

PENINGKATAN AKTIVITAS ANTIJAMUR *CANDIDA ALBICANS* SALEP MINYAK ATSIRI DAUN SIRIH (*Piper bettle* LINN.) MELALUI PEMBENTUKAN KOMPLEKS INKLUSI DENGAN β -SIKLODEKSTRIN

ENHANCING ANTIFUNGAL *CANDIDA ALBICANS* ACTIVITY OF *Piper bettle* LINN. LEAF ESSENTIAL OIL OINTMENT THROUGH FORMATION OF COMPLEX WITH β - CYCLODEXTRIN INCLUSION

Ika Yuni Astuti^{*}, Dwi Hartanti dan Ani Aminiati

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuwaluh,
PO Box 202, Purwokerto 53182

ABSTRAK

Minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* Linn.) memberikan aktifitas antimikroba terhadap *Candida albicans* (Wirna, 2006). Sifat minyak atsiri adalah kurang stabil terhadap suhu tinggi, cahaya, dan oksigen. Untuk menjaga kestabilan dan memudahkan penanganan minyak atsiri dalam pembuatan sediaan, dapat dilakukan pembuatan kompleks inklusi minyak atsiri dengan β -siklodekstrin (Szejtli, 1989). Hal ini mendorong penulis untuk meneliti tentang pengaruh pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih dalam β -siklodekstrin terhadap aktivitas antijamur *Candida albicans* yang diformulasikan dalam sediaan salep polietilen glikol. Dalam penelitian ini, pertama kali dilakukan isolasi minyak atsiri daun sirih secara destilasi. Kemudian dilakukan pembuatan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin dengan metode kopresipitasi dengan perbandingan minyak atsiri daun sirih : β -siklodekstrin 1:1 (b/b). Kompleks inklusi yang terbentuk diidentifikasi dengan kromatografi lapis tipis dan difraksi sinar X serbuk. Kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel sebagai fase diam dan fase gerak toluen-etil asetat (7:3) dan metanol-air (7:3). Nilai Rf minyak atsiri daun sirih dan kompleks inklusi dibandingkan. Pola difraksi sinar X serbuk β -siklodekstrin, campuran fisik, dan kompleks inklusi juga dibandingkan. Tahap selanjutnya adalah pembuatan salep minyak atsiri daun sirih dan salep kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin dengan menggunakan basis polietilen glikol. Sifat fisik dan aktivitas antifungi kedua formula dibandingkan. Hasil kromatografi lapis tipis menunjukkan minyak atsiri daun sirih dengan fase gerak metanol-air (7:3) mempunyai Rf 0,69 dan 0,81 untuk kompleks inklusi. Pada fase gerak toluen-etil asetat (7:3), nilai Rf minyak atsiri daun sirih 0,63; 0,73; 0,85; sedangkan kompleks inklusi 0,66; 0,80, dan 0,91. Analisis difraksi sinar X serbuk menunjukkan pola yang berbeda antara β -siklodekstrin, campuran fisik dan kompleks inklusi. Perbedaan Rf pada kromatografi lapis tipis dan perbedaan pola difraksi sinar X ini menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih telah terkompleks dengan β -siklodekstrin. Hasil uji sifat fisik salep minyak atsiri daun sirih dan salep kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin menunjukkan bahwa homogenitas kedua formula cukup baik. Salep kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin mempunyai daya sebar, daya lengket dan daya antijamur yang lebih baik dibandingkan dengan salep minyak atsiri daun sirih. Potensi daya antijamur salep kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin tidak berbeda nyata dengan salep mikonazol sebagai kontrol positif.

Kata kunci : minyak atsiri daun sirih, kompleks inklusi, kromatografi lapis tipis, difraksi sinar X serbuk, aktivitas antijamur

