

## **Uji Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein**

### **Anti-Inflammatory Activity of Combination of Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) and Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) Leaf Extracts with Protein Denaturation Inhibition Method**

Tri Mulyani<sup>1\*</sup>, Siswa Setyahadi<sup>1,2</sup>, Agung Eru Wibowo<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila

Jl. Raya Lenteng Agung, Srengseng Sawah, Jakarta Selatan 12460, Indonesia

<sup>2</sup> Pusat Teknologi Bioindustri, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan 15314, Indonesia

<sup>3</sup> Pusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi

Kawasan PUSPIPTEK Serpong, Tangerang Selatan 15314, Indonesia

\*Corresponding author email: trimulyani2306@gmail.com

#### **ABSTRAK**

Inflamasi merupakan reaksi lokal terhadap kerusakan sel dan jaringan tubuh yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti infeksi, kimia, termal dan mekanik. Terjadinya inflamasi pada jaringan ditandai dengan timbulnya rasa panas, kemerahan, pembengkakan, dan nyeri. Proses yang berlanjut diikuti dengan perubahan struktur jaringan yang dapat menimbulkan kehilangan fungsi sehingga menyebabkan timbulnya penyakit salah satunya yaitu rheumatoid arthritis. Penanganan inflamasi pada umumnya menggunakan obat-obatan golongan antiinflamasi non steroid (AINS), dimana obat golongan tersebut banyak menimbulkan efek samping pada penggunaannya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi penggunaan ekstrak daun torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lam.) serta kombinasinya terhadap penghambatan terjadinya denaturasi protein sebagai salah satu pemicu terjadinya inflamasi. Kombinasi ekstrak etanol daun torbangun dan ekstrak etanol daun kelor dibuat dengan perbandingan kelor dan torbangun (K:T) masing-masing 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, dengan Natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Pengujian aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein. Hasil pengujian aktivitas antiinflamasi menunjukkan bahwa terdapat 3 kombinasi ekstrak memiliki nilai  $IC_{50}$  yang termasuk dalam kategori antiinflamasi kuat. Ketiga kombinasi tersebut adalah K:T 3:1, 4:1, dan 5:1 dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 74.23 ppm, 50.80 ppm, dan 74.23 ppm. Nilai  $IC_{50}$  Natrium diklofenak yang digunakan sebagai pembanding yaitu sebesar 11 ppm. Kombinasi ekstrak daun torbangun dan ekstrak daun kelor memiliki kemampuan sebagai antiinflamasi dengan metode penghambatan denaturasi protein, namun aktivitasnya lebih kecil dibandingkan Natrium diklofenak sebagai obat pembanding.

**Kata kunci:** Daun kelor, daun torbangun, inflamasi, penghambatan denaturasi protein

#### **ABSTRACT**

Inflammation is a local reaction of cells and tissues caused by various factors such as chemical, thermal, and mechanical infection. The signs of inflammation are rubor, color, dolor, tumor, and functio laesia. One of the diseases caused by inflammation is rheumatoid arthritis. Treatment of inflammation generally uses non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Many investigations said that NSAIDs have many side effects on the patient. This study aims to determine the potential use of torbangun leaf extract (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) and Moringa leaf extract (*Moringa oleifera* Lam.) and their combination for inhibiting protein denaturation as a trigger for inflammation. The combination of torbangun leaf ethanol extract and moringa leaf ethanol extract was prepared with a ratio of moringa and torbangun (K:T) 1:0, 0:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, with Diclofenac Sodium as the positive control. The anti-inflammatory activity test uses the protein denaturation inhibition method. The results of the anti-inflammatory activity test showed three combinations of extracts included in a strong anti-inflammatory category. The combinations are K:T 3:1, 4:1, and 5:1, with  $IC_{50}$  values of 74.23 ppm, 50.80 ppm, and 74.23 ppm.  $IC_{50}$  value of Diclofenac Sodium used as a comparison was 11 ppm. The combination of torbangun leaf extract and moringa leaf extract can be anti-inflammatory by inhibiting protein denaturation. Still, its activity is lower than diclofenac sodium as a comparison drug.

