

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Penyiapan Bahan Uji

Tanaman mimba yang digunakan diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Ramuan Obat Bogor. Selanjutnya tanaman dideterminasi di Laboratorim Taksonomi Tumbuhan jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran. Proses determinasi ini bertujuan untuk memastikan kebenaran dari sampel yang digunakan. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman uji yang digunakan termasuk famili Meliaceae, spesies *Azadirachta indica* A.Juss. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

Minyak biji mimba diperoleh melalui proses pengepresan biji. Minyak yang dihasilkan dengan cara ini dapat mencapai 50% berat biji (Sukrasno *et al.*, 2003). Pengepresan biji mimba dilakukan di Balitro Bogor. Sebelum dilakukan pengepresan diperlukan perlakuan pendahuluan seperti pembuatan serpih dan rajangan. Pengepresan dilakukan dengan cara pengepresan hidrolis, biji mimba sebanyak 5 kg di *press* dengan tekanan berkisar 140,6 kg/cm (136 atm), sehingga dihasilkan minyak biji mimba sebanyak 200 ml dengan warna kuning kecoklatan, bau seperti bawang putih dan viskositas seperti minyak kelapa.

5.2 Penapisan Fitokimia

Pada penelitian kali ini dilakukan penapisan fitokimia pada simplisia biji mimba (*Azadirachta indica* A.juss). Tujuan dilakukannya penapisan fitokimia ini

adalah untuk mengidentifikasi kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia tanaman uji. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada tabel V.1. Dari hasil pengamatan yang diperoleh menunjukkan bahwa simplisia biji mimba yang digunakan mengandung polifenol, kuinon, flavonoid, dan triterpenoid.

Tabel V.1 Hasil Pengamatan Penapisan Fitokimia Minyak Biji Mimba

Golongan Senyawa	Identifikasi	
	(+)	(-)
Tanin	-	√
Polifenol	-	√
Kuinon	√	-
Saponin	-	√
Flavonoid	√	-
Steroid	-	√
Triterpenoid	√	-

Keterangan :

(+) = Terdeteksi

(-) = Tidak Terdeteksi

Berdasarkan hasil penapisan fitokimia telah diketahui bahwa simplisia biji mimba mengandung senyawa triterpenoid yaitu nimbolid. Senyawa tersebut memiliki aktivitas anti inflamasi (Biswass *et al.*, 2002). Inflamasi ini merupakan salah satu gejala terjadinya alergi pada kulit karena pemompaan kalsium ke dalam sel dapat menstimulasi pelepasan mediator inflamasi dan alergi seperti prostaglandin dan histamin (Gomperts *et al.*, 1983).

5.3 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan adalah kelinci albino jantan *hibrid new zealand* dengan berat badan 1,5 kg-2,5 kg. Tujuan digunakannya kelinci dengan rentang bobot tertentu agar daerah pengamatan cukup luas, dan tujuan digunakannya kelinci jantan karena sistem imun pada kelinci jantan relatif lebih stabil dan tidak

dipengaruhi hormon reproduksi. Hal ini disebabkan karena kadar hormon estrogen pada kelinci jantan relatif lebih rendah dibanding kelinci betina. Adanya stres akut dapat menyebabkan penurunan kadar estrogen pada kelinci betina yang berefek imunostimulasi (Gunawan, 2007).

Sebelum dilakukan penelitian, hewan percobaan diaklimasi terlebih dahulu selama 7 hari dengan tujuan untuk mengadaptasikan hewan percobaan dengan lingkungannya yang baru. Baik selama aklimasi ataupun pengamatan kelinci tidak diberi pakan berupa pelet untuk menghindari reaksi alergi yang diakibatkan protein yang terkandung dalam pelet melainkan diberi makan berupa sayuran segar. Sebelum masuk ke dalam tahap penantangan bulu punggung pada kelinci dicukur terlebih dahulu sehingga bentol dan eritema yang terbentuk dapat diamati dengan jelas.