ABSTRACT

The *Piper betle* leaf essential oil have antimicrobial activity to *Candida albicans* (Wirna, 2006). However, the essential oil is unstable to high temperature, light, and oxygen. One approach to improve the stability and facilitate in developing various dosage forms is by preparing the essential oil in complex inclusion using β -cyclodextrin (Szejtli, 1989). The aim of the present study was to investigate the effect of inclusion complex formation of the *Piper betle* leaf essential oil in β -cyclodextrin formulated to polyethylene glycol ointment to antifungal *Candida albicans* activity. The essential oil of *Piper betle* leaf was isolated by distillation. The inclusion complex of the essential oil - β -cyclodextrin was prepared by coprecipitation of the

essential oil : β - cyclodextrin 1:1 (w/w). The inclusion complex formation was studied with thin layer chromatography (TLC) and powder X-ray diffraction (XRD). In the TLC, silica gel was used as solid phase, whereas toluen-ethyl acetate (7:3) and methanol-water (7:3) was used as mobile phase, then the Rf value of the essential oil and inclusion complex was compared. The XRD pattern of β -cyclodextrin, physical mixtures and inclusion complex was compared, too. Then, the polyethylene glycol ointment of the essential oil and inclusion complex was prepared. The physical properties and antifungal activity was compared. The TLC result showed that the essential oil of Piper betle leaf with methanol-water (7:3) as mobile phase had Rf 0,69 and the inclusion complex had Rf 0,81. With toluen-ethyl acetate (7:3), Rf of the essential oil were 0,63; 0,73; 0,85, whereas the inclusion complex were 0,66; 0,80, and 0,91. The powder XRD analysis showed that the pattern of β -cyclodextrin, physical mixture and inclusion complex were different. The differences of Rf from TLC and XRD patterns were showed that the Piper betle leaf essential oil was complexed with β cyclodextrin. The physical properties studies showed that the homogeneity of both formulation was good. The inclusion complex ointment had spreading property, adhering property and antifungal activity which better than the essential oil ointment. The potency of antifungal activity of the inclusion complex of the essential oil - β -cyclodextrin was not significant different than miconazol ointment.

Key words : Piper betle essential oil, inclusion complex, thin layer chromatography, powder X ray diffraction, antifungal activity, candida albicans.

PENDAHULUN

Skrining aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* Linn.) telah dilakukan terhadap *Escherchia coli*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*. Berdasarkan hasil penelitian Wirna ditemukan bahwa minyak atsiri daun sirih memberikan aktifitas antimikroba terhadap bakteri tersebut (Wirna, 2006).

Akan tetapi minyak atsiri kurang stabil terhadap suhu, cahaya, dan udara. Untuk menjaga kestabilan dan memudahkan penggunaan minyak atsiri dapat dilakukan pembuatan kompleks inklusi minyak atsiri. Salah satu zat yang dapat membentuk kompleks inklusi adalah β -siklodekstrin (Szejtli, 1989).

Pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih dalam β -siklodekstrin diharapkan dapat meningkatkan stabilitas minyak atsiri dan mengubah bentuk minyak atsiri dari cairan menjadi padatan hingga memudahkan penggunaan minyak atsiri.

Terbentuknya kompleks inklusi dapat dikarakterisasi antara lain dengan kromatografi lapis tipis dan difraksi sinar X serbuk. Difraksi sinar X dapat digunakan untuk mendeteksi kompleks inklusi dalam padatan. Metode ini lebih

inklunya sendiri dapat dideteksi (Bekers *et al.*, 1991).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih- β -siklodekstrin yang diformulasikan sebagai salep polietilene glikol terhadap aktivitas antijamur *candida albicans*.

METODOLOGI

Bahan

Daun sirih diambil dari daerah Kulon Progo, Yogyakarta. β -siklodekstrin (Sigma Co.), etanol, aquadest, toluen, metanol, dan etil asetat, PEG 4000, PEG 400, Setil Alkohol, *Nutrient broth* (E-Merck), *Potato Dekxrose Agar* (Oxoid), aquades steril (Asia Lab, Yogyakarta).

Alat

Seperangkat alat destilasi (Pyrex), magnetic stirer, timbangan analitik (Sartorius) seperangkat alat KLT, oven, difraktometer sinar X (Rigaku miniflex). Autoklaf, inkubator (Mermert), pinset, timbangan, LAF (*Laminar Air Flow*), pemanas/*hot plate* (Schott gerate), pipet ukur, alat-alat gelas (Pyrex).

Tahapan penelitian

Pengumpulan bahan dan determinasi tumbuhan

Daun sirih diperoleh dari daerah Kulonprogo, Yogyakarta. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Biologi, Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

Isolasi minyak atsiri daun sirih.

