

Kode/Rumpun Ilmu	327 / Kedokteran Gigi
Bidang IPTEK	Ilmu Kedokteran Spesialis

LAPORAN AKHIR HIBAH KOMPETENSI

**Pemanfaatan Akar Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) sebagai Obat Sakit
Gigi: Hewan Model Peradangan Periapikal Akibat Induksi LPS
*Porphyromonas gingivalis***

Tim Peneliti

Dr. drg. Maria Tanumihadja, MDSc	(0016026102)
Dr. drg. Indrya Kirana Mattulada, MS	(0023055302)
Drg. Nurhayaty Natsir, Ph.D., Sp. KG	(0018056401)
Subehan, PhD, Apt.	(0025097508)



**FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
OKTOBER 2017**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Pemanfaatan Akar Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) sebagai Obat Sakit Gigi: Hewan Model Peradangan Periapikal Akibat Induksi LPS *Porphyromonas gingivalis*

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr MARIA TANUMIHARDJA, S.KG
Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin
NIDN : 0016026102
Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
Program Studi : Pendidikan Dokter Gigi
Nomor HP : 08124212953
Alamat surel (e-mail) : maria_tanumiharja@yahoo.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : Dr.drg INDRYA KIRANA M MS
NIDN : 0023055302
Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin

Anggota (2)

Nama Lengkap : NURHAYATI N S.KG, Ph.D
NIDN : 0018056401
Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin

Anggota (3)

Nama Lengkap : SUBEHAN S.Si
NIDN : 0025097508
Perguruan Tinggi : Universitas Hasanuddin

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 144,000,000
Biaya Keseluruhan : Rp 244,000,000

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi



(Dr. drg. Bahruddin Thalib, M.Kes., Sp.Pro) NIP/NIK 196408141991031002

Kota Makassar, 26 - 10 - 2017
Ketua,



(Dr MARIA TANUMIHARDJA, S.KG)
NIP/NIK 131658794/19610216

Menyetujui,
Ketua LP2M, Sekretaris LP2M



(Prof. Dr. Ir. Laode Asrul, MP)
NIP/NIK 196303071088121001

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian : Pemanfaatan akar sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) Sebagai obat sakit gigi: hewan model peradangan periapikal akibat induksi LPS *Porphyromonas gingivalis*

2. Tim Peneliti

No.	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Institusi Asal	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1	Dr. drg. Maria Tanumihardja, MDSc	Ketua	Konservasi gigi	FKG UNHAS	24
2	Dr. drg. Indrya Kirana Mattulada, MS	Anggota 1	Konservasi gigi	FKG UNHAS	20
3	drg. Nurhayati Natsir, Ph.D., Sp. KG	Anggota 2	Konservasi gigi	FKG UNHAS	20
4	Subehan, PhD, Apt.	Anggota 3	Fitokimia	Farmasi UNHAS	20

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dari segi penelitian)
Akar Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) untuk diisolasi senyawa aktif nya
4. Masa Pelaksanaan
Mulai Bulan: Mei Tahun: 2017
Berakhir Bulan: Desember Tahun 2017
5. Usulan Biaya DRPM Dirjen Penguatan Risbang
Tahun ke-1 : Rp 100.000.000,- (disetujui Dikti)
Tahun ke-2 : Rp 132,000,000,- (usulan ke Dikti)
6. Lokasi Penelitian
Lab konservasi FKG UNHAS; Lab Fitokimia FF UNHAS; Lab Terpadu ITB; dan Lab Parasitologi UGM
7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)
 - a. Lab. Terpadu Institut Teknologi Bandung untuk karakterisasi senyawa aktif termasuk LC-MS/MS dan NMR
 - b. Lab. Parasitologi Universitas Gadjah Mada untuk pengujian kultur sel
8. Temuan yang ditargetkan
 - a. Senyawa aktif baru yang diisolasi dari akar Sidaguri
 - b. Senyawa aktif baru berkhasiat anti-inflamasi
9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu
10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala internasional bereputasi, nasional terakreditasi, atau nasional tidak terakreditasi dan tahun rencana publikasi
Der Pharma Chemica (Journal bereputasi terindeks scopus) yang akan dipublikasikan pada tahun 2017
11. Rencana luaran HKI, buku, purwarupa, atau luaran lainnya yang ditargetkan, tahun rencana perolehan atau penyelesaiannya
 - a. Journal internasional bereputasi terindek Scopus
 - b. Menjadi pembicara pada seminar internasional
 - c. Buku ajar yang ber-ISBN

ABSTRAK

Penyakit pulpa dan periapikal menurut Profil Data Kesehatan Indonesia tahun 2009, berada pada urutan ke-8 dari 10 besar pasien rawat jalan di rumah sakit. Keadaan ini terus meningkat, dimana pada data tahun 2010 penyakit pulpa dan periapikal naik ke urutan ke-7 sebagai 10 besar pasien rawat jalan di rumah sakit. Penyakit pulpa dan periapikal terjadi karena infeksi bakteri pada jaringan pulpa. Bakteri yang sering ditemukan pada saluran akar yaitu *E. faecalis*, dan *Actinomyces* spp. Berbagai tumbuhan biasa yang digunakan oleh masyarakat untuk mengobati penyakit gigi adalah akar sidaguri akan tetapi tanaman sidaguri belum banyak diteliti dalam bidang kedokteran gigi baik sebagai antibakteri maupun sebagai antiinflamasi. Ekstrak etanol akar sidaguri dapat menghambat pertumbuhan *E. faecalis* dan tetapi tidak pada *Actinomyces* spp. Uji antiinflamasi ekstrak etanol akar sidaguri 2,4 g/kgBB menunjukkan efek yang optimal dengan daya antiinflamasi 20,78% dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0.05$). Pada hewan model peradangan periapikal akibat induksi lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* didapatkan bahwa sidaguri mampu menurunkan kadar CRP darah dan indeks GI secara histopatologi pada dosis 2.4 g/kgBB. Potensi sebagai alternative dalam dalam mengobati penyakit gigi tersebut mendorong untuk dilakukannya penelitian untuk mengetahui senyawa aktif berkhasiat yang terkandung dalam tanaman tersebut.

Senyawa aktif diisolasi berdasarkan gradient kepolaran pelarut yang terbagi dalam 2 sistem: polar dan non polar. Ekstraksi akar sidaguri dilakukan secara reflux dan dipartisi dengan kromatografi cair vakum (senyawa larut heksan, etil asetat, butanol dan tidak larut butanol). Sedangkan isolasi senyawa aktif dilakukan secara KLT dan didapatkan 2 isolat murni. Hasil interpretasi NMR menunjukkan: (Z)-3,6,6-trimethylhept-2-en-1-ol, dan nonanoic acid. Kedua senyawa murni tersebut berpotensi sebagai antiinflamasi dan dapat digunakan sebagai obat, namun memiliki efek samping karena sifat senyawa yang tidak selektif terhadap penghambatan prostaglandin pada COX-2.

ABSTRACT

According to data profile of Indonesian health in year 2009, pulp and periapical diseases has become the eighth rank of big ten mobilized patients in Indonesian hospital. These tend to increase and become the seventh rank in year 2010. Pulp and periapical diseases are caused by bacterial infection in the pulp. *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces* spp are frequently found in the root canal and are often related to failure in endodontic treatment. Many herbs are usually practiced by people to treat tooth pain and one of them is the roots of sidaguri. However there are lack studies in dentistry to evaluate them either as an antibacterial, an anti inflammatory agent or analgesics. Ethanol extract of Sidaguri can inhibit *Enterococcus faecalis* but no inhibition on *Actinomyces* spp. Anti inflammatory and analgesic effect of ethanol extracts on sidaguri roots were found at 2.4 g/kg/BW with 20.78% and can delay pain till 13.02 min compared to negative control ($p < 0.05$). Due to its potential as an alternative in dental disease, encouraging conducting research to determine the active compounds from this plant.

The active compound is isolated based on the solvent polar gradient divided into 2 systems: polar and non-polar. Sidaguri root extraction using reflux method and partitioned with vacuum liquid chromatography (hexane, ethyl acetate, butanol and insoluble butanol). The interpretation of NMR shows: (Z)-3,6,6-trimethylhept-2-en-1-ol, and nonanoic acid. All the active compounds can be used as an anti-inflammatory, but has side effects due to its non-selective to inhibit COX-2.

