

Isolasi Senyawa dan Uji Aktivitas Anti-inflammasi Ekstrak Metanol Daun Puwar Kincung (*Nicolaia speciosa* Horan)

Emrizal^{1*}, Armon Fernando¹, Fitri Suryani¹, Farediah Ahmad², Hasnah M. Sirat² dan Dayar Arbain³

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia

²Department of Chemistry, Faculty of Science, Universiti Teknologi Malaysia, Malaysia

³Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Andalas, Padang, Indonesia

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian isolasi dan pengujian efek antiinflamasi dari daun puwar kincung (*Nicolaia speciosa* Horan) terhadap ekstrak metanol, fraksi *n*-heksana dan etil asetat. Isolasi dilakukan dengan metoda ekstraksi secara fraksinasi dan beberapa tahap kromatografi kolom. Pemurnian dilakukan secara rekristalisasi. Dua senyawa berhasil diisolasi dan diberi label F4 dan S3. F4 didapat dari fraksi *n*-heksana sebanyak 20 mg berbentuk kristal berwarna putih kekuningan dengan titik leleh 55–57°C dan S3 dari fraksi etilasetat sebanyak 15 mg berbentuk kristal berwarna kuning dengan titik leleh 68–69°C. Pengujian efek antiinflamasi ekstrak metanol menggunakan metoda *paw edema* menunjukkan bahwa dosis 250 dan 1000mg/kgBB mempunyai efek sebagai antiinflamasi.

Kata Kunci: Anti-inflammasi, *Nicolaia speciosa*, puwar kincung, Zingiberaceae

ABSTRACT

The study of anti-inflammatory activity and isolation of the methanolic extract, hexane and ethyl acetate fractions of the leaves of puwar kincung (*Nicolaia speciosa* Horan) have been done. Isolation was carried out by extraction, fractionation and multiple column chromatographic method, followed by recrystallization technique. Two compounds were isolated and labeled as F4 and S3. F4 was derived from *n*-hexane fraction as yellowish-white crystals (20 mg) with mp. 55–57°C and S3 from the ethyl acetate fraction (15 mg) as yellow crystals with mp. 68–69°C. Anti-inflammatory activity of methanolic extract using *Paw Edema* method showed that the dose 250 and 1000mg/kgbw were active as anti inflammatory agents.

Keywords: Antiinflammation, *Nicolaia speciosa*, puwar kincung, Zingiberaceae

PENDAHULUAN

Puwar kincung, (*Nicolaia speciosa* Horan) merupakan tumbuhan suku Zingiberaceae, suku terbesar dari ordo Zingiberales (Mulianingsih, 2004). Diperkirakan terdapat 53 genus dan lebih dari 1200 spesies (Kress *et al.*, 2002). Suatu penelitian menyatakan bahwa 2 suku terbesar; Zingiberaceae dan Marantaceae dari ordo ini menunjukkan adanya flavonoid (Williams & Harborne, 1977). Berdasarkan hasil uji pendahuluan fitokimia diketahui bahwa tumbuhan *N. speciosa* Horan ini mengandung senyawa dari golongan flavonoid, fenolik, dan saponin.

Dalam dekade terakhir ini metabolit sekunder yang berasal dari tanaman sangat banyak menunjukkan aktivitas penghambat *cyclooxygenase*. Golongan utama dari senyawa penghambat *cyclooxygenase* adalah flavonoid, fenolik dan beberapa stilbenoid. Senyawa fenolik seperti gingerol, eugenol dan curcuminoid menunjukkan penghambatan terhadap aktifitas *cyclooxygenase* secara signifikan (Jachak, 2006). Beberapa flavonoid dari sumber

tumbuh-tumbuhan mengurangi regulasi dari *cyclooxygenase-2* di dalam jaringan sel. Banyak ekstrak tanaman yang di dalamnya mengandung flavonoid digunakan secara tradisional sebagai anti inflamasi secara topikal di Asia (Park *et al.*, 2001).

METODOLOGI

Alat-alat yang digunakan adalah botol kaca gelap, gunting, timbangan, *becker glass*, vial, corong, corong pisah, *rotary evaporator*, destilasi, kolom kromatografi, *Pletysmometer*, jarum suntik intra peritoneal dan jarum oral, lumpang dan alu, vial, pipet tetes, timbangan hewan, kandang hewan, dan foto digital, seperangkat alat *Fisher John melting points apparatus*, lampu UV, timbangan analitik.

