair-cair dengan metanol yang mengandung 10% air dan *n*-heksana. Ekstrak MeOH yang dihasilkan dianalisis kandungan fitokimianya dan diuji aktivitas antimikroba dan antioksidannya dengan menggunakan metode difusi cakram dan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH). Pada penelitian ini diperoleh tiga isolat jamur. Identifikasi molekuler dari daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) isolat menunjukkan hubungan terdekat dengan *Aspergillus* sp., *Aspergillus tamarii*, dan *Trichoderma* sp. Analisis fitokimia menunjukkan semua ekstrak jamur mengandung alkaloid dan polifenol. Selain itu, ekstrak dari *Trichoderma* sp. SED-TU (1) (NS) dapat menghambat *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Streptococcus mutans* dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar $4,69 \pm 0,16$; $3,51 \pm 0,01$ dan $3,49 \pm 0,25$ mm. Ekstrak dari *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM (S) menghambat *Candida albicans* dengan zona hambat sebesar $7,04 \pm 0,22$ mm dan juga memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 62.00 ± 0.35 μ g/mL. Penelitian ini mengindikasikan bahwa isolat jamur yang diisolasi dari sedimen laut memiliki potensi yang besar sebagai sumber metabolit bioaktif.

How to cite: (citation style AMA 11th Ed.)

Wulandari, NMW, Dwijayanti, NK, Putri, NP, Putra, IPYA, Leliqia, NPE, Wibowo, JT, Dwija, IBNP, Ariantari, NP. Bioactivities and Molecular Identification from Marine Sediment-Derived Fungi Isolated from Amed and Tulamben Beaches. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 74-85, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.10745](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.10745)

INTRODUCTION

Various health problems related to infectious diseases and cell damage due to oxidative stress are still an essential concern worldwide.^{1,2} The widespread and incorrect use of antimicrobial drugs in the community can cause new problems, including the increasing incidence of drug resistance, which complicates the treatment of infectious diseases.³ On the other hand, the decrease in the body's ability to counteract free radicals causes the onset of various degenerative diseases, such as cancer, diabetes, and cardiovascular disease.⁴

To date, the development of new drugs faces significant global challenges, primarily due to the increasing cases of antibiotic resistance and the prevalence of degenerative diseases. Natural products are known as potential sources for drug discovery, including antimicrobial agents and antioxidants. The utilization of marine fungi shows a promising source of bioactive compounds such as antimicrobial and antioxidant.⁵

Fungi isolated from marine environments, such as sediments, have attracted significant attention due to their potential to produce new bioactive compounds as antimicrobial and antioxidant.⁵ A new compound, diorcinol K, and three previously known compounds, namely diorcinols D, F, and I, were obtained from marine sediment-derived *Aspergillus* sp. CUGB-F046. These compounds showed significant antibacterial activity against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of 3.125, 6.25, and 6.25 µg/mL, respectively.⁶ On the other hand, *Aspergillus* sp. SCSIO 41024 was isolated from deep-sea sediments in the South China Sea and yielded cyclopiazonic acid (CPA), speradine A, and asperorydine H. These compounds showed good antioxidant activity in an assay employing DPPH with IC₅₀ values of 190.1, 31.9, and 228.4 µg/mL, respectively.⁷

In this study, we reported potential fungal isolates with antimicrobial and antioxidant activities. The isolates were obtained from marine sediments collected at Amed and Tulamben beaches in Bali, Indonesia. Following fungal cultivation on rice media with and without the addition of artificial sea salt, the resulting methanolic extracts were subjected to metabolite analysis and bioassays, including antimicrobials and antioxidants.

METHODS

Instrumental and Materials

Instrumental. A microplate reader spectrophotometer (Thermo Scientific®, Lithuania) was used for antioxidant testing. The DNA extraction kit from Zymo Research®, USA (Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit) was used for DNA extraction.

Materials. Agar media was prepared using malt extract (Himedia®, India), Bacto agar (Difco BD®, Maryland USA), yeast extract (Oxoid®, France), artificial seawater salts broth (Himedia®, India), and glycerol (Vivantis®, Malaysia). Rice media (Putri Sejati®, Indonesia) with or without the addition of artificial seawater salts broth (Himedia®, India) was used for fungal isolation, purification, and fermentation. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid®, France), Mueller-Hinton Broth (MHB) (Himedia®, India), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Oxoid®, France), and Sabouraud Dextrose Broth (SDB) (Himedia®, India) were used in the antimicrobial activity test. Chloramphenicol (Nalgene®, USA) and ketoconazole (Zoralin®, Indonesia) were used as a positive control for the antimicrobial assay. The antioxidant activity test used DPPH (Smart-Lab®, Indonesia). Ascorbic Acid (Supelco®, Germany) was used as a reference solution for the antioxidant assay. Ethyl acetate, methanol, and *n*-hexane were used in fungal maceration and liquid-liquid extraction. Primers (ITS1 and ITS4), DNA polymerase, nuclease-free water (Thermo Scientific, Lithuania), agarose (1st BASE®, Singapore), and tris-acetate-EDTA (TAE) solution (1st BASE®, Singapore) were used in the molecular identification process.

Sample Collection

Marine sediment was collected from Amed Beach, Abang District, Karangasem Regency (8°21'00.8 "S 115°40'58.4 "E) and Tulamben Beach, Kubu District, Karangasem Regency (8°16'32.5 "S 115°35'34.8 "E) in June

2024. Samples were placed in 50 mL sterile Eppendorf tubes and stored in the collection box. The sample was processed at the Integrated Laboratory of Universitas Udayana.

Isolation of marine-sediment-derived-fungi

Isolation of marine sediment-derived fungi was carried out following the procedure described in the protocol⁸. In brief, agar media for fungal isolation contains malt extract, Bacto agar, artificial seawater salts broth, and chloramphenicol in demineralized water. In addition, rice media with and without the addition of artificial seawater salts were also used for fungal isolation. Isolation was carried out by inoculating ± 1 –2 g of marine sediment onto agar and rice media and incubating them at room temperature (28 °C) for 7 days. Each fungal colony grown on agar and rice medium with different morphological appearances was transferred to a new agar medium for purification. The agar media for purification contains a mixture of malt extract, Bacto agar, and artificial seawater salts broth in demineralized water.

Molecular identification

Molecular identification was carried out through comparison of DNA sequences of the Internal Transcribed Spacer (ITS) region using ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') as forward primer and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') as reverse primer. Prior to the polymerase chain reaction (PCR) process, the fungal DNA was extracted using the Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep Kit according to the package protocol. The ITS region of the extracted DNA was then amplified using a Labcycler 48 Thermocycler in a mixture containing 1 μ L ITS1 primer, 1 μ L ITS4 primer, 20 μ L DNA polymerase, 17 μ L nuclease-free water, and 1 μ L extracted fungal genomic DNA as template. For DNA amplification, the thermocycler was set under pre-denaturation conditions at 95°C for 1.5 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C, annealing at 56°C, and extension at 72°C; each cycle was run for 1 minute and ended with a final extension at 72°C for 15 minutes. Next, the amplicons were analyzed by electrophoresis using 1% agarose gel in 10 $\times$ TAE buffers (Tris-acetate-EDTA) at 75 volts for 45 minutes. PCR products were then submitted to Genetika Science Laboratory for sequencing analysis. The obtained sequences were then compared with nucleotide sequences using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program for nucleotides in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank. The reference sequences of interest and the fungal sequences were aligned in pairs using the MUSCLE method. Phylogenetic trees were reconstructed using MEGA software version 11.0.11 by neighbor-joining method with 1,000 bootstrap replications.⁹

Fermentation and extraction

Each fungal isolate was fermented on rice media with and without the addition of artificial seawater salts. The rice media contained 100 g of rice, 110 mL of demineralized water, and an additional 3.8 g of artificial seawater salts for the rice media containing salt. Aseptically, each agar medium containing pure fungal isolates was cut into pieces and spread onto the surface of the prepared rice medium. The samples were incubated at room temperature until the fungal mycelia covered the rice media. The fermented media were macerated using 500 mL of ethyl acetate in an orbital shaker at 150 rpm for 8 hours. The resulting macerate was filtered and concentrated using a rotary evaporator to remove the solvent. The extract was partitioned using liquid-liquid extraction with a 2:1 ratio of methanol containing 10% water and *n*-hexane. The methanol extract was further analyzed regarding its bioactive content and bioassay.¹⁰

Phytochemicals Screening

Extracts with a concentration of 6000 μ g/mL were prepared. Analysis to detect the presence of alkaloids, terpenoids, steroids, triterpenoids, saponins, polyphenols, and flavonoids was performed with phytochemical screening. For the alkaloid test, Dragendorff's, Wagner's, and Bouchardat's reagents were used. To the 100 μ L extract solution, 100 μ L of 2N HCl and three drops of each reagent were added. The presence of an orange precipitate after the addition of Dragendorff's reagent, a white to yellow precipitate after adding Wagner's reagent, and a brown to black precipitate after the addition of Bouchardat's reagent indicates the presence of alkaloids.¹¹ Terpenoid testing was conducted by reacting 200 μ L of the extract solution with 100 μ L of chloroform and 100 μ L of H₂SO₄. The presence of a reddish-brown layer on top indicates a positive result

for terpenoids.¹² Steroid and triterpenoid tests were performed using the Liebermann-Burchard reaction. A bluish-green color suggests the presence of steroids, while a brown or purple ring at the boundary between the two solvents indicates the presence of triterpenoids.¹³ For the saponin test, 200 µL of the extract solution was shaken vertically for 10 seconds, followed by adding one drop of 2N HCl. If the resulting foam does not disappear, it indicates the presence of saponins.¹⁴ The polyphenol test was carried out by reacting 200 µL of the extract solution with a 10% FeCl₃ solution. A color change to dark blue, blackish-blue, or blackish-green indicates the presence of polyphenols.¹³ The flavonoid test was conducted by evaporating 200 µL of the extract solution, followed by the addition of 200 µL each of acetone, boric acid, oxalic acid, and ether. The solution was then observed under UV₃₆₆ light. Intense yellow fluorescence indicates the presence of flavonoids.¹³

Antimicrobial test

Antimicrobial assay was conducted using disc diffusion methods against the following bacterial strains: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 3351, *Streptococcus mutans* ATCC 35668, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Candida albicans* ATCC 10231. The test solution was prepared by dissolving 50 mg of extract with 1 mL of solvents (methanol: distilled water=9:1) to produce a final concentration of 5%. Suspension of bacterial and/or fungal cultures was made at as much as 10 mL, and the incubation process was carried out for 18-24 hours for bacteria and 48-52 hours for fungi at 37°C. For the assay, 600 µL of the bacteria suspension, equivalent to 0.5 McFarland standard turbidity, was spread on agar media for antibacterial testing and 550 µL of the fungal suspension for antifungal testing. Next, sterile discs were placed on agar media, and 10 µL of test solution was added to each sterile disc.¹⁵ For the negative control, 10 µL of methanol was added to the sterile disc, and antibiotic chloramphenicol with a concentration of 30 µg/mL or antifungal ketoconazole with a concentration of 15 µg/mL was used as a positive control, followed by incubation for 18-24 hours for the antibacterial test and 48-52 hours for the antifungal test. The experiment was performed in triplicate.

Antioxidant test

The antioxidant activity of the tested extracts was estimated using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging assay.¹⁶⁻¹⁸ Ascorbic acid as a reference solution was prepared with concentrations of 4, 6, 8, 10, and 12 µg/mL. Samples were prepared with a series of concentrations starting from 20 to 500 µg/mL. For the assay, 40 µL of 0.5 mM DPPH and 160 µL of sample dissolved in MeOH were added to a 96-well microplate, followed by incubation for 30 minutes at room temperature in a dark room. Next, the absorbance was measured using a microplate reader spectrophotometer at 517 nm wavelength. When DPPH as a free radical encounters a proton-donor substrate such as an antioxidant, the radicals are scavenged, reducing the absorbance. The experiment was performed in triplicate.

Data analysis

The antimicrobial activity was determined by measuring the diameter of the inhibition zone around the sterile discs using a caliper. Antimicrobial activity was analyzed based on its inhibition category. The antimicrobial activity is classified into four categories: weak inhibition (<5 mm), moderate (5–10 mm), strong (10–20 mm), and very strong (>20 mm).^{19,20} The diameter of the inhibition was calculated as follows:

$$\text{Inhibition zone} = \frac{(A-C)+(B-C)}{2} \dots\dots\dots (1)$$

A: Vertical diameters of the clear zone

B: Horizontal diameters of the clear zone

C: Diameter of disc

The antioxidant activity was quantitatively analyzed and categorized according to its IC₅₀. Antioxidant activity is considered very strong if the IC₅₀ value is below 50 µg/mL; strong: IC₅₀= 50-100 µg/mL, moderate: IC₅₀= 101-250 µg/mL, weak: IC₅₀= 250-500 µg/mL, and inactive when the IC₅₀ is more than 500 µg/mL.²¹ The IC₅₀ value was calculated from the linear regression of sample concentration *versus* percent inhibition. The inhibition percentage of the extract against free radicals was calculated as follows:

$$\% \text{Inhibition} = \frac{A-B}{A} \times 100 \dots \dots \dots (2)$$

A: Blank absorbance

B: Sample absorbance

RESULT AND DISCUSSION

Fungal isolation and molecular identification

Fungal isolation from marine sediments resulted in three fungal isolates, encoded as RM-NS-SED-AM (1) and RM-S-SED-AM obtained from Amed Beach, and SED-TU (1) obtained from Tulamben Beach. Isolate RM-NS-SED-AM (1) was obtained from the fungal isolation procedure on rice media without the addition of salt, while RM-S-SED-AM was isolated from rice media supplemented with salt. Meanwhile, SED-TU (1) was isolated from the isolation procedure on agar media. The use of isolation media with and without salt addition aims to isolate a broader diversity of marine fungi. Facultative marine fungi are capable of growing in both saline and non-saline conditions, whereas obligate marine fungi require a saline environment for optimal growth. The macroscopic appearance of fungal isolates is shown in **Figure 1**.

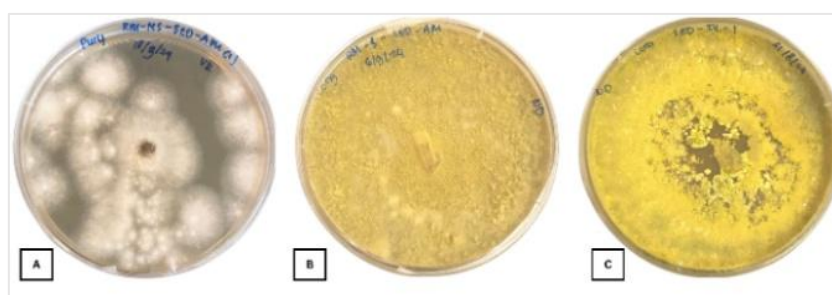


Figure 1. Morphological appearance view from the top of the agar media of fungal isolates: RM-NS-SED-AM (1) (A), RM-S-SED-AM (B), and SED-TU (1) (C).

Molecular identification of species based on sequence comparison using ITS1 and ITS4 evolves rapidly and exhibits higher genetic variability between species. Therefore, the ITS region can be utilized for species-level identification.²² Amplification of the ITS region from isolates RM-NS-SED-AM (1), RM-S-SED-AM, and SED-TU (1) produced DNA bands of approximately 500–700 bp (**Figure 2**). The isolates were classified into three different species with high similarity percentages (>99%) and E-values of 0.0, as shown in **Table 1**. Isolate RM-NS-SED-AM (1) was identified as *Aspergillus* sp., showing 100% similarity to *Aspergillus* sp. PP070052.1. Isolate RM-S-SED-AM was identified as *Aspergillus tamarii*, with 100% similarity to *Aspergillus tamarii* JQ257030.1. Meanwhile, isolate SED-TU (1) was identified as *Trichoderma* sp., showing 100% similarity to *Trichoderma* sp. MK871051.1 and supported by bootstrap values greater than 86 in the phylogenetic analysis (**Figure 3**).

