

**UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK ETANOL  
BUNGA KECOMBRANG (*Etlingera elatior* (Jack) R.  
M. Sm.) DENGAN METODE STABILISASI  
MEMBRAN SEL DARAH MERAH**

**DRAFT SKRIPSI**



**Oleh:**

**VIVIN ASFITRI**  
**NIM : 1504031**

**PROGRAM STUDI S1 FARMASI  
SEKOLAH TINGGI FARMASI INDONESIA  
PERINTIS PADANG  
2020**

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah segala puji dan syukur hanya kepada Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan karunia-Nya berupa ilmu, kesehatan, dan kemudahan sehingga penulis telah dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK ETANOL BUNGA KECOMBRANG (*ETLINGERA ELATIOR* (JACK) R. M. SM.) DENGAN METODE STABILISASI MEMBRAN SEL DARAH MERAH”** yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan program pendidikan strata satu pada Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STIFI) Perintis Padang.

Selesainya penulisan skripsi ini tidak lepas dari do'a, dukungan, semangat dan kasih sayang dari Ibu/Bapak, saudara dan sahabat. Rasa hormat dan terima kasih yang tulus penulis sampaikan kepada :

1. Bapak Dr. Yufri Aldi M. S, Apt selaku dosen pembimbing I yang telah meluangkan waktu, tenaga dan pikiran untuk memberikan bimbingan, nasehat dan pengarahan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.
2. Ibu Mimi Aria M.Farm, Apt selaku pembimbing akademik dan selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktunya memberikan bimbingan, dukungan, nasehat dan semangat selama penulis menyelesaikan pendidikan Strata satu di Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFI) Padang.
3. Bapak H. Zulkarni, S.Si, MM, Apt selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia Yayasan Perintis Padang.

4. Bapak dan Ibu dosen, serta seluruh staf pengajar Sekolah Tinggi Farmasi Indonesia (STIFI) Padang yang selama ini telah memberikan ilmu pengetahuan dan bimbingan serta nasehat yang sangat berguna bagi penulis selama menjalani pendidikan.
5. Kepala Laboratorium LLDIKTI Wilayah X Sumatera Barat, Analisis dan seluruh pihak yang membantu.
6. Teristimewa, penulis ucapkan terima kasih kepada Ayahanda Aswanbeadri, Ibunda Vettry dan seluruh anggota keluarga atas segala kasih sayang, dukungan material dan moral serta doa dalam penyusunan skripsi ini.

Semoga Allah SWT membalas semua amalan dan budi baik yang telah diberikan semua pihak dalam membantu penulis. Penulis menyadari sepenuhnya skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran guna kesempurnaan skripsi ini dimasa yang akan datang. Penulis berharap semoga skripsi ini menjadi sumbangan yang berguna bagi ilmu pengetahuan serta bermanfaat bagi pembaca khususnya di bidang kefarmasian.

Padang, Januari 2020

Penulis

## ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm.) dengan metode stabilisasi membran sel darah merah. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah. Metode stabilisasi sel darah merah digunakan karena sel darah merah analog dengan membran lisosomal. Mekanisme stabilisasi membran sel darah merah dapat dilihat ketika di induksi dengan larutan hipotonik hal tersebut menyebabkan terjadinya stress oksidatif sehingga memicu kerusakan membran yang ditandai dengan terjadinya hemolisis. Lisis dari sel darah merah dijadikan ukuran untuk melihat aktivitas antiinflamasi yang terjadi akibat larutan hipotonik. Dimana kestabilan sel darah merah dilihat dari nilai persentase stabilitas. Larutan pembanding yang digunakan adalah ibuprofen dengan konsentrasi 15 ppm (24,59%), 30 ppm (32,69%), 60 ppm (52,83%), 120 ppm (72,32%) yang merupakan NSAID. Hasil persentase stabilitas membran sel darah merah ekstrak etanol bunga kecombrang pada konsentrasi 15 ppm (15,95%), 60 ppm (37,85%), 250 ppm (50,93%) dan 1000 ppm (66,06%). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi paling tinggi. Hasil tersebut didukung dengan hasil analisa statistik ANOVA satu arah yang dilanjutkan dengan uji Duncan yang menunjukkan bahwa ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm tidak berbeda secara bermakna dengan ibuprofen 120 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa bunga kecombrang memiliki potensi sebagai antiinflamasi.

Kata kunci : antiinflamasi, ekstrak etanol 70%, *Etilingera elatior* (Jack)R. M.Sm.), stabilisasi membran sel darah merah

## ABSTRACT

Research on the anti-inflammatory activity test the ethanol extract flowers kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.). This study aims to determine the anti-inflammatory activity the ethanol extract flowers kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) by using the red blood cell membrane stabilization method. Red blood cell stabilization method is used because red blood cells are analogous to lysosomal membrane. Mechanism stabilization red blood cell membrane can be seen when induced with hypotonic solutions it cause oxidative stress that triggers membrane damage which is characterized by hemolysis. Lysis red blood cells is used as measure to see anti-inflammatory activity that occurs due to hypotonic solutions. Where stability of red blood cells can be seen from the value of percentage stability. Ibuprofen which is a NSAID has been used as a solution with the 15 ppm (24,59%), 30 ppm (32,69%), 60 ppm (52,83%), 120 ppm (72,32%) concentration. The stability percentage result of red blood cells membrane ethanol extract flowers kecombrang at the concentration 15 ppm (15,95%), 60 ppm (37,85%), 250 ppm (50,93%) dan 1000 ppm (66,06%). This shows that the extract with concentration of 1000 ppm has the highest anti-inflammatory activity. These result are supported by result one-way ANOVA statistical analysis followed Duncan test which showed that extract with a concentration 1000 ppm were not significantly different from ibuprofen 120 ppm. This show that kecombrang flowers has potential as an anti-inflammatory.

Keywords: anti-inflammatory, 70% ethanol extract, *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.), stabilization of red blood cell membranes

## DAFTAR PUSTAKA

<b>JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>ii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>x</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1. Tinjauan Biologi <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.....	5
2.2 Tinjauan Kimia.....	6
2.2.1 Flavonoid .....	7
2.2.2 Steroid.....	11
2.3 Tinjauan Farmakologi.....	13
2.4 Tinjauan Farmasetik .....	13
2.5 Inflamasi .....	13
2.5.1 Definisi Inflamasi .....	13
2.5.2 Mediator Inflamsi .....	14
2.5.3 Jenis Antiinflamasi .....	16
2.5.4 Mekanisme Inflamasi .....	17
2.5.5 Obat Inflamasi .....	18
2.5.6 Metode Uji Antiinflamasi.....	19
2.6 Metode Pengujian Efek Antiinflamasi .....	25
2.7 Spektrofotometer Uv-Vis .....	26
<b>BAB III. PELAKSANAAN PENELITIAN .....</b>	<b>29</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	29
3.2 Alat dan Bahan .....	29
3.2.1 Alat .....	29
3.2.2 Bahan .....	29
3.3 Metode Penelitian .....	30
3.3.1 Pengambilan sampel.....	30
3.3.2 Identifikasi Tanaman .....	30
3.3.3 Pembuatan Ekstrak .....	30
3.4 Karakterisasi <i>Etlingera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.....	31
3.4.1 Pemeriksaan Organoleptis .....	31
3.4.2 Pemeriksaan Rendemen Ekstrak.....	31
3.4.3 Pemeriksaan Susut Pengerangan.....	31
3.4.4 Penetapan Kadar Abu.....	32

3.4.5 Uji Skrining Fitokimia .....	32
3.5. Uji Aktivitas Antiinflamasi .....	33
3.5.1 Pembuatan Larutan yang Dibutuhkan .....	33
3.5.2 Pembuatan Suspensi Sel Darah Merah.....	34
3.6 Pengujian Aktivitas Ekstrak <i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.....	35
3.7 Analisis Data.....	36
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Hasil.....	37
4.2 Pembahasan .....	39
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>48</b>
5.1 Kesimpulan .....	48
5.2 Saran .....	48
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>49</b>
<b>LAMPIRAN</b>	

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Pita Absorpsi UV dari Flavonoid.....	10
2. Mediator-mediator Inflamasi.....	14
3. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang .....	61
4. Hasil Organoleptis Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang.....	61
5. Hasil Identifikasi Fitokimia Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang.....	62
6. Penentuan Susut Pengeringan Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang.....	63
7. Penentuan Kadar Abu Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang .....	63
8. Nilai Absorban Pengujian Aktifitas Stabilisasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang dan Ibuprofen terhadap Membran Sel Darah Merah Kambing pada Panjang Gelombang 577,50 nm .....	71
9. Nilai persentase Stabilitas Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah.....	72
10. Uji statistik ANOVA satu arah dengan metode stabilisasi membran sel darah merah oleh ekstrak etanol bunga kecombrang, ibuprofen dan kontrol.....	73
11. Uji Duncan dari ekstrak etanol bunga kecombrang dengan metode stabilisasi membran sel darah merah.....	74

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman bunga kecombrang .....	5
2. Struktur Flavonoid.....	7
3. Struktur Beberapa Asam Fenolat.....	8
4. Spektrum Serapan UV-Visible Jenis Flavonoid.....	11
5. Struktur Steroid.....	11
6. Skema Instrumentasi Spektrofotometer UV-Vis.....	27
7. Surat Hasil Identifikasi Bunga Kecombrang.....	53
8. Tanaman Bunga Kecombrang.....	54
9. Bunga Kecombrang.....	54
10. Eritrosit Kambing.....	55
11. Eritrosit Kambing setelah Disentrifuge.....	55
12. Larutan Uji setelah Disentrifuge .....	56
13. Spektrofotometer UV-Vis .....	56
14. Skema Kerja Ekstraksi Bunga Kecombrang .....	57
15. Pembuatan larutan yang dibutuhkan untuk menentukan aktifitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang terhadap Membran Sel Darah Merah .....	58
16. Bagan alir pembuatan Suspensi Sel Darah Merah .....	59
17. Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang ( <i>Etilingera elatior</i> (Jack) R. M. Sm.) terhadap Membran Sel Darah Merah Kambing.....	60
18. Kurva Spektrum UV Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang.....	64
19. Grafik perbandingan antara variasi konsentrasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang, Ibuprofen terhadap persentase stabilitas Membran .....	72

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Surat Identifikasi Tanaman Kecombrang dari Harbarium Universitas Andalas Padang dan Gambar.....	53
2. Skema Kerja .....	57
3. Hasil Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak Etanol 70% Bunga Kecombrang ( <i>Etilingera elatior</i> (Jack) R.M. S.).....	61
4. Data Hasil Penelitian.....	64
5. Data Perhitungan.....	65
6. Uji Aktifitas Stabilisasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang ( <i>Etilingera elatior</i> (Jack) R. M.Sm) dan Ibuprofen Terhadap Membran Sel Darah Merah .....	71
7. Pengolahan Data Secara Statistik (ANOVA) Satu Arah Dilanjutkan Uji Duncan (SPSS-23.0).....	73

## **BAB I. PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Inflamasi merupakan suatu respon jaringan terhadap rangsangan fisik atau kimiawi yang merusak. Rangsangan ini menyebabkan lepasnya mediator inflamasi seperti histamin, serotonin, bradikinin dan prostaglandin yang menimbulkan reaksi radang berupa panas, nyeri, merah, bengkak dan disertai gangguan fungsi. Kerusakan sel yang terkait dengan inflamasi berpengaruh pada selaput membran sel yang menyebabkan leukosit mengeluarkan enzim-enzim lisosomal dan asam arakhidonat. Metabolisme asam arakhidonat menghasilkan prostaglandin-prostaglandin yang mempunyai efek pada pembuluh darah, ujung saraf dan pada sel-sel yang terlibat dalam inflamasi (Katzung, 2004). Proses terjadinya inflamasi sebenarnya merupakan salah satu mekanisme pertahanan diri dari tubuh terhadap benda asing, tetapi jika proses ini berlangsung secara terus menerus (kronis) justru akan merusak jaringan (Docke *dkk*, 1997).

Pengobatan pasien dengan inflamasi pada umumnya untuk memperlambat atau membatasi proses kerusakan jaringan yang terjadi pada daerah inflamasi. Obat modern yang biasa digunakan ialah obat antiinflamasi non steroid (NSAID) yang memiliki efek samping yang merugikan tubuh seperti tukak lambung (Tjay dan Rahardja, 2007). Oleh karena itu pemanfaatan tumbuhan obat dengan khasiat antiinflamasi perlu dilakukan untuk menemukan alternatif pengobatan dengan efek samping yang relatif lebih kecil.

Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat antiinflamasi adalah kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Sm.). Kecombrang merupakan

tumbuhan yang tersebar cukup luas di Indonesia. Tumbuhan ini digunakan sebagai bahan pangan dan juga digunakan untuk pengobatan (Antoro, 1995). Menurut Permadi, (2008) tanaman kecombrang dapat digunakan sebagai antineoplastik, antipiretik, hipotensif (menurunkan tekanan darah), antikanker dan hipogliemik. Bunga kecombrang mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid, saponin dan minyak atsiri (Tampubolon *dkk*, 1983).

Hasil penelitian Sagala *dkk*, (2016) pada bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dengan metode *in vivo* menunjukkan bahwa bunga kecombrang memberikan efek penyembuhan luka pada tikus putih dengan dosis efektif sebesar 5%. Pada penelitian Wijekoon *dkk*, (2010) menunjukkan kadar fenolik total pada ekstrak aseton bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) sebesar 687 mgGAE/100g dan kadar flavonoid total sebesar 1431 mgQE/100 mg. Pada penelitian Handayani *dkk*, (2014) pada ekstrak metanol bunga dan daun *Etilingera elatior* dengan metode DPPH menunjukkan bahwa daun memiliki  $IC_{50}$  sebesar 30,65  $\mu\text{g/mL}$ , dan bunga memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 101,84  $\mu\text{g/mL}$ .

Berdasarkan uraian di atas, peneliti bermaksud melakukan penelitian tentang uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode stabilisasi membran sel darah merah dengan menggunakan sel darah merah kambing. Stabilisasi membran sel darah merah merupakan metode yang banyak digunakan dalam penelitian sebagai parameter biokimia untuk uji aktivitas anti-inflamasi secara *in-vitro*. Kestabilan sel darah merah dapat dilihat ketika sel darah merah diinduksi dengan larutan hipotonik. Hal tersebut menyebabkan

terbentuknya stress oksidatif yang dapat mengganggu kestabilan biomembrannya, sehingga akan memicu kerusakan membran yang ditandai dengan terjadinya hemolisis. Besar kecilnya hemolisis yang terjadi pada membran sel darah merah yang diinduksi larutan hipotonik dijadikan sebagai ukuran untuk mengetahui aktivitas anti-inflamasi (Kumar, 2011).

## **1.2 Perumusan Masalah**

1. Apakah ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) memiliki aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah?
2. Apakah variasi konsentrasi dari ekstrak bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) mempengaruhi aktivitas antiinflamasi?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R.M.Sm.) terhadap aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode stabilisasi membran sel darah merah.
2. Untuk mengetahui pengaruh aktivitas antiinflamasi berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M.Sm.).

## **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan pengetahuan khususnya dalam bidang farmasi dan teknologi kesehatan.
2. Penelitian ini diharapkan mampu memperkuat penelitian-penelitian sebelumnya tentang manfaat bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) sebagai antiinflamasi.

3. Memberikan informasi kepada masyarakat mengenai khasiat bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm.) sebagai obat yang memiliki aktivitas antiinflamasi.

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Biologi Tumbuhan Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.Sm)

#### 2.1.1 Klasifikasi



**Gambar 1.** Tanaman Bunga Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.)

Menurut *United States Department of Agriculture* (2008) tanaman *Etilingera elatior* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Liliopsida
Subkelas	: Zingiberidae
Ordo	: Zingiberales
Famili	: Zingiberaceae
Genus	: Etilingera
Spesies	: <i>Etilingera elatior</i> (Jack) R. M. Sm.