5.4 Pembuatan Sediaan Krim

Minyak biji mimba yang hendak digunakan dibuat dalam sediaan krim karena target pengobatannya berada pada kulit di lapisan epidermis selain itu tujuan terapi dari penggunaan krim minyak biji mimba yaitu pengobatan lokal. Pembuatan sediaan minyak biji mimba dalam bentuk krim memiliki beberapa keuntungan, antara lain: tingkat penerimaan pasien lebih tinggi dibandingkan sediaan dalam bentuk salep, sediaan krim tidak lengket dan mudah dicuci dengan air sehingga lebih nyaman digunakan, serta memiliki daya absorpsi yang baik.

Pembuatan krim menggunakan trietanolamin sebagai emulgator, trietanolamin ini termasuk ke dalam golongan surfaktan anionik dengan

mekanisme kerja membentuk lapisan film monolayer pada antar muka globul. Penggunaan emulgator ini juga dikarenakan dalam minyak biji mimba terdapat banyak asam lemak dimana jika asam lemak ini dikombinasikan dengan trietanolamin akan menghasilkan butir halus yang stabil dalam emulsi minyak dalam air (Yener, 2009:754). Hasil emulsi minyak dalam air terbentuk dari amin seperti trietanolamin dengan asam lemak (Lund,1994). Selain itu digunakan pula CMC-Na untuk meningkatkan viskositas pada krim sehingga krim yang dibuat lebih stabil. Metil paraben dan propil paraben digunakan pada formulasi krim minyak biji mimba sebagai pengawet dengan tujuan untuk meningkatkan stabilitas krim dengan mencegah pertumbuhan mikroorganisme, karena pada dasarnya krim mengandung fase air dan fase minyak yang merupakan media yang baik untuk pertumbuhan bakteri dan jamur. Alfatokoferol digunakan sebagai antioksidan pada formulasi krim untuk mencegah ketengikan akibat oksidasi oleh cahaya pada fase minyak, reaksi oksidasi pada lemak terjadi melalui pembentukan radikal bebas. Alfa tokoferol merupakan antioksidan yang paling banyak terdapat di alam, zat penyapu radikal bebas dan bersifat lipofilik. Antioksidan ini dapat mencegah reaksi oksidasi dengan memutus rantai peroksida lipid dan menyumbangkan atom hidrogen pada gugus hidroksil dari struktur cincin ke radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi tidak reaktif (DeMan, 1999). Kemudian digunakan pula etanol sebagai peningkat penetrasi, zat ini dimaksudkan untuk meningkatkan jumlah zat yang terpenetrasi agar terapi yang dilakukan optimal.

Selanjutnya dilakukan evaluasi terhadap sediaan krim. Evaluasi ini meliputi organoleptis, homogenitas, tipe emulsi, pH, dan viskositas. Hasil evaluasi dapat dilihat pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil Evaluasi Krim Minyak Biji Mimba

Parameter	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4
Warna	Kuning Muda	Kuning Muda	Kuning Muda	Putih
Bau	Khas Mimba	Khas Mimba	Khas Mimba	Tidak Berbau
Homogenitas	Homogen	Homogen	Homogen	Homogen
Tipe Emulsi	M/A	A/M	A/M	M/A
Viskositas	4680	4280	3990	4720
pH	6,2	5,63	5,63	6,43

Keterangan :

Formula 1 = Krim Minyak Biji Mimba 10%

Formula 2 = Krim Minyak Biji Mimba 15%

Formula 3 = Krim Minyak Biji Mimba 20%

Formula 4 = Basis Krim

Secara organoleptis sediaan krim yang dibuat memiliki warna kuning muda, serta memiliki bau khas mimba. Pada evaluasi homogenitas semua sediaan krim baik pada basis krim maupun krim minyak biji mimba konsentrasi 10%, 15%, dan 20% memiliki homogenitas yang baik. Setiap sediaan krim minyak biji mimba memiliki pH yang memenuhi syarat yaitu 5,5-6,5 sehingga sediaan yang dibuat tidak menimbulkan iritasi pada kulit. Sedangkan untuk evaluasi viskositas, semakin tinggi konsentrasi minyak biji mimba viskositas yang dihasilkan semakin rendah. Hal ini disebabkan karena viskositas dari minyak biji mimba murni cukup rendah. Untuk evaluasi tipe emulsi yang diperoleh pada basis krim, dan krim minyak biji mimba 10% adalah minyak dalam air, namun untuk krim minyak biji mimba 15% dan 20% tipe emulsi yang diperoleh adalah air dalam minyak hal ini dapat disebabkan karena terjadinya kerusakan pada emulsi yaitu inversi, yang

dapat disebabkan karena penambahan fase terdispersi berlebih yaitu minyak biji mimba (Lund,1994).