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
DAFTAR ISI.....	vi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	2
I.3 Manfaat Penelitian.....	3
I.4 Urgensi Penelitian.....	3
BAB 2 URAIAN KEGIATAN.....	5
2.1 Penelitian yang telah Dilakukan.....	5
2.2 Keterbaharuan Penelitian.....	5
2.3 Peta Jalan Penelitian.....	6
BAB 3 METODE PENELITIAN.....	7
3.1 Luaran Penelitian.....	7
3.2 Sistematika Kegiatan Penelitian.....	7
3.2.1 Bahan Penelitian.....	7
3.2.2 Alat Penelitian.....	7
3.2.3 Waktu dan Tempat Penelitian.....	7
3.2.4 Penyiapan Sampel.....	7
3.2.5 Ekstraksi.....	8
3.2.6 Fraksinasi.....	8
3.2.7 Isolasi senyawa aktif.....	8
3.2.8 Analisis KLT.....	8
3.2.9 Identifikasi dan karakterisasi senyawa aktif.....	9
3.2.10 Uji Fitokimia.....	9
3.2.11 Uji antiinflamasi penghambatan terhadap siklooksigenase (COX-1 dan 2).....	9
3.3 Sistematika Kegiatan.....	12
BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	13
4.1 Penyiapan dan Pengolahan Sampel.....	13
4.2 Ekstraksi.....	13
4.3 Isolasi.....	15
4.4 Karakterisasi senyawa aktif.....	19
4.4.1 Spektroskopi FT-IR Senyawa I.....	19
4.4.2 Spektroskopi FT-IR Senyawa II.....	20
4.5 Analisis Spektroskopi ¹ H-NMR.....	20
4.5.1 Analisis Spektroskopi ¹ H-NMR Senyawa I.....	20
4.5.2 Analisis Spektroskopi ¹ H-NMR senyawa II.....	21
4.6 Uji Antiinflamasi.....	23
BAB 5 PENUTUP.....	25
5.1 Kesimpulan.....	25
5.2 Saran.....	25
REFERENSI.....	26
LAMPIRAN.....	27

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Beberapa tahun terakhir perhatian Pemerintah Indonesia mengenai pemanfaatan obat herbal dibidang kesehatan terus meningkat. Hal tersebut sejalan dengan keputusan Badan Kesehatan dunia, *World Health Organization* (WHO), yang telah membagi pelayanan kesehatan menjadi dua, yaitu *Modern Medicine* dan *Traditional Medicine*. Pengobatan herbal, masuk dalam bagian *Traditional Medicine* yang mulai diaplikasikan disebagian pelayanan kesehatan dasar di Indonesia sejak tahun 2009 (Anonim, 2012).

Indonesia dikenal dengan keanekaragaman hayati yang melimpah, dari 40.000 jenis flora yang ada di dunia, 30.000 spesiesnya terdapat di Indonesia, dan 940 diantaranya diketahui berkhasiat sebagai obat. Salah satu bentuk perhatian Pemerintah dalam pemberdayaan obat tradisional adalah dengan dikeluarkannya Saintifikasi Jamu dalam Peningkatan Penelitian Berbasis Pelayanan Kesehatan, serta rencana pengembangan pengobatan tradisional untuk wisata kesehatan atau *health tourism* yang dapat dimanfaatkan untuk kesehatan manusia (Anonim, 2012 dan Karyanto, 2012).

Penyakit pulpa dan periapikal menurut Profil Data Kesehatan Indonesia tahun 2009, berada pada urutan ke-8 dari 10 besar pasien rawat jalan di rumah sakit. Keadaan ini terus meningkat, dimana pada data tahun 2010 penyakit pulpa dan periapikal naik ke urutan ke-7 sebagai 10 besar pasien rawat jalan di rumah sakit (Anonim, 2012).

Dalam bidang kedokteran gigi tanaman yang biasa digunakan sebagai *antiplaque* adalah daun sirih dan siwak, sebagai anti inflamasi yaitu mengkudu, jahe dan sereh, sebagai analgetika yaitu cengkeh, jahe dan sambiloto dan antibakteri yaitu bawang putih, mimba dan kunyit (Harsini, 2008). Selain tanaman yang telah disebutkan, terdapat pula tumbuhan yang biasa digunakan masyarakat untuk mengobati sakit gigi yaitu tumbuhan jarak, gambir, dan sidaguri (Kinho, 2011). Manfaat tumbuhan sidaguri dalam bidang kedokteran gigi masih belum banyak diteliti baik sebagai antibakteri dan analgetika.

Sidaguri atau dengan nama latin *Sida rhombifolia L*, termasuk dalam famili malvaceae yang telah diteliti secara *in vitro* dan terbukti berkhasiat sebagai *analgesic* dan *anti inflamasi* sehingga bagian akar, batang dan daun digunakan sebagai obat asam urat dan telah beredar dipasaran dalam bentuk kemasan. Bagian bunga sidaguri dapat digunakan sebagai obat luar pada gigitan serangga. Sebagai *antimicrobial* penelitian menunjukkan daun sidaguri memiliki

aktivitas antibakteri yang cukup baik terhadap bakteri gram positif seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan bakteri gram negatif *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli*, sehingga dapat digunakan sebagai obat cacing, bisul, kurap dan gatal-gatal. Pada bagian akar sidaguri digunakan untuk mengobati rematik, asma, influenza serta sakit gigi, namun hanya sebagian kecil masyarakat yang menggunakan akar sidaguri untuk obat sakit gigi. Akar dari tumbuhan sidaguri digunakan untuk mengurangi rasa nyeri pada pembengkakan yang timbul akibat dari sakit gigi (Kinho, 2011 dan Ema, 2012).

Uji daya hambat ekstrak etanol akar sidaguri terhadap *E. faecalis* dan *Actinomyces spp* menggunakan metode difusi agar pada konsentrasi 5, 10, 15 dan 20% didasarkan pengukuran zona hambat yang ditimbulkan oleh masing-masing konsentrasi ekstrak. Daya hambat yang paling besar terhadap bakteri *E. faecalis* didapatkan pada konsentrasi 20% ($p < 0.05$) sedangkan pada *Actinomyces spp* tidak didapatkan zone hambat sama sekali (Nurhayati; 2012).

Uji daya antiinflamasi ekstrak etanol akar sidaguri 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 dan 2,4 g/kgBB yang telah dilakukan dengan menggunakan hewan uji tikus yang terinduksi karagenan 1% pada telapak kaki dan volume edema diamati tiap waktu menggunakan Plesitometer. Volume edema yang paling kecil tiap waktu didapatkan pada konsentrasi 2,4 g/kgBB dengan daya antiinflamasi 20,78% dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0.05$) (Nurhayati; 2012).

Uji anti-inflamasi yang dilakukan pada hewan model peradangan periapikal akibat induksi lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis* menunjukkan bahwa akar Sidaguri pada dosis 2,4 g/kgBB dapat menurunkan jumlah bakteri (CFU) pada gingival crevicular fluid (GCF), menurunkan kadar C-reactive protein (CRP) darah dibandingkan dengan control negative ($p < 0,05$) dan mampu menurunkan indeks gingifa (GI) secara histopatologi.

Berdasarkan latar belakang diatas maka akan dilakukan pencaharian senyawa aktif berkhasiat farmakologi yang diisolasi dari akar Sidaguri serta elusidasi struktur senyawa aktif tersebut secara IR, LC-MS/MS dan NMR. Senyawa aktif yang terisolasi selanjutnya diuji aktifitas anti-inflamasinya pada kultur sel *human gingival fibroblasts* (HGF) dengan parameter IL-1 β dan COX-2 secara imunohistokimia (IHC).

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah tersebut maka, peneliti ingin mengetahui senyawa aktif apakah berkhasiat anti-inflamasi yang terdapat dalam akar Sidaguri serta bagaimana mekanisme kerja anti-inflamasinya pada kultur sel HGF dengan parameter IL-1 β dan COX-2 secara imunohistokimia (IHC).

I.3 Manfaat Penelitian

1. Sebagai alternatif dalam meredakan inflamasi yang dapat digunakan sebagai penanganan sementara pada sakit gigi;
2. Menambah wawasan dan ilmu pengetahuan bagi peneliti dan masyarakat luas mengenai manfaat dan kegunaan dari Sidaguri;
3. Mengoptimalkan pemanfaatan tanaman Sidaguri yang selama ini masih dianggap sebagai hama pengganggu;
4. Meningkatkan nilai jual dari tanaman Sidaguri yang selama ini belum dimanfaatkan masyarakat; dan
5. Membuktikan secara ilmiah penggunaan empiris tanaman Sidaguri sebagai bahan pereda sakit gigi di masyarakat Sulawesi Selatan.

I.4 Urgensi Penelitian

Tingginya angka penderita penyakit periendontitis mendorong penemuan berbagai bahan aktif yang dapat mencegah atau mengobati penyakit tersebut, terutama pada pengobatan infeksi dan inflamasi yang terjadi. Penyakit periendontitis kronik juga bisa berdampak sistemik terhadap organ lainnya.

Penyakit periendontitis disebabkan oleh banyak variasi bakteri pathogen, salah satu bakteri yang paling susah dimusnahkan adalah *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri yang paling resisten terhadap antibiotik yang telah beredar dipasaran.

Penggunaan antibiotik yang berlebih dan tidak terkontrol menyebabkan bakteri ini bermutasi lebih resisten terhadap antibiotik yang telah ada, sehingga lebih mempersulit penanganan penyakit tersebut. Salah satu alternatif pengobatan antibakteri adalah menggunakan herbal, selain aman untuk dikonsumsi juga lebih mudah didapatkan terutama di daerah pedesaan.

Pengujian uji daya antiinflamasi dan antibakteri dari ekstrak etanol akar sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) terhadap hewan model Peradangan Periapikal Akibat Induksi Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*.

Program ini dipandang strategis karena Universitas Hasanuddin sebagai lembaga pendidikan tinggi terbesar dan terpadang di kawasan Timur Indonesia dengan segudang hasil penelitian civitas akademika yang dapat dibanggakan, sudah saatnya IPTEK yang ada di kampus menjadi sesuatu yang dapat diadopsi dan digunakan oleh masyarakat umum.