### **2.1.2 Sinonim**

Tanaman *Etilingera elatior* memiliki sinonim yaitu *Alpinia elatior*, *Elettaria speciosa*, *Nicolaia elatior*, *Nicolaia speciosa* dan *Phaeomeria speciosa* (Chandak, 2007).

### **2.1.3 Nama Daerah**

Tanaman *Etilingera elatior* memiliki nama daerah yaitu *puwar kinjung* (Sumatera), *kinjung* (Medan), *kinjuang atau sambuang* (Minangkabau), *honje, rombeka, combrang, kecombrang, kecumbrang atau cumbrang* (Jawa), *bubogu atau katimbang* (Sulawesi), *salahawa atau petikala* (Maluku) (Hidayat dan Romade, 2015).

### **2.1.4 Morfologi Tumbuhan**

*Etilingera elatior* merupakan tanaman herba yang tingginya mencapai 5 m. Batang semu bulat, membesar di pangkalnya, tumbuh tegak membentuk rumpun. Rimpang tebal, berwarna merah muda. Daun tersusun dalam dua baris, berseling, bentuk jorong lonjong, pangkal membulat, tepi bergelombang, ujung meruncing pendek dengan bintik-bintik halus dan rapat, warna hijau mengkilap. Bunga berbentuk gasing, bertangkai panjang. Buah berbentuk seperti kapsul dengan diameter 10-20 cm dengan masing-masing butir berukuran 2-2,5 cm, berwarna hijau dan menjadi merah saat matang. Berbiji banyak, berwarna coklat kehitaman, diselubungi aril putih bening atau kemerahan (Hidayat dan Rodame, 2015).

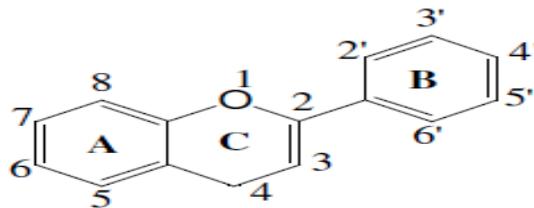
## **2.2 Tinjauan Kimia**

Komponen yang terkandung dalam bunga kecombrang terdiri dari alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid, saponin dan minyak atsiri. Pada penelitian ini

senyawa yang dianalisis yaitu golongan flavonoid, terutama flavonol dan flavon. Senyawa dari golongan flavonol terdiri atas quercetin, kaempferol dan myricetin, sedangkan dari golongan flavon terdiri atas apigenin dan luteolin (Tampubolon, 1983). Kelompok flavonol dan flavon merupakan kelompok flavonoid yang mayoritas (secara kuantitatif) ditemukan di dalam sayuran (Lee, 2000).

## 2.2.1 Flavonoid

### 1. Monografi



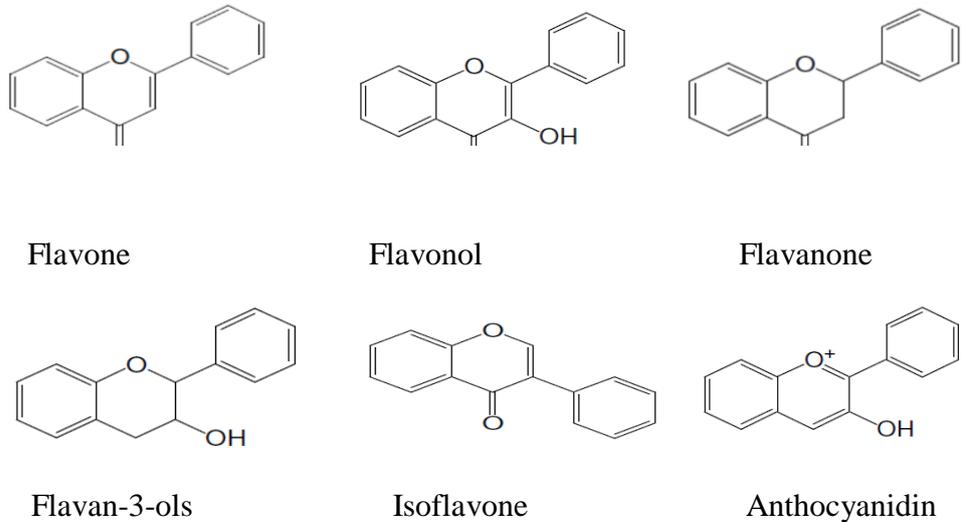
**Gambar 2.** Struktur Flavonoid (Ghasemzadeh dan Ghasemzadeh, 2011).

Flavonoid adalah salah satu metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan seperti batang, daun, bunga, buah dan akar. Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6C_3C_6$ . Terdiri dari 2 cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga buah karbon yang dapat atau tidak membentuk cincin ketiga (Markham, 1988).

Flavonoid merupakan senyawa polar dengan adanya beberapa gugus hidroksil bebas, sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti mentanol, etanol, butanol dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air, sedangkan aglikon yang kurang polar seperti flavon yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam air dan larut dalam pelarut non polar seperti eter dan kloroform (Harborne, 1987).

Flavonoid diklasifikasikan menjadi enam sub kelompok, yaitu (Manach *dkk*, 2014):

1. Flavon (luteonin, apigenin, tangeritin).
2. Flavonol (kuersetin, kaemferol, mirisetin, isorametin, pakipodol).
3. Flavanon (hesteretin, naringenin, eriodiktiol).
4. Flavan-3-ols (katekin, epikatekin).
5. Isoflavon (genistein, deidzein, glisitein).
6. Senyawa antosianidin (sianidin, delpinidin, malvidin, palargonidin, peonidin, petunidin).



**Gambar 3.** Struktur Beberapa Asam Fenolat (Ghasemzadeh dan Ghasemzadeh, 2011).

## 2. Identifikasi

Dapat diidentifikasi dengan besi (III) klorida yang menunjukkan adanya gugus fenolik pada flavonoid. Pereaksi asam klorida pekat dan logam magnesium menunjukkan adanya gugus iron. Pereaksi aluminium klorida bereaksi dengan basa (natrium hidroksida, ammonia) yang akan membentuk garam (Harborne, 1987).

### **3. Isolasi**

Isolasi dapat dilakukan dengan cara menimbang, mencuci dan membelah tanaman terlebih dahulu, kemudian diekstraksi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara maserasi, perkolasi dan sokletasi menggunakan pelarut yang sesuai dengan kepolaran flavonoid, kemudian pelarut dipekatkan sampai volume yang dibutuhkan dan dibebaskan dari senyawa-senyawa non polar menggunakan N-heksan atau kloroform, lalu difraksinasi dengan pelarut yang cocok dan selanjutnya dilakukan pada tahap kromatografi (Harborne, 1987).

### **4. Penetapan Kadar**

Ambil ekstrak sebanyak 0,5 ml tambahkan 1,5 ml metanol, tambahkan 0,1 ml pottasium asetat 1M dan tambahkan air suling 2,8 ml, biarkan 10 menit dan ukur panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Visible (Pourmorad *dkk*, 2006).

### **5. Identifikasi Flavonoid**

Analisis kuantitatif flavonoid dapat dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Spektrum serapan ultra violet dan serapan tampak merupakan cara tunggal yang paling bermanfaat untuk mengidentifikasi struktur flavonoid (Markham, 1988). Metode tersebut juga dapat digunakan untuk melakukan uji secara kuantitatif untuk menentukan jumlah flavonoid yang terdapat dalam ekstrak metanol atau etanol juga dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis yaitu dengan mengukur nilai absorbansinya (Carbonaro, 2005). Nilai absorbansi ini akan bergantung pada kadar zat yang terkandung di dalamnya, semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu

sehingga nilai absorbansi semakin besar atau dengan kata lain nilai absorbansi akan berbanding lurus dengan konsentrasi zat yang terkandung didalam suatu sampel.

Spektrum flavonoid pada tumbuhan biasanya ditentukan dalam larutan dengan pelarut metanol atau etanol. Spektrum khas flavonoid terdiri atas dua maksimal pada rentang 230-295 nm (pita II) dan 300-560 nm (pita I) (lihat Tabel 1) (Neldawati dkk, 2013).

**Tabel I.** Pita absorpsi UV dari flavonoid

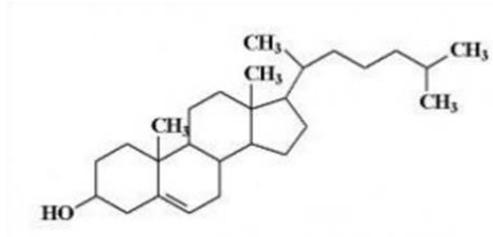
No.	Jenis Flavonoid	Pita I	Pita II
1	Flavon	250-280	310-350
2	Flavonol	250-280	330-385
3	Flavonon	275-295	300-330
4	Bilavonil	270-295	300-320
5	Kalkon	230-270	340-390
6	Auron	230-270	380-430
7	Antosianidin	270-280	465-560

(Sumber: Neldawati *dkk*, 2013)

Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah UV-Vis (Rohyami, 2003; Harborne, 1987).

## 2.2.2 Steroid

### 1. Monografi



**Gambar 5.** Struktur Steroid (Lenny, 2006)

Steroid adalah senyawa triterpenoid yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentanoperhidropentantren. Senyawa ini tersebar luas di alam dan mempunyai fungsi biologis yang sangat penting misalnya untuk antiinflamasi (Harborne, 1987).

Beberapa jenis senyawa steroid yang digunakan dalam dunia obat-obatan antara lain estrogen merupakan jenis steroid hormone seks yang digunakan untuk kontrasepsi sebagai penghambat ovulasi, progestin merupakan steroid sintetik digunakan untuk mencegah keguguran dan uji kehamilan, glikokortikoid sebagai antiinflamasi, alergi, demam, leukemia, dan hipertensi serta kardenolida merupakan steroid glikosida jantung digunakan sebagai obat diuretik dan penguat jantung (Doerge, 1982).

### 2. Identifikasi

Sampel sebanyak  $\pm$  1 ml dicampur dengan 3 ml kloroform atau 3 ml etanol 70% dan ditambah 2 ml asam asetat anhidrat (Reagen Liebermann- Burchard). Perubahan warna dari ungu ke biru atau hijau menunjukkan adanya steroid (Haborne, 1987).

### **3. Penetapan Kadar**

Ambil ekstrak 0,2 ml diencerkan dengan aquadest sampai 10 ml kemudian lakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Visible pada panjang gelombang 365 nm (Stahl, 1985).

### **4. Isolasi**

Isolasi dapat dilakukan dengan cara menimbang, mencuci, dan mengeringkan terlebih dahulu, kemudian diekstraksi. Ekstraksi dapat dilakukan dengan cara maserasi, perkolasi, dan sokhletasi menggunakan pelarut yang sesuai dengan kepolarannya. Kemudian pelarut dipekatkan sampai volume yang dibutuhkan dan dibebaskan dari senyawa-senyawa non polar menggunakan N-heksan atau kloroform, lalu difraksinasi dengan pelarut yang cocok dan selanjutnya dilakukan pada tahap kromatografi (Harborne, 1987).

## **2.3 Tinjauan Farmakologi**

Beberapa peneliti telah meneliti berbagai manfaat dari kecombrang bagi kesehatan manusia. Diantaranya kecombrang digunakan sebagai antioksidan (Pristiadi, 2012), antiinflamasi (Sagala *dkk*, 2016) dan antipiretik (Malik *dkk*, 2015). Antioksidan dari kecombrang dapat diperoleh dari ekstrak batang, bunga, buah dan rimpang kecombrang yang menunjukkan aktivitas antioksidan sebesar 58,49% dengan kadar fenolik total sebesar 323,25 mg/100g. Antiinflamasi dapat diperoleh dari ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap penyembuhan luka pada tikus putih dengan dosis efektif 5% . Antipiretik dapat diperoleh dari ekstrak etanol buah wualae terhadap mencit jantan galur Balb/c.

## 2.4 Tinjauan Farmasetik

Sampai saat ini bunga kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) belum ditemukan dalam sediaan farmasetik, walaupun sudah dilakukan beberapa penelitian terhadap bunga kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Sm.).

## 2.5 Inflamasi

### 2.5.1 Pengertian Inflamasi

Inflamasi atau radang merupakan respon jaringan terhadap rangsangan yang dapat menyebabkan perubahan atau kerusakan pada jaringan. Rangsangan dapat berupa rangsangan fisika (trauma bahan kimia, panas dan radiasi), infeksi (infeksi virus, bakteri dan parasit lainnya) dan fenomena lainnya. Rangsangan tersebut menyebabkan sel mast pecah dan melepaskan mediator-mediator radang dan enzim lisosom yang berperan dalam proses inflamasi (Mutschler, 1991).

### 2.5.2 Mediator Inflamasi

Mediator-mediator inflamasi dapat dilihat pada tabel 2.

**Tabel 2.** Mediator-mediator inflamasi (Costa *dkk*, 1994)

Tipe Sel	Jenis Mediator	Mediator	Efek dan Fungsi Patologis
Sel mast dan basofil	Disimpan didalam granul sitoplasma	Histamin	Meningkatkan permeabilitas vaskuler, menstimulasi kontraksi otot
		Enzim: netral protease (triptase dan chymase), asam	Degradasi mikroba, kerusakan jaringan atau <i>remodeling</i>
Sel mast dan Basofil	Mediator lipid	Prostaglandin D2	Vasodilatasi bronkokonstriksi, neutrophil chemotaxis
		Leukotrien C4, D4, E4	Memperlama terjadinya bronkokonstriksi, sekresi mucus, peningkatan permeabilitas vaskuler

	Mediator lipid	Platelet-activating factor	<i>Chemotaxis</i> , aktivasi leukosit, bronkokonstriksi, peningkatan permeabilitas vaskuler
	Sitokin	IL-3	Menginduksi proliferasi sel mast
		TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$	Menginduksi inflamasi/reaksi fase akhir
		IL-4, IL-13	Menginduksi diferensiasi TH2
		IL-5	Merangsang produksi dan aktivasi eosinofil
Eosinofil	Disimpan didalam granul sitoplasma	Eosinofil protein kationik	Bersifat toksik pada cacing, bakteri, dan sel inang
		Eosinofil peroksidase, lisosomal hidrolase, lisofosfolipase.	Degradasi cacing dan dinding sel protozoa, kerusakan jaringan/remodeling
	Sitokin	IL-3, IL-5, GM-CSF	Merangsang produksi dan aktivasi eosinofil
		IL-8, IL-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$ eotaxin	<i>Chemotaxis</i> leukosit
Sel mast dan basofil	Disimpan didalam granul sitoplasma	Histamin	Meningkatkan permeabilitas vaskuler, menstimulasi kontraksi otot
		Enzim: netral protease (triptase dan chymase), asam hidrolase, cathepsin G, karboksipeptidase	Degradasi mikroba, kerusakan jaringan atau <i>remodeling</i>
	Mediator lipid	Prostaglandin D2	Vasodilatasi bronkokonstriksi, neutrophil chemotaxis
	Sitokin	IL-3	Menginduksi proliferasi sel mast
		TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$	Menginduksi inflamasi/reaksi fase akhir

		IL-4, IL-13, IL-5	Menginduksi difensiasi TH2 merangsang produksi dan aktivasi eosinofil
Eosinofil	Disimpan didalam granul sitoplasma	Eosinofil protein kationik	Bersifat toksik pada cacing, bakteri, dan sel inang
		Eosinofil peroksidase, lisosomal hidrolas	Degradasi cacing dan dinding sel protozoa, kerusakan jaringan/remodeling
	Sitokin	IL-3, IL-5, GM-CSF	Merangsang produksi dan aktivasi eosinofil
		IL-8, IL-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$ eotaxin	<i>Chemotaxis</i> leukosit

### 2.5.3 Jenis Inflamasi (Nugroho, 2012)

#### 1. Inflamasi Akut

Inflamasi atau peradangan akut merupakan respon awal tubuh untuk rangsangan berbahaya, berlangsung dalam beberapa hari. Proses peradangan akut yang simultan akan menghasilkan peradangan kronis, yang bisa berlangsung berbulan-bulan. Pada peradangan akut, respon terjadi secara langsung terhadap kerusakan sel atau jaringan yang terjadi yang melibatkan sistem vaskuler lokal, sistem imun dan beberapa sel. Tanda-tanda klasik pada proses peradangan akut yaitu:

##### a. Rubor (Kemerahan)

Terjadi karena pembuluh darah arteriol yang mensuplai darah ke daerah luka mengalami vasodilatasi sehingga darah lebih banyak mengalir ke mikrosirkulasi lokal.

b. Tumor (Pembekakan)

Ini disebabkan karena adanya suplai cairan maupun sel darah merah maupun sel darah putih dari sirkulasi darah menuju jaringan interstisial. Kumpulan cairan beserta sel-sel tersebut dalam jaringan luka dinamakan eksudat.

c. Kalor (Panas)

Terjadi manakala aliran darah banyak yang tersuplai ke jaringan luka pada proses peradangan. Kalor merupakan sifat peradangan yang terjadi pada permukaan tubuh relatif lebih dingin dibandingkan suhu dalam tubuh yaitu 37°C.

d. Dolor (Sakit atau nyeri)

Ditimbulkan karena adanya kerusakan jaringan, yang melepaskan mediator nyeri yang akan merangsang reseptor nyeri. Mediator tersebut antara lain ion hidrogen, histamin, serotonin, asetilkolin dan bradikinin. Oleh karena itu, nyeri merupakan sinyal bahwa tubuh mengalami kerusakan jaringan.