**Keywords:** *Inhibition of protein denaturation, inflammation, moringa leaf, Plectranthus leaf*

## Pendahuluan

Inflamasi merupakan suatu respon mekanisme perlindungan tubuh. Inflamasi didefinisikan sebagai reaksi lokal terhadap kerusakan sel dan jaringan tubuh yang disebabkan oleh berbagai faktor seperti infeksi, kimia, termal dan mekanik. Tanda terjadinya inflamasi pada jaringan ditandai dengan timbulnya rasa panas, kemerahan, pembengkakan, dan nyeri. Proses yang berlanjut diikuti dengan perubahan struktur jaringan yang dapat menimbulkan kehilangan fungsi (Robin, 2003). Proses inflamasi jika tidak diatasi dapat menimbulkan penyakit yang lebih serius, salah satunya yaitu rheumatoid arthritis (RA). Angka kejadian RA bervariasi antara satu populasi dengan yang lainnya. Jumlah penderita RA di Indonesia belum diketahui jumlahnya secara pasti, tapi data terbaru saat ini dari Perhimpunan Reumatologi Indonesia diperkirakan tidak kurang dari 1,3 juta orang yang menderita RA di Indonesia. Perhitungan tersebut berdasarkan atas angka prevalensi RA di dunia yaitu sekitar 0,5-1%, dari jumlah penduduk Indonesia yang berjumlah 268 juta jiwa pada tahun 2020 (Hidayat, 2021)

Natrium diklofenak merupakan obat golongan anti inflamasi *non steroid (AINS)* derivat asam fenil asetat yang dipakai untuk mengobati penyakit reumatik dengan kemampuan menekan tanda-tanda dan gejala-gejala inflamasi. Natrium diklofenak biasanya digunakan untuk menangani nyeri pada muskuloskeletal, seperti pada penyakit rheumatoid arthritis, osteoarthritis, spondilitis ankilosa, spondiloarthritis, dan arthritis gout (Sweetman, 2015). Efek samping Natrium diklofenak dilaporkan terjadi pada 30% penderita berupa gangguan fungsi ginjal, terjadinya komplikasi seperti hipertensi, edema, gangguan fungsi ginjal, dan pendarahan gastrointestinal (Cahyati, 2020). Efek samping yang ditimbulkan akibat penggunaan obat antiinflamasi non-steroid ini (AINS), maka orang cenderung lebih memilih alternatif menggunakan obat tradisional yang berbasis bahan alam untuk mengurangi peradangan, karena diyakini bahwa bahan alam memiliki efek samping yang lebih rendah dibanding obat kimia.

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antiinflamasi yaitu torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng). Torbangun kaya akan kandungan zat gizi mikro seperti magnesium, besi, zink, kalsium,  $\alpha$ -tocopherol, dan  $\beta$ -karoten, minyak atsiri antara lain fenol, karvakrol, isopropil o kresol dan sineol serta zat aktif seperti flavonoid dan glikosida (Chiu, 2012). Aktivitas farmakologi daun torbangun berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diantaranya adalah sebagai prekursor anti tumor dan aktivitas sitotoksik dan antiinflamasi (Rahmawati, 2015). Pada penelitian secara *in vitro* dengan metode penghambatan denaturasi protein ekstrak etanol daun torbangun menunjukkan adanya aktivitas

penghambatan denaturasi protein dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 98.286  $\mu$ g/mL (Sibuea, 2017).

Selain torbangun, Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dapat digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk mengatasi penyakit seperti rematik, kelumpuhan, epilepsi. Berbagai penelitian mengenai khasiat tanaman kelor telah banyak dilakukan, diantaranya memiliki efek antiinflamasi dan antinoseptik dari bagian daun tanaman kelor (Pal, 2016). Kelor dilaporkan memberikan aktivitas sebagai hepatoprotektif dan antibiotic. Pada penelitian lain secara *in vitro* dengan metode penghambatan denaturasi protein, ekstrak etanol daun kelor menunjukkan aktivitas penghambatan denaturasi protein dengan  $IC_{50}$  sebesar 215.9 $\pm$ 29.8  $\mu$ g/mL (Rini, 2016).