5.5 Uji Aktivitas Anti Alergi

Pengujian dilakukan dengan menyuntikkan ekstrak udang 32% b/v untuk tahap sensitisasi dan Pengujian aktivitas antialergi pada penelitian ini dilakukan dengan metoda anafilaksis kutan aktif. Metoda anafilaksis kutan aktif, yaitu dengan menyuntikkan suatu antigen ke dalam kulit hewan yang telah sensitisasi terhadap antigen tertentu, kemudian akan menimbulkan reaksi anafilaksis kutan lokal. Reaksi ini terdiri dari pembengkakan lokal kemerahan. Kenaikan permeabilitas vaskular lokal yang merupakan ciri khas reaksi ini (Henson, 1993:235).

Pengujian terdiri dari tahap sensitisasi dan tahap penantangan. Pada tahap sensitisasi dilakukan penyuntikkan ekstrak udang peci 32 % b/v sebanyak 2 mL/Kg BB kelinci, tahap ini berlangsung selama 23 hari. Pada tahap ini terjadi proses dibentuk imunoglobulin tipe IgE yang mempunyai kemampuan melekat pada permukaan sel mast. Jika pada kontak berikutnya, alergen yang masuk dan bereaksi dengan antibodi IgE dapat menyebabkan degranulasi sel mast, serta pelepasan mediator seperti histamin, sitokin, dan leukotrien (Kariosentono,2006). Pemberian ekstrak udang peci dilakukan dengan cara subkutan agar absorpsi dari ekstrak udang peci berlangsung lebih lambat sebagai tahap proses pengenalan suatu induksi antigen, selain itu luas daerah pemberian lebih besar sehingga antibodi yang terbentuk lebih banyak.

Tahap penantangan dilakukan pemberian ekstrak udang peci 10% b/v sebanyak 0,1 mL/sektor dengan cara intradermal pada 6 sektor di punggung kelinci, hal ini dimaksudkan agar reaksi yang ditimbulkan bersifat lokal. Pada tahap ini, setelah kelinci diinduksi dengan ekstrak udang peci 10% b/v maka akan terbentuk bentol-bentol dengan ukuran yang berbeda. Hal tersebut dikarenakan ekstrak udang peci 10% b/v mampu mengakibatkan manifestasi alergi tipe 1. Adanya perbedaan pada ukuran bentol yang terbentuk diakibatkan karena terdapat perbedaan jumlah antibodi yang terbentuk.

Penggunaan ekstrak udang 32% b/v dapat menginduksi terbentuknya antibodi pada kelinci percobaan, karena udang memiliki kandungan protein yang cukup tinggi. Sehingga dapat merespon pembentukan antibodi, alergi ini disebabkan oleh protein yang terdapat dalam makanan dan berlangsung melalui IgE dan terjadinya pelepasan mediator (Tjay dan Rahardja 2007:815).

Pengamatan dilakukan selama 4 kali pada waktu yang berbeda. Kelinci dinyatakan alergi terhadap ekstrak udang peci jika timbul bentol-bentol serta kemerahan pada daerah yang disuntikkan ekstrak udang peci 10% b/v (dapat dilihat pada lampiran 3). Diameter bentol diukur 1 jam setelah tahap penantangan (t_0). Diameter kembali diukur 1 jam setelah pemberian obat (t_1), 2 jam setelah pemberian obat (t_2), dan 24 jam setelah pemberian obat (t_3). Pada masing-masing kelinci dibagi menjadi 6 sektor pengamatan, dengan perlakuan yang berbeda pada masing-masing sektor. Untuk jenis perlakuan pada masing-masing sektor dapat dilihat pada gambar IV.1.

