

Bab VI Hasil dan Pembahasan

VI.1 Penyiapan Bahan

Penelitian ini diawali dengan penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman dan pengolahan bahan sampai menjadi simplisia. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang kecombrang (*Etlingera elatior*) yang diperoleh dari wilayah Majalaya Kabupaten Bandung, Jawa Barat. Untuk memastikan dan meyakinkan bahwa tanaman uji yang digunakan merupakan tanaman kecombrang, maka dilakukan determinasi tanaman di Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati ITB. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman uji yang digunakan merupakan tanaman kecombrang dengan nama sinonim *Etlingera elatior* (Jack) R.M.Sm. dari family *Zingiberaceae*.

Proses pembuatan simplisia dilakukan dengan beberapa tahapan. Tahap pertama yang dilakukan adalah sortasi basah, yang bertujuan untuk memisahkan kotoran-kotoran atau bahan-bahan asing lainnya seperti tanah, kerikil, rumput serta pengotor lainnya dari rimpang kecombrang (*Etlingera elatior*). Selanjutnya dilakukan proses pencucian dengan air mengalir hingga bersih untuk menghilangkan pengotor yang masih menempel pada rimpang. Kemudian rimpang dirajang atau dipotong menjadi bagian kecil-kecil untuk memperkecil ukuran agar dapat mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya rimpang kecombrang dikeringkan menggunakan oven pada suhu 40° C. Kemudian dilakukan sortasi kering dengan cara memisahkan benda-benda asing seperti bagian-bagian tanaman yang tidak diinginkan dan pengotor lainnya yang tertinggal pada simplisia rimpang kecombrang (*Etlingera elatior*) yang telah dikeringkan. Selanjutnya simplisia

disimpan dalam wadah dan tempat tertutup dan terlindung dari cahaya matahari, dan diperoleh simplisia sebanyak 1,050 kg dengan rendemen silmplisia sebesar 7,04 %.

VI.2 Karakteristik Simplisia

VI.2.1. Parameter Nonspesifik

Karakterisasi simplisia dilakukan untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan. Parameter non spesifik meliputi penetapan kadar abu, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan, kadar sari larut air, dan kadar sari larut etanol. Hasil penetapan parameter non spesifik dapat dilihat pada tabel VI.1.

Tabel VI. 1 Hasil Penetapan Parameter Non Spesifik Ekstrak Rimpang Kecombrang (*Etlingera elatior*)

Parameter	Hasil (% ^b/_b)
Kadar Abu	8,18
Kadar Abu Larut Air	5,1
Kadar Abu Tidak Larut Asam	4,35
Susut Pengeringan	11,14
Kadar Sari Larut Air	8,22
Kadar Sari Larut Etanol	5,44

Tabel VI.1 menunjukkan hasil penetapan kadar abu, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, susut pengeringan, kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol dari simplisia rimpang kecombrang. Penetapan kadar abu total bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa anorganik yang terdapat didalam ekstrak, baik yang berasal dari internal maupun eksternal tanaman. Selain pemeriksaan kadar abu total, ditentukan juga kadar abu larut air dan kadar abu tidak larut

asam. Pemeriksaan kadar abu larut air bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan mineral berasal dari tanaman itu sendiri (internal) seperti fosfor, kalium dan nitrogen yang sebagian besar bermanfaat bagi manusia. Sedangkan untuk pemeriksaan kadar abu tidak larut asam untuk mengetahui jumlah mineral yang berasal dari luar tanaman (eksternal), bersumber dari pengotor yang berasal dari pasir atau tanah silikat.

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui batasan maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan dalam ekstrak rimpang. Hasil persentase pada susut pengeringan diperoleh sebesar 11,14 %.

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 8,22% dan lebih tinggi bila dibandingkan dengan kadar sari larut etanol yaitu 5,44%. Hal ini menunjukkan tingginya senyawa yang larut dalam air dibandingkan senyawa yang larut dalam etanol.