Tabel 1. Rencana target capaian tahunan

No	Jenis Luaran		Indikator Capaian	
			TS	TS+1
		Internasional	Reviewed	Reviewed
		Nasional terakreditasi		
		Internasional	Sudah dilaksanakan	Sudah dilaksanakan
		Nasional		
		Internasional		
		Nasional		
4	<i>Visiting lecturer</i>	Internasional		
		Paten		
		Paten sederhana		
		Hak cipta		
		Rahasia dagang		
		Desain produksi industri		
		Indikasi geografis		
		Perlindungan varietas tanaman		
		Perlindungan topografi sirkuit terpadu		
6	Teknologi tepat guna			
7	Model/purwarupa/desain/karya seni/rekayasa social			
8	Buku ajar (ISBN)			Proses editing
9	Tingkat kesiapan teknologi (TKT)			

BAB 2

URAIAN KEGIATAN

2.1 Penelitian yang telah Dilakukan

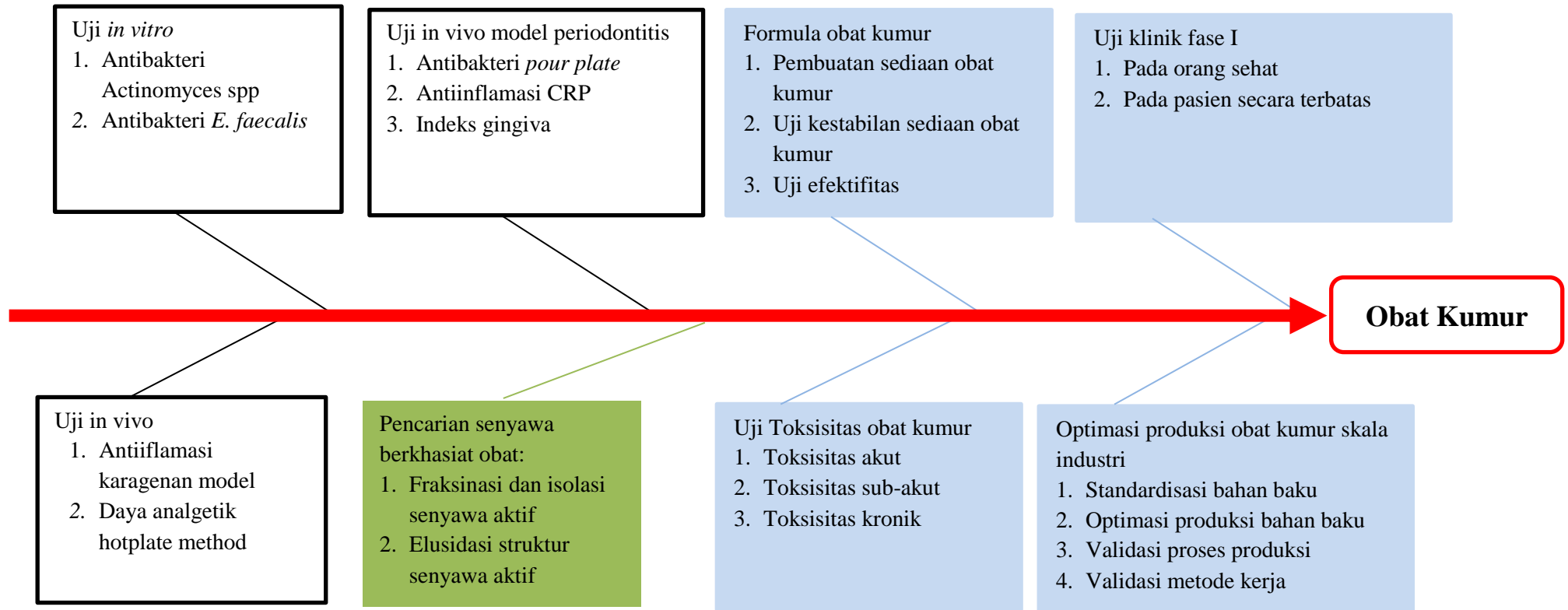
Penelitian ini tahap penelitian tidak lanjut terhadap hasil yang telah didapatkan. Adapun penelitian yang telah dilakukan sebelumnya adalah:

1. Uji daya hambat ekstrak etanol akar sidaguri terhadap *E. faecalis* menggunakan metode difusi agar (Nurhayati, 2012);
2. Uji daya hambat ekstrak etanol akar sidaguri terhadap *Actinomyces spp* menggunakan metode difusi agar (Nurhayati, 2012);
3. Uji daya antiinflamasi ekstrak etanol akar sidaguri 0,15; 0,3; 0,6; 1,2 dan 2,4 g/kgBB yang telah dilakukan dengan menggunakan hewan uji tikus yang terinduksi karagenan 1% (Nurhayati, 2012); dan
4. Uji analgetik daya ekstrak etanol akar sidaguri pada hewan uji mencit metode hotplate (Nurhayati, 2012);
5. Uji daya antibakteri ekstrak akar Sidaguri pada hewan model peradangan periapical terinduksi LPS pada dosis 0,6; 1,2 dan 2,4 g/kgBB (Tanumihardja, 2016); dan
6. Uji daya anti-inflamasi (CRP dan indeks GI) ekstrak akar Sidaguri pada hewan model peradangan periapical terinduksi LPS pada dosis 0,6; 1,2 dan 2,4 g/kgBB (Tanumihardja, 2016);

2.2 Keterbaharuan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian skala laboratorium menggunakan sampel akar Sidaguri yang merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya. Kajian mengenai Sidaguri telah banyak dilaporkan oleh peneliti sebelumnya, termasuk isolasi senyawa aktif. Kebaruan penelitian yang diusulkan ini untuk mendapatkan senyawa aktif berkhasiat anti-inflamasi yang dapat diaplikasikan pada penyakit peradangan periapical yang sebelumnya belum pernah dilaporkan.

2.3 Peta Jalan Penelitian



Ket:

- Telah dilakukan
- Usulan penelitian
- Penelitian lanjutan

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Luaran Penelitian

Adapun luaran yang direncanakan pada tahun kedua ini adalah:

1. Menulis pada jurnal internasional bereputasi
2. Menjadi pemakalah pada pertemuan ilmiah internasional
3. Menulis dan membuat buku ajar ber-ISBN

3.2 Sistematika Kegiatan Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini berupa akar tumbuhan sidaguri (*Sida rhombifolia* L.) diperoleh dari Kabupaten Bone. Bahan penelitian lain seperti: metanol teknis, akuades, akuabides, n-heksana p.a, diklorometan pa, n-butanol p.a, es batu, plastik wrap, aluminium foil, tissue roll, kertas saring Whatman nomor 42, plat KLT (Merk Kiesel gel 60 F254 0,25 mm), silika gel 60 (Merk, no. katalog 7733), silika gel 60 (Merk, no. katalog 7734), DMSO (Merck no. katalog 802912).

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain corong pisah, statif dan klem, alat-alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium, botol vial, timbangan digital (Ohaus AP-110), botol semprot, blender, alat soxhlet, alat evaporasi (BUCHI Rotavapor R-200), alat destilasi, alat KLT (chamber, pipa kapiler, pensil, cutter, dan mistar), inkubator, penangas air, kromatografi kolom gravitasi (KKG), kromatografi kolom tekan (KKT), kromatografi kolom vakum (KKV), lampu UV 254-365 nm, sementara untuk analisis spektrofotometer IR dengan varian FT IR Prestige-21 Shimadzu, JEOL JMN A 5000 yang bekerja pada 500,0 MHz untuk spektrum ¹H-NMR dan 125,65 MHz untuk spektrum ¹³C-NMR.

3.2.3 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli 2017 sampai selesai di Laboratorium Kimia Organik untuk preparasi sampel, Laboratorium Kimia Terpadu untuk analisis FT-IR Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Laboratorium Farmakologi untuk analisis antiinflamasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar dan Laboratorium Kimia ITB untuk analisis NMR.

3.2.4 Penyiapan Sampel

Akar tumbuhan *Sida rhombifolia* L. dicuci bersih dengan air dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di udara terbuka pada suhu kamar. Sampel yang telah kering dipotong-potong

kecil kemudian dihaluskan dengan blender sampai diperoleh serbuk. Hasil yang diperoleh digunakan sebagai sampel penelitian.

3.2.5 Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan cara soxhletasi. Sampel sebanyak 500 g, dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet. Pelarut metanol sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Kemudian alat soxhletasi dirangkai dengan kondensor. Ekstraksi dilakukan sekitar 8 jam hingga cairan tidak berwarna. Ekstrak yang didapat dievaporasi menggunakan evaporator, kemudian pelarut diuapkan menggunakan waterbath sampai diperoleh ekstrak kasar.

3.2.6 Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan 3 macam kromatografi kolom yaitu KKV, KKG dan KKT dengan menggunakan eluen yang bervariasi. Hasil fraksinasi dianalisis dengan KLT menggunakan eluen yang sesuai, dan fraksi-fraksi dengan nilai Rf yang sama, digabungkan di dalam suatu wadah.

