



**PENGARUH NANOTRANSFERSOME EKSTRAK KULIT
JERUK NIPIS (*CITRUS AURANTIFOLIA* SWINGLE)
TERHADAP JUMLAH FIBROBLAS PADA PENYEMBUHAN
LUKA MUKOSA LABIAL TIKUS WISTAR**

**SKRIPSI
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

**OLEH:
DESI DWI KURNIAWATI
NIM: 165160101111042**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPL i

HALAMAN PENGESAHAN ii

HALAMAN PERSETUJUAN iii

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI iv

KATA PENGANTAR v

ABSTRAK vii

ABSTRACT viii

DAFTAR ISI ix

DAFTAR GAMBAR xiii

DAFTAR TABEL xiv

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH xv

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 4

1.3 Tujuan Penelitian 4

 1.3.1 Tujuan Umum 4

 1.3.2 Tujuan Khusus 5

1.4 Manfaat Penelitian 6

 1.4.1 Manfaat Akademis 6

 1.4.2 Manfaat Praktis 6

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) 7

2.2 Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) 8

 2.2.1 Flavonoid 9

 2.2.2 Tanin 10

 2.2.3 Saponin 10

 2.2.4 Alkaloid 10

2.3 Ekstraksi Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) 11

2.4 Kortikosteroid 13

2.5 Skrining Fitokimia 14

2.6 LC-MS 15

2.7 Nanopartikel dan Nanotransfersome 16

2.8 PSA 20



2.9 ESEM.....	21
2.10 Zeta Potensial.....	22
2.11 Tikus Wistar.....	23
2.12 Ulkus Traumatik.....	24
2.13 Penyembuhan Luka.....	25
2.14 Sel Fibroblas.....	26

BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....	31
3.2 Hipotesis Penelitian.....	32

BAB IV. METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian.....	33
4.2 Sampel Penelitian.....	34
4.3 Variabel Penelitian.....	35
4.3.1 Variabel Bebas.....	35
4.3.2 Variabel Terikat.....	35
4.3.3 Variabel Kontrol.....	35
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	36
4.4.1 Lokasi Penelitian.....	36
4.4.2 Waktu Penelitian.....	36
4.5 Alat/Instrumen dan Bahan Penelitian.....	36
4.5.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	36
4.5.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	37
4.5.3 Uji Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis dengan LCMS.....	37
4.5.4 Pembuatan Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	37
4.5.5 Uji Karakterisasi Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	37
4.5.6 Perawatan dan Pemeliharaan Hewan Coba.....	37
4.5.7 Induksi Termal pada Mukosa Labial Tikus Wistar.....	37
4.5.8 Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji.....	38
4.5.9 Pembedahan Hewan Uji.....	38
4.5.10 Pembuatan Preparat.....	38
4.5.11 Pengamatan Jumlah Fibroblas.....	38



4.6	Definisi Operasional.....	38
4.6.1	Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	38
4.6.2	Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.....	38
4.6.3	Ulkus Traumatik.....	39
4.6.4	Jumlah Fibroblas	39
4.7	Prosedur Penelitian.....	39
4.7.1	Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	39
4.7.2	Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	40
4.7.3	Uji Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis dengan LCMS	42
4.7.4	Pembuatan Nanotransfersome Ekstrak Kulit Nipis	42
4.7.5	Uji Karakterisasi Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis	43
4.7.6	Perawatan dan Pemeliharaan Hewan Coba	44
4.7.7	Induksi Termal pada Mukosa Labial Tikus Wistar	44
4.7.8	Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji.....	45
4.7.9	Pembedahan Hewan Uji.....	45
4.7.10	Pembuatan Preparat.....	45
4.7.11	Pengamatan Jumlah Fibroblas.....	47
4.8	Analisis Data	47
4.9	Alur Penelitian	48

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1	Hasil Penelitian	49
5.1.1	Uji Skrining Fitokimia	49
5.1.2	Uji LCMS	50
5.1.3	Uji PSA	51
5.1.4	Uji Zeta Potensial	51
5.1.5	Uji ESEM.....	51
5.2	Analisa Data.....	60
5.2.1	Uji Normalitas	60
5.2.2	Uji Homogenitas	60
5.2.3	Uji <i>One-way</i> Anova.....	60
5.2.4	Uji <i>Post-hoc</i> Tukey	61
5.3	Pembahasan Penelitian.....	62



BAB VI. PENUTUP

26.1 Kesimpulan 65

26.2 Saran 65

DAFTAR PUSTAKA 67

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pernyataan Keaslian Tulisan 73

Lampiran 2. Keterangan Kelayakan Etik 74

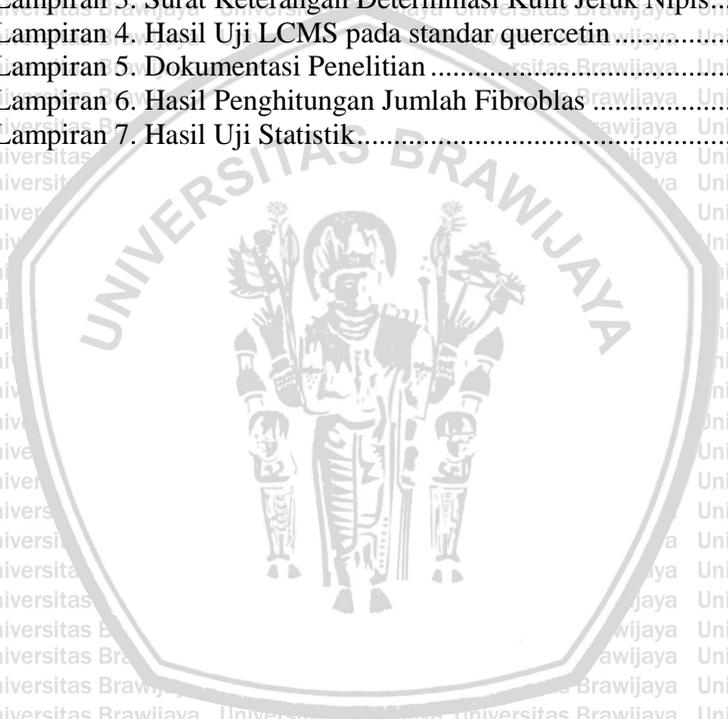
Lampiran 3. Surat Keterangan Determinasi Kulit Jeruk Nipis 75

Lampiran 4. Hasil Uji LCMS pada standar quercetin 76

Lampiran 5. Dokumentasi Penelitian 77

Lampiran 6. Hasil Penghitungan Jumlah Fibroblas 84

Lampiran 7. Hasil Uji Statistik 85



ABSTRAK

Desi Dwi Kurniawati, NIM: 165160101111042, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang, 3 November 2019, **Pengaruh Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) terhadap Jumlah Fibroblas pada Luka Mukosa Labial Tikus Wistar**, Tim Pembimbing: drg. Nenny Prasetyaningrum, M.Ked.

Penyembuhan luka pada ulkus traumatik dipengaruhi oleh proliferasi fibroblas. Kandungan flavonoid dalam kulit jeruk nipis dapat meningkatkan jumlah fibroblas. Peningkatan bioavailabilitas senyawa dapat dilakukan dengan membentuk senyawa nanopartikel. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar. Metode penelitian menggunakan *true experimental in vivo* dengan induksi termal mukosa labial tikus, dibagi menjadi 4 kelompok dengan *time series* hari 3 dan 7 yaitu kelompok kontrol negatif (K(-)3 dan K(-)7), kelompok kontrol positif dengan triamcinolone acetonida 0,1% (K(+3 dan K(+7), kelompok perlakuan ekstrak kulit jeruk nipis (P3A dan P7A), kelompok perlakuan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (P3B dan P7B). Kemudian dilakukan pengamatan jumlah fibroblas menggunakan mikroskop digital dengan perbesaran 400x. Analisa data menggunakan uji *One-way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan jumlah fibroblas yang signifikan antar kelompok baik pada hari ke-3 dan ke-7. Sehingga dapat disimpulkan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka.

Kata kunci: Fibroblas, flavonoid, nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), ulkus traumatik.



ABSTRACT

Desi Dwi Kurniawati, NIM: 165160101111042, Dentistry Study Programs, Faculty of Dentistry Brawijaya University Malang, 3 November 2019, **The Effect of Nanotransfersome Lime Peel Extract (*Citrus aurantifolia* Swingle) toward the number of Fibroblast in Healing of Wistar Rat Labial Wound**, Adviser: drg. Nenny Prasetyaningrum, M.Ked.

Wound healing in traumatic ulcers is affected by fibroblast proliferation. The contains of flavonoid in lime peel can increase the number of fibroblast. Increased bioavailability of coumpounds can be done by forming nanoparticle compound. The purpose of this study was to determine the effect of nanotransfersome lime peel extract (*citrus aurantifolia* Swingle) toward the number of fibroblast in healing of wistar rat labial wound. The research method used true experimental in vivo with thermal induction of wistar rats labial mucous, divided into 4 groups with time series days 3 and 7, that are negative control groups (K(-)3 and K(-)7), positive control groups given triamcinolone acetonida 0.1% (K(+))3 and K(+))7), treatment groups given lime peel extract (P3A and P7A), treatment groups given nanotransfersome lime peel extract (P3B and P7B). Then the number of fibroblasts was observed using a digital microscope with 400x magnification. Data analysis using One-Way ANOVA test showed that there were significant differences in the number of fibroblasts between groups on the 3rd and 7th day. So it can be concluded that nanotransfersome lime peel extract (*citrus aurantifolia* Swingle) affects the number of fibroblasts in wound healing.

Keywords: Fibroblast, flavonoid, nanotransfersome lime peel extract (*citrus aurantifolia* Swingle), traumatic ulcer.



BABI PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dekade terakhir ini banyak masyarakat yang menderita ulkus dengan prevalensi ulkus dalam mulut di seluruh dunia diketahui sebesar 4% (Amtha dkk., 2017). Ulkus adalah hilangnya seluruh ketebalan epitel sehingga jaringan ikat dibawahnya terbuka yang disebabkan oleh peradangan yang menembus membran mukosa atau kulit (Harty dan Ogston, 2014). Salah satu penyebab ulkus yang paling sering yaitu trauma yang dapat terjadi karena trauma fisik, termal, dan kimiawi. Penelitian di Meksiko oleh Castellanos *et al.* (2008) terhadap 1000 orang menunjukkan bahwa prevalensi ulkus traumatik sebesar 40,24%. Ulkus traumatik biasanya tampak sebagai ulkus soliter yang nyeri, disertai permukaan yang berwarna putih kekuningan dan daerah kemerahan tipis disekitar lesi. Ulkus traumatik dapat menyebabkan rasa nyeri, kesulitan mulut untuk beraktivitas, serta ketidaknyamanan pasien yang dapat mengganggu proses mastikasi. Ulkus traumatik dapat sembuh dalam beberapa hari apabila penyebabnya dihilangkan, tetapi jika trauma terjadi secara berulang dan tidak diobati maka ulkus akan bertambah parah menjadi trauma kronis yang dapat menyebabkan ulkus berkembang hingga terjadinya hiperplasia atau hiperkeratosis mukosa (Scully *et al.*, 2003).

Ketika terjadi luka, tubuh secara alami melakukan proses penyembuhan luka melalui kegiatan bioseluler dan biokimia yang terjadi secara berkesinambungan. Proses penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh peranan migrasi dan proliferasi fibroblas pada area perlukaan. Proliferasi fibroblas pada tahap penyembuhan luka mengindikasikan adanya proses penyembuhan yang berlangsung cepat. Hari ke-3 merupakan awal mulai diinduksi proliferasi fibroblas oleh growth factor yang dihasilkan makrofag. Hari ke-7 pasca luka termasuk dalam fase proliferasi yang pada fase ini jumlah sel fibroblas mencapai puncaknya di jaringan dan menjadi sel dominan, sementara hari



ke-21 merupakan akhir dari fase proliferasi sehingga diharapkan jumlah sel fibroblas telah menurun karena akan segera masuk pada fase remodelling (Hidayat, 2013). Peran fibroblas yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang salah satunya adalah kolagen yang digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Fungsi kolagen yang lebih spesifik adalah membentuk cikal bakal jaringan baru (connective tissue matrix) dan dengan dikeluarkannya substrat oleh fibroblas, memberikan tanda bahwa makrofag, pembuluh darah baru, dan juga fibroblas sebagai satu kesatuan unit dapat memasuki kawasan luka (Sumbayak, 2015).

Gejala ulkus traumatik adalah sakit serta ketidaknyamanan dalam 24 hingga 48 jam sesudah trauma terjadi. Ulkus ini akan sembuh dengan sendirinya dalam waktu 10 hingga 14 hari apabila iritan penyebab dihilangkan karena adanya proses keratinisasi dan pembaharuan sel-sel epitel mukosa oral (Sunarjo dkk., 2015). Obat yang biasa digunakan dalam perawatan ulkus traumatik di rongga mulut adalah kortikosteroid topikal. Kortikosteroid mempunyai kemampuan menekan inflamasi/peradangan dengan cara menghambat fosfolipase A dan menekan IL-1 α . (Johan, 2015). Efek samping kortikosteroid topikal adalah atrofi, striae atrofise, telangiektasis, purpura, dermatosis akneformis, hipertrikosis setempat, hipopigmentasi, dermatitis peroral (Levina, 2013). Kortikosteroid sering disebut *life saving drug* karena dalam penggunaannya sebagai antiinflamasi, tetapi kortikosteroid tidak berfungsi sebagai terapi kausal melainkan sebagai terapi paliatif yaitu menghambat gejalanya saja (Levina, 2013). Maka dari itu diperlukan obat dari bahan herbal yang juga dapat merangsang percepatan penyembuhan luka.

Salah satu tanaman (bahan herbal) yang tersebar diseluruh Indonesia dan mempunyai kandungan yang bermanfaat sebagai obat adalah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle). Buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) yang memiliki kandungan flavonoid, saponin, dan minyak atsiri banyak dikonsumsi oleh masyarakat sebagai penambah nafsu makan, penurun panas, diare, menguruskan badan, antiinflamasi, antibakteri, antioksidan (Haryanto, 2006). Tetapi kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*

Swingle) seringkali tidak dimanfaatkan oleh masyarakat dan dibuang begitu saja ketika sudah selesai menggunakan buahnya. Kulit jeruk nipis termasuk lapisan albedo, flavedo, dan lapisan segmennya memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi daripada jus butiran daging buahnya. Zat-zat dalam kulit jeruk tersebut mampu bekerja sebagai zat antiinflamasi, antibakteri, antimikroba, antivirus, antiulserogenik, antioksidan, antikanker, menurunkan kadar kolesterol, antineoplastik, antitumor, antiplatelet, antihepatotoksik, serta antihipertensi (Nogata *et al.*, 2006).

Flavonoid adalah zat metabolit sekunder pada jeruk nipis yang memiliki konsentrasi paling tinggi pada bagian kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) (Okwu, 2008). Flavonoid merupakan senyawa yang memberikan aktivitas antiinflamasi dengan menghambat pelepasan serotonin dan histamin yang merupakan mediator inflamasi ke tempat terjadinya radang. Flavonoid memiliki kemampuan imunomodulator yang dapat mengaktivasi makrofag. Makrofag yang aktif berfungsi untuk melakukan fagositosis, memproduksi TNF, perbaikan jaringan (fibroblas stimulating factor, fibronectin, kolagenase), sitokin, dan memproduksi hormone pertumbuhan (*growth factor*). *Growth factor* ini bertanggung jawab atas terjadinya inflamasi dan proses mitogen fibroblas yang penting dalam proses penyembuhan luka (Widyastomo dkk., 2013). Dengan kata lain, kulit jeruk nipis masih dapat diolah untuk mendapatkan flavonoid yang berperan dalam penyembuhan luka.

Dalam penelitian sebelumnya oleh Wardani dkk (2017) telah dibuktikan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis berpengaruh terhadap penyembuhan ulkus traumatik. Tetapi dalam penelitian ini, peneliti ingin meningkatkan penghantaran obat dengan cara memperkecil ukuran partikel menjadi nano. Nanopartikel dapat memperbaiki bioavailabilitas oral dari obat-obatan yang kelarutannya rendah dan meningkatkan penghantaran suatu obat melewati membran (Ramadon & Mun'im, 2016). Pada sistem penghantaran transdermal atau topikal diperlukan kemampuan penetrasi yang tinggi, maka dari itu dibutuhkan obat yang memiliki sifat menyerupai kulit atau mukosa yang dituju. Mukosa

rongga mulut memiliki sifat hidrofilik dan hidrofobik. Nanopartikel dalam sediaan farmasi salah satunya berupa transfersome. Menurut Singh (2013) komponen bahan transfersome terdiri dari gugus hidrofilik dan hidrofobik yang dapat digunakan sebagai pembawa obat dengan berbagai kelarutan. Transfersome artinya adalah tetesan lipid bilayer yang memiliki kemampuan deformabiliti dimana mampu membuat penetrasi yang mudah melalui pori yang lebih kecil dibandingkan ukuran droplet itu sendiri. Transfersome adalah vesikel buatan dan mirip dengan vesikel sel alami. Sehingga cocok untuk penghantaran obat terkontrol dan tertarget. Transfersome melindungi obat dari degradasi metabolisme dan bertindak sebagai depot melepaskan isinya perlahan-lahan (Prajapati *et al*, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, disimpulkan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat paling banyak pada kulit jeruk nipis dapat ditingkatkan penetrasinya dengan cara mensintesisnya menjadi bentuk nanopartikel. Pembentukan nanopartikel yang akan dicapai yaitu dengan metode enkapsulasi transfersome (nanotransfersome). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis kandungan senyawa organik ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) dengan uji skrining fitokimia dan uji karakterisasi LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*).
2. Menganalisis morfologi, ukuran, dan muatan partikel dari padatan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) dengan uji karakterisasi menggunakan alat ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), PSA (*Particle Size Analyzer*), dan Zeta Potensial.
3. Menghitung dan membandingkan perbedaan jumlah fibroblas pada penyembuhan luka ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar yang diinduksi termal pada kelompok tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis, kelompok yang diberi triamcinolone acetonida 0.1%, kelompok yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis, dan kelompok yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) pada hari ke-3.
4. Menghitung dan membandingkan perbedaan jumlah fibroblas pada penyembuhan luka ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar yang diinduksi termal pada kelompok tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis, kelompok yang diberi triamcinolone acetonida 0.1%, kelompok yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis, dan kelompok yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) pada hari ke-7.
5. Membandingkan dan menganalisis perbedaan jumlah fibroblas pada penyembuhan luka ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar yang diinduksi termal pada kelompok tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis, kelompok yang diberi triamcinolone acetonida 0.1%, kelompok yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis, dan kelompok yang diberi nanotransfersome

ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) pada hari ke-3 dan 7.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Secara teoritis penelitian ini ingin memberikan informasi ilmiah tentang pengaruh nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar.
2. Memperluas pengetahuan tentang nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle).