Previous research reported that the *Aspergillus* genus, namely *A. tubingensis* was found from the area with high salt concentrations (hypersaline) and higher ambient temperatures.²³ This species was also isolated from the bottom sediments of the eastern Gulf of Finland.²⁴ Moreover, previous studies also reported *A. tamarii* species afforded from marine sediments from the Mediterranean Sea, Alexandria,²⁵ as well as from the upper layer of sediments in the Velikaya Salma Strait located on the southwestern shore of Kandalaksha Bay in the White Sea.²⁶ Meanwhile, one of the species of *Trichoderma*, namely *T. lixii* was obtained before from coastal marine waters in Nha Trang Bay and Van Bay of Phong Bay, Vietnam.²⁷

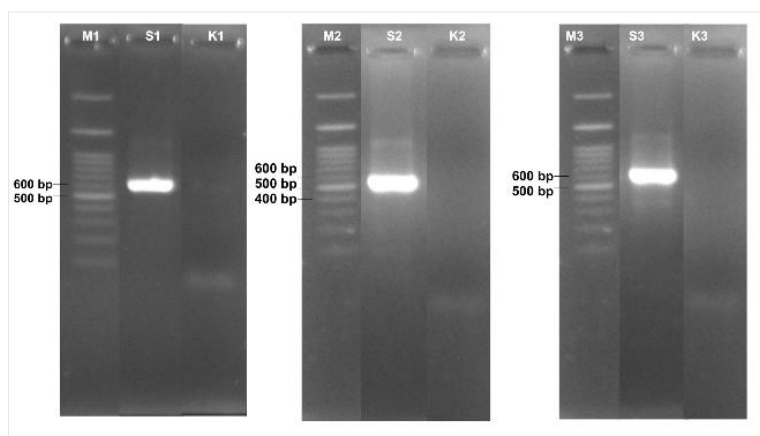


Figure 2. Electrophoregram of PCR products from amplification of ITS region; M1-3: 100 bp DNA ladders, S1: DNA sample with code *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1), S2: DNA sample with code *A. tamarii* RM-S-SED-AM, S3: DNA sample with code *Trichoderma* sp. SED-TU (1). K1-3: negative controls.

Table 1. Molecular identification using GenBank's Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) for nucleotides.

Isolate Code	Taxa with the Closest Relationship	Number of basepairs	Percent similarity	Query Cover	E. Value
RM-NS-SED-AM (1)	<i>Aspergillus</i> sp. (PP070052.1)	517	100%	100%	0.0
RM-S-SED-AM	<i>Aspergillus tamarii</i> (MH345887.1)	573	100%	99.82%	0.0
SED-TU (1)	<i>Trichoderma</i> sp. (MK871051.1)	610	100%	100%	0.0

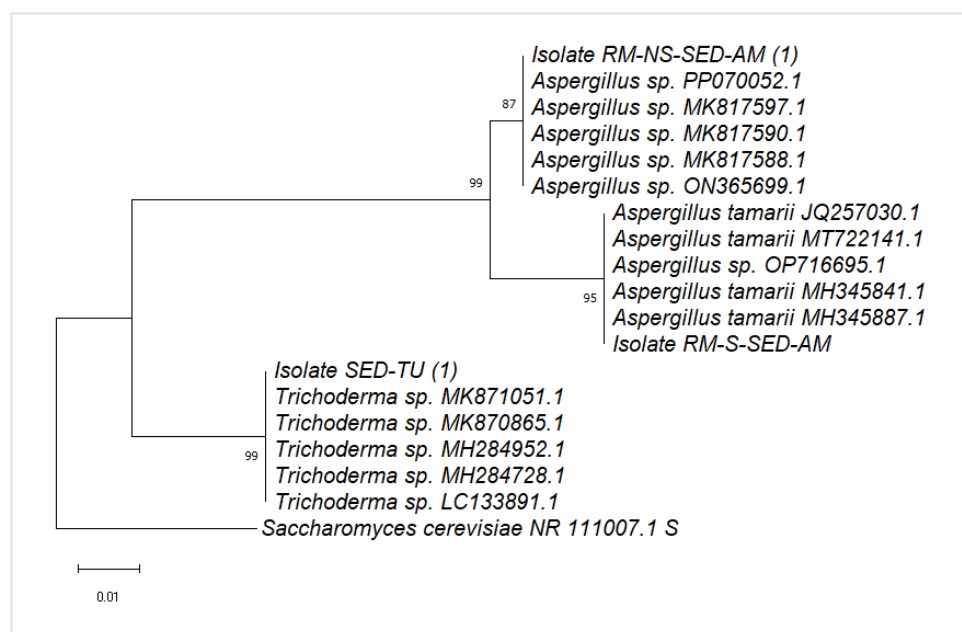


Figure 3. Phylogenetic tree of isolates *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1), *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM, and *Trichoderma* sp. SED-TU (1) based on comparison of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions using neighbor-joining algorithm with 1,000 bootstraps.

Fermentation and extraction

The methanol and *n*-hexane extracts obtained from the liquid-liquid partitioning of the crude ethyl acetate extract of each fungal isolate are shown in **Table 2**. Only methanol extracts were further used for analysis and bioassays. The *n*-hexane solvent has non-polar characteristics which predominantly dissolves compounds such as oils and fats with relatively large molecular weights. The presence of these compounds can inhibit the diffusion process and block the penetration of antimicrobial active compounds into cells,²⁸

therefore only methanolic extracts were used for further bioassays in this study. In addition, previous studies have also reported that extracts obtained from the methanolic phase showed the highest antioxidant activity.^{29,30}

Table 2. The amount of extract afforded following fermentation of the marine sediment-derived fungi.

Fungal isolate	Salt in media	Extract's amount (g)		
		MeOH extract	n-hexane extract	EtOAc extract
<i>Aspergillus</i> sp. RM-NS-SED-AM (1)	With	1.14	0.73	1.87
	Without	0.79	0.27	1.06
<i>Aspergillus tamarii</i> RM-S-SED-AM	With	0.28	0.19	0.47
	Without	0.31	0.26	0.57
<i>Trichoderma</i> sp. SED-TU (1)	With	0.83	0.50	1.33
	Without	0.85	0.52	1.37

Phytochemicals Screening

Phytochemical screening of the obtained methanol extracts showed that all extracts contained alkaloids and polyphenols (**Table 3**). Flavonoids were detected in the extracts of *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1) and *Trichoderma* sp. SED-TU (1) cultured on rice medium supplemented with salt. Triterpenes were identified in the extracts of *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1) and *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM. None of the extracts exhibited the presence of saponins, terpenes, or steroids. We observed no difference in the phytochemical profile of extracts afforded from fungal isolates *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1) and *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM regarding salt occurrence in the media. However, in the *Trichoderma* sp. SED-TU (1) extracts, flavonoids were only detected in the methanol extract when the fungus was fermented on rice medium with salt addition.

There are limited reports on secondary metabolites from *Aspergillus tamarii* from marine sediment by far. However, a previous study on *A. tamarii* M143 led to the isolation of a new pentacyclic oxindole alkaloid (Separadine A) from the cultured broth of the fungus. The fungus was obtained from driftwood at a seashore in Okinawa.³¹ Alkaloids such as asperazine, asperazines B and C, and pestalamide D were also reported to be produced by *A. tubingensis* OUCMBIII 143291, which was isolated from tidal zone sediments in Dongying, China.³² Research on one of the *Trichoderma* species, *Trichoderma lixii*, collected from Mentawai Island, Indonesia, led to the isolation of several secondary metabolites. Trichodermamides A and B, aspergillazine A, and DC1149B are classified as alkaloids. Ergosterol peroxide is identified as a steroidal compound, while 5-hydroxy-2,3-dimethyl-7-methoxy-chromone belongs to the polyphenol class. Cerebrosides C and D are categorized as glycosphingolipids, and nafuredin A is classified as polyketide. Lastly, harzianumols E and F are identified as sesquiterpenes, a subgroup of the terpene class.³³

Table 3. Phytochemicals screening of methanol extracts from the marine sediment-derived fungi.

Fungal isolate	Salt in media	Class of secondary metabolites						
		Alkaloids	Flavonoids	Polyphenols	Saponins	Terpenes	Steroids	Triterpenes
<i>Aspergillus</i> sp. RM-NS-SED-AM (1)	With	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
	Without	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>Aspergillus tamarii</i> RM-S-SED-AM	With	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
	Without	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)
<i>Trichoderma</i> sp. SED-TU (1)	With	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Without	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)

Note: (+/-) indicates the presence/absence of the corresponding secondary metabolite class.

Antimicrobial test

The antimicrobial activity of the tested extracts was indicated by the mean diameter of the inhibition zone $\pm$ standard deviation (SD). Among them (**Table 4**), *Trichoderma* sp. SED-TU (1) extracts afforded from rice culture without the addition of salt (NS) showed potential inhibition against *S. aureus*, *S. epidermidis*, and *S. mutans* with zone inhibitions of 4.69 ± 0.16 , 3.51 ± 0.01 , and 3.49 ± 0.25 mm, respectively. Meanwhile, *Aspergillus*

sp. RM-NS-SED-AM (1) extract, which was obtained from rice culture without the addition of salt (NS), showed potential inhibition against *B. cereus* growth with a zone inhibition of 3.19 ± 0.85 mm. On the other hand, *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM extract from rice culture containing salt (S) had the most potent inhibition against *C. albicans* with a zone inhibition of 7.04 ± 0.23 mm. None of the tested extracts had antibacterial activity against the tested Gram-negative bacterium *E. coli* and MRSA. Although the disc diffusion results indicate generally weak inhibition categories, the presence of clear inhibition zones using extracts at a low tested concentration (5%) suggests that the tested samples possess potential antibacterial activity.

Many previous studies have shown that bioactive compounds with antimicrobial activity have been found in extracts produced by marine fungi from the genera *Aspergillus* and *Trichoderma*. Aside from marine ecosystems, the antibacterial activity of secondary metabolites isolated from these genera is also widely reported from fungal isolates derived from terrestrial environments, which indicates the broad distribution of these genera in nature and their potential as producers of bioactive compounds, including antibacterial. For example, *A. tamarii* extract, isolated from the inner living tissues of the fruiting bodies of *Lycoperdon umbrinum* mushroom in the botanical Garden, University of Ibadan, was shown to have antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 6538 and *E. coli* ATCC 25922, with zone inhibitions of 14.5 ± 0.707 and 23 ± 1.414 mm.³⁴ Extracts of *A. tubingensis* obtained from the lichen *Parmelia caperata* of Similipal Biosphere Reserve, India exerted antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, *B. subtilis* and *S. aureus* with inhibition zone diameters of 20.30 ± 0.57 and 16.50 ± 0.50 mm. This extract also showed antifungal activity against *C. albicans*, with an inhibition zone reaching 25.30 ± 1.73 mm.³⁵ *Trichoderma lixii* extract, the fungus isolated from mangrove *Sonneratia alba* grown in Bungus, West Sumatra, Indonesia, also showed inhibition against the growth of *S. aureus*, *E. coli* and *C. albicans*, with inhibition zone diameters of 14.37 ± 0.01 , 13.65 ± 0.00 and 14.57 ± 0.00 mm, respectively.³⁶

Table 4. Diameter of inhibition zone (mm) of fungal extracts against the tested bacterial and fungal strains

Fungal isolate	Salt in media	Diameter of inhibition growth zone (mm) against microbial strains (mean $\pm$ SD)						
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>S. mutans</i> ATCC 35668	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	MRSA ATCC 3351	<i>C. albicans</i> ATCC 10231
<i>Aspergillus</i> sp. RM-NS-SED-AM (1)	With	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Without	(-)	(-)	3.19 ± 0.85	(-)	(-)	(-)	(-)
<i>Aspergillus tamarii</i> RM-S-SED-AM	With	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	7.04 ± 0.23
	Without	0.22 ± 0.00	(-)	(-)	(-)	0.21 ± 0.01	(-)	(-)
<i>Trichoderma</i> sp. SED-TU (1)	With	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	Without	4.69 ± 0.16	(-)	(-)	3.49 ± 0.25	3.51 ± 0.01	(-)	(-)
Positive control*		21.79 ± 0.00	23.97 ± 6.54	22.10 ± 0.76	21.69 ± 0.92	14.06 ± 0.01	3.30 ± 0.00	25.24 ± 0.03

Note: (-) indicates that there is no antimicrobial activity. All tests were performed with three replicates.

*Chloramphenicol is used as a positive control in the antibacterial tests, while ketoconazole is used as a positive control in the antifungal test.

Antioxidant test

The antioxidant activity of the tested extracts was shown by the mean of $IC_{50} \pm$ standard deviation (Table 5). Ascorbic acid was used as a reference and showed prominent antioxidant activity. Among the tested extracts, *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM extract cultured on rice media containing salts had strong antioxidant activity with an IC_{50} of 62.00 ± 0.35 μ g/mL. In contrast, its extract from rice culture without salt was inactive. Extracts of *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1) cultured on rice media containing salt, and *Trichoderma* sp. SED-TU (1) cultured on rice media with or without salt exhibited moderate antioxidant activity with IC_{50} values of 149.33 ± 5.46 , 106.02 ± 2.51 , and 163.85 ± 3.56 μ g/mL, respectively. Meanwhile, *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1) (NS) extract from rice culture without adding salt only showed weak antioxidant activity with an IC_{50} value of 305.72 ± 8.19 μ g/mL.

Previous studies have shown that extracts and compounds from the *Aspergillus* and *Trichoderma* genera have antioxidant activity. For example, the extract of soil-derived *A. tubingensis*, which was isolated

from a soil sample close to the Sohag-Qena Road, Sohag Governorate, Egypt was shown to have very strong antioxidant activity with an IC_{50} value of $1.2 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$.³⁷ A study on *Trichoderma* sp. Jing-8, isolated from the stem of *Panax notoginseng* collected in Wenshan, Yunnan Province, China, led to the isolation of alternariol and alternariol-1'-hydroxy-9-methyl ether, which demonstrated potent radical-scavenging activity with an IC_{50} value of $12 \mu\text{g/mL}$.³⁸

Table 5. Antioxidant activity of extracts from marine sediment-derived fungi using the DPPH method.

Fungal isolate	Salt in media	$IC_{50} \pm SD$ ($\mu\text{g/mL}$)	Category*
<i>Aspergillus</i> sp. RM-NS-SED-AM (1)	With	149.33 ± 5.46	Moderate
	Without	305.72 ± 8.19	Weak
<i>Aspergillus tamarii</i> RM-S-SED-AM	With	62.00 ± 0.35	Strong
	Without	>500	Inactive
<i>Trichoderma</i> sp. SED-TU (1)	With	106.02 ± 2.51	Moderate
	Without	163.85 ± 3.56	Moderate
Ascorbic Acid**		6.79 ± 0.10	Very strong

*Category refer to the study by Endra *et al.* (2021)²¹

**Ascorbic acid was used as a reference compound in the antioxidant assay.

In the present study, each isolated marine sediment-derived fungus was cultured on rice media with or without salt. The secondary metabolite analysis showed no apparent differences among the secondary metabolites detected in extracts from both cultures, except for *Trichoderma* sp. SED-TU (1) extract. However, in the antimicrobial and antioxidant tests, the presence or absence of salt in rice media seemed to influence the activity of the extracts. This finding is in line with previous studies. For example, the extract of the fungus *Phialosimplex* isolated from seawater from Dona Paula beach grown on media containing 15% NaCl showed higher antioxidant activity,³⁹ suggesting that salt in media could affect the production of secondary metabolites, which in turn also influence their bioactivity. As the method for phytochemical analysis used in our study is only able to detect the presence of a particular class of secondary metabolites, analysis using HPLC-DAD or LC-MS would be more beneficial to detect particular secondary metabolites produced by fungi grown on different media compositions for further investigation.

