

**UJI EFEK IRITASI KULIT DARI NANOEMULSI  
HIDROGEL PROPOLIS LEBAH *Trigona* sp. PADA  
KELINCI ALBINO (*Lepus nigricollis*) DAN MANUSIA  
(*Homo sapiens*)**

**SKIN IRRITATION TEST FROM NANOEMULSION  
HYDROGEL PROPOLIS OF BEE *Trigona* sp. IN  
ALBINO RABBIT (*Lepus nigricollis*) AND HUMAN  
(*Homo sapiens*)**

**KEVIN ADITYA NALLE  
N111 16 338**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**

**UJI EFEK IRITASI KULIT DARI NANOEMULSI HIDROGEL PROPOLIS  
LEBAH *Trigona* sp. PADA KELINCI ALBINO (*Lepus nigricollis*) DAN  
MANUSIA (*Homo sapiens*)**

**SKIN IRRITATION TEST FROM NANOEMULSION HYDROGEL  
PROPOLIS OF BEE *Trigona* sp. IN ALBINO RABBIT (*Lepus  
nigricollis*) AND HUMAN (*Homo sapiens*)**

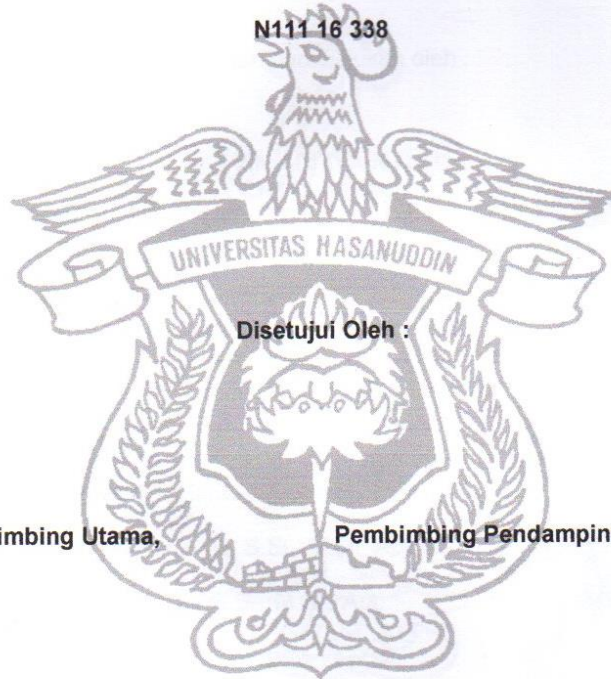


**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2020**

UJI EFEK IRITASI KULIT DARI NANOEMULSI HIDROGEL PROPOLIS  
LEBAH *Trigona* sp. PADA KELINCI ALBINO (*Lepus nigricollis*) DAN  
MANUSIA (*Homo sapiens*)

KEVIN ADITYA NALLE

N111 16 338



Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping,



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt. Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP.19670319 199203 2 002 NIP.19861111 201504 1 001

Pada tanggal : Agustus 2020

**SKRIPSI**

**UJI EFEK IRITASI KULIT DARI NANOEMULSI HIDROGEL PROPOLIS  
LEBAH *Trigona* sp. PADA KELINCI ALBINO (*Lepus nigricollis*) DAN  
MANUSIA (*Homo sapiens*)**

**SKIN IRRITATION TEST FROM NANOEMULSION HYDROGEL  
PROPOLIS OF BEE *Trigona* sp. IN ALBINO RABBIT (*Lepus  
nigricollis*) AND HUMAN (*Homo sapiens*)**

Disusun dan diajukan oleh :

**KEVIN ADITYA NALLE  
N111 16 338**

Telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian Skripsi  
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin  
pada tanggal 2020  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Panitia Penguji Skripsi :**

1. Prof. Dr.rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt.
2. Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt.
3. Achmad Himawan, S.Si., M.Si., Apt.
4. Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt.

*mu*  
.....  
*M. Nur Amir*  
.....  
.....  
.....

Mengetahui,  
Ketua Program Studi S1 Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin



Firzan Naini, S.Si., M.Biomed.Sc., Ph.D., Apt.  
NIP. 19820610 200801 1 012

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, Agustus 2020

Yang menyatakan,  
  
Kevin Aditya Nalle  
N11116338

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkat dan anugerah-Nya penulis mampu menyelesaikan skripsi ini, sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Rasa bangga, hormat, dan terima kasih dengan tulus penulis berikan kepada:

1. Ibu Prof. Dr.rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt. selaku pembimbing utama dan Bapak Muhammad Nur Amir, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping atas segala bimbingan, arahan, dan pelajaran berharga yang telah diberikan kepada penulis dalam proses penyelesaian tugas akhir ini.
2. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA., Apt. dan Bapak Achmad Himawan, S.Si., M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan-masukan untuk penelitian dan perbaikan skripsi ini
3. Dekan dan para Wakil Dekan serta segenap dosen dan staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas setiap bimbingan dan didikan yang diberikan kepada penulis selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
4. Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt. selaku penasehat akademik penulis yang telah memberikan banyak nasehat selama mengikuti perkuliahan

5. Kedua orang tua penulis, Ayah F.E. Fredy Nalle dan Ibu Dina Irana, untuk cinta kasihnya yang tak terhingga yang terwujud lewat nasihat, dukungan moril dan materil, dan banyak hal lainnya yang tidak dapat diaksarakan
6. Segenap Korps Asisten Biofarmasi yang telah menjadi teman belajar dan menjadi tempat berbagi suka-duka
7. Segenap angkatan 2016 (NEOST16MINE) dan PMKO Filadelfia yang telah menjadi keluarga selama menempuh pendidikan

Serta terkhusus untuk Emilia Amanda Toding, NBA (Neos Boy Army), rekan penelitian Afdil Viqar Viqih, S.Si., Apt. dan Sherlly Afrilia, S.Si yang selalu menemani selama proses pengerjaan penelitian dan terima kasih atas segala kerjasama, serta motivasi untuk penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis sangat mengharapkan tanggapan maupun saran dalam penyempurnaan skripsi ini. Semoga skripsi ini bermfaat dalam pengembangan Farmasi ke depan.

Makassar, Agustus 2020

Kevin Aditya Nalle

## ABSTRAK

KEVIN ADITYA NALLE. *Uji Efek Iritasi Kulit Dari Nanoemulsi Hidrogel Propolis Lebah Trigona sp. Pada Kelinci Albino (Lepus Nigricollis) Dan Manusia (Homo Sapiens)*. (Dibimbing oleh Marianty A. Manggau dan Muhammad Nur Amir).

Propolis telah banyak dimanfaatkan dalam bidang kesehatan dan kosmetik, dan dapat dijumpai dalam berbagai bentuk sediaan salah satunya yaitu nanoemulsi hidrogel. Penggunaan propolis dalam sediaan farmasi dan kosmetik telah beberapa kali dilaporkan menyebabkan kasus alergi dan kontak dermatitis selama dua dekade terakhir. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek iritasi kulit dari sediaan nanoemulsi hidrogel propolis lebah *Trigona* sp. pada kulit kelinci albino (*Lepus nigricollis*) dan manusia menggunakan metode uji iritasi kulit Draize dan *Human 4-h patch test*. Kontrol positif yang digunakan yaitu 20% *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Hasil pengamatan visual dari kedua metode uji menunjukkan pengujian sediaan nanoemulsi hidrogel propolis lebah *Trigona* sp. tidak menyebabkan reaksi eritema dan edema pada kulit kelinci dan manusia, sehingga tergolong ke dalam kategori 4, non-iritan, dengan nilai indeks iritasi primer yaitu 0.

**KATA KUNCI:** Propolis lebah *Trigona* sp., nanoemulsi hidrogel, uji iritasi, *Human 4-h patch test*.



## ABSTRACT

**KEVIN ADITYA NALLE.** *Skin Irritation Test from Nanoemulsion Hydrogel Propolis of Bee Trigona sp. in Albino Rabbit and Human.* (Supervised by Marianty A. Manggau and Muh. Nur Amir).