## **2. Inflamasi Kronis**

Inflamasi kronis disebabkan karena adanya kerusakan jaringan yang stimultan. Peradangan kronis terjadi apabila proses inflamasi terjadi dalam waktu lama (beberapa bulan, bahkan bisa menahun), terjadi pergeseran progresif jenis sel yang hadir pada luka. Peradangan kronis melibatkan peran sel dasar putih terutama sel mononuclear (monosit, makrofag dan limposit) dan peran dari fibroblast.

#### **2.5.4 Mekanisme Inflamasi**

Inflamasi merupakan reaksi lokal organisme terhadap suatu iritasi atau keadaan non fisiologik. Terjadinya inflamasi dimulai dengan stimulus yang merusak jaringan. Hal ini mengakibatkan pecahnya sel mast dan terlepasnya mediator-mediator inflamasi dari sel tersebut. Terjadinya vasodilatasi dari seluruh pembuluh darah pada daerah inflamasi sehingga aliran darah akan meningkat. Terjadinya perubahan volume darah dalam kapiler dan venula, menyebabkan sel-sel endotel pembuluh darah meregang dan terjadi kenaikan permeabilitas pembuluh darah, protein plasma keluar dari pembuluh darah sehingga menimbulkan edema. Infiltrasi leukosit ketempat inflamasi, pada tahap awal infiltrasi oleh neutrofil, dilanjutkan dengan filtrasi oleh monosit. Kedua jenis leukosit ini berasal dari pembuluh darah, melekat pada dinding endotelium venula kemudian menuju daerah inflamasi (Katzung, 2002).

#### **2.5.5 Obat Antiinflamasi**

Obat-obat antiinflamasi merupakan golongan obat yang memiliki aktivitas menekan atau mengurangi peradangan. Aktivitas ini dapat dicapai melalui berbagai cara, yaitu dengan menghambat pembentukan mediator radang prostaglandin, menghambat migrasi sel-sel leukosit ke daerah radang dan menghambat pelepasan prostaglandin dari sel-sel tempat pembentukannya. Berdasarkan mekanisme kerjanya, antiinflamasi terbagi dalam golongan, berikut:

##### **1. Antiinflamasi-Steroid (SAID)**

Obat golongan antiinflamasi steroid bekerja mengendalikan antinflamasi dengan menekan atau mencegah banyak komponen dari proses inflamasi pada tempat cedera dengan cara menghambat fosfolipase, suatu enzim yang

bertanggung jawab terhadap pelepasan asam arakidonat dari membran lipid. Obat-obat yang termasuk kedalam golongan antiinflamasi steroid adalah prednison, hidrokortison, deksametason dan betametason (Katzung, 2006).

## **2. Antiinflamasi Non-Steroid (NSAID)**

Obat golongan antiinflamasi non steroid bekerja menghambat enzim siklooksigenase sehingga konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin menjadi terganggu. Enzim siklooksigenase berperan dalam memacu pembentukan prostaglandin dan tromboksan dari asam arakidonat. Prostaglandin merupakan molekul pembawa pesan pada prosen inflamasi. Inhibisi sintesis prostaglandin dalam mukosa lambung sering kali dapat menyebabkan kerusakan gastrointestinal (dispepsia, mual dan gastritis). Efek samping yang paling serius adalah pendarahan gastrointestinal (Katzung, 2006).

Obat-obat yang termaksud kedalam golongan antiinflamasi non steroid adalah ibuprofen, natrium diklofenak, aspirin, indometasin, fenilbutazon dan piroksikam (Katzung, 2006).

### **2.5.6 Metode Uji Antiinflamasi**

Manifestasi inflamasi adalah bentuk panas, eksudasi plasma, edema, nyeri, akibat migrasi sel darah putih, poliferasi jaringan, deformasi organ, pengkerutan jaringan untuk menguji potensial antiinflamasi suatu senyawa ada beberapa metode yang dapat digunakan.

Ada 2 jenis metode yang digunakan yaitu :

1. Metode in-vivo

Dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelompok metode diantaranya sebagai berikut :

a. Metoda pembentukan edema buatan

Metoda ini didasarkan pada pengukuran volume dari edema buatan volume edema diukur sebelum dan sesudah pemberian zat uji. Beberapa iritan yang dipakai sebagai penginduksi edema antara lain formalin, ragi dan dekstran (Domer, 1971). Iritan yang umum digunakan dan memiliki kepekaan yang tinggi adalah karagen (Winter, 1962).

b. Teknik pembentukan kantong granuloma

Hewan uji dicukur pada bagian punggung dan diinfeksi, lalu pada bagian tengah kulit dorsal diinjeksikan 20 ml udara, ke dalam kantong udara yang terbentuk diinjeksikan 1,5 ml minyak kroton 1% dalam minyak wijen dengan menghindari terjadinya kebocoran udara, 48 jam kemudian udara tersebut dikeluarkan dari kantong. Sejak pembentukan kantong, setiap hari hewan uji diberi senyawa uji atau senyawa standar secara oral atau subkutan. Pada hari ke-4 atau ke-5, hewan uji dikorbankan. Kantong udara dibuka dan eksudat diambil kemudian diukur volumenya. Pada metode ini sebagai penginduksi digunakan minyak kroton tetapi dapat juga diganti dengan karagen.

c. Uji radang telapak kaki

Senyawa uji atau ekstrak tanaman diberikan secara oral 1 jam sebelum pemberian senyawa penginduksi inflamasi atau 30 menit sebelumnya bisa

diberikan secara intraperitoneal. Aktivitas penghambatan radang telapak kaki menunjukkan adanya aktivitas inflamasi. Udem atau radang dihasilkan dengan menginjeksikan senyawa agonis (karagen, dekstran, kaolin, formalin, albumin telur) secara subplantar pada telapak kaki kiri hewan uji. Kemudian volume cairan udem diukur dengan pletismometer segera setelah injeksi, lakukan kembali setelah 3 dan 6 jam kemudian.

#### d. Uji pleuris

Pleuris atau radang pleura diketahui sebagai fenomena eksudasi inflamasi pada manusia. Pada percobaan dengan hewan dapat diinduksi dengan beberapa iritan seperti histamin, prostaglandin, degranulasi sel mast, enzim, antigen, mikroba, dan iritan yang tidak spesifik seperti terpentin dan karagen. Karagen menginduksi pleuritis pada tikus dinilai merupakan model inflamasi akut yang sempurna karena cairan ekstravasi, migrasi granulosit dan berbagai parameter biokimia yang berhubungan dengan respon inflamasi dapat diukur dengan mudah dalam eksudat.

#### e. Metode artritis buatan

Metoda ini berdasarkan pada rangsangan seperti inflamasi dalam artritis reumatoid. Dalam percobaan disuntikkan “Freud’s adjuvant” secara subkutan pada telapak kaki tikus atau pada ekor tikus, “Freud’s adjuvant” tersebut terdiri dari suspensi *Mycobacterium butyricum* yang telah mati dalam minyak mineral. Setelah 10 sampai 15 hari terjadi lesi yang menimbulkan edema dan diukur dengan alat mikrometer.

f. Metoda iritasi dengan panas

Pengukuran luas radang dan berat edema yang terbentuk setelah diiritasi dengan panas merupakan parameter yang digunakan dalam metode ini. Mula-mula hewan diberi zat warna tripan biru yang disuntikkan secara intravena, dimana zat ini akan berikatan dengan albumin plasma. Kemudian pada daerah penyuntikan tersebut dirangsang dengan panas yang cukup tinggi. Panas akan menyebabkan pembebasan histamin endogen sehingga timbul inflamasi. Zat warna akan keluar dari pembuluh darah yang mengalami dilatasi bersama-sama dengan albumin plasma sehingga jaringan-jaringan yang meradang kelihatan berwarna. Penilaian derajat inflamasi diketahui dengan mengukur luas radang akibat pembesaran zat ke jaringan meradang. Pengukuran juga dapat dilakukan dengan menimbang edema yang terbentuk, dimana jaringan yang meradang dipotong kemudian ditimbang (Domer, 1971).

g. Metoda pembentukan eritema

Metoda ini didasarkan pada pengamatan secara visual terhadap eritema pada kulit hewan yang telah dicukur bulunya. Eritema yang terjadi akibat iritasi sinar ultraviolet selama 20 detik, sehingga terjadi vasodilatasi yang diikuti dengan meningkatnya permeabilitas pembuluh darah dan leukositosis lokal. Dua jam kemudian eritema yang terbentuk diamati.

h. Metode penumpukan kristal synovitis

Pada metode ini telapak kaki tikus disuntik dengan suspensi ragi brewer dalam larutan metal selulosa secara subkutan. Akibat penyuntikan ini mengakibatkan peningkatan suhu rektal lebih kurang 2 derajat atau lebih dan tetap

berlangsung selama 24 jam atau lebih. Pada waktu 18 jam setelah penyuntikan diberikan obat secara oral dan suhu rektal diukur dalam selang waktu 30 menit.

## 2. Metode in-vitro

Teknik-teknik yang biasa digunakan antara lain :

### a. Stabilisasi membran sel darah merah

Metode uji antiinflamasi secara in-vitro yang paling banyak digunakan adalah metoda stabilisasi membran sel darah merah. Membran sel darah merah manusia atau eritrosit adalah analog dengan membran lisosomal dan stabilisasinya menunjukkan bahwa ekstrak dapat juga menstabilkan membran lisosomal. Stabilisasi membran lisosomal penting dalam membatasi respon inflamasi dengan menghambat pelepasan konstituen lisosomal dari neutrofil aktif seperti enzim bakterisida dan protease, yang menyebabkan peradangan dan kerusakan jaringan lebih lanjut atas pelepasan ekstraseluler (Kumar *dkk*, 2012). Enzim lisosomal dilepaskan selama peradangan yang akan menghasilkan berbagai gangguan yang mengarah ke cedera jaringan dengan merusak makromolekul dan peroksidasi lipid membran yang dianggap bertanggung jawab untuk kondisi patologis tertentu seperti serangan jantung, syok septik dan rheumatoid arthritis dan lain-lain. Kegiatan enzim ekstra selular ini dikatakan berhubungan dengan peradangan akut atau kronis (Chippada *dkk*, 2011).

Eritrosit telah digunakan sebagai sistem model untuk beberapa studi interaksi obat dengan membran. Obat seperti anestesi, tranquilizer dan antiinflamasi steroid menstabilkan membran eritrosit terhadap induksi hipotonik pemicu hemolisis sehingga dapat mencegah pelepasan hemoglobin. Aktivitas

menstabilkan membran sel darah merah yang diperlihatkan oleh beberapa obat, berfungsi sebagai metode *in vitro* untuk menilai aktivitas antiinflamasi dari berbagai senyawa (Awe *dkk*, 2009).

b. Penghambatan denaturasi protein

Inhibisi denaturasi protein yang merupakan uji untuk skrining awal aktivitas antiinflamasi, dimana denaturasi protein adalah salah satu parameter bila terjadi inflamasi dan rematik. Oleh karena itu menggunakan agen yang dapat mencegah denaturasi protein akan bermanfaat dalam perkembangan obat antiinflamasi. *Bovine serum albumin* (BSA) merupakan salah satu protein yang dapat digunakan untuk uji antiinflamasi. Larutan BSA dalam *triss-buffer saline* pH 6,3 ditambahkan larutan sampel dalam metanol kemudian larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  lalu dipanaskan larutan di *waterbath* selama 5 menit pada suhu  $\pm 72^{\circ}\text{C}$ , setelah dipanaskan larutan didiamkan selama 25 menit pada suhu ruang lalu dianalisis dengan spektrofotometri UV dan menggunakan persamaan :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol negatif} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100 \%$$

Dimana senyawa yang mempunyai % inhibisi lebih besar dari 20 % dianggap mempunyai efek antiinflamasi dan dapat digunakan untuk pengembangan obat baru (William *dkk*, 2008).

c. Tes fibrinolitik

Enzim fibrinolitik merupakan enzim protease yang mampu mendegradasi fibrin yang merupakan komponen protein utama bekuan darah yang terbentuk dari fibrinogen melalui proses fibrinolisis oleh trombin. Proses fibrinolisis

oleh enzim ini digunakan sebagai agen trombolitik yang dapat mendegradasi bekuan darah. (Yoshiko *dkk*, 2011).

d. Agregasi trombosit

Pemeriksaan agregasi trombosit bertujuan mendeteksi gangguan fungsi trombosit yang dapat dilakukan dengan berbagai macam cara antara lain dengan menggunakan analyzer yang berdasarkan perubahan transmisi cahaya. Pada analyzer tersebut digunakan plasma yang mengandung banyak trombosit atau dikenal dengan Platelet Rich Plasma (PRP) yang dicampur dengan agregator berupa ADP pada berbagai konsentrasi. Penilaian hasil dilakukan dengan analisis bentuk kurva agregasi trombosit.

## **2.6 Metode Pengujian Efek Antiinflamasi**

Terdapat berbagai metode yang digunakan dalam studi obat, kandungan kimia dan preparasi herbal untuk menunjukkan adanya aktivitas atau potensi antiinflamasi. Teknik-teknik tersebut termasuk pelepasan fosforilasi oksidatif (ATP biogenesis terkait dengan respirasi), pembentukan denaturasi protein, stabilitas membran eritrosit, stabilitas membran lisosomal, tes fibrinolitik dan agregasi trombolitik (Oyedapo *dkk*, 2010).

### **2.6.1 Metode Stabilisasi Membran Sel Darah**

Metode stabilisasi membran sel darah merah merupakan metode yang banyak digunakan dalam penelitian sebagai parameter biokimia untuk uji aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*. Kestabilan sel darah merah dapat dilihat ketika sel darah merah diinduksi larutan yang dapat menyebabkan hemolisis. Hal tersebut menyebabkan stress oksidatif yang dapat mengganggu kestabilan

biomembrannya. Stress oksidatif dapat ditandai dengan terjadinya hemolisis. Besar kecilnya hemolisis yang terjadi pada membran sel darah merah yang diinduksi larutan hipotonik dijadikan sebagai ukuran untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi (Kumar *dkk*, 2011).