CONCLUSIONS

Three fungal isolates obtained from the marine sediments of Amed and Tulamben beaches were identified as *Aspergillus* sp. RM-NS-SED-AM (1), *Aspergillus tamarii* RM-S-SED-AM, and *Trichoderma* sp. SED-TU (1). Phytochemical analysis revealed that all methanol extracts contained alkaloids and polyphenols. Antimicrobial tests showed that extracts from the culture of all three isolates without salt have superior antibacterial activity compared to the culture without salt. However, only the culture of *A. tamarii* RM-S-SED-AM with salt showed antifungal activity against *C. albicans*. Moreover, antioxidant test revealed that this extract possess strong antioxidant activity. Therefore, the findings from this study regarding the effect of salt on the culture can serve as the starting point of further investigations, particularly in the search for compounds responsible for the antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of each fungal strain.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Institute for Research and Community Service (LPPM) of Udayana University for the research funding through the "Kampus Merdeka" research grant (no.: B/266.46/UN14.4.A/PT.01.03/2024). The authors also thank the Marine Natural Products Research Group in Research Center for Vaccine and Drugs, National Research and Innovation Agency (BRIN) for facilitating the research through MBKM Research 2024, and the Karangasem Regency Government for facilitating the sample collection.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Baker RE, Mahmud AS, Miller IF, et al. Infectious disease in an era of global change. *Nat Rev Microbiol.* 2022;20(4):193-205. doi:10.1038/s41579-021-00639-z
2. Raut SK, Khullar M. Oxidative stress in metabolic diseases: current scenario and therapeutic relevance. *Mol Cell Biochem.* 2023;478(1):185-196. doi:10.1007/s11010-022-04496-z
3. Burhamzah R, Rante H. Isolasi dan Skrining Aktinomisetes Laut Penghasil Senyawa Antibakteri-Multi Drug Resistance dari Sedimen Laut Pantai Galesong. *Majalah Farmasi dan Farmakologi.* 2020;23(3):79-81. doi:10.20956/mff.v23i3.9397
4. Zukhruf N, Kiromah W, Husein S, et al. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ganitri (*Elaeocarpus Ganitrus* Roxb.) dengan Metode DPPH (2,2 Difetil-1-Pikrilhidazil) Antioxidant Activity Test of Ganitri (*Elaeocarpus Ganitrus* Roxb.) Leaf Ethanol Extract Using the DPPH (2,2 Difetil-1-Pikrilhidazil) Method. *Jurnal Farmasi Indonesia.* 2021;18(1):60-67. <http://journals.ums.ac.id/index.php/pharmacon>
5. Yurchenko AN, Girich E V., Yurchenko EA. Metabolites of Marine Sediment-Derived Fungi: Actual Trends of Biological Activity Studies. *Mar Drugs.* 2021;19(2):1-38. doi:10.3390/MD19020088
6. Xu X, Yang H, Xu H, Yin L, Chen Z, Shen H. Diphenyl ethers from a marine-derived isolate of *Aspergillus* sp. CUGB-F046. *Nat Prod Res.* 2018;32(7):821-825. doi:10.1080/14786419.2017.1363754
7. Chen WH, Li KL, Lin XP, et al. Antioxidant CPA-type indole alkaloids produced from the deep-sea derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO 41024. *Nat Prod Res.* 2021;35(23):5266-5270. doi:10.1080/14786419.2020.1749614
8. Kjer J, Debbab A, Aly AH, Proksch P. Methods for Isolation of Marine-Derived Endophytic Fungi and Their Bioactive Secondary Products. *Nat Protoc.* 2010;5(3):479-490. doi:10.1038/nprot.2009.233
9. Ariantari NP, Putra IPYA, Leliqia NPE, et al. Antibacterial and cytotoxic secondary metabolites from endophytic fungi associated with *Antidesma bunius* leaves. *J Appl Pharm Sci.* 2023;13(7):132-143. doi:10.7324/JAPS.2023.101347
10. Putra IPYA, Ratnasantasyacitta ESP, Putra AAGRY, Ariantari NP. Investigation of Antibacterial Activity and Toxicity of Extracts of *Lumnitzera racemosa*-derived Endophytic Fungi. In: *AIP Conference Proceedings.* Vol 3132. American Institute of Physics; 2024:040003(1)-040003(7). doi:10.1063/5.0211549
11. Ghannam M, Shammaa E, Ali-Nizam A. Determining the quality of the powders of *Xanthium Strumarium* and *Xanthium Spinosum* by microscopic examination and preliminary tests. *SN Appl Sci.* 2020;2(9):1-12. doi:10.1007/s42452-020-03390-x
12. Edeoga HO, Okwu DE, Mbaebie BO. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *Afr J Biotechnol.* 2005;4(7):685-688. <http://www.academicjournals.org/AJB>
13. Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of plant secondary metabolites. *Methods in Molecular Biology.* 2012;864(13):341-366. doi:10.1007/978-1-61779-624-1_13
14. Santoso P, Juliadi D, Udayani NNW, Separsa IPPJ, Mahayani IAGS, Trismawan IGY. Skrining Fitokimia, Formulasi dan Antioksidan Sediaan Granul Effervescent Ekstrak N-Butanol Buah Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). *Malahayati Nursing Journal.* 2023;5(2):541-555. doi:10.33024/mnj.v5i2.7509
15. Ariantari NP, Putu Yogi Astara Putra I, Wibowo JT, et al. Evaluation of Antibacterial and Toxicity Properties of Marine Endophytic Fungi from Red Algae *Gracilaria Salicornia* and *Chondrus* sp. In: *BIO Web of Conferences.* Vol 92. EDP Sciences; 2024:1-12. doi:10.1051/bioconf/20249202019
16. Sembiring E N, Elya B, Sauriasari R. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacog Journal.* 2018;10(8):123-127. doi:10.4103/0973-7847.70902
17. Biao H. He Biao and Liena, "The Antioxidant Activity Test with DPPH and Antibacterial Method with Minimum Inhibitory Concentration Method of Andaliman Fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC The Antioxidant Activity Test with DPPH and Antibacterial Method with Minimum Inhibitory Concentration Method of Andaliman Fruit (*Zanthoxylum acanthopodium* DC.). *International Journal of Multidisciplinary Research and Publications (IJMRAP).* 2023;5(10):62-65.
18. Alemu B, Molla MD, Tezera H, Dekebo A, Asmamaw T. Phytochemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Bersama abyssinica* F. seed extracts. *Sci Rep.* 2024;14(1):1-10. doi:10.1038/s41598-024-56659-1
19. Davis WW, Stout TR. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error1. *Appl Microbiol.* 1971;22:659-665. <https://journals.asm.org/journal/am>

20. Maryadi M, Yusuf F, Farida S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tanaman Obat Suku Musi di Kabupaten Musi Banyuasin, Sumatera Selatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. 2017;7(2). doi:10.22435/jki.v7i2.6070.127-135
21. Endra Pujiastuti, Ricka Islamiyati. Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat dan Air Ranting Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) dengan Peredaman Radikal Bebas DPPH. *Cendekia Journal of Pharmacy*. 2021;5(2):135-144.
22. Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J Nat Prod*. 2017;80(3):756-770. doi:10.1021/acs.jnatprod.6b01085
23. Abdel-Azeem AM, Salem FM, Abdel-Azeem MA, Nafady NA, Mohesien MT, Soliman EA. Biodiversity of the Genus *Aspergillus* in Different Habitats. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*. Elsevier Inc.; 2016:3-28. doi:10.1016/B978-0-444-63505-1.00001-4
24. Kuzikova I, Rybalchenko O, Kurashov E, Krylova Y, Safronova V, Medvedeva N. Defense Responses of the Marine-Derived Fungus *Aspergillus tubingensis* to Alkylphenols Stress. *Water Air Soil Pollut*. 2020;231(6):1-18. doi:10.1007/s11270-020-04639-2
25. Fathy N, Dahab A, Awad MF, et al. Marine-derived fungus, *Penicillium aurantiogriseum* AUMC 9757: a producer of bioactive secondary metabolites. *J Basic Appl Mycol Egypt*. 2013;4(1):77-83. <https://www.researchgate.net/publication/261064145>
26. Khusnullina AI, Bilanenko EN, Kurakov A V. Microscopic Fungi of White Sea Sediments. *Contemp Probl Ecol*. 2018;11(5):503-513. doi:10.1134/S1995425518050062
27. Pham TT, Dinh K V., Nguyen VD. Biodiversity and Enzyme Activity of Marine Fungi with 28 New Records from the Tropical Coastal Ecosystems in Vietnam. *Mycobiology*. 2021;49(6):559-581. doi:10.1080/12298093.2021.2008103
28. Moningka KC, Kojong NS, Sudewi S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm. F.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara In-Vitro. *PHARMACON*. 2015;4(3):193-202.
29. Zulharmitta, Elrika D, Rivai H. Penentuan Pengaruh Jenis Pelarut Ekstraksi terhadap Perolehan Kadar Senyawa Fenolat dan Daya Aktiosidan dari Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.). *Jurnal Farmasi Higea*. 2010;2(1):37-45.
30. Nurcahyanti ADR, Dewi L, Timotius KH, et al. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Polar dan Non-Polar Biji Selasih (*Ocimum sanctum* Linn). *J Teknol dan Industri Pangan*. 2011;22:1-6.
31. Tsuda M, Mugishima T, Komatsu K, et al. Speradine A, a New Pentacyclic Oxindole Alkaloid from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus tamarii*. *Tetrahedron*. 2003;59(18):3227-3230. doi:10.1016/S0040-4020(03)00413-7
32. Xu C, Xu K, Yuan XL, et al. Characterization of diketopiperazine heterodimers as potential chemical markers for discrimination of two dominant black aspergilli, *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis*. *Phytochemistry*. 2020;176(1):1-8. doi:10.1016/j.phytochem.2020.112399
33. Sirimangkalakitti N, Lin J, Harada K, Setiawan A, Arisawa M, Arai M. Chemical Constituents and Anticancer Activities of Marine-Derived Fungus *Trichoderma lixii*. *Molecules*. 2024;29(9). doi:10.3390/molecules29092048
34. Christianah B, Tayo A. Molecular Identification and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi *Aspergillus tamarii* (Trichomaceae). *Niger J Pharm Sci*. 2017;16(1):41-48. <https://www.researchgate.net/publication/348923135>
35. Padhi S, Das D, Panja S, Tayung K. Molecular Characterization and Antimicrobial Activity of an Endolichenic Fungus, *Aspergillus* sp. Isolated from *Parmelia caperata* of Similipal Biosphere Reserve, India. *Interdiscip Sci*. 2017;9(2):237-246. doi:10.1007/s12539-016-0146-y
36. Handayani D, Rivai H, Mulyana R, Suharti N, Rasyid R, Hertiani T. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from mangrove plant *Sonneratia alba* Sm. *J Appl Pharm Sci*. 2018;8(2):049-053. doi:10.7324/JAPS.2018.8207
37. Ramadan A, Shehata R, EL-Sheikh H, Zidan S, Al-Bedak osama. GC-MS Analysis, Antifungal, and Antioxidant Activity of Rice Straw-Based Extract Produced by *Aspergillus tubingensis* AUMC 15759 in Solid State Fermentation. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G Microbiology*. 2023;15(2):43-60. doi:10.21608/eajbsg.2023.317808

38. Zhang J cheng, Chen GY, Li XZ, et al. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Nat Prod Res.* 2017;31(23):2745-2752. doi:10.1080/14786419.2017.1295235
39. Ravindran C, Varatharajan GR, Rajasabapathy R, Vijayakanth S, Kumar AH, Meena RM. A role for antioxidants in acclimation of marine derived pathogenic fungus (NIOCC 1) to salt stress. *Microb Pathog.* 2012;53(3-4):168-179. doi:10.1016/j.micpath.2012.07.004

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) dengan Metode DPPH dan FRAP

Antioxidant Activity of Ethanol Extracts from Mangrove (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) Seed Coat and Fruit by DPPH and FRAP Assays

I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani^{1*}, Ketut Agus Adrianta¹, Ni Nyoman Wahyu Udayani¹, Ni Nyoman Yudianti Mendra¹, Ni Luh Gede Erica Fridayana², Ni Made Dharma Shantini Suen³

¹Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

²Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

³Departemen Farmasetika, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati Denpasar, Jl.Kamboja, No. 11 A, Denpasar, 80233, Indonesia

Diajukan: 21-06-2024

Direview: 14-02-2025

Disetujui: 28-04-2025

Kata Kunci: antioksidan, bakau, buah, kulit biji, radikal bebas

Keywords: antioxidant, banana, fruit, seed coat, free radical

Korespondensi:

I Gusti Agung Ayu Kusuma Wardani

kusumawardani@unmas.ac.id



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Penulis

Abstrak

Senyawa radikal bebas merupakan suatu molekul yang mempunyai sifat reaktif dan tidak stabil, sehingga senyawa ini mampu menyebabkan kerusakan biomolekul dengan merusak integritas DNA, protein dan lipid. Kondisi ini memicu terjadinya stres oksidatif yang mengakibatkan timbulnya penyakit degeneratif. Manusia membutuhkan asupan antioksidan dari luar ketika antioksidan endogen tidak cukup untuk menangkai radikal bebas. Penelitian sebelumnya menunjukkan tingginya aktivitas antioksidan pada biji bakau. Potensi antioksidan dari kulit biji dan buah bakau masih belum dieksplorasi secara mendalam, baik dengan menggunakan metode DPPH maupun FRAP. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) menggunakan metode DPPH dan FRAP. Penelitian ini merupakan penelitian kuantitatif dengan metode pendekatan eksperimental laboratorium. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan FRAP. Asam galat digunakan sebagai standar pembanding aktivitas antioksidan. Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit biji, buah dan asam galat diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 10,83 µg/mL, 4,91 µg/mL dan 0,793 µg/mL (DPPH) dan RP₅₀ sebesar 4.455,63 µg/mL, 15.556,32 µg/mL dan 34,04 µg/mL (FRAP). Perbedaan metode uji dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak, tergantung pada jenis radikal bebas, pelarut radikal bebas, aksesibilitas sterik dan pH pengujian.

Abstract

Free radical compounds are molecules that possess reactive and unstable properties, which can damage biomolecules by disrupting the integrity of DNA, proteins and lipids. This condition can trigger oxidative stress, which can result in degenerative diseases. Humans require antioxidant intake from external sources when their own endogenous antioxidants are insufficient to counteract free radicals. Previous studies have demonstrated the high antioxidant activity of mangrove seeds. However, the antioxidant potential of mangrove seed coats and fruits remains underexplored, particularly when assessed using the DPPH and FRAP methods. This study aims to evaluate the antioxidant activity of seed coat and fruit extracts of *Xylocarpus granatum* J. Koenig using the DPPH and FRAP methods. This research is quantitative research with laboratory experimental approach. Antioxidant activity testing using DPPH and FRAP methods. Gallic acid was used as a comparison standard for antioxidant activity. The results obtained from the antioxidant activity testing of the ethanol extracts of seed shell, fruit and gallic acid were IC₅₀ values of 10.83 µg/mL, 4.91 µg/mL and 0.793 µg/mL (DPPH) and RP₅₀ of 4,455.63 µg/mL, 15,556.32 µg/mL and 34.04 µg/mL (FRAP). It is acknowledged that discrepancies in testing methodologies can influence the antioxidant activity of each extract, contingent on the nature of the free radical, the solvent, steric accessibility, and the pH of the medium.