Propolis has been widely used in the fields of health and cosmetics, and can be found in various dosage forms, one of which is nanoemulsion hydrogel. The use of propolis in pharmaceutical and cosmetic preparations has been published several times which causes cases of allergies and contact dermatitis over the past two decades. The aim of this study is to determine the skin irritation effect from nanoemulsion hydrogel propolis preparation of bee *Trigona* sp. on the skin of albino rabbit (*Lepus nigricollis*) and human using the Draize skin irritation test method and the Human 4-hour patch test. The positive control used is 20% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). The results of observations of two test methods for testing nanoemulsion preparations of *Trigona* sp. does not cause erythema and edema reactions in rabbits and human skin, so it is classified into category 4, not irritant, with a primary irritation index value of 0.

**KATA KUNCI:** Propolis *Trigona* sp. bee, nanoemulsion hydrogel, irritation test, *Human 4-h patch test*.

## DAFTAR ISI

	halaman
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	IX
ABSTRAK	XI
ABSTRACT	
XII	
DAFTAR ISI	
XIII	
DAFTAR TABEL	XVI
DAFTAR GAMBAR	
XVII	
DAFTAR LAMPIRAN	
XVIII	
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Propolis	4
II.1.1 Uraian Umum Propolis	4

II.1.2 Karakteristik Propolis	5
II.1.3 Kandungan Propolis	6
II.1.4 Manfaat Propolis	8
II.2 Propolis Lebah <i>Trigona</i> sp.	10
	halaman
II.3 Uraian Hewan Coba ( <i>Lepus nigricollis</i> )	11
II.4 Kulit	13
II.5 Dematitis Kontak Iritan	18
II.6 Iritasi Primer	19
II.7 Metode Uji Iritasi Akut Dermal	21
II.7.1 Uji Iritasi Kulit Draze	21
II.7.2 <i>Human 4-h patch test</i>	22
II.8 Nanoemulsi	25
II.9 Hidrogel	28
BAB III METODE PENELITIAN	26
III.1 Bahan dan Metode	26
III.1.1 Alat	26
III.1.2 Bahan	26
III.2 Prosedur Kerja	26
III.2.1 Uji Iritasi Kulit Draize	26
III.2 <i>Human 4-h patch test</i>	29
III.3 Pengumpulan Data dan Analisis Data	30

III.4 Pembahasan Hasil dan Penarikan Kesimpulan	30
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	31
IV.1 Hasil Uji Iritasi Kulit Draize	32
IV.2 <i>Hasil Human 4-h Patch Test</i>	33
	halaman
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	36
V.1 Kesimpulan	36
V.2 Saran	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	44

## DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Kandungan Propolis	6
2. Data biologik <i>Lepus nigricollis</i>	13
3. Sistem Penilaian Iritasi Kulit	28
4. Kriteria Penggolongan Sediaan Uji Iritasi Akut Dermal	28
5. Penilaian respon iritasi kulit	30
6. Hasil Pengamatan Uji Iritasi Kulit Draize	34

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Propolis	4
2. (a) Lebah <i>Trigona</i> sp.; (b) Propolis Lebah <i>Trigona</i> spp.	11
3. Data biologik <i>Lepus nigricollis</i>	13
4. Lapisan Kulit	14
5. Lapisan Epidermis	16
6. Iritasi Primer	20
7. Klasifikasi Iritasi Kulit / Potensi Korosi	24
8. Hasil Pengamatan <i>Human 4-h Patch Test</i>	34
9. Alat & Bahan	46
10. 20% <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Kontrol Positif)	46
11. Penempelan <i>Patch</i> Pada Kulit Sukarelawan Uji	46
12. Pengamatan Respon Iritasi Kulit Sukarelawan Uji	46
13. Pencukuran Hewan Uji (Kelinci Albino)	46
14. Penempelan <i>Patch</i> Pada Hewan Uji Tahap <i>Initial Test</i>	46
15. Pengamatan Respon Iritasi Kulit Hewan Uji Tahap <i>Initial Test</i>	47
16. Penempelan <i>Patch</i> Pada Hewan Uji Tahap <i>Confirmatory Test</i>	47
17. Pengamatan Respon Iritasi Kulit Tahap <i>Confirmatory Test</i>	47

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Uji Iritasi Kulit Draize	43
2. Skema Kerja <i>Human 4-h Patch Test</i>	44
3. Perhitungan Indeks Iritasi Primer	45
4. Dokumentasi Penelitian	46
5. Dokumentasi Hasil Pengamatan Uji Iritasi Kulit Draize	48
6. Dokumentasi Hasil Pengamatan <i>Human 4-h Patch Test</i>	49
7. Naskah Penjelasan Untuk Mendapat Persetujuan Dari Subjek Penelitian	51
8. Formulir Persetujuan Mengikuti Penelitian Setelah Mendapat Penjelasan	53
9. <i>Informed Consent</i> Calon Subjek Uji <i>Human 4-H Patch Test</i>	55
10. Formula Sediaan Uji	58
11. Rekomendasi Persetujuan Etik Hewan	59
12. Rekomendasi Persetujuan Etik Manusia	60

# BAB I

## PENDAHULUAN

### I.1 Latar Belakang

Propolis (lem lebah) merupakan matriks kompleks alami berwarna kecoklatan yang dikumpulkan oleh lebah pekerja dari berbagai resin jenis tumbuhan yang dicampur dengan lilin dan enzim saliva lebah ( $\beta$ -glucosidase) (Zebaiou *et al.*, 2017). Propolis dilaporkan memiliki sifat antibakteri, antijamur, antivirus, dan banyak aktivitas biologis bermanfaat lainnya: anti-inflamasi, antiulcer, anestesi lokal, hepatoprotektif, antitumor, dan imunomodulator (Fatoni *et al.*, 2008; Kuropatnicki *et al.*, 2013; Sharteshnizi *et al.*, 2015; Szliszka *et al.*, 2013). Karena sifat biologisnya, propolis saat ini secara luas digunakan dalam bidang farmasi dan kosmetik (Wagh, 2013).

Perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi menyebabkan sistem penghantaran (*delivery system*) propolis dalam bidang kosmetik berkembang dengan pesat. Saat ini, telah banyak sistem penghantaran propolis yang diusulkan dan dievaluasi, seperti salep, sistem mukoadesif, sistem bioadesif, *lotion* dan krim, nanopartikel, hidrogel dan nanoemulsi (Bruschi *et al.*, 2016). Saat ini, kombinasi nanoemulsi dan hidrogel telah diminati sebagai salah satu sistem penghantaran obat topikal yang paling menjanjikan dengan alasan perpaduan nanoemulsi ke dalam matriks



hidrogel menghasilkan nanoemulgel yang mungkin lebih relevan untuk aplikasi transdermal dibandingkan dengan nanoemulsi (Arora *et al.*, 2014).

Uji keamanan menjadi syarat penting dalam pengembangan suatu obat, obat tradisional dan kosmetik (BPOM, 2014), termasuk yang menggunakan bahan baku alam (Hayes & Kruger, 2014) seperti propolis. Penggunaan propolis dalam sediaan farmasi dan kosmetik beberapa kali telah dilaporkan menyebabkan kasus alergi dan dermatitis kontak dalam dua dekade terakhir (Sforcin, 2007; Rajpara *et al.* 2009). Oleh karena itu, semua produk kulit dan kosmetik baik produk yang sedang diteliti maupun yang dikembangkan memerlukan hasil uji iritasi akut dermal untuk memastikan keamanan konsumen (Watanakrai *et al.*, 2007).

Uji iritasi akut dermal merupakan salah satu uji toksisitas non klinik secara *in vivo* yang digunakan sebagai acuan dalam pelaksanaan kegiatan uji keamanan (BPOM, 2014). Uji iritasi kulit Draize merupakan uji iritasi yang paling umum digunakan dan menjadi standar uji (Robinson & Perkins, 2002).