3.2.7 Isolasi senyawa aktif

Ekstrak kasar metanol di suspensikan dalam air dan dipartisi dengan diklorometan, sehingga diperoleh fraksi air dan fraksi diklorometan. Untuk fraksi air, selanjutnya dipartisi dengan n-butanol. Sedangkan fraksi diklorometan selanjutnya disuspensikan dengan metanol air (9:1) dan dipartisi dengan n-heksana. Fraksi metanol air hasil partisi, kemudian disuspensikan dengan metanol air (5:5) dan dipartisi lebih lanjut dengan diklorometan (Kupchan dkk., 1978). Fraksi polar yang diperoleh yaitu n-butanol, metanol dan air. Fraksi yang berpotensi sebagai agen anti inflamasi selanjutnya difraksinasi melalui KKV, KKT, dan KKG menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan analisis dengan KLT dan setiap hasil fraksinasi dimonitor kembali melalui analisis dengan KLT.

3.2.8 Analisis KLT

Analisis dengan KLT dilakukan dengan menggunakan berbagai variasi pelarut. Maserat ditotolkan pada plat KLT yang memiliki silika gel sebagai adsorben lalu dimasukkan di dalam tabung yang telah dijenuhkan dengan eluen. Noda dari hasil totolan pada base line bergerak berdasarkan perbedaan kepolaran dan dihasilkan noda-noda. Sistem ini dilakukan dengan prinsip trial and error guna mencari eluen yang sesuai untuk fraksinasi. Eluen yang digunakan dapat berupa campuran dua atau tiga pelarut. Kromatogram yang baik ditandai dengan terpisahnya masing-masing noda yang kemudian dihitung nilai Rf-nya. Senyawa murni harus menunjukkan noda tunggal pada tiga macam sistem eluen dan kromatogram KLT dua dimensi.

3.2.9 Identifikasi dan karakterisasi senyawa aktif

Isolat tunggal yang diperoleh diuji kemurniannya melalui analisis KLT. Data spektroskopi untuk penetapan struktur diperoleh dengan mengukur senyawa murni melalui alat FT-IR, ¹H NMR, dan ¹³C NMR.

3.2.10 Uji Fitokimia

Pada fraksi polar akar tumbuhan *Sida rhombifolia* L. dilakukan uji fitokimia menurut Harborne (1987) yaitu uji alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, terpenoid, dan tanin.

3.2.11 Uji antiinflamasi penghambatan terhadap siklooksigenase (COX-1 dan 2)

1. Pembuatan larutan untuk pereaksi

Dapar reaksi (Item No.460104) dibuat dengan mengencerkan 5 mL dapar reaksi dengan 45 mL air steril. COX-1 (Item No. 460100): Vial mengandung *ovine* COX-1, diencerkan 80 µL enzim COX-1 dari vial dan ditambahkan ditambahkan 320 µL dapar reaksi, kemudian di simpan dalam lemari pendingin sebelum digunakan. COX-2 (Item No.460121): Vial mengandung *human recombinant* COX-2, diencerkan 80 µL enzim COX 2 dari vial dan ditambahkan 320 µL dapar reaksi kemudian di simpan dalam lemari pendingin sebelum digunakan. Larutan Heme (Item No. 460102): Vial mengandung larutan heme dalam pelarut DMSO. Diencerkan 40 µL Heme dengan menambahkan 960 µL dapar reaksi. Asam arakidonat/Substrat (Item No. 460103): Vial mengandung larutan asam arakidonat dalam pelarut etanol. Dipindahkan 50 µL sediaan substrat ke vial lain, ditambahkan 50 µL KOH, vortex dan diencerkan dengan 400 µL air steril. Timah (II) klorida/ SnCl₂ (Item No. 460107): Vial mengandung kristal SnCl₂. Ditambahkan 5 mL HCl (Item No. 460106) ke dalam vial persediaan SnCl₂ dan vortex hingga larutan jenuh.

Dapar ELISA (Item No.460060): Satu vial yang mengandung dapar ELISA konsentrasi (10x) diencerkan dengan 90 mL air steril. Dapar Pencuci (Item No. 460062): Vial yang mengandung dapar pencuci konsentrasi (400x) diencerkan dengan air steril hingga volume total 500 mL dan tambahkan 0,25 mL Tween 20 (Item No. 400062).

Prostaglandin *Screening* AChE *Tracer* (Item No.414006): Direkonstitusi 100 dtn *Prostaglandin Screening* AChE *Tracer* dengan 6 mL dapar ELISA. Prostaglandin *Screening* ELISA Antiserum (Item No. 414016): Direkonstitusi 100 dtn *Prostaglandin Screening* ELISA Antiserum dengan 6 mL dapar ELISA. Prostaglandin *Screening* *Standard* (Item No.414026): Dilarutkan liofilisat Prostaglandin *Screening* ELISA *Standard* dengan 1 mL dapar ELISA. Konsentrasi larutan ini adalah 10 ng/mL (standar bulk). Larutan digunakan sebagai standar untuk digunakan dalam ELISA: Disiapkan 8 tabung uji dan beri label S1 hingga S8. Diisi 800 µL dapar ELISA pada tabung S1 dan 500 µL dapar ELISA pada tabung S2 – S8. Dipipet 200

μL standar bulk dimasukkan pada tabung S1 dan kocok hingga homogen. Secara serial diencerkan standar dengan memipet 500 μL dari tabung S1 dan dimasukkan ke tabung S2, dikocok hingga homogen. Kemudian diambil 500 μL dari tabung S2 dan dimasukkan ke tabung S3, kocok hingga homogen. Diulangi perlakuan untuk tabung S4 – S8.

2. Pembuatan larutan uji

Isolat dilarutkan kedalam pelarut dapar perekasi hingga didapatkan konsentrasi 0,05 ppm dan 0,025 ppm menggunakan dapar ELISA.

3. Pelaksanaan reaksi COX

Tabung *Background*: Inaktif enzim COX-1 dan COX-2 dilakukan dengan memindahkan sebanyak 20 μL dari larutan masing – masing enzim ke dalam tabung *microfuge*, dipanaskan tabung pada air mendidih selama 3 menit, lalu ditambahkan 10 μL pembawa DMSO ke dalam tiap tabung. Tabung COX-1 100% *Initial Activity*: Ditambahkan 160 μL dapar reaksi, 10 μL larutan heme dan 10 μL COX-1 ke dalam tabung Effendorf kemudian ditambahkan 10 μL pembawa DMSO ke dalam tiap tabung. Tabung COX-2 100% *Initial Activity*: Ditambahkan 160 μL dapar reaksi, 10 μL larutan heme dan 10 μL COX-2 ke dalam tabung Effendorf kemudian ditambahkan 10 μL pembawa DMSO ke dalam tiap tabung. Tabung Inhibitor COX-1: Ditambahkan 160 μL dapar reaksi, 10 μL larutan heme dan 10 μL COX-1 ke dalam tabung Effendorf. Kemudian ditambahkan 10 μL larutan uji isolat ke dalam tabung. Tabung Inhibitor COX-2: Ditambahkan 160 μL dapar reaksi, 10 μL larutan heme dan 10 μL COX-2 ke dalam tabung Effendorf. Kemudian ditambahkan 10 μL larutan uji isolate ke dalam tabung. Diinkubasi semua tabung pada suhu 37⁰C dan ditambahkan 10 μL asam arakidonat ke dalam semua tabung, diaduk dan diinkubasi selama 2 menit pada suhu 37⁰C. Ditambahkan 30 μL larutan SnCl₂ pada semua tabung, dipindahkan tabung dari *water bath* dan vortex. Kemudian diinkubasi selama 5 menit pada temperatur ruangan. Jumlah prostaglandin yang terbentuk dapat dikuantifikasi dengan metode ELISA.

4. Pengenceran reaksi COX

Background Samples COX (BC): Disiapkan tabung Effendorf beri label BC1 dan BC2. Dimasukkan 990 μL dapar ELISA ke dalam tiap tabung, ditambahkan 10 μL supernatan sampel Background COX-1 ke tabung BC1 dan 10 μL supernatan sampel Background COX-2 ke tabung BC2, vortex hingga homogen. COX 100% *Initial Activity Samples (IA 100%)*: Disiapkan 3 tabung Effendorf dan beri tanda IA1 sampai IA3. Dimasukkan 990 μL dapar ELISA ke dalam tabung IA1, ditambahkan 10 μL supernatan sampel IA 100% COX-1 lalu dihomogenkan. Dimasukkan 950 μL dapar ELISA ke dalam tabung IA2, tambahkan 50 μL dari tabung IA1 ke dalam tabung IA2, lalu dihomogenkan. Dimasukkan 500 μL dapar ELISA ke

dalam tabung IA3, ditambahkan 500 μL dari tabung IA2 ke dalam tabung IA3, lalu dihomogenkan. Diulangi perlakuan diatas untuk IA 100% COX-2. COX-1 Inhibitor Sampel: Disiapkan 3 tabung Effendorf dan beri tanda C1 sampai C3. Dimasukkan 990 μL dapar ELISA ke dalam tabung C1, tambahkan 10 μL larutan COX-1 inhibitor lalu dihomogenkan. Dimasukkan 950 μL dapar ELISA ke dalam tabung C2, ditambahkan 50 μL dari tabung C1 ke dalam tabung C2, lalu dihomogenkan. Dimasukkan 500 μL dapar ELISA ke dalam tabung C3, ditambahkan 500 μL dari tabung C2 ke dalam tabung C3, lalu dihomogenkan. Diulangi perlakuan diatas untuk COX-2 inhibitor sampel

5. Pengujian Aktivitas Dengan Metode ELISA

Pada tahap ini digunakan microplate 96 wells yang tiap sumurnya akan diisi dengan beberapa reagen yaitu *Non Specific Binding (NSB)*, *Maximum Binding (B₀)*, *Prostaglandin Screening ELISA Standard*, *Background Samples COX-1 dan COX-2*, *COX-1 dan COX-2 100% Initial Activity Samples*, *COX-1 dan COX-2 Inhibitor Samples* dan *Total Activity*.