Daun sirih segar dimasukkan ke dalam ketel destilator. Kompor dinyalakan, tetesan air yang keluar dari pendingin kaca ditampung dengan

^{*)} Korespondensi : Ika Yuni Astuti
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah
Email: ikayunias@yahoo.com

sangat bermanfaat dalam kasus molekul-molekul *guest* berwujud cair, sebab cairan tidak memberikan pola tersendiri. Apabila spesies yang dianalisis memberikan pola yang berbeda dari pola siklodekstrin yang non-kompleks, maka kompleks

corong pisah. Tetesan air tersebut mengandung minyak atsiri yang kemudian dipisahkan dengan corong pisah.

Pembuatan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih β -Siklodekstrin.

Kompleks inklusi minyak atsiri dibuat dengan metode pengendapan (*Kopresipitasi*) dalam perbandingan berat 1:1. Minyak atsiri ditimbang, dilarutkan dalam etanol sampai larut. Kemudian β -siklodekstrin ditimbang, dilarutkan dalam air sampai larut. Kedua larutan dicampurkan, dilanjutkan dengan pengadukan menggunakan *magnetic stirer* selama 10 jam hingga terbentuk endapan, kemudian disaring dan dikeringkan dalam oven bersuhu 50°C.

Identifikasi kompleks inklusi menggunakan kromatografi lapis tipis.

Sebagai fase diam digunakan plat silika gel, sedangkan campuran toluen-etil asetat (7:3) digunakan sebagai fase gerak I dan metanol-air (7:3) sebagai fase gerak II. Pada plat silika gel, ditotolkan minyak atsiri daun sirih dan larutan kompleks inklusi minyak atsiri - β -siklodekstrin dalam air, kemudian plat dikembangkan dalam fase gerak. Jarak pengembang senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf. Rumus perhitungan Rf :

$$R_f = \frac{\text{jarak pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan dari titik awal}}$$

Identifikasi kompleks inklusi menggunakan difraksi sinar X serbuk.

Sejara sebelum dilakukan difraksi sinar X serbuk, dibuat campuran fisik minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin dengan cara mencampurkan minyak atsiri daun sirih dan β -siklodekstrin (1:1 b/b). Dengan menggunakan difraktometer, pola difraksi sinar X serbuk β -siklodekstrin, campuran fisik dan kompleks inklusi daun sirih- β -siklodekstrin di-scan dan dibandingkan.

Pembuatan sediaan salep

Formula

Poli etilen glikol 4000 FI 47 g F II 47g, Poli etilen glikol 400 FI 47g FII 47g, Setil alkohol FI 5g FII 5g, Minyak atsiri daun sirih FI 3g, Kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih - β -siklodekstrin FII Setara 3 g minyak atsiri.

Cara Pembuatan

PEG 4000 dilelehkan pada suhu 80°C di penangas air. Setil alkohol ditambahkan, diaduk sampai homogen. Setelah itu PEG 400 ditambahkan, diaduk sampai homogen. Setelah dingin kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih β -siklodekstrin atau minyak atsiri dimasukkan,

diaduk sampai homogen. Salep dimasukkan ke dalam wadah, disimpan di tempat yang terlindung dari cahaya.

Evaluasi sediaan salep

Uji Homogenitas

Satu mg salep ditimbang, dioleskan pada plat kaca, lalu digosokkan dan diraba. Bila homogen maka massa salep tidak tersisa bahan padatnya atau strukturnya rata.

Uji Daya Menyebar Salep

Sebanyak 0,5 g salep ditimbang, lalu diletakkan di tengah kaca bulat berdiameter 15 cm. Kaca yang satu diletakkan di atasnya, dibiarkan selama 1 menit. Diameter sebar salep diukur, kemudian ditambahkan 50 gr beban tambahan, didiamkan selama 1 menit lalu diukur diameter sebar yang konstan. Lakukan replikasi 3 kali.

Uji Daya Lengket Salep

Sebanyak 0,5 g salep ditimbang, lalu dioleskan pada plat kaca dengan luas 2,5 cm². Kedua plat ditempelkan sampai plat menyatu, ditekan dengan beban seberat 1 kg selama 5 menit setelah itu beban dilepas, lalu diberi beban pelepasan 80 g untuk pengujian. Dicatat waktu sampai kedua plat saling lepas. Dilakukan replikasi 3 kali.