Menurut beberapa penelitian uji iritasi kulit Draize memiliki kelemahan, dalam beberapa penelitian menunjukkan bahwa struktur epidermis kulit kelinci berbeda dengan kulit manusia (Costin *et al.*, 2009). Pada tahun 1998, dikembangkan metode pengujian iritasi yaitu *human 4-hour patch test* yang menggunakan subjek uji manusia dimana hasil uji

yang diperoleh lebih akurat dibanding metode pengujian dengan hewan coba atau secara *in vitro* (Basketter *et al.*, 2012).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk menguji efek iritasi kulit sediaan nanoemulsi hidrogel propolis lebah *Trigona* sp. pada kulit kelinci albino (*Lepus nigricollis*) dan kulit manusia.

## **I.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan uraian di atas, rumusan masalah yang dapat ditarik adalah apakah sediaan nanoemulsi hidrogel propolis lebah *Trigona* sp. menunjukkan efek iritasi pada kulit kelinci albino (*Lepus nigricollis*) dan kulit manusia?

## **I.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui efek iritasi kulit sediaan nanoemulsi hidrogel propolis lebah *Trigona* sp. pada kulit kelinci albino (*Lepus nigricollis*) dan kulit manusia.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### II.1 Propolis

##### II.1.1 Uraian Umum Propolis



**Gambar 1. Propolis**

Propolis (lem lebah) merupakan matriks kompleks alami berwarna kecoklatan yang dikumpulkan oleh lebah pekerja dari berbagai resin jenis tumbuhan yang dicampur dengan lilin dan enzim saliva lebah ( $\beta$ -glucosidase). (Zebaiou *et al.*, 2017). Kata propolis berasal dari bahasa Yunani, di mana pro yang berarti "dalam pertahanan" atau "untuk" dan polis untuk "komunitas" atau "kota," yang berarti produk alami ini digunakan dalam pertahanan sarang (Aminimoghadamfarouj & Nematollahi, 2017). Lebah menggunakan propolis tidak hanya untuk melindungi sarang mereka, dengan menutup retakan, menyegel ruang dan menghaluskan dinding internal sarang, tetapi mereka juga

menggunakannya sebagai antiseptik untuk melindungi larva lebah, menyimpan madu dan mencegah infeksi mikroba (Akabay *et al.*, 2017; Drescher *et al.*, 2017). Selain itu, propolis juga dimanfaatkan oleh lebah untuk mencegah dekomposisi bangkai pengganggu yang berada di dalam sarang dan untuk menjaga suhu di dalam sarang sekitar 35°C (Pasupuleti *et al.*, 2017; Yuksel & Akyol, 2016).

### **II.1.2 Karakteristik Propolis**

Propolis memiliki warna yang bervariasi sesuai dengan daerah dan sumber tanamannya. Propolis mencair pada suhu 60°C hingga 70°C, untuk beberapa jenis propolis mencair pada suhu 100°C. Propolis akan berbentuk padat pada suhu rendah dan lunak pada suhu tinggi. Propolis diekstraksi secara komersial dengan pelarut yang cocok yaitu metanol, kloroform, eter dan aseton, dan pelarut terbaik yaitu etanol. Aktivitas biologis dari propolis bervariasi, tergantung asal geografisnya serta sumber tanamannya. Propolis dapat ditemukan secara komersial dalam bentuk pasta gigi, tablet hisap, obat kumur, krim, gel, sirup batuk, kue, bubuk, sabun, permen karet dan tablet, sampo, cokelat, lotion kulit, pasta gigi, antiseptik campuran, dan juga digunakan untuk pengawetan daging, Koloni lebah diperkirakan dapat menghasilkan propolis 150-200 gram per tahun (Ahmed *et al.*, 2017; Kuropatnicki *et al.*, 2013; Martinotti and Ranzato, 2015; Wagh, 2013).

### II.1.3 Kandungan Propolis

Dalam hal komposisi kimia, propolis umumnya terdiri dari 50% resin, 30% lilin, 10% minyak esensial, 5% serbuk sari, dan 5% zat lain, termasuk turunan dari asam sinamat, asam fenolik, asam benzoat tersubstitusi, asam amino dan flavonoid (Salatino *et al.*, 2005; Wagh, 2013). Efek biologis dan komposisi kimia propolis tergantung pada berbagai faktor, seperti jenis sumber nabati, asal geografis, musim dalam setahun, dan waktu pengumpulan. (Elnakady *et al.*, 2017; Krol *et al.*, 2013; Tagliacollo & Orsi, 2011).

**Tabel 1. Kandungan Propolis**

<b>Kandungan</b>	<b>Referensi</b>
<b>Flavonoids, flavanones, flavones &amp; flavonols:</b> Islapienin, Ermanin, Pectolinarigenin, Sakuranetin, Isosakuranetin, Quercetin-3,30-dimethyl ether, 3-acetyl pinobanksin, Betuletol, Isorhamnetin, Kaempferide, Rhamnazin, Rhamnetin, Alnusin, Alpinetin, Alnusitol, Pinostrobin, Pinocembrin, Chrysin, Tectochrysin, Acacetin, Rhamnocitrin, Quercetin, Galangin, Apigenin, Pinobanksin, Kaempferol, Rutin, Catechin, Luteolin, Naringenin.	Walker & Crane (1987); Lotfy (2006)
<b>Benzoic acid and derivatives:</b> Benzoic acid, Salicylic acid, Gentisic acid, Gallic acid, Phenylmethyl ester of benzoic acid, Phenylmethyl ester of salicylic acid, Trans-coniferyl benzoate, Trans-p-coumaryl benzoate, Protocatechuic acid	Walker & Crane (1987)
<b>Benzaldehyde derivatives:</b> Vanillin, Caproic aldehydes, Isovanillin p-hydroxybenzaldehyde, Protocatechualdehyde	Abdulkhali <i>et al.</i> (2017), Akbay <i>et al.</i> (2017), Walker & Crane (1987)
<b>Cinnamyl alcohol, cinnamic acid &amp; its derivatives:</b> Cinnamyl alcohol, Hydrocaeffic acid, Isoferulic acid, Cinnamic acid methyl ester, Cinnamic acid ethyl ester, Cinnamylidene acetic acid, Cinnamic acid, Caffeic acid, Ferulic acid	Walker & Crane (1987)
<b>Aliphatic hydrocarbons:</b> Eicosine, 1-octadecene, Tricosane, Pentacosane, Eicosane, Heneicosane	
<b>Sugar:</b> d-ribofuranose, d-fructose, d-glucitol, d-gulose, Talose, Sucrose, d-glucose	