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar.
2. Menghasilkan sebuah produk yang dapat membantu penyembuhan luka mukosa labial untuk masyarakat sekitar.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

1.1 Jeruk Nipis

Gambar 2.1 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle)



(Sumber: Rukmana, 2003)

Jeruk nipis bukan merupakan tanaman asli Indonesia. Menurut sejarah, asal tanaman jeruk nipis adalah Asia Tenggara. Jeruk nipis masuk ke Indonesia dibawa oleh orang-orang Belanda. Di Indonesia, Jeruk nipis mempunyai banyak nama daerah, antara lain *jeruk mipis* (Sunda), *jeruk pecel* (Jawa), dan *jeruk dhurga* (Madura). Kedudukan tanaman jeruk nipis dalam sistematika tumbuh-tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut.

Kingdom : *Plantae* (tumbuh-tumbuhan)

Divisi : *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji)

Subdivisi : *Angiospermae* (berbiji tertutup)

Kelas : *Dicotyledonae* (biji berkeping dua)

Ordo : *Rutales*

Famili : *Rutaceae*

Genus : *Citrus*

Spesies : *Citrus aurantifolia* Swingle

Pada mulanya, jeruk nipis mempunyai nama latin *Citrus aurantium* subspesies *aurantifolia*. Dalam perkembangan selanjutnya, jeruk nipis dikenal dengan nama *Citrus aurantifolia* Swingle. Tanaman jeruk nipis berbentuk perdu, rindang (rimbun), dan memiliki banyak percabangan. Cabang dan ranting berduri. Tinggi tanaman berkisar antara 150 cm - 350 cm. Perakaran tanaman cukup kuat, cukup dalam, dan dapat tumbuh dengan baik pada segala jenis tanah. Daun berbentuk bulat panjang dan tumpul pada bagian ujung. Tangkai daun agak bersayap. Permukaan daun bagian atas berwarna hijau tua mengilap, sedangkan bagian bawah berwarna hijau muda. Kedudukan daun pada ranting pada umumnya mendatar. Buah jeruk nipis berukuran panjang antara 3,5 cm – 5,0 cm dan diameter antara 3,5 cm – 5,0 cm, dengan tebal kulit buah antara 0,2 mm – 0,5 mm. Ujung buah tidak berputing, namun biasanya rata atau agak menjorok ke dalam. Buah muda berwarna hijau, sedangkan buah yang sudah masak berwarna kuning kehijauan dengan permukaan kulit yang bercelah halus (Rukmana, 2003).

Jeruk nipis mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang bermanfaat seperti asam sitrat, asam amino (triptofan, lisin), minyak atsiri (sitril, limonen, felandren, lemon kamfer, kadinen, gerani-lasetat, linali-lasetat, aktilaldehid, nonilaldehid), damar, glikosida, asam sitrun, lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang vitamin B1 dan C. Jeruk nipis juga mengandung senyawa saponin dan flavonoid yaitu hesperidin (hesperetin 7-rutinosida), tangeretin, naringin, eriocitrin, eriocitrocid (Adindaputri Zenia dkk., 2013).

2.2 Kulit Jeruk Nipis

Kulit buah jeruk nipis juga memiliki peranan penting bagi kesehatan. Berdasarkan hasil uji fitokimia dari penelitian Hardyanti dkk (2018) menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Selain itu Kandungan minyak atsiri juga terdapat dalam kulit jeruk nipis dan dapat digunakan sebagai obat herbal (Ekawati dkk., 2017)

2.2.1 Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga. Flavonoid yang lazim ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi (Angiospermae) adalah flavon dan flavonol dengan C- dan O-glikosida, isoflavon C- dan O-glikosida, flavanon C- dan O-glikosida, khalkon dengan C- dan O-glikosida dan dihidrokhalkon, proantosianidin dan antosianin, auron O-glikosida dan dihidroflavonol O-glikosida. Golongan flavon, flavonol, falvanon, isoflavon, dan khalkon juga sering ditemukan dalam bentuk aglikonnya (Waji dan Sugrani, 2009).

Flavonoid termasuk senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Senyawa-senyawa ini dapat ditemukan pada batang, daun, bunga, dan buah. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti-inflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Waji dan Sugrani, 2009).

Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar, kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid. Kuersetin (*Quercetin*) adalah salah satu zat aktif kelas flavonoid yang secara biologis amat kuat. Bila vitamin C mempunyai aktivitas antioksidan 1, maka kuersetin memiliki aktivitas antioksidan 4,7. Flavonoid merupakan sekelompok besar antioksidan bersama polifenol yang terdiri atas antosianin, biflavon, katekin, flavanon, flavon, dan flavonol. Kuersetin termasuk kedalam kelompok flavonol (Waji dan Sugrani, 2009).

Kuersetin dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit *degenerative* dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak. Kuersetin memperlihatkan kemampuan mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoproteins* (LDL) dengan cara menangkap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi (Waji dan Sugrani, 2009).

2.2.2 Tanin

Tanin adalah salah satu golongan senyawa polifenol yang juga banyak dijumpai pada tanaman. Tanin dapat didefinisikan sebagai senyawa polifenol dengan berat molekul yang sangat besar yaitu lebih dari 1000 g/mol serta dapat membentuk senyawa kompleks dengan protein. Tanin memiliki peranan biologis yang besar karena fungsinya sebagai pengendap protein dan penghelat logam. Oeh karena itu tanin diprediksi dapat berperan sebagai antioksidan biologis (Noer dkk., 2018).

2.2.3 Saponin

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tanaman tingkat tinggi serta beberapa hewan laut dan merupakan kelompok senyawa yang beragam dalam struktur, sifat fisikokimia dan efek biologisnya. Dampak positif saponin banyak dimanfaatkan untuk kepentingan manusia karena saponin memiliki aktivitas yang luas seperti antibakteri, antifungi, kemampuan menurunkan kolesterol dalam darah dan menghambat pertumbuhan sel tumor. Hasil penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* pada mencit menunjukkan bahwa pemberian saponin dapat menurunkan konsentrasi kolesterol dalam darah. Hasil penelitian aktivitas antibakteri dan antifungi menggunakan metode disc diffusion test juga menunjukkan bahwa saponin memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri maupun fungi. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengungkap aktivitas antitumor saponin *in vivo* dengan menggunakan hewan uji mencit maupun tikus putih (Yanuartono dkk., 2017).

2.2.4 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuhan-tumbuhan, terutama angiosperm. Lebih dari 20% spesies angiosperm mengandung alkaloid. Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman, seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang. Alkaloida umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan. Alkaloid bersifat basa, sehingga dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam

tumbuhan. Senyawa alkaloid berkhasiat sebagai anti diare, anti diabetes, anti mikroba dan anti malaria. (Ningrum dkk., 2016).

2.3 Ekstraksi Kulit Jeruk Nipis

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengesktraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang terisi diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Istiqomah, 2013)

Ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya, yaitu (Istiqomah, 2013):

1. Ekstrak encer adalah sediaan yang memiliki konsistensi semacam madu dan dapat dituang.
2. Ekstrak kental adalah sediaan yang dilihat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya berjumlah sampai 30%. Tingginya kandungan air menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri.
3. Ekstrak kering adalah sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%.
4. Ekstrak cair adalah ekstrak yang dibuat sedemikiannya sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan 2 bagian ekstrak cair.

Ekstraksi kulit jeruk nipis menggunakan metode maserasi. Maserasi adalah proses pengesktrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi dilakukan dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan atau kamar (Depkes RI, 2000).

Maserasi berasal dari bahasa latin *Macerace* berarti mengairi dan melunakkan. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Dasar dari maserasi adalah melarutnya bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak, yang terbentuk pada saat penghalusan, ekstraksi (difusi) bahan kandungan dari sel yang masih utuh. Setelah selesai waktu maserasi, artinya keseimbangan antara bahan yang

diekstraksi pada bagian dalam sel dengan masuk kedalam cairan, telah tercapai maka proses difusi segera berakhir. Selama maserasi atau proses perendaman dilakukan pengocokan berulang-ulang. Upaya ini menjamin keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi yang lebih cepat didalam cairan. Sedangkan keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunannya perpindahan bahan aktif. Secara teoritis pada suatu maserasi tidak memungkinkan terjadinya ekstraksi absolut. Semakin besar perbandingan simplisia terhadap cairan pengekraksi, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Istiqomah, 2013).

Terdapat pula kerugian pada metode maserasi ini yaitu pengerjaannya yang lama dan pelarutannya kurang sempurna. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes RI, 2000).

Proses pembuatan ekstrak melalui tahap-tahap sebagai berikut (Depkes RI, 2000):

1. Pembasahan

Pembasahan serbuk dilakukan pada pelarutan, dimaksudkan memberikan kesempatan sebesar-besarnya kepada cairan pelarut memasuki pori-pori dalam simplisia sehingga mempermudah pelarutan selanjutnya.

2. Pelarut

Cairan pelarut yang digunakan dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau aktif. Pelarut tersebut dapat dipisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya. Faktor utama yang menjadi pertimbangan dalam pemilihan cairan pelarut adalah selektifitas, ekonomis, kemudahan bekerja, ramah lingkungan, dan aman.

Dalam hal keamanan untuk manusia atau hewan uji, cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi "*Pharmaceutical grade*". Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air, alkohol (etanol), atau campuran (air dan alkohol).

3. Pemisahan dan Pemurnian

Tujuannya adalah untuk menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa pengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni. Proses-proses pada tahap ini adalah pengendapan, pemisahan dua cairan tak bercampur, sentrifugasi, dekantasi, filtrasi, serta proses absorpsi dan penukar ion.

4. Pemekatan/Penguapan

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partikel solut (senyawa terlarut) dengan cara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kering tetapi ekstrak hanya menjadi kental/pekat.

2.4 Kortikosteroid

Kortikosteroid merupakan derivat hormon kortikosteroid yang dihasilkan oleh kelenjar adrenal. Hormon ini memainkan peran penting termasuk mengontrol respon inflamasi. Kortikosteroid hormonal dapat digolongkan menjadi glukokortikoid dan mineralokortikoid. Golongan glukokortikoid adalah kortikosteroid yang efek utamanya terhadap penyimpanan glikogen hepar dan khasiat antiinflamasi nyata. Prototip golongan ini adalah kortisol dan kortison, yang merupakan glukokortikoid alami. Terdapat juga glukokortikoid sintetik, misalnya prednisolon, triamsinolon, dan betametason. Golongan mineralokortikoid adalah kortikosteroid yang mempunyai aktivitas utama menahan garam dan terhadap keseimbangan air dan elektrolit. Umumnya golongan ini tidak mempunyai efek antiinflamasi yang berarti, sehingga jarang digunakan. Pada manusia, mineralokortikoid yang terpenting adalah aldosteron. Berdasarkan cara penggunaannya, kortikosteroid dapat dibagi dua, yaitu kortikosteroid sistemik dan kortikosteroid topikal (Johan, 2015).

Kortikosteroid mempunyai kemampuan menekan inflamasi/peradangan dengan cara menghambat fosfolipase A dan menekan IL-1 α . Sebagai obat immunosupresan, kortikosteroid dapat menghambat kemotaksis n_e , menurunkan jumlah sel Langerhans dan menekan pengekitan sitokin, menekan reaksi alergi-immunologi, serta menekan proliferasi/antimitotik. Kortikosteroid juga menyebabkan vasokonstriksi dan efek ini sejalan dengan daya

antiinflamasi. Pemakaian kortikosteroid jangka panjang atau potensi kuat menginduksi atrofi kulit, striae, telangiectasi, purpura, hipopigmentasi, akneiformis, dermatitis perioral, hipertrikosis, dan moonface. Pada pemakaian Kortikosteroid tidak terkontrol dan jarang dilaporkan adalah adiksi kortikosteroid. Beberapa contoh adiksi kortikosteroid, yaitu lesi eritematosa di wajah setelah peeling, kulit skrotum tipis dan merah, vulvodinia, atrofi perianal, dan dermatitis atopik rekalsitrans. Pemakaian Kortikosteroid jangka panjang di wajah dapat menyebabkan topical corticosteroids-induced rosacea-like dermatitis atau topical steroid-dependent face (Johan, 2015).

2.5 Skrining Fitokimia

Skirining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam suatu penelitian fitokimia yang bertujuan memberi gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang diteliti. Metode skrining fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna (Simaremare, 2014). Skrining fitokimia serbuk simplisia dan sampel dalam bentuk basah meliputi pemeriksaan kandungan senyawa alkaloid, flavonoida, terpenoida/steroida, tannin, dan saponin (Khotimah, 2016).

Fitokimia merupakan ilmu pengetahuan yang menguraikan aspek kimia suatu tanaman. Kajian fitkomia meliputi uraian yang mencakup aneka ragam senyawa organik yang dibentuk dan disimpan oleh organisme, yaitu struktur kimianya, biosintesisnya, perubahan serta metabolismenya, penyebarannya secara alamiah dan fungsi biologisnya, isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari bermacam-macam jenis tanaman (Khotimah, 2016). Analisis fitokimia dilakukan untuk menentukan ciri komponen bioaktif suatu ekstrak kasar yang mempunyai efek racun atau efek farmakologis lain yang bermanfaat bila diujikan dengan sistem biologi atau bioassay (Khotimah, 2016)

Skrining fitokimia berguna untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam bahan, hasil dipengaruhi oleh pemilihan pelarut serta metode ekstraksi yang digunakan. Kandungan senyawa bioaktif suatu tumbuhan mengalami perbedaan disebabkan juga oleh beberapa faktor, diantaranya faktor lingkungan seperti tinggi tempat, jenis tanah, iklim dan pembentukan metabolit sekunder di dalam

tanaman yang dipengaruhi oleh suhu, pH, aktivitas air dan intensitas cahaya (Pratita, 2017).

2.6 LCMS (*Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry*)

LCMS adalah teknik kimia analisis yang merupakan penggabungan dari pemisahan fisik menggunakan kromatografi cair dan deteksi massa molekul dengan spektrometri massa. LCMS merupakan uji yang banyak digunakan untuk berbagai aplikasi yang memiliki sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi. LCMS berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya (prinsip kerja kromatografi), dimana setelah campuran senyawa tersebut terpisah maka senyawa yang murni akan diidentifikasi berat molekulnya. Data yang didapatkan adalah berat molekul ditambah beberapa muatan dan berat molekul pelarut. LCMS menggabungkan kemampuan pemisahan kimia dari LC dengan kemampuan dari spektroskopi massa untuk menyeleksi temuan dan mengkonfirmasi identitas molekuler. MS merupakan salah satu metode yang lebih sensitif dan selektif untuk menganalisis molekuler, serta menyediakan informasi pada berat molekul sebaik pada fragmentasi dari molekul analit (Khotimah, 2016).

1. LC (*Liquid Chromatograph*) atau Kromatografi Cair

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Pada kromatografi, komponen-komponennya akan dipisahkan antara dua buah fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam akan menahan komponen campuran, sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Komponen yang mudah tertahan pada fase diam akan tertinggal, sedangkan komponen yang mudah larut dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat (Mulya, 2012).

2. MS (*Mass Spectrometry*)

MS (*Mass Spectrometry*) adalah instrumen yang menyusun molekul gas (ion) berdasarkan massanya. Ada beberapa jenis *mass spectrometry* yang harus memiliki komponen yang berfungsi sebagai berikut:

- Mengionisasi sampel,
- Mengakselerasi ion di daerah listrik,

- c. Mendispersi ion sesuai massanya,
- d. Mendeteksi ion untuk menghasilkan sinyal listrik yang sesuai.

Mass Spectrometry tergantung pada aliran ion gas yang melewati daerah listrik dan medan magnet sampai ke detektor untuk di evakuasi. Teknik dalam proses ionisasi tidak lebih dari 10^{-3} Pa (sekitar 10^{-5} torr). Hal ini membutuhkan pemompaan ion yang efisien dan berkelanjutan, selanjutnya ion ditangkap oleh nitrogen cair. Spektrometri massa bekerja dengan mengionisasi atom-atom atau molekul-molekul, kemudian menyeleksi dan mendeteksi ion-ion berdasarkan perbandingan massa. Terhadap muatannya. Komponen-komponen yang utama dalam proses ini adalah sumber ion untuk menghasilkan ion-ion dan penganalisis massa untuk menyeleksi ion-ion. Untuk massa dari ion yang akan ditentukan, ion tersebut harus melalui penganalisis massa untuk ke detektor (Mulya, 2012).

2.7 Nanopartikel dan Nanotransfersome

Penghantaran nanopartikel dideskripsikan sebagai formulasi suatu partikel yang terdispersi pada ukuran nanometer atau skala per seribu mikron. Batasan ukuran partikel yang pasti untuk sistem ini masih terdapat perbedaan karena nanopartikel pada sistem penghantaran obat berbeda dengan teknologi nanopartikel secara umum. Pada beberapa sumber disebutkan bahwa nanopartikel baru menunjukkan sifat khasnya pada ukuran diameter di bawah 100 nm, namun batasan ini sulit dicapai untuk sistem nanopartikel sebagai sistem penghantaran obat. Nanopartikel obat secara umum harus terkandung obat dengan jumlah yang cukup di dalam matriks pada tiap butir partikel, sehingga memerlukan ukuran yang relatif lebih besar dibanding nanopartikel non-farmasetik. Meskipun demikian secara umum tetap disepakati bahwa nanopartikel merupakan partikel yang memiliki ukuran di bawah 1 mikron (Martien dkk., 2012). Ukuran ini dapat dikarakterisasi secara sederhana dan secara visual menghasilkan dispersi yang relatif transparan, serta perpanjangan lama pengendapan disebabkan karena resultan gaya ke bawah akibat gravitasi sudah jauh berkurang. Hal tersebut sebagai akibat dari berkurangnya massa tiap partikel dan peningkatan luas permukaan total yang signifikan

menghasilkan interaksi tolak menolak antar partikel yang besar dan muncul fenomena gerak Brown sebagai salah satu karakter spesifik partikel pada ukuran koloidal (Martien dkk., 2012).