VI.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan besar senyawa kimia yang terkandung didalam simplisia rimpang kecombrang. Hasil yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi awal untuk mengetahui senyawa kimia apa saja yang terkandung dalam simplisia rimpang kecombrang.

Hasil penapisan fitokimia rimpang kecombrang dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel VI. 2 Hasil Skrining Fitokimia Rimpang Kecombrang
(*Etlingera elatior*)

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

Ket: (+) dideteksi terdapat senyawa

(-) dideteksi tidak terdapat senyawa

Berdasarkan hasil skrining fitokimia dapat disimpulkan bahwa rimpang kecombrang mengandung senyawa flavonoid, tanin, kuinon, saponin dan steroid/ triterpenoid.

VI.4 Pembuatan Ekstrak

Selanjutnya 1,05 kg simplisia kering rimpang kecombrang (*Etlingera elatior*) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% pada suhu ruangan selama 3x24 jam. Ekstrak cair yang didapatkan kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary vaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 175mbar sampai menjadi ekstrak kental. Ekstrak kental rimpang kecombrang didapat sebanyak 57,15 gram dengan rendemen ekstrak sebanyak 11,43%.

VI.5 Pembuatan Fraksi

Selanjutnya dilakukan fraksinasi untuk memisahkan komponen senyawa dalam ekstrak berdasarkan kepolaran. Ekstrak kental

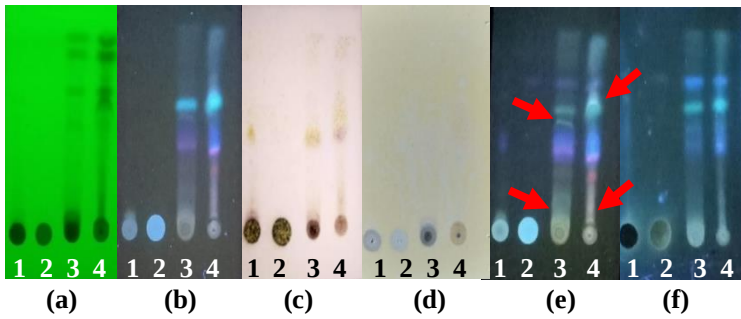
sebanyak 50 g dilarutkan dalam metanol 20% dalam air lalu diekstraksi cair-cair dalam corong pisah dengan pelarut n-heksana dan etil asetat. Ketiga fraksi dipekatkan dengan *rotary vaporator* dan diperoleh fraksi kental.

Tabel VI. 3 Hasil Rendemen Fraksi Rimpang Kecombrang (*Etlingera elatior*)

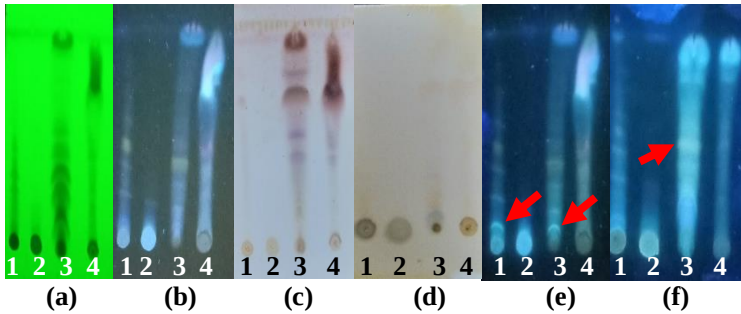
Fraksi	Fraksi (gram)	Rendemen (%)
Fraksi n-Heksan	1,12	2,24
Fraksi Etil Asetat	1,40	2,80
Fraksi Metanol-Air	26,89	53,79