<b>Vitamins:</b> B1, B2(complex), B6, C, E	Kuropatnicki <i>et al.</i> (2013)
<b>Nicotinic acid, Pantothenic acid Chalcones &amp; dihydrochalcones :</b> Alpinetin chalcone, Naringinen chalcone, Pinobanksin chalcones, Pinobanksin-3-acetate chalcone, Pinostrobin chalcone, Pinocembrin chalcones, Sakuranetin chalcone, 20,6O,a-trihydroxy-4O-methoxy chalcone, 20,6,dihydroxy-4O-methoxydihydro chalcone, 20,4O,6-trihydroxydihydro chalcone	Marcucci (1995)
<b>Amino acids:</b> Alanine, b-alanine, a-amino butyric acid, d-amino butyric acid, Arginine, Asparagine, Aspartic acid, Cystine, Cystein, Glutamic acid, Glycine, Histidine, Hydroxyproline, Isoleucine, Leucine, Lysine, Methionine, Ornithine, Phenylalanine, Proline, Pyroglutamic acid, Sarcosine, Serine, Threonine, Tryptophane, Tyrosine, Valine	
<b>Esters:</b> Methyl palmitate, Cinnamyl-trans-4- coumarate, Ethyl palmitate, Stearic acid methyl ester, Phthalate ester, Benzyl benzoate, Benzyl-trans-4- coumarate, 3-Methyl-3-butenyl isoferulate, 3-Methyl-2-butenyl isoferulate, 3-Methyl-3-butenyl caffeate, 2-Methyl-2-butenyl caffeate, 3-Methyl-2-butenyl caffeate, Benzyl caffeate, Phenylethyl caffeate, Cinnamyl caffeate, Tetradecyl caffeate, Tetradecenyl caffeate, Tetradecenyl caffeate (isomer), Tetradecanyl caffeate, Hexadecyl caffeate	El Hady & Hegazi (2002)
<b>Other acids and derivatives :</b> Phenylmethyl ester of 14- methylpentadecanoic acid, Ethyl ester of palmitic acid, Myristic acid, Sorbic acid, Butyl-2-methylpropyle ester of Phthalic acid, Stearic acid, Methyl ester of alnustic acid	Walker & Crane (1987)
<b>Alcohol, ketones, phenols and heteroaromatic compounds:</b> Benzyl alcohol, Hexadecanol acetate, Coumarine, Pterostilbene, Xanthorrhoeol, Scopoletol	
<b>Terpene, Sesquiterpene, alcohol &amp; derivatives:</b> Geraniol, Neroledol, b-bisabolol, Guaiol, Farnisol, Dihydroeudesmol, aacetoxybetulenol	
<b>Sesquiterpene &amp; Triterpene hydrocarbons:</b> b-patchoulene, b-bisabolene, Squalene, b-bourbonene, Copaene, Calarene, Calamenene, Caryophyllene, Patchoulane, Selenene, Aromadendrene	
<b>Sterols &amp; steroid hydrocarbons:</b> Cholestrilene, Cholinasterol, Stigmasterol, b-dihydrofucosterol, Lanosterol, Cholesterol	
<b>Minerals:</b> Sr, Ba, Cd, Sn, Pb, Ti, Ag, Co, Mo, Al, Si, V, Ni, Mn, Cr, Na, Mg, Cu, Ca, Zn, Fe, K	
<b>Enzymes:</b> Glucose-6-phosphatase, Acid phosphatase, Adenosine triphosphatase, Succinic dehydrogenase	Lotfy (2006); Pasupuleti <i>et al.</i> (2017); Walker & Crane (1987)

<p><b>Ketones:</b> Acetophenone, p-acetophenol acetophenone, Methylacetophenone, 6-methylketone</p> <p><b>Waxy acids:</b> Archid acid, Behenic acid, Cerotic acid, Lauric acid, Linoleic acid, Lignoceric acid, Montanic acid</p> <p><b>Aliphatic acids &amp; aliphatic esters:</b> Acetic acid, Angelic acid, Butyric acid, Crotonic acid, Fumaric acid, Isobutyric acid, Methylbutyric acid, Isobutyl acetate, Isopentyl acetate, Isopentynyl acetate</p> <p><b>Alcohol:</b> Benzene methanol, Cinnamyl alcohol, Glycerol, a-glycerophosphate, Phenethyl alcohol, Isobutenol, Hydroquinone, Prenyl alcohol</p>	Marcucci (1995)
<p><b>Aliphatic acids:</b> Lactic acid, Hydroxyacetic acid, Malic acid, 5-Hydroxy-n-valeric acid, 2,3-Dihydroxypropanoic acid, Pentonic acid-2-deoxy-3,5-dihydroxy-c-lactone, Pentonic acid-2-deoxy-3,5-dihydroxy-c-lactone (isomer), Succinic acid, 2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone, 2,3,4,5-Tetrahydroxypentanoic acid-1,4-lactone(isomer), Nonanoic acid, Palmitic acid, Oleic acid, Decanoic acid, Dodecanoic acid, Tetradecanoic acid, Heptadecanoic acid, Octadecenoic acid, Tetracosanoic acid, Eicosanoic acid, Hexacosanoic acid, 2-Hydroxy hexacosanoic acid</p> <p><b>Fatty acids (C7-C18 acids) Other compounds:</b> Phosphoric acid, 1,4-Dihydroxy benzene, 4-Hydroxy benzaldehyde, 4-Hydroxy acetophenone, 1,2,4-trihydroxy butane, 1,2,3-trihydroxy butanal, 1,2,3-trihydroxy butanal (isomer), Myristicin, 1,8-dihydroxy-3-methyl anthraquinone, Myristicin (isomer)</p>	El Hady & Hegazi (2002)

#### II.1.4 Manfaat Propolis

Propolis telah digunakan secara luas oleh manusia sebagai obat tradisional sejak tahun 300 SM. Pemanfaatan propolis untuk pengobatan dinyatakan oleh dokter Romawi dan Yunani serta ilmuwan lain, seperti Dioscorides, Galen, Aristoteles dan Pliny. Demikian pula, dokter menggunakan propolis secara efisien untuk pengobatan cedera selama pertempuran Anglo-Boer dan juga dalam Perang Dunia II. Orang Mesir purba menggunakan propolis untuk melindungi mayat mereka dari pembusukan dan menyembuhkan luka karena mereka mengetahui sifat

pembusukan propolis. Selanjutnya, propolis diakui sebagai agen anti-bakteri selama abad ke-17 dan ke-20 di Eropa. Di Inggris, Propolis diakui sebagai obat yang lebih baik untuk perawatan luka selama abad ke-17. Demikian pula di Cina, propolis diakui sebagai obat anti-kanker dan anti-infeksi. Laporan ilmiah pertama tentang propolis, komposisi dan tindakan kimianya diumumkan kepada publik pada tahun 1908 (Machado *et al.*, 2017; Wagh, 2013; Toreti *et al.*, 2013; Martinotti & Ranzato, 2015).

Propolis dilaporkan memiliki manfaat besar pada kesehatan manusia dan digunakan untuk berbagai keperluan. Saat ini, propolis digunakan sebagai antibakteri, antijamur, antiinflamasi, antivirus, anestesi, antioksidan, antitumoral, antiprotozoal, antikanker, antihipertensi, antikarsinogenik, anti-hepatotoksik dan memiliki aktivitas sitotoksik, dll (Omar *et al.*, 2017; Sforcin, 2016; Toreti *et al.*, 2013).

Berdasarkan khasiat-khasiat yang dimilikinya, maka propolis banyak dimanfaatkan sebagai obat-obatan. Propolis dapat digunakan untuk melawan bakteri penyebab radang tenggorokan, jamur penyebab infeksi kulit, virus penyebab flu, dan dapat pula digunakan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh secara alami karena adanya bioflavonoid yang dapat membantu meningkatkan produksi serta aktivitas sel-sel imun (Bogdanov, 2017).



## II.2 Propolis Lebah *Trigona* sp.

Indonesia memiliki banyak jenis lebah lokal yang menghasilkan madu dan propolis. Salah satunya yang dikenal sebagai penghasil propolis dalam jumlah besar adalah *Trigona* spp. (Setaiwan & Wirawati, 2016). Lebah *Trigona* merupakan jenis lebah yang tidak menyengat (*stingless bees*). *Stingless bees* adalah kelompok serangga *eusocial* yang milik lima genus yang berbeda, yaitu. *Melipona*, *Trigona*, *Meliponula*, *Dectylurina* dan *Lestrimelitta*. Lebah *trigona* adalah genus terbesar dari *stingless bees* yang ditemukan secara eksklusif di daerah Neotropik, dari Meksiko hingga Argentina dan di kawasan Indo-Australia dari India-Sri Lanka hingga Taiwan, Kepulauan Solomon, Indonesia Selatan, Nugini, dan Australia (Michener, 2000). Lebah *Trigona* merupakan serangga yang hidup berkelompok dan membentuk koloni. Menurut Sihombing (2005), klasifikasi dari *Trigona* adalah sebagai berikut :

Filum : Artrhropoda  
Kelas : Insekta  
Ordo : Hymenoptera  
Famili : Apidae  
Genus : *Trigona*  
Spesies : *Trigona* spp.