Tabel V.3 Rata-rata Diameter Bentol Pada Setiap Kelompok Uji

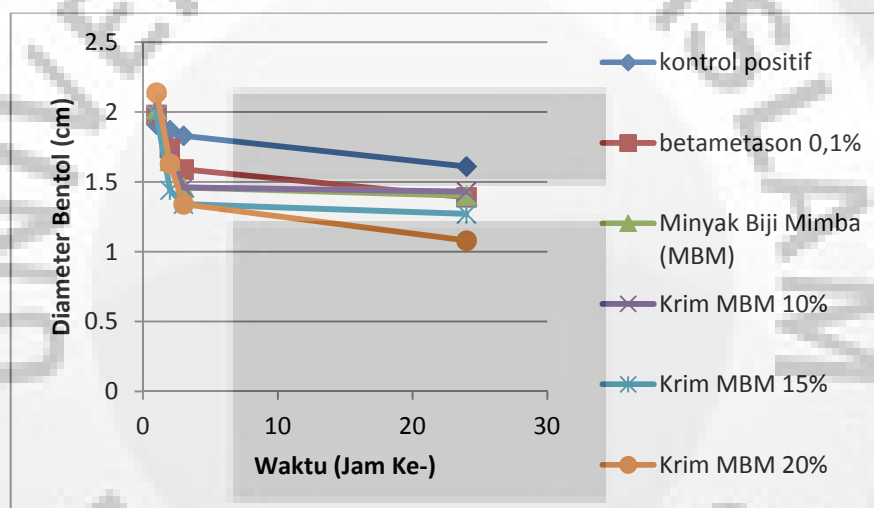
Perlakuan	Diameter Bentol ($\bar{X} \pm SD$ cm)			
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₂₄
Kontrol +	1,91 ± 0,09	1,87 ± 0,28	1,83 ± 0,28	1,61 ± 0,26
Pembanding	1,98 ± 0,34	1,74 ± 0,35	1,59 ± 0,27	1,39 ± 0,24
Minyak Biji Mimba	2,02 ± 0,22	1,65 ± 0,21	1,46 ± 0,29	1,40 ± 0,35
Krim Minyak Biji Mimba 10%	2,05 ± 0,15	1,67 ± 0,26	1,46 ± 0,24	1,43 ± 0,24
Krim Minyak Biji Mimba 15%	1,98 ± 0,18	1,44 ± 0,28	1,34 ± 0,25	1,27 ± 0,44
Krim Minyak Biji Mimba 20%	2,14 ± 0,33	1,63 ± 0,22	1,34 ± 0,15	1,08 ± 0,32

Keterangan :

X = Rata-rata

T₀ = Sebelum pemberian obatT₂ = 2 jam setelah pemberian obat

SD = Standar Deviasi

T₁ = 1 jam setelah pemberian obatT₂₄ = 24 jam setelah pemberian obat

Gambar V.1 Grafik Perkembangan Diameter Bentol setelah Aplikasi Sediaan Uji dan Pembanding pada Kelinci Alergi

Tabel V.4 Rata-rata Selisih Diameter Bentol Tiap Jam Terhadap T₀

Perlakuan	Rata - rata Selisih Diameter Bentol		
	Δt_1	Δt_2	Δt_{24}
Kontrol +	0,04	0,08	0,3
Pembanding	0,24	0,39	0,92
Minyak Biji Mimba	0,37	0,57*	0,63
Krim Minyak Biji Mimba 10%	0,38	0,59*	0,62
Krim Minyak Biji Mimba 15%	0,54	0,64*	0,71
Krim Minyak Biji Mimba 20%	0,57	0,81*	1,06

Keterangan :

(*) = memiliki perbedaan bermakna terhadap kontrol positif melalui analisis anava dan tukey