VI.6 Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

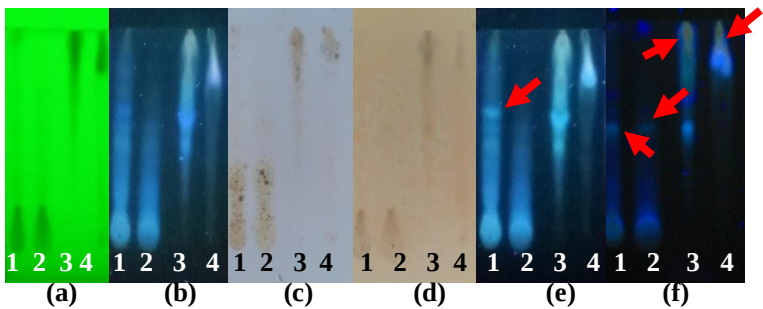
Pemantauan ekstrak dan fraksi dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak dan fraksi secara kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak menggunakan tiga eluen dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Fase gerak non polar menggunakan perbandingan pelarut n-heksan-etil asetat (8:2), fase gerak semipolar menggunakan kloroform-metanol (9:1), fase gerak polar menggunakan BAW. Pengamatan dilakukan di bawah lampu uv 254 nm, uv 365 nm, dan dengan menggunakan penampak bercak H₂SO₄ visual, FeCl₃ visual, sinar UV 365 nm AlCl₃ dan sinar UV 365 nm Sitroborat.



Gambar VI. 1 Fase gerak non polar n-Heksan:Etil Asetat (8:2) dan Fase diam: silika gel F254



Gambar VI. 2 Fase gerak semi polar Kloroform:Metanol (9:1) dan Fase diam: silika gel F254



Gambar VI. 3 Fase gerak polar BAW dan Fase diam: silika gel F254

Keterangan: Kromatogram lapis tipis ekstrak dan fraksi (1) ekstrak rimpang, (2) fraksi metanol:air, (3) fraksi etil asetat (4) fraksi n-heksan. (a) sinar UV 254 nm, (b) sinar UV 365nm, (c) penampak bercak H_2SO_4 10%, (d) penampak bercak FeCl_3 10%, (e) penampak bercak AlCl_3 5% sinar UV 365 nm, (f) penampak bercak sitroborat sinar UV 365 nm.

Pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel F_{254} dan fase gerak yang sesuai. Penampak bercak H_2SO_4 10% sebagai penampak bercak universal menunjukan adanya senyawa pada ekstrak dan fraksi rimpang kecombrang dengan ditunjukkannya bercak coklat. Penyemprotan dengan pereaksi semprot FeCl_3 menunjukkan adanya spot hitam menunjukkan adanya senyawa fenol. Adanya spot kuning pada penyemprotan menggunakan pereaksi semprot AlCl_3 menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ekstrak dan fraksi rimpang kecombrang. Penampak bercak sitroborat untuk mengidentifikasi adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan hasil positif yaitu dengan adanya bercak berfluoresensi kuning kehijauan saat dilihat dibawah sinar UV 365 nm. Diketahui bahwa salah satu kegunaan dari flavonoid adalah sebagai antiinflamasi (Nugraha, 2005).

VI.7 Pengujian Antiinflamasi Metode Stabilitas Sel Darah Merah

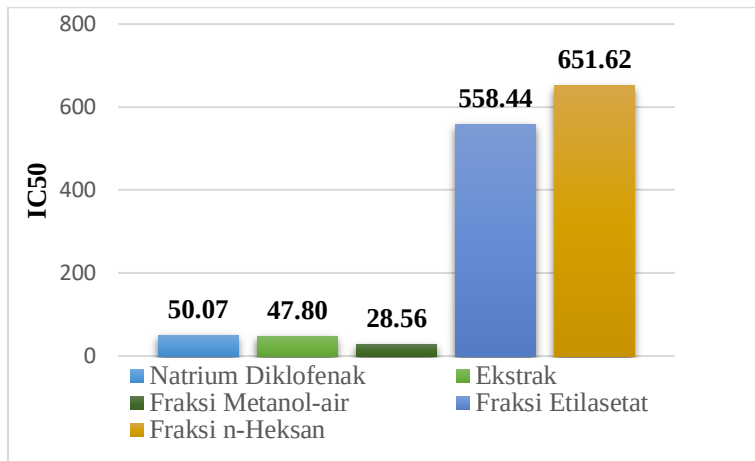
Uji aktivitas antiinflamasi yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu dengan metode stabilitas membran sel darah merah. Stabilisasi membran sel darah merah telah digunakan sebagai metode untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan membran sel darah merah mirip dengan membran lisosom (Shenoy *et al.*, 2010) yang dapat mempengaruhi proses inflamasi, sehingga