Gambar 2. (a) Lebah *Trigona* sp.; (b) Propolis Lebah *Trigona* spp.  
(Sumber: Milind *et al.*, 2012)

### II.3 Uraian Hewan Coba (*Lepus nigricollis*)

Penggunaan hewan dalam penelitian biomedis telah direkomendasikan untuk menyempurnakan dan memvalidasi prosedur yang ada, pengembangan dalam bidang farmakologi serta memahami berbagai proses fisiologis dan patologis karena tidak ada model *in vitro* yang mampu sepenuhnya meniru kompleksitas organisme manusia. Pemilihan hewan coba/uji dalam eksperimen ditentukan oleh beberapa faktor seperti biaya, kesesuaian teknis dari prosedur, prinsip-prinsip ilmiah, basis data yang tersedia (Calasans *et al.*, 2009).

Kelinci lokal (*Lepus nigricollis*) merupakan salah satu contoh hewan coba yang dapat digunakan dalam eksperimen. Kelinci (*Lepus nigricollis*) memiliki beberapa keuntungan sebagai hewan coba yaitu mudah ditangani dan diamati, memiliki siklus vital yang relatif pendek (kehamilan, laktasi, dan pubertas) dan memungkinkan transpalantasi atau transmisi tumor (Calasans *et al.*, 2009). Selain itu, kelinci menjadi pilihan yang tepat suatu eksperimen terutama dalam studi dermatologi karena kelinci memiliki ukuran dan proporsi ukuran punggungnya relatif besar, serta sensitifitas kulit baik (Kram & Keller, 2006).

Kelinci lokal (*Lepus nigricollis*) memiliki ciri-ciri bobot badan sekitar 1,5 kg dengan warna bulu abu-abu, putih, belang dan hitam (Whendrato & Madyana 1986). Menurut Damron (2003), klasifikasi kelinci adalah sebagai berikut :

Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Logomorpha
Famili	: Lepuridae
Genus	: Lepus
Spesies	: <i>Lepus nigricollis</i>

**Tabel 2. Data biologik *Lepus nigricollis***

<b>Kriteria</b>	<b>Keterangan</b>
Lama hidup	5-10 tahun
Lama Produksi Ekonomis	1-3 tahun
Lama bunting	30-35 hari
Umur disapih	6-8 minggu
Umur dewasa	4-10 bulan
Umur dikawinkan	segera sesudah timbul periode estrus
Siklus kelamin	Poliestrus
Siklus esterus	11-15 hari
Berat dewasi	1,5-7 kg jantan; 1,4- 6,5 kg betina
Berat lahir	30-70 g (tergantung jumlah anak)
Jumlah anak	4-10 ekor
Suhu rektal	38-40,1 <sup>0</sup> C
Denyut jantung	205-300 denyut/ menit
Tekanan darah	90-130 sistol, 60-90 diastol
Konsumsi oksigen	0,42-0,48 ml/ g/ jam
Volume darah	45-80 ml/ kg
Jumlah eritrosit	5-10 <sup>6</sup> / mm <sup>3</sup>
Jumlah neutrofil	3-12,5 x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
Neutrofil	30-65%
Monosit	2-16%
Eusinofil	0,5-5%
PCV	31-50
Trombosit	250-750 x 10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup>
Hb	8-17 g/ 100 ml
Protein plasma	5-8 g/ 100 ml
ALT/SGPT	48,5-78,9 IU/ liter
AST/SGOT	42,5-98,0 IU/ liter
Kolesterol serum	10-80 mg/ 100 ml
Urin	50-90 ml/ kg/ hari, kental, keruh, kuning, pH 8,2
Kecepatan tumbuh	15-20 g/ hari hingga umur 8 minggu 100-150 gr / minggu hingga umur 26 minggu

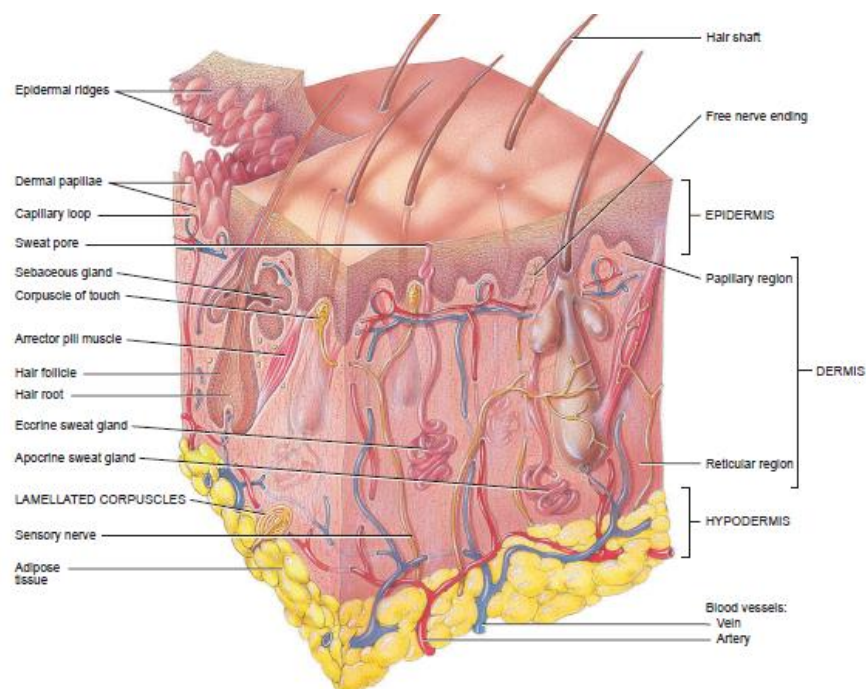
(Smith dan Mangkoewidjojo,1988)

## II.4 Kulit

Kulit, atau membran kulit, menutupi permukaan luar tubuh. Ini adalah organ tubuh terbesar di area permukaan dan berat. Pada orang dewasa, kulit menutupi area sekitar 2 meter persegi (22 kaki persegi) dan berat 4,5–5 kg (10-11 lb), sekitar 16 persen dari total berat badan.

Ketebalannya berkisar mulai 0,5 mm (0,02 inci) pada kelopak mata hingga 4,0 mm (0,16 inci) pada tumit. Namun, untuk sebagian besar tubuh, tebalnya 1-2 mm (0,04-0,08) (Jenkins & Tortora, 2013).

Secara struktural, kulit terdiri dari dua bagian utama (Gambar 3). Bagian dangkal, lebih tipis, yang terdiri dari jaringan epitel, adalah epidermis. Bagian jaringan ikat yang lebih dalam dan lebih tebal adalah dermis. Jaringan epidermis adalah daerah avaskular, sedangkan jaringan dermis merupakan daerah vaskular. Untuk alasan ini, jika jaringan epidermis terpotong tidak akan ada pendarahan, tetapi jika jaringan dermis terpotong akan terjadi pendarahan (Jenkins & Tortora, 2013).