Membran sel darah merah analog dengan membran lisosomal dan stabilisasinya menunjukkan bahwa senyawa dapat juga menstabilkan membran lisosomal. Stabilisasi membran lisosomal penting dalam membatasi respon inflamasi dengan cara menghambat pelepasan konstituen lisosomal dari neutrophil aktif seperti enzim bakterisida dan protease, yang menyebabkan peradangan dan kerusakan jaringan lebih lanjut (Kumar *dkk*, 2012).

Enzim lisosomal dapat menyebabkan degradasi pada dinding sel jika berada dalam plasma. Zat yang dapat menghambat enzim lisosomal dan menstabilkan membrane lisosomal dapat mencegah kerusakan lebih lanjut pada seluler dan struktur jaringan bersamaan dengan inflamasi akut dan kronis (Kumar *dkk*, 2012).

## **2.7 Spektrofotometer UV-Vis**

Spektrofotometer UV-Vis yang terdiri dari dua komponen utama yaitu spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan spektra panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer merupakan alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau diabsorpsi. Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mengukur energi secara relatif bila energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang. Sedangkan spektrofotometri adalah suatu metode yang didasarkan pada pengukuran energi

cahaya tampak (visibel) atau cahaya ultraviolet (UV) oleh suatu senyawa sebagai fungsi panjang gelombang (Day & Underwood, 2002).

### 2.7.1 Prinsip Dasar

Hukum yang mendasari spektrofotometri adalah “Hukum Lambert-Beer”. Bila sebagian cahaya monokromatis melalui suatu media yang transparan maka akan bertambah turunnya intensitas cahaya yang dipancarkan sebanding dengan bertambahnya tebal dan kepekatan media (Day & Underwood, 2002).

$$A = a \cdot b \cdot c$$

Keterangan : A : Absorbansi sampel

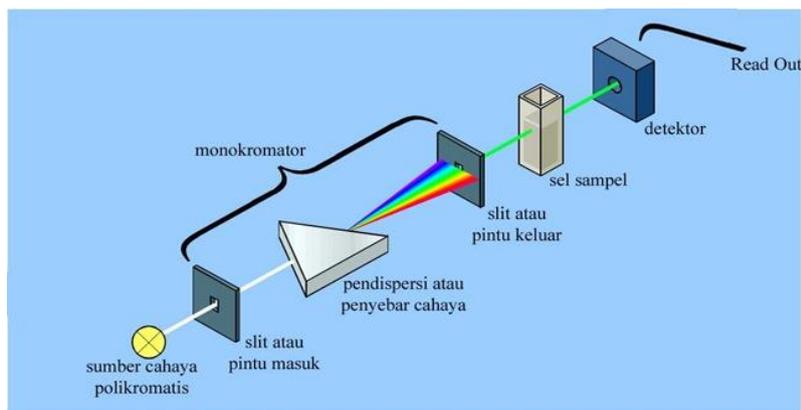
a : Absorbtivitas molar

b : Tebal kuvet

c : Konsentrasi sampel

### 2.7.2 Instrumentasi

Spektrofotometer UV-Vis pada umumnya tersusun dari dua komponen, yaitu spektrometer (mengukur dan menghasilkan spektra dengan panjang gelombang tertentu atau sinar monokromatis) dan fotometer (pengukur daya kuat sinar monokromatis yang ditransmisikan atau diabsorpsi) (Day & Underwood, 2002).



**Gambar 6.** Skema Instrumentasi Spektrofotometer UV-Vis (Watson, 2009)

### 1. Sumber Cahaya

Sumber cahaya mempunyai fungsi untuk memberikan energi pada daerah panjang gelombang yang tepat untuk pengukuran dan mempertahankan intensitas cahaya yang tetap selama pengukuran. Spektrofotometer sinar tampak menggunakan lampu wolfram dengan panjang gelombang diatas 375 nm, sedangkan spektrofotometer UV menggunakan lampu deuteriu (D2) memiliki panjang gelombang dibawah 375 nm (Day & Underwood, 2002).

### 2. Monokromator

Monokromator adalah suatu alat yang berfungsi untuk mengubah cahaya polikromatik menjadi cahaya monokromatik yang kemudian dilewatkan pada celah sempit atau slit agar memungkinkan pemisahan panjang gelombang yang diukur. Beberapa monokromator yang biasa digunakan adalah prisma dan grating (Day & Underwood, 2002).

### 3. Kuvet

Kuvet adalah tempat disimpannya larutan contoh yang akan diukur serapannya yang diletakkan pada jalan cahaya dari minokromator. Pada saat cahaya monokromatis melalui kuvet, terjadi penyerapan sejumlah tertentu cahaya, sedangkan sebagian lainnya diteruskan ke detektor (Day & Underwood, 2002).

### 4. Detektor

Detektor berfungsi untuk mengubah energi cahaya yang ditransmisikan atau diteruskan oleh kuvet, yang jatuh mengenainya menjadi suatu besaran yang terukur. Detektor yang ideal harus mempunyai kepekaan tinggi dan responnya stabil pada panjang gelombang pengamatan (Day & Underwood, 2002).

### 5. Rekorder

Rekorder merupakan bagian akhir dalam alat ini. Sinyal listrik yang dihasilkan pada detektor dapat dibaca pada rekorder dengan mengkonversikannya ke dalam besaran absorban atau %T (Day & Underwood, 2002).

## BAB III. METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan selama 3 bulan (Juli – Agustus 2019) di Laboratorium Kopertis Wilayah X, Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi.

### 3.2 Alat dan Bahan

#### 3.2.1 Alat

Corong pisah (Pyrex<sup>®</sup>), erlenmeyer (Pyrex<sup>®</sup>), vial, beaker glass (Pyrex<sup>®</sup>), tabung reaksi (Pyrex<sup>®</sup>), gelas ukur (Pyrex<sup>®</sup>), chamber (Pyrex<sup>®</sup>), lampu UV (Merck, Germany), pH meter, pipet tetes, kolom konvensional (Pyrex<sup>®</sup>), mikropipet, oven (Panasonic), *rotary evaporator* (Eyela N-1000), Spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2910), *water bath* (Eyela SB-1000), Sentrifus (Universal 32 R, Hettich Zentrifugen, USA).

#### 3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.), etanol 70%, ammonia, kertas saring, kapas, dekstrosa, natrium sitrat, asam sitrat, Natrium klorida (NaCl), PBS (*Phosphate Buffer Saline*), Ibuprofen, sel darah merah kambing, kloroform, asam klorida pekat, norit, pereaksi Lieberman Burchard, kloroform amoniak, pereaksi mayer, dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), dinatrium dihidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

### **3.3 Metode Penelitian**

#### **3.3.1 Pengambilan Sampel**

Sampel yang digunakan adalah bunga kecombrang yang diambil di Sungai Aro, Kecamatan Koto Parik Gadang Diateh, Kabupaten Solok Selatan, Sumatera Barat.

#### **3.3.2 Identifikasi Tanaman**

Identifikasi sampel dilakukan di Herbarium Andalas (ANDA) Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, UNAND, Padang.

#### **3.3.3 Pembuatan Ekstrak**

Bunga kecombrang yang telah diambil dibersihkan dari pengotor dan ditimbang sebanyak 1 kg, lalu keringkan diudara terbuka yang terlindung dari cahaya matahari langsung. Setelah kering bunga dirajang dan dijadikan serbuk dan ditimbang. Kemudian sampel kering yang telah ditimbang dimasukkan dalam botol maserasi dan tambahkan etanol 70% sampai terendam. Biarkan di tempat gelap selama 9 hari sambil sesekali diaduk. Pisahkan hasil maserasi dengan penyaringan menggunakan kapas. Ulangi maserasi sebanyak 3 kali atau lebih sampai diperoleh maserat yang jernih dengan cara yang sama. Seluruh filtrat digabungkan menjadi satu dan diaduk hingga rata, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental dengan berat konstan (Depkes RI, 2008).

### **3.4. Karakterisasi Ekstrak Bunga Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Sm.)**

#### **3.4.1 Pemeriksaan Organoleptis**

Dilakukan dengan pengamatan visual yang meliputi warna, bentuk, rasa dan bau.

#### **3.4.2 Penentuan Rendemen Ekstrak (Departemen Kesehatan RI, 2000)**

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat Sampel}} \times 100\%$$

#### **3.4.3 Penentuan Susut Pengeringan (Departemen Kesehatan RI, 2008)**

Tara cawan penguap yang telah dikeringkan selama 30 menit dalam oven pada suhu 105°C, timbang ekstrak sebanyak 1 gram, masukkan kedalam cawan penguap kemudian ditimbang kembali, lalu dengan perlahan cawan digoyang agar ekstrak merata. Masukkan kembali kedalam oven. Cawan penguap berisi ekstrak dipanaskan dalam suhu 105°C selama 1 jam. Setelah itu keluarkan dan dinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Lakukan pengulangan seperti cara yang sama dengan diatas sampai diperoleh berat yang konstan (selisih penimbangan terakhir dengan penimbangan sebelumnya 0,001).

$$\% \text{ susut pengeringan} = \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \times 100\%$$

Keterangan :

A= Berat cawan penguap kosong

B= Berat cawan penguap + sampel sebelum dipanaskan

C= Berat cawan penguap + sampel yang telah dipanaskan

#### **3.4.4 Penetapan Kadar Abu (Departemen Kesehatan RI, 2008)**

Timbang seksama 1 gram ekstrak dan masukkan kedalam krus yang telah dipijarkan dan ditara. Pijarkan perlahan-lahan dalam furnes pada suhu 600°C selama 6 jam, dinginkan dalam desikator dan timbang.

$$\text{Kadar abu} = \frac{(C - A)}{(B - A)} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Berat krus kosong

B = Berat krus porselen + sampel sebelum pemijaran

C = Berat krus porselen + sampel setelah pemijaran

#### **3.4.5 Uji Skrining Fitokimia**

Ekstrak kental bunga kecombrang dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 5 ml aquadest dan 5 ml kloroform, dibiarkan sampai terbentuk dua lapisan, lapisan air dan kloroform (Harborne, 1987). Beberapa uji yang dapat dilakukan terhadap ekstrak bunga kecombrang adalah sebagai berikut :

1. Uji flavonoid (Metoda “*Sianidin Test*”)

Ambil lapisan air 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan serbuk Mg dan HCl (p), terbentuknya warna merah menandakan adanya flavonoid.

2. Uji terpenoid dan steroid (Metoda “*Simes*”)

Diambil sedikit lapisan kloroform tambahkan norit kemudian disaring, tambahkan asam asetat anhidrat, tambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (p), terbentuknya warna biru

ungu menandakan adanya steroid, sedangkan bila terbentuk warna merah menandakan adanya terpenoid.

3. Uji saponin

Diambil lapisan air, kocok kuat-kuat dalam tabung reaksi, terbentuknya busa yang permanen ( $\pm$  15 menit) menunjukkan adanya saponin.

4. Uji Fenolik

Diambil lapisan air 1-2 tetes, teteskan pada plat tetes lalu tambahkan pereaksi  $\text{FeCl}_3$ , terbentuknya warna biru menunjukkan adanya fenolik

5. Uji alkaloid (Metode “*Culvenore – Fristgerald*”)

Diambil sedikit lapisan kloroform tambahkan 10 ml kloroform amoniak 0,05 N, aduk perlahan tambahkan beberapa tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N kemudian dikocok perlahan, biarkan memisah. Lapisan asam ditambahkan beberapa tetes pereaksi Mayer, reaksi positif alkaloid ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih.

### **3.5 Uji Aktivitas Antiinflamasi dengan Metode Stabilisasi Membran Sel Darah Merah**

#### **3.5.1 Pembuatan Larutan yang Dibutuhkan**

##### **1. Pembuatan Dapar Fosfat pH 7,4 (0,15 M)**

Sebanyak 2,671 gram dinatrium hidrogen fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dilarutkan dalam aquades sampai 100 ml (0,15 M). 2,070 gram natrium dihidrogen fosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) dilarutkan dalam aquades sampai 100 ml (0,15 M). Kemudian 81 ml larutan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,15 M) dicampurkan dengan 19 ml larutan  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,15 M) pada suhu ruang. Kemudian cek pH dengan pH meter. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$  selama 2 jam.

## **2. Pembuatan Larutan Isosalin**

Sebanyak 0,9 gram NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 100 ml pada suhu ruang (Oyedapo *dkk*, 2010). Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam.

## **3. Pembuatan Larutan Hiposalin**

Sebanyak 0,25 gram NaCl dilarutkan dalam dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M) sampai volume 100 ml pada suhu ruang (Oyedapo *dkk*, 2010). Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam.

## **4. Penyiapan Konsentrasi Bunga Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dan Ibuprofen**

Sebanyak 50 mg ekstrak dilarutkan dalam isosalin sampai 50 ml (1000 ppm) pada suhu ruang. Kemudian di encerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (15, 60, 250, 1000 ppm). Begitu juga dengan Ibuprofen, sebanyak 50 mg Ibuprofen dilarutkan dalam 50 ml isosalin (1000 ppm) pada suhu ruang. Kemudian di encerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (15, 30, 60, 120 ppm).

### **3.5.2 Pembuatan Suspensi Sel Darah Merah**

Darah yang digunakan adalah darah kambing, untuk uji stabilisasi membran sel darah merah, diambil darah sebanyak 10 ml dengan cara menampung darah kambing yang disembelih kemudian langsung dimasukkan dalam vacutiner tube yang berisi EDTA, lalu dimasukkan kedalam tabung sentrifus. Kemudian disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit pada suhu 27°C. Supernatan yang terbentuk dipisahkan menggunakan pipet steril. Endapan sel-sel darah yang tersisa kemudian dicuci dengan larutan isosalin dan disentrifugasi kembali. Proses

tersebut diulang kurang lebih 4 kali atau sampai isosalin jernih. Volume sel darah diukur dan di resuspensi dengan isosalin sehingga didapatkan suspensi sel darah merah dengan konsentrasi 10% v/v dengan mencampurkan 2 ml sel darah merah dengan 18 ml larutan isosalin. Suspensi sel darah tersebut disimpan pada suhu 4°C jika belum digunakan (Oyedapo *dkk*, 2010).

### **3.6 Pengujian Aktivitas Ekstrak Bunga Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) terhadap Stabilisasi Membran Sel Darah Merah**

Larutan-larutan yang digunakan dalam uji aktivitas ekstrak bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) terhadap stabilisasi membran sel darah merah adalah sebagai berikut :

#### **a. Pembuatan Larutan Uji**

Larutan uji terdiri dari 1 ml dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 ml larutan sampel dan 2 ml hiposalin.

#### **b. Pembuatan Larutan Pembanding**

Larutan pembanding terdiri dari 1 ml dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 ml suspensi sel darah merah, 1 ml larutan Ibuprofen dan 2 ml hiposalin.

#### **c. Larutan Kontrol**

Larutan kotrol positif terdiri dari 1 ml dapar fosfat pH 7,4 (0,15 M), 0,5 ml suspensi sel darah merah, 1 ml isosalin dan 2 ml hiposalin.

Setiap larutan diatas diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan yang didapat

diambil dan kandungan hemoglobinnnya diukur menggunakan spektrofotometer uv/vis pada panjang gelombang 577,5 nm.