Pada penelitian ini, dilakukan kombinasi kedua ekstrak tanaman yaitu ekstrak daun torbangun dan ekstrak daun kelor dengan tujuan untuk mendapatkan daya hambat aktivitas antiinflamasi mendekati daya hambat obat pembanding. Tanaman torbangun dipilih karena selain memiliki daya antiinflamasi yang diperoleh dari kandungan flavonoidnya juga memiliki kandungan antioksidan dan zat gizi mikro yang cukup tinggi, sehingga dapat berpotensi dikembangkannya formulasi antiinflamasi. Tanaman kelor dipilih karena memiliki aktivitas antiinflamasi serta mengandung antioksidan dan kandungan gizi yang tinggi. Sehingga Ketika kedua ekstrak tanaman ini dikombinasikan akan diperoleh daya penghambatan terjadinya denaturasi protein yang lebih baik dibandingkan ekstrak tunggalnya.

## Metode Penelitian

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah seperangkat alat ekstraksi yaitu bejana maserasi, pengaduk, tutup bejana, *evaporator*, neraca analitik, mortir dan stamper, cawan porselin, gelas arloji, pipet tetes, labu ukur, *beaker glass*, mikropipet, tabung reaksi, *waterbath* (Memmert), Spektrofotometer UV-Vis 1900i (Shimadzu).

Bahan yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun torbangun dan daun kelor yang diperoleh dari perkebunan di Tawangmangu, Jawa Tengah, dan dideterminasi di Herbarium Bogoriense Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, *bovine serum albumin* (BSA, Sigma Aldrich), *Tris base*, asam asetat, NaCl, natrium diklofenak, aquadest.

### Jalannya Penelitian

#### 1. Proses ekstraksi

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi. Daun torbangun dan daun kelor yang sudah dikumpulkan dilakukan sortasi basah dengan mencuci bahan pada air yang mengalir, kemudian dikeringkan dengan

metode pengeringan tidak langsung di bawah matahari. Pengeringan dilakukan di suhu ruang dan pada ruangan yang tertutup selama 3-5 hari dan diperoleh simplisia kering. Simplisia kering kemudian diblender untuk mendapatkan serbuk simplisia. Serbuk simplisia kelor dan torbangun masing – masing ditimbang sebanyak 500 g kemudian direndam menggunakan pelarut etanol 96% selama 5X24 jam. Larutan kemudian dilakukan pengadukan setiap hari selama 10 menit. Hasil maserasi (maserat) dipisahkan dengan ampasnya, kemudian dilakukan remaserasi dengan sisa pelarut. Perbandingan serbuk dengan jumlah pelarut yang digunakan pada proses ekstraksi ini adalah 1:10. Maserat yang diperoleh ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak etanol awal (*crude extract*). Ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang untuk ditentukan rendemennya terhadap berat simplisia awal. Kemudian ekstrak awal inilah digunakan untuk pengujian selanjutnya.

## 2. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi uji kualitatif terhadap kandungan senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida. Metode pengujian yang digunakan mengacu pada *Materia Medika Indonesia (MMI)* (Depkes, 1995).

Identifikasi alkaloid, sebanyak 0,5 g ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan 5 ml HCl 2 N, dipanaskan pada penangas air. Setelah dingin, campuran disaring dan filtrat ditambahkan beberapa tetes reagen Mayer. Sampel kemudian diamati hingga terbentuk endapan putih atau keruh yang menunjukkan adanya kandungan alkaloid.

Identifikasi saponin, sebanyak 0,5 g ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan dengan 20 mL aquabides dan dikocok kemudian didiamkan selama 15-20 menit. Jika tidak ada busa maka hasilnya tidak terdapat kandungan saponin (-) dan jika busa busa lebih dari 1 cm artinya kandungan saponin lemah, jika busa tingginya 1,2 cm maka kandungan saponin lemah, dan jika busa tingginya lebih dari 2 cm maka kandungan saponinnya kuat.

Identifikasi tannin, ekstrak 0,5 g dalam cawan ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan FeCl<sub>3</sub> sebanyak 3 tetes, jika menghasilkan warna biru, biru-hitam, hijau atau biru-hijau dan endapan maka mengandung tannin.

Identifikasi fenolik, ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok dengan sedikit eter. Lapisan eter dikeringkan pada plat

tetes, ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub>. Terbentuk warna ungu biru menandakan adanya senyawa fenol.