 Δt = selisih diameter bentol pada jam ke-

Dari data pengamatan diketahui bahwa terdapat penurunan diameter bentol pada semua daerah pengujian. Pada minyak biji mimba terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,37 cm pada jam pertama, kemudian setelah 2 jam terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,57 cm (dibandingkan dengan diameter pada t_0), dan pada jam ke 24 terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,63 cm. Pada krim minyak biji mimba 10% terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,38 cm pada jam pertama, kemudian setelah 2 jam terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,59 cm (dibandingkan dengan diameter pada t_0), dan pada jam ke 24 terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,62 cm. Pada krim minyak biji mimba 15% terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,54 cm pada jam pertama, kemudian setelah 2 jam terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,64 cm (dibandingkan dengan diameter pada t_0), dan pada jam ke 24 terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,71 cm. Sedangkan pada krim minyak biji mimba 20% pada jam pertama terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,53 cm kemudian setelah 2 jam terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,81 cm (dibandingkan dengan diameter pada t_0), dan pada jam ke 24 terjadi penurunan diameter bentol sebesar 1,06 cm.

Jika dibandingkan dengan jumlah penurunan diameter bentol pada kontrol positif dan pembanding, jumlah penurunan diameter bentol pada krim uji lebih besar. Pada kontrol positif penurunan diameter bentol pada jam ke 1 sebesar 0,04 cm, pada jam ke 2 penurunan diameter bentol sebesar 0,08 cm, dan pada jam ke 24 terjadi penurunan diameter bentol sebesar 0,30 cm. Sedangkan pada

pembandingan penurunan diameter bentol pada jam ke 1 sebesar 0,24 cm, jam ke 2 penurunan sebesar 0,39 cm, dan pada jam ke 24 penurunan sebesar 0,60 cm.

Berdasarkan hasil pengukuran penurunan diameter bentol diketahui bahwa pemberian krim minyak biji mimba 20% mampu menurunkan diameter bentol lebih besar dibandingkan pemberian minyak biji mimba, karena pada sediaan ini minyak biji mimba telah diformulasikan dengan basis krim yang dapat meningkatkan waktu kontak antara obat dengan kulit. Selain itu minyak mimba sebagai komponen lemak dianggap sebagai faktor utama yang secara langsung bertanggung jawab terhadap rendahnya penetrasi obat melalui *stratum corneum*. Sehingga minyak mimba dalam basis krim lebih mudah terabsorpsi karena hidrasi pada kulit dapat dipengaruhi oleh basis, pada basis krim terdapat surfaktan yang dapat membungkus globul minyak dalam fase air, hal tersebut dapat mempengaruhi efek pelembab dari kulit. Hidrasi pada stratum korneum dapat meningkatkan derajat lintasan dari obat yang berpenetrasi melalui kulit, peningkatan absorpsi ini mungkin disebabkan karena melunaknya jaringan dan bertambahnya ukuran pori-pori yang memungkinkan arus bahan lebih besar (Ansel, 2005). Di dalam formulasi krim juga terdapat etanol yang berfungsi sebagai peningkat penetrasi dengan mekanisme kerja mengubah sifat kelarutan stratum korneum hingga koefisien partisi obat ke dalam jaringan meningkat. Selain itu etanol meningkatkan aktifitas termodinamik obat karena etanol cepat menembus melewati *stratum corneum* dan memiliki sifat cepat menguap sehingga membuat obat dalam sediaan mencapai kondisi jenuh dan memberikan daya dorong permeasi yang kuat (Rowe, Owen., 2006). Kemudian jika dibandingkan

dengan krim minyak biji mimba 10% dan 15%, penurunan diameter bentol pada krim minyak biji mimba 20% masih lebih besar. Hal ini disebabkan karena konsentrasi minyak biji mimba dalam krim lebih tinggi.