Kemudian dihitung persentase stabilitas membran sel darah merah menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{\text{Abs. Lar. kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \right] \times 100\%$$

### **3.7 Analisis Data**

Pada penelitian ini data yang didapatkan berupa data kategorik dan numeric yang bersifat objektif, konsentrasi yang diujikan bervariasi (lebih dari satu), maka digunakan Analisa Statistik (ANOVA). Analisa ANOVA yang digunakan pada penelitian ini adalah ANOVA satu arah karena variable bebas dan terikat yang dianalisa tidak lebih dari satu. Dimana variable bebasnya adalah konsentrasi sediaan uji, sedangkan variable terikatnya adalah persen stabilitas membran sel darah merah. Hasil uji ANOVA akan berbeda secara nyata apabila didapatkan secara statistic ( $P < 0,05$ ).

Analisa data dilanjutkan dengan Uji Lanjut berjarak Duncan (*Duncan New Multiple Range Test*) menggunakan software statistic SPSS 23,0 for *Windows Evaluation*, tujuannya untuk mengetahui kebermaknaan perbedaan hasil dari masing-masing konsentrasi.

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan tentang uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dengan metode stabilisasi membran sel darah merah secara *in vitro*, didapatkan hasil sebagai berikut :

1. Hasil identifikasi yang dilakukan di Herbarium Jurusan Biologi, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas, Padang diperoleh nama tanaman *Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm), famili *Zingiberaceae* (lampiran 1, gambar 7).
2. Dari 1 kg bunga segar kecombrang diperoleh ekstrak etanol 25,6691 gram dengan persentase rendemen 2,566 % dan diperoleh juga persen randemen dari bunga kecombrang yang dikering anginkan dengan berat kering 250 gram adalah 10,267 % (lampiran 3, tabel 3).
3. Hasil pengamatan yang dilakukan secara organoleptis ekstrak etanol bunga kecombrang menunjukkan bentuk kental dengan warna coklat kehitaman, bau khas dan rasa yang asam (lampiran 3, tabel 4).
4. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol bunga kecombrang positif terhadap adanya kandungan flavonoid, fenolat, saponin dan steroid (lampiran 3, tabel 5)
5. Hasil persentase pengujian susut pengeringan ekstrak etanol bunga kecombrang adalah 7,66 % (lampiran 3, tabel 6).

6. Hasil persentase kadar abu ekstrak etanol bunga kecombrang adalah 7,4077% (lampiran 3, tabel 7).
7. Hasil panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 577,50 nm, dapat dilihat pada (lampiran 4, gambar 18).
8. Hasil pengukuran absorbansi sampel, konsentrasi 15 ppm (0,635), konsentrasi 60 ppm (0,470), konsentrasi 250 ppm (0,363), konsentrasi 1000 ppm (0,256), ibuprofen 15 ppm (0,570), ibuprofen 30 ppm (0,509), ibuprofen 60 ppm (0,356), ibuprofen 120 ppm (0,209), kontrol (0,756), dapat dilihat pada (Lampiran 6, Tabel 8).
9. Hasil persentase stabilitas ekstrak etanol bunga kecombrang terhadap membran sel darah merah yang didapatkan adalah  $C_1$  (15 ppm) = 15,95%,  $C_2$  (60 ppm) = 37,85%,  $C_3$  (250 ppm) = 50,93%,  $C_4$  (1000 ppm) = 66,06%, dapat dilihat pada (Lampiran 6, Tabel 9).

## 4.2 Pembahasan

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.). Pengambilan sampel dilakukan di daerah Sungai Aro, Kecamatan Koto Parik Gadang Diateh, Kabupaten Solok Selatan, Sumatera Barat. Sampel diidentifikasi di Herbarium Andalas (ANDA) yang bertujuan untuk memperoleh identitas sampel sehingga tidak terjadi kesalahan terhadap tanaman yang digunakan. Hasil identifikasi diperoleh bahwa sampel bunga kecombrang termaksud spesies (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dari keluarga *Zingiberaceae*. Sampel yang digunakan adalah sampel segar dengan tujuan untuk menghindari hilangnya senyawa-senyawa yang terkandung dalam bunga kecombrang selama proses pengeringan berlangsung. Sampel segar bunga kecombrang kemudian dipotong halus. Hal ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan sampel yang berkontak dengan pelarut, sehingga dapat mempermudah penetrasi pelarut kedalam membran sel dan melarutkan senyawa-senyawa yang terkandung didalam sel.

Metode ekstraksi yang digunakan pada bunga kecombrang adalah metode ekstraksi maserasi. Metode maserasi yaitu ekstraksi menggunakan pelarut dengan beberapa pengocokan atau pengadukan pada suhu ruangan. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan (Depkes, 2000). Pelarut yang digunakan adalah etanol karena bersifat universal yang dapat menarik senyawa polar, semipolar dan non polar. Etanol yang digunakan adalah etanol 70% karena sampel yang digunakan adalah sampel kering yang memiliki kandungan air yang relatif sedikit. Adanya kandungan air sebanyak 30% dari pelarut ini berfungsi untuk membantu memecahkan dinding

sel sehingga penetrasi etanol kedalam sel lebih cepat dan optimal. Maserat yang didapat dikentalkan dengan *rotary evaporator*. Tujuan dari evaporasi untuk menguapkan pelarut yaitu etanol sehingga yang tersisa hanya senyawa aktif atau ekstrak kental etanol.

Ekstrak kental yang diperoleh adalah 25,6691 gram dengan randemen dari sampel basah 2,566 % dan sampel kering 10,267 % (Lampiran 3, Tabel 3), dimana standarisasi dari ekstrak kental bunga kecombrang tidak kurang dari 9,86% (Depkes, 2011). Ekstrak kental etanol yang didapatkan berwarna coklat kehitaman, bau khas dan rasa asam (Lampiran 3, Tabel 4). Penentuan organoleptik ini termasuk salah satu parameter spesifik yang ditentukan dengan panca indera dan bertujuan untuk pengenalan awal secara sederhana dan subjektif. Pada uji fitokimia ekstrak kental etanol bunga kecombrang terdapat senyawa flavonoid, fenolat, saponin dan steroid (Lampiran 3, Tabel 5) dimana standarisasi dari kandungan kimia ekstrak kental bunga kecombrang adanya flavonid (Depkes, 2011). Uji fitokimia ini bertujuan untuk memberikan informasi golongan kandungan kimia sebagai parameter mutu ekstrak dalam kaitannya dengan efek farmakologis.

Penentuan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan (Depkes, 2008). Hasil perolehan susut pengeringan pada ekstrak etanol bunga kecombrang sebesar 7,66 % (Lampiran 3, Tabel 6) dimana standarisasi susut pengeringan kecil dari 10 % (Kemenkes, 2010). Penentuan kadar abu berhubungan erat dengan kandungan mineral yang berasal dari proses awal sampai diperoleh simplisia dan ekstrak baik yang berasal dari tanaman

secara alami maupun kontaminan selama proses pembuatan simplisia (Meteria Medika Indonesia, 1995). Hasil perolehan kadar abu dari ekstrak etanol bunga kecombrang sebesar 7,4077% (Lampiran 3, Tabel 7) dimana standarisasi kadar abu tidak lebih dari 7,5% (Depkes, 2011).

Pada penelitian ini digunakan metode stabilisasi membran sel darah merah untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi. Keuntungan dari penggunaan sel darah merah adalah mudah didapatkan, mudah diisolasi dari darah, memiliki struktur membran yang sama dengan membran sel lainnya, sehingga sel darah merah dapat digunakan sebagai pengujian aktivitas antiinflamasi. Dalam penelitian ini sel darah merah yang digunakan adalah sel darah merah kambing, karena mudah didapatkan, hubungan sifat antigen darah kambing dengan antiinflamasi baik. Untuk mendapatkan sampel uji, pertama di lakukan pengumpulan sampel darah kambing yang dimasukan dalam vacutainer tube EDTA berukuran 3 ml. Vacutainer tube EDTA digunakan karena EDTA merupakan antikoagulan yang sangat luas penggunaannya.

Darah yang dimasukkan dalam vacutainer tube ini tidak boleh kurang atau lebih dari 3 ml karena didalam tube jumlah EDTA sudah sesuai dengan jumlah darah sebanyak 3 ml. Jika darah yang masukkan melebihi 3 ml maka akan menyebabkan eritrosit mengkerut atau krenasi dan jika jumlah darah yang dimasukan kurang dari 3 ml maka akan menyebabkan eritrosit mengalami lisis karena kelebihan antikoagulannya. Sampel darah yang telah dimasukkan dalam vacutainer tube disentrifugasi dengan alat sentrifus pada 3000 rpm selama 10 menit, maka akan diperoleh 3 lapisan yaitu lapisan bawah (eritrosit), lapisan tengah (leukosit) dan lapisan atas (plasma). Kemudian ambil lapisan eritrositnya

saja lalu dicuci dengan larutan isosalin dan disentrifugasi kembali. Proses pencucian ini dilakukan 4 kali atau lebih sampai isosalin jernih. Lalu sel darah merah diresuspensi menjadi 10 % dalam larutan isosalin untuk pengujian aktivitas antiinflamasi.

Stabilisasi membran sel darah merah adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*. Metode ini dapat digunakan karena membran sel darah merah tersebut analog dengan membran lisosom dan stabilisasi membran sel darah merah tersebut dapat menyiratkan bahwa terjadi juga stabilisasi pada membran lisosom. Stabilisasi membran lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi dengan mencegah pelepasan kandungan lisosom dari aktivitas neutrofil seperti enzim protease yang menyebabkan peradangan pada jaringan dan cairan ekstraseluler. Beberapa NSAID diketahui memiliki sifat stabilisasi membran yang dapat berkontribusi pada potensi efek antiinflamasi (Kumar *dkk*, 2012). Persentase stabilisasi atau bisa juga disebut stabilitas adalah ukuran untuk melihat kemampuan suatu sampel untuk menstabilkan membran sel darah merah yang didapatkan dari perbandingan serapan antara absorbansi larutan uji dengan absorbansi kontrol (Oyedapo *dkk*, 2010).

Mekanisme stabilisasi membran sel darah merah dapat dilihat ketika diinduksi larutan hipotonik. Hal tersebut menyebabkan terbentuknya stress oksidatif yang dapat mengganggu kestabilan biomembrannya. Stress oksidatif dapat menyebabkan oksidasi lipid dan protein sehingga memicu kerusakan membran yang ditandai dengan terjadinya hemolisis. Lisis dari sel darah merah dapat dijadikan ukuran untuk melihat aktivitas antiinflamasi dilihat dari besar atau

kecilnya lisis yang terjadi akibat larutan hipotonik. Kestabilan membran sel darah merah dapat dilihat dari besar kecilnya nilai absorbansi pada larutan uji, karena pada larutan uji terdapat hemoglobin akibat dari lisisnya sel darah merah. Nilai absorbansi yang kecil menandakan lisis yang terjadi juga sedikit sehingga semakin besar aktivitas antiinflamasi.

Larutan uji yang digunakan berisi larutan hipotonik sebagai induktor hemolisis, sampel suspensi 10% sel darah merah dan senyawa uji berupa ekstrak etanol bunga kecombrang pada konsentrasi 15, 60, 250 dan 1000 ppm. Larutan kontrol digunakan sebagai indikator terjadinya hemolisis sebesar 100% dimana senyawa uji digantikan dengan isosalin. Larutan pembanding yang digunakan adalah ibuprofen pada konsentrasi 15, 30, 60, 120. Masing-masing larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C untuk memberikan waktu absorpsi ekstrak bunga kecombrang dan juga untuk melihat pengaruh senyawa terhadap sel darah merah. Kemudian masing-masing larutan disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit untuk memisahkan bagian sel darah merah yang masih normal dan bagian sel darah merah yang sudah mengalami lisis. Sel darah merah yang normal akan membentuk endapan, sedangkan sel darah merah yang sudah lisis akan berada dibagian supernatan. Supernatan diambil dan serapan hemoglobin diukur dengan spektrofotometer UV/Vis dengan panjang gelombang 577,5 nm sehingga didapatkan nilai absorbansi masing-masing larutan. Hasil analisis terhadap sampel uji yang memiliki aktivitas antiinflamasi dapat dilihat dari penurunan absorbansi hemoglobin pada campuran larutan uji. Semakin kecilnya serapan hemoglobin yang terdeteksi pada campuran larutan uji berarti membran sel darah merah semakin stabil dan tidak mengalami lisis (Kumar *dkk*,

2012). Pengukuran absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 577,50 nm karena pada panjang gelombang tersebut adalah panjang gelombang serapan maksimum dari hemoglobin yang berasal dari penguraian sel darah merah. Ketika membran sel darah merah tidak stabil maka sel darah merah akan terurai, melepaskan hemoglobinnnya dan hem inilah yang akan menyerap panjang gelombang sinar UV-Vis. Jika diberikan sediaan uji, diharapkan bisa menstabilkan membran sel darah merah, jika membran sel darah merah stabil maka sel darah merah tidak akan terurai dan tidak akan melepaskan hemoglobin yang ada didalam sel darah merah walaupun ada mungkin hanya sedikit sehingga sedikit pula yang menyerap sinar UV-Vis maka akan diperoleh absorbansi yang kecil.

Berdasarkan prinsip tersebut aktivitas antiinflamasi dari ekstrak etanol bunga kecombrang dapat dilihat dari penurunan nilai absorbansi pada campuran larutan uji dan dibandingkan dengan absorbansi pembanding. Aktivitas antiinflamasi ekstrak dapat dikatakan bagus apabila nilai absorbansinya mendekati atau sama dengan pembanding. Aktivitas antiinflamasi ekstrak tidak dilihat dari nilai absorbansinya saja, perlu dilakukan perhitungan persentase penghambatan lisis sel darah merah dengan menggunakan rumus persentase stabilitas. Nilai persentase stabilitas ekstrak yang mendekati atau melebihi pembanding dapat dikatakan bagus karena memiliki aktivitas antiinflamasi yang sama atau lebih dari pembanding. Ibuprofen digunakan sebagai pembanding karena merupakan obat antiinflamasi non steroid yang bekerja dengan cara mencegah pelepasan mediator antiinflamasi sehingga dapat menghambat sintesis prostaglandin atau siklooksigenase (Goodman *dkk*, 2008). Selain itu, Ibuprofen

dipilih karena merupakan obat antiinflamasi golongan NSAID yang banyak digunakan untuk mengobati inflamasi serta mudah didapatkan.

Berdasarkan hasil pengukuran nilai absorban yang didapatkan, terlihat bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak bunga kecombrang maka semakin rendah nilai absorban yang terukur. Semakin besar konsentrasi senyawa yang diujikan maka semakin sedikit jumlah hemoglobin yang terukur yang menunjukkan semakin sedikitnya lisis sel darah merah sehingga semakin besar kemampuan stabilisasi membran sel darah merahnya. Setelah dilakukan pengukuran nilai absorbansi, kemudian dihitung persentase stabilitasnya. Hasil pengamatan dan perhitungan yang telah dilakukan pada konsentrasi 15, 60, 250, 1.000 ppm didapatkan nilai persentase stabilitas membran sel darah merah sebesar 15,95 %, 37,85 %, 50,93 % dan 66,06 % secara berurutan (Lampiran 6, Tabel 9). Pada larutan pembanding yang berisi senyawa ibuprofen dengan variasi konsentrasi 15, 30, 60 dan 120 ppm didapatkan nilai persentase stabilitas sebesar 24,59 %, 32,69 %, 52,83 % dan 72,32 % secara berurutan (Lampiran 6, Tabel 9).

Analisa data dilakukan dengan uji statistik ANOVA satu arah. Uji Anova adalah analisis statistik yang digunakan untuk menguji perbedaan mean (rata-rata) data lebih dari satu kelompok. Tujuan digunakan ANOVA satu arah karena hanya terdapat satu variabel bebas (konsentrasi sediaan uji) dan satu variabel terikat (persen stabilitas membran sel darah merah). Sebelum dilakukan uji ANOVA terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas dari ekstrak etanol bunga kecombrang diperoleh nilai signifikan  $P > 0,05$  (Lampiran 7, Tabel 10) menunjukkan bahwa data yang diperoleh homogen.