Identifikasi flavonoid, sebanyak 0,1 g ekstrak ditambahkan 10 mL air panas kemudian saring. Sebanyak 10 mL filtrate ditambahkan 0,5 g serbuk Mg, 1 mL HCl pekat, dan 1 mL amil alkohol. Campuran dikocok kuat – kuat. Uji positif terhadap flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol.

Identifikasi triterpenoid, sebanyak 0,5 g ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan 2 ml etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan 1 mL kloroform dan 1 mL asetat anhidrida lalu didinginkan. Setelah dingin, ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Jika terjadi warna kemerahan, menunjukkan adanya triterpenoid.

Identifikasi steroid, ekstrak 0,5 g dalam tabung reaksi ditambahkan 2 mL etanol 70% kemudian diaduk, ditambahkan 2 ml kloroform, kemudian ditambahkan 2 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat dengan cara diteteskan pelan-pelan dari sisi dinding tabung reaksi. Pembentukan cincin warna merah menunjukkan adanya steroid.

Identifikasi glikosida, sebanyak 0,1 ml larutan ekstrak diuapkan di atas penangas air, dilarutkan sisa dalam 5 ml asam asetat anhidrat P. Kemudian ditambahkan 10 tetes asam sulfat P; terjadi warna biru atau hijau, menunjukkan adanya glikosida (reaksi Liebermann Burchard).

## 3. Pengujian aktivitas antiinflamasi

Metode uji antiinflamasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode uji penghambatan denaturasi protein. Metode uji ini dipilih karena sesuai untuk skrining awal pengujian aktivitas antiinflamasi secara in vitro. Beberapa langkah yang dilakukan pada pengujian aktivitas ini adalah:

Pembuatan pereaksi, pembuatan Tris Buffer Saline (TBS). Sebanyak 4,35 g NaCl dilarutkan dalam 200 ml aquadest, ditambahkan 605 mg Tris Base dicukupkan dengan air sampai 400 ml. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan asam asetat glasial hingga pH 6,3, kemudian dicukupkan dengan air sampai 500 mL. Pembuatan 0,2% BSA dalam TBS, sebanyak 0,2 g Bovine Serum Albumin (BSA) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan dengan larutan TBS hingga volume 100 mL.

Pembuatan larutan natrium diklofenak sebagai kontrol positif, natrium diklofenak sebanyak 0,025 gram dilarutkan pada labu tentukur 25 ml dan dicukupkan dengan aquadest hingga volume 25 ml, sehingga di dapat larutan induk 1000 ppm. Dari larutan induk tersebut dilakukan pengenceran ke

dalam konsentrasi 500 ppm dan 100 ppm. Dari larutan 100 ppm tersebut dibuat kedalam 5 seri konsentrasi 6.25, 12.5, 25, 50, dan 100 ppm. Kelima seri konsentrasi inilah yang digunakan sebagai kontrol positif.

Pembuatan kontrol negatif, sebanyak 500µl aquadest ditambahkan dengan larutan BSA 0,2% dalam TBS ke dalam labu tentukur hingga volume 5 mL. Pembuatan perbandingan ekstrak pada kombinasi (K : T) 1:0, 0:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1. Larutan kombinasi ini dibuat dalam pelarut air. Konsentrasi larutan induk yang digunakan adalah 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi 5 seri konsentrasi pada masing-masing kombinasi. Larutan kontrol blanko berupa aquadest.

Pengujian aktivitas antiinflamasi, sebanyak 500 µl masing-masing larutan sampel, larutan kontrol positif, dan kontrol negatif, ditambahkan larutan BSA 0,2% dalam TBS sampai volume menjadi 5 mL dan di inkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit. Masing-masing campuran tersebut kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 70°C, kemudian didinginkan dengan cara direndam dalam wadah berisi air kurang lebih 10 menit. Setelah dingin larutan divortex dan dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan instrument spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm (Tiffani, 2020).

#### Analisis Data

Data persen penghambatan denaturasi protein dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A - B}{A}$$

Dengan A = absorbansi kontrol negatif, B = absorbansi larutan uji.