Cara mensitasi artikel (citation style: AMA 11thEd.):

Wardani, IGAAG, Adrianta, KA, Udayani, NNW, Mendra, NNY, Fridayana, NLGE, Suen, NMDS. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau (*Xylocarpus granatum* J.Koenig) dengan Metode DPPH dan FRAP. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 86-98, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9426](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9426)

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Dalam upaya mencapai stabilitas, radikal bebas cenderung sangat reaktif dalam menarik elektron dari molekul lain, sehingga mengakibatkan kerusakan pada biomolekul seperti lipid, protein, dan DNA. Hal ini dapat meningkatkan stres oksidatif dan memicu timbulnya penyakit degeneratif.¹

Penyakit degeneratif merupakan masalah kesehatan yang signifikan di Indonesia. Adapun contoh penyakit degeneratif meliputi gagal ginjal, diabetes melitus dan stroke. Prevalensi penyakit-penyakit ini terus meningkat dari waktu ke waktu. Menurut data dari Riskesdas, prevalensi stroke meningkat dari 7% pada tahun 2013 menjadi 10,9% pada tahun 2018. Begitu pula, prevalensi gagal ginjal kronis naik dari 2% menjadi 4%, dan diabetes mellitus dari 1,8% menjadi 1,9% dalam periode yang sama. Pada masa pandemi COVID-19, prevalensi penyakit degeneratif diperkirakan akan semakin meningkat akibat dampak negatif yang meluas di berbagai bidang kehidupan, termasuk ekonomi, psikologis, sosial, spiritual, dan kesehatan, yang dapat memicu timbulnya penyakit degeneratif.² Tubuh manusia membutuhkan antioksidan eksternal ketika produksi antioksidan internal tidak cukup untuk menangkalkan radikal bebas. Konsumsi makanan yang mengandung agen antioksidan dapat membantu mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh.³

Indonesia merupakan salah satu negara tropis, memiliki kekayaan tanaman obat yang telah lama dimanfaatkan secara tradisional untuk mengatasi berbagai penyakit. Salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat oleh masyarakat Indonesia adalah bakau (*Xylocarpus granatum* J. Koenig). Secara tradisional, bakau digunakan untuk mengobati diabetes, asma, hepatitis, diare, penyakit kulit, infeksi dan penyakit mata.⁴ Penelitian sebelumnya menunjukkan tingginya aktivitas antioksidan pada biji bakau dengan nilai IC₅₀ sebesar 7,94 ppm.⁵ Potensi antioksidan dari kulit biji dan buah bakau masih belum dieksplorasi secara mendalam, baik dengan menggunakan metode DPPH maupun FRAP. Kulit biji dan buah bakau mengandung senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas farmakologi. Bagian biji bakau mengandung tanin yang memiliki sifat antibakteri, sementara kulit bijinya kaya akan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan, karena kulit biji dari *X. granatum* memiliki kandungan flavonoid.⁶ Flavonoid dikenal sebagai senyawa yang efektif dalam menangkalkan radikal bebas.⁷ Selain itu, kulit biji dan buah bakau juga mengandung senyawa limonoid, turunan triterpenoid yang memiliki aktivitas farmakologi beragam, termasuk sebagai antioksidan.⁸ Senyawa fenolik dalam buah *X. granatum* juga memiliki aktivitas antioksidan.⁹

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan melalui mekanisme transfer atom hidrogen (HAT) dan transfer elektron (ET). Metode HAT menilai kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal bebas melalui donasi atom hidrogen, contoh TRAP, ORAC, β -Caroten bleaching assay. Metode ET mengukur aktivitas antioksidan dalam mereduksi radikal bebas melalui transfer elektron, contohnya pada metode FRAP, DMPD, FIC, CUPRAC dan lain-lain. Beberapa metode, seperti DPPH dan ABTS, menggabungkan kedua mekanisme ini untuk hasil yang lebih komprehensif. Penelitian ini menggunakan metode DPPH dan FRAP untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau.¹⁰

Berdasarkan hal tersebut, penelitian mengenai pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau (*X. granatum* J.Koenig) menggunakan metode DPPH dan FRAP.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian.

Alat. Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik (Ohaus®), gelas kimia (Pyrex®), gelas ukur (Pyrex®), labu ukur (Pyrex®), kaca arloji, erlenmayer (Pyrex®), tabung reaksi (Iwaki®), corong kaca (Pyrex®), batang pengaduk, spatula logam, pipet mikro, kertas saring, cawan porselin, penangas air, lampu bunsen dan instrumen yang digunakan yaitu spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-Vis 1800®), rotary evaporator (Buchi R-300®), dan elmasonik (Elma®), *centrifuge* (Ohaus®), *multichannel pipettor* 200 μ L (Rainin®), *microplate reader* (Occuris®).

Bahan. Bahan yang digunakan yaitu simplisia kulit biji dan buah bakau yang berasal dari Taman Hutan Raya (TAHURA) yang berlokasi di Balai Pengelolaan Hutan Mangrove Wilayah Pemongan, Kuta, Denpasar, etanol 80% (Bratacem), metanol p.a. (Merck®), baku DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma®), aquadest (Sekawan Bali Sejahtera®), HCl pekat (SAP Chemicals®), reagen dragendroff (Nitra Kimia®), pereaksi mayer (SAP Chemicals®), FeCl₃ 1% (SAP Chemicals®), kloroform (Merck®), asam asetat anhidrat (Merck®), asam sulfat pekat (SAP Chemicals®), Fe (III) 6H₂O, 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) (Sigma®), Sodium Asetat (Merck®), Asam Asetat Glasial (Merck®), Galic Acid (Sigma®).

Prosedur Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis eksperimental laboratorium yang dilakukan secara kuantitatif untuk menentukan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau menggunakan metode DPPH dan FRAP.

Ekstraksi

Proses ekstraksi dilakukan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sholihah et al. (2017) dengan modifikasi. Serbuk simplisia kulit biji bakau ditimbang sebanyak 50 g dan dilarutkan dengan pelarut etanol 80% sebanyak 500 mL. Ekstraksi dilakukan menggunakan elmasonik selama 10 menit dengan suhu 40°C. Filtrat disaring menggunakan kertas *whatman* dengan bantuan corong buchner (Filtrat 1). Filtrat yang diperoleh ditampung pada beaker glass dan ditutup dengan aluminium foil. Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat yang telah terkumpul dievaporasi pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia pada ekstrak etanol kulit biji bakau meliputi skrining alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid dan steroid. Pembuatan larutan uji ekstrak kulit biji bakau dilakukan dengan cara melarutkan 500 mg ekstrak etanol kulit biji bakau (*X. granatum*) dalam 50 mL etanol 80%.¹² **Pemeriksaan alkaloid** dilakukan dengan memasukkan larutan ekstrak uji sebanyak 2 mL ke dalam cawan porselin dan diuapkan di atas penangas air hingga menghasilkan residu. Residu tersebut selanjutnya dilarutkan dalam 5 mL HCl 2N. Larutan residu ini kemudian dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Pada tabung pertama ditambahkan HCl encer sebagai blanko, pada tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, dan pada tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukkan adanya alkaloid.¹³ **Pengujian flavonoid** dilakukan dengan cara mengambil masing-masing larutan uji ekstrak kulit biji bakau sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dipanaskan selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan 0,1 g logam Mg dan 5 tetes HCl pekat. Jika larutan terbentuk warna kuning jingga hingga warna merah, maka positif mengandung flavonoid.¹⁴ **Pemeriksaan saponin** dengan cara, ekstrak ditambahkan 2 mL aquades kemudian dikocok kuat-kuat sampai terbentuk busa, selanjutnya ditetaskan HCl 10%. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.¹⁵ **Pengujian tanin** dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 2 mL larutan uji ekstrak kulit biji bakau dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 sebagai kontrol dan tabung 2 dipanaskan ± 5 menit, selanjutnya ditambahkan 3 tetes FeCl₃ 1%. Jika larutan uji terbentuk warna biru kehitaman atau coklat kehijauan maka positif mengandung tanin.¹⁴ **Pengujian kandungan steroid dan triterpenoid** dilakukan menggunakan reaksi Lieberman-Burchard. Larutan ekstrak kulit biji bakau sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam cawan porselin dan diuapkan di atas penangas air hingga diperoleh residu. Residu tersebut kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform dan ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Sebanyak 2 mL asam sulfat pekat ditambahkan secara perlahan melalui dinding tabung. Pembentukan cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.¹²

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Prosedur pengujian dilakukan sesuai Blois (1988) dengan modifikasi.¹⁶ Larutan induk ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau dibuat dengan konsentrasi 100 µg/mL dengan menimbang 5 mg ekstrak kental

dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian dilarutkan dengan metanol p.a. ad 50 mL, dikocok hingga homogen. Kemudian dibuat larutan standar dengan cara, larutan ekstrak etanol kulit biji bakau dibuat dengan konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6, 7 µg/mL, larutan buah bakau dibuat dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10 dan asam galat dengan konsentrasi 0,0; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 µg/mL. Sebanyak 5 mg serbuk DPPH dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 ml ditambahkan metanol p.a. ad 50 mL, dikocok hingga homogen, untuk membuat larutan baku induk DPPH konsentrasi 100 µg/mL. Larutan baku DPPH tersebut kemudian dipipet sebanyak 8 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 20 mL dan ditambahkan metanol p.a. sampai tanda batas, dikocok hingga homogen, untuk membuat larutan baku kerja DPPH konsentrasi 40 µg/mL. Selanjutnya, larutan baku DPPH ini dipipet sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam kuvet, diamati spektrum serapan pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Metanol p.a. digunakan sebagai larutan blanko. Kurva serapan yang dihasilkan dapat digunakan untuk menentukan panjang gelombang maksimum.

Larutan DPPH 40 µg/mL dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 2 mL metanol p.a., dikocok dan didiamkan selama 30 menit, selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet. Absorbansi diamati pada panjang gelombang maksimum 516 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Untuk pengukuran aktivitas perendaman radikal bebas, sebanyak 2 mL larutan DPPH 40 µg/mL dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan sebanyak 2 mL larutan uji dari setiap konsentrasi yang berbeda. Campuran tersebut dikocok hingga homogen dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Absorbansi masing-masing larutan dicatat dan digunakan untuk menghitung persentase perendaman serta nilai IC₅₀.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan menimbang 100 mg ekstrak kental kulit biji dan buah bakau, kemudian dimasukkan ke dalam labu tentukur dan dilarutkan dengan metanol p.a. hingga volume 1 mL, kemudian dikocok hingga homogen dengan konsentrasi 100.000 µg/mL. Selanjutnya, untuk pembuatan larutan standar, asam galat sebanyak 10 mg ditimbang dan dilarutkan dengan 10 mL aquadest.

Untuk pembuatan reagen FRAP, larutan natrium asetat 300 nM dibuat dengan menimbang 0,19 g natrium asetat dan dilarutkan dengan 50 mL aquadest, kemudian ditambahkan 1,6 mL asam asetat glasial dan diaduk dengan aquadest hingga volume total 100 mL, disimpan pada suhu 80°C. Larutan TPTZ disiapkan dengan cara melarutkan 0,031 g TPTZ dalam 8 mL HCl 40 mM, kemudian ditambahkan HCl 40 mM hingga volume total mencapai 10 mL. Larutan Fe (III) dibuat dengan melarutkan 0,0541 g FeCl₃.6H₂O dalam 5 mL aquadest dan kemudian diaduk hingga volume total mencapai 10 mL.

Untuk pengukuran aktivitas antioksidan, larutan sampel dan standar dipipet sebanyak 20 µL ke dalam 96-well plate, dimulai dari konsentrasi terbesar hingga terkecil. Setiap konsentrasi dimasukkan ke dalam tiga well (triplo). Kemudian, larutan FRAP sebanyak 280 µL dimasukkan ke dalam well yang berisi larutan sampel dan standar. Proses penambahan larutan dilakukan dalam suasana gelap, kemudian well plate ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang dalam keadaan gelap. Pembacaan dilakukan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 492 nm.¹⁷

Pengolahan dan Analisis Data.

Pengolahan dan analisis data dilakukan secara kuantitatif dengan menghitung aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau. Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil uji aktivitas antioksidan adalah IC₅₀ (*Inhibition Concentration* 50%) untuk metode DPPH dan RP₅₀ (*Reducing Power* 50) untuk metode FRAP. IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan sampel yang mampu mengurangi aktivitas DPPH sebesar 50%. Untuk menghitung nilai IC₅₀, data persentase perendaman digunakan dengan rumus berikut:

$$\% \text{ Inhibisi (peredaman)} = \frac{(\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel})}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%^{18}$$

Aktivitas antioksidan pada ekstrak kulit biji dan buah bakau dianalisa dengan menggunakan persamaan regresi linear. Pada metode DPPH, persentase perendaman pada setiap konsentrasi digunakan untuk membuat kurva regresi, menghasilkan persamaan $y = bx + a$, dimana konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/mL}$) sebagai sumbu x dan nilai persentase perendaman sebagai sumbu y, selanjutnya digunakan untuk menghitung IC_{50} . Nilai IC_{50} yang lebih kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Suatu senyawa dikategorikan mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai $\text{IC}_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, kuat jika IC_{50} antara 50-100 $\mu\text{g/mL}$, sedang jika IC_{50} antara 101-150 $\mu\text{g/mL}$, dan lemah jika IC_{50} antara 151-200 $\mu\text{g/mL}$.¹⁸

Pada metode FRAP, kurva regresi dibuat menggunakan *GraphPad* dengan syarat $R \geq 0,95$. Persen *reducing power* merupakan kemampuan sampel dalam mereduksi oksidan. RP_{50} merupakan konsentrasi sampel yang mampu mereduksi oksidan sebesar 50%. Nilai Top absorbansi standar diperoleh dari nilai Top pada *Best-Fit Values* menggunakan *GraphPad* yang dianggap nilainya setara dengan 100% *reducing power*. Adapun rumus persen *reducing power* sebagai berikut:

$$\% \text{ reducing power} = \frac{(\text{Absorbansi sampel} - \text{Absorbansi blanko})}{\text{Top absorbansi standar}} \times 100\%^{17}$$

Nilai Top absorbansi standar diperoleh dari nilai Top pada *Best-Fit Values* menggunakan *GraphPad* yang dianggap nilainya setara dengan 100% *reducing power*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau menunjukkan hasil positif terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan triterpenoid (**Tabel 1**). Identifikasi alkaloid menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan pembentukan endapan jingga akibat reaksi dengan pereaksi *Dragendorff*. Proses ini melibatkan pertukaran ligan, dimana nitrogen pada alkaloid dengan pasangan elektron bebas membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat, menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap.¹⁹ Identifikasi flavonoid menunjukkan warna jingga hingga merah akibat reaksi flavonoid dengan logam Mg, yang membentuk garam flavilium berwarna khas.²⁰

Saponin teridentifikasi melalui pembentukan busa, yang terjadi karena keberadaan gugus glikosil polar dan gugus steroid atau triterpenoid nonpolar. Senyawa ini bersifat aktif permukaan dan membentuk misel ketika dikocok dengan air, di mana gugus polar menghadap keluar dan gugus nonpolar menghadap ke dalam, sehingga tampak berbusa.¹⁹ Identifikasi tanin menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan perubahan warna menjadi biru kehitaman, mengindikasikan keberadaan tanin terkondensasi.²¹

Uji steroid dan triterpenoid menggunakan metode Liebermann-Burchard menunjukkan hasil yang khas, di mana reaksi triterpenoid menghasilkan warna merah-ungu kecoklatan, sedangkan steroid menghasilkan warna hijau-biru. Perbedaan warna ini disebabkan oleh variasi gugus pada atom C4 dalam struktur senyawa.¹⁹

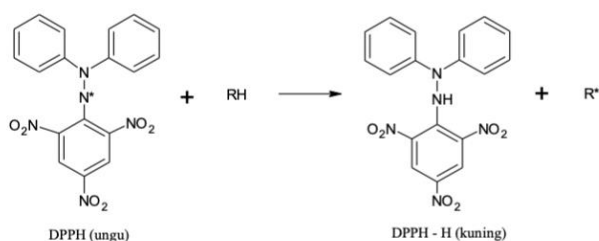
Tabel 1. Hasil Pengujian Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Biji dan Buah Bakau

Metabolit sekunder	Hasil		Keterangan	Reaksi Positif (Pustaka)
	Kulit Biji	Buah		
Alkaloid	Positif	Positif	Endapan jingga	Endapan kuning-jingga ¹³
Flavonoid	Positif	Positif	Warna kuning/jingga	Warna kuning, jingga atau merah ²²
Saponin	Positif	Positif	Busa stabil	Busa konsisten ²²
Tannin	Positif	Positif	Warna biru kehitaman	Warna biru kehitaman ²³
Triterpenoid/ Steroid	Positif mengandung triterpenoid	Positif mengandung triterpenoid	Warna kecoklatan mengandung triterpenoid. Warna kehijauan mengandung steroid	Cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid. Cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid ²⁴

Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari ungu menjadi kuning pada uji dengan metode DPPH. Prinsip kerja dari metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) yaitu mengukur aktivitas antioksidan secara kuantitatif dengan cara pengukuran aktivitas peredaman radikal DPPH oleh ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau sehingga diperoleh aktivitas peredaman radikal bebas, yang dinyatakan sebagai nilai IC_{50} (*Inhibitory concentration*).²⁵ *Inhibitory concentration* merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam radikal bebas DPPH sebanyak 50%, semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidan suatu sampel.²⁶

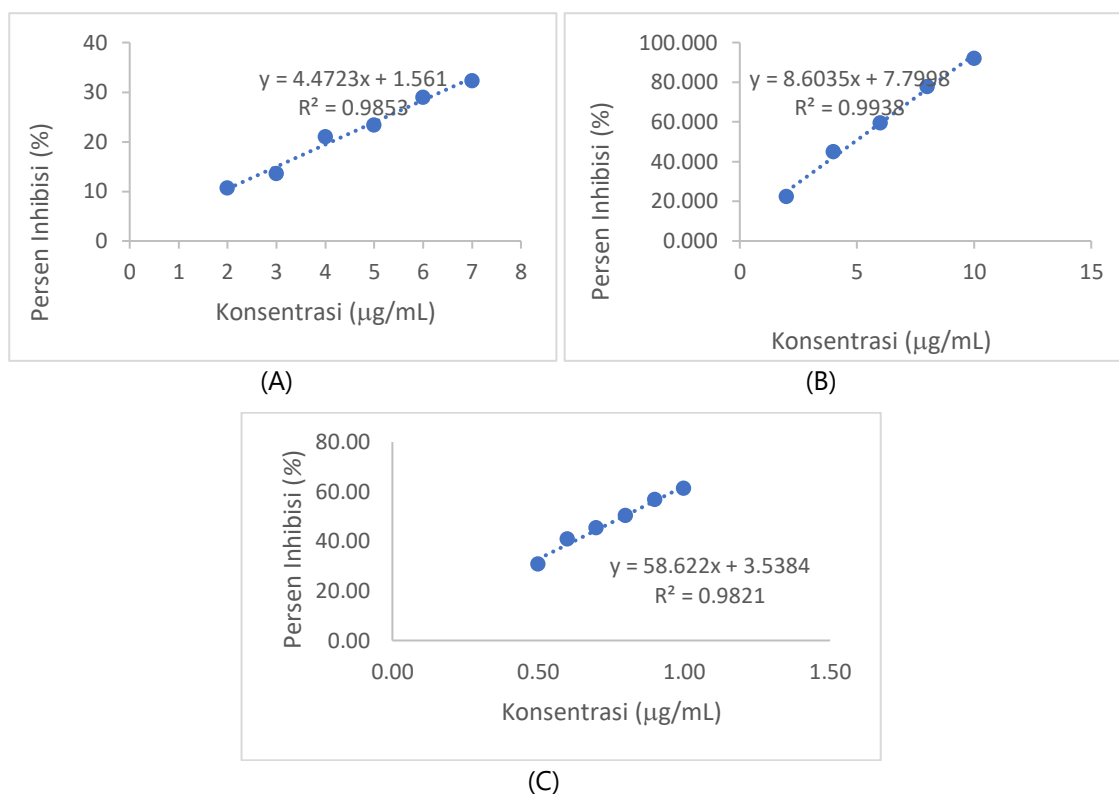
Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau dibuat beberapa variasi konsentrasi dan direaksikan dengan larutan DPPH selama 30 menit. Waktu efektif DPPH dan sampel uji bereaksi adalah 30 menit, hal ini dikarenakan lama inkubasi tersebut telah memasuki tahapan propagasi. Senyawa antioksidan pada ekstrak akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donor atom hidrogen sehingga membentuk senyawa (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH-H) dengan perubahan warna DPPH dari ungu menjadi berwarna kuning.²⁷ Mekanisme reaksi peredaman pada metode DPPH dapat dilihat pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Mekanisme Peredaman Metode DPPH²⁸

Perubahan warna pada DPPH disebabkan oleh keberadaan atom nitrogen dengan elektron tidak berpasangan, yang menginduksi transisi elektronik jenis $n \rightarrow \pi^*$. Dalam transisi ini, keadaan dasar memiliki sifat lebih polar dibandingkan keadaan tereksitasi. Perubahan intensitas warna tersebut mempengaruhi nilai absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH, dimana peningkatan konsentrasi sampel berbanding terbalik dengan nilai absorbansi yang dihasilkan.²⁸ Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang maksimum 516 nm. Hasil persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 2**. Absorbansi yang didapatkan digunakan dalam pembuatan kurva persamaan regresi linier dengan menghubungkan konsentrasi sampel uji dengan nilai % inhibisi sehingga didapatkan persamaan regresi linier dari ekstrak (**Gambar 2**).

Berdasarkan persamaan regresi linier diperoleh nilai IC_{50} ekstrak etanol kulit biji bakau, buah bakau dan asam galat sebesar 10,83 $\mu\text{g/mL}$, 4,91 $\mu\text{g/mL}$ dan 0,789 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} asam galat pada penelitian yang dilakukan oleh Armin (2011) menunjukkan IC_{50} sebesar 0,4 $\mu\text{g/mL}$.²⁹ Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol biji bakau (*X. granatum* J. Koenig) diperoleh nilai IC_{50} sebesar 7,94 ppm menggunakan metode DPPH.⁵ Penelitian yang dilakukan oleh Hidayati (2025) menunjukkan ekstrak metanol buah bakau (*X. granatum*) yang diekstraksi dengan metode maserasi memiliki nilai IC_{50} sebesar 236.46 ppm melalui pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.³⁰ Perbedaan nilai IC_{50} yang diperoleh dari penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Hidayati diduga akibat perbedaan pelarut dan metode ekstraksi. Semakin rendah nilai IC_{50} menunjukkan semakin tingginya aktivitas antioksidan yang dimiliki sampel.²⁶ Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas sebagai antioksidan jika nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ tergolong sangat kuat, jika nilai IC_{50} sebesar 50-100 $\mu\text{g/mL}$ tergolong kuat, jika IC_{50} bernilai 100-150 $\mu\text{g/mL}$ tergolong sedang, jika IC_{50} bernilai 150-200 $\mu\text{g/mL}$ tergolong lemah, dan jika IC_{50} bernilai $> 200 \mu\text{g/mL}$ tergolong sangat lemah.¹⁸ Berdasarkan hasil yang diperoleh, aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau dapat dikelompokkan dalam kategori sangat kuat dilihat dari nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$.



Gambar 2. Kurva Regresi Linier (A) Asam Galat, (B) Ekstrak Etanol Kulit Biji Bakau, (C) Ekstrak Etanol Buah Bakau

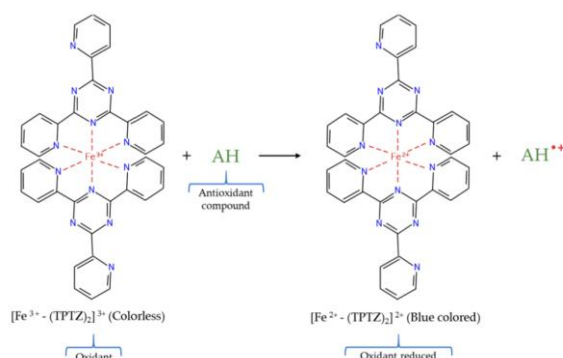
Tabel 2. Hasil Pengujian Antioksidan Ekstrak Kulit Biji dan Buah Bakau menggunakan Metode DPPH

No	Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	% Inhibisi ± SD
1	Asam Galat	0,00	0,00±0,00
		0,50	30,68±0,26
		0,60	40,85±0,13
		0,70	45,29±0,45
		0,80	50,28±0,09
		0,90	56,75±0,17
		1,00	61,18±0,29
		IC₅₀ = 0,793 µg/mL	
2	Ekstrak Kulit Biji Bakau	2	10,68 ± 0,56
		3	13,65 ± 0,28
		4	21,07 ± 0,19
		5	23,44 ± 0,51
		6	28,93 ± 0,49
		7	32,34 ± 0,08
		IC₅₀ = 10,83 µg/mL	
3	Ekstrak Buah Bakau	2	22,50±0,36
		4	45,01±0,61
		6	59,63±0,17
		8	77,84±0,23
		10	92,12±0,46
		IC₅₀ = 4,91 µg/mL	

Analisis statistik persen inhibisi (peredaman) dari ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan data terdistribusi normal dengan nilai $p > 0,05$. Hasil analisis *Independent T-Test* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) persen inhibisi antara ekstrak kulit biji bakau dengan ekstrak buah bakau dengan nilai p sebesar 0,001 dengan metode DPPH.

Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP pertama kali dilaporkan oleh Benzie dan Strain³¹, merupakan salah satu metode berbasis transfer elektron.³² Prinsip kerja dari metode FRAP yaitu mengukur kemampuan antioksidan dalam mereduksi ion ferri (Fe^{3+}) menjadi ion ferro (Fe^{2+}). Reagen FRAP yang digunakan dalam penelitian ini adalah kompleks ferri 2,4,6-tripiridil-s-triazin [$\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2$]³⁺, yaitu garam besi yang dihasilkan dari campuran 2,4,6-tripiridil-s-triazin (TPTZ) dan FeCl_3 dalam medium asam. Kompleks ferri tak berwarna [$\text{Fe}^{3+}-(\text{TPTZ})_2$]³⁺ dapat direduksi oleh senyawa antioksidan menjadi kompleks ferro berwarna biru tua [$\text{Fe}^{2+}-(\text{TPTZ})_2$]²⁺ (**Gambar 3**).³³ TPTZ merupakan suatu *colorants* dan Fe(III) merupakan radikal bebas. Proses pengujian dilakukan pada pH asam.³⁴ Pengujian antioksidan pada metode DPPH dan FRAP memiliki karakteristiknya masing-masing.^{10,35}



Gambar 3. Reaksi Reduksi pada Metode FRAP³³

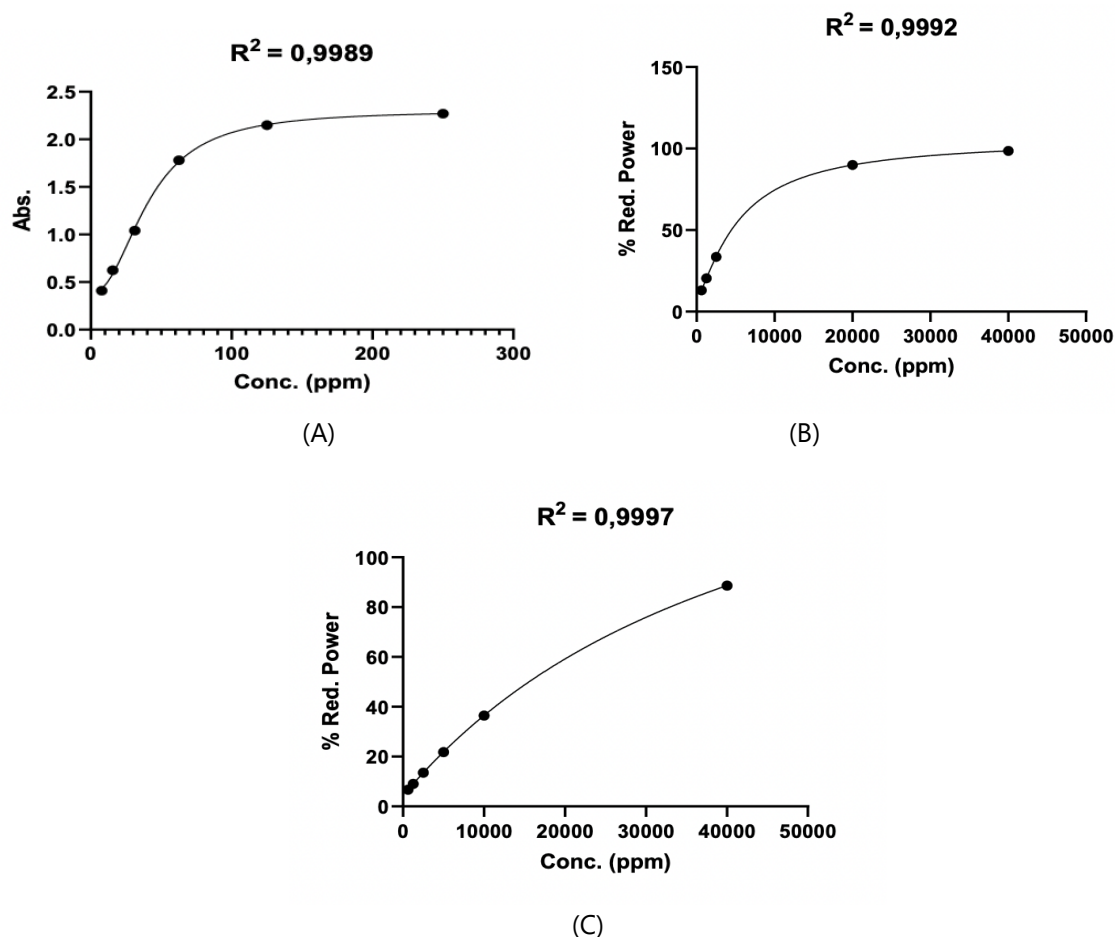
Ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan nilai *Reducing Power* 50 (RP_{50}) sebesar 4.455,63 $\mu\text{g/mL}$ dan 15.556,32 $\mu\text{g/mL}$ (secara berturut-turut) (**Tabel 3**), yang ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru pada uji FRAP. Standar yang digunakan dalam pengujian ini adalah asam galat, dimana nilai RP_{50} yang dihasilkan sebesar 34,04 $\mu\text{g/mL}$. Nilai *Reducing Power* merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan aktivitas antioksidan dalam mereduksi kompleks ferri (Fe^{3+}) dari 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) menjadi kompleks ferro (Fe^{2+}). Adapun kurva persen *reducing power* dari asam galat, ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau dapat dilihat pada **Gambar 4**.

