

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Bahan

Pada penelitian ini hal yang pertama dilakukan adalah pengumpulan bahan baku berupa rimpang Bangle Hantu segar yang diperoleh dari Kebun Percobaan Manoko Lembang, Bandung Barat, Jawa Barat. Kebenaran jenis spesies dari tanaman Bangle Hantu telah dibuktikan melalui surat keterangan determinasi dari Herbarium Bandungense Sekolah Institut Teknologi Hayati (SITH, ITB). Berdasarkan hasil dari determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang diuji merupakan Bangle Hantu dengan spesies (*Zingiber ottensii* Val.).

VI.1.1 Pembuatan Simplisia

Proses pembuatan simplisia dilakukan dengan beberapa tahapan. Pertama, dilakukan tahapan sortasi basah dengan cara memisahkan rimpang Bangle Hantu dari kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya seperti bagian tanaman yang busuk, tanah, kerikil, rumput serta pengotor lainnya. Kedua, dilakukan pencucian dengan air bersih yang mengalir agar dapat menghilangkan tanah dan faktor pengotor lainnya yang masih melekat pada rimpang. Ketiga, rimpang dirajang atau diiris tipis menjadi bagian-bagian kecil untuk memperluas luas permukaan rimpang agar dapat mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya dilakukan pengeringan rimpang, dengan menggunakan oven bersuhu 40°C. Tujuan pengeringan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu lama. Kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan atau bagian gosong pada simplisia

yang telah dikeringkan. Simplisia disimpan dalam wadah tertutup rapat dan tidak lembab.

VI.2 Pembuatan Ekstrak

Serbuk rimpang Bangle Hantu sebanyak 3,5 g dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi pada suhu ruangan selama 3 kali 24 jam dengan menggunakan pelarut etanol 70% karena dapat mengikat semua jenis senyawa secara umum yang terkandung dalam sampel selain itu juga pelarut etanol memiliki sifat yang mampu melarutkan hampir semua zat karena merupakan pelarut universal.

Setelah diperoleh ekstrak cair, kemudian dilakukan proses pemekatan menggunakan *rotary vaporator* pada suhu 40°C dan tekanan 175 mBar. Ekstrak kental yang diperoleh dari hasil pemekatan dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel VI. 1 Rendemen Ekstrak *Zingiber ottensii* Val.

Ekstrak	Bobot Ekstrak (gram)	Rendemen (%)
Rimpang	269,03	7,69

Selanjutnya ekstrak kental rimpang *Zingiber ottensii* Val. yang telah kental dilakukan fraksinasi.

VI.3 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan suatu senyawa berdasarkan kepolarannya. Fraksinasi dilakukan dengan metode Ekstraksi Cair-cair (ECC). Metode Ekstraksi Cair-cair dilakukan berdasarkan partisi dimana adanya dua fase berupa dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa tertentu yang dipisahkan akan terpisah

menurut kesesuaian sifat dari cairan pelarut. Ekstrak kental rimpang Bangle Hantu sebanyak 210 gram di fraksinasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang bertingkat. Dari fraksinasi sampel rimpang didapatkan 4 fraksi yaitu fraksi heksana, fraksi etil asetat, fraksi butanol, dan fraksi air yang kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental.

Pada tabel VI.2 diperoleh hasil rendemen fraksi kental yang berbeda-beda tergantung terhadap kelarutan senyawa metabolit sekunder yang tertarik oleh pelarut tertentu pada saat proses fraksinasi.

Tabel VI. 2 Hasil Rendemen Fraksi

Bagian Tanaman	Fraksi	Bobot kental (gram)	Rendemen (%)
Rimpang	Heksana	5,89	2,80
	Etil asetat	4,3907	2,09
	Butanol	67,1809	31,99
	Air	131,9344	62,83

Hasil rendemen fraksi dapat dilihat pada tabel VI.2, hasil rendemen fraksi menunjukkan bahwa yang paling tinggi yaitu pada fraksi air, hal ini menunjukkan bahwa banyak senyawa yang bersifat polar.

VI.4 Karakteristik Mutu Simplisia

VI.4.1 Parameter Non Spesifik

Karakterisasi simplisia dilakukan untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan. Hasil karakterisasi simplisia rimpang Bangle Hantu dapat dilihat pada tabel VI. 3.

Tabel VI. 3 Karakterisasi Simplisia Rimpang Bangle Hantu

Parameter	Hasil (%)
Abu Total	6,60
Abu Tidak Larut Asam	2,32
Sari Larut Air	10,75
Sari Larut Etanol	8,73
Susut Pengeringan	9,85

Berdasarkan tabel VI.3 menunjukkan bahwa kadar abu total yang diperoleh sebesar 6,60%, dimana pemeriksaan ini bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan mineral baik fisiologis maupun non fisiologis.

Penetapan kadar sari bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa dalam simplisia yang dapat tersari dalam pelarut tertentu. Nilai kadar sari larut air yang didapat yaitu 10,75% dan lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar sari larut etanol yaitu 8,73%. Hal ini menunjukkan tingginya senyawa yang larut dalam air dibandingkan senyawa yang larut dalam etanol.

Pada susut pengeringan diperoleh nilai sebesar 9,85%. Susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan.

VI.4.2 Parameter Spesifik

Pada penetapan parameter spesifik bertujuan untuk memberikan identitas obyektif. Parameter spesifik meliputi Uji makroskopik, organoleptik.

1. Uji Makroskopik dan Organoleptik

1.1 Uji Makroskopik dan Organoleptik Rimpang Segar Bangle Hantu



Gambar VI. 1 Rimpang Segar Bangle Hantu

Tabel VI. 4 Hasil Pemeriksaan Rimpang Segar Bangle Hantu

Pengamatan	Hasil Pengamatan
Bentuk	Hampir bundar sampai lonjong tidak beraturan dan padat keras
Warna	Ungu kecoklatan
Bau	Khas
Ukuran	P : 12 cm dan L : 3 cm

1.2 Uji Makroskopik dan Organoleptik Simplisia Rimpang Bangle Hantu



Gambar VI. 2 Simplisia Rimpang Bangle Hantu

Tabel VI. 5 Hasil Pemeriksaan Simplisia Rimpang Bangle Hantu

Pengamatan	Hasil Pengamatan
Bentuk	Bundar dan kering
Warna	Ungu
Bau	Khas
Ukuran	P : 2,5 cm dan L : 2 cm

VI.5 Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam dalam simplisia rimpang Bangle Hantu. Hasil penapisan fitokimia rimpang Bangle Hantu dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel VI. 6 Penapisan Fitokimia Rimpang Bangle Hantu

Golongan Senyawa	Kesimpulan
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin	-
Kuinon	-
Steroid/ Triterpenoid	+

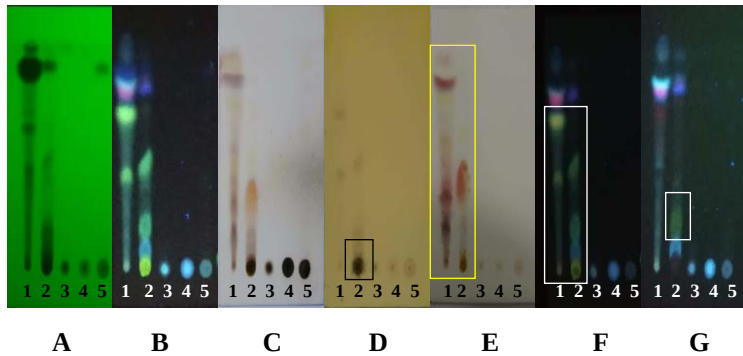
Keterangan : (+) = mengandung senyawa yang diuji

(-) = tidak mengandung senyawa yang diuji

VI.6 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

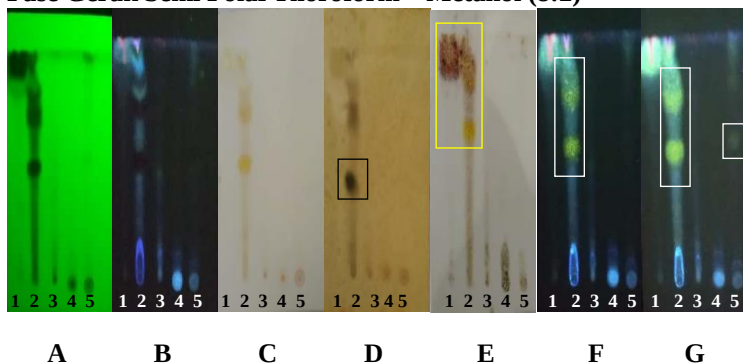
Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak dan fraksi secara kualitatif menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase geraknya menggunakan tiga eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fase gerak non polar menggunakan perbandingan pelarut heksana-etil asetat (7:3), fase gerak semipolar menggunakan kloroform-metanol (8:2), fase gerak polar menggunakan BAW (Butanol-Asam Asetat-Air) (4:1:5). Pengamatan dilakukan di bawah lampu UV 254 nm, UV 365 nm dengan penampak bercak yang digunakan yaitu : H₂SO₄ 10%, AlCl₃ 5%, Sitroborat, FeCl₃ 10% dan Anisaldehyd.

Fase Gerak Non Polar Heksana : Etil Asetat (7:3)



Gambar VI. 3 : Kromatogram ekstrak dan fraksi rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.) dengan fase gerak nonpolar, fase diam silika gel F245 fase gerak heksana – etil asetat (7:3), fraksi heksana (1), fraksi etil asetat (2), fraksi butanol (3), fraksi air (4), ekstrak rimpang Bangle Hantu (5) pemantauan UV 254 nm (A), pemantauan UV 366 nm (B), penampak bercak H_2SO_4 10% (C), penampak bercak FeCl_3 10% (D), penampak bercak Anisaldehyd (E), penampak bercak AlCl_3 5% (F) dan penampak bercak Sitroborat (G).

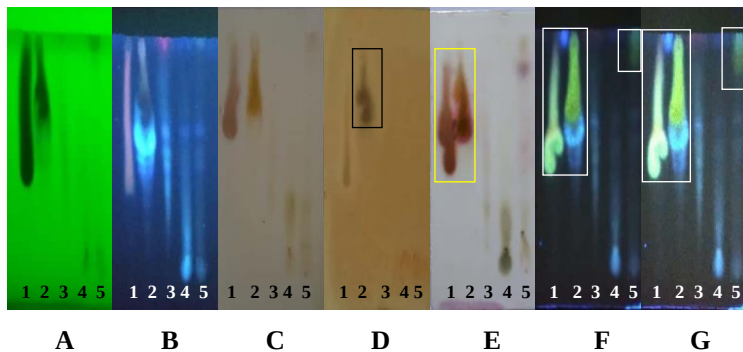
Fase Gerak Semi Polar Kloroform – Metanol (8:2)



Gambar VI. 4 : Kromatogram ekstrak dan fraksi rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.) dengan fase gerak

semi polar, fase diam silika gel F245 fase gerak kloroform - metanol (8:2), fraksi heksana (1), fraksi etil asetat (2), fraksi butanol (3), fraksi air (4), ekstrak rimpang Bangle Hantu (5) pemantauan UV 254 nm (A), pemantauan UV 366 nm (B), penampak bercak H_2SO_4 10% (C), penampak bercak FeCl_3 10% (D), penampak bercak Anisaldehyd (E), penampak bercak AlCl_3 5% (F) dan penampak bercak Sitroborat (G).

Fase Gerak Polar BAW (Butanol – Asam Asetat – Air) (4:1:5)



Gambar VI. 5 : Kromatogram ekstrak dan fraksi rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.) dengan fase gerak polar, fase diam silika gel F₂₄₅ fase gerak BAW (Butanol – Asam Asetat – Air) (4:1:5), fraksi heksana (1), fraksi etil asetat (2), fraksi butanol (3), fraksi air (4), ekstrak rimpang Bangle Hantu (5) pemantauan UV 254 nm (A), pemantauan UV 366 nm (B), penampak bercak H_2SO_4 10% (C), penampak bercak FeCl_3 10% (D), penampak bercak Anisaldehyd (E), penampak bercak AlCl_3 5% (F) dan penampak bercak Sitroborat (G).

Pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan KLT menunjukkan adanya spot kuning pada penyemprotan menggunakan pereaksi semprot AlCl_3 dan sitroborat menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada fraksi heksana, etil asetat, dan ekstrak. Spot paling jelas terdapat

pada fase gerak semi polar dan polar. Penyemprotan dengan pereaksi FeCl_3 menunjukkan adanya spot hitam terutama didaerah penotolan menunjukkan adanya senyawa fenol pada fraksi etil asetat. Penyemprotan dengan pereaksi anisaldehyd menunjukkan adanya spot berwarna ungu dan orange menunjukkan adanya senyawa terpenoid pada fraksi heksana dan fraksi etil asetat.

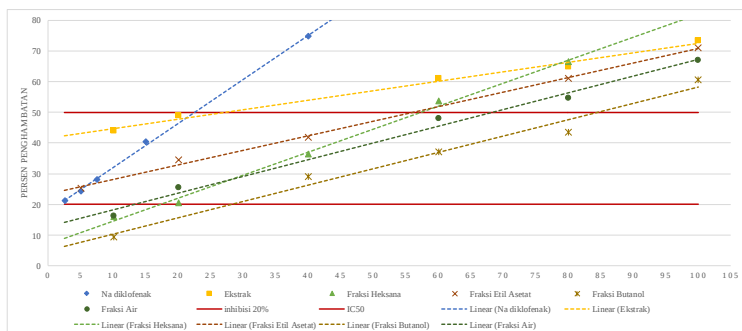
VI.7 Pengujian Antiinflamasi dari Ekstrak dan Fraksi Rimpang Bangle Hantu

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in-vitro* dari senyawa aktif menggunakan metode inhibisi denaturasi protein, dimana akan mengalami denaturasi pada saat dipanaskan. Hal ini yang jadi penanda dimana albumin mengalami kerusakan pada saat diinduksi panas sehingga oleh tubuh dianggap sebagai bahan asing oleh karena itu tubuh melakukan perlawanan yaitu melalui mekanisme inflamasi. Hal ini karena, denaturasi protein pada jaringan adalah salah satu penyebab inflamasi. Panas dapat mempengaruhi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar karena panas meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul yang menyusun protein bergerak sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan hidrogen. Selain itu, pemanasan akan membuat protein berubah kemampuan mengikat airnya. Energi panas akan mengakibatkan terputusnya interaksi non-kovalen yang ada pada struktur alami protein tetapi tidak memutuskan ikatan kovalennya yang berupa ikatan peptida (Ingle *et al.*, 2011).

Metode uji antiinflamasi yang digunakan mengacu pada jurnal Williams *et al.* (2008), untuk melihat kemampuan dari senyawa metabolit sekunder Bangle Hantu dalam menghambat proses

denaturasi protein dilihat dari penghambatan denaturasi protein dan dengan menentukan besarnya nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration* 50%). Potensi penghambatan denaturasi protein diketahui dengan pengukuran serapan secara spektrofotometri *UV-Visibel*. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat dijadikan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat (Verma *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran penghambatan denaturasi ekstrak dan fraksi dari rimpang Bangle Hantu dan sebagai kontrol digunakan natrium diklofenak. Dari hasil pengukuran didapatkan data absorbansi kemudian dihitung persentase inhibisi. Persentase inhibisi adalah kemampuan suatu sampel untuk menghambat denaturasi protein yang didapatkan dari perbandingan serapan antara absorbansi ekstrak, fraksi heksana, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air dan natrium diklofenak.



Gambar VI. 6 Penghambatan Denaturasi Protein

Dari data persen inhibisi rata-rata larutan kontrol positif (natrium diklofenak), ekstrak dan fraksi rimpang Bangle Hantu dapat diketahui

bahwa larutan kontrol positif pada konsentrasi 2,5 ppm sudah dapat menghambat denaturasi protein. Penghambatan denaturasi protein pada ekstrak sudah terjadi pada konsentrasi dibawah 10 ppm dan pada fraksi etil asetat mulai ditunjukkan pada konsentrasi 5 ppm, sedangkan penghambatan denaturasi protein pada fraksi heksana dan fraksi air ditunjukkan pada konsentrasi 20 ppm kemudian pada fraksi butanol penghambatan denaturasi protein mulai terlihat pada konsentrasi 40 ppm. Berdasarkan data tersebut, maka potensi penghambatan denaturasi protein yang dimiliki oleh ekstrak dan fraksi etil asetat lebih besar dibandingkan dengan fraksi heksana, fraksi butanol dan fraksi air. Tetapi, ekstrak dan fraksi etil asetat memiliki potensi penghambatan denaturasi protein lebih kecil daripada larutan kontrol positifnya. Dari hasil % inhibisi yang diperoleh, maka dapat dihitung nilai IC_{50} dari masing-masing sampel yang dapat dilihat pada (lampiran 4 dan tabel VI. 7).

Tabel VI. 7 Nilai IC_{50} Natrium Diklofenak, Ekstak dan Fraksi Rimpang Bangle Hantu

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Natrium diklofenak	22,57
Ekstrak	27,17
Fraksi Heksana	57,31
Fraksi Etil asetat	56,08
Fraksi Butanol	84,59
Fraksi Air	68,33

Perhitungan nilai IC_{50} diperoleh dengan cara memplotkan konsentrasi dengan persen inhibisi sehingga diperoleh nilai IC_{50} . Dari gambar VI. 7 menunjukkan bahwa ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi heksana memiliki aktivitas yang kuat dibandingkan dengan sampel lainnya,

serta hampir mendekati dengan penghambatan dari kontrol positif (natrium diklofenak).

Pada hasil penapisan fitokimia rimpang Bangle Hantu memiliki senyawa flavonoid, saponin dan steroid. Belum diketahui pasti mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat denaturasi protein, tetapi Nijveldt (2001) menyatakan bahwa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dari sel inflamasi sehingga menyebabkan tidak terbentuknya jalur lipooksigenase dan jalur siklooksigenase (Winarti, 2011).

Denaturasi protein adalah proses dimana protein kehilangan struktur tersier dan struktur sekunder dengan penerapan tekanan eksternal atau senyawa, seperti asam atau basa kuat, garam anorganik terkonsentrasi, pelarut organik atau panas. Kebanyakan protein biologis kehilangan fungsi biologisnya ketika terjadi denaturasi (Verma *et al.*, 2011). Kemungkinan adanya interaksi atau ikatan antara molekul yang terdapat dalam protein (*Bovine Serum Albumin*) terhadap molekul yang terdapat pada masing-masing ekstrak atau fraksi dari rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.) sehingga ekstrak atau fraksi tersebut dapat menghambat terjadinya denaturasi protein.

Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan fraksi rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.) mempunyai aktivitas antiinflamasi. Ekstrak rimpang Bangle Hantu, fraksi etil asetat dan fraksi heksana mempunyai aktivitas antiinflamasi yang lebih kuat dengan nilai IC_{50} berturut-turut adalah: 27,17 $\mu\text{g/mL}$; 56,08 $\mu\text{g/mL}$,

57,31 $\mu\text{g/mL}$ terhadap penghambatan denaturasi protein secara *in-vitro* dibandingkan dengan fraksi butanol dan fraksi air.