Beberapa kelebihan nanopartikel adalah kemampuan untuk menembus ruang-ruang antar sel yang hanya dapat ditembus oleh ukuran partikel koloidal (Martien dkk., 2012), kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi, baik melalui difusi maupun opsonifikasi, dan fleksibilitasnya untuk dikombinasi dengan berbagai teknologi lain sehingga membuka potensi yang luas untuk dikembangkan pada berbagai keperluan dan target. Kelebihan lain dari nanopartikel adalah adanya peningkatan afinitas dari sistem karena peningkatan luas permukaan kontak pada jumlah yang sama (Martien dkk., 2012). Pembentukan nanopartikel dapat dicapai dengan berbagai teknik yang sederhana. Nanopartikel pada sediaan farmasi dapat berupa sistem obat dalam matriks seperti nanosfer dan nanokapsul, nanopartikel, nanoemulsi, dan sebagai sistem yang dikombinasikan dalam perancah (scaffold) dan penghantaran transdermal (Martien dkk., 2012).

Pada sistem penghantaran transdermal atau topikal untuk menaikkan penetrasi dari obat dapat digunakan sistem vesikular seperti liposom, transfersome, etosom. Liposom atau gelembung lemak adalah partikel koloid yang dapat dibuat dengan turunan molekul fosfolipid baik dari sumber alam maupun sintesis kimia (Amalia, 2004). Fosfolipid melakukan peran yang penting dengan sifat yang amfifilik dan self-assembly untuk mengenkapsulasi suatu agen terapeutik (Khan, 2013). Amfifilik merupakan senyawa yang bersifat hidrofilik dan lipofilik sehingga dapat larut dalam senyawa polar dan non polar.

Transfersome merupakan liposom ultrafleksibel yang terdiri dari bilayer sebagai fosfolipid dan aktivator tepi. Transfersome lebih elastis daripada liposom konvensional. Elastisitas vesikel ini disebabkan oleh adanya aktivator tepi yang mampu melemahkan lapisan lemak lipid vesikel dan meningkatkan deformabilitas dan fleksibilitasnya. Spans, Tweens, dipotassium glycyrrhizinate, sodium cholate dan sodium deoxycholate digunakan sebagai aktivator tepi (Rai et al, 2017).

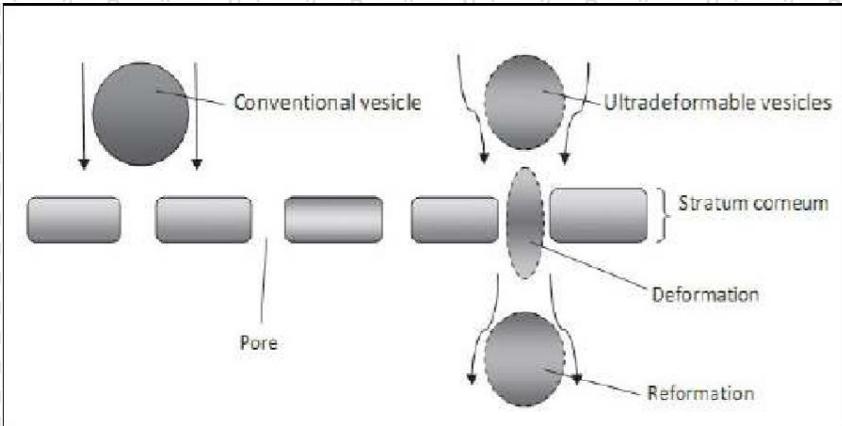
Transfersome berasal dari bahasa latin *transferre* yang artinya membawa menembus dan Yunani a *soma* yang artinya tubuh.

Transfersome adalah vesikel buatan dan mirip dengan vesikel sel alami. Sehingga cocok untuk penghantaran obat terkontrol dan tertarget. Transfersome melindungi obat dari degradasi metabolisme dan bertindak sebagai depot melepaskan isinya perlahan-lahan (Prajapati *et al*, 2011).

Transfersome merupakan tetesan lipid bilayer yang memiliki kemampuan deformabiliti dimana mampu membuat penetrasi yang mudah melalui pori yang lebih kecil dibandingkan ukuran droplet itu sendiri. Ketika diaplikasikan ke dalam kulit, pembawa mencari dan mengeksploitasi jalur hidrofilik atau pori diantara sel didalam kulit, pembawa mencari dan membiarkan vesikel masuk bersama muatan obatnya, mengubah bentuk dirinya dengan esktrim tanpa kehilangan integritas bentuk vesikularnya. Fleksibilitas dari membrane transfersome diperoleh karena pencampuran yang sesuai antara komponen aktif dalam rasio yang tepat. Fleksibilitas dari transfersome meminimalkan resiko vesikel pecah di dalam kulit dan membiarkan transfersome mengikuti gradien air alami melewati epidermis ketika diaplikasikan kondisi nonoklusif (Prajapati *et al*, 2011).

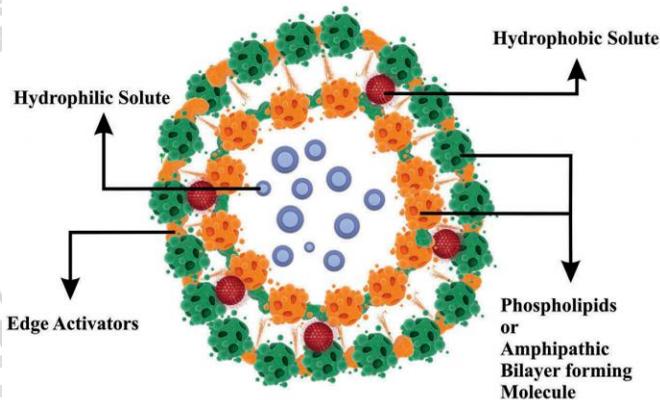
Adapun kelebihan transfersome dibandingkan bentuk penghantaran obat lainnya adalah komponen bahan transfersome yang terdiri dari gugus hidrofobik dan hidrofilik dapat digunakan sebagai pembawa obat dengan berbagai kelarutan. Deformabilitas yang tinggi menyebabkan transfersome dapat melewati pori-pori atau celah (5 sampai 10 kali lebih kecil dari diameternya) menyesuaikan dengan diameter pori dan dapat kembali ke bentuk semula tanpa merusak ukuran dan bentuk awal. Kelebihan lain dari transfersome adalah sebagai pembawa obat yang memiliki berat molekul yang rendah sampai tinggi misalnya analgesic, anestetik, kortikosteroid, hormone, antikanker, antiinflamasi non steroid (AINS), insulin, *gap junction proteins*, albumin (Singh, 2013). Transfersome diformulasi menggunakan fosfolipid (lesitin) sebagai vesikel pembentuk materi, surfaktan (tween) untuk memberikan fleksibilitas, alkohol (kloroform) sebagai pelarut, dan *buffering agent* (PBS) sebagai medium hidrasi transfersome (Giriraj, 2011).

Gambar 2.2 Skema Rute Penetrasi Vesikel



(Sumber: Ermawati, 2017)

Gambar 2.3 Diagram Skematik dari Struktur Transfersome



(Sumber: Rai et al, 2017)

Nanotransfersome telah didefinisikan sebagai partikel vesikuler yang dirancang khusus yang terdiri dari setidaknya satu bagian dalam yang dienkapsulasi oleh vesikel lipid dengan morfologi seperti liposom. Namun secara fungsional, nanotransfersome dapat melewati pori-pori jauh lebih kecil dari ukurannya sendiri (Rai et al, 2017). Oleh karena itu, nanotransfersome dapat menambah penetrasi

obat karena mengandung komponen surfaktan yang dapat melarutkan obat sehingga meningkatkan fungsi obat (Chaudarya et al, 2013).

2.8 PSA (*Particle Size Analyzer*)

Particle Size Analyzer adalah suatu alat yang digunakan untuk melihat ukuran dan distribusi nanopartikel yang diukur menggunakan prinsip *Photon Correlation Spectroscopy* dan *Electrophoretic Light Scattering*. Rentang pengukuran dengan alat ini yaitu $0,6 \mu\text{m} - 7 \text{ nm}$ (Abdassah, 2017). Dalam penelitian ini diperlukan ukuran partikel dengan rentang 10-1000 nm atau dibawah $1 \mu\text{m}$. Yang diukur dalam pengukuran ini adalah gerak Brownian partikel dalam medium dan mengkorelasikannya dengan ukuran partikel tersebut. Prinsip kerjanya yaitu dengan mengiluminasikan cahaya laser dan menganalisa fluktuasi intensitas dari cahaya yang terhambur oleh partikel (Ratnawati dan Ermawati, 2011).

Konsepnya bahwa partikel kecil dalam suspense bergerak dengan pola secara acak, kemudian sinar laser menyinarinya. Semakin besar ukuran partikel, semakin lambat Gerak Brown. Ukuran dan distribusi partikel merupakan karakteristik yang paling penting dalam sistem nanopartikel. Hal ini digunakan untuk memperkirakan distribusi secara *in vivo*, biologis, toksisitas, dan kemampuan membidik dari sistem nanopartikel (Abdassah, 2017).

Penentuan ukuran dan distribusi ukuran nanopartikel harus dilakukan karena mempengaruhi secara langsung keunikan sifat nanopartikel. Metode yang dapat digunakan antara lain *Dynamic Light Scattering* (DLS), *Static Light Scattering* (SLS), NMR, turbidimetri, dan lain sebagainya (Abdassah, 2017). Setelah sampel diukur dengan perhitungan beberapa jenis menghasilkan representasi dari distribusi ukuran partikel. Partikel distribusi ukuran dapat dihitung sebagai angka atau volume distribusi massa. Analisis memberikan nilai ukuran untuk setiap partikel yang diperiksa (Abdassah, 2017).

2.9 ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*)

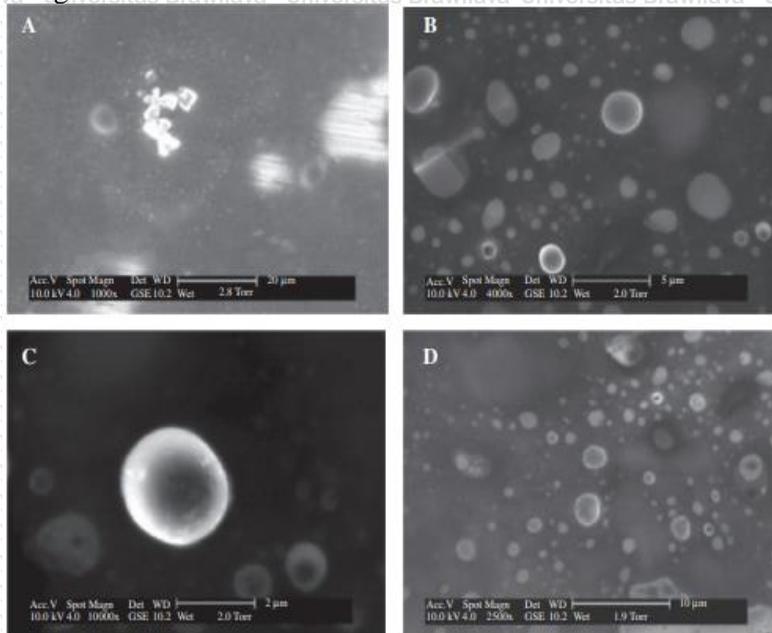
SEM adalah sebuah mikroskop elektron yang di desain untuk menyelidiki permukaan dari objek solid secara langsung, yang memiliki perbesaran 10 – 3000000x, depth of field 4 – 0.4 mm dan resolusi sebesar 1–10 nm (Lubis, 2015) SEM digunakan untuk melihat morfologi dan karakteristik dari suatu partikel. Dalam penelitian ini

yang diamati adalah morfologi morfomersome yang menunjukkan bentuk vesikel yang bulat dengan ukuran partikel yang bervariasi.

SEM mulai muncul secara komersial pada pertengahan sembilan belas enam puluhan. Karena keunggulan kinerja SEM dibandingkan jenis mikroskop lain, SEM dengan cepat menjadi alat yang sangat diperlukan dalam berbagai aplikasi ilmiah. Batasan utama SEM sebagai pencitraan umum dan teknik analisis adalah pembatasan yang dikenakan pada sampel dengan memerlukan lingkungan sampel vakum tinggi, sampel harus bersih, kering, dan konduktif listrik (Johnson, 1996).

Pertengahan delapan puluhan melihat pengembangan SEM Lingkungan atau ESEM yang memiliki keuntungan utama terletak pada memungkinkan ahli mikroskop untuk memvariasikan lingkungan sampel melalui berbagai tekanan, suhu dan komposisi gas. ESEM mempertahankan semua keunggulan kinerja SEM konvensional, tetapi menghilangkan kendala vakum tinggi pada lingkungan sampel. Sampel basah, berminyak, kotor, non-konduktif dapat diperiksa dalam keadaan alami tanpa modifikasi atau persiapan. ESEM menawarkan pencitraan elektron sekunder resolusi tinggi dalam lingkungan gas dari hampir semua komposisi, pada tekanan setinggi 50 Torr, dan suhu setinggi 1500 ° C. ESEM telah dibuka untuk penyelidikan SEM sejumlah aplikasi yang sebelumnya tidak mungkin. Sama pentingnya, ESEM telah menghilangkan sebagian besar persiapan sampel yang diperlukan untuk aplikasi SEM sebelumnya. (Johnson, 1996). Tetapi ESEM memiliki kekurangan yaitu berkas elektron menyebar di ruang lingkungan bertekanan tinggi dan mengeluarkan sinar-X fluoresen dari seluruh spesimen, tidak hanya dari bawah berkas elektron. Sinar-X fluoresen yang dihasilkan di luar area yang diinginkan terdeteksi oleh detektor dan mengurangi kontras gambar (XOS, 2019).

Gambar 2.4 Uji ESEM liposom ibuprofen terbuat dari fosfolipid dan kolesterol didispersikan dalam larutan salin dapar fosfat 0,01M (pH 7,4). Struktur liposom yang stabil diamati ketika mengalami dehidrasi terkontrol.



(Sumber: Mahmood *et al*, 2017)

2.10 Zeta Potensial

Zeta potensial adalah suatu nilai yang digunakan untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanopartikel, berkaitan dengan interaksi elektrostatik nanopartikel. Interaksi elektrostatik akan menentukan kecenderungan agregasi dan tolak menolak. Potensial zeta adalah ukuran muatan permukaan partikel yang tersebar dalam medium pendispersi. Idealnya, muatan potensial zeta partikel harus lebih tinggi daripada medium pendispersi untuk mencegah agregasi. Potensial zeta harus dapat dikendalikan (Abdassah, 2017).

Nanopartikel dengan nilai potensial zeta lebih kecil dari -30 mV dan lebih besar dari +30 mV memiliki stabilitas lebih tinggi. Atau dengan kata lain, nilai potensial zeta dikatakan stabil ketika menjauhi titik isoelektrik yaitu 0, sehingga terjadi tolak-menolak. Sistem

dispersi dengan nilai zeta potensial yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (Nanocomposix, 2012 dalam Abdassah, 2017).

2.11 Tikus Wistar

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) atau yang dikenal sebagai Norway rat merupakan hewan percobaan yang sering digunakan pada penelitian biomedis, pengujian, dan pendidikan. Hal ini dikarenakan genetik yang terkarakteristik dengan baik, galur yang bervariasi dan tersedia dalam jumlah yang banyak. Tikus dan mencit untuk kepentingan penelitian atau laboratorium merupakan jenis albino yang kehilangan pigmen melaninnya, sifat tersebut menurun pada anak-anaknya. Taksonomi dari tikus putih adalah sebagai berikut (Fauziyah, 2016):

Kingdom : *Animalia*
Divisi : *Chordata*
Kelas : *Mammalia*
Ordo : *Rodentia*
Famili : *Muridae*
Subfamili : *Murinae*
Genus : *Rattus*
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tikus Wistar merupakan salah satu galur tikus paling populer yang digunakan untuk penelitian laboratorium yaitu sebagai model dalam penelitian biomedik. Tikus Wistar (albino) dikembangkan pertama kali di Wistar Institute Philadelphia pada tahun 1906 dengan nama katalog WISTARAT®. Karakteristik tikus Wistar adalah kepala tikus yang lebar, telinga panjang, dan memiliki panjang ekor yang kurang dari panjang tubuhnya. Tikus Wistar lebih aktif (agresif) dari pada jenis lain seperti tikus Sprague-Dawley (Fauziyah, 2016).

Tikus dipilih sebagai hewan uji pada penelitian ini karena merupakan hewan jinak yang berukuran cukup kecil, mudah diperoleh dalam jumlah banyak, perawatan cukup mudah, dan harga lebih terjangkau dibandingkan dengan hewan mamalia lainnya seperti kelinci ataupun marmut. Tikus memiliki fungsi tubuh yang serupa dengan manusia seperti produksi sel darah merah, pencernaan, pernapasan, dan sistem kardiovaskuler. Walaupun tetap ada perbedaan

dengan manusia, tetapi tikus merespon sama dengan manusia saat sakit maupun saat melakukan perawatan.

Gambar 2.5 Tikus Putih Wistar



(Sumber: Fauziyah, 2016)

2.12 Ulkus Traumatik

Ulkus atau ulser merupakan suatu defek dalam epitelium berupa lesi dangkal berbatas tegas serta lapisan epidermis di atasnya menghilang. Ulkus traumatik adalah bentuk lesi ulseratif yang disebabkan oleh adanya trauma. Ulkus traumatik dapat terjadi pada semua usia dan pada kedua jenis kelamin. Lokasinya biasanya pada mukosa pipi, mukosa bibir, palatum, dan tepi perifer lidah. Secara simptomatis, kebanyakan traumatik ulser terasa sakit. Ketidaknyamanan biasanya terjadi pada 24 – 48 jam setelah terjadinya trauma (Chairunnissa, 2011).

Ulkus traumatik dapat diakibatkan oleh trauma fisik atau kimia. Trauma fisik bisa didapat dari trauma mekanis, termal, atau elektrik. Pada umumnya ulkus traumatik adalah akibat dari trauma mekanis seperti mukosa yang tergigit, iritasi dari restorasi atau gigi yang fraktur, serta dari benda-benda tajam yang ada didalam mulut seperti alat ortodontik dan prostodontik. Penyebab ulkus traumatik juga bisa didapat dari trauma kimia. Iritasi kimiawi pada mukosa mulut dapat menimbulkan ulserasi. Penyebab umum dari ulserasi ini adalah tablet aspirin atau krim sakit gigi yang dilekatkan pada gigi-gigi yang sakit atau dibawah protesa yang tidak nyaman (Chairunnissa, 2011).

Diagnosa ulkus traumatik didapat berdasarkan anamnesis atau identifikasi spesifik dari sumber iritasi. Gambaran klinis dari ulkus traumatik mirip dengan gambaran pada ulser aftosa. Ulser biasanya berbentuk bulat, bagian tengah terdapat jaringan nekrotik berwarna putih kekuningan dikelilingi oleh daerah eritem. Pada kasus trauma mekanis, bentuk lesi biasanya ireguler atau sesuai dengan area sumber trauma. Sebab itu, ulserasi yang terlihat ireguler biasanya merupakan hasil dari trauma. Ulser akibat iritasi kimia, memperlihatkan daerah superfisial erosi yang lebih luas, juga disertai dengan eksudat fibrous (Chairunnissa, 2011).