Tabel 3. Hasil Pengujian Antioksidan Ekstrak Kulit Biji dan Buah Bakau menggunakan Metode FRAP

No	Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	% Reducing Power ± SD
1	Asam Galat	250,00	98,48 ± 0,38
		125,00	93,24 ± 0,89
		62,50	77,30 ± 1,11
		31,25	45,16 ± 0,20
		15,63	27,11 ± 0,04
		7,81	17,80 ± 0,14
			RP ₅₀ = 34,04 µg/mL
2	Ekstrak Kulit Biji Bakau	40.000	98,50 ± 1,26
		20.000	89,95 ± 1,31
		2.500	33,61 ± 1,85
		1.250	20,48 ± 0,67
		625	13,08 ± 0,16
			RP ₅₀ = 4.455,63 µg/mL
3	Ekstrak Buah Bakau	40.000	88,66 ± 0,78
		10.000	36,49 ± 0,96
		5.000	21,78 ± 0,56
		2.500	13,53 ± 0,04
		1.250	9,08 ± 0,25
		625	6,72 ± 0,17
			RP ₅₀ = 15.556,32 µg/mL

Analisis statistik persen *reducing power* dari ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p < 0,05$. Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) persen *reducing power* antara ekstrak kulit biji bakau dengan ekstrak buah bakau dengan nilai p sebesar 0,047 dengan metode FRAP.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kulit biji dan buah bakau dengan metode DPPH dan FRAP menunjukkan bahwa perbedaan metode uji dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak. Hal ini disebabkan oleh mekanisme reaksi setiap metode dalam meredam radikal bebas berbeda-beda, tergantung pada jenis radikal bebas, pelarut radikal bebas, aksesibilitas sterik dan pH. Metode DPPH dan FRAP memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing.³³



Gambar 4. Kurva Persen *Reducing Power* (A) Asam Galat, (B) Ekstrak Etanol Kulit Biji Bakau, (C) Ekstrak Etanol Buah Bakau

Potensi Metabolit Sekunder Ekstrak sebagai Antioksidan

Potensi aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau disebabkan oleh adanya metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak. Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit biji dan buah bakau menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder diantaranya senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid. Hal ini diperkuat oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh Ansyori (2024) terkait uji aktivitas antioksidan pada ekstrak biji buah nyirih yang mana pada ekstrak tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder yakni flavonoid, alkaloid, tanin, saponin yang menyebabkan ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat dengan nilai IC_{50} yang didapatkan yaitu sebesar $8,27 \mu\text{g/mL}$.³⁶

Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak bakau merupakan suatu senyawa polifenol yang terdiri dari 15 atom karbon dan memiliki mekanisme kerja sebagai antioksidan dengan menstimulasi enzim superoksida

dismutase (SOD) dan catalase (CAT) melalui peningkatan sintesis Nrf2 sehingga mengakibatkan berkurangnya jumlah radikal bebas. Mekanisme kerja lain dari flavonoid yaitu dengan menyumbangkan atom hidrogen yang berasal dari cincin aromatiknya ke radikal bebas sehingga mengurangi radikal bebas yang memiliki sifat toksik, kemudian menghasilkan radikal flavonoid yang lebih stabil dan tidak toksik. Potensi antioksidan ini terjadi karena senyawa flavonoid memiliki stuktur stabil yang memungkinkan untuk mengurangi radikal bebas yang sangat reaktif menjadi radikal aroksil yang kurang reaktif.³⁷

Selain mengandung flavonoid, ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau juga mengandung alkaloid yang merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang mengandung atom nitrogen. Senyawa alkaloid pada ekstrak bakau memiliki aktivitas antioksidan dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein dari enzim NADPH-oksidadase (NOX), menurunkan ekspresi p47phox atau subunit NADPH-oksidadase non-enzimatik lainnya dan meningkatkan sintesis Nrf2 yang menyebabkan terjadinya peningkatan ekspresi dari dismutase superoksida mitokondria (SOD2) dan katalase sehingga terjadi penurunan stres oksidatif.³⁸

Tanin termasuk golongan senyawa polifenol yang memiliki struktur senyawa stabil yang terdiri dari cincin benzena (C₆) yang berikatan dengan gugus hidroksil (-OH). Senyawa tanin pada ekstrak bakau memiliki mekanisme kerja dengan menyumbangkan atom hidrogennya ke radikal bebas sehingga terjadi reaksi kimia yang menyebabkan senyawa yang semula radikal berubah menjadi non radikal.³⁹

Saponin yang terkandung dalam ekstrak bakau dapat mengurangi radikal superoksida melalui pembentukan intermediat hidropersoksida sehingga dapat mencegah kerusakan molekuler akibat adanya radikal bebas.⁴⁰ Menurut penelitian Chen et al. (2014) senyawa saponin memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan peningkatan kadar SOD dan T-AOC yang menyebabkan terhambatnya pembentukan lipid peroksida pada tikus dengan kerusakan hati setelah pemberian ekstrak *radix trichosanthis* yang mengandung senyawa saponin.⁴¹

Senyawa triterpenoid dapat menyumbangkan atom hidrogen (H) sehingga mengubah radikal bebas menjadi non reaktif. Senyawa triterpenoid mampu menghambat reaksi ROS, mereduksi ion logam dan memodulasi fosforilasi protein yang dihubungkan dengan penghambatan aktivitas enzim dan penghambatan peroksidasi lipid.³⁹

Keuntungan dan Kerugian Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan FRAP

Metode DPPH dan FRAP memiliki keunggulan dalam pengujian aktivitas antioksidan, seperti kesederhanaan prosedur, waktu analisis yang cepat, dan tidak memerlukan peralatan khusus. Namun, metode DPPH memiliki keterbatasan karena radikal DPPH hanya larut dalam pelarut organik, khususnya alkohol, sehingga kurang sesuai untuk mengukur antioksidan hidrofilik. Selain itu, radikal DPPH tidak menyerupai radikal peroksil yang berperan dalam peroksidasi lipid pada sistem biologis, sehingga kurang representatif untuk sampel tertentu. Penggunaannya pada sampel emulsi juga terbatas karena hasil pengujian dapat dipengaruhi oleh distribusi antioksidan dalam berbagai fase. Kendala lain pada metode ini adalah kemungkinan presipitasi protein dalam larutan alkohol, yang dapat mengganggu hasil pengujian.^{10,33,35}

Metode FRAP juga memiliki beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan. Senyawa dengan potensial redoks lebih rendah dari Fe³⁺/Fe²⁺ dapat berkontribusi pada nilai FRAP, sehingga menghasilkan kapasitas antioksidan yang lebih tinggi dari sebenarnya. Metode ini juga tidak dapat mendeteksi antioksidan dengan gugus -SH seperti glutathion serta senyawa antioksidan yang bekerja melalui transfer hidrogen, seperti karotenoid dan beberapa protein. Uji FRAP membutuhkan pH 3,6 untuk menjaga kelarutan kation besi, yang dapat menyebabkan presipitasi protein. Keterbatasan lainnya adalah ketidakmampuannya dalam mengukur kapasitas antioksidan terhadap berbagai jenis radikal bebas karena tidak menggunakan radikal bebas dalam proses pengujiannya. Selain itu, Fe²⁺ dalam metode ini bersifat pro-oksidan dan dapat menghasilkan radikal bebas tambahan seperti OH• yang memicu reaksi oksidasi lebih lanjut. Interferensi juga dapat terjadi akibat adanya zat yang menyerap pada panjang gelombang pengujian, sehingga mempengaruhi akurasi pengukuran absorbansi.^{10,33,35}

SIMPULAN

Ekstrak etanol kulit biji dan buah bakau (*X. granatum*) menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan dengan nilai IC₅₀ sebesar 10,83 µg/mL dan 4,91 µg/mL serta nilai RP₅₀ sebesar 4.455,63 µg/mL dan 15.556,32 µg/mL, hasil uji dari metode DPPH dan FRAP. Penggunaan kedua metode ini memberikan gambaran komprehensif tentang potensi antioksidan ekstrak, yang dipengaruhi oleh jenis radikal bebas, pelarut, dan kondisi pengujian. Hasil ini membuka peluang untuk pengembangan ekstrak bakau sebagai sumber antioksidan alami dalam produk kesehatan dan kosmetik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada Fakultas Farmasi Universitas Mahasaraswati Denpasar yang telah mendukung dan mendanai penelitian serta penulisan karya ilmiah ini.

KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak ada konflik kepentingan antar penulis dalam naskah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Arnanda QP, Nuwarda RF. Penggunaan Radiofarmaka Teknisium-99M dari Senyawa Glutation dan Senyawa Flavonoid Sebagai Deteksi Dini Radikal Bebas Pemicu Kanker. *Farmaka*. 2019;17(2):236-243.
2. Linda O, Rahayu LS. Prevensi Awal dan Lanjutan Penyakit Degeneratif untuk Usia Dewasa di Masa Pandemi COVID-19. *Jurnal Arsip Pengabdian Masyarakat*. 2021;2(1):107-115.
3. Amanda KA, Mustofa S, Nasution SH. Review Efek Antioksidan pada Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack). *Majority*. 2019;8(2):265-272.
4. Henny, Diba F, Anwari S. Tumbuhan Mangrove yang Berpotensi sebagai Obat di Kawasan PT. Kandelial Alam Kecamatan Kubu Kabupaten Kubu Raya. *Jurnal Hutan Lestari*. 2017;5(4):1100-1110.
5. Wardani IGAA, Jawi IM, Senapathi TGA, et al. The Effect of *Xylocarpus granatum* J. Koenig Seed Extract Cream on the Number of Fibroblast and Re-Epithelialization in IIA Degree Burn Wound Healing. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2022;33(4):653-665. doi:https://doi.org/10.22146/ijp.3461
6. Yin ZZ, Khine WW, Thu HM. Investigation on Phytochemical Constituents and Antimicrobial Activity of *Xylocarpus granatum* J. Koenig. *Myanmar Korea Conference Research Journal*. 2018;3(3):1180-1186.
7. Noviarni I, Batubara I, Putri SP. Antiglycation and Antioxidant Activity from Methanol Extract and Fraction of *Xylocarpus granatum* Stem. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 2020;23(1):21-27. doi:10.14710/jksa.23.1.21-27
8. Dey D, Quispe C, Hossain R, et al. Ethnomedicinal Use, Phytochemistry, and Pharmacology of *Xylocarpus granatum* J. Koenig. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2021;2021:1-16. doi:10.1155/2021/8922196
9. Ramadani N, Andayani R, Marliza H. Penentuan Kadar Fenolat Total Ekstrak Kulit Buah Nyireh (*Xylocarpus Granatum* J.Koenig) Dengan Spektrofotometri Uv-Visibel. *Katalisator*. 2020;5(2):106-111.
10. Theafelicia Z, Wulan SN. Perbandingan Berbagai Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan (DPPH, ABTS, dan FRAP) pada teh Hitam (*Camellia sinensis*). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2023;1(24):35.
11. Sholihah M, Ahmad U, Budiastira IW. Application of Ultrasonic Wave to Increase Extraction Yield and Effectiveness of Antioxidant from *Mangosteen* Rind. *Jurnal Keteknik Pertanian*. 2017;05(2):161-168. doi:10.19028/jtep.05.2.161-168
12. Puspitasari L, Swastini D a., Arisanti CI a. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2013;2(3):1-5.
13. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Materia Medika Indonesia Jilid V*. Departemen Kesehatan RI; 1989.
14. Ergina, Nuryanti S, Pursitasari ID. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave Angustifolia*) yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air dan Etanol. *J Akad Kim*. 2014;3(3):165-172.
15. Hendrawan, Zuraida I, Pamungkas BF. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol *Xylocarpus granatum* dari Pesisir Muara Badak. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. 2015;20(2):15-22.
16. Blois M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-1200.

17. Tang J, Dunshea FR, Suleria HAR. LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds from medicinal plants (Hops and Juniper Berries) and their antioxidant activity. *Foods*. 2020;9(1):1-25. doi:10.3390/foods9010007
18. Hernady MJ, Yani L. Penelusuran Pustaka Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Murbei (*Morus alba* L.) dengan Metode DPPH. *Bandung Conference Series: Pharmacy*. 2024;4(1):78-84. doi:10.29313/bcsp.v4i1.11929
19. Habibi AI, Firmansyah RR, Setyawati SM. Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksam Korteks Batang Salam (*Syzygium polyanthum*). *Indonesian Journal of Chemical Science*. 2018;7(1):1.
20. Meigaria KM, Mudianta IW, Martiningsih NW. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Aseton Daun Kelor (*Moringa oleifera*). *Jurnal Wahana Matematika dan Sains*. 2016;10(2):1.
21. Yanti S, Vera Y. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*). *Indonesian Health Scientific Journal*. 2019;4(2):41-46.
22. Agada R, Usman WA, Shehu S, Thagariki D. In vitro and in vivo inhibitory effects of *Carica papaya* seed on α -amylase and α -glucosidase enzymes. *Heliyon*. 2020;6(3):e03618. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e03618
23. Ergina, Nuryanti S, Pursitasari ID. Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder Pada Daun Palado (*Agave angustifolia*) Yang Diekstraksi Dengan Pelarut Air Dan Etanol. *J Akad Kim*. 2014;3(3):165-172.
24. Puspitasari L, Swastini DA., Arisanti CIA. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 95% Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Garuda Portal*. 2013;961:5.
25. Paat SFA, Antasionasti I. Uji Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Kulit Buah Lemon Suanggi (*Citrus lemon* L.) Dengan Metode Dpph (1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl). 2022;11:1315-1320.
26. Setiawan F, Yunita O, Kurniawan A. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*. 2018;2(2):82-89.
27. Widyasanti A, Rohdiana D, Ekatama N. *Antioxidant Activities of White Tea Extract (Camellia Sinensis) Using DPPH (2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) Method*. Vol 1.; 2016. <http://ejournal.upi.edu/index.php>
28. Petrina R, Alimuddin AH, Harlia. Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Kulit Biji Pinang Sirih (*Areca catechu* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*. 2017;6(2):70-77.
29. Armin F, Dewi YY, Mahyuddin. Penentuan Kadar Senyawa Fenolat dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Buah Terung Belanda (*Cyphomandra Betacea* (Cav.) Sendtn) secara Spektrofotometri Visibel. *Jurnal Farmasi Higea*. 2011;3(1):1-15.
30. Hidayati JR, Fitri M, Hasibuan BZ, et al. Antioxidant Activity and Bioactive Coumpounds Extract of *Xylocarpus granatum* Fruit from Pengudang Village, Riau Island. *J Mar Biotechnol Immunol*. 2025;3(1):3026-1457.
31. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-76.
32. Gulcin I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol*. 2020;94:651-715.
33. Echegaray N, Pateiro M, Muneke PES, et al. Measurement of antioxidant capacity of meat and meat products: Methods and applications. *Molecules*. 2021;26(13):1-21. doi:10.3390/molecules26133880
34. Indriyah SIN, Permatasari DAI, Pratama KJ. Penetapan Kadar Fenolik Serta Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Batang Bajakah Kalalawit (*Uncaria Gambir* Roxb) Dengan Metode FRAP. *Jurnal Kesehatan Tradisional*. 2023;1(2):147-158. doi:10.47861/usd.v1i2..347
35. Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins. *Int J Biol Macromol*. 2023;233:1-9. doi:10.1016/j.jbiomac.2023.123470
36. Ansyori AK, Tamrin M, Sa'adah H. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Biji Buah Nyirih (*Xylocarpus granatum*) Dengan Metode Dpph Secara Spektrofotometri UV-Vis. 2024;6(2):233-248.
37. Rodriguez PH, Baquero LP, Larrota HR. *Flavonoids*. Elsevier Inc.; 2019. doi:10.1016/B978-0-12-814774-0.00014-1
38. Macaakova K, Afonso R, Saso L, Mladenka P. The influence of alkaloids on oxidative stress and related signaling pathways. *Free Radic Biol Med*. 2019;134(January):429-444. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.026
39. Vrianty D, Laila RQ, Widowati W, et al. Comparison of Antioxidant and Anti-Tyrosinase Activities of Pineapple (*Ananas comosus*) Core Extract and Luteolin Compound Perbandingan Aktivitas Antioksidan

- dan Anti-Tirosinase pada Ekstrak Bonggol Nanas (*Ananas comosus*) dan Senyawa Luteolin 1 2 2 1 1 1. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 2019;30(4):240-246.
40. Kumaradewi DAP, Subaidah WA, Andayani Y, Al-Mokaram A. Phytochemical Screening and Activity Test of Antioxidant Ethanol Extract of Buni Leaves (*Antidesma bunius* L. Spreng) Using DPPH Method. *Jurnal Penelitian Pendidikan IPA*. 2021;7(2):275. doi:10.29303/jppipa.v7i2.675
 41. Chen Y, Miao Y, Huang L, et al. Antioxidant activities of saponins extracted from Radix Trichosanthis: An in vivo and in vitro evaluation. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):1-8. doi:10.1186/1472-6882-14-86

Effectiveness of Brochures in Improving the Knowledge of PKK Mothers in South Danguran on Self-Medication Drug Use and Disposal

Efektivitas Media Brosur dalam Meningkatkan Pengetahuan Ibu PKK di Danguran Selatan tentang Penggunaan dan Pembuangan Obat Swamedikasi

Ismah Rahmadhani¹, Nur Atikah^{1*}, Dwi Subarti¹

¹Pharmacy Department,
Poltekkes Kemenkes Surakarta,
Jln. Ksatrian No. 02, Danguran,
Klaten Selatan, Klaten, Indonesia

Submitted: 15-08-2024

Reviewed: 30-12-2024

Accepted: 21-04-2025

Keywords: brochures,
disposal, medication use,
knowledge, self-medication.