Pada uji inhibisi ini, jika dihasilkan % Inhibisi > 20% dianggap memiliki daya penghambatan pada proses denaturasi protein (Yunahara, 2018). Aktivitas antiinflamasi in vitro dinyatakan dengan menentukan besarnya IC<sub>50</sub> (inhibition concentration 50). Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dengan membuat persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y). Perhitungan dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier karena hubungan antara daya hambat dan konsentrasi menghasilkan persamaan linier. Dari persamaan yang diperoleh Y = ax + b, kemudian dihitung nilai IC<sub>50</sub> nya.

Data penelitian diuji uji normalitasnya dengan uji kolmogrov-smirnov, kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas varian. Data kemudian dianalisis menggunakan metode uji one-way ANOVA menggunakan aplikasi SPSS versi 25. Analisa data tahap lanjut dilakukan untuk mengetahui kelompok

mana yang berbeda, dilakukan dengan uji *post-hoc* Duncan.

#### Hasil dan Pembahasan

Ekstrak kental daun kelor yang diperoleh pada penelitian ini sebesar 71,35 gram dan rendemen sebesar 14,27%, sedangkan ekstrak kental daun torbangun yang diperoleh sebesar 30,87 gram dan rendemen sebesar 6,17 %.

Skrining fitokimia dilakukan dengan tujuan untuk memberikan Gambaran awal komposisi kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak (DepKes, 2000). Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol daun kelor menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa kimia alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida. Kandungan alkaloid pada kelor diduga sebagai agen antiinflamasi. Sifat antiinflamasi diidentifikasi oleh senyawa pterygospermin dan kandungan alkaloid moringinine yang dapat menyebabkan konstiksi pembuluh darah, sehingga dapat meminimalisir timbulnya inflamasi terutama eritema.

Kandungan flavonoid pada ekstrak torbangun diduga sebagai agen antiinflamasi, yang bekerja dengan cara memproduksi pro inflamatori mediator yang menstimulasi sel yang berkaitan dengan inflamasi seperti limfosit, monosit, natural killer sel, neutrophil, makrofag, dan sel mastosit (Sangheeta, 2016) Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Pada pengujian aktivitas antiinflamasi ini menggunakan tiga kelompok uji yaitu kontrol negatif, kontrol positif dan larutan sampel. Pengujian penghambatan denaturasi protein menggunakan BSA sebagai proteinnya. Pada saat BSA dipanaskan maka akan terjadi denaturasi protein, karena suhu merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya denaturasi protein. BSA dilarutkan dalam TBS pH patologis (6,2-6,5). Penggunaan Tris Buffer Saline berfungsi untuk mempertahankan pH larutan. Pada penelitian ini, ketika campuran larutan BSA dan larutan uji dipanaskan pada suhu 70°C maka larutan berubah dari bening menjadi putih dan terdapat sedikit endapan. Hal ini menunjukkan terjadinya denaturasi pada larutan uji.

**Tabel 1.** Hasil skrining fitokimia

Jenis pengujian	Hasil pengujian	
	Ekstrak daun kelor	Ekstrak daun torbangun
Alkaloid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Fenolik	+	+
Flavonoid	+	+
Triterpenoid	+	+
Steroid	+	+
Glikosida	+	+

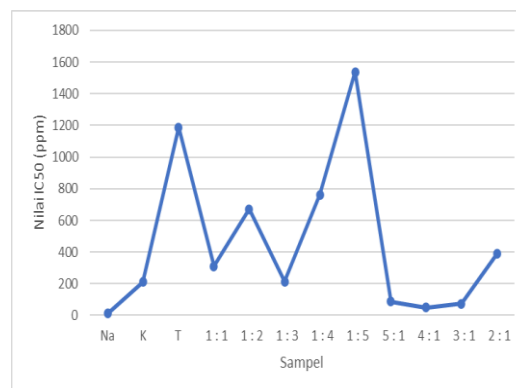
Denaturasi protein merupakan perubahan atau modifikasi terhadap struktur sekunder, tersier, dan kuaterner molekul protein tanpa terjadinya