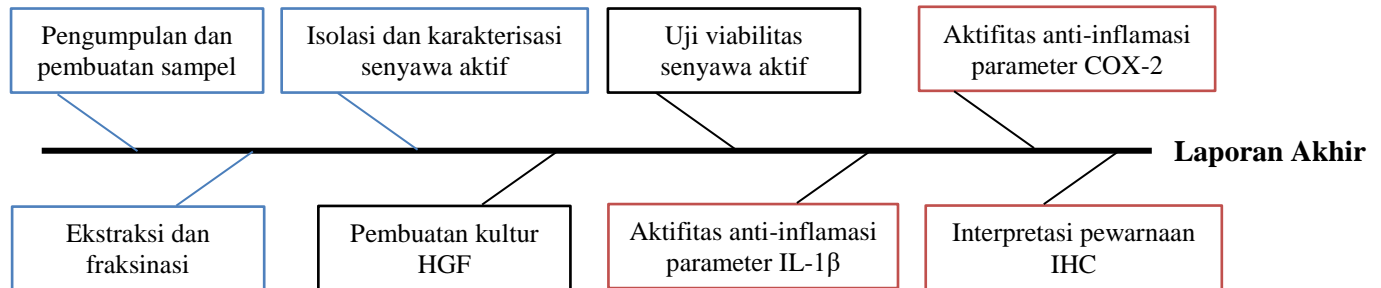
Sebanyak 100 μL dapar ELISA dimasukkan ke dalam sumur NSB dan 50 μL dapar ELISA dimasukkan ke dalam sumur B₀. Sumur *Prostaglandin Screening Standard* ditambahkan 50 μL dari tiap masing – masing tabung pengenceran yang ditandai S1 hingga S8, dimulai dari sumur paling bawah S8 hingga sumur paling atas S1. *Background Samples COX-1 dan COX-2 (Tabung BC₁₂, BC₁₃, BC₂₂, BC₂₃)* ditambahkan 50 μL ke dalam sumur masing-masing. Pada sumur COX-1 100% *Initial Activity Samples (Tabung uji IA2 dan IA3)* ditambahkan 50 μL sampel sesuai kodenya IA2 dan IA3 ke dalam sumur masing-masing. Dilakukan perlakuan yang sama untuk COX-2 100% *Initial Activity Samples*. COX-1 Inhibitor Sampel (Tabung uji C2 dan C3) ditambahkan 50 μL sampel sesuai kodenya C2 dan C3 ke dalam sumur masing-masing. Dilakukan perlakuan yang sama untuk COX-2 Inhibitor Sampel.

Sebanyak 50 μL *Prostaglandin Screening AChE Tracer* ditambahkan ke dalam semua sumur, kecuali sumur *Total Activity (TA)* dan *Blanko (Blk)*. Selanjutnya sebanyak 50 μL *Prostaglandin Screening ELISA Antiserum* ditambahkan ke dalam semua sumur kecuali sumur TA, NSB dan *Blanko*. Sumur *Blanko* tidak ditambahkan dengan reagen apapun.

Semua sumur ditutup dengan plastik film dan diinkubasi selama 18 jam pada temperatur ruangan di atas *orbital shaker*, setelah diinkubasi kemudian sumur dicuci dengan dapar pencuci kemudian ditambahkan 200 μL reagen Ellman's yang sebelumnya telah direkonstitusi satu vial dengan 20 mL air steril. Untuk sumur *Total Activity (TA)* tidak dilakukan penambahan apapun sebelum diinkubasi. Namun, setelah diinkubasi ditambahkan dengan 200 μL reagen Ellman's dan 5 μL *Prostaglandin Screening AChE Tracer*. Tutup kembali dengan plastik film dan

inkubasi selama 90 menit. pada suhu 37⁰C. Setelah diinkubasi dilakukan pembacaan lempeng pada panjang gelombang 405 nm.

3.3 Sistematika Kegiatan



Dr. drg. Maria Tanumihadja, MDSc: akan mengkoordinir dan mengawasi seluruh kegiatan penelitian

▭ Subehan, PhD, Apt.: ekstraksi, fraksinasi, isolasi dan karakterisasi senyawa aktif

▭ Dr. drg. Indrya Kirana Mattulada, MS: penyiapan kultur sel HGF dan pengujian viabilitasnya

▭ Drg. Nurhayaty Natsir, Ph.D., Sp. KG: aktifitas anti-inflamsi dan pewarnaan IHC

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Penyiapan dan Pengolahan Sampel

Sampel yang telah diambil kemudian dikeringkan selama kurang lebih 1 minggu untuk mengeluarkan kandungan air dalam sampel, karena sampel yang masih basah memiliki struktur yang keras sehingga sulit untuk di gerus. Sampel yang telah kering kemudian dipotong-potong menjadi potongan kecil agar nantinya mudah untuk dihaluskan menggunakan blender. Setelah halus, sampel kembali dikeringkan 2-3 hari untuk memastikan kandungan airnya telah habis dan beratnya ditimbang. Berat sampel yang diperoleh sebanyak 500 g. Berikut gambar sampel sebelum dan sesudah di haluskan:



Gambar 4.1. *Sida rhombifolia* L. yang belum dihaluskan

4.2 Ekstraksi

Sampel yang telah berbentuk serbuk dibungkus dengan kertas saring dan dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet. Kertas saring ini berfungsi untuk menjaga tidak tercampurnya bahan dengan pelarut secara langsung. Selanjutnya labu kosong diisi butir batu didih. Fungsi batu didih ialah meratakan panas. Pelarut etanol sebanyak 500 mL dimasukkan ke dalam labu. Ekstraksi dilakukan sekitar 8 jam hingga cairan tidak berwarna. Ekstrak yang didapat dievaporasi menggunakan *evaporator*, kemudian pelarut diuapkan menggunakan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kasar.

Metode soxhlet ini dipilih karena pelarut yang digunakan lebih sedikit (efisiensi bahan) dan larutan sari yang dialirkan melalui sifon tetap tinggal dalam labu, sehingga pelarut yang digunakan untuk mengekstrak sampel selalu baru dan meningkatkan laju ekstraksi. Waktu yang digunakan lebih cepat.

Setelah disokhletasi, sampel kemudian dievaporasi menggunakan alat rotary evaporator untuk mengurangi pelarutnya dan membuat sampel menjadi lebih pekat. Hal ini dilakukan agar pada proses ekstraksi selanjutnya menggunakan sedikit pelarut dan proses pemisahan lebih efektif.

Sampel yang telah dipekatan kemudian difraksinasi dengan menggunakan metode Kupchan (Kupchan dkk., 1978). Sampel disuspensikan ke dalam air kemudian diekstraksi dengan menggunakan diklorometan menggunakan corong pisah. Proses ini dilakukan dengan perbandingan 1:2 antara volume sampel dan pelarut, kemudian dibiarkan selama kurang lebih 24 jam untuk membuat pelarut dapat menarik senyawa dari sampel secara maksimal. Hasil dari tahap ini diperoleh 2 fraksi yaitu fraksi air dan fraksi diklorometan. Fraksi air selanjutnya diekstraksi kembali dengan 2-butanol. Jumlah ekstrak 2-butanol yang diperoleh dalam proses ekstraksi ini 3,983 g (cair).

Ekstrak 2-butanol yang telah diperoleh kemudian di kromatografi lapis tipis (KLT) untuk mencari perbandingan eluen yang sesuai dan pemisahan senyawa yang baik. Eluen yang digunakan berupa n-heksana, etil asetat, kloroform, dan aseton. Keempat eluen inilah yang divariasikan perbandingannya untuk mendapatkan pemisahan senyawa yang baik. Dalam penelitian ini didapatkan perbandingan eluen dari etil asetat dan aseton yaitu 7:3. Eluen inilah yang akan digunakan dalam proses pemisahan selanjutnya.

Sedangkan untuk isolasi senyawa non-polar dilakukan dengan cara: Sampel yang telah disokhlet kemudian dilakukan ekstraksi cair-cair dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. Ekstraksi diawali dengan pelarut non polar n-heksan dan DCM kemudian dilanjutkan dengan pelarut polar H₂O, 2-butanol dan kloroform. Perbandingan sampel dengan pelarut yang digunakan adalah 1:3 dimana sampel yang digunakan sebanyak 0,895 gram. Maserasi dilakukan selama 2x24 jam dan dilakukan sekitar 6-7 kali hingga filtrate berwarna bening. Evaporasi dilakukan dengan suhu 50 oC agar tidak merusak senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada filtrate.

Tabel 4.1 Hasil Ekstraksi Akar *Sidaguri rhombifolia* L.