Hasil pengujian statistik ANOVA didapatkan bahwa pemberian variasi konsentrasi dari ekstrak etanol bunga kecombrang mempunyai aktivitas antiinflamasi yang ditandai dengan nilai signifikan  $P < 0,05$  (Lampiran 7, Tabel 10) artinya ada perbedaan secara bermakna antara kelompok perlakuan, kelompok pembanding dan kelompok kontrol kemudian dilanjutkan dengan uji DUNCAN. Hasil analisa dari uji DUNCAN dapat disimpulkan bahwa kebermaknaan absorbansi ibuprofen 120 berbeda nyata dengan absorbansi bunga kecombrang 1000, ibuprofen 60, bunga kecombrang 250, bunga kecombrang 60, ibuprofen 30, ibuprofen 15, bunga kecombrang 15 dan kontrol. Kebermaknaan absorbansi bunga kecombrang 1000 sama dengan kebermaknaan absorbansi ibuprofen 120. Kebermaknaan absorbansi ibuprofen 60 sama dengan kebermaknaan absorbansi bunga kecombrang 250 namun berbeda nyata dengan absorbansi ibuprofen 120, bunga kecombrang 1000, bunga kecombrang 60, ibuprofen 30, ibuprofen 15, bunga kecombrang 15 dan kontrol. Kebermaknaan absorbansi bunga kecombrang 60 berbeda nyata dengan absorbansi bunga kecombrang 250, ibuprofen 60, bunga kecombrang 1000, ibuprofen 120, ibuprofen 30, ibuprofen 15, bunga kecombrang 15 dan kontrol. Kebermaknaan absorbansi ibuprofen 30 begitu juga dengan ibuprofen 15, bunga kecombrang 15, kontrol kebermaknaannya sama dengan kebermaknaan bunga kecombrang 60. Dari analisis diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bunga kecombrang memiliki aktivitas antiinflamasi.

Adanya efek antiinflamasi diduga karena aktivitas metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak bunga kecombrang yaitu flavonoid dan saponin. Salah satu metabolit sekunder yang diduga memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi yaitu flavonoid, mekanisme kerja flavonoid sebagai antiinflamasi dapat melalui

beberapa jalur dengan penghambatan aktivitas siklooksigenase (COX) dan lipooksigenase, penghambatan akumulasi leukosit, penghambatan degranulasi neutrofil, penghambatan histamin (Nijveltd, 2001). Selain itu, mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya radang melalui dua cara yaitu menghambat asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dan endothelial sehingga proliferasi dan eksudasi dari proses radang. Terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel inflamasi akan menyebabkan kurang tersediannya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipooksigenase (Robinson, 1995). Selain flavonoid senyawa bioaktif lain yang berpotensi sebagai antiinflamasi adalah saponin dengan menghambat pembentukan eksudat dan menghambat permeabilitas vaskular (Winarti, 2011).

## **BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dengan metode stabilisasi membran sel darah merah secara *in vitro* maka diperoleh kesimpulan yaitu :

1. Adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) terhadap aktivitas antiinflamasi dengan metode stabilisasi membran sel darah merah.
2. Variasi konsentrasi dari ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) memberikan pengaruh terhadap aktivitas antiinflamasi. Ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm memiliki aktivitas antiinflamasi paling tinggi.

### **5.2 Saran**

Disarankan pada peneliti selanjutnya untuk melakukan uji aktivitas antiinflamasi dari fraksinasi bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dengan metode stabilisasi membran sel darah merah secara *in vitro*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antoro ED. 1995. Skrining fitokimia rimbang *Nicolaia speciosa* Horan secara mikrokimiawi kromatografi lapis tipis dan spektrofotometri UV. FF-UGM.
- Awe EO, Adeloye OA, Banjoko SO. 2009. Membrane Stabilizing activity of *Russelia Equisetiformis*, Schlecht & Chan, *Journal of Natural Products*.
- Carbonaro M. 2005. *Absorption of Quercetin and Rutin in Rat Small Intestine Annals Nutrition and Metabolism*. New York.
- Chan E, Lim Y, Omar M. 2007. *Antioxidant and Antibacterial activity of Leaves of Etlingera species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia*. Malaysia.
- Chippada SC, Sharan SV, Srinivasa RB, Meena V, 2011. In Vitro Anti Inflammatory activity of Methanolic Extract of *Centella Asiatica* By Hrbc Membrane Stabilization, *RASAYAN Journal Chemistry*.
- Costa JJ, Waller PW, Galli SJ. 1994. *The cells of the Allergic Response*. JAMA.
- Day RA dan Underwood AL. 2002. *Analisa Kimia Kuantitatif*. Edisi VI. Jakarta. Penerbit Erlangga.
- Departemen Kesehatan RI. 1995. *Materia Medika Indonesia*, Jilid VI. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Cetakan 1. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta.
- Departemen Kesehatan RI. 2011. *Suplemen II Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*. Jakarta.
- Doerge RF. 1982. *Buku Teks Wilson dan Gisvold Kimia Farmasi dan Medisinal Organik*, Edisi VII, Bagian I. JB. Lippicott Company. Philadelphia.
- Docke WD, Randow F, Syrbe U. 1997. Monocyle deactivation in Septic patients.
- Domer, LF. 1971. *Animal Experiments in Pharmacological Analysis*. Departement of Pharmacological school of Medicine Fulane University New York Orleans, Lousina.
- Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. 2011. Flavonoid and Phenolic acid Role and Biochemical Anctivity in Plants and Human. *Journal of Medical Plants Research Voll 5 (31)*.
- Goodman G. 2008. *Dasar Farmakologi Terapi*. Jakarta; Kedokteran. EGC.

- Handayani V, Ahmad A, Sudir M. 2014. Uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol bunga dan daun patikala (*Etilingera elatior* (Jack.) R.M.SM) menggunakan metode DPPH. *Pharmaceutical Sciences and Research*.
- Harborne, JB. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. diterjemahkan oleh K. Pandanawita dan I. Soediro. Bandung: ITB.
- Hidayat S dan Rodame. 2015. *Kitab Tumbuhan Obat*. Jakarta.
- Katzung BG. 2002 . *Farmakologi Dasar dan Klinik* (edisi II). Jakarta: Salemba Medika.
- Katzung BG. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik* (edisi XIII). Buku 3. *Translation of Basic and Clinical Pharmacology Eight Edition* Alih bahasa oleh Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta: Salemba Medika.
- Katzung BG. 2006. *Farmakologi Dasar dan Klinik* (edisi X). Jakarta: Kedokteran EGC.
- Kumar N, Sampath. 2011. Evaluation of RBC Membran Stabilization and Antioxidant of Bombax Cerba in an In Vitro Methode. *International Journal of Pharmaad Bio Sciences*.
- Kumar V, Zulfiqar AB, Dinesh K, NA Khan, IA Chashoo, MY Shah. 2012. Evaluation of AntiInflammatory Potential of Petal Extracts of Crocus sativus “Cashmerianus”. *International Journal of Phytopharmacology*.
- Lee HS. 2000. HPLC Analysis of Phenolic Compounds. *Journal of Food Analysis by HPLC* (second edition). New York.
- Lenny S. 2006. *Senyawa Terpenoida dan Steroida*. USU Repository, Medan.
- Malik F, Ningsih A, Bafadal M, Saktiani DN. 2015. Uji Efek Antipiretik Ekstrak Etanol Buah Wualae (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm.) terhadap Mencit Jantan (*Mus musculus* L.) Galur Balb/c. *Jurnal Farmasi Sains dan Kesehatan*.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. 2014. Polyphenols Food Sources and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*.
- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. diterjemahkan oleh K. Padmawinata. Bandung: ITB.
- Markham KR. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification*. London. Academic Press.

- Mustchler E. 1991. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi (edisi kelima) diterjemahkan oleh Widiyanto MB, Ranti AS. ITB. Bandung.
- Neldawati, Ratnawulan, Gusnedi. 2013. Analisis nilai absorbansi dalam penentuan kadar flavonoid untuk berbagai jenis daun tanaman obat. *Journal of Physics. Jurusan Fisika, Universitas Negeri Padang*.
- Nijveldt RJE, Van NDEC, Van HPG, Boelens K, Van NPAM. 2001. Flavonoid a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical and Nutrition*.
- Nugroho AE. 2012. *Obat-obat Penting dalam Pembelajaran Ilmu Farmasi dan Dunia Kesehatan*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Oyedapo OO, BA Akinpelu, KF Akinwunmi, MO Adeyinka and FO Sipeolu. 2010. Red Blood Cell Membrane Stabilizing Potentials of Extracts of *Lantana camara* and its Fractions. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*.
- Permadi A. 2008. *Ramuan Herbal Penumpas Hipertensi*. Jakarta: Pusaka Bunda
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, dan Shahabimajid N. 2006. Antioxidant activity. Phenol and Flavonoid Contents of some selected Iranian Medicinal Plants. *African Journal of Biotechnology*.
- Pristiadi. 2012. Kajian Komparatif aktivitas Antioksidan Formula Pengawet Alami Ekstrak Kecombrang (*Nicolaia speciosa* Horan) dan Pola Pemisahan Kromatografi Ekstrak bagian-bagian Tanaman Kecombrang. *Journal of Inovation and Technology of Agroindustri*.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB
- Rohyami Y, Shabur TJ. 2003. *Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa Boerl) menggunakan Spektrofotometer UV- Vis*, Prosiding Seminar Nasional Farmasi UII, Yogyakarta.
- Sagala JP, Prabowo WC, Tusli R. 2016. *Pengaruh Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang (Etlingera elatior) Terhadap Penyembuhan Luka Pada Tikus Putih (Rattus novergicus)*. Prosiding seminar nasional tumbuhan obat Indonesia ke-50. Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur.
- Stahl E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, Penerjemah: Padmawinata K dan I Sudiro. ITB. Bandung.

- Tampubolon OT, Suhatsyah S, Sastrapradja S. 1983. *Penelitian Pendahuluan Kimia Kecombrang (Nicolaia speciosa Horan)*. Risalah Simposiu.
- Tjay TH, Raharja K. 2007. *Obat-obat Penting (Khasiat, Penggunaan dan Efek Samping)*. Jakarta: Gramedia.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2008. *Classification for Kingdom Plantae doen to Genus Graptophyllum Nees*.
- Wijekoon JO, Bhat R, Karim AA. 2010. Effect of Extraction Solvents on The Phenolic Compound and Antioxidant activities of Bunga Kantan (Etlintera elatior Jack.) Inflorence. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Williams LAD, AO Connar, L Latore, O Dennis, S Ringer, JA Whittaler, J Conrad, B Vogler, H Rosner, W Kraus. 2008. The in vitro Antidenaturation Effects Induced by Natura Product and Non-Steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin is Proposed asa Screening Assay for Detection of AntiInflammatory compounds ,without the Use of Animals, in the Early Stages of The DrugDiscovery Process, *West Indian Medical Journal*.
- Winarti dan Lina. 2011. *Uji Antiinflamasi Ekstrak Metanol Daun Sirih Merah (Piper Crocatum Ruiz dan Pav) Pada Tikus Putih*. Fakultas Farmasi dan Universitas Jember.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW. 1962. Carrageenin – induced Udem in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Journal of Experimental Biology and Medicine*.
- Yoshiko U, Hirokazu U, Masaki I, Tadashi H. 2011. Highly Potent Fibrinolytic Serine Protease from Streptomyces, *Enzyme and MicrobialTechnology*.

**Lampiran 1. Surat identifikasi tanaman kecombrang dari Herbarium Universitas Andalas Padang**

 **HERBARIUM UNIVERSITAS ANDALAS (ANDA)**  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas Kampus Limau Manih Padang Sumbar  
Indonesia 25163 Telp. +62-751-777427 ext. \*811 e-mail: [nas\\_herb@yahoo.com](mailto:nas_herb@yahoo.com);  
[herbariumandaunand@gmail.com](mailto:herbariumandaunand@gmail.com)

---

Nomor : 181/K-ID/ANDA/V/2019  
Lampiran : -  
Perihal : Hasil Identifikasi

Kepada yth,  
Vivin Asfitri  
Di  
Padang

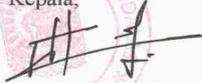
Dengan hormat,  
Sehubungan dengan surat mengenai bantuan untuk "Identifikasi Tumbuhan" di Herbarium Universitas Andalas Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas, kami telah membantu mengidentifikasi tumbuhan yang dibawa, atas nama:

Nama : Vivin Asfitri  
No. BP : 1504031  
Instansi : STIFI-YP PADANG

Berikut ini diberikan hasil identifikasi yang dikeluarkan dari Herbarium Universitas Andalas.

No	Family	Spesies
1.	Zingiberaceae	<i>Etingera elatior</i> (Jack) R.M.Sm.

Demikian surat ini dibuat untuk dapat digunakan seperlunya.