Uji daya antijamur

Pembuatan medium

Medium Nutrient Broth (NB) :

- Nutrient Broth 4 g
- Air suling ad 500 mL

Medium Potato Dextrose Agar (PDA) :

- Potato Dextrose Agar 19,5 g
- Air suling ad 500 mL

Medium dan air suling dipanaskan di atas *hot plate* selama 5 menit sampai menjadi larutan yang homogen. Air suling ditambahkan untuk mengganti volume yang hilang selama pemanasan sampai volume yang ditetapkan. Selanjutnya disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit.

Kultur *Candida albicans*

Kultur dilakukan dengan menggunakan metode agar miring dengan teknik aseptis. Satu ose khamir berumur 2 hari digoreskan pada medium agar *Potato Dextrose Agar* (PDA) di dekat api bunsen, setelah itu ditutup dengan kapas steril dan inkubasi selama 48 jam di dalam inkubator dengan suhu 37° C untuk kemudian digunakan pada uji antifungi.

Perhitungan Khamir *Candida albicans*

Satu ose khamir *Candida albicans* yang berumur 2 hari ditumbuhkan pada medium NB, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kekeruhannya dihitung secara tidak langsung dan harus memenuhi standar Mc Farlan (10^8 CFU/ mL) serta jumlah koloni jamur dalam satu cawan petri harus memenuhi standar uji yaitu 30-300 koloni (Lay, 1994).

Uji Daya Hambat

Setiap petri dibagi menjadi 4 bagian yaitu: kontrol negatif (basis salep larut air), kontrol positif (salep mikonazole 0,4%), Formula I (salep minyak atsiri 3%), Formula II (salep kompleks inklusi minyak atsiri- β -siklodekstrin). Replikasi dilakukan 5 kali. Masing-masing formula salep yang telah ditimbang 0.1 g dioleskan pada 4 kertas cakram steril diameter 7 mm, kemudian diletakkan di tengah petri yang telah tersedia, setelah 48 jam, amati diameter hambat (zona bening) yang terbentuk.

Metode Analisis

Berdasarkan data dari uji aktifitas antijamur minyak atsiri daun sirih dilakukan analisis statistik diameter hambat dengan uji anava, yaitu menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap), apabila F hitung lebih besar dari F tabel, maka dilanjutkan dengan post hock, yaitu dengan menggunakan metode BNT (Beda Nyata Terkecil).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi minyak atsiri daun sirih menghasilkan minyak dengan bau menyengat khas sirih, rasa getir dan warna kuning kecoklatan. Sedangkan dari pembuatan kompleks inklusi, dihasilkan serbuk berwarna putih kekuningan.

Pada kromatografi lapis tipis, campuran toluen-etil asetat (7:3) dan campuran metanol-air (7:3) dipilih karena siklodekstrin kurang larut pada pelarut non polar, sehingga dipilih pelarut yang semi polar, disamping itu toluen-etil asetat (7:3) merupakan fase gerak yang biasa digunakan untuk mengevaluasi senyawa yang diduga mengandung minyak atsiri.

Pada kedua fase gerak, harga Rf minyak atsiri dan kompleks inklusi berbeda, hal ini menunjukkan bahwa pada kopresipitasi minyak atsiri dengan β -siklodekstrin telah terbentuk

senyawa baru yaitu kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih- β -siklodekstrin.