Fraksi	Berat Ekstrak (gram)	Warna Ekstrak	Bentuk
n-heksana	0,7716	Coklat	Pasta
Diklorometan	0,4905	Coklat kehitaman	Pasta
2-butanol			
Kloroform			
H ₂ O		Kekuning-kuningan	Cairan

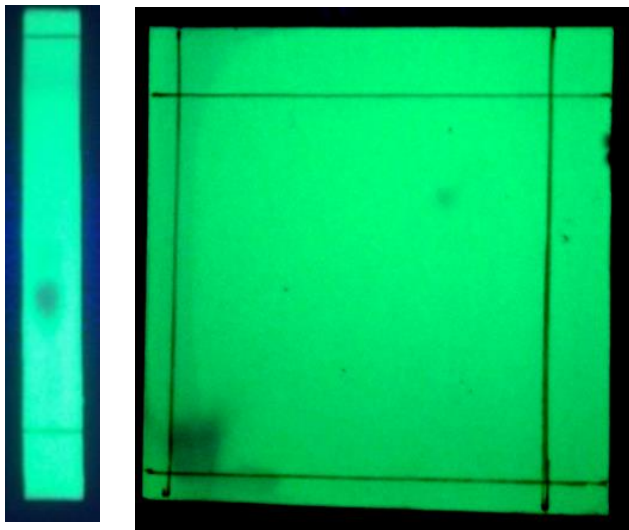
Ekstrak *n*-heksana yang telah diperoleh kemudian dikromatografi lapis tipis (KLT) untuk mencari perbandingan eluen yang sesuai dan pemisahan senyawa yang baik. Eluen yang digunakan berupa *n*-heksan, etil asetat, kloroform, aseton dan metanol. Kelima eluen inilah yang divariasikan perbandingannya untuk mendapatkan pemisahan senyawa yang baik.

4.3 Isolasi

Tahapan isolasi ini dimulai dengan melakukan kromatografi kolom vakum (KKV). Ekstrak 2-butanol sebanyak 3,983 g (cair) kemudian diimprek dengan menggunakan silika gel tipe 7730 sampai sampel menjadi butiran-butiran halus yang persis dengan struktur silika itu sendiri. Setelah itu barulah dilakukan KKV untuk memisahkan senyawa menjadi beberapa fraksi-fraksi. Proses ini dilakukan dengan menggunakan alat KKV dan silika gel tipe 7734, tahapan ini berlangsung dengan menggunakan eluen etil asetat dan aseton dengan berbagai perbandingan mulai dari 10:0 sampai 0:10. Pada tahapan ini akan di peroleh beberapa fraksi yang kemudian dianalisis dengan menggunakan KLT untuk mengetahui fraksi mana yang memiliki noda yang sama untuk kemudian digabung menjadi satu.

Penggabungan fraksi mendapatkan 1 buah fraksi yang memiliki pemisahan noda yang baik (ada dua noda). Selanjutnya direkristalisasi dengan cara dilarutkan dengan etil asetat : aseton, dan ditambahkan *n*-heksana sedikit demi sedikit hingga membentuk endapan. Hasilnya didapatkan Kristal seperti jarum.

Selanjutnya dilakukan KLT untuk melihat kemurniannya. Hasil dari KLT didapatkan 1 noda.



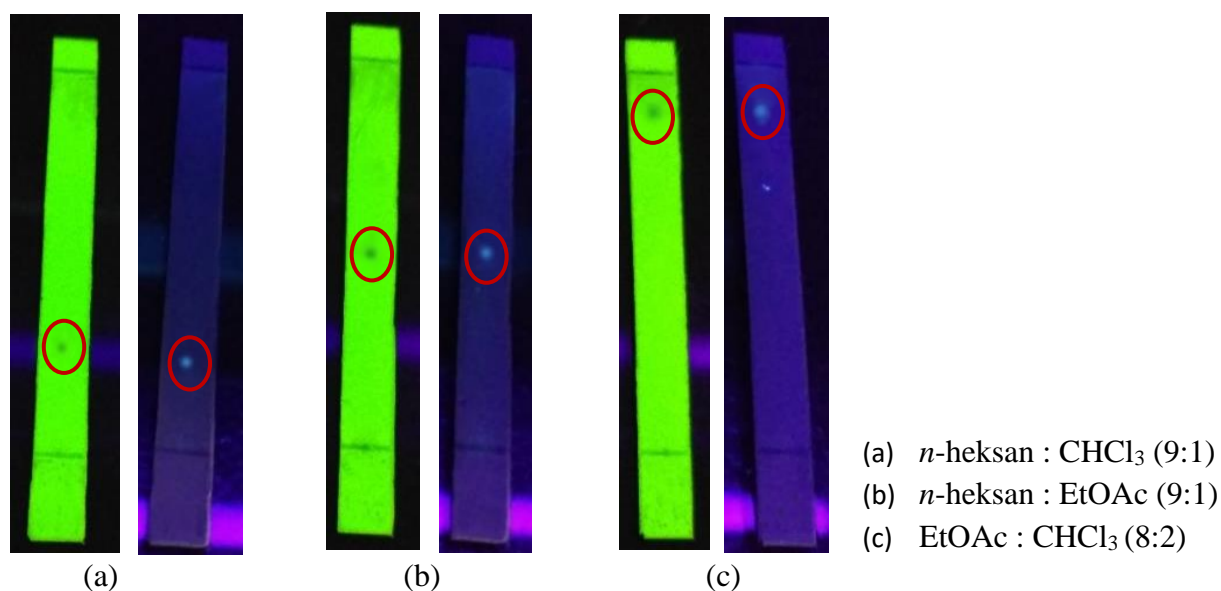
Gambar 4.2 Hasil KLT fraksi menghasilkan satu noda tunggal.

Tahapan isolasi senyawa non-polar dimulai dengan melakukan kromatografi kolom tekan (KKT). Sebelum KKT dilakukan, terlebih dahulu ekstrak *n*-heksan dikeringkan agar menjadi

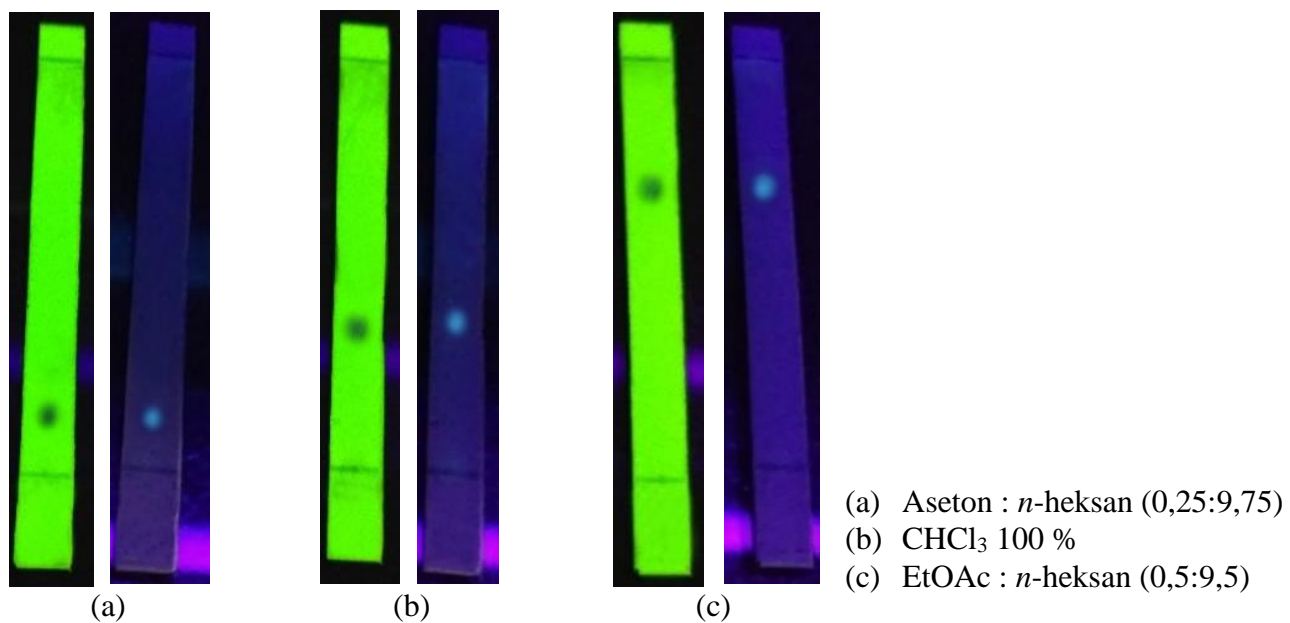
padatan agar nantinya mudah untuk dilakukan KKT. Ekstrak yang sudah kering sebanyak 0,7716 g kemudian diimprek dengan menggunakan silika gel tipe 7730 sampai sampel menjadi butiran-butiran halus yang persis dengan struktur silika itu sendiri. Setelah itu barulah dilakukan KKT untuk memisahkan senyawa menjadi beberapa fraksi-fraksi. Proses ini dilakukan dengan menggunakan alat KKT dan silika gel tipe 7734, tahapan ini berlangsung dengan menggunakan eluen n-heksan 100 % (sebanyak 5 kali), n-heksana dan kloroform dengan perbandingan (8:2, 7:3 dan 5:5), kloroform dan n-heksana (7:3), kloroform 100 %, etil asetat dan kloroform (2:8, 5:5 dan 7:3), etil asetat, aseton dan metanol masing-masing 100 %. Pada tahapan ini akan diperoleh beberapa fraksi yang kemudian dianalisis dengan menggunakan KLT. Pada penelitian ini, hanya beberapa fraksi yang diambil untuk dilakukan prosedur selanjutnya, diantaranya fraksi T₁₂ dan T₁₃ karena pada kedua fraksi tersebut diduga terdapat bibit kristal yang dilihat.