Gambar 2.6 Ulkus Traumatik



(Sumber: Chairunnissa, 2011)

2.13 Penyembuhan Luka

Proses penyembuhan luka memiliki 3 fase yaitu fase inflamasi, fase proliferasi, dan fase remodelling. Fase inflamasi diawali dengan mediator inflamasi menarik neutrofil menuju luka, kemudian makrofag mengikuti setelah 48- 72 jam dan menjadi sel dominan setelah hari ke-3 pasca cedera. Makrofag menghasilkan growth factor untuk menstimulasi proliferasi fibroblas. Peran fibroblas yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein (salah satunya adalah kolagen) yang digunakan selama proses rekonstruksi jaringan. Fase proliferasi berlangsung pada hari ke-4 hingga hari ke-21 pasca cedera jaringan. Fase remodelling merupakan fase terjadinya proses penyempurnaan jaringan baru menjadi jaringan yang lebih kuat. Fibroblas mulai

meninggalkan jaringan granulasi pada fase ini. Hasil akhir dari fase ini berupa jaringan parut yang pucat, tipis, lemas, dan mudah digerakkan dari dasarnya. (Hidayat, 2013).

Peningkatan proliferasi fibroblas pada proses penyembuhan luka diharapkan dapat mempercepat penyembuhan luka bakar. Akselerasi proliferasi fibroblas akan menghasilkan eliminasi fibroblas yang lebih cepat dan menandakan luka yang sembuh. Hari ke-3 merupakan awalnya mulai diinduksi proliferasi fibroblas oleh growth factor yang dihasilkan makrofag. Hari ke-7 pasca luka termasuk dalam fase proliferasi yang pada fase ini jumlah sel fibroblas mencapai puncaknya di jaringan dan menjadi sel dominan, sementara hari ke-21 merupakan akhir dari fase proliferasi sehingga diharapkan jumlah sel fibroblas telah menurun karena akan segera masuk pada fase remodelling (Hidayat, 2013).

Fibroblas merupakan sel dominan pada minggu pertama penyembuhan luka (Hidayat, 2013). Fibroblas bertugas mensintesis kolagen sebagai unsur utama *extracellular matrix* yang merupakan penyedia integritas struktural pada luka. Meningkatnya proliferasi fibroblas, maka sintesis *extracellular matrix* dan kolagen juga akan meningkat sehingga fase proliferasi dapat terselesaikan lebih cepat dan masuk pada fase remodelling selanjutnya penyembuhan luka akan lebih cepat terjadi (Hidayat, 2013).

2.14 Sel Fibroblas

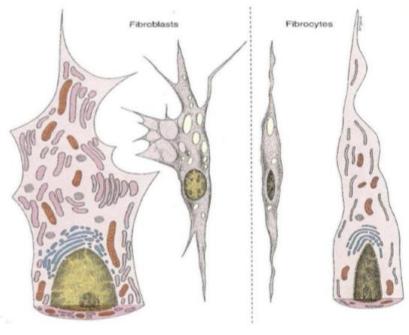
Sel fibroblas (L. fibra, serat: Yunani. blatos, benih: Latin) merupakan sel yang paling umum ditemui pada jaringan ikat dan mensintesis beberapa komponen matriks ekstraseluler (kolagen, elastin, retikuler), beberapa makromolekul anionik (glikosaminoglikans, proteoglikans) serta glikoprotein multiadhesiv, laminin, dan fibronectin) yang dapat mendorong perlekatan sel pada substrat. Di samping itu, sel fibroblas mensekresikan sitokin dan beberapa faktor pertumbuhan (growth factors) diantaranya dapat menstimulasi proliferasi sel dan menghambat proses diferensiasi (Sumbayak, 2015).

Kultur *in vitro* sel-sel fibroblas dilaporkan mensekresikan sekitar 175 jenis protein, diantaranya adalah beberapa faktor yang mampu menghambat diferensiasi sel seperti *basic fibroblast growth factor* (bFGF/FGF2) (Sumbayak, 2015). Fibroblas mempunyai 2

(dua) tahap aktivitas yaitu: aktif dan tenang. Sel-sel dengan aktivitas sintesis yang tinggi secara morfologis berbeda dari fibroblas tenang, yang tersebar dalam matriks yang telah disintesis sel-sel tersebut. Fibroblas pada saat sedang aktif menghasilkan substansi internal, sel ini memiliki juluran sitoplasma lebar atau tampak berbentuk kumparan. Sitoplasmanya yang banyak bersifat basofil dan anak intinya sangat jelas, yang menandakan adanya sintesis protein secara aktif. Fibroblas merupakan sel induk yang berperan membentuk dan meletakkan serat-serat dalam matriks, terutama serat kolagen. Sel ini mensekresi molekul *tropokolagen* kecil yang bergabung dalam substansi dasar membentuk serat kolagen. Kolagen akan memberikan kekuatan dan integritas pada semua luka yang menyembuh dengan baik (Junqueira dkk., 2007).

Fibroblas adalah sel yang menghasilkan komponen ekstrasel dari jaringan ikat yang berkembang. Bila mereka menjadi relatif tidak aktif dalam membuat serat, ahli histologi menyebutnya sebagai fibrosit. Namun, karena sel-sel ini berpotensi untuk fibrogenesis dalam jaringan ikat diam dewasa selama perkembangannya maka digunakanlah istilah fibroblas. Bentuk sel ini tergantung pada sebagian besar substratnya (Sumbayak, 2015).

Gambar 2.7 Penampang Sel Fibroblas dan Fibrosit



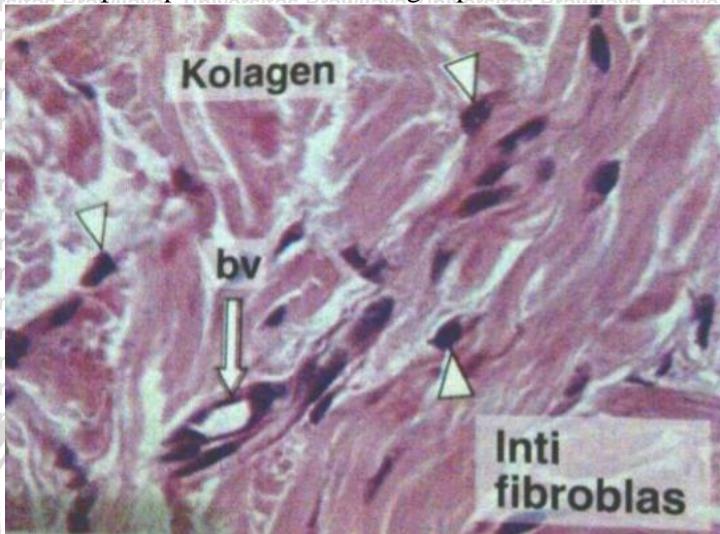
(Sumber: Sumbayak, 2015)

Fibroblas merupakan sel besar, gepeng, bercabang-cabang, dari samping terlihat berbentuk gelendong atau fusiform. Cabang-cabangnya berbentuk langsing. Pada jaringan ikat yang direntangkan inti fibroblas tampak pucat; pada sajian irisan, fibroblas terlihat mengkerut dan terpulas gelap dengan pewarnaan basa. Pada

kebanyakan sediaan histologi, batas sel tidak nyata dan ciri inti merupakan pedoman untuk mengenalnya. Inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran inti halus dengan satu atau dua anak inti jelas, dan sedikit granula kromatin halus. Sel biasanya tersebar sepanjang berkas serat kolagen dan tampak dalam sediaan sebagai sel fusiform dengan ujung-ujung meruncing. Dalam beberapa situasi, fibroblas ditemukan dalam bentuk stelata gepeng dengan beberapa cabang langsing. Inti panjangnya terlihat jelas, namun garis bentuk selnya mungkin sukar dilihat pada sediaan histologis karena bila relatif tidak aktif, sitoplasmanya eosinofilik seperti serat kolagen di sebelahnya (Sumbayak, 2015).

Sel Fibrosit bersifat heterokromatik (gelap) dan hanya di kelilingi oleh sedikit sitoplasma berwarna pucat. Pengamatan sel fibrosit dengan menggunakan mikroskop elektron memperlihatkan jumlah retikulum endoplasma kasar (REK) yang sedikit, dengan kompleks golgi yang kecil. Sedangkan sel fibroblas berukuran sedikit lebih besar di bandingkan sel fibrosit dengan inti yang bersifat eukromatik (terang). Sitoplasmanya berbentuk irregular dengan beberapa penjurulan. Pada pengamatan dengan mikroskop elektron akan terlihat REK dalam jumlah banyak dan kopleks golgi yang besar pada sitoplasma. Struktur ini mengindikasikan produksi matriks jaringan ikat lebih banyak di banding fibrosit. Sel fibroblas dapat berkembang langsung dari sel mesenkim yang belum berdiferensiasi atau dapat juga berasal dari sel fibrosit tergantung pada pengaruh faktor lingkungan. Sel fibroblas juga mampu mensintesis protein seperti kolagen dan elastin yang akan membentuk serat yang dibutuhkan dalam pembentukan serabut ikat (Sumbayak, 2015).

Gambar 2.8 Sel Fibroblas secara Histologi pada perbesaran 400x dengan pewarnaan HE



Inti fibroblast (panah), pembuluh darah (bv)
(Sumber : Sumbayak, 2015)

Proliferasi fibroblas dalam proses penyembuhan luka secara alami distimulasi oleh interleukin-1b (IL-1b), platelet derived growth factor (PDGF), dan fibroblas growth factor (FGF). Selain itu, migrasi fibroblas pada area perlukaan distimulasi oleh transforming growth factor (TGF), yaitu faktor pertumbuhan yang dihasilkan oleh jaringan granulasi yang terbentuk selama proses inflamasi. Proses penyembuhan luka sangat dipengaruhi oleh peranan migrasi dan proliferasi fibroblas pada area perlukaan. Fungsi kolagen yang lebih spesifik adalah membentuk cikal bakal jaringan baru (connective tissue matrix) dan dengan dikeluarkannya substrat oleh fibroblas, memberikan tanda bahwa makrofag, pembuluh darah baru dan juga fibroblas sebagai satu kesatuan unit dapat memasuki kawasan luka (Sumbayak, 2015).

Tabel 2.1 Faktor-Faktor Pertumbuhan dalam Penyembuhan Luka

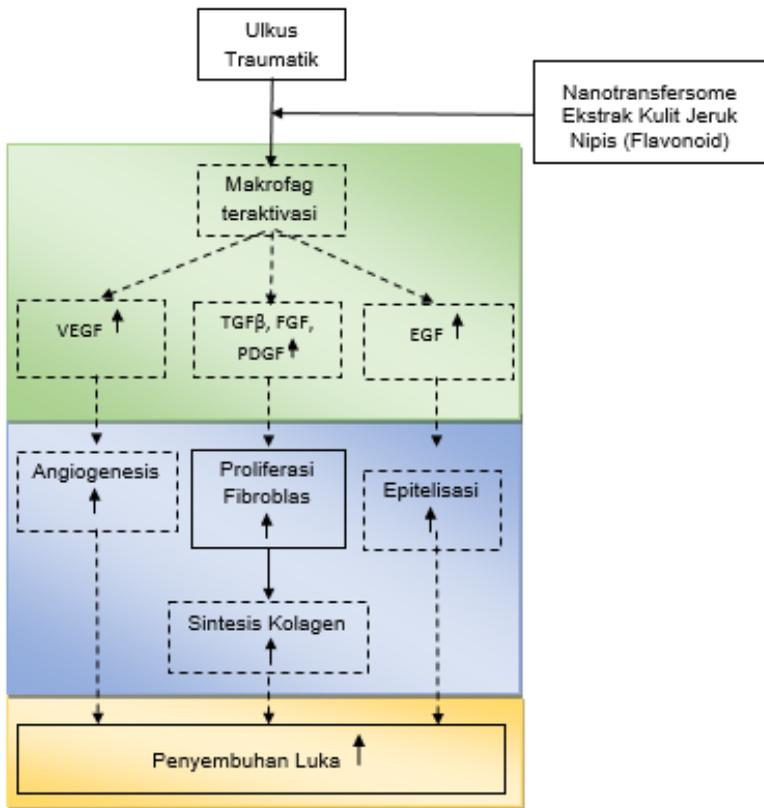
Faktor Pertumbuhan	Efek
EGF	Migrasi, proliferasi, diferensiasi, re-epitelisasi keratinosit epidermal
FGF-1,-2	Proliferasi fibroblas dan keratinosit; proliferasi, migrasi, ketahanan sel endotelial, angiogenesis
IGF	Proliferasi sel
KGF/FGF-7	Proliferasi keratinosit
PDGF	Kemotaksis, proliferasi, kontraksi fibroblas
TGF- α	Sama dengan EGF
TGF- β 1,- β 2,- β 3	Kemotaksis fibroblas, deposisi matriks ekstraseluler, inhibisi proliferasi sel, inhibisi sekresi inhibitor protease; migrasi, ketahanan sel endotelial, angiogenesis
VEGF	Proliferasi, migrasi, ketahanan sel endotelial, peningkatan vasopermeabilitas, angiogenesis

(Sumber: Sumbayak, 2015)



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- = Variabel yang tidak diteliti
- = Variabel yang diteliti
- ↑ = Meningkatkan
- (Green) = Fase Inflamasi
- (Blue) = Fase Proliferasi
- (Yellow) = Fase Maturasi

Ulkus Traumatik adalah hilangnya seluruh ketebalan epitel sehingga jaringan ikat dibawahnya terbuka yang disebabkan oleh peradangan/inflamasi yang menembus membran mukosa atau kulit yang berhubungan dengan adanya trauma. Nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis yang mengandung flavonoid diaplikasikan pada ulkus traumatik tersebut. Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang temukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali *algae*. Flavonoid memiliki kemampuan imunomodulator yang dapat mengaktifasi makrofag. Makrofag melepaskan beberapa *growth factor* antara lain VEGF, TGF β , FGF, PDGF, dan EGF. Masing-masing *growth factor* tersebut menstimulasi target sesuai dengan fungsinya. Pada penelitian ini, yang berperan adalah TGF β , FGF, PDGF yang selanjutnya menstimulasi proliferasi fibroblas. Peran fibroblas yaitu bertanggung jawab pada persiapan menghasilkan produk struktur protein yang salah satunya adalah kolagen yang digunakan selama proses rekonstruksi jaringan.

3.2 Hipotesis Penelitian

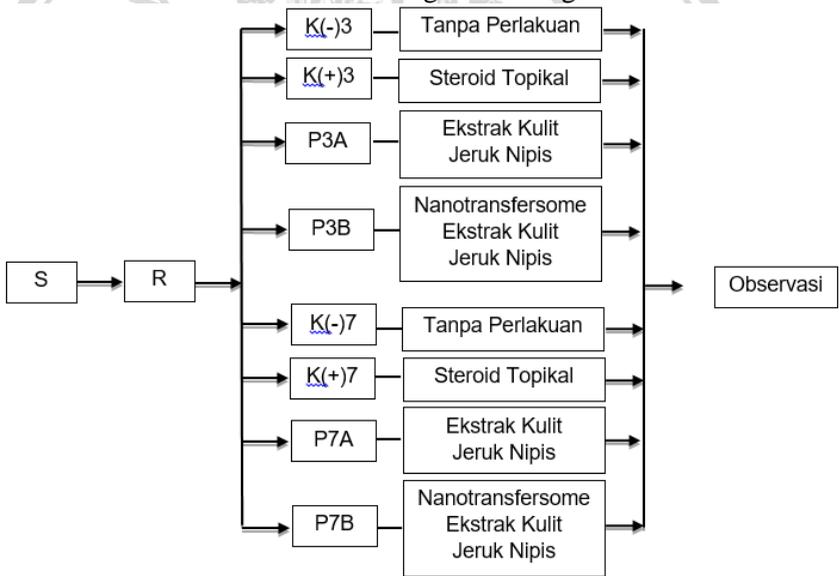
Nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap jumlah sel fibroblas pada proses penyembuhan luka ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar.

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian yang digunakan adalah desain eksperimen murni (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan penelitian “*Post Test Only Randomized Control Group Design*” di laboratorium secara in vivo untuk mengetahui pengaruh pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap peningkatan jumlah fibroblas pada penyembuhan ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar. Sampel dipilih dengan menggunakan teknik “*Simple Random Sampling*” kemudian ditempatkan dalam 4 kelompok dengan 2 *time series* yaitu:

Gambar 4.1 Kerangka Rancangan Penelitian



Keterangan:

S = sampel

R = random



K(-)3 = kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-

3.

K(+)-3 = kelompok kontrol yang diberi triamcinolone acetonide 0.1% sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

P3A = kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

P3B = kelompok perlakuan yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-

3.

K(-)7 = kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-

7.

K(+)-7 = kelompok kontrol yang diberi triamcinolone acetonide 0.1% sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

P7A = kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

P7B = kelompok perlakuan yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-

7.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus wistar (*Rattus Novergicus*) yang dipelihara di laboratorium Terpadu Biologi Oral (*Animal House*) FKG UB yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi pada penelitian ini adalah jenis kelamin jantan, umur 2-3 bulan, berat badan 180-200 gram, dan sehat. Kriteria tikus sehat terlihat dari struktur anatomi normal, gerakan lincah, kulit dan bulu halus, tanpa luka, mata terang. Kriteria eksklusi dalam

penelitian ini adalah tikus yang sakit atau mati selama penelitian dan tikus yang sudah pernah dilakukan penelitian sebelumnya.

Jumlah sampel penelitian dihitung menggunakan rumus Federer yaitu:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$(n-1)7 \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah sample penelitian

Jadi pada penelitian ini digunakan 4 ekor tikus dengan 1 ekor tikus cadangan pada setiap kelompok untuk mengurangi *Lost of Sample* karena tikus mati pada saat penelitian, sehingga diperlukan 40 ekor tikus untuk penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), triamcinolone acetone 0.1%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah fibroblas.