pemecahan-pemecahan ikatan kovalen. Denaturasi protein tidak mempengaruhi kandungan struktur utama protein yaitu C, H, O, dan N. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan terjadinya proses denaturasi protein diantaranya yaitu suhu, pH, tekanan, aliran listrik, adanya campuran bahan kimia seperti alkohol, dan agen pereduksi. Pada metode penelitian ini, penyebab utama terjadinya denaturasi protein adalah adanya suhu yang terlalu tinggi sehingga mengacaukan ikatan hydrogen pada Bovine serum Albumin. Suhu tinggi dapat meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul penyusun protein bergerak bergetar sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan molekul tersebut. Protein yang mengalami proses denaturasi menyebabkan berkurangnya kelarutan cairan sehingga mudah mengendap. Perlakuan penambahan ekstrak pada penelitian ini bertujuan untuk menghambat terjadinya proses denaturasi protein tersebut. Kandungan senyawa kimia pada ekstrak diduga dapat menghambat laju denaturasi protein yang terjadi.

Pengujian aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer UV – Vis, dan data yang diperoleh merupakan data absorbansi yang kemudian digunakan untuk menghitung persen inhibisi ekstrak dan nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel. Grafik daya hambat masing-masing sampel secara umum menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin besar juga nilai persen inhibisinya. Natrium diklofenak sebagai kontrol positif pada konsentrasi 6.25 ppm menunjukkan daya hambat sebesar 40.17%, hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut, natrium diklofenak memiliki aktivitas antiinflamasi karena mampu menghambat lebih dari 20% terjadinya denaturasi protein. Daya Hambat masing-masing ekstrak torbangun dan ekstrak kelor beserta kombinasinya selengkapnya dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Hasil pengujian SPSS menunjukkan bahwa data yang diperoleh terdistribusi secara normal dengan nilai significant sebesar 0.058, sedangkan uji homogenitas varian menunjukkan nilai significant sebesar 0.143, sehingga data homogen dan dilanjutkan dengan uji *one-way ANOVA*. Hasil ANNOVA menunjukkan bahwa *p-value* yang diperoleh adalah 0.000, hal tersebut berarti terdapat perbedaan nilai rata-rata persen inhibisi (terdapat pengaruh konsentrasi terhadap tingkat daya hambat).

Nilai  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi efektif ekstrak yang dibutuhkan untuk meredam 50% dari total radikal. Sampel dinyatakan mempunyai aktivitas antiinflamasi sangat kuat jika nilai  $IC_{50} < 50$  ppm, kuat jika nilai  $IC_{50}$  50-100 ppm, sedang jika nilai  $IC_{50}$  100-150 ppm, lemah jika nilai  $IC_{50}$  151-200 ppm, dan dinyatakan tidak aktif jika mempunyai nilai  $IC_{50} > 200$ . Persamaan regresi linier beserta nilai  $R^2$  dapat dilihat pada **Tabel 2**.



**Gambar 1.** Nilai  $IC_{50}$  natrium diklofenak (Na), ekstrak daun kelor (K), ekstrak daun torbangun (T), dan kombinasi keduanya (K:T) pada berbagai rasio

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas antiinflamasi

Sampel	Persamaan	$IC_{50}$ (ppm)	$R^2$
Na	$y = 32.513x + 16.135$	11.00	0.9831
K	$y = 33.407x - 27.655$	2111.11	0.9096
T	$y = 21.63x - 16.498$	1186.71	0.9535
K:T 1:1	$y = 31.427x - 28.271$	309.43	0.9409
K:T 1:2	$y = 27.533x - 27.819$	670.49	0.8299
K:T 1:3	$y = 22.173x - 1.6947$	214.50	0.9146
K:T 1:4	$y = 26.1x - 25.224$	762.33	0.8422
K:T 1:5	$y = 22.737x - 22.453$	1536.62	0.8365
K:T 5:1	$y = 30.163x - 8.6047$	87.69	0.9626
K:T 4:1	$y = 32.08x - 4.724$	50.80	0.9692
K:T 3:1	$y = 30.637x - 7.3093$	74.23	0.998
K:T 2:1	$y = 26.957x - 19.843$	389.86	0.9964

**Keterangan:** Na = natrium diklofenak, K= ekstrak daun kelor, T = ekstrak daun torbangun, 1:1 = kombinasi (K:T) 1:1, 1:2 = kombinasi (K:T) 1:2, 1:3 = kombinasi (K:T) 1:3, 1:4 = kombinasi (K:T) 1:4, 1:5 = kombinasi (K:T) 1:5, 5:1 = kombinasi (K:T) 5:1, 4:1 = kombinasi (K:T) 4:1, 3:1 = kombinasi (K:T) 3:1, 2:1 = kombinasi (K:T) 2:1.