Padang, 15 Mei 2019  
Kepala,  
  
Dr. Nurainas, M.Si  
NIP. 196908141995122001

**Gambar 7.** Surat Hasil Identifikasi Bunga Kecombrang (*Etingera elatior* (Jack) R. M. Sm.)

**Lampiran 1. Gambar**



**Gambar 8. Tanaman Kecombrang**



**Gambar 9. Bunga Kecombrang**

**Lampiran 1. (Lanjutan)**



**Gambar 10. Eritrosit Kambing**



**Gambar 11. Eritrosit kambing setelah disentrifuge**

**Lampiran 1. (Lanjutan)**

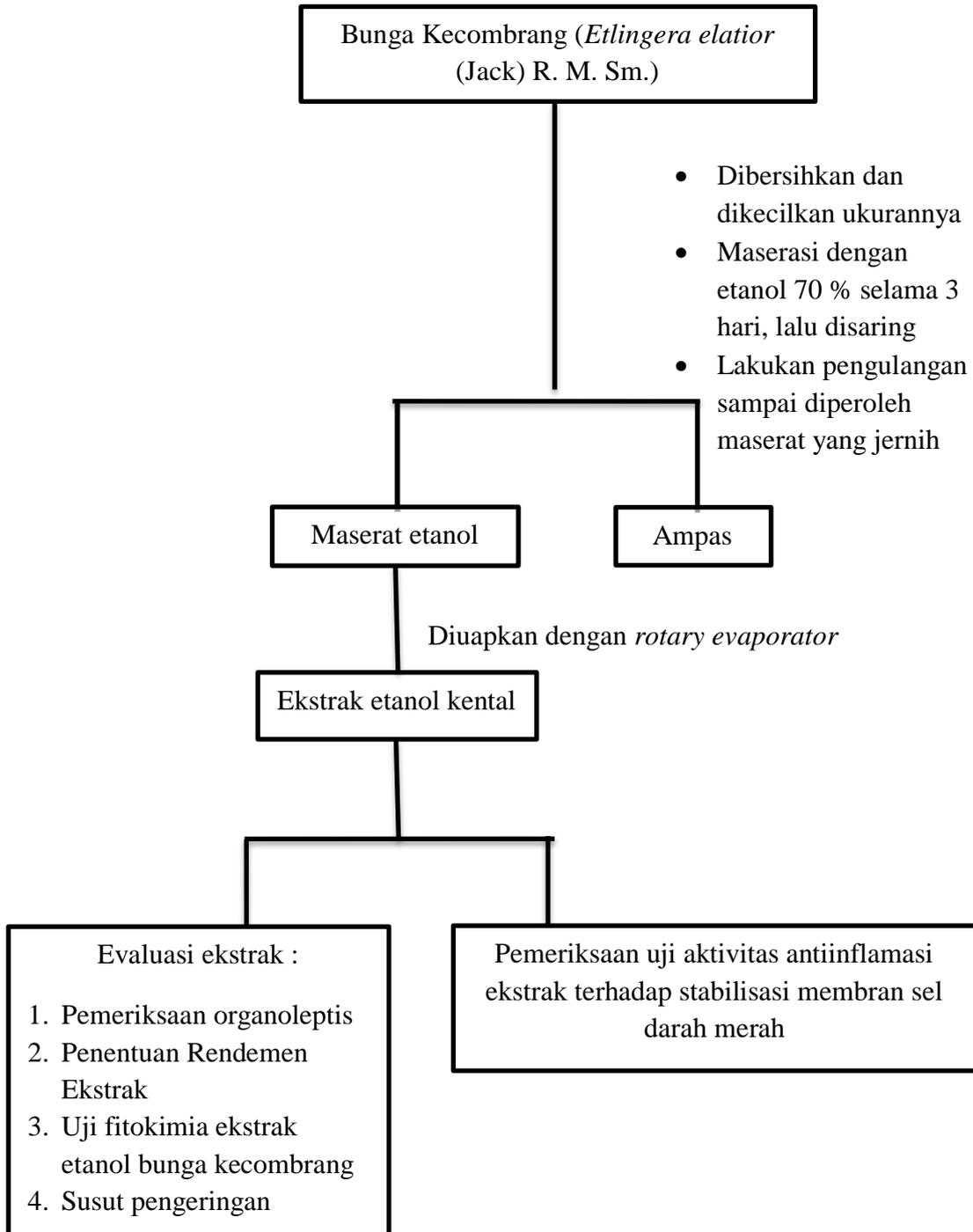


**Gambar 12.** Larutan uji setelah disentrifuge



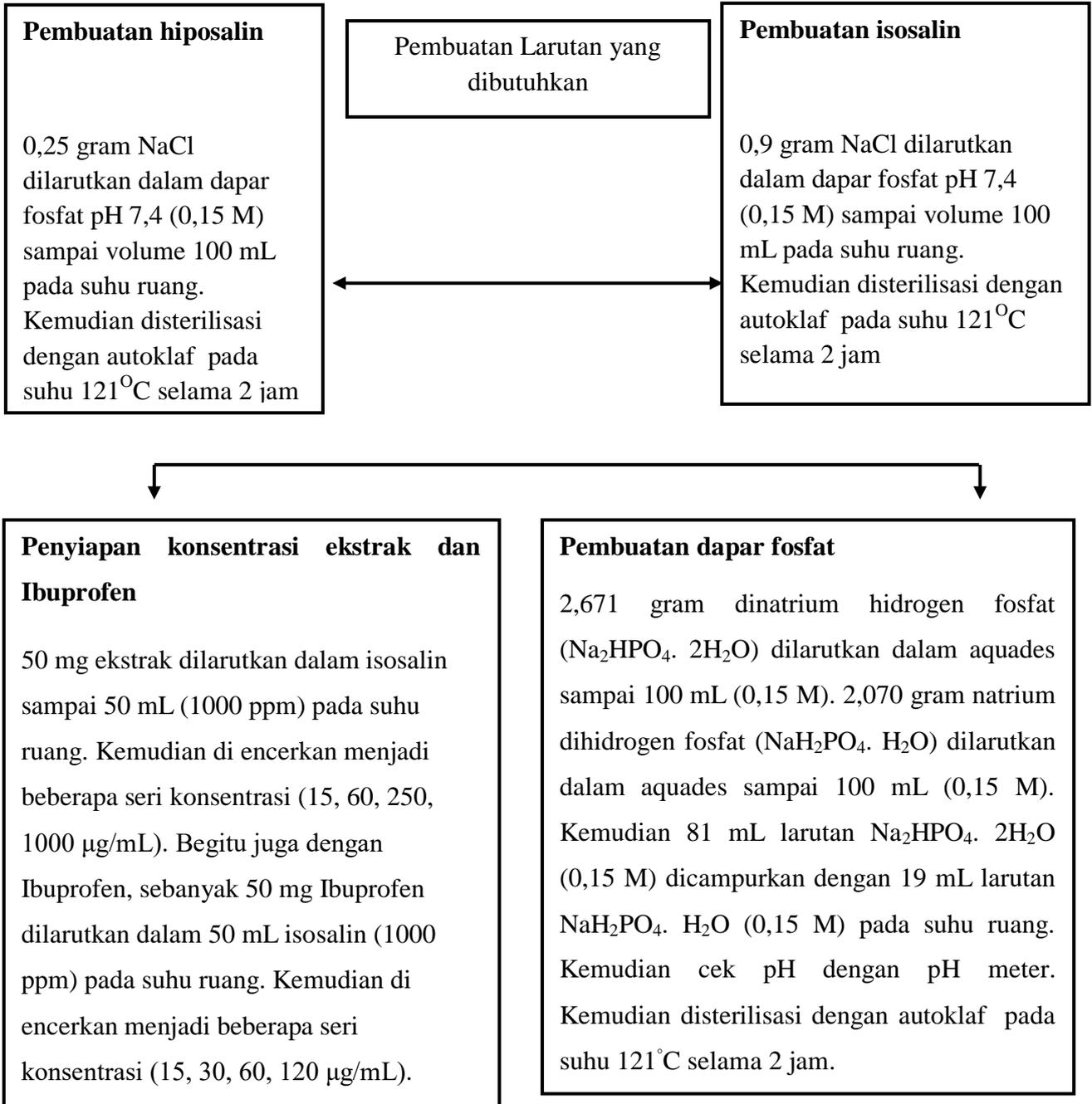
**Gambar 13.** Spektrofotometer UV-Vis

## Lampiran 2. Skema Kerja



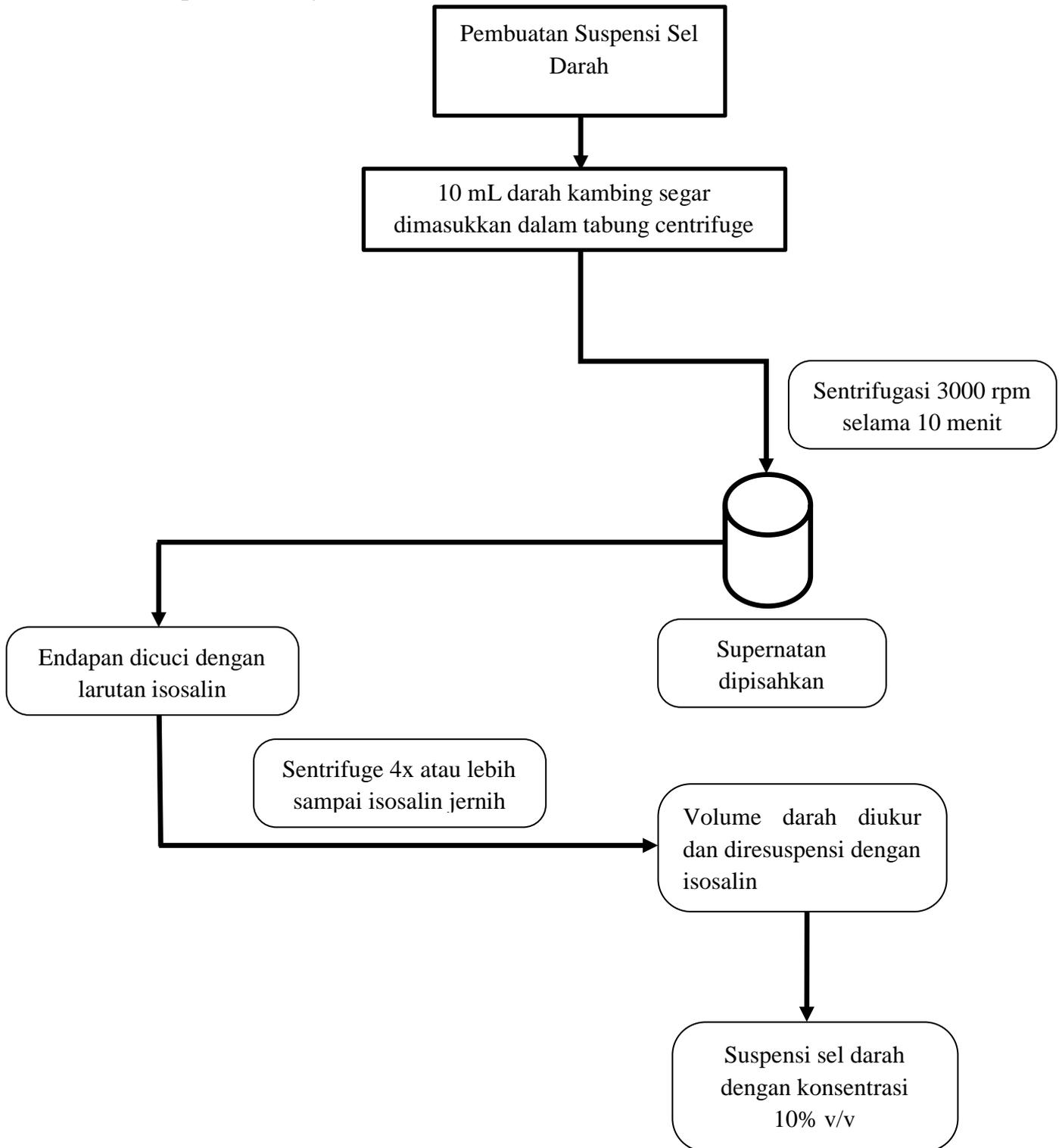
**Gambar 14.** Skema kerja Ekstraksi Bunga Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Sm.).

## Lampiran 2. (Lanjutan)



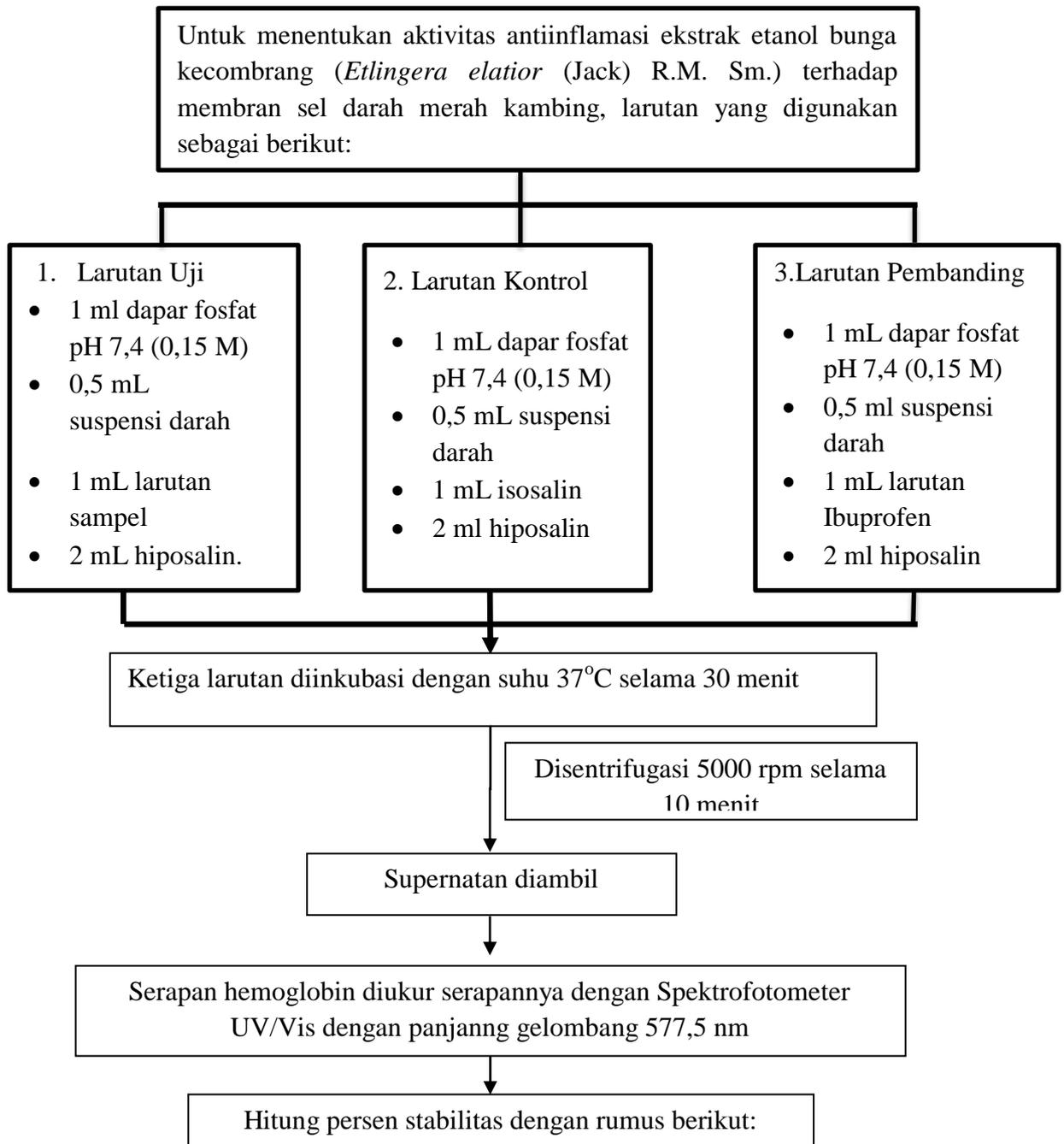
**Gambar 15.** Pembuatan Larutan yang dibutuhkan untuk menentukan aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol bunga kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R.M. Sm.) terhadap membran sel darah merah kambing.

Lampiran 2 (Lanjutan)



Gambar 16. Bagan Alir Pembuatan Suspensi Sel Darah Merah

## Lampiran 2 (Lanjutan)



$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbansi larutan Uji}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \right] \times 100\%$$

**Gambar 17.** Pengujian Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R.M. Sm.) terhadap Membran Sel Darah Merah Kambing.