4.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol dalam penelitian ini adalah

1. Jenis kelamin, umur, berat badan, dan makanan yang dikonsumsi.
2. Aplikasi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), triamcinolone acetone 0.1%.
3. Teknik induksi termal pada mukosa labial tikus wistar.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.4.1 Lokasi Penelitian

1. Laboratorium Materia Medica Batu untuk pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).
2. Laboratorium Farmasi FK UB untuk skrining fitokimia ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan pembuatan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).
3. Laboratorium Analisa Instrumental jurusan Teknik Kimia POLINEMA untuk karakterisasi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy).
4. Laboratorium jurusan Fisika Institut Teknologi Sepuluh November untuk uji karakterisasi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan PSA dan zeta potensial.
5. Laboratorium Sentral Ilmu Hayati UB untuk uji karakterisasi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan ESEM.
6. Laboratorium Terpadu Biologi Oral (*Animal House*) FKG UB untuk pemeliharaan dan pemberian perlakuan hewan uji.
7. Laboratorium PA FK UB untuk pembuatan preparat dan pengamatan histologis.

4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan selama 5 bulan.

4.5 Alat/Instrumen dan Bahan Penelitian

4.5.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Ayakan mesh 60 atau kertas saring, pisau, timbangan neraca analitik (Ohaus), gelas ukur, vacuum rotary evaporator, blender, oven, kapas, wadah tertutup, lemari pendingin, *water pump*, *water bath*, kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) 700 gram dari buah jeruk nipis 23 kg, air, aquadest, pelarut etanol 96%.

4.5.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Ekstrak kulit jeruk nipis 30mg, asam klorida 2N, gelatin 1%, air panas, penyaring, pemanas air, serbuk magnesium, pereaksi Mayer, pereaksi Wargner, methanol, pereaksi Dragendorff, tabung reaksi, pereaksi besi (III) klorida, larutan NaOH, larutan H₂SO₄, HCL pekat 0,2ml, timbangan analitik.

4.5.3 Uji Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy)

Filter syringe 0,22 mikron, vial 2 mL, alat LC-MS, ekstrak kulit jeruk nipis 1g, methanol dan quercetin.

4.5.4 Pembuatan Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Ekstrak kulit jeruk nipis 60 ml, Lesitin 1316,25 mg, tween 20 2328,75 mg, kloroform 154,8 ml, PBS (*Phosphat Buffered Saline*) Ph 7,4 180 ml, labu alas bulat, *rotary evaporator*, sonikator ultrasonik.

4.5.5 Uji Karakterisasi Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), PSA (*Particle Size Analyzer*), dan zeta potensial

ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), sampel nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis, formvar coated cuprum grid, air suling, PSA (*Particle Size Analyzer*), zeta-sizer, larutan pendispersi (dapar fosfat pH 7,4), kuvet.

4.5.6 Perawatan dan Pemeliharaan Hewan uji

Kandang tikus berukuran 30x40x15 cm sejumlah 40 buah terbuat dari bak plastik dengan tutup berupa anyaman kawat, sekam dan botol air, neraca digital untuk menimbang berat badan tikus, bahan makanan berupa pelet (pakan tikus) dan air untuk minum hewan uji coba.

4.5.7 Induksi Termal pada Mukosa Labial Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*)

Perlak, instrument sement stopper, syringe anestesi, *tools tray*, tempat sampah kecil, pinset bedah, *cotton roll*, *cotton pellet*, kassa steril, bunsen, tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) berumur 2 bulan dengan berat badan 180-200 gram, larutan anestesi ketamin 10ml, masker, *handscoon*.

4.5.8 Pemberian Perlakuan pada Hewan Uji

Tikus putih wistar (*Rattus norvegicus*) umur 2-3 bulan dengan berat badan 180-200 gram yang sudah terdapat ulkus di mukosa labialnya, nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), triamcinolone acetonide 0,1%, cotton bud, syringe, masker, dan handscoon.

4.5.9 Pembedahan Hewan Uji

Larutan fiksasi berupa formalin 10%, pisau bedah (scalpel), pinset, gunting bedah, syringe, masker, handscoon.

4.5.10 Pembuatan Preparat

Pisau scalpel, pinset, rotary microtome, glass object, tempat pewarna dan cucian, cassette, tissue embedding, basemold, mikrotom, pipet, tray, wadah, blok paraffin, larutan formalin 10%, etanol, larutan xylol, alcohol 96%, bahan pewarnaan berupa larutan Hematoksin dan larutan Eosin (untuk pewarnaan HE), ammonia lithium carbonate, aquades, air, label, masker, handscoon.

4.5.11 Pengamatan Jumlah Fibroblas

Preparat, slide glass, mikroskop cahaya merk Olympus CX21, image analyzer software OlyVIA.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan ekstrak berupa sediaan kental yang berasal dari ekstraksi kulit jeruk nipis dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, dilakukan uji skrining fitokimia dan LCMS. Kulit jeruk nipis diperoleh dan diidentifikasi di Laboratorium Materia Medica Batu.

4.6.2 Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis dibuat menggunakan enkapsulasi transfersome dengan metode sonikasi. Ekstrak kulit jeruk nipis dicampur dengan senyawa lesitin dan tween 20 dengan perbandingan yaitu 1:1, 1:2, 1:3. Selanjutnya dilarutkan dalam kloroform dan diuapkan sampai terbentuk lapisan film dan diamankan selama 24 jam. Setelah itu lapisan film ditambahkan larutan ekstrak dalam PBS pH 7,4 60 ml dan dimasukkan ke dalam alat sonikator ultrasonik untuk mengecilkan ukuran menjadi nano. Terakhir

dilakukan uji karakterisasi dengan menggunakan PSA, ESEM, dan zetapotensial.

4.6.3 Ulkus Traumatik

Ulkus traumatik dibuat dengan cara induksi termal menggunakan semen stopper pada mukosa labial tikus wistar. Semen stopper yang telah dipanaskan kemudian ditempelkan selama 1 detik pada mukosa labial tikus yang telah ditentukan sebelumnya. Setelah diinduksi ditunggu selama sehari hingga ulkus terbentuk yang ditandai dengan adanya lesi berbentuk bulat, berwarna putih dengan sentral kekuningan yang berisi eksudat fibrinosa dengan tepi kemerahan (Mendrofa, 2015).

4.6.4 Penghitungan Jumlah Fibroblas

Penghitungan jumlah fibroblas dilakukan pada hari ke 3 dan 7 dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pembesaran 400 per 5 lapang pandang, kemudian diamati dan dihitung menggunakan *software* olyVIA (*Olympus for Viewer Imaging Applications*). Fibroblas dengan pewarnaan HE ditandai dengan ciri inti lonjong atau memanjang dengan warna biru. Sel biasanya tersebar sepanjang berkas serat kolagen dan tampak dalam sediaan sebagai sel fusiform dengan ujung-ujung meruncing.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Cara ekstraksi:

1. Jeruk nipis dicuci terlebih dahulu kemudian dilap sampai kering.
2. Kulit jeruk nipis dipisahkan dengan buahnya.
3. Kulit jeruk nipis dijemur di bawah sinar matahari secara tidak langsung atau di angin-anginkan untuk mempertahankan kandungan zat yang terkandung didalamnya.
4. Kemudian masukkan ke dalam oven dengan suhu 60° agar didapatkan kulit jeruk nipis yang kering.
5. Kulit jeruk nipis kering diblender lalu di ayak untuk mendapatkan bubuk halus jeruk nipis.
6. Bubuk kulit jeruk nipis ditimbang dengan neraca analitik kemudian dibungkus dengan kertas saring.

7. Kertas saring berisi bubuk kulit jeruk nipis direndam di dalam tabung yang berisi etanol.
8. Rendaman tersebut dibiarkan beberapa hari sampai ditemukan rendaman yang pekat.
9. Hasil ini selanjutnya dievaporasi untuk memisahkan ekstrak kulit jeruk nipis dengan pelarut etanol.

Cara evaporasi:

1. Evaporator dipasang pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja percobaan.
2. Hasil ekstraksi termasuk batu didihnya dipindahkan dari labu destilasi ke labu pemisah ekstraksi. Labu pemisah ekstraksi dihubungkan pada bagian atas evaporator, kemudian pendingin spiral dan vakum dihubungkan dengan selang plastik.
3. *Water pump* ditempatkan dalam bak yang berisi aquades dan dihubungkan dengan sumber listrik sehingga aquades mengalir memenuhi pendingin spiral, tunggu sampai air mengalir sampai rata.
4. Letakkan satu set alat evaporator sehingga sebagian labu pemisah ekstraksi terendam aquades pada *waterbath*.
5. Vakum dan *waterbath* dihubungkan dengan sumber listrik dan suhu *waterbath* dinaikkan kira-kira 35° - 45° celcius (sesuai suhu *refluks* etanol).
6. Biarkan sirkulasi berjalan sehingga hasil evaporasi tertampung di dalam labu pemisah ekstraksi selama 3 jam.
7. Panaskan di dalam oven dengan suhu 50° - 60° celcius selama kurang lebih 1 jam.
8. Hasil ekstraksi inilah yang akan digunakan untuk penelitian.
9. Simpan ekstrak kulit jeruk nipis didalam lemari pendingin untuk dipakai saat penelitian.

4.7.2 Skrining Fitokimia Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

4.7.2.1 Pemeriksaan Alkaloida

Preparasi Sampel

- Timbang ekstrak sebanyak 30 mg, larutkan dalam 3 ml methanol.
- Selanjutnya dibagi menjadi 4 dalam tabung reaksi \rightarrow 3 sampel untuk uji dengan pereaksi warna dan 1 sampel untuk blanko.

Deteksi Alkaloid dengan Pereaksi Warna

- Tes Mayer's: ambil 1 ml sampel yang telah dipreparasi, tambahkan pereaksi Mayer's sedikit demi sedikit → terbentuk endapan kuning (positif alkaloid).
- Tes Wagner's: ambil 1 ml sampel yang telah dipreparasi, tambahkan pereaksi Wagner's sedikit demi sedikit → terbentuk endapan cokelat kemerahan (positif alkaloid).
- Tes Dragendorff: ambil 1 ml sampel yang telah dipreparasi, tambahkan pereaksi Dragendorff sedikit demi sedikit → terbentuk endapan merah (positif alkaloid).

4.7.2.2 Pemeriksaan Flavonoida

Preparasi sampel:

1. Timbang 30 mg ekstrak, larutkan dalam 3 ml methanol dalam vial.
2. Bagi larutan ekstrak menjadi 3, masing-masing 1 ml ditampung pada tabung reaksi, ambil 1 tabung reaksi untuk blanko. Jika salah satu tes antara tes alkali dan tes Mg/HCl sudah menunjukkan flavonoid positif maka sudah menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung flavonoid.

Deteksi flavonoid dengan pereaksi warna:

1. Tes alkali : 1 ml ekstrak ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH → terbentuk warna kuning kuat, yang berubah menjadi kuning pucat ketika ditambahkan larutan H_2SO_4 (positif flavonoid).
2. Tes Mg/HCl : 1 ml ekstrak ditambahkan sedikit logam/serbuk Mg, dan 0.2 ml HCl pekat → larutan dikocok dan dibiarkan memisah → terbentuk lapisan berwarna merah cokelat → (positif flavonoid).

4.7.2.3 Pemeriksaan Saponin

1. Menimbang ekstrak sebanyak 30 mg kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 10 ml air panas, sampel didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang stabil selama lebih dari 10 menit setinggi 1-10 cm.
2. Ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N.
3. Apabila buih tidak hilang maka sampel positif mengandung saponin.

4.7.2.4 Pemeriksaan Tanin

Preparasi

Menimbang ekstrak sebanyak 30 mg, larutkan dalam metanol 3 ml di tabung reaksi, masing-masing ekstrak menjadi (larutan A, larutan B, dan larutan C).

Uji Gelatin

Ambil larutan A, tambahkan gelatin 1%, amati perubahan yang terjadi (gunakan larutan C sebagai pembanding)

Uji Ferri Klorida

1. Ambil larutan B, tambahkan beberapa tetes larutan FeCl_3 , kemudian diamati adanya perubahan warna (gunakan larutan C sebagai blanko pembanding).

2. Jika terjadi warna hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin

4.7.3 Uji Karakterisasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) dengan LCMS (Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy)

Identifikasi senyawa menggunakan Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS) dilakukan pada ekstraksi kulit jeruk nipis. Sebanyak 0,5 gram ekstrak kulit jeruk nipis dilarutkan dalam 50 mL metanol p.a. Larutan disaring menggunakan filter syringe 0,22 mikron, dimasukkan ke dalam vial 2 mL, dan diinjeksikan ke sistem LC-MS.

4.7.4 Pembuatan Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Formula 1:

1. Lesitin 607,5 mg dan Tween 20 607,5 mg dengan perbandingan 1:1 dilarutkan pada kloroform 51,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat.
2. Dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $60 \pm 2^\circ\text{C}$ pada kecepatan 150 rpm sampai kloroform menguap. Hasil tahap ini nantinya akan terbentuk lapisan film. Lapisan film didiamkan sampai 24 jam pada suhu ruang ($<30^\circ\text{C}$).
3. Kemudian lapisan film ditambahkan larutan ekstrak dalam PBS pH 7,4 60 ml kemudian diputar menggunakan *rotary evaporator* selama 2 jam pada suhu $60 \pm 2^\circ\text{C}$ dengan kecepatan 60 rpm hingga homogen.

4. Selanjutnya didiamkan supaya mengembang selama 1 jam pada suhu ruang, diikuti dengan 30 menit sonikasi menggunakan sonikator ultrasonik.

Formula 2:

1. Lesitin 405 mg dan Tween 20 810 mg dengan perbandingan 1:2 dilarutkan pada kloroform 51,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat.

2. Dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ pada kecepatan 150 rpm sampai kloroform menguap. Hasil tahap ini nantinya akan terbentuk lapisan film. Lapisan film didiamkan sampai 24 jam pada suhu ruang ($<30^{\circ}\text{C}$).

3. Kemudian lapisan film ditambahkan larutan ekstrak dalam PBS pH 7,4 60 ml kemudian diputar menggunakan *rotary evaporator* selama 2 jam pada suhu $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 60 rpm hingga homogen.

4. Selanjutnya didiamkan supaya mengembang selama 1 jam pada suhu ruang, diikuti dengan 30 menit sonikasi menggunakan sonikator ultrasonik.

Formula 3:

1. Lesitin 303,75 mg dan Tween 20 911,25 mg dengan perbandingan 1:3 dilarutkan pada kloroform 51,6 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat.

2. Dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ pada kecepatan 150 rpm sampai kloroform menguap. Hasil tahap ini nantinya akan terbentuk lapisan film. Lapisan film didiamkan sampai 24 jam pada suhu ruang ($<30^{\circ}\text{C}$).

3. Kemudian lapisan film ditambahkan larutan ekstrak dalam PBS pH 7,4 60 ml kemudian diputar menggunakan *rotary evaporator* selama 2 jam pada suhu $60\pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan kecepatan 60 rpm hingga homogen.

4. Selanjutnya didiamkan supaya mengembang selama 1 jam pada suhu ruang, diikuti dengan 30 menit sonikasi menggunakan sonikator ultrasonik.

4.7.5 Uji Karakterisasi Nanotransfersome Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*), PSA (*Particle Size Analyzer*), dan zeta potensial

4.7.5.1 Prosedur analisis morfologi partikel menggunakan ESEM (*Environmental Scanning Electron Microscopy*)

1. Persiapkan sampel dengan cara: sampel disuspensikan ke dalam EtOH. Kemudian teteskan sampel pada pita karbon, menempel dan kering. Selanjutnya dilapisi dengan emas.
2. Nyalakan alat ESEM. Letakkan sampel pada alat tersebut.
3. Tunggu sampai alat menunjukkan Ready.
4. Mengatur lensa sehingga sampel terlihat fokus.

4.7.5.2 Prosedur analisis ukuran partikel menggunakan PSA (*Particle Size Analyzer*)

Penentuan ukuran partikel, distribusi ukuran partikel dan indeks polidispersi dilakukan dengan cara mendispersikan sampel didalam air suling dengan perbandingan 1:15 (v/v) pada suhu 25°C. Pengukuran distribusi ukuran partikel dan indeks polidispersi dilakukan menggunakan alat *particle size analyzer* (Amalia dkk., 2015).

4.7.5.3 Prosedur analisis muatan partikel menggunakan zeta potensial

Potensial zeta transfersome dievaluasi dengan menggunakan *zeta-sizer*. Sampel transfersome diencerkan dengan pengenceran 1 tetes dalam 10 ml larutan pendispersi, yaitu dapar fosfat pH 7,4. Sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan dianalisis pada suhu 25°C (Pasaribu dkk., 2016).

4.7.6 Perawatan dan Pemeliharaan Hewan uji

Aklimatisasi (penyesuaian lingkungan) bagi hewan uji dilakukan selama tujuh hari di laboratorium Terpadu Biologi Oral (*Animal House*) FKG UB. Tikus diberi makan dan minuman standar laboratorium serta dilakukan penimbangan berat badan di akhir aklimatisasi.

4.7.7 Pembuatan Ulserasi pada Mukosa Labial Tikus Wistar (*Rattus Novergicus*)

Daerah yang akan dibuat ulserasi adalah mukosa labial bagian bawah. Kemudian pasang perlak dan alasnya di bawah tikus yang akan dibuat ulser. Lakukan anestesi pada area kulit yang akan dibuat luka dengan ketamine 0,2ml secara intermuskular. Ulser dibuat menggunakan semen stopper yang dipanaskan di atas bunsen. Semen stopper yang telah dipanaskan kemudian ditempelkan selama 1 detik pada mukosa labial tikus yang telah ditentukan sebelumnya. Pada hari kedua dilakukan pengamatan ulkus yang ditandai dengan adanya

lesi berbentuk bulat, berwarna putih dengan sentral kekuningan yang berisi eksudat fibrinosa dengan tepi kemerahan (Mendrofa, 2015).

4.7.8 Pemberian Perlakuan terhadap Hewan Uji

Hewan uji diberi beberapa perlakuan yaitu diberi triamcinolone acetonida 0.1%, diberi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle), dan diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) yang diaplikasikan pada daerah ulkus traumatik mukosa labial tikus wistar menggunakan *cotton bud* untuk triamcinolone acetonida 0.1% dan syringe untuk ekstrak kulit jeruk nipis serta nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 2 kali sehari sampai hari ke-3 dan ke-7 pasca induksi termal.

4.7.9 Pembedahan Hewan Uji

Pada hari ke-3 dan ke-7 setelah induksi termal, setiap kelompok perlakuan dikorbankan dengan metode dekapitasi leher. Kemudian mukosa bibir bawah dipotong sampai sudut mulut tikus mengikuti bagian yang ulser dan bagian yang normal dimasukkan kedalam larutan fiksasi (Destri dkk., 2017). Setelah dilakukan pembedahan, lakukan sanitasi pada organ hewan uji yang tidak terpakai setelah dilakukan pengambilan jaringan pada mukosa labial dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Bagian mukosa labial yang akan diamati kemudian dibersihkan dan diberi etanol 70% sebagai aseptik.
2. Dilakukan pembuatan lubang berukuran 100 cm x 30 cm x 50 cm.
3. Sisa organ yang tidak terpakai kemudian dikubur dalam lubang tersebut dengan dibalut bahan yang mudah terurai, contohnya kain.
4. Sampah setelah tindakan pembedahan dimasukkan ke dalam plastik. Seluruh sampah medis dipisahkan dengan sampah nonmedis dan dikirim ke Rumah Sakit Pendidikan UB untuk dibuang.