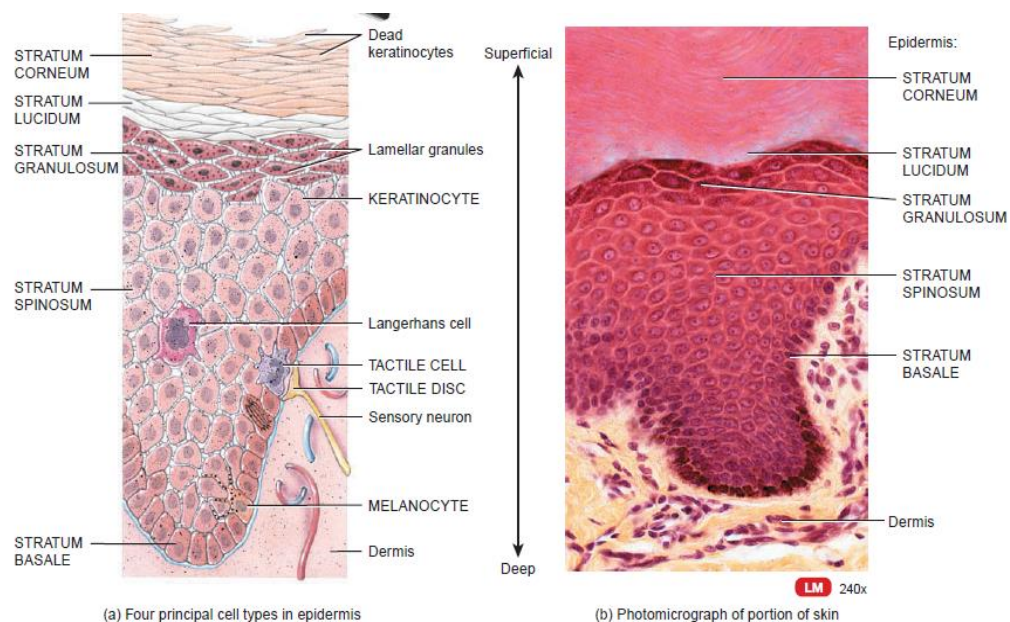
**Gambar 3. Lapisan Kulit**  
(Sumber : Jenkins & Tortoro., 2013)

Lapisan di bawah dermis adalah hipodermis atau lapisan subkutan. Lapisan ini terdiri dari jaringan areolar dan adiposa. Serat yang membentang dari dermis jangkar kulit ke hipodermis, yang pada gilirannya menempel pada fascia yang mendasarinya, jaringan ikat di sekitar otot dan tulang. Hipodermis berfungsi sebagai gudang penyimpanan lemak dan mengandung pembuluh darah besar yang memasok kulit. Daerah ini (dan kadang-kadang dermis) juga mengandung ujung saraf yang disebut sel-sel *lamellated* (pacinian) yang sensitif terhadap tekanan (Jenkins & Tortora, 2013).

Epidermis tersusun atas epitel skuamosa berlapis berlapis keratin. Ini berisi empat jenis sel utama: keratinosit, melanosit, sel Langerhans, dan sel taktil (Gambar 4). Keratinosit, sel epidermal yang paling banyak, disusun dalam empat atau lima lapisan dan menghasilkan keratin, protein berserat yang kuat yang membantu melindungi kulit dan jaringan di bawahnya dari lecet, panas, mikroba, dan bahan kimia. Keratinosit juga menghasilkan butiran lamelar, yang melepaskan pelapis kedap air yang mengurangi pemasukan dan kehilangan air (Jenkins & Tortora, 2013).

Melanosit memiliki proyeksi panjang dan ramping yang memanjang antara keratinosit dan mentransfer melanin ke mereka. Melanin adalah pigmen kekuningan atau coklat-hitam yang berkontribusi pada warna kulit dan menyerap sinar ultraviolet (UV) yang merusak. Begitu masuk keratinosit, melanin membentuk kerudung pelindung di atas nukleus di sisi

yang menghadap permukaan kulit. Dengan cara ini melanin melindungi nuklir DNA dari sinar UV. Meskipun keratinosit mendapatkan perlindungan dari melanin, melanosit sendiri sangat rentan terhadap kerusakan oleh sinar UV (Jenkins & Tortora, 2013).



**Gambar 4. Lapisan Epidermis**  
(Sumber : Jenkins & Tortoro., 2013)

Sel Langerhans berpartisipasi dalam respon imun terhadap mikroba yang menyerang kulit dengan membantu sel-sel sistem kekebalan tubuh lainnya mengenali mikroba yang menyerang dan menghancurkannya. Sel Langerhans mudah rusak oleh sinar UV (Jenkins & Tortora, 2013).

Sel Taktil (Merkel) adalah yang paling sedikit dari sel epidermis. Mereka terletak di lapisan terdalam epidermis, di mana mereka menghubungkan cakram taktil (Merkel), proses rata dari neuron sensorik (sel

saraf). Sel-sel taktil dan cakram taktil yang terkait berfungsi bersama untuk mendeteksi sensasi sentuhan (Jenkins & Tortora, 2013).

Beberapa lapisan keratinosit yang berbeda dalam berbagai tahap perkembangan membentuk empat atau lima strata, atau lapisan epidermis (Gambar 4). Lapisan terdalam epidermis, stratum basale, terdiri dari satu baris keratinosit kuboid atau kolumnar. Beberapa sel dalam lapisan ini adalah sel punca yang mengalami pembelahan sel untuk terus menghasilkan keratinosit baru. Melanosit dan sel-sel taktil (dengan cakram taktil yang terkait) tersebar di antara keratinosit lapisan stratum basale. Lapisan di atas stratum basale adalah stratum spinosum, tersusun dalam 8 hingga 10 lapisan keratinosit banyak sisi yang saling berdekatan. Sel-sel di lapisan yang lebih dangkal menjadi agak rata. Keratinosit dari stratum spinosum menyusut dan terlepas ketika disiapkan untuk pemeriksaan mikroskopis, sehingga mereka tampaknya ditutupi dengan duri seperti duri (oleh karena itu nama "spinosum"). Sel-sel Langerhans dan proyeksi melanosit hadir pada lapisan ini (Jenkins & Tortora, 2013).

Stratum granulosum terdiri dari tiga hingga lima lapisan keratinosit yang rata. Ketika keratinosit dari stratum granulosum bergerak lebih jauh dari sumber nutrisi mereka (pembuluh darah kulit), mereka tidak dapat lagi melakukan reaksi metabolisme yang vital, dan mati. Dengan demikian, stratum granulosum menandai transisi antara strata yang lebih dalam dan aktif secara metabolik dan sel-sel mati dari strata yang lebih dangkal. Ciri



khas lapisan ini adalah adanya butiran lamelar yang tertutup membran di dalam keratinosit. Butiran lamelar melepaskan sekresi kaya lipid yang disimpan di ruang antara sel-sel stratum granulosum, stratum lucidum, dan stratum korneum. Sekresi kaya lipid bertindak sebagai sealant anti air, memperlambat kehilangan air dan masuknya bahan asing (Jenkins & Tortora, 2013).

Stratum lucidum hanya ada di kulit tebal ujung jari, telapak tangan, dan tapak kaki. Ini terdiri dari empat hingga enam lapisan keratinosit mati jelas yang rata yang mengandung banyak keratin dan membran plasma yang menebal. Stratum korneum terdiri atas 25 hingga 30 lapisan keratinosit mati yang rata. Sel-sel ini terus menerus dilepaskan dan digantikan oleh sel-sel dari strata yang lebih dalam. Sel-sel ini adalah paket keratin yang sangat tipis, datar, dan tertutup membran keratin yang tidak lagi mengandung nukleus atau organel internal apa pun. Sel-sel dalam setiap lapisan saling tumpang tindih seperti sisik pada kulit ular. Di lapisan luar epidermis ini, sel-sel secara terus menerus dilepaskan dan digantikan oleh sel-sel dari strata yang lebih dalam. Lapisan sel-sel mati yang banyak membantu stratum korneum untuk melindungi lapisan yang lebih dalam dari cedera dan invasi mikroba (Jenkins & Tortora, 2013).

## **II.5 Dermatitis Kontak Iritan**

Dermatitis kontak iritan adalah inflamasi non-imunologis akut atau kronis pada kulit yang disebabkan oleh paparan iritan (Lazenby, 2011).

Ekspresi klinis yang diakibatkan oleh iritan terhadap kulit mulai dari xerosis hingga lesi kautik, hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor termasuk, sifat kimiawi (iritan, korosif atau kaustik), konsentrasi, durasi dan frekuensi kontak, lingkungan (suhu, higrometri, dan kelembaban), tipe kulit, keadaan dasar kulit yang terpapar dan sifat penyembuhan luka (Slowdonik *et al.*, 2008).