Pada penelitian ini, hasil  $IC_{50}$  na diklofenak sebagai kontrol positif yaitu sebesar 11 ppm yang berarti kontrol positif memiliki daya hambat yang sangat kuat. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun kelor tunggal sebesar 211.11 ppm yang berarti daya hambatnya lemah dan ekstrak daun torbangun tunggal sebesar 1186.71 ppm yang berarti daya hambatnya sangat lemah. Pada penelitian ini, terdapat 3 kombinasi ekstrak yang memiliki nilai  $IC_{50}$  kategori kuat (rentang 50 ppm – 100 ppm). Ketiga kombinasi tersebut adalah kombinasi 3:1, 4:1, dan 5:1 dengan nilai  $IC_{50}$  berturut-turut adalah 74.23 ppm, 50.80 ppm, dan 87.69 ppm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pada ketiga kombinasi ekstrak mempunyai aktivitas antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan denaturasi protein dengan kategori kuat.

Hasil  $IC_{50}$  menunjukkan bahwa ekstrak yang dikombinasikan memiliki tingkat daya hambat terhadap denaturasi protein lebih baik dibandingkan dengan ekstrak tunggal. Nilai  $IC_{50}$  ketiga kombinasi ekstrak lebih besar dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  natrium diklofenak namun masih memberikan efek antiinflamasi yang cukup baik. Hasil uji Duncan yang diperoleh pada penelitian ini adalah terdapat 4 kelompok kombinasi yang mendekati nilai kontrol positif. Kelompok uji yang memiliki nilai mendekati nilai kontrol positif yaitu kombinasi 5:1, 3:1, dan 4:1, sehingga pada kombinasi tersebut dianggap memiliki efek yang sama.

Hasil  $IC_{50}$  yang didapat pada penelitian ini umumnya menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak Kelor pada kombinasi menunjukkan hasil  $IC_{50}$  yang semakin kecil atau mendekati  $IC_{50}$  kontrol positif. Hal ini berarti bahwa diduga terdapat komponen yang lebih besar pada ekstrak Kelor yang dapat menghambat terjadinya denaturasi albumin. Nilai  $IC_{50}$  yang berbeda-beda dapat disebabkan karena beberapa faktor diantaranya proses pemanasan pada pengujian penghambatan denaturasi protein, dan adanya zat pengotor. Proses perlakuan terhadap sampel pada suhu tinggi dapat menyebabkan ketidakstabilan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak sehingga aktivitas antiinflamasinya dapat melemah. Selain itu, adanya keberadaan zat pengotor yang ikut tersaring saat proses ekstraksi atau pada saat proses perlakuan pengujian pada sampel juga dapat mengurangi aktivitas daya hambat ekstrak terhadap denaturasi protein sehingga berpengaruh pada nilai  $IC_{50}$  nya. Hasil  $IC_{50}$  dari masing-masing kombinasi ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 2**, sedangkan grafik  $IC_{50}$  dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Penghambatan denaturasi protein ini diduga karena adanya metabolit sekunder dalam ekstrak Kelor dan Torbangun yang berpotensi sebagai agen antiinflamasi, karena mampu menghambat terjadinya proses denaturasi protein dalam tubuh yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas yang menyebabkan terjadinya proses peradangan (inflamasi) dengan mekanisme aksi merangsang

pelepasan mediator inflamasi. Metabolit sekunder dalam ekstrak mampu menghambat terjadinya proses denaturasi protein dalam tubuh yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas yang menyebabkan terjadinya proses peradangan (inflamasi) dengan mekanisme aksi merangsang pelepasan mediator inflamasi. Ekstrak Kelor dan Torbangun yang digunakan pada penelitian ini mengandung metabolit sekunder seperti senyawa alkaloid, saponin, tanin, fenolik, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan glikosida.