**Lampiran 3. Hasil pemeriksaan karakteristik ekstrak etanol 70% bunga kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm)**

**Tabel 3.** Hasil perhitungan rendemen ekstrak etanol bunga kecombrang

Parameter	Berat (gram)
Berat Sampel Basah	1000
Berat Ekstrak Kental	25,6691
Rendemen	2,566 %

Penentuan rendemen :

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat sampel segar}} \times 100\% \\ &= \frac{25,6691}{1000} \times 100\% \\ &= 2,566 \% \end{aligned}$$

Parameter	Berat (gram)
Berat Sampel Kering	250
Berat Ekstrak Kental	25,6691
Rendemen	10,267 %

Penentuan rendemen :

$$\begin{aligned} \text{Rendemen (\%)} &= \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat sampel kering}} \times 100\% \\ &= \frac{25,6691}{250} \times 100\% \\ &= 10,267 \% \end{aligned}$$

**Tabel 4.** Hasil pengamatan secara organoleptis ekstrak etanol bunga kecombrang

No.	Pemeriksaan	Pengamatan
1.	Bentuk	Kental
2.	Warna	Coklat kehitaman
3.	Bau	Khas
4.	Rasa	Asam

### Lampiran 3. (Lanjutan)

**Tabel 5.** Hasil identifikasi fitokimia ekstrak etanol bunga kecombrang

<b>No</b>	<b>Kandungan kimia</b>	<b>Pereaksi</b>	<b>Hasil Pengamatan</b>	<b>Kesimpulan</b>
1	Flavonoid	Lapisan air + Mg dan HCL (p)	Terbentuk warna merah	+
2	Fenolat	Lapisan air + FeCl <sub>3</sub>	Terbentuk warna biru	+
3	Saponin	Lapisan air dikocok kuat	Terbentuk busa 18 menit 20 detik	+
4	Steroid	Lapisan kloroform + norit, as.asetat anhidrat, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Terbentuk warna hijau kebiruan	+
5	Terpenoid	Lapisan kloroform + norit, as.asetat anhidrat, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat	Tidak terbentuk warna merah	-
6	Alkaloid	Lapisan kloroform + kloroform amoniak, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2N, mayer	Terbentuk kabut putih	-

Keterangan : (+) = Mengandung senyawa kimia

(-) = Tidak mengandung senyawa kimia

### Lampiran 3. (Lanjutan)

**Tabel 6.** Penentuan susut pengeringan ekstrak etanol bunga kecombrang

Kategori	Berat (gram)
Berat krus kosong (A)	46,2096
Berat krus + Sampel sebelum di panaskan (B)	47,2099
Berat krus + sampel setelah dipanaskan (C)	47,1332

Keterangan

A = Berat krus

B = Berat krus + sampel sebelum dipanaskan

C = Berat krus + sampel setelah dipanaskan

Perhitungan persentase susut pengeringan :

$$\begin{aligned}\% \text{Susut pengeringan} &= \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \times 100\% \\ &= \frac{(47,2099 - 46,2096) - (47,1332 - 46,2096)}{(47,2099 - 46,2096)} \times 100\% \\ &= 7,66 \%\end{aligned}$$

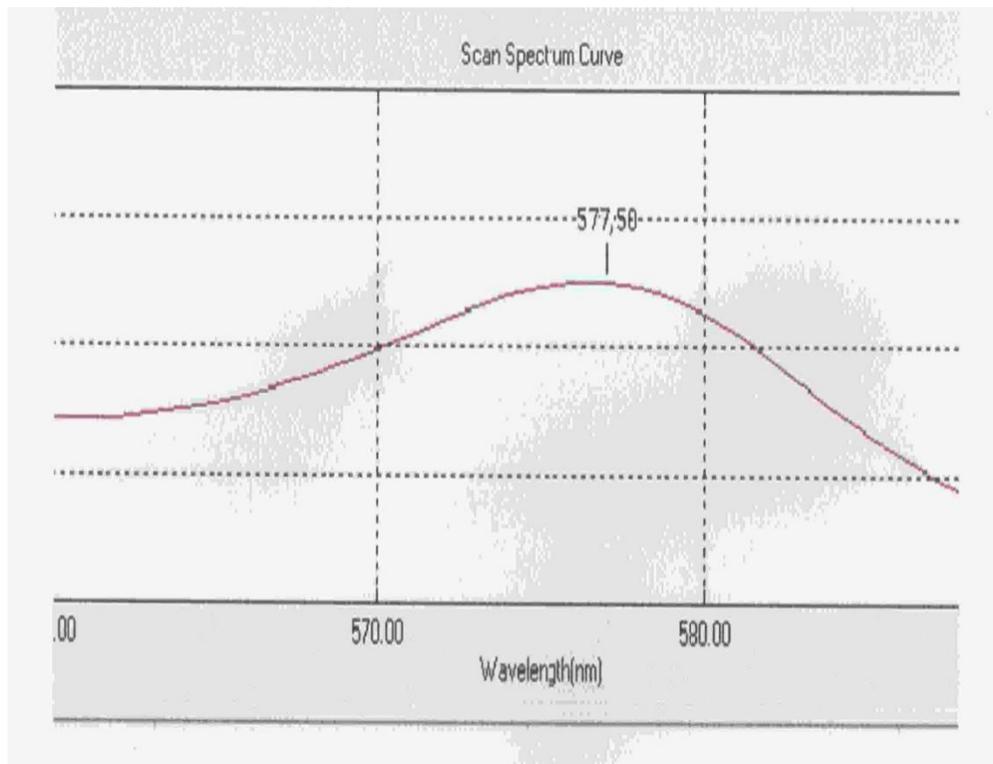
**Tabel 7.** Penentuan kadar abu ekstrak etanol bunga kecombrang

Kategori	Berat (gram)
Bobot krus kosong (A)	46,2098
Bobot krus + sampel sebelum dipijarkan (B)	47,2101
Bobot krus + sampel setelah dipijarkan (C)	46,2839

Perhitungan persentase kadar abu :

$$\begin{aligned}\% \text{Kadar abu} &= \frac{C - A}{B - A} \times 100\% \\ &= \frac{46,2839 \text{ g} - 46,2098 \text{ g}}{47,2101 \text{ g} - 46,2098 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 7,4077 \%\end{aligned}$$

#### Lampiran 4. Data Hasil Penelitian



**Gambar 18.** Kurva Spektrum UV Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang (*Etilingera elatior* (Jack) R. M. Sm)

## Lampiran 5. Data perhitungan

1. Perhitungan serial konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang dengan menggunakan rumus Thomson :

$$\text{Konsentrasi ekstrak terendah} = 15 \text{ ppm}$$

$$\text{Konsentrasi ekstrak tertinggi} = 1000 \text{ ppm}$$

$$\text{Jumlah konsentrasi ekstrak} = 4$$

$$\text{Nilai F} = \sqrt[n-1]{\frac{C \text{ max}}{C \text{ min}}}$$

$$= \sqrt[4-1]{\frac{1000}{15}}$$

$$= \sqrt[3]{66,66}$$

$$= 4,05$$

$$\text{Konsentrasi ekstrak 1} = 15 \text{ ppm}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak 2} &= 15 \text{ ppm} \times 4,05 \\ &= 60,75 \text{ ppm} \infty 60 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak 3} &= 60 \text{ ppm} \times 4,05 \\ &= 243 \text{ ppm} \infty 250 \text{ ppm} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi ekstrak 4} &= 250 \text{ ppm} \times 4,05 \\ &= 1.012,5 \text{ ppm} \infty 1000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

Jadi, konsentrasi yang dibuat untuk ekstrak etanol bunga kecombrang adalah 15 ppm, 60 ppm, 250 ppm dan 1000 ppm.

## Lampiran 5. (Lanjutan)

### 2. Perhitungan serial konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang

Diketahui: larutan induk 1000 ppm

#### a. Konsentrasi 15 ppm

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \text{ mL} \cdot 15 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ mL} = 150 \mu\text{L}$$

#### b. Konsentrasi 60 ppm

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 60 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,6 \text{ mL} = 600 \mu\text{L}$$

#### c. Konsentrasi 250 ppm

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 250 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ mL} = 2500 \mu\text{L}$$

#### d. Konsentrasi 1000 ppm

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$$

$$V_1 \cdot 1000 \text{ ppm} = 10 \cdot 1000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 10 \text{ mL} = 1000 \mu\text{L}$$

### Lampiran 5. (Lanjutan)

3. Perhitungan persentase stabilitas membran sel darah merah dengan larutan uji ekstrak etanol bunga kecombrang.

$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbansi larrutan Uji}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \right] \times 100\%$$

$$\text{Absorbansi Kontrol} = 0,7563$$

- Konsentrasi 1000 ppm

1.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,251}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 66,81 \%$$

2.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,256}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 66,15 \%$$

3.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,263}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 65,22 \%$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 1000 ppm = 66,06 %

- Konsentrasi 250 ppm

1.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,363}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 52 \%$$

2.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,366}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 48,39 \%$$

3.  $\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,360}{0,7563} \right] \times 100\%$

$$= 52,39 \%$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 250 ppm = 50,93 %

## Lampiran 5. (Lanjutan)

- Konsentrasi 60 ppm

$$1. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,479}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 36,66 \%$$

$$2. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,467}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 38,25 \%$$

$$3. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,464}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 38,65 \%$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 60 ppm = 37,85 %

- Konsentrasi 15 ppm

$$1. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,627}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 17,09 \%$$

$$2. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,645}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 14,72 \%$$

$$3. \text{ \% Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{0,635}{0,7563} \right] \times 100\%$$

$$= 16,04 \%$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 15 ppm = 15,95 %

## Lampiran 5. (Lanjutan)

4. Perhitungan persentase stabilitas membran sel darah merah dengan larutan pembanding Ibuprofen :

$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left[ \frac{\text{Absorbansi larrutan Uji}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \right] \times 100\%$$

$$\text{Absorbansi Kontrol} = 0,7563$$

a Konsentrasi 120 ppm

$$\begin{aligned} 1. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,202}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 73,29 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,216}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 71,44 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,210}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 72,23 \% \end{aligned}$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 120 ppm = 72,32%

b Konsentrasi 60 ppm

$$\begin{aligned} 1. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,353}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 53,32 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,357}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 52,79 \% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3. \ \% \text{ Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,360}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 52,39 \% \end{aligned}$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 60 ppm = 52,83 %

### Lampiran 5. (Lanjutan)

c Konsentrasi 30 ppm

$$\begin{aligned} 1. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,513}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 32,17 \text{ \%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,506}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 33,09 \text{ \%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,508}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 32,83 \text{ \%} \end{aligned}$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 30 ppm = 32,69 %

d Konsentrasi 15 ppm

$$\begin{aligned} 1. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,589}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 22,12 \text{ \%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 2. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,567}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 25,03 \text{ \%} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 3. \text{ \% Stabilitas} &= 100 - \left[ \frac{0,555}{0,7563} \right] \times 100\% \\ &= 26,62 \text{ \%} \end{aligned}$$

Jadi, rata-rata % stabilitas untuk ekstrak konsentrasi 15 ppm = 24,59 %

**Lampiran 6. Uji Aktivitas Stabilitas Ekstrak Etanol Bunga Kecombrang (*Etlintera elatior* (Jack) R. M. Sm.) dan Ibuprofen Terhadap Membran Sel Darah Merah.**

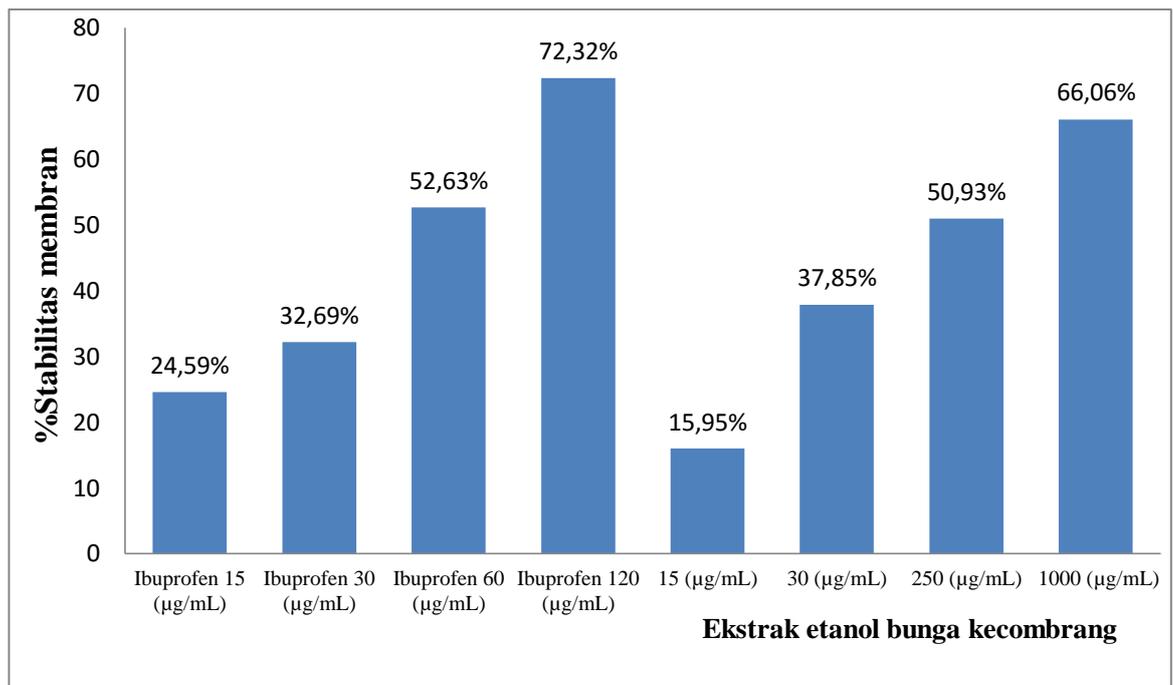
**Tabel 8.** Nilai absorbansi pengujian aktivitas stabilisasi ekstrak etanol bunga kecombrang dan ibuprofen terhadap membran sel darah merah kambing, pada panjang gelombang 577,50 nm dengan 3 kali pengulangan.

Ibuprofen	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi Perlakuan			
		1	2	3	Rata-rata ± SD
	15	0.589	0.567	0.555	0.570±0.0172
	30	0.513	0.506	0.508	0.509±0.0036
	60	0.353	0.357	0.360	0.356±0.0035
	120	0.202	0.216	0.210	0.209±0.0070
Bunga Kecombrang	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi Perlakuan			
		1	2	3	Rata-rata ± SD
	15	0.627	0.645	0.635	0.635±0.0090
	60	0.479	0.467	0.464	0.470±0.0079
	250	0.363	0.366	0.360	0.363±0.0030
	1000	0.251	0.256	0.263	0.256±0.0060
Kontrol		0.753	0.756	0.760	0.756±0.0035

## Lampiran 6. (Lanjutan)

**Tabel 9.** Nilai persentase stabilitas ekstrak etanol bunga kecombrang dengan metode stabilisasi membran sel darah merah.

Konsentrasi Bunga Kecombrang dan Ibuprofen ( $\mu\text{g/mL}$ )	Aktivitas Stabilisasi Membran Sel Darah Merah (%)
Ibuprofen 15 ( $\mu\text{g/mL}$ )	24,59
Ibuprofen 30 ( $\mu\text{g/mL}$ )	32,69
Ibuprofen 60 ( $\mu\text{g/mL}$ )	52,83
Ibuprofen 120 ( $\mu\text{g/mL}$ )	72,32
Bunga Kecombrang 15 ( $\mu\text{g/mL}$ )	15,95
Bunga Kecombrang 60 ( $\mu\text{g/mL}$ )	37,85
Bunga Kecombrang 250 ( $\mu\text{g/mL}$ )	50,93
Bunga Kecombrang 1000 ( $\mu\text{g/mL}$ )	66,06



**Gambar 19.** Grafik perbandingan antara variasi konsentrasi ekstrak etanol bunga kecombrang dengan variasi konsentrasi ibuprofen terhadap persentase stabilisasi membran sel darah merah

**Lampiran 7. Pengolahan Data Secara Statistik (ANOVA) Satu Arah  
Dilanjutkan Uji Duncan**

**Tabel 10.** Hasil uji statistik ANOVA satu arah dengan metode stabilitas membran sel darah merah oleh ekstrak etanol bunga kecombrang, ibuprofen dan kontrol

**Descriptives**

Absorban

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Ibuprofen 15	3	.57033	.017243	.009955
Ibuprofen 30	3	.50900	.003606	.002082
Ibuprofen 60	3	.35667	.003512	.002028
Ibuprofen 120	3	.20933	.007024	.004055
Bunga Kecombrang 15	3	.63567	.009018	.005207
Bunga Kecombrang 60	3	.47000	.007937	.004583
Bunga Kecombrang 250	3	.36300	.003000	.001732
Bunga Kecombrang 1000	3	.25667	.006028	.003480
Kontrol	3	.75633	.003512	.002028
Total	27	.45856	.172529	.033203

**Test of Homogeneity of Variances**

Absorban

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.185	8	18	.080

**ANOVA**

Absorban

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.773	8	.097	1.515E3	.000
Within Groups	.001	18	.000		
Total	.774	26			

**Lampiran 7 (Lanjutan)**

**Tabel 11.** Uji Duncan dari ekstrak etanol bunga kecombrang dengan metode stabilisasi membran sel darah merah

Duncan

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Ibuprofen 120	3	.20933							
Bunga kecombrang 1000	3		.25667						
Ibuprofen 60	3			.35667					
Bunga kecombrang 250	3			.36300					
Bunga kecombrang 60	3				.47000				
Ibuprofen 30	3					.50900			
Ibuprofen 15	3						.57033		
Bunga kecombrang 15	3							.63567	
Kontrol	3								.75633
Sig.		1.000	1.000	.344	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.									