4.7.10 Pembuatan Preparat

Prosedur pembuatan preparat menurut Pratiwi dan Manan (2015)

1. Fiksasi jaringan

Fiksatif yang digunakan untuk pengawetan jaringan adalah larutan formalin 10%. Proses fiksasi dengan larutan formalin 10% dilakukan selama 24 jam.

2. Pemilihan jaringan (trimming)

Jaringan terfiksasi dipotong menggunakan pisau bedah yang tajam dan steril agar jaringan tidak mengalami kerusakan dalam proses pengerjaan. Setelah dilakukan proses trimming kemudian jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam *cassette*. *Cassete* yang berisi jaringan kemudian direndam dalam aquades selama satu menit dengan tujuan untuk menghindari terjadinya pengkerutan pada jaringan akibat terlalu lama terkena udara.

3. Dehidrasi jaringan

Dehidrasi jaringan dilakukan dengan tujuan untuk mengeluarkan seluruh cairan yang terdapat dalam jaringan yang telah difiksasi sehingga nantinya dapat diisi dengan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Hal ini perlu dilakukan karena air tidak dapat bercampur dengan cairan parafin atau zat lainnya yang dipakai untuk membuat blok preparat. Penarikan air keluar dari sel/jaringan dilakukan dengan cara merendam jaringan dalam bahan kimia yang berfungsi sebagai dehidrator (penarik air) yang secara progresif konsentrasinya meningkat, yakni alkohol.

4. Pembuatan blok jaringan

Pembuatan blok jaringan dilakukan untuk menjaga masing-masing bagian dari jaringan agar tidak berubah seperti pada kondisi tahap awal pemotongan dengan menggunakan alat yang disebut *tissue embedding*. Dalam proses ini digunakan cetakan anti karat atau basemold untuk pembuatan blok paraffin. Pada proses ini digunakan zat pembedam yaitu paraffin cair panas dengan suhu 70°C.

5. Pengirisan jaringan

Pengirisan jaringan adalah proses pemotongan blok jaringan dengan menggunakan mikrotom. Mikrotom merupakan alat yang digunakan untuk memotong tipis atau irisan suatu jaringan. Hasil dari pengirisan jaringan ini berupa pita tipis yang sangat penting karena irisan-irisan tipis ini akan membantu ketepatan diagnosa.

6. Pewarnaan jaringan

Pewarnaan adalah proses pemberian warna pada jaringan yang telah dipotong sehingga jaringan dapat dikenali dan memudahkan dalam pengamatan jaringan dengan mikroskop. Pulasan (pewarna) yang sering digunakan secara rutin adalah pewarnaan yang dapat digunakan untuk memulas inti dan sitoplasma serta jaringan penyambungannya yaitu pulasan hematoksilin-eosin (HE). Pada pulasan HE digunakan 2

macam zat warna yaitu hematoxilin yang berfungsi untuk memulas inti sel dan memberikan warna biru (basofilik) serta eosin yang merupakan *counterstaining*.

4.7.11 Pengamatan Jumlah Fibroblas

Pengamatan dilakukan untuk mengamati jumlah fibroblas per lapang pandang pada sediaan histopatologi yang telah dibuat. Sel fibroblas dihitung dengan pembesaran 400 kali dengan menggunakan mikroskop cahaya merk Olympus CX21. Kemudian preparat discan dan dilihat menggunakan komputer dengan *software* olyVIA (*Olympus for Viewer Imaging Applications*). Jumlah fibroblas yang dilihat dan dihitung pada 5 lapang pandang dijumlah dan dicari rata-rata dari masing-masing kelompok sampel.

4.8 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa jumlah sel fibroblas, kemudian dirata-rata per kelompok lalu dilakukan analisis secara statistika menggunakan program pengolah data statistik. Analisis data ini dilakukan untuk menguji hipotesis komparatif dan korelatif, dengan tingkat signifikansi yaitu 0,05 ($p=0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$).

Langkah-langkahnya ialah :

1. Uji Normalitas Data

Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui distribusi data-data yang diperoleh tersebut normal atau tidak. Uji Normalitas dapat dilakukan dengan *Saphiro Wilk Test* karena jumlah sampel yang digunakan ≤ 50 . Apabila data tersebut terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji homogenitas varian.

2. Uji Homogenitas Varian

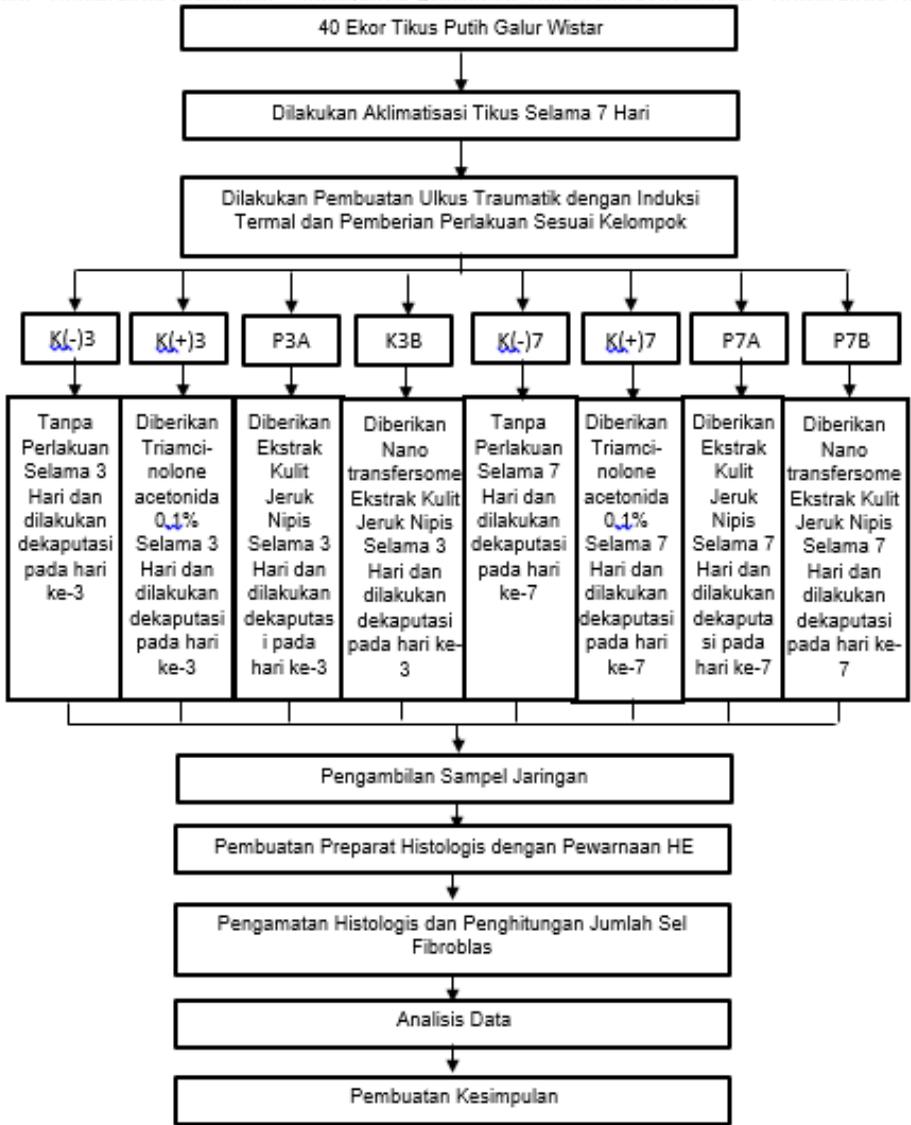
Uji homogenitas dapat dilakukan dengan *Levene test*. Jika uji homogenitas menunjukkan data tersebut terdistribusi secara homogen, maka dapat dilanjutkan uji parametrik berupa uji *One way Annova* jika, sedangkan apabila data tidak normal dapat dilanjutkan dengan uji *Kruskal Wallis*.

3. Uji *One Way Annova*

Untuk menguji hipotesis penelitian yang mana menilai adakah perbedaan rerata antara kelompok (lebih dari 2 kelompok).

4.9 Alur Penelitian

Gambar 4.2 Kerangka Operasional Penelitian



BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

Penelitian dilakukan dengan pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis yang dilanjutkan dengan uji skrining fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan uji LCMS untuk mengetahui kadar quercetin (salah satu zat aktif kelas flavonoid) dalam ekstrak. Setelah itu dilakukan pembuatan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis dan di uji dengan PSA, ESEM, dan zeta untuk mengetahui karakter dari nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis. Selanjutnya dilakukan pengaplikasian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis ke mukosa labial tikus wistar yang sudah diinduksi termal, lalu dilakukan pembedahan pada tikus untuk dilihat jumlah sel fibroblas pada jaringan menggunakan mikroskop digital.

5.1.1 Uji Skrining Fitokimia

Uji skrining fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa kimia dalam bagian tanaman yang akan diteliti, dalam penelitian ini yang diteliti adalah kandungan flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid dari kulit jeruk nipis. Hasil dari uji skrining fitokimia yang telah dilakukan yaitu kulit jeruk nipis positif mengandung flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid.

Tabel 5.1 Hasil Uji Skrining Fitokimia

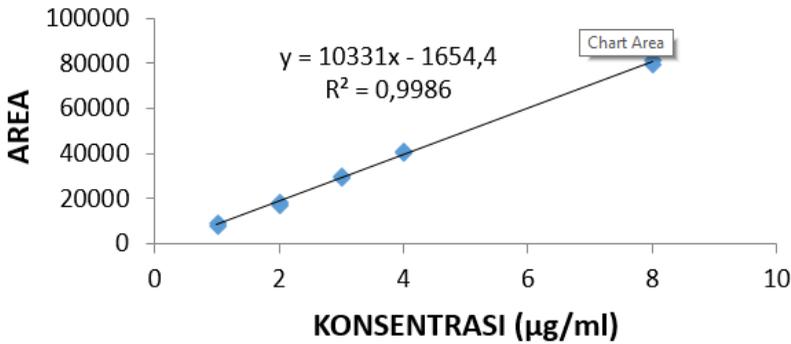
No	Nama Senyawa	Hasil
1	Flavonoid	Positif (+)
2	Alkaloid	Positif (+)
3	Saponin	Positif (+)
4	Tannin	Positif (+)



5.1.2 Uji LCMS

Gambar 5.1 Diagram Kurva Kalibrasi Standar Quercetin

KURVA KALIBRASI ESTD QUERCETIN



Tabel 5.2 Hasil Uji LCMS pada Sampel Ekstrak Kulit Jeruk Nipis

Nama Sampel	Berat Sampel (µL)	Area	Konsentrasi Terukur (µg/ml)	Faktor Pengenceran (ml)	Konsentrasi Terhitung (µg/ml)	Rata-rata (µg/ml)
Sampel 1	200	13.785,00	1,494	5.0	37,36	37,13
Sampel 2	200	14.116,00	1,526	5.0	38,16	
Sampel 3	200	13.172,00	1,435	5.0	35,88	

Berdasarkan hasil uji LCMS dapat diketahui bahwa ekstrak kulit jeruk nipis mengandung quercetin (salah satu zat aktif kelas flavonoid). Hasil kuantitatif kandungan quercetin pada ekstrak kulit jeruk nipis sebanyak 37,13 µg/ml ditunjukkan pada tabel 5.2. Langkah selanjutnya dilakukan pembuatan nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis menggunakan 3 formula dengan perbandingan lesitin dan tween 1:1, 1:2, dan 1:3. Kemudian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis dilakukan karakterisasi menggunakan uji PSA, uji zeta potensial, dan uji ESEM.



5.1.3 Uji PSA (Particle Size Analyzer)

Tabel 5.3 Hasil Uji PSA

No	Nama	Perbandingan Lecithin dan Tween	Ukuran
1	Formula 1	1:1	369,58 nm
2	Formula 2	1:2	169,76 nm
3	Formula 3	1:3	210,42 nm

5.1.4 Uji Zeta Potensial

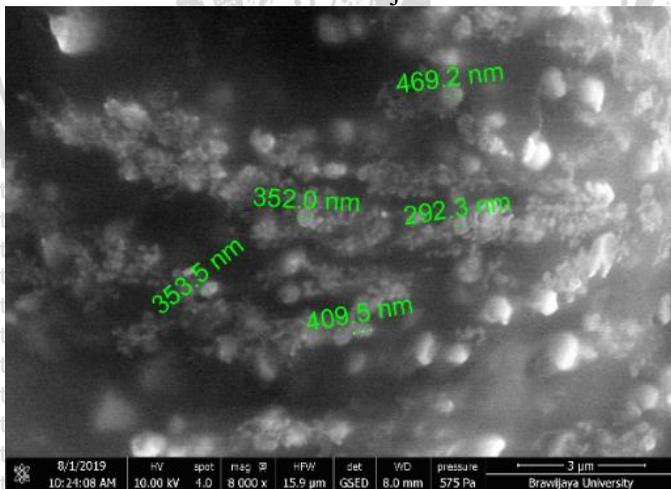
Tabel 5.4 Hasil Uji Zeta Potensial

No	Nama	Perbandingan Lecithin dan Tween	Ukuran
1	Formula 1	1:1	-1,89
2	Formula 2	1:2	-3,53
3	Formula 3	1:3	-2,79

5.1.5 Uji ESEM (Environmental Scanning Electron Microscope)

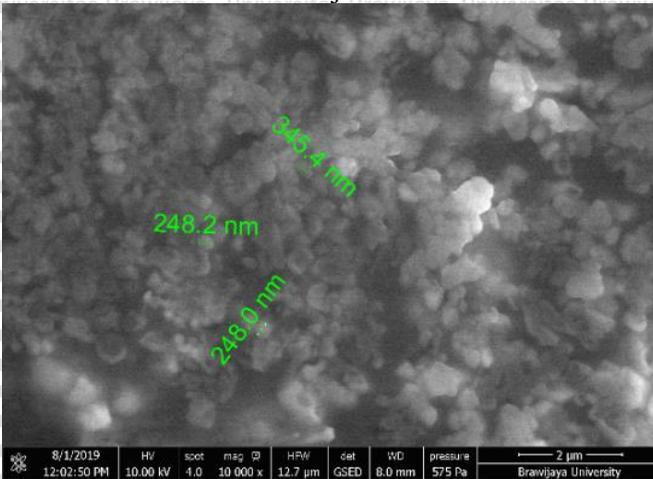
FORMULA 1

Gambar 5.2 Gambar Hasil Uji ESEM Formula 1



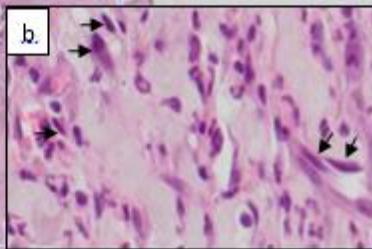
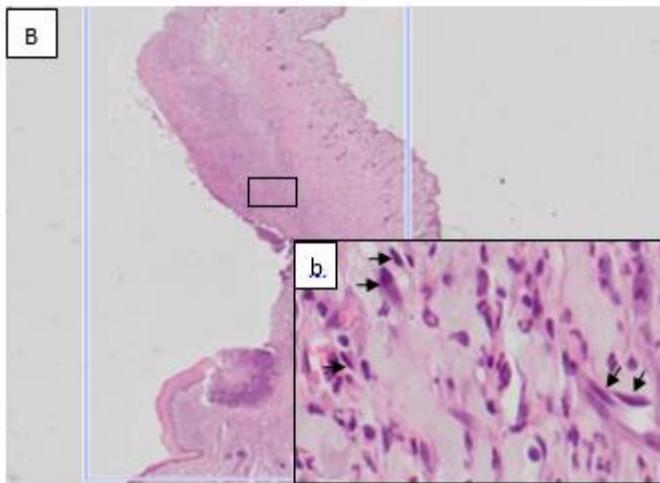
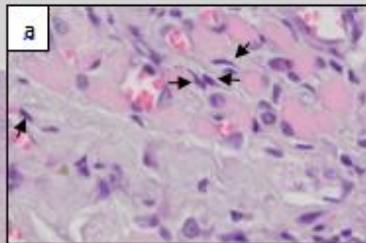
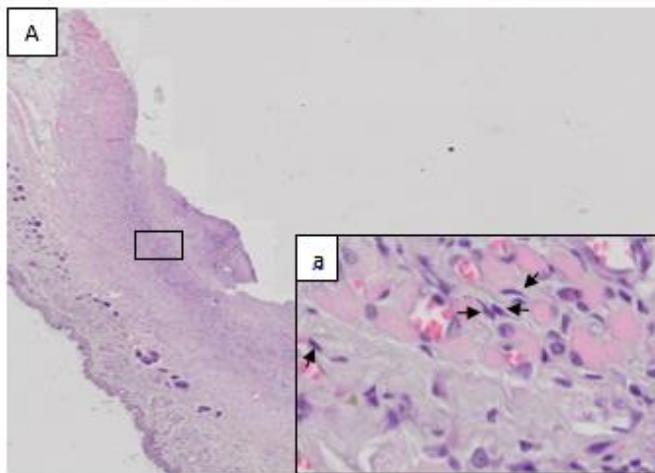
FORMULA 2