Selanjutnya kedua fraksi tersebut (T₁₂ dan T₁₃) dilakukan kristalisasi dan rekristalisasi dengan metanol dan etil asetat untuk pemurnian dan dibiarkan hingga semua pelarutnya menguap. Setelah semua pelarutnya menguap, kedua fraksi tersebut menghasilkan senyawa X dalam bentuk kristal cokelat masing-masing 62,2 mg (T₁₂) dan 4,2 mg (T₁₃).

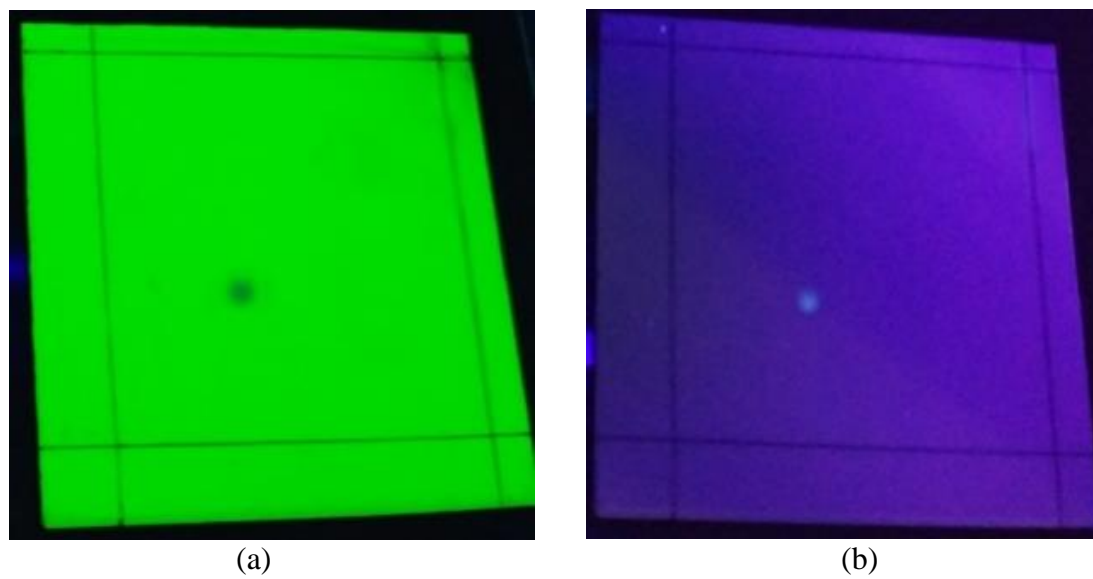
Uji kemurnian senyawa X pada masing-masing fraksi dilakukan dengan analisis KLT pada 3 sistem eluen dan KLT 2 dimensi (Gambar 12). Kromatogram memperlihatkan satu noda yang berpendar di bawah lampu UV. Hal tersebut mengindikasikan bahwa senyawa X merupakan senyawa murni.



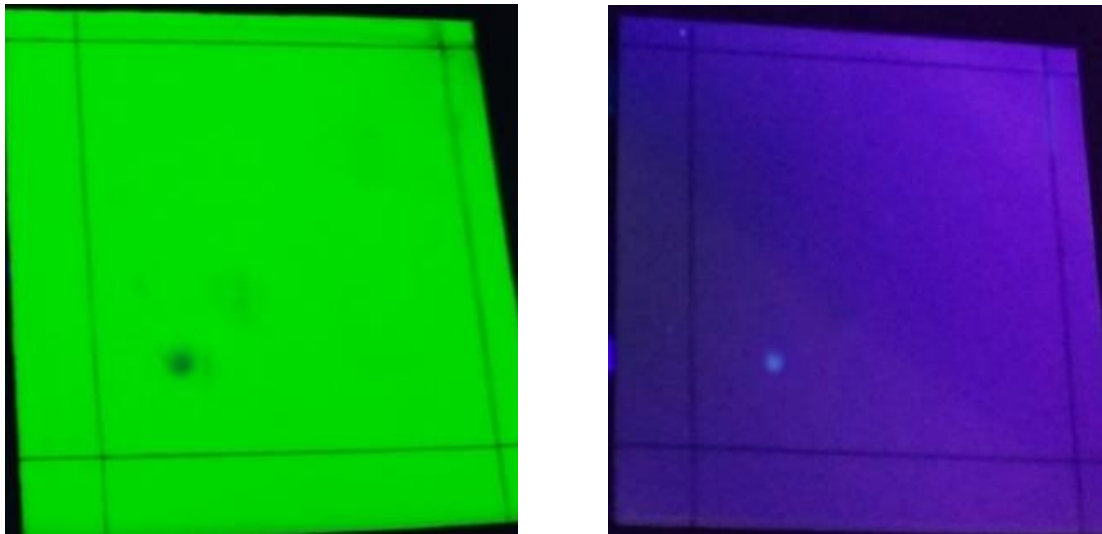
Gambar 4.3 Kromatogram hasil analisis KLT kristal fraksi T₁₂



Gambar 4.4 Kromatogram hasil analisis KLT kristal fraksi T₁₃



Gambar 4.5 Kromatogram hasil analisis KLT dua dimensi kristal fraksi T₁₂



Gambar 4.6 Kromatogram hasil analisis KLT dua dimensi kristal fraksi T₁₃

Uji fitokimia terhadap ekstrak n-heksana dan DCM menghasilkan data seperti yang terlihat pada Tabel 1.

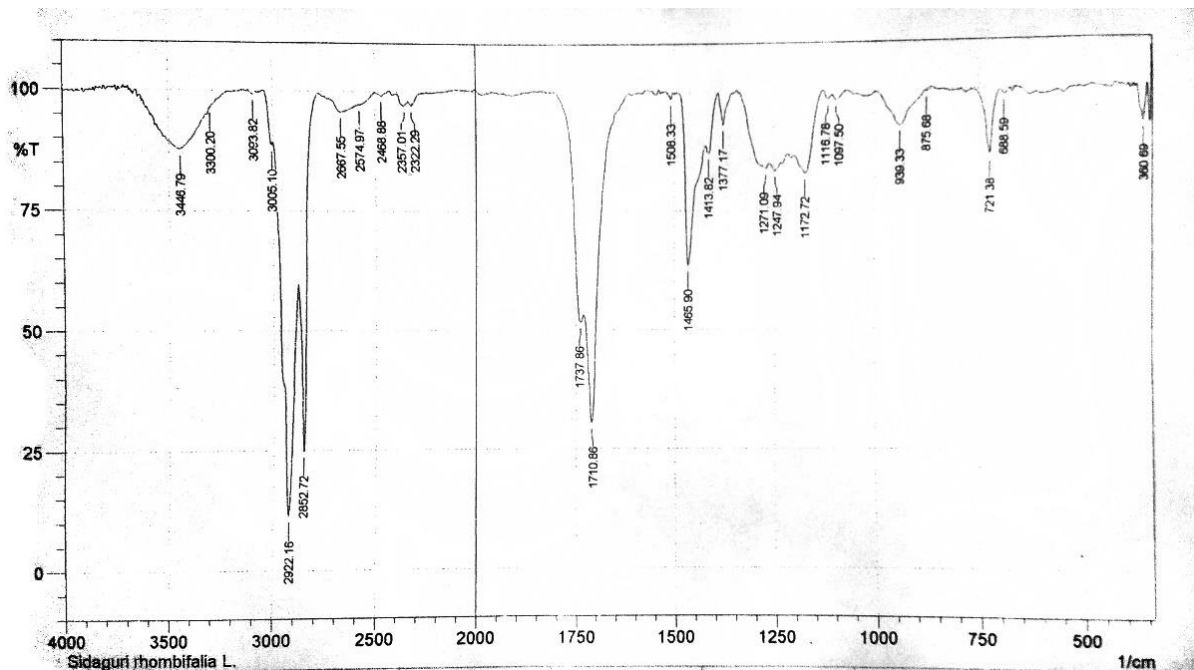
Tabel 4.2 Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana dan DCM dari akar *Sidaguri rhombifolia* L.

Metabolit Sekunder	Fraksi	
	DCM	N-heksan
Alkaloid		
a. Meyer	-	-
b. Wagner	-	-
Flavonoid	+	-
Saponin	+	+
Tanin	-	-
Steroid	+	-
Triterpenoid	+	-

Tahap identifikasi dilakukan dengan menggunakan instrumen FTIR, dan NMR proton dan karbon.