Salah satu golongan senyawa dalam minyak biji mimba yang diperkirakan memiliki aktifitas anti inflamasi pada bentol yang terbentuk adalah triterpenoid, karena sebelumnya telah dilakukan penelitian mengenai kandungan kimia dalam tanaman mimba. Dalam biji mimba terkandung nimbolid yang merupakan golongan senyawa triterpenoid (Biswass *et al.*, 2002 ; Sadeghian, 2007). Senyawa ini berkhasiat sebagai anti inflamasi. Inflamasi ini merupakan salah satu gejala dari terjadinya alergi, dimana ketika terjadi degranulasi sel mast pada reaksi hipersensitivitas maka terjadi pula pelepasan mediator inflamasi primer dan sekunder. Mediator primer menyebabkan eosinofil dan neutrofil serta menstimulasi terjadinya urtikaria (gatal), vasodilatasi, meningkatnya permeabilitas vaskular, Sedangkan mediator sekunder menyebabkan peningkatan pelepasan metabolit asam arakidonat (prostaglandin dan leukotrien) dan protein (sitokin and enzim) (Boediana, 1996). Golongan senyawa triterpenoid diduga memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Antioksidan ini dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan suatu radikal bebas yang dapat menarik berbagai mediator inflamasi dengan bereaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif (Halliwell, 1995 ; Korkina, 1997). Selain itu antioksidan juga dapat membatasi perluasan diameter bentol yang disebabkan oleh radikal bebas karena antioksidan membuat membran sel menjadi stabil (Singh *et al.*, 2011). Sehingga dapat menghindari terjadinya degranulasi sel mast.

Senyawa yang diduga memiliki aktivitas anti inflamasi dan anti alergi merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan sehingga selain antioksidan yang berasal dari triterpenoid antioksidan ini dapat berasal dari golongan senyawa flavonoid.

Pembanding yang digunakan adalah betametason 0,1%. Betametason merupakan salah satu obat golongan kortikosteroid yang memiliki khasiat sebagai immunosupresan dengan mekanisme kerja melalui antiinflamasi dengan menghambat fosfolipase, suatu enzim yang bertanggung jawab terhadap pelepasan asam arakhidonat dari membran lipid (Katzung, 1996).

Hasil dari pengamatan diuji secara statistik menggunakan metode student-T untuk membandingkan hasil pengamatan diameter bentol antara dan setelah pemberian obat. Hasil analisis data menggunakan student-t dapat dilihat pada lampiran 4.

Hasil pengujian statistik menggunakan metode student-T yang dapat dilihat pada lampiran 3, menunjukkan bahwa pada pengamatan diameter bentol pada kontrol positif memiliki nilai signifikansi $p > 0,05$ yang tidak menunjukkan perubahan penurunan diameter bentol yang bermakna. Maka dapat diketahui bahwa penurunan diameter bentol tidak dipengaruhi oleh faktor internal dari hewan percobaan. Pada pengamatan diameter bentol yang diberikan sediaan pembanding, minyak biji mimba, krim minyak biji mimba 10%, 15%, dan 20% memiliki nilai signifikansi $p < 0,05$ maka dapat disimpulkan bahwa pengukuran diameter bentol pada sektor yang diaplikasikan pembanding dan sediaan uji

mengalami penurunan diameter bentol dengan perbedaan yang bermakna terhadap kontrol positif.

Pengujian dilanjutkan dengan menggunakan metode ANAVA serta uji lanjutan Tukey (HSD) untuk mengetahui perbandingan perubahan diameter bentol antar kelompok pada jam yang sama.

Pada tabel IV.3 diketahui bahwa sektor yang diaplikasikan minyak biji mimba, krim minyak biji mimba 10%, 15%, dan 20% memiliki jumlah penurunan diameter yang bermakna ($p < 0,05$) pada t_2 jika dibandingkan kontrol positif. Sehingga dapat diketahui bahwa minyak biji mimba mulai bekerja pada 2 jam setelah diaplikasikannya sediaan. Jika dilihat dari hasil pengolahan data menggunakan ANAVA dan Tukey (lampiran 5) tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p > 0,05$) antar sediaan uji, sehingga dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi tidak menyebabkan perbedaan bermakna terhadap penurunan diameter bentol dan hal ini juga menunjukkan bahwa antara sediaan uji dengan pembanding tidak menunjukkan perbedaan bermakna terhadap penurunan diameter bentol sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan uji sebanding dengan betametason 0,1% . Pada t_3 terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara kontrol positif dengan krim minyak biji mimba 20%, namun hal ini tidak dapat dijadikan parameter keberhasilan terapi pada 24 jam setelah pemberian sediaan karena jika dilihat pada hasil analisis dengan student-t pada t_3 , sektor kontrol positif mengalami penurunan diameter yang hampir berbeda bermakna yaitu dengan nilai signifikansi 0,058.