Senyawa Flavonoid dapat menghambat jalur lipooksigenase secara langsung pada proses inflamasi yang menyebabkan penghambatan biosintesis eikosanoid dan mengaktifkan radikal bebas yang dapat menarik berbagai mediator inflamasi. Senyawa tanin dapat mempengaruhi respon inflamasi dengan aktivitasnya sebagai penangkal radikal bebas. Senyawa Steroid dapat menghambat pelepasan prostaglandin dari sel-sel sumbernya, sehingga pembentukan histamin, prostaglandin dan mediator-mediator kimia lainnya yang mengakibatkan peradangan dapat terhambat. Senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antiinflamasi biasanya mempunyai gugus hidroksil (OH), sehingga dapat melindungi membran, menghambat pelepasan mediator dan menginaktifkan radikal bebas. Denaturasi protein merupakan sebuah proses dimana protein kehilangan struktur tersier dan struktur sekunder oleh senyawa eksternal, seperti asam kuat atau basa kuat, garam organik, pelarut organik dan pemanasan (Dheani, 2021).

### Kesimpulan

Kombinasi ekstrak daun torbangun dan ekstrak daun kelor memiliki aktivitas antiinflamasi melalui mekanisme penghambatan denaturasi protein. Kombinasi yang dipilih adalah kombinasi (K:T) 3:2, 4:1, dan 5:1 yang memiliki nilai  $IC_{50}$  berturut-turut sebesar 74.23 ppm, 50.80 ppm, dan 87.69 ppm.

### Daftar Pustaka

- Chiu Y. J., Huang T. H., Chiu C. S., Lu T. C., Chen Y. W., Peng W. H., Chen C. Y. 2012. Analgesic and anti-inflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both in vitro and in vivo. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 508137. DOI: 10.1155/2012/508137.
- Cahyati, 2020. Hubungan tingkat kejadian efek samping antiinflamasi non steroid dengan usia dan jenis kelamin. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 6(2):56. DOI: 10.20473/jfiki.v6i22019.56-61.
- DepKes, 1995. *Materia Medika Indonesia*. VI ed. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- DepKes, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Dirjen Pengawasan Obat dan Makanan.
- Dheani, 2021. Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap penghambatan denaturasi protein. *Stannum : Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 3(1): 16-22.

- Hidayat, R., 2021. *Diagnosis dan Pengelolaan Rheumatoid Arthritis*. 1 ed. Perhimpunan Reumatologi Indonesia.
- Rahmawati, 2015. *Aktivitas ekstrak daun bangun-bangun (Coleus amboinicus Lour) sebagai antiinflamasi pada tikus putih (Rattus norvegicus)*. Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences (Prosiding Seminar Nasional Kefarmasian). Fakultas Farmasi. Universitas Mulawarman.
- Robin, 2003. *Accute and Chronic Inflammation*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders.
- Sangeetha K. S. S., Umamaheswari U., Reddy C. U. M., Kalkura S. N. 2016. Flavonoids: Theurapetic potential of natural pharmacological agents. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3: 3924-3930.
- Sibuea R. D., Hasibuan P. A. Z., Sitorus P. 2017. *Aktivitas peredaman radikal bebas dan penentuan kandungan total flavonoid dari fraksi etil asetat daun bangun-bangun (Plectranthus amboinicus L .)*. Thesis, Universitas Sumatera Utara.
- Sulistiyawati S., Pratiwi P. Y. 2016. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera L.*) terhadap aktivitas analgesik dan antiinflamasi melalui ekspresi enzim siklooksigenase. *Pharmaciana*. 6(31): 31-38.
- Sweetman, 2015. *The Complete Drugs Reference*. 36th ed. London: Pharmaceutical Press.
- Tiffani C., Laksmiawati D. R. 2020. Aktivitas penghambatan denaturasi albumin dan efek anti-inflamasi campuran ekstrak herba meniran, daun kelor, daun salam. *Majalah Farmasetika*. 4(1): 233.
- Velázquez-Zavala M., Peón-Escalante I. E., Zepeda-Bautista R., Jiménez-Arellanes M. A. 2016. *Moringa (Moringa oleifera Lam.): Potential uses in agriculture, industry and medicines*. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 22(2): 95-116.
- Yunahara, 2018. Uji aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak etanol rimpang temulawak (*Curcuma Xanthoriza Roxb*) dengan metode penghambatan denaturasi protein. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 16(2): 225-230.