4.4 Karakterisasi senyawa aktif

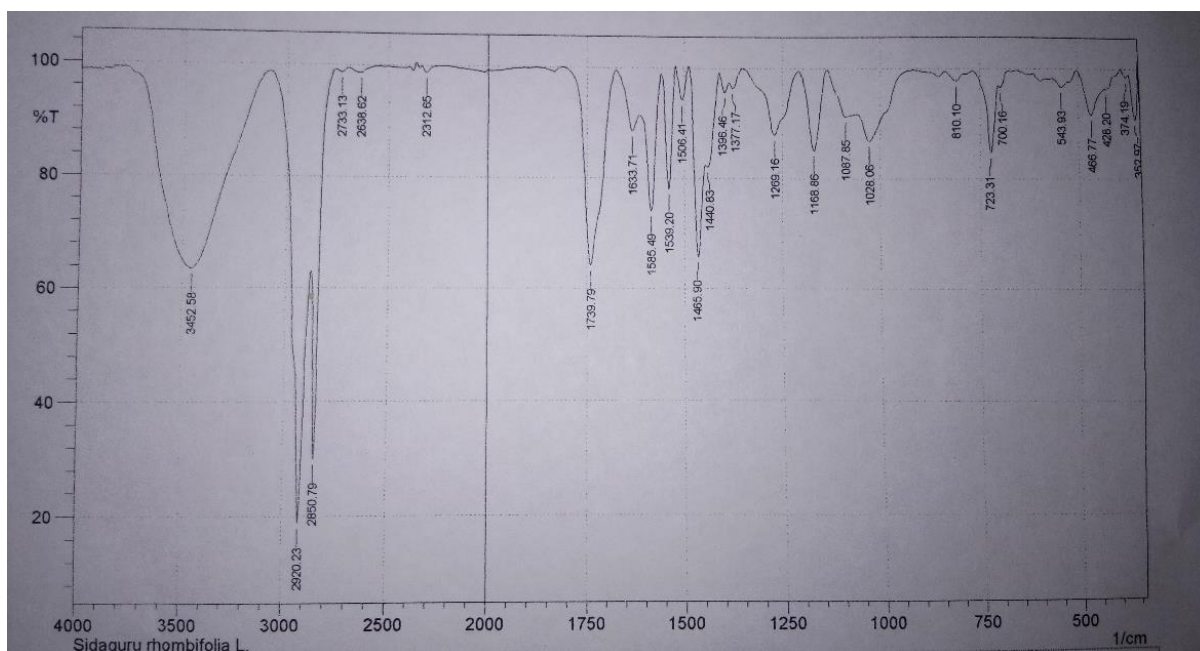
4.4.1 Spektroskopi FT-IR Senyawa 1



Gambar 4.7 Spektroskopi IR Senyawa 1

Data spektroskopi IR senyawa 1 memperlihatkan adanya gugus OH pada daerah 3446.79 cm^{-1} yang diperkuat dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang 1172.72 cm^{-1} , gugus C-H alifatik pada bilangan gelombang 2922.16 dan 2852.72 cm^{-1} yang diperkuat dengan adanya pita serapan CH_2 pada bilangan gelombang 1465.90 cm^{-1} dan pita serapan CH_3 pada bilangan gelombang 1377.17 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 2922.16 dan 2852.72 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus C-H sp^3 yang diperkuat dengan munculnya pita serapan pada bilangan gelombang 1465.90 dan 1413.62 cm^{-1} yang mengindikasikan gugus CH_2 (metilen) serta pita serapan pada bilangan gelombang 1377.17 cm^{-1} yang mengindikasikan gugus CH_3 (metil), muncul pita serapan pada bilangan gelombang 1737.86 dan 1710.86 cm^{-1} mengindikasikan gugus C=O ester yang diperkuat dengan adanya pita serapan C-O pada bilangan gelombang 1172.72 cm^{-1} .

4.4.2 Spektroskopi FT-IR Senyawa II



Gambar 4.8 Spektroskopi IR Senyawa 2

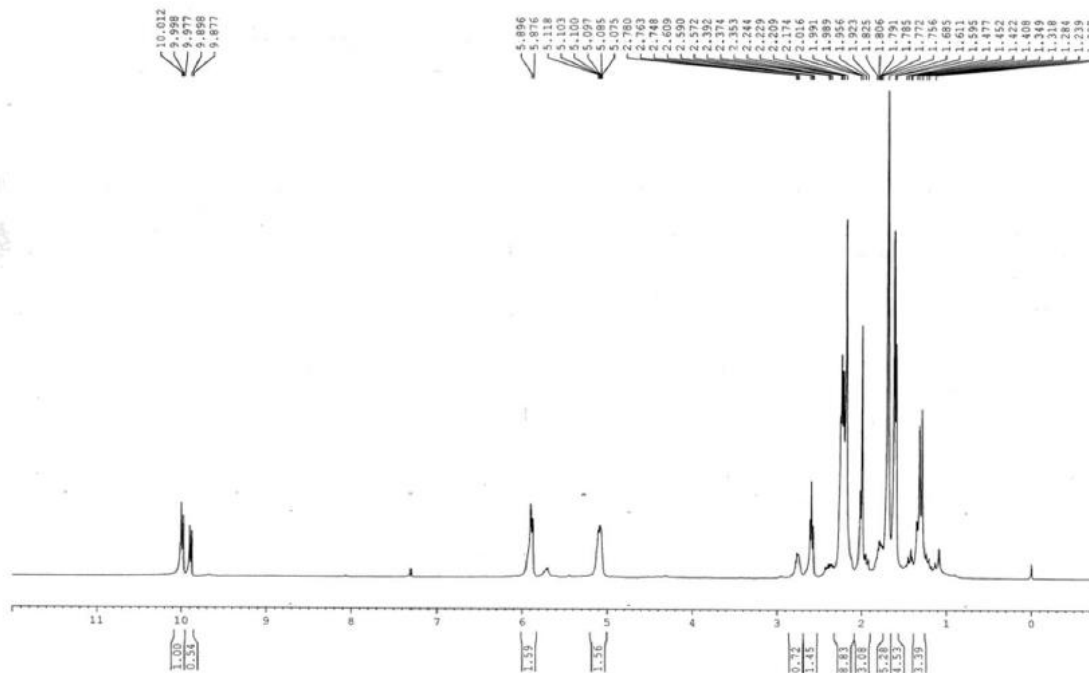
Data spektroskopi IR senyawa 2 memperlihatkan adanya gugus OH pada daerah 3452.58 cm^{-1} yang diperkuat dengan adanya serapan C-O pada daerah 1028.09 cm^{-1} , gugus C-H alifatik pada daerah serapan 2920.23 ; 2850.79 dan 1465.90 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 1739.79 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus C=O ester yang diperkuat dengan adanya serapan pada bilangan gelombang 1168.86 cm^{-1} . Pita serapan pada bilangan gelombang 1653.71 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus C=C alkena alifatik.

4.5 Analisis Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$

4.5.1 Analisis Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ Senyawa I

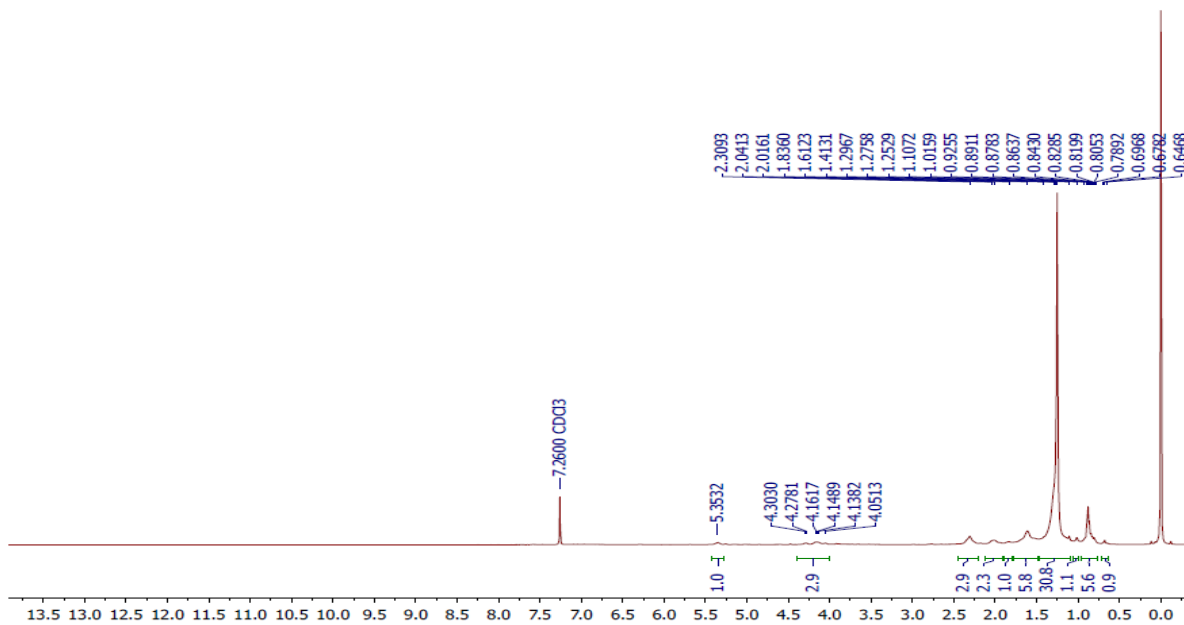
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 1 (Gambar 4.9) memperlihatkan 7 puncak. Puncak dengan pergeseran kimia $0,91$ dan $1,27 \text{ ppm}$ menunjukkan adanya gugus CH_3 . Sinyal proton pada pergeseran kimia $5,37 \text{ ppm}$ berbentuk singlet menunjukkan adanya gugus olefin ($\text{C}=