Dalam Dermatitis Kontak Iritan, bahan kimia secara langsung bertanggung jawab dalam peradangan kulit dengan sifat fisikokimianya, yang pro-inflamasi. Analisis peradangan pada dermatitis kontak iritan semuanya merujuk ke karakteristik dari reaksi inflamasi non spesifik, yaitu hiperproduksi sitokin dan kemokin, adanya infiltrat inflamasi polimorfik dan lesi apoptosis / nekrosis sel-sel epidermis dengan proliferasi kompensasi keratinosit. Tidak ada argumen untuk keterlibatan sel T (Nicolas, 2009).

## **II.6 Iritasi Primer**

Iritasi adalah reaksi kulit terhadap bahan kimia seperti alkali kuat, asam, pelarut, deterjen dan bahan kimiawi lainnya. Reaksi yang terjadi juga memperlihatkan tingkat keparahannya mulai dari hiperemia, edema, dan vesikulasi hingga ulserasi (korosi). Iritasi primer yaitu iritasi yang terjadi di daerah yang kontak dengan iritan dan secara umum, terjadi pada kontak pertama. Karena itu iritasi primer berbeda dengan sensitisasi kulit (Lu & Kacew, 2002).

Mekanisme suatu iritan mampu menyebabkan iritasi pada kulit diawali dengan kontak antara kulit dengan bahan iritan yang kemudian berpenetrasi melalui berbagai lapisan kulit terutama epidermis dan dermis. Mulanya bahan iritan akan merusak lapisan tanduk epidermis, kemudian akan mencapai membran lemak keratinosit. Bahan iritan selanjutnya akan berdifusi melalui membran sel lalu merusak lisosom, mitokondria dan komponen inti lainnya. Kerusakan keratinosit akan menyebabkan pelepasan sejumlah besar sitokin dan kemokin yang masing-masing berperan dalam induksi inflamasi (de Jong *et al.*, 2007). Keratinosit mewakili 95% sel epidermis dan merupakan sel utama dan sel pertama yang mengeluarkan sitokin setelah stimulus epikutan, sehingga memberikan peran penting dalam inisiasi dan pengembangan dermatitis kontak iritan (Norman *et al.*, 2008).



**Gambar 5. Iritasi Primer**  
(Sumber : Lestari & Adrianto., 2018)

## II.7 Metode Uji Iritasi Akut Dermal

### II.7.1 Uji Iritasi Kulit Draize

Metode uji iritasi kulit yang paling umum digunakan yaitu uji iritasi kulit Draize. Metode ini pertama kali dipublikasikan oleh Draize pada tahun 1959 yang merupakan kajian kuantitatif iritasi kulit sebagai panduan untuk uji keamanan sediaan produk. Draize mendefinisikan iritan sebagai senyawa yang menghasilkan reaksi radang kulit (inflamasi). Proses inflamasi yang tergolong sebagai iritasi kulit dicirikan oleh eritema (kemerahan kulit yang terjadi akibat peningkatan aliran darah lokal) dan edema (akumulasi cairan di bawah kulit dan daerah intetisial) (Draize *et al.*, 1959).

Uji iritasi kulit Draize adalah suatu uji pada hewan (kelinci albino) untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemaparan sediaan uji pada dermal selama 3 menit sampai 4 jam. Hasil uji dievaluasi berdasarkan kriteria bahaya dari *Globally Harmonised System (GHS) for The Classification of Chemical* (2009). Kriteria tersebut digunakan terutama untuk mengkategorikan sediaan uji yang berbahaya/ toksik. Bila sediaan uji sudah diketahui mempunyai pH ekstrim ( $\text{pH} \leq 2$  atau  $\geq 11,5$ ), maka sediaan tersebut tidak boleh diuji pada hewan uji (OECD 404, 2002; BPOM, 2014).

Prinsip uji iritasi akut dermal adalah pemaparan sediaan uji dalam dosis tunggal kepada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi

perlakuan berfungsi sebagai kontrol. Derajat iritasi dinilai pada interval waktu tertentu yaitu pada jam ke 1, 24, 48 dan 72 setelah pemaparan sediaan uji. Untuk melihat reversibilitas, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari. Hewan yang menunjukkan tanda-tanda kesakitan atau penderitaan yang parah harus dikorbankan sesuai dengan prosedur pemusnahan hewan. Selain pengamatan terhadap iritasi, semua pengaruh zat toksik terhadap kulit, seperti *defatting of skin* (OECD TG 404, 2002) dan pengaruh toksisitas lainnya serta berat badan harus dijelaskan dan dicatat. Pemeriksaan histopatologi perlu dipertimbangkan untuk menjelaskan respon yang meragukan (BPOM, 2014).

Uji ini digunakan untuk menentukan adanya efek iritasi pada kulit serta untuk menilai dan mengevaluasi karakteristik suatu zat apabila terpapar pada kulit (BPOM, 2014).

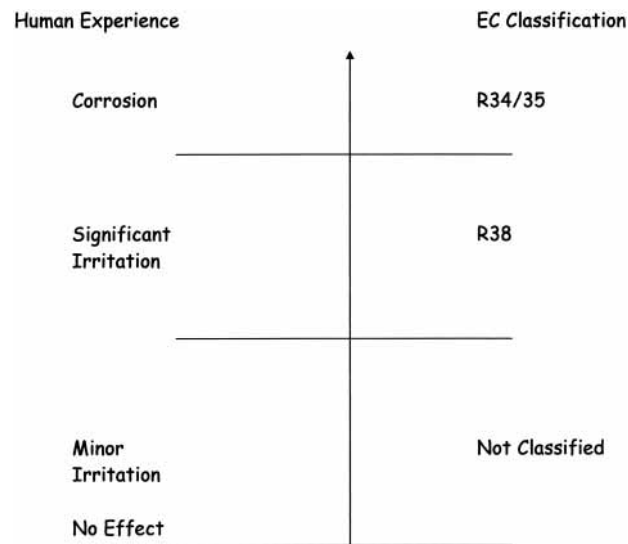
### **II.7.2 Human 4-h patch test**

*Human 4-h patch test* merupakan uji alternatif yang dirancang dan dikembangkan untuk menggantikan penggunaan hewan untuk identifikasi potensi iritasi kulit suatu zat (York *et al.*, 1996). Prosedur ini, dalam banyak hal, dirancang agar serupa dengan metodologi uji kelinci Draize yang ingin diganti. Titik akhir yang diukur (tingkat iritasi visual) sesuai mengingat bahwa itu sama dengan yang digunakan dalam prosedur uji hewan dan metode yang sangat umum dalam pengujian dermatologi (Robinson *et al.*, 2001). Berbeda dengan uji iritasi Draize yang

membandingkan pemaparan sediaan uji dalam dosis tunggal pada kulit hewan uji dengan area kulit yang tidak diberi perlakuan berfungsi sebagai kontrol (BPOM, 2014). *Human 4-h patch test* menggunakan 20% *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS) sebagai kontrol positif untuk klasifikasi iritasi yang terjadi (Robinson *et al.*, 2001).

Tujuan dari *Human 4-h patch test* bukanlah untuk membuat prediksi tentang kerentanan individu atau kelompok terhadap iritasi kulit. Sebaliknya, tes ini dikembangkan hanya untuk menentukan potensi iritasi akut dari bahan uji, menggunakan populasi uji dengan ukuran yang cukup untuk menunjukkan potensi iritasi ini dibandingkan dengan tolak ukur yang sesuai. Hubungan antara respons manusia terhadap bahan kimia dan klasifikasi kimia yang sesuai ditunjukkan pada gambar 6 (Robinson *et al.*, 2001).

Meskipun ada kemungkinan bahwa panel subjek yang sangat responsif mungkin tidak memiliki skala yang sama besarnya dengan yang sangat reaktif, namun telah menjadi pengalaman yang berlaku bahwa sekelompok sekitar 30 subjek uji memberikan penilaian yang wajar tentang potensi iritasi kulit dalam kaitannya dengan kontrol positif yang dipilih dengan baik. Ini adalah penggunaan kontrol benchmark sebagai alat relasional yang membantu memberikan konsistensi dalam klasifikasi iritasi kimia (Robinson *et al.*, 2001).