Kata Kunci: brosur,
pembuangan, pengetahuan,
penggunaan obat,
swamedikasi.

Correspondence:

Nur Atikah

ika.nuratikah01@gmail.com



Lisensi: CC BY-NC-ND 4.0

Copyright ©2025 Authors

Abstract

Limited health knowledge increases the risk of improper use and disposal of self-medication drugs. Educational interventions, such as brochures, are expected to enhance public awareness. This study aimed to evaluate the effectiveness of brochures in improving the knowledge of PKK (Family Empowerment and Welfare) mothers in RT 01 RW 10, South Danguran, regarding the appropriate use and disposal of self-medication. A pre-experimental one-group pre-test-post-test design was employed, involving 37 purposively selected respondents who met the inclusion and exclusion criteria. Univariate analysis was used to describe respondent characteristics, knowledge levels, and survey responses, while bivariate analysis was performed using the Wilcoxon signed-rank test. The results showed that most respondents were aged 46–65 years (64.9%), had a high school education (56.8%), and worked as housewives or labourers (67.6%). Before the intervention, 51.4% of respondents had a moderate level of knowledge, whereas after the intervention, 81% demonstrated a good level of knowledge. The Wilcoxon signed-rank test indicated a significant improvement, with a p-value of <0.001 ($p < 0.05$). In conclusion, brochures were effective in increasing knowledge regarding the use and disposal of self-medication drugs among PKK mothers in RT 01 RW 10, South Danguran.

Abstrak

Pengetahuan kesehatan yang terbatas meningkatkan risiko penggunaan dan pembuangan obat swamedikasi yang tidak tepat. Intervensi edukatif, seperti penggunaan brosur, diharapkan dapat meningkatkan kesadaran masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas media brosur dalam meningkatkan pengetahuan ibu-ibu PKK (Pemberdayaan dan Kesejahteraan Keluarga) di RT 01 RW 10, Danguran Selatan, mengenai penggunaan dan pembuangan obat swamedikasi yang benar. Penelitian ini menggunakan desain pra-eksperimental dengan pendekatan *one-group pre-test-post-test*, melibatkan 37 responden yang dipilih secara purposive sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Analisis univariat dilakukan untuk menggambarkan karakteristik responden, tingkat pengetahuan, dan hasil survei, sedangkan analisis bivariat menggunakan uji Wilcoxon signed-rank. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar responden berusia 46–65 tahun (64,9%), berpendidikan SMA (56,8%), dan bekerja sebagai ibu rumah tangga atau buruh (67,6%). Sebelum intervensi, sebanyak 51,4% responden memiliki tingkat pengetahuan sedang, sedangkan setelah intervensi, 81% menunjukkan tingkat pengetahuan baik. Uji Wilcoxon signed-rank menunjukkan peningkatan yang signifikan dengan nilai $p < 0,001$ ($p < 0,05$). Kesimpulannya, brosur efektif dalam meningkatkan pengetahuan tentang penggunaan dan pembuangan obat swamedikasi pada ibu-ibu PKK di RT 01 RW 10, Danguran Selatan.

How to cite: (citation style AMA 11th Ed.)

Rahmadhani, I, Atikah, N, Subarti, D. Effectiveness of Brochures in Improving the Knowledge of PKK Mothers in South Danguran on Self-Medication Drug Use and Disposal. *J. Ilm. Medicam.*, 2025;11(1), 99-107, DOI: [10.36733/medicamento.v11i1.9757](https://doi.org/10.36733/medicamento.v11i1.9757)

INTRODUCTION

The use of printed educational materials, particularly brochures, remains a widely adopted strategy in public health communication to enhance knowledge and awareness regarding health behaviors, including the responsible use and disposal of self-medication drugs.¹ A systematic review examines various interventions aimed at reducing inappropriate demand for medical resources, including medications. It highlights the effectiveness of educational materials, such as brochures, in changing health behaviors related to self-medication and drug disposal.²

Self-medication is a prevalent practice globally, often influenced by ease of access to over-the-counter (OTC) medications, prior experiences, and socio-economic factors. Conducted in Uttar Pradesh, India, this study found a self-medication prevalence of 66.4% among 440 adults. Common reasons included convenience (46%) and lack of time (35.3%). Factors such as urban residence, female gender, skilled occupation, and higher income were significantly associated with self-medication practices.³ The tendency toward self-medication among Indonesian people remains relatively high.⁴ Self-medication poses significant risks, particularly in developing countries like Indonesia. In countries with populations that have limited health knowledge, the likelihood of improper drug use increases.⁵ According to Sari's (2020) research, the respondents' knowledge of drug use, as measured by the average correct response rate, remained below 50%.⁶ Consequently, it was classified as 'insufficient,' with a score of less than 56%.⁷ Insufficient knowledge of proper drug use can lead to suboptimal therapeutic effects and potentially harmful drug interactions, especially when combined with other medications or food.⁸

Furthermore, improper drug use behavior and disposal of medications can lead to serious public health and environmental concerns, such as drug resistance, accidental poisoning, and pharmaceutical pollution. According to the Ministry of Environment and Forestry data, 2022, national waste accumulation exceeded 35 million tons. Household waste accounted for the largest percentage in Indonesia, at 31,66%. Pharmaceutical waste is a common component of household waste.⁹ A study by Savira et al.¹⁰ revealed that 57.9% of respondents failed to dispose of medications properly, often discarding them directly into household trash. This improper disposal contributes to significant environmental harm, contaminating groundwater, rivers, lakes, and water supplies. Improper drug disposal is a widespread problem, as most individuals are unaware of appropriate disposal methods.⁵ The Study conducted in Bandung, Indonesia, found that 95% of households stored unused medicines, with 82.1% disposing of them in household garbage. Notably, 79.5% of respondents had never received information about proper medication disposal practices, and over half were unaware of the environmental and health impacts of improper disposal.¹¹

Recent studies have highlighted the effectiveness of brochures as an accessible, low-cost, and scalable medium for public education. Informational brochures are an effective strategy for increasing drug-related awareness, significantly enhancing individuals' knowledge levels.¹² Brochures are especially useful in conveying focused, easy-to-understand messages supported by visual elements that can aid in knowledge retention and behavioral change. Several intervention-based studies have demonstrated that well-designed brochures can significantly improve knowledge levels in diverse populations when used as part of health promotion strategies. Research by Rasdianah et al.¹³ demonstrated a change in respondents' knowledge levels after receiving education through brochures, with the percentage of those in the 'good' category increasing from 4% to 76%.

Given these concerns, it is essential to provide education on proper medication use and disposal to enhance public knowledge through brochures for PKK (Family Empowerment and Welfare) mothers in RT 01 RW 10, South Danguran. Mothers play a crucial role in managing household health and resource quality, aligning with the PKK movement's objectives of empowering families to achieve well-being, self-sufficiency, and awareness of environmental and legal aspects. This study focused on PKK mothers as key facilitators of information and agents of change within their families and communities.¹⁴

Moreover, the integration of pre-test and post-test assessments in intervention research has become a standard method for evaluating the impact of educational tools, including brochures. This approach allows

for measurable outcomes and helps determine changes in knowledge levels before and after the dissemination of information. Despite their benefits, the effectiveness of brochures may vary depending on factors such as literacy level, cultural context, design quality, and the clarity of the message.^{15,16} For that reason, ongoing research is needed to explore how these materials can be optimized and integrated with other media forms to enhance their reach and impact.

In the context of self-medication, there is a growing recognition of the need to educate the public not only on the proper use of drugs but also on environmentally responsible disposal practices. As public awareness campaigns evolve, brochures continue to serve as a valuable component in multi-modal strategies aimed at fostering safe and informed medication behaviors.¹⁷ Therefore, it is important to conduct this research on the effectiveness of brochure media on the level of knowledge regarding the use and disposal of self-medication drugs among PKK mothers in South Danguran.

RESEARCH METHOD

This study employed a quantitative research approach with a pre-experimental design, utilizing a one-group pre-test post-test framework. Data were collected through a non-probability sampling method, specifically purposive sampling, in which participants were selected from a predetermined population based on specific criteria within a certain age range. The study subjects were PKK mothers in RT 01 RW 10, South Danguran. The research population consisted of 80 individuals. The sample size was determined using the formula for paired categorical comparative analysis (matched/crossed-over two groups) as follows:

$$n = \frac{Z\alpha + Z\beta^2 \pi}{(P_1 - P_2)^2}$$

Description:

n = Sample size

Z α = Standard deviation for alpha – Type I error, set at 5%, so Z α = 1.96

Z β = Standard deviation for beta – Type II error, set at 20%, so Z β = 0.84

P₁ = Proportion of the first group, obtained from Lestari's study,¹³ equal to 89% (P₁ = 0.89)

P₂ = Proportion of the second group, obtained from Lestari's study,¹³ equal to 56% (P₂ = 0.56)

Q₁ = 1 - P₁ = 1 - 0.89 = 0.11

Q₂ = 1 - P₂ = 1 - 0.56 = 0.44

π = Magnitude of discordance (disagreement)

$\pi = (P_1Q_2) + (P_2Q_1)$

$\pi = (0.89 \times 0.44) + (0.56 \times 0.11)$

$\pi = 0.4 + 0.06$

$\pi = 0.46$

Thus, the sample size calculation for this study is as follows:

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 0.46}{(0.89 - 0.56)^2}$$

$$n = \frac{(2.8)^2 0.46}{(0.33)^2}$$

$$n = \frac{7.84 \times 0.46}{0.11}$$

$$n = \frac{3.6}{0.11}$$

$$n = 32.72 \approx 33 \text{ responden}$$

This study adjusts the required sample size by adding a 10% buffer to accommodate potential dropouts. This additional sample is utilised only if respondents fail to complete the study or withdraw midway due to illness or other factors. The formula for calculating dropouts is as follows:

$$n' = \frac{n}{(1 - f)}$$

Description:

n' = Sample size after adjustment

n = Number of samples calculated based on the previous estimation

f = Predicted dropout percentage of 10% (0.1)

Thus, the calculation for the total sample size to be studied is as follows:

$$n' = \frac{33}{(1 - 0,1)}$$

$$n' = \frac{33}{0,9}$$

$$n' = 36,67 \approx 37 \text{ respondents}$$

This study included 37 respondents who met the specified inclusion and exclusion criteria. The inclusion criteria encompassed respondents aged 17 to 65 years, members of the PKK mothers' group in RT 01 RW 10, South Danguran, and those who had practiced self-medication at home within the past six months. The exclusion criterion was PKK mothers who declined to participate.

The research instrument was a questionnaire assessing self-medication practices and drug disposal methods. Content validity was ensured by developing the questionnaire based on theory and various previous studies, including a survey by Hartika¹⁸ regarding The Level of Students' Knowledge about DAGUSIBU Medications at SMK Multimedia Tumpang, Malang Regency and research by Rasdianah et al.¹³ about education on proper medication use through brochure media for the community. Face validity was ensured by formulating questionnaire statements that were clear, easily understood, and relevant to the research topic. A clinical pharmacist then evaluated the instrument to assess its visual validity and appropriateness for measuring knowledge levels regarding medication use and disposal. Additionally, a validity test was conducted on 30 respondents with characteristics similar to the research participants, specifically PKK mothers in RT 07/RW 02, Kroya Village, Cilacap.

The validity of the questionnaire was assessed using the Pearson Product-Moment correlation. A questionnaire item was considered valid if the calculated r-value exceeded the r-table value (0.361) at a 5% significance level with 30 respondents or if the p-value was ≤ 0.05 . Reliability was evaluated using Cronbach's Alpha, where a questionnaire was deemed reliable if the Cronbach's Alpha coefficient was at least 0.60 and highly reliable if it approached.¹⁹

The results of the computed r value for the validity test in this study ranged from (-0.039) to 0.708, and the p-value for the validity test ranged from <0.001 to 0.839. Nine of the 40 items were deemed invalid, while 31 were determined to be valid. The valid items adequately represented all the indicators, so the invalid questions were discarded or removed. Additionally, the reliability test results indicated that Cronbach's Alpha value was 0.886, which is considered highly reliable.¹⁹

Data analysis for this study was conducted using a statistical software package with two types of data analysis: univariate analysis to identify characteristics such as age, education, occupation, level of knowledge, and questionnaire scores of the respondents and bivariate analysis to assess the effectiveness of brochures in improving respondents' knowledge about self-medication practices and drug disposal. Knowledge level categorization was determined by calculating the percentage of correct answers. The percentage scores were then classified into three categories: good (76–100%), moderate (56–75%), and insufficient ($<56\%$).

The Wilcoxon Signed-Rank Test, a non-parametric statistical test, was used in this analysis to compare two related samples or repeated measurements on the same subjects (paired samples), specifically the pre-test and post-test knowledge levels of PKK mothers in South Danguran Village. This test was selected because the research data were nominal, consisting of categorical variables that could be classified and counted based on frequency, such as knowledge levels. Therefore, the Wilcoxon Signed-Rank Test was deemed appropriate for this study. The decision criterion for this test was as follows: if the p-value was ≤ 0.05 , the brochures were considered effective in enhancing knowledge. Conversely, if the p-value was > 0.05 , the brochures were deemed ineffective in improving knowledge about the use and disposal of self-medication drugs among PKK mothers in South Danguran. This study was ethically reviewed and approved by the Health Research Ethics Committee of RSUD Dr. Moewardi under approval number 424/II/HREC/2024 on 16 February 2024.

RESULT AND DISCUSSION

The study on the effectiveness of brochures in improving knowledge about self-medication drug use and disposal among PKK mothers in South Danguran used a questionnaire as its instrument. This study involved 37 respondents who met the inclusion and exclusion criteria. After agreeing to participate, the respondents first completed a pre-test questionnaire. They then received education through brochures and reviewed the content of the brochures. Subsequently, the respondents filled out a post-test questionnaire. The purpose of distributing the brochures was to evaluate their effectiveness in enhancing respondents' knowledge about self-medication drug use and disposal. This research was conducted from September 2023 to April 2024.

This study examined the characteristics of PKK mothers in RT 01 RW 10, South Danguran, focusing on age, education, and occupation. As presented in **Table 1**, most respondents were elderly (46–65 years old), comprising 24 individuals or 64.9% of the total sample. This finding was consistent with Puspasari et al.,²⁰ who investigated the relationship between knowledge levels and community attitudes towards DAGUSIBU oral medication, where the elderly age group was also the largest, accounting for 52% of the sample.

Table 1. Age Characteristics

Age	Total	
	n	%
Teenagers (17-25 years)	0	0
Adult (26-45 years)	13	35,1
Elderly (46-65 years)	24	64,9
Total	37	100

Source: Primary Data, 2024

Older people generally acquire greater knowledge as they gain wisdom and access to a wider range of information and experiences.²¹ Similarly, Suwaryo dan Yuwono²² argues that age influences cognitive ability and intellectual development, contributing to an improved understanding.

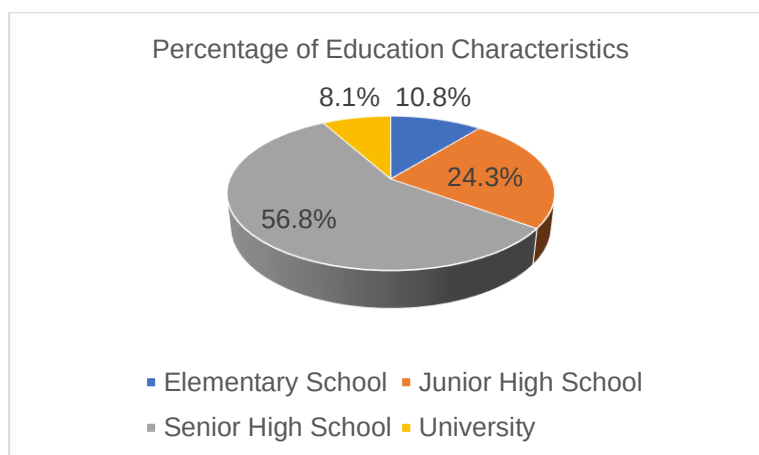


Figure 1. Percentage of Education Characteristics
(Source: Primary Data, 2024)

As shown in **Figure 1**, the highest proportion of respondents in terms of educational background had completed high school, totaling 21 individuals (56.8%). This finding aligns with the study by Agustin,²³ which reported that most respondents in research on community knowledge of DAGUSIBU oral medication had a high school education (63%).