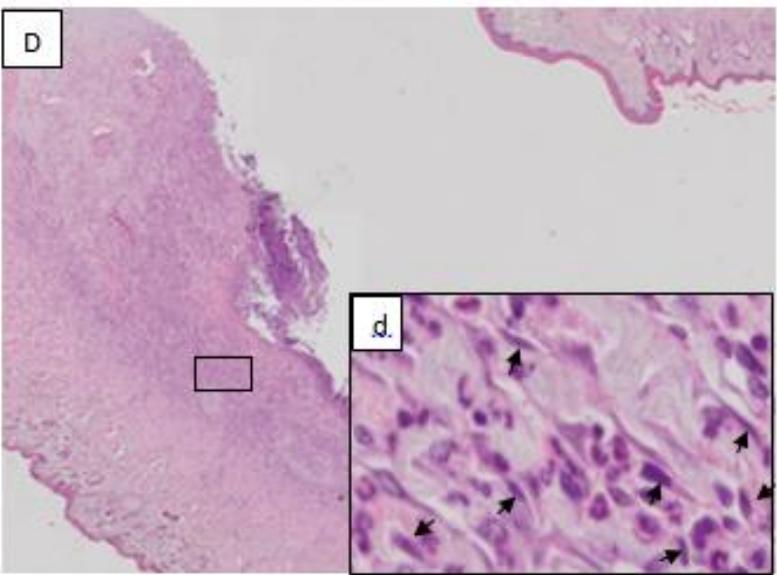
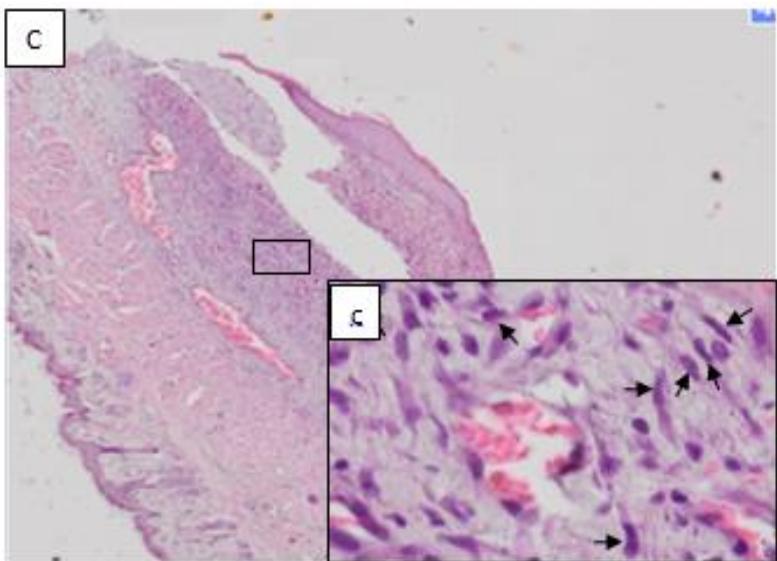
Gambar 5.3 Hasil Uji ESEM Formula 2



Berdasarkan hasil uji karakterisasi ESEM menggunakan metode pengendapan, morfologi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis tidak dapat diinterpretasikan karena ESEM juga memiliki kekurangan yaitu berkas elektron menyebar di ruang lingkungan bertekanan tinggi dan mengeluarkan sinar-X fluoresen dari seluruh spesimen, tidak hanya dari bawah berkas elektron. Sinar-X fluoresen yang dihasilkan di luar area yang diinginkan terdeteksi oleh detektor dan mengurangi kontras gambar (XOS, 2019). Sedangkan pada hasil uji karakterisasi menggunakan uji PSA dan uji zeta potensial disimpulkan bahwa formula 2 merupakan formula yang paling efektif untuk digunakan sebagai variabel pada uji in vivo menggunakan hewan uji tikus wistar (*Rattus novergicus*). Sampel penelitian didapatkan dengan mengambil area ulkus traumatik pada mukosa labial serta jaringan sehat sekitarnya pada tikus putih yang telah didekapitasi pada hari ke-3 dan ke-7 pasca terbentuknya ulkus traumatik. Kemudian dilakukan pembuatan preparat histologi dengan pewarnaan HE (*Hematoxylin-Eosin*) dan dilakukan pengamatan menggunakan software Olyvia (*Olympus Viewer for Imagine Applications*) dengan perbesaran 400x sebanyak lima lapang pandang. Didapatkan gambaran fibroblas dengan bentukan gelendong atau fusiform, inti lonjong atau memanjang dan diliputi membran halus berwarna keunguan dengan percabangan sitoplasma yang irregular.

Gambar 5.4 Gambaran histologi fibroblas dengan pewarnaan HE jaringan ulkus mukosa labial tikus wistar (ditunjukkan oleh tanda panah) pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-3 dengan perbesaran 100x (A,B,C,D) dan 400x (a,b,c,d).





Keterangan :

tanda panah hitam (→) menunjukkan sel fibroblas

(A,a) Kelompok kontrol negatif (K(-)3)

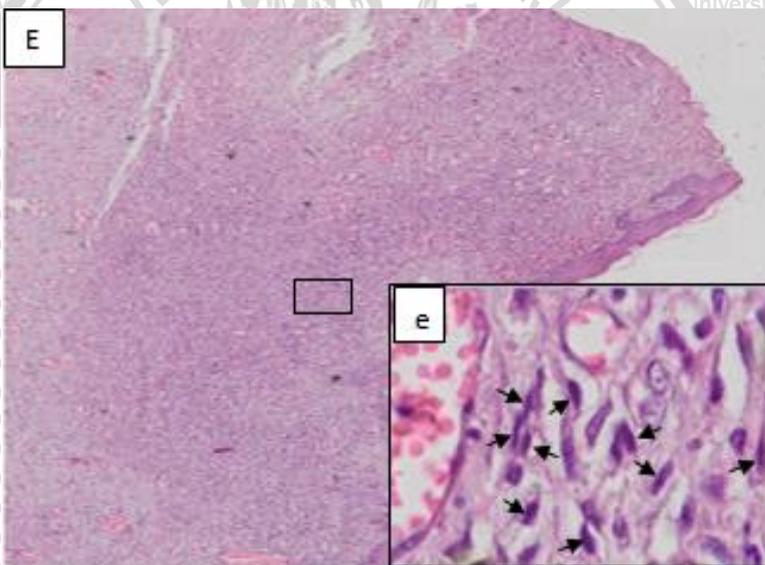
(B,b) Kelompok kontrol positif (K(+3)

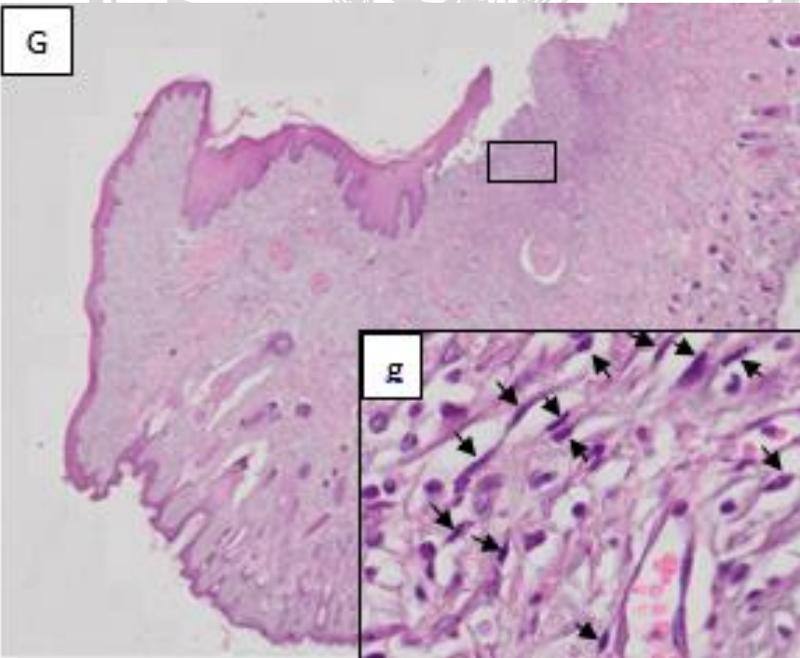
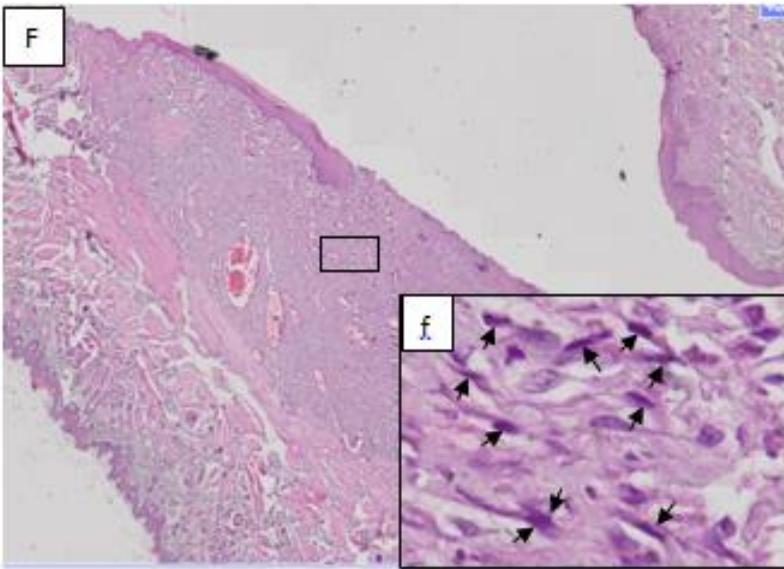
(C,c) Kelompok perlakuan ekstrak (P3A)

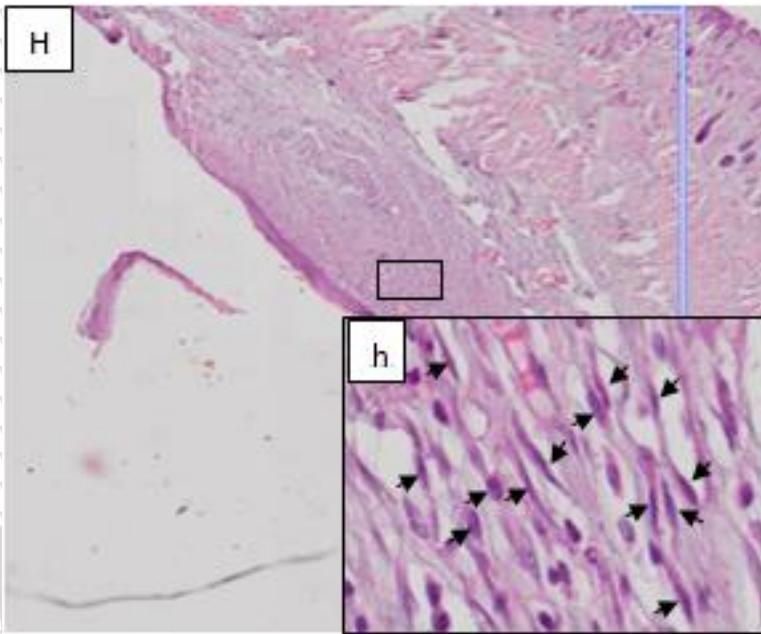
(D,d) Kelompok perlakuan nano (P3B)

Berdasarkan gambar 5.4 menunjukkan bahwa pada hari ke-3 tampak gambaran jumlah sel fibroblas yang lebih banyak pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Gambar 5.5 Gambaran histologi fibroblas dengan pewarnaan HE jaringan ulkus mukosa labial tikus wistar (ditunjukkan oleh tanda panah) pada kelompok kontrol dan perlakuan hari ke-7 dengan perbesaran 100x (E,F,G,H) dan 400x (e,f,g,h).







Keterangan :

- tanda panah hitam (→) menunjukkan sel fibroblas
- (E,e) Kelompok kontrol negatif (K(-)7)
- (F,f) Kelompok kontrol positif (K(+7)
- (G,g) Kelompok perlakuan ekstrak (P7A)
- (H,h) Kelompok perlakuan nano (P7B)

Berdasarkan gambar 5.5 menunjukkan bahwa pada hari ke-7 tampak gambaran jumlah sel fibroblas yang lebih banyak pada kelompok perlakuan dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Tabel 5.5 Hasil Perhitungan Rata-Rata Jumlah Fibroblas

Kelompok		Mean	Std. Deviasi
Hari ke-3	K(-)3	41,50	5,260
	K(+3	41,50	6,608
	P3A	63,50	9,256
	P3B	65,00	1,414

Hari ke-7	K(-)7	70,00	9,661
	K(+7	72,25	2,217
	P7A	108,50	14,271
	P7B	110,50	14,364

Keterangan:

K(-)3 = kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

K(+3) = kelompok kontrol yang diberi triamcinolone acetonide 0.1% sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

P3A = kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

P3B = kelompok perlakuan yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-3 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-3.

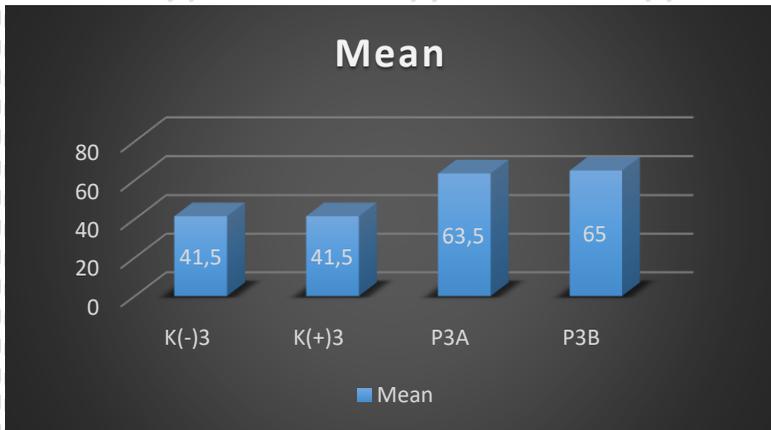
K(-)7 = kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

K(+7) = kelompok kontrol yang diberi triamcinolone acetonide 0.1% sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

P7A = kelompok perlakuan yang diberi ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

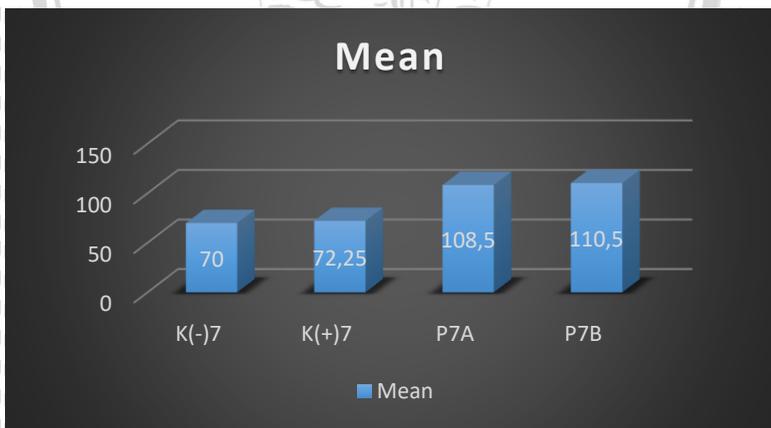
P7B = kelompok perlakuan yang diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) sampai hari ke-7 pasca diinduksi termal dan kemudian dilakukan pembedahan pada hari ke-7.

Gambar 5.6 Diagram rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-3



Berdasarkan gambar diagram diatas, kelompok perlakuan pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis menunjukkan jumlah fibroblas paling tinggi pada hari ke-3.

Gambar 5.7 Diagram rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-7



Berdasarkan gambar diagram diatas, kelompok perlakuan pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis menunjukkan jumlah fibroblas paling tinggi pada hari ke-7.

5.2 Analisa Data

Data hasil penelitian berupa jumlah sel fibroblas dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel ≤ 50 dan uji homogenitas menggunakan *levenne's test*. Data penelitian yang normal dan homogen selanjutnya akan dianalisis dengan uji *One-Way* Anova untuk mengetahui perbedaan jumlah fibroblas pada tiap kelompok penelitian. Data kemudian dianalisis menggunakan uji lanjutan *Post-hoc Tukey* untuk melihat kelompok mana yang paling berbeda diantara keempat kelompok kelompok hari ke-3 dan keempat kelompok hari ke-7. Apabila data berdistribusi tidak normal dan tidak homogen dilakukan analisis menggunakan uji *Kruskal-Wallis*.

5.2.1 Uji Normalitas

Data dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* dengan tujuan untuk mengetahui apakah sebaran data berdistribusi normal atau tidak. Data dinyatakan berdistribusi normal jika nilai signifikansi yang diperoleh lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Hasil uji normalitas data pada penelitian ini menunjukkan bahwa nilai signifikansi rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-3 adalah 0,086 ($p > 0,05$) dan pada hari ke-7 adalah 0,153 ($p > 0,05$). Jadi dapat disimpulkan bahwa data setiap kelompok berdistribusi normal.

5.2.2 Uji Homogenitas

Data hasil penelitian yang berdistribusi normal selanjutnya dilakukan uji homogenitas data menggunakan uji *levene*. Data dinyatakan homogen apabila nilai signifikansi yang diperoleh lebih besar dari 0,05 ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas ragam didapatkan nilai signifikansi perhitungan rata-rata jumlah fibroblas pada hari ke-3 yaitu 0,154 ($p > 0,05$) dan hari ke-7 yaitu 0,210 ($p > 0,05$). Maka dapat disimpulkan bahwa data penelitian tersebut bersifat homogen.

5.2.3 Uji *One-way* ANOVA

Uji *One-way* ANOVA digunakan untuk mengetahui perbedaan nilai jumlah fibroblas pada setiap kelompok. Uji ini dapat dilakukan bila data berdistribusi normal, variasi homogen, dan diambil dari sampel yang acak. Hasil uji *One-way* ANOVA didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$) pada hari ke-3 maupun hari ke-7, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan jumlah fibroblas yang signifikan antar kelompok.

5.2.4 Uji *Post Hoc* Tukey

Uji ini bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang paling berbeda diantara keempat kelompok pada hari ke-3 dan ke-7 tersebut. Pada Uji ini suatu data dikatakan berbeda secara bermakna apabila nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

Tabel 5.6 Hasil uji *Post Hoc* Tukey jumlah fibroblas pada hari ke-3

Kelompok	Kelompok Pembeding	Nilai Signifikasi	Keterangan
K(-)3	K(+)3	1,000	Tidak signifikan
	P3A	0,002	Signifikan
	P3B	0,001	Signifikan
K(+)3	P3A	0,002	Signifikan
	P3B	0,001	Signifikan
P3A	P3B	0,986	Tidak signifikan

Keterangan :

K(-)3 :kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis

K(+)3: kelompok kontrol diberi triamcinolone

P3A : kelompok perlakuan diberi ekstrak kulit jeruk nipis

P3B : kelompok perlakuan diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis

Pada tabel diatas diketahui perbedaan yang signifikan antara K(-)3 dan P3A, K(-)3 dan P3B, K(+)3 dan P3A, K(+)3 dan P3B. Hasil yang lain diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara K(-)3 dan K(+)3, P3A dan P3B.

Tabel 5.7 Hasil uji *Post Hoc* Tukey jumlah fibroblas pada hari ke-7

Kelompok	Kelompok Pembeding	Nilai Signifikasi	Keterangan
K(-)7	K(+)7	0,992	Tidak signifikan
	P7A	0,002	Signifikan
	P7B	0,001	Signifikan
K(+)7	P7A	0,003	Signifikan
	P7B	0,002	Signifikan
P7A	P7B	0,994	Tidak signifikan

Keterangan :

K(-)3 : kelompok kontrol tanpa diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis

K(+)3 : kelompok kontrol diberi triamcinolone

P3A : kelompok perlakuan diberi ekstrak kulit jeruk nipis

P3B : kelompok perlakuan diberi nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis

Pada tabel diatas diketahui perbedaan yang signifikan antara K(-)7 dan P7A, K(-)7 dan P7B, K(+)7 dan P7A, K(+)7 dan P7B. Hasil yang lain diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara K(-)7 dan K(+)7, P7A dan P7B.