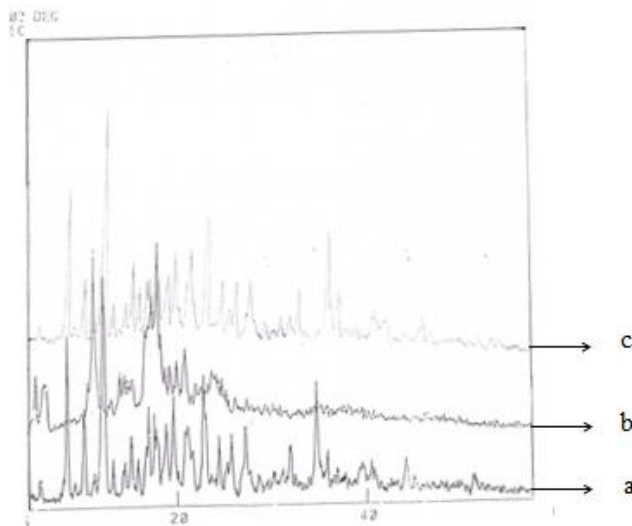
Untuk pembuktian lebih lanjut maka dilakukan analisis dengan menggunakan difraksi sinar X. Berdasarkan hasil analisis dengan difraksi sinar X serbuk, pola yang muncul antara sampel β -siklodekstrin, campuran fisik dan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih- β -siklodekstrin berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa telah terbentuk senyawa yang baru karena minyak atsiri telah terkompleks dengan β -siklodekstrin.

Hasil uji homogenitas menunjukkan bahwa zat aktif dalam salep telah terdistribusi secara merata, terbukti dari teksturnya yang tidak terasa kasar. Berdasarkan data daya sebar salep, formula II memiliki daya sebar yang lebih besar dibanding formula I. Hal ini disebabkan pembentukan kompleks inklusi meningkatkan hidrofilitas minyak atsiri daun sirih, karena bagian luar β -siklodekstrin bersifat hidrofilik. Dengan demikian daya sebar salep formula II meningkat. Salep formula II memiliki daya lengket lebih lama yaitu 10,01 menit sedangkan salep formula I hanya memiliki daya lengket selama 3,22 menit. Semakin lama salep tersebut berada di kulit maka salep tersebut dapat memberikan efek terapi yang diinginkan dengan maksimal.

Dari hasil pengenceran yang dilakukan, suspensi khamir yang memenuhi syarat jumlah 30-300 koloni adalah pada pengenceran 10^{-7} . Hasil uji aktivitas antijamur dapat dilihat pada gambar 2.

Berdasarkan hasil perhitungan statistik analisis variansi data pada tabel diatas, nilai F hitung perlakuan (42,5856) lebih besar dari F tabel dengan taraf kepercayaan 5 % dengan nilai 3,24. Hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan pengaruh perlakuan terhadap daya antijamur minyak atsiri daun sirih terhadap *Candida albicans* secara in vitro.

Selanjutnya, berdasarkan hasil uji BNT antara kontrol negatif dengan kontrol positif, formula I dan formula II diketahui bahwa antara kontrol negatif dengan ketiga sampel tersebut berbeda nyata pada taraf 95%. Hal ini membuktikan bahwa kontrol positif, formula I dan formula II memiliki potensi sebagai antijamur. Sedangkan pada kontrol negatif tidak memiliki kemampuan sebagai antijamur.



Gambar 1. Pola difraksi sinar X serbuk: a: β -siklodekstrin; b: kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih- β -siklodekstrin; c: campuran fisik minyak atsiri daun sirih dan β -siklodekstrin

Tabel I. Nilai Rf pada masing- masing pelarut

Sampel	Nilai Rf	
	Metanol- Air	Toluen-Etil asetat
Minyak Atsiri sirih	0,69	0,63; 0,73; 0,85
Kompleks inklusi minyak atsiri sirih β -Siklodekstrin	0,81	0,66; 0,80; 0,91

Tabel 2. Hasil uji sifat fisik salep

Formula	Sifat Fisik		
	Homogenitas	Daya sebar rata-rata	Daya lengket rata-rata
Formula I	Homogen	2,87 cm ²	3,22 menit
Formula II	Homogen	3,43 cm ²	10,01 menit

Keterangan :