**Gambar 6. Klasifikasi iritasi kulit / potensi korosi**  
(Sumber : Robinson *et al.*, 2001)

Kunci keberhasilan pengembangan *Human 4-h patch tests* adalah pemilihan kontrol positif. Hal ini disebabkan karena respons kulit manusia terhadap iritan menunjukkan variasi antar-individu yang luas (Judge *et al.*, 1996). Hal ini diperburuk dengan kondisi lingkungan yang berbeda. Oleh karena itu, dianggap penting untuk 'mengkalibrasi' setiap populasi penelitian dengan tanggapan kolektif mereka terhadap iritan standar. SDS dipilih sebagai kontrol iritan karena merupakan iritan kulit yang paling banyak digunakan dalam uji klinis, mudah didapatkan, murah, stabil dalam situasi pengujian klinis normal, dan bebas dari efek samping lainnya (Sugar *et al.*, 1999).

Iritasi kulit bukanlah fenomena mutlak. Zat apa pun dapat menyebabkan iritasi kulit, ini hanya masalah dosis dan sifat serta tingkat pemaparan. Karena alasan ini, respons iritasi kulit pada manusia hampir

selalu komparatif. Dengan demikian, SDS dipilih tidak hanya untuk mengkalibrasi tingkat respons dalam suatu tes, tetapi juga berfungsi sebagai titik perbandingan untuk klasifikasi iritasi akut. Poin terakhir didasarkan pada fakta bahwa SDS diklasifikasikan sebagai iritan kulit (R38) sesuai dengan kriteria EC (EEC, 1992). Konsentrasi 20% SDS dipilih sebagai patokan daripada bahan yang tidak diencerkan. Konsentrasi ini dipilih sebagai ambang batas atau level minimum SDS (dalam larutan atau persiapan) yang diklasifikasikan sebagai R38 (Robinson *et al.*, 2001).

## **II.8 Nanoemulsi**

Nanoemulsi adalah sistem emulsi yang transparan, tembus cahaya dan merupakan dispersi minyak air yang distabilkan oleh lapisan film dari surfaktan atau molekul surfaktan yang memiliki ukuran droplet 50-500 nm (Shakeel *et al.*, 2008). Karena ukuran tetesan yang kecil, nanoemulsi dapat dengan mudah berpenetrasi melewati lapisan kulit dan dapat meningkatkan penetrasi bahan aktif. Nanoemulsi memiliki bentuk fisik yang transparan. Nanoemulsi memiliki beberapa keuntungan antara lain memiliki luas permukaan yang lebih besar dan bebas energi. Nanoemulsi tidak menunjukkan masalah dalam ketidakstabilan seperti pada makroemulsi yaitu creaming, flokulasi, koalesens, dan sedimentasi. Selain itu, nanoemulsi juga tidak toksik, dan tidak mengiritasi, oleh karena itu dapat diaplikasikan dengan mudah melalui kulit maupun membran mukosa. Nanoemulsi juga dapat meningkatkan absorpsi, meningkatkan



penetrasi obat, membantu mensolubilisasikan zat aktif yang bersifat hidrofob, serta memiliki efisiensi (Devarajan Ravichandran, 2011).

Batasan nanoemulsion sebagai aplikasi topikal yaitu tantangan dalam memberikan formulasi berukuran partikel kecil, ketika memberikan obat melalui kulit, sifat reologi dari nanoemulsion harus diperhatikan. Formulasi nanoemulsion tidak nyaman digunakan karena viskositasnya rendah dan daya sebar kurang baik. Oleh karena itu, pendekatan penggabungan nanoemulsion dengan sistem pembentuk gel dapat membantu mengatasi masalah ini (Chellapa *et al.*, 2015).

Komponen yang digunakan pada sediaan nanoemulsi yaitu minyak, surfaktan dan kosurfaktan. Minyak merupakan komponen penting dalam formulasi nanoemulsi karena dapat melarutkan bahan aktif lipofilik. (Gupta *et al.*, 2010). Komponen minyak yang digunakan memiliki kemampuan berpenetrasi berbeda yang nantinya akan mengembang di daerah grup ekor dari lapisan surfaktan sehingga mempengaruhi HLB. Minyak rantai pendek dapat berpenetrasi pada area grup ekor lebih baik daripada rantai panjang alkana sehingga dapat menurunkan HLB (Talegaonkar *et al.*, 2008).

Surfaktan berperan penting dalam pembentukan nanoemulsi. Surfaktan dapat menurunkan tegangan permukaan antara fase minyak dan air, menurunkan jumlah energi yang dibutuhkan untuk merusak globul, dan menghasilkan ukuran globul yang lebih kecil (Silva *et al.*,

2011). Surfaktan non ionik umumnya digunakan karena memiliki toksisitas yang rendah dibandingkan dengan surfaktan ionik (Gupta *et al.*, 2010).

Menurut sifat ionik dari molekul dalam larutan, surfaktan digolongkan menjadi 4 tipe surfaktan yaitu (Myers, 2006.)

a. Surfaktan anionik

Surfaktan anionik merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan negatif.

b. Surfaktan kationik

Surfaktan ini merupakan surfaktan dengan bagian aktif pada permukaannya mengandung muatan positif. Surfaktan ini terionisasi dalam air serta bagian aktif pada permukaannya adalah bagian kationnya.

c. Surfaktan nonionik

Surfaktan yang tidak terionisasi di dalam air adalah surfaktan nonionik yaitu surfaktan dengan bagian aktif permukaannya tidak mengandung muatan apapun.

d. Surfaktan ampoterik

Surfaktan ini dapat bersifat sebagai non ionik, kationik, dan anionik di dalam larutan, jadi surfaktan ini mengandung muatan negatif maupun muatan positif pada bagian aktif pada permukaannya.

Dalam kebanyakan kasus, penggunaan surfaktan saja tidak cukup mampu untuk mengurangi tegangan permukaan antara minyak-air, sehingga dibutuhkan kosurfaktan untuk membantu menurunkan tegangan permukaan. Penambahan kosurfaktan selain dapat menurunkan tegangan permukaan antar muka minyak-air, juga dapat meningkatkan fluiditas pada antar muka sehingga dapat meningkatkan entropi sistem. Kosurfaktan juga dapat meningkatkan mobilitas ekor hidrokarbon sehingga penetrasi minyak pada bagian ekor menjadi lebih besar (Gupta *et al.*, 2010).

## **II.9 Hidrogel**

Hidrogel adalah salah satu jenis makro molekul polimer hidrofilik yang berbentuk jaringan berikatan silang, mempunyai kemampuan mengembang dalam air (*swelling*), serta memiliki daya difusi air yang tinggi. Oleh karena sifat fisik yang khas tersebut, pada awalnya hidrogel disintesis untuk digunakan sebagaimatriks pelepasan/pelepasan obat, kontak lensa, immobilisasi enzim dan sel. Lebih jauh lagi, sesuai dengan perkembangan teknologi dan kebutuhan akan bahan baru yang dapat diaplikasikan di bidang kesehatan, aplikasi hidrogel pada beberapa tahun belakangan ini diteliti dan dikembangkan untuk aplikasi di bidang biomedis. Salah satu aplikasi hidrogel dengan prospek yang menjajikan adalah untuk pembalut luka bakar. Hal ini didasarkan pada sifat fisik lainnya dari hidrogel yaitu kemampuannya dalam mengekang air, bersifat sebagai pembasah permukaan dan biokompatibel terhadap tubuh.

Khususnya untuk pembalut luka bakar, pemakaian hidrogel tidak memberikan efek penyembuhan yang maksimal dikarenakan hidrogel hanya bersifat sebagai pendingin. Oleh karena itu, perlu ditambahkan suatu antibiotik yang akan menaikkan kinerja dari hidrogel untuk penyembuhan luka, misalnya antibiotik (Erizal, 2008). Hidrogel merupakan jaringan makro molekul yang mampu menyerap dan melepas air secara reversibel berdasarkan stimulan eksternal (Sannino *et al.*, 2009).