5.3 Pembahasan Penelitian

Penelitian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis telah dilakukan beberapa uji, yaitu uji skrining fitokimia, LCMS (*Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry*), PSA (*Particle Size Analyzer*), Zeta Potensial, dan ESEM (*Environment Scanning Electron Microscopy*). Uji skrining fitokimia merupakan uji kualitatif kandungan senyawa kimia dalam bagian tanaman yang akan diteliti, hasil dari uji skrining fitokimia yang telah dilakukan yaitu kulit jeruk nipis positif mengandung flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid, hal ini sesuai dengan teori yang dinyatakan oleh Hardyanti dkk (2018). Dengan kata lain, kulit jeruk nipis mempunyai efek antibakteri yang terdapat dalam saponin dan alkaloid, efek antioksidan dalam kandungan tanin dan flavonoid, serta efek antiinflamasi pada kandungan flavonoid. Sedangkan dalam uji LCMS secara kuantitatif membuktikan bahwa ekstrak kulit jeruk nipis mengandung quercetin (salah satu zat aktif kelas flavonoid) sebanyak 37,13 µg/ml.

Penelitian ini terdiri dari 3 formula nanotransfersome, dengan perbandingan lesitin dan tween 1:1, 1:2, 1:3 untuk menentukan formula paling efektif yang selanjutnya akan diujikan pada hewan uji. Hasil uji PSA (*Particle Size Analyzer*) dari ke-3 formula tersebut menunjukkan perbedaan, dimana pada formula 1 ukuran partikel dari nanotransfersome sebesar 369,58 nm, formula 2 sebesar 169,76 nm, dan formula 3 sebesar 210,42 nm. Setelah dilakukan uji PSA selanjutnya dilakukan uji Zeta Potensial untuk mengkarakterisasi sifat muatan permukaan nanotransfersome dimana muatan potensial zeta

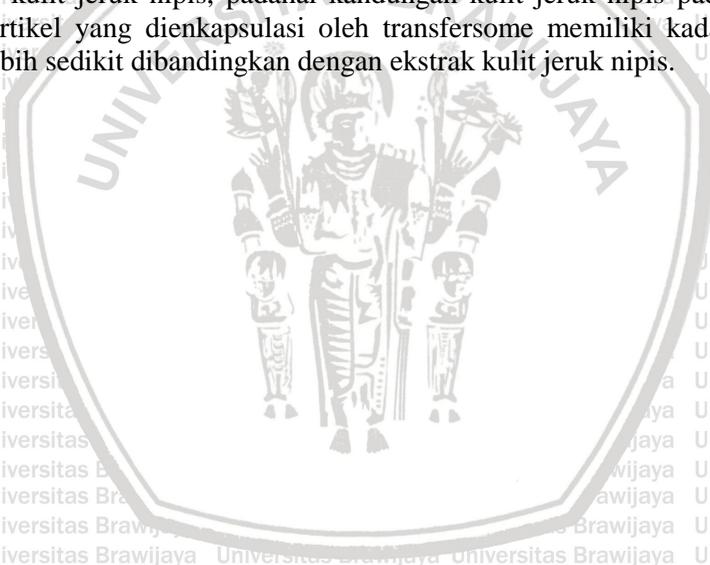
partikel harus lebih tinggi daripada medium pendispersinya untuk mencegah agregasi (Abdassah, 2017). Hasil uji zeta potensial formula 1 menunjukkan nilai sebesar -1,89; formula 2 sebesar -3,53; dan formula 3 sebesar -2,79. Dari hasil uji PSA dan zeta potensial tersebut ditarik kesimpulan bahwa formula 2 adalah formula yang paling efektif. Hal ini ditentukan sesuai dengan teori bahwa nilai zeta dikatakan stabil ketika menjauhi titik isoelektrik yaitu 0, sehingga terjadi tolak menolak, sedangkan sistem dispersi dengan nilai zeta potensial yang rendah lebih mudah membentuk agregat seiring dengan gaya Van der Waals dalam interaksi partikel (Abdassah, 2017). Selain itu, ukuran partikel formula 2 lebih kecil dibandingkan dengan formula 1 dan 3, sehingga kemampuan untuk menembus dinding sel yang lebih tinggi akan lebih efektif.

Pengamatan pada penelitian ini dilakukan pada hari ke-3 dan ke-7 setelah induksi termal. Gambaran klinis ulkus traumatik timbul setelah 1 hari induksi termal dilakukan, dimana lesi terlihat berbentuk bulat dengan diameter \pm 1mm, berwarna putih kekuningan dan dikelilingi oleh pinggiran yang berwarna kemerahan, hal tersebut sesuai dengan yang dijelaskan oleh Mendrofa (2015) dimana lesi berwarna putih dengan sentral kekuningan yang berisi eksudat fibrinosa dengan tepi eritematus. Pada uji *One-Way Anova* hasil perbandingan kelompok pada hari ke-3 dan ke-7 terdapat perbedaan jumlah fibroblas yang signifikan antar kelompok dengan didapatkannya nilai p sebesar 0,000. Rata-rata jumlah fibroblas tertinggi pada hari ke-3 maupun ke-7 terdapat pada kelompok perlakuan dengan pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis. Sehingga dapat diartikan bahwa nanotransfersome ekstrak kulit jeruk berpengaruh terhadap jumlah fibroblas.

Pada hasil uji *Post Hoc Tukey* hari ke-3 maupun ke-7 terdapat perbedaan yang signifikan antara K(-) dan PA, K(-) dan PB, K(+) dan PA, K(+) dan PB. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah fibroblas yang signifikan antara kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan. Tetapi terdapat hasil lain yang diketahui bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara PA dan PB walaupun jumlah fibroblas pada PB lebih tinggi dibandingkan PA. Hal tersebut disebabkan karena perbedaan kadar kulit jeruk nipis yang lebih banyak pada ekstrak kulit jeruk nipis yaitu 100% dibandingkan

pada nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis yaitu 33%. Dengan kata lain dengan kadar kulit jeruk nipis yang lebih sedikit, nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis memiliki kemampuan yang sama bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak kulit jeruk nipis yang memiliki kadar kulit jeruk nipis yang lebih banyak.

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap jumlah fibroblas pada proses penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar. Sehingga hipotesis pada penelitian ini dapat diterima. Hal tersebut dapat dibuktikan juga dengan jumlah fibroblas yang lebih tinggi pada nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis dibandingkan dengan ekstrak kulit jeruk nipis, padahal kandungan kulit jeruk nipis pada nanopartikel yang dienkapsulasi oleh transfersome memiliki kadar yang lebih sedikit dibandingkan dengan ekstrak kulit jeruk nipis.



BAB VI PENUTUP

6.1 Kesimpulan

1. Kandungan quercetin pada ekstrak kulit jeruk nipis sebanyak 37,13 $\mu\text{g/ml}$.
2. Ukuran partikel nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis yang paling kecil yaitu pada formula 2 sebesar 169,76 nm dengan nilai zeta sebesar -3,53.
3. Nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) berpengaruh terhadap jumlah fibroblas pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wisar.
4. Rata-rata jumlah fibroblas paling tinggi pada hari ke-3 yaitu pada pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis sebesar 65,00 dan paling rendah pada kontrol negatif dan postif sebesar 41,50.
5. Rata-rata jumlah fibroblas paling tinggi pada hari ke-7 yaitu pada pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis sebesar 110,50 dan paling rendah pada kontrol negatif sebesar 70,00.
6. Rata-rata jumlah fibroblas paling tinggi pada kelompok nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis hari ke-7.

6.2 Saran

1. Perlu dilakukan pembuatan nanotransfersome dalam sediaan gel dimana daya retensinya lebih kuat karena sebagian besar air didalamnya hampir tidak ada sehingga mudah diserap.
2. Perlu dilakukan variasi formula pembuatan nanotransfersome untuk diperoleh formula yang paling efektif pada penghantaran obat.
3. Perlu dilakukan uji karakterisasi morfologi nanotransfersome menggunakan uji TEM (*Transmission Electron Microscopy*).
4. Perlu dilakukan uji lanjut dengan pewarnaan IHC untuk melihat *growth factor* mana yang mempengaruhi peningkatan jumlah fibroblas.



5. Perlu dilakukan uji lanjut mengenai dosis pemberian nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis pada penyembuhan luka mukosa labial tikus wistar.
6. Perlu dilakukan uji toksisitas pada nanotransfersome ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle).



DAFTAR PUSTAKA

- Abdassah, M. 2017. Nanopartikel dengan Gelasi Ionik. *Farmaka*. 15(01). Hal. 50-51.
- Adindaputri Z., Purwanti N., Wahyudi I.A. 2013. Pengaruh Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* Swingle) Konsentrasi 10% Terhadap Aktivitas Enzim Glukosiltransferase *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi*. 20(2). Hal. 126-131.
- Amalia A., Jufri M., Anwar E. 2015. Preparasi dan Karakterisasi Sediaan Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Gliklazid. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. April 2015. hal. 108-114.
- Amtha R., Marcia M., Aninda A.I. 2017. Plester Sariawan Efektif dalam Mempercepat Penyembuhan Stomatitis Aftosa Rekuren dan Ulkus Traumatikus. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. 3(2). Hal. 69-75.
- Andriani R., Nashrianto H., Aminingsih T. *Potensi Aktivitas Antioksidan dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya L*) Menggunakan Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)*. Skripsi. Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.
- Castellanos J.L., Guzman L.D., Guanajuato. 2008. *Lesions of the oral mucosa: an epidemiological study of 23785 Mexican patients*. Mosby [serial online]. Hal. 78-85.
- Chairunnissa, S.M. 2011. *Traumatik Ulser disertai Coated Tongue*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran Bandung. Hal. 9-10.
- Chaudharya H, Kohli BK, Kumar V. 2013. Nano-Transfersomes As A Novel Carrier For Transdermal Delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 454 (2013) 367–380.

Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

Destri C., Sudiana I.K., dan Nugraha J. 2017. Potensi *Jatropha multifida* terhadap Jumlah Fibroblas pada Aphthous Ulcer Mukosa Mulut Tikus. *Jurnal Biosains Pascasarjana*. 19(1).

Ekawati E.R., Santoso S.D., Purwanti Y.R. 2017. Pemanfaatan Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) Sebagai Larvasida *Aedes aegypti* Instar III. *Jurnal Biota*. 3(1). Hal. 1-5.

Ermawati, Dian. 2017. *Transfersome: Sistem Penghantaran Obat Topikal dan Transdermal*. Hal. 180-186.

Fauziyah, K.R. 2016. *Profil Tekanan Darah Normal Tikus Putih (Rattus novergicus) Galur Wistar dan Sprague-Dawley*. Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor. Hal. 2-3.

Girijaj, K.T. 2011. Herbal drug delivery systems: An emerging area in herbal drug research. *JChRDD*. 7(1): 37-47.

Hardyanti A.P., Komala O., Sari B.L. 2018. Uji Efektivitas Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* L.) dengan Perbedaan Kepolaran Pelarut terhadap *Malassezia Furfur* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Farmaka*. Universitas Pakuan. Hal. 1-9.

Harty F.J. dan Ogston R. 2014. *Kamus Kedokteran Gigi*. Jakarta: EGC.

Haryanto, S. 2006. *Sehat dan Bugar Secara Alami*. Hal. 60. Jakarta: Penebar Plus.

Hidayat, T.S.N. 2013. *Peran Topikal Ekstrak Gel Aloe Vera Pada Penyembuhan Luka Bakar Derajat Dalam Pada Tikus*. Tesis. Surabaya: Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Istiqomah. 2013. *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)*. Program Studi Farmasi



Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. Hal 12-16.

Johan, R. 2015. Penggunaan Kortikosteroid Topikal yang Tepat. *Continuing Profesional Development*, 42(4), Hal. 308-312.

Johnson, Robert. 1996. *Environmental Scanning Electron Microscopy*. Philips Electron Optics. Netherlands.

Junqueira 1997. *Histologi Dasar*. Edisi 8. Jakarta: EGC.

Khotimah, K. 2016. *Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain Pada Ekstrak Metanol Daun Carica pubescens Lenne & K. Koch Dengan LC/MS (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry)*. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.

Levina, L. 2013. *Kortikosteroid*. Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Krida Wacana.

Lubis, K. 2015. Metoda-Metoda Karakterisasi Nanopartikel Perak. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat*. 21(79). Hal. 53

Mahmood S., et al. 2017. *Advanced Characterizations of Nanoparticles for Drug Delivery: Investigating Their Properties Through the Technique Used in Their Evaluations*. *Nanotechnol Rev*. 6(4): 355-372.

Martien R., Adhyatmika, Irianto I.D.K., Farida V., Sari D.P. 2012. Perkembangan Teknologi Nanopartikel Sebagai Sistem Penghantaran Obat. *Majalah Farmasetik*. 8(01). Hal. 134-138.

Mayasari U., Laoli M.T. 2018. Karakterisasi Simplisia dan Skrining Fitokimia Daun Jeruk Lemon (Citrus Limon(L.)Burm.f.). *Klorofil*, 2 (1), Hal. 7-13.

Mendrofa A.N., Karsini I., Mulawarmanti D. 2015. Ekstrak Daun Mangrove (A.Marina) Mempercepat Kesembuhan Ulkus Traumatikus. *Dentofasial*. 14(1).

Moawad FA, Ali AA, Salem HF. 2016. *Nanopartikels-Loaded Thermosensitive in Situ Gel as A Rectal Delivery System of Tizanidine Hcl: Preparation, In Vitro And In Vivo Performance*. Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group. 24(1): 252–260.

Mulya, Y. 2012. *Verifikasi Metode Uji Penetapan Kadar Niasin (Vitamin B₃) dalam Sereal Secara Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. Skripsi. Program Studi Diploma III Analisis Kimia Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Bandung.

Ningrum R., Purwanti E., Sukarsono. 2016. Identifikasi Senyawa Alkaloid dari Batang Karamunting (*Rhodomirtus tomentosa*) Sebagai Bahan Ajar Biologi untuk SMA Kelas X. *Jurnal Pendidikan Biologi Indonesia*. 2(3). Hal. 231-236.

Noer S., Pratiwi R.D., Gresinta E. 2018. Penetapan Kadar Senyawa Fitokimia (Saponin, Tanin, Flavonoid sebagai Kuersetin) pada Ekstrak Daun Inggu (*Ruta angustifolia L.*). *Eksakta: Jurnal Ilmu-ilmu MIPA*. 18(1). Hal.19-29.

Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M., Ohta H. 2006. Flavonoid of Fruit Tissues of Citrus Species. *Biosci Biothechnol Biochem*. 70 (1). Hal. 178-92.

Okwu. 2008. Citrus Fruits: A Rich Source of Phytochemicals and Their Roles in Human Health. *Int J Chem Sc*, 6(2), Hal. 451-471.

Pasaribu G., Iskandarsyah, Sagita E. 2016. *Uji Aktivitas Antiproliferasi Formula Liposom Ekstrak Etanol Kunyit (Curcuma domestica) Terhadap Sel Kanker Payudara T47D*. Pharm Sci Res ISSN 2407-2354.



Prajapati T.S., Patel C.G., Patel C.N. 2011. Transfersomes: A Vesicular Carrier System for Transderma Drug Delivery. *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* Issue 2 (Vol 1).

Pratita, A.T.K. 2017. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Senyawa Alkaloid dari Berbagai Ekstrak Kopi Robusta (*Coffea canephora*). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. 17(2). Hal. 200.

Pratiwi A. dan Utami L.B. 2018. Isolasi dan Analisis Kandungan Minyak Atsiri pada Kembang Leson. *Bioksperimen*. 4(1). Hal. 42-47.

Pratiwi H.C. dan Manan A. 2015. Teknik Dasar Histologi pada Ikan Gurami (*Osphronemus gouramy*). *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 7(2). Hal. 153-157.

Rai S, Pandey V, Rai G. 2017. *Transfersomes As Versatile And Flexible Nano-Vesicular Carriers In Skin Cancer Therapy: The State Of The Art*. Nano Reviews & Experiments. Vol. 8, 1325708.

Ramadon D. dan Mun'im A. 2016. Pemanfaatan Nanoteknologi dalam Sistem Penghantaran Obat Baru untuk Produk Bahan Alam. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 14(2), Hal. 124.

Ratnawati E dan Ermawati R. 2011. Sintesis Nanopartikel Magnetit dengan Metode Dekomposisi Terma. *Jurnal Kimia Kemasan*. 33(01). Hal. 98

Rukmana, R.H. 2003. *Jeruk Nipis Prospek Agribisnis, Budi Daya, dan Pascapanen*. Kanisius. Hal. 13-21.

Scully C., Porter S., Porter S.R. 2003. *Orofacial Disease: Update for the dental clinical team*. Barcelona: Churchill Livingstone. hal. 11-2

Simaremare, E.S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*laportea decumana* (roxb.) wedd). *Pharmacy*. 11(01). Hal. 100.

Singh, D. 2013. Ultradefomable system: A carrier for transdermal drug delivery, *IJPSR*. 4(11): 4098-4104.

Sumbayak, E.M. 2015. Fibroblas : Struktur dan Peranannya dalam Penyembuhan Luka. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 21 (57).

Sunarjo L., Hendari R., Rimbyastuti H. 2015. Manfaat Xanthone terhadap Kesembuhan Ulkus Rongga Mulut dilihat dari Jumlah Sel PMN dan Fibroblast. *Odonto Dental Journal*. 2(2). Hal. 14-15.

Waji, A.R. dan Sugrani A. 2009. *Makalah Kimia Organik Bahan Alam : Flavonoid (Quercetin)*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Hasanuddin.

Wardani R.P., Kholifa M., Yuletnawati S.E. 2017. Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) Terhadap Penyembuhan Ulkus Traumatik Pada Rattus *novergicus* Strain Wisar. *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi*. 1(1). Hal. 23-27.

Widyastomo, Wulan K.A., Permatasari I. 2013. Pengaruh Jus Buah Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* Linn.) Terhadap Peningkatan Jumlah Fibroblas pada Soket Tikus Strain Wistar Pasca Ekstraksi Gigi. *Jurnal Prodentia*. 1(2). Hal. 62-70.

XOS. 2019. *Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM)*. East Greenbush:New York.

Yanuartono, Purnamaningsih H., Nururrozi A., Indrajulianto S. 2017. Saponin: Dampak terhadap Ternak (Ulasan). *Jurnal Pertenakan Sriwijaya*. 6(2).