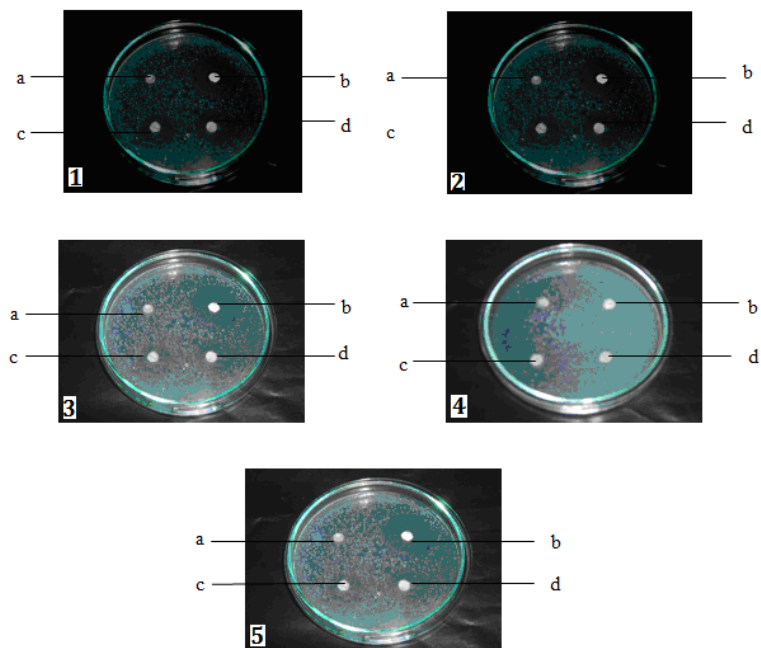
Formula I: Salep minyak atsiri daun sirih 3%

Formula II: Salep minyak atsiri daun sirih 3% dalam kompleks inklusi β -Siklodekstrin.

Hasil uji BNT antara kontrol positif dengan formula I menunjukkan bahwa kedua sampel tersebut berbeda nyata pada taraf 95%. Hal ini membuktikan bahwa salep mikonazol memiliki daya antifungi yang lebih baik dibandingkan dengan salep minyak atsiri daun sirih bebas. Pada formula II, yaitu salep kompleks inklusi minyak atsiri- β -siklodekstrin memberikan daya antijamur yang lebih baik dibanding formula I (salep dengan minyak atsiri bebas). Ini berarti pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih- β -Siklodekstrin dapat meningkatkan pelepasan

minyak atsiri dari basis salep polietilen glikol, sehingga aktivitas antijamurnya juga meningkat.

Pada uji BNT antara kontrol positif dengan formula II menunjukkan bahwa tidak berbeda nyata pada taraf kepercayaan 95%, hal ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara formula II yaitu salep kompleks inklusi minyak atsiri- β -siklodekstrin dengan kontrol positif, sehingga kontrol positif dan formula II memiliki potensi yang sama dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.



Gambar 2. Hasil uji daya hambat terhadap jamur *candida albicans*

Keterangan:

1 = Replikasi 1, 2= Replikasi 2, 3= Replikasi 3, 4= Replikasi 4, 5= Replikasi 5

A = Kontrol - (Basis salep tanpa zat aktif)

B = Kontrol + (Salep mikonazol 0,4%)

C = Salep minyak atsiri daun sirih 3%

D = Salep minyak atsiri daun sirih 3% dengan pembentukan kompleks inklusi kompleks inklusi β -Siklodekstrin.

Pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih dengan β -siklodekstrin terbukti dapat meningkatkan aktivitas antijamur minyak atsiri daun sirih sehingga memiliki aktivitas antijamur yang sama dengan kontrol positif (salep mikonazole).

KESIMPULAN

Salep kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* Linn.) - β -siklodekstrin menghasilkan homogenitas yang baik, serta daya sebar dan daya lengket yang lebih baik daripada salep minyak atsiri daun sirih. Pembentukan kompleks inklusi minyak atsiri daun sirih (*Piper betle* Linn.) - β -siklodekstrin dapat meningkatkan aktivitas antijamurnya terhadap *Candida albicans*.

DAFTAR PUSTAKA

- Bekers, O., Uijtendaal, E. V., Beijnen, J.H., Bult, A, and Underberg, W.J.M, 1991, Cyclodextrin in the pharmaceutical field, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 1506, 1519-1521, The Netherlands.
- Szejtli, J., 1989, *Down Stream Processing Using Cyclodextrins*, 170-174, Tibetch.
- Wirna, *Bidang Mikrobiologi, Skrining aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih*, WWW.lppm.wirna.ac.id/ppot/ABSTRAK-PEN-PPOT-WEB-mikro.gtml_19k. di download pada tanggal 24 November 2006.
- Lay, B. W., 1994, *Analisis Mikroba Di Laboratorium*. Raja Grafindo Persada, 48, Jakarta