This study aligns with the research by Sulistyowati et al.,²¹ who found that higher education levels positively influence an individual's knowledge and comprehension across various subjects. Additionally, Souhuwat et al.²⁴ and Mutmainah et al.²⁵ further asserted that education affects the learning process; as a person's level of education increases, they become more adept at absorbing information.

The most common occupation among respondents in this study falls under the 'other' category (housewives and laborers), comprising 25 respondents (67,6%) (**Table 2**). This finding was consistent with Irsila's²⁶ research, which found that the dominant occupational characteristic among respondents in a study on DAGUSIBU medication knowledge was housewives, totaling 42 respondents (46%). Similarly, Ra'is et al.²⁷ reported that in their study on the relationship between knowledge levels and self-medication behavior with analgesics, the predominant occupational category was laborers, with 42 respondents (42%).

Table 2. Occupation Characteristics

Occupation	Total	
	n	%
Farmer	0	0
Civil servant	1	2,7
Self-employed	4	10,8
Business	7	18,9
Others (housewives and labourers)	25	67,6
Total	37	100

Source: Primary Data, 2024

Individuals whose work involves more cognitive tasks than physical labor are likely to experience improvements in intellectual performance and memory retention.²² In the workplace, there are opportunities for interaction with colleagues, information exchange, and mutual motivation, which can enhance their insights and understanding.²⁸

Table 3. Knowledge Level Before Receiving Brochure Media

Knowledge Level Categories	Pre-Test	
	n	%
Good (76-100%)	6	16,2
Moderate (56-75%)	19	51,4
Insufficient (<56%)	12	32,4
Total	37	100

Source: Primary Data, 2024

According to **Table 3**, the respondents' knowledge levels before receiving the brochure were categorized as follows based on the pre-test results: 'good' (6 respondents, 16.2%), 'moderate' (19 respondents, 51.4%), and 'insufficient' (12 respondents, 32.4%). At the start of the pre-test, the predominant knowledge level was 'moderate'. This finding is consistent with the research conducted by Ramadhiani et al. (2023), which found that in the pre-test regarding respondents' knowledge of DAGUSIBU medication, the dominant knowledge level category was 'moderate,' with a frequency of 18 respondents (51,40%). This result differs from the study by Hartika¹⁸, where the predominant category in the pre-test for SMK Multimedia Tumpang students in Malang regarding DAGUSIBU medication was 'insufficient,' with the highest number of respondents, totaling 102 (60%).

The respondents' education level in this research is predominantly in Senior High School (56,8%), and they mostly work as housewives and laborers (67,6%). This may affect the majority of knowledge pre-tests showing a moderate level (51,4%), which also stated by Yulianti and Anisa that there was a significant correlation between age ($p = 0,024$), education ($p = 0,001$), and employment status ($p = 0,007$) regarding the knowledge around self-medication in Society in Central Java, Indonesia. Yulianti and Anisa found that most respondents had completed high school (38,9%), and their occupation was housewife (29,3%), which indicates the same proportion as this research.²⁹ Research by Al-Qahtani et al. describes the same results: age ($p = 0.007$), education ($p = 0,014$), and occupation ($p = <0,001$) had significant correlations with knowledge, attitude, and practice.³⁰

Table 4. Knowledge Level After Receiving Brochure Media

Knowledge Level Categories	Post-Test	
	n	%
Good (76-100%)	30	81
Moderate (56-75%)	7	19
Insufficient (<56%)	0	0
Total	37	100

Source: Primary Data, 2024

Table 4 shows that after receiving the brochure media, the study's data show that the highest frequency of post-test questionnaire responses falls within the 'good' knowledge level category, with 30 respondents (81%). This result is consistent with the research conducted by Ramadhiani et al.,³¹ which found that the level of knowledge in the community of Desa Kerujon about DAGUSIBU medication, initially categorized as 'moderate,' improved to the 'good' category in the post-test, with the highest number of respondents being 29 individuals (82.9%).²²

The analysis of all knowledge level categories in this study indicates that most respondents improved their knowledge after receiving education through brochures. However, the post-test results reveal that seven respondents (19%) remained in the "moderate" knowledge category. It may be attributed to certain questionnaire items that some respondents answered incorrectly.

In the post-test questionnaire results, question number 11 had the highest frequency of incorrect answers, with 20 respondents (54,1%) incorrectly answering how to administer ear drops to children, specifically by pulling the ear upward and backward. According to the Ministry of Health,³² the correct method for administering ear drops to children is to pull the ear downward and backward. It indicated that while respondents' overall knowledge level improved, the percentage of correct answers for each question item from the pre-test to the post-test reveals the items that respondents knew and did not know.

Table 5. Wilcoxon Signed Rank Test Result

Knowledge Level Categories	Pre-Test		Post-Test		p-value
	n	%	n	%	
Good (76-100%)	6	16,2	30	81	<0,001 (p<0,05)
Moderate (56-75%)	19	51,4	7	19	
Insufficient (<56%)	12	32,4	0	0	
Total	37	100	37	100	

Source: Primary Data, 2024

Brochure media was considered effective if it could enhance respondents' knowledge about the use and disposal of self-medication drugs. Therefore, the Wilcoxon Signed Rank Test was used to evaluate the effectiveness of the brochure media in improving the knowledge of PKK mothers in RT 01 RW 10 South Dangan.

Table 5 describes the p-value (significance level) for the effectiveness of brochure media in enhancing respondents' knowledge in this study was <0.001 ($p < 0.05$). It indicates that the brochure media is effective as it successfully improved respondents' knowledge before and after the education on the use and disposal of self-medication drugs. This finding is consistent with the research by Rasdianah et al. (2022), which showed a significant difference in community knowledge (p-value 0.001) before and after the education and distribution of brochures about proper medication use and disposal.³²

Respondents' knowledge acquisition effectiveness is closely linked to the media used. Brochures were selected because they present information concisely and clearly, making it easier to understand.³³ However, this differs from the findings of Roseanne (2023), which indicated that the effectiveness of video and brochure media on DAGUSIBU for household mothers' behavior in managing syrup medication in Purwosari Laweyan Surakarta showed an average score of 9.66 for the video group, compared to only 5,71 for the brochure group. This discrepancy is attributed to direct explanations using audio-visual media (video), which

are preferred as they stimulate both the visual and auditory senses, leading to a greater increase in knowledge or understanding.³⁴

The primary limitation of this study is that the validity test was conducted solely through questionnaire distribution without including the brochure media used. Another limitation is that the study measured only respondents' knowledge levels without analyzing changes in their attitudes and behaviors. Ideally, research that incorporates attitude and behavior assessments aims to influence respondents' lifestyles and enhance their understanding and knowledge, particularly regarding the use and disposal of self-medication drugs.

CONCLUSION

This study demonstrates that educational interventions using brochure media can significantly enhance community knowledge regarding the proper use and disposal of self-medication drugs. The substantial improvement in knowledge among PKK mothers in RT 01 RW 10 South Danguran highlights the importance of accessible and targeted health education strategies. By empowering individuals with accurate information, such initiatives contribute to promoting responsible self-medication practices and minimizing potential health and environmental risks associated with improper drug use and disposal.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to express their gratitude to the Department of Pharmacy, Poltekkes Kemenkes Surakarta, and the PKK mothers of South Danguran Village, Klaten Regency, for their valuable assistance and support.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Maziyyah N. Penyuluhan Penggunaan Obat yang benar (DAGUSIBU) di Padukuhan Bakalan, Mlati, Sleman. 2015.
2. Lin L, Alam P, Fearon E, Hargreaves JR. *Public Target Interventions to Reduce the Inappropriate Use of Medicines or Medical Procedures: A Systematic Review*. Vol 15. Implementation Science; 2020. doi:10.1186/s13012-020-01018-7
3. Juneja K, Chauhan A, Shree T, et al. Self-medication prevalence and associated factors among adult population in Northern India: A community-based cross-sectional study. *SAGE Open Med*. 2024;12. doi:10.1177/20503121241240507
4. Octavia DR, Susanti I, Bintang SMN. Peningkatan Pengetahuan Masyarakat Tentang Penggunaan dan Pengelolaan Obat yang Rasional Melalui Penyuluhan Dagusibu. *GEMASSIKA J Pengabdian Kpd Masy*. 2020;4(1):23-39.
5. Ahmed SM, Sundby J, Aragaw YA, Abebe F. Self-medication and safety profile of medicines used among pregnant women in a tertiary teaching hospital in jimma, ethiopia: A cross-sectional study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(11). doi:10.3390/ijerph17113993
6. Sari YK. Gambaran Tingkat Pengetahuan dan Perilaku Masyarakat tentang Swamedikasi di Rumah Tangga di Kecamatan Pakualam Yogyakarta. 2020.
7. Arikunto S. *Prosedur Penelitian: Suatu Pendekatan Praktik (Cet. 15)*. Jakarta: Rineka Cipta; 2014.
8. Nugraheni AY, Ganurmala A, Pamungkas KP. Sosialisasi Gerakan Keluarga Sadar Obat: DAGUSIBU Pada Anggota Aisyiyah Kota Surakarta. *Abdi Geomedisains*. 2020;1(1):15-21. doi:10.23917/abdi-geomedisains.v1i1.92
9. KLHK. Capaian Kinerja Pengelolaan Sampah.
10. Savira M, Ramadhani FA, Nadhirah U, et al. Praktik Penyimpanan Dan Pembuangan Obat Dalam Keluarga. *J Farm Komunitas*. 2020;7(2):38. doi:10.20473/jfk.v7i2.21804
11. Insani WN, Qonita NA, Jannah SS, et al. Improper disposal practice of unused and expired pharmaceutical products in Indonesian households. *Heliyon*. 2020;6(7):6-10. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04551
12. Oktaviani E, Oktaviana Z, Marlia H. Efek Edukasi Melalui Brosur Terhadap Kontrol Tekanan Darah dan

- Kepatuhan Pasien Hipertensi. *Fitofarmaka J Ilm Farm*. 2020;10(1):65-75.
13. Rasdianah N, Djuwarno EN, Taupik M. Edukasi Penggunaan Obat Yang Benar Melalui Media Brosur Bagi Masyarakat. *JMM (Jurnal Masy Mandiri)*. 2022;6(1):380. doi:10.31764/jmm.v6i1.6380
 14. Fadhillah G, Ihsan S, Ramadhan R. Efektivitas Edukasi DAGUSIBU Spesifik Buang terhadap Pengetahuan Ibu-ibu PKK di Kecamatan Garut Kota. *Pharmacoscript*. 2023;6(2):164-175.
 15. Cameron B, McCully SN, Updegraff JoA, Ehret PJ, Areguin MA, Sherman DK. The Impact of Cultural Exposure and Message Framing on Oral health behavior: Exploring the role of message memory. 2017;36(7):834-843. doi:10.1177/0272989X15570114.The
 16. Mayberry JF. The design and application of effective written instructional material: A review of published work. *Postgrad Med J*. 2007;83(983):596-598. doi:10.1136/pgmj.2006.053538
 17. Rasdianah N, Djuwarno EN, Taupik M. EDUKASI PENGGUNAAN OBAT YANG BENAR MELALUI MEDIA. 2022;6(1):380-387.
 18. Hartika RA. Pengaruh Edukasi menggunakan Video terhadap Tingkat Pengetahuan Siswa-Siswi tentang DAGUSIBU Obat di SMK Multimedia Tumpang Kabupaten Malang. *Univ Islam Negeri Malang*. 2024;15(1).
 19. Sugiyono. *Metodologi Penelitian Kuantitatif Dan Kualitatif Dan R&D*. Jakarta: Alfabeta; 2019.
 20. Puspasari DH. Hubungan Tingkat Pengetahuan Terhadap Sikap Masyarakat tentang DAGUSIBU Obat Oral di Desa Banyumudal Kecamatan MOga Kabupaten Pemalang Tahun 2020. *Kajen J Penelit dan Pengemb Pembang*. 2022;5(2).
 21. Sulistyowati A, Kusuma WRP, Riza U. Hubungan Antara Usia dan Tingkat Pendidikan dengan Tingkat Pengetahuan Ibu Hamil tentang Perawatan Payudara selama Hamil di Poli Kandungan di RSU Jasem, Sidoarjo. *J Nurse Heal*. 2017;6(2):40-43.
 22. Suwaryo PAW, Podo Y. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Tingkat Pengetahuan Masyarakat dalam Mitigasi Bencana Alam Tanah Longsor. In: *URECOL*. Magelang: Universitas Muhammadiyah Magelang; 2017:305-314.
 23. Agustin N. Tingkat Pengetahuan Masyarakat tentang DAGUSIBU Obat di Kelurahan Tanah Patah Kota Bengkulu. 2020.
 24. Souhuwat S, Handayani, Yoanita H. Hubungan Tingkat Pengetahuan Orang Tua dengan Upaya Penanganan Kejang Demam di Desa Hutumuri, Kecamatan Leitimur Selatan, Kota Ambon. 2022.
 25. Mutmainah N, Nabila P, Jannah M, et al. Pengetahuan, Sikap dan Perilaku DAGUSIBU Obat pada Kader PKK. *PHARMACON J Ilm Farm – UNSRAT*. 2022;19(2):141-147.
 26. Irsila KB. Gambaran Tingkat Pengetahuan Masyarakat Tentang DAGUSIBU Obat Sediaan Cair di RT 06 Dusun Kenep Desa Kenep Kecamatan Balen Kabupaten Bojonegoro. 2020.
 27. Ra'is ON, Muthoharoh A, Ningrum WA, Permadi YW. Hubungan Tingkat Pengetahuan Terhadap Perilaku Swamedikasi Obat Antinyeri di Kecamatan Ulujami Kabupaten Pemalang. *Med Sains*. 2021;6(1).
 28. Wulansih R. Hubungan Umur, Pendidikan dan Pekerjaan dengan Tingkat Pengetahuan Kader Nasyiatul Aisyiyah tentang Stunting di Kabupaten Boyolali. 2021.
 29. Yulianti T, Muazizah AF. Community Knowledge , Attitude and Practice toward Self- Medication and Its Influencing Factor in Central Java: A Cross- Sectional Study. *J Manaj dan Pelayanan Farm*. 2024;14(3):204-213. doi:10.22146/jmpf.92581
 30. Al-Qahtani AM, Alqahtani NS, Mannasaheb BA, et al. Self-Medication Related Knowledge, Attitudes, and Practices among Residents of Riyadh, Saudi Arabia: A Community-Based Cross-Sectional Study. *Healthc*. 2023;11(23). doi:10.3390/healthcare11233040
 31. Ramadhiani AR, Citra YP, Widyasari. Pengaruh Pemberian Edukasi Terhadap Pengetahuan Masyarakat Tentang DAGUSIBU (Dapatkan, Gunakan, Simpan Dan Buang) Obat di Desa Kerujon. *Maj Farm*. 2023;19(1):48-54. doi:10.22146/farmaseutik.v19i1.73424
 32. Depkes. *Modul I Materi Pelatihan Peningkatan Pengetahuan Dan Keterampilan Memilih Obat Bagi Tenaga Kesehatan*.; 2008.
 33. Ruyadi I. Pemanfaatan brosur dan leaflet sebagai media informasi dan komunikasi pertanian. *Bul Agro-Infotek*. 2015;1(1).
 34. Yulida R, Sayamar E, Andriani Y, Sari RY. Efektivitas Media Visual dan Media Audion-Visual dalam Penyuluhan di Kelurahan Kabupaten Siak. In: *Prosiding Seminar Nasional Urgency Riset Dan Pengembangan Teknologi Informasi Dalam Mengatasi Masalah Bangsa*. Vol 2. ; 2017:19-22.