Bahan-bahan yang digunakan adalah daun *N. speciosa* segar, metanol, *n*-heksana, etil asetat, silika gel, metanol, kloroform-amoniak 0,05 N, kloroform, asam sulfat 2N, pereaksi Mayer, asam klorida pekat, karbon aktif, asam sulfat pekat,

*Unit Bidang Farmasi Bahan Alam
Telp: +628137 180 9658
Email: emrizal_atiax@yahoo.com

asam asetat anhidrat, logam Mg, larutan feri klorida 1%, karagen 1%, Na. diklofenak, Na. CMC 1%, Akuades.

Sampel Tumbuhan. Sampel tumbuhan sebanyak 3 kg yang diambil dari desa Rajo Dani, kecamatan Padang Ganting, Batusangkar, Sumbar. Identifikasi tumbuhan dilakukan oleh Nurainas, dari Herbarium Andalas (ANDA), Biologi, FMIPA Universitas Andalas, Padang. Spesimen tumbuhan disimpan di Herbarium tersebut dengan voucher spesimen (FSEM-0410).

Ekstraksi dan Isolasi. Daun segar *N. speciosa* Horan, dibersihkan (3 kg), dirajang, kemudian dikering-anginkan dan diperoleh 750 g sampel kering. Sampel ini dimaserasi dengan metanol selama 4 x 24 jam dalam botol berwarna gelap pada suhu kamar. Maserat diperoleh dari penyaringan dan pemekatan digunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak yang didapat dikumpulkan kemudian ditimbang.

Ekstrak kental sebanyak 160 g dihomogenkan dengan akuades 100 mL dan difraksinasi dengan *n*-heksana 160 mL dalam corong pisah, dikocok sampai homogen, diamkan selama 24 jam. Kemudian ambil lapisan atas (fraksi *n*-heksana), sedangkan fraksi air dimasukkan kembali kedalam corong pisah, tambahkan pelarut *n*-heksana kembali. Fraksinasi ini dilakukan tiga kali pengulangan. Fraksi yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan fraksi kental *n*-heksana dan ditimbang.

Fraksi air selanjutnya difraksinasi dengan pelarut pelarut etil asetat sebagaimana pengerjaan dengan pelarut *n*-heksana yaitu 3 x 160 mL dalam corong pisah. Homogenisasi dengan cara mengguncang secara berkala, diamkan sampai terjadi pemisahan. Kemudian ambil lapisan atas (fraksi etil asetat). Fraksi yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan fraksi kental dan ditimbang.

Sebanyak 2 g fraksi kental *n*-heksana dikolom menggunakan silika gel ukuran 70-230 mesh. Kolom dibuat dengan mensuspensikan silika gel dengan pelarut *n*-heksana, bertujuan untuk menghomogenkan dan menghilangkan kemungkinan adanya gelembung udara yang dapat mengganggu proses pemisahan. Kemudian bubuk silika ini dimasukkan ke dalam kolom kromatografi yang bagian dasarnya telah dilapisi kapas sebagai penyaring sambil diketok-ketok sampai bubuk silika padat.

Ekstrak kental kemudian dipreadsorbsi, dengan cara mencampurkan ekstrak kental dan silika gel dengan perbandingan 1:1. Preadsorbsi diawali dengan melarutkan

ekstrak kental dengan pelarut *n*-heksana, lalu dihomogenkan dengan silika. Untuk membuat jadi bubuk preadsorbsi, pelarutnya diuapkan secara *in vacuo* sehingga diperoleh campuran ekstrak kental dan silika gel berupa bubuk kering. Setelah itu dimasukkan ke dalam kolom dengan cara ditaburkan secara merata diatas bubuk silika gel yang telah padat. Selanjutnya pengelusian dilakukan menggunakan metoda peningkatan kepolaran atau *Step Gradient Polarity* (SGP), dimulai dari pelarut non polar (*n*-heksana) dilanjutkan dengan campuran pelarut *n*-heksana dan etil asetat dengan komposisi kepolaran meningkat.

Hasil kolom kromatografi yang didapat ditampung dalam vial yang telah diberi nomor, kemudian dimonitor dengan KLT. Vial-vial dengan Rf yang sama digabung dimonitor kembali dengan KLT hingga didapat pola senyawa yang bagus. Pemisahan fraksi *n*-heksana dengan kromatografi kolom berhasil didapatkan 175 vial. Penggabungan berdasarkan pola KLT-nya didapatkan 13 gabungan fraksi yang diberi label F1-F13. Semua fraksi kemudian dimonitor pola kromatografi lapis tipisnya. Fraksi F4 memperlihatkan pola pemisahan yang baik dan pada vial gabungan didapatkan butiran-butiran kristal yang kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi dan didapatkan suatu senyawa murni dengan pola KLT yang bagus berupa satu noda dengan nilai Rf 0,375 dalam eluen *n*-heksana : etil asetat (9:1). Kristal yang didapat berwarna putih kekuningan sebanyak 20 mg.

Pemisahan fraksi etil asetat dengan menggunakan kromatografi kolom dengan SiO₂ dan eluen *n*-heksana 100%, campuran *n*-heksana dan etil asetat dengan perbandingan kepolaran yang ditingkatkan bertahap serta etil asetat 100%, didapatkan 137 vial. Penggabungan vial-vial ini berdasarkan pola kromatografi lapis tipisnya didapatkan 9 fraksi gabungan yang diberi label S1 sampai dengan S9). Hanya fraksi S3 yang memperlihatkan pola noda yang bagus pada hasil KLT dengan nilai Rf 0,4 dalam pelarut *n*-heksana : etil asetat (9:1). Kristal yang didapat berwarna kuning dengan berat 12 mg.

Pembuatan Suspensi Ekstrak. Ekstrak metanol disuspensikan dengan Na CMC dalam akuades Na CMC ditaburkan diatas air panas didalam lumpang, menggunakan air sebanyak 20 kali berat Na CMC. Biarkan 15 menit hingga Na CMC mengembang lalu gerus, kemudian ekstrak metanol dimasukkan sedikit demi sedikit ke dalam lumpang sambil digerus homogen dan dicukupkan dengan akuades sampai 10mL.

Penentuan Dosis. Dosis untuk senyawa uji ekstrak metanol daun *N. speciosa* Horan terhadap tikus putih betina ditetapkan secara kelipatan yaitu 250; 500 dan 1000 mg/kgBB secara oral. Volume penyuntikan 1% dari berat badan hewan, hitung berdasarkan rumus Mallon (Thompson, 1985).

Uji Efek Anti-inflammasi. Hewan percobaan dipuaskan dahulu selama satu malam. Hewan dikelompokkan menjadi 5 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 3 ekor tikus putih betina dengan berat badan 150-200 gram. Timbang masing-masing hewan, catat berat badannya dan ukur volume kaki tikus dengan alat *pletysmograf* sebagai volume awal (V_0). Kelompok I beri Na CMC 1% dan diberikan sebanyak 1% dari berat badan secara oral sebagai kontrol negatif. Kelompok II diberi natrium diklofenak 13,5 mg/kgBB secara oral sebagai kontrol positif. Kelompok III, IV, V diberi ekstrak metanol daun *N. speciosa* Horan dengan dosis (250; 500 dan 1000 mg/kgBB) secara oral. Setelah 30 menit hewan diinduksi dengan karagen 1% secara sub-plantar. Volume udem diukur pada jam ke- 1, 2, 3, 4, dan 5 dengan menggunakan alat *pletysmograf*.

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{E_c - E_t}{E_c} \times 100\%$$

Analisa Data. Data yang diperoleh dari hasil pengamatan diolah menggunakan analisis statistic, *analysis of variance* (ANOVA) dua arah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengeringan tiga kg daun *N. speciosa* Horan segar dihasilkan simplisia kering sebanyak 750 g. Hasil pemeriksaan kandungan metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun *N. speciosa* Horan menunjukkan adanya senyawa dari golongan flavonoid, fenolik, dan saponin.

Ekstrak metanol yang diperoleh dari 750 g sampel kering adalah 167,5 g, berat fraksi kental *n*-heksana yang diperoleh dari 160 g ekstrak metanol adalah sebanyak 77 g, dan berat

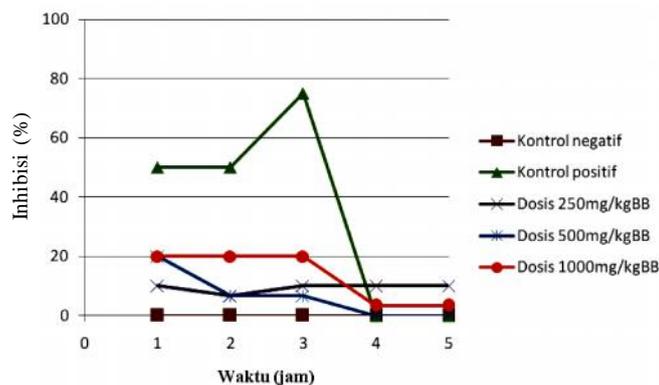
fraksi etil asetat yang diperoleh dari 160 g ekstrak metanol adalah sebanyak 67 g.

Dari hasil pemurnian fraksi kental *n*-heksana secara kromatografi kolom dan rekristalisasi didapatkan suatu senyawa murni dari fraksi F4 yang mempunyai satu noda dengan R_f 0,375 dalam eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1). Senyawa murni yang didapat berupa kristal yang berwarna putih kekuningan seberat 20 mg dengan titik lelehnya 55–57°C, dan dari fraksi kental etil asetat berhasil juga didapatkan suatu senyawa murni yang berasal dari fraksi S3 yang mempunyai satu noda bulat dengan nilai R_f 0,4 dalam eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1). Senyawa murni yang didapat berupa kristal berwarna kuning seberat 15 mg dengan titik lelehnya 68–69°C.

Dari grafik pengujian aktivitas anti-inflammasi didapatkan hubungan antara waktu dengan persen inhibisi (Gambar 1). Hal ini terlihat pada persen inhibisi maksimal pada kelompok dosis 250 mg/kgBB pada jam ke-1, jam ke-3, jam ke-4 dan jam ke-5 sebesar 10%, dosis 500mg/kgBB pada jam ke-1 sebesar 20% dan pada dosis 1000mg/kgBB pada jam ke-1, jam ke-2 dan jam ke-3 sebesar 20%.

Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa tikus percobaan mengalami peningkatan volume kaki akibat pemberian karagenan, yang ditandai dengan bertambahnya volume kaki tikus berupa udem. Karagenan merupakan suatu zat asing (antigen) yang bila masuk ke dalam tubuh akan merangsang pelepasan mediator radang seperti histamin sehingga menimbulkan radang akibat antibodi tubuh bereaksi terhadap antigen tersebut untuk melawan pengaruhnya (Gambar 2).

Sebagai kontrol positif digunakan natrium diklofenak dengan dosis 13,5 mg/kgBB yang disuspensikan dengan Na CMC 1% (Hanani, 2008). Natrium diklofenak termasuk golongan NSAID dengan aktifitas antiinflamasi, analgesik dan antipiretik. Mekanisme kerja dengan menghambat enzim



Gambar 1. Grafik persen inhibisi terhadap waktu efek antiinflammasi

siklo-oksigenase sehingga pembentukan prostaglandin menjadi terhambat. Natrium diklofenak merupakan derivat fenilasetat yang kuat anti radangnya dengan efek samping yang relatif ringan dibandingkan obat jenis lainnya (Ganiswarna, 2005). Na CMC dipilih sebagai pensuspensi karena mempunyai toksisitas yang rendah dan terdispersi di dalam air dibandingkan dengan pensuspensi lain (Raymond dan Paul, 2003). Fungsi kontrol positif adalah sebagai pembanding apakah zat uji bisa berefek sama dengan obat antiinflamasi yang digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan fungsi kontrol negatif adalah untuk mengetahui apakah pensuspensi yang digunakan mempunyai efek terhadap hewan uji.

Pada tikus kontrol positif, radang timbul satu jam setelah pemberian karagen. Namun, radang yang ditimbulkan karagenan dapat dikurangi dengan pemberian Na diklofenak 13,5 mg/kgBB tikus, sehingga volume kaki tikus menjadi berkurang, bahkan radang yang dialami tikus hampir hilang pada jam ke-3, yang dapat diperlihatkan dengan persentase inhibisi maksimal sebesar 75%.

Berdasarkan perhitungan statistik ANOVA dua arah terhadap variabel dosis menyatakan bahwa hasil persentase inhibisi pada tikus percobaan memperlihatkan antara kontrol negatif dengan kelompok dosis 250 dan 1000 mg/kgBB signifikan dengan $p < 0,05$, artinya pada dosis 250 dan 1000 mg/kgBB tersebut memiliki efek antiinflamasi. Antara kontrol negatif dengan kelompok dosis 500mg/kgBB tidak signifikan dengan $p > 0,05$, artinya bahwa pada dosis tersebut tidak menunjukkan adanya efek antiinflamasi.

Berdasarkan data statistik ANOVA dua arah terhadap variabel waktu dimana pada jam ke-1 tidak berbeda nyata dengan jam ke-2, jam ke-2 tidak berbeda nyata dengan jam ke-3. Jam ke-3 berbeda dengan jam ke-4, jam ke-4 tidak berbeda nyata dengan jam ke-5.

Menurut Wilmana (1995), absorpsi Na diklofenak berlangsung cepat dan lengkap. Obat ini terikat 99% pada protein plasma dan mengalami *first-pass effect* sebesar 40-50%.

KESIMPULAN

Isolasi dan pemurnian senyawa murni dari tumbuhan Puwar Kincung, *N. speciosa* Horan berhasil diisolasi dua senyawa murni F4 berupa kristal berwarna putih sebanyak 20 mg dengan nilai $R_f 0,375$ dalam eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1) dengan titik lelehnya 55–57°C. Senyawa kedua diberi label S3, berupa kristal berwarna kuning sebanyak 15 mg dengan nilai $R_f 0,4$ dalam eluen *n*-heksana : etil asetat (9:1) dan titik lelehnya 68–69°C.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antiinflamasi yang telah dilakukan terhadap ekstrak metanol tumbuhan ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun *N. speciosa* Horan yang diujikan pada tikus putih betina pada dosis (250 dan 1000)mg/kgBB mempunyai efek sebagai antiinflamasi ($p < 0,05$), tetapi pada dosis 500mg/kgBB tidak memiliki efek sebagai antiinflamasi ($p > 0,05$).

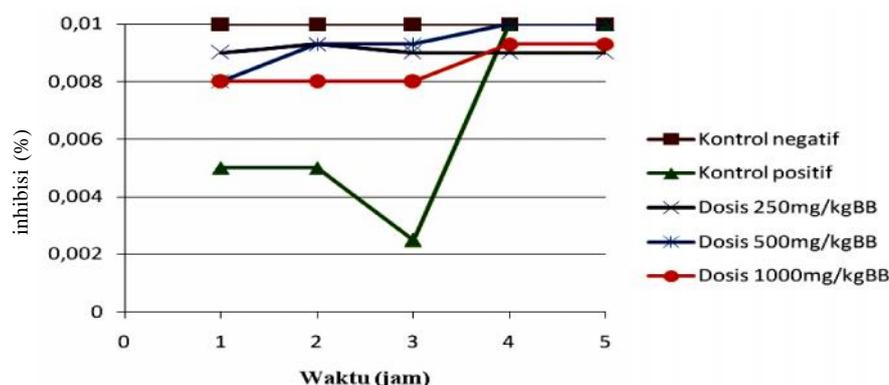
Penelitian ini masih perlu dilanjutkan untuk menguji aktivitas anti-inflamasi semua fraksi dan kedua senyawa murni yang telah diisolasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Nurainas dari Herbarium Universitas Andalas (ANDA) untuk identifikasi spesimen penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Ganiswarna, S.G. 2005. *Farmakologi Dan Terapi* edisi IV, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Jakarta: Universitas Indonesia.
- Hanani, E. 2008. Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* linn.) Pada Tikus Putih Jantan, *Laporan Penelitian*, Jakarta: Universitas Indonesia.



Gambar 2. Grafik volume udem dari waktu kewaktu selama pengamatan uji antiinflamasi

- Jachak, S.M. 2006. Cyclooxygenase Inhibitory Natural Product: Current Status. *Current Medicinal Chemistry*, **13**, 659-678.
- Kress, W.J, Prince. L.M. and William, K.J. 2002. The Phylogeny and a New Classification of The Gingers (Zingiberaceae): Evidence from Molecular Data. *American Journal of Botany*, **89(11)**, 1682–1696.
- Mulianingsih, L. 2004. *Turunan Flavonoid dari Nicolaia speciosa* Horan, *Organic chemistry: Macromolecules Chemistry, Thesis Magister Kimia*, Bandung: ITB.
- Park, B.K., Heo, M.Y., Park, H. and Kim, H.P. 2001. Inhibition of TPA-Induced Cyclooxygenase-2 Expression and Skin Inflammation In Mice By Wogonin, A Plant Flavone from *Scutellaria Radix*, *European Journal of Pharmacology*, **425**, 153-157.
- Raymond, C.R. and Paul, S., 2003, *Handbook Of Pharmaceutical Excipient*, Fourth Edition, USA: *Pharmaceutical Press*.
- Thompson, E.B. 1985. *Drugs Bioscreening Fundamental of Drug, Evaluation Technique in Pharmacology*, New York: Graceway Publishing Compan.
- Willams, C.A. and Harborne, J.B. 1977. The leaf flavonoids of the Zingiberales. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5(3)**, 221-229.
- Wilmana, P.F. 1995. *Analgesik-Antipiretik Antiinflamasi Non steroid dan Obat Pirai*, dalam Ganiswarna, S.G., (Editor), 1995, *Farmakologi dan Terapi*, Edisi Keempat, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Jakarta: Universitas Indonesia. Hal 207-208.