stabilisasi membran lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi, dengan cara mencegah pelepasan enzim dari dalam lisosom selama proses inflamasi. Dengan demikian, kestabilan membran sel darah merah terhadap gangguan yang diinduksi larutan hipotonik, dapat juga digunakan sebagai ukuran untuk mengetahui stabilisasi membran lisosom (Kumar *et al.*, 2012).

Sampel uji yang memiliki aktivitas antiinflamasi dilihat dari penurunan absorbansi hemoglobin yang terdeteksi pada campuran larutan uji, yaitu semakin kecilnya serapan yang terdeteksi pada campuran larutan uji berarti membran sel darah merah semakin stabil dan sedikit mengalami lisis (Lutfiana, 2013). Penurunan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer visible dengan panjang gelombang 560 nm dengan Na diklofenak sebagai kontrol positif (Kumar *et al.*, 2012). Na diklofenak digunakan sebagai kontrol positif merupakan obat antiinflamasi non steroid yang memiliki aktivitas antiinflamasi yang besar karena dapat mencegah pelepasan (bukan sintesis) mediator antiinflamasi (Gilman *et al.*, 1985)

Setelah dilakukan pengukuran absorbansi kemudian dihitung persen inhibisinya. Persen inhibisi adalah kemampuan suatu sampel untuk menghambat membran sel darah merah yang didapatkan dari perbandingan serapan antara absorbansi larutan uji dengan absorbansi kontrol negatif (Oyedapo, 2010). Sedangkan parameter yang digunakan untuk uji aktivitas antiinflamasi adalah *inhibition concentration* (IC_{50}), tujuannya untuk memperoleh konsentrasi sampel yang dapat menstabilkan membran sel darah merah sebesar 50% dibandingkan dengan kontrol positif. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti

semakin besar aktivitas antiinflamasinya. Gambar 6.4 menunjukkan hasil perhitungan nilai IC_{50} dari Na diklofenak sebagai kontrol positif sebesar 50,07 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan ekstrak etanol dan fraksi metanol-air memiliki aktivitas antiinflamasi yang paling baik dengan nilai IC_{50} 47,80 $\mu\text{g/mL}$ dan 28,56 $\mu\text{g/mL}$.



Gambar VI. 4 Perbandingan Aktivitas Antiinflamasi dari Natrium diklofenak, Ekstrak rimpang kecombrang, fraksi metanol-air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan.

Hasil penelitian Muralidhar *et al* (2010) menunjukkan bahwa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *Butea monosperma*, yaitu Genistein dan Prunetine memiliki kemampuan menghambat kerja enzim siklooksigenase dan lipooksigenase dalam mengkonversi asam arakidonat menjadi prostaglandin dan leukotrien yang merupakan mediator inflamasi. Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa ada hubungannya antara senyawa flavonoid dengan kemampuannya dalam menstabilkan membran (Sankari *et al.*, 2009). Flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi

dengan melindungi membran eritrosit terhadap kerusakan membran sehingga menyebabkan hemolisis karena flavonoid dapat menghambat mediator inflamasi dan radikal bebas (Kasolo *et al.*, 2010).

Senyawa flavonoid akan berperan dalam melindungi membran eritrosit dari larutan hipotonik. Efek dari larutan hipotonik tersebut berkaitan dengan banyaknya cairan yang masuk ke dalam membran eritrosit, sehingga mengakibatkan pecah membran eritrosit yang disebut dengan hemolisis. Dimana senyawa flavonoid yang terdapat dalam sampel tersebut akan berinteraksi dengan larutan hipotonik yang diinduksi sehingga menghambat aktivitas perusak membrannya (Sankari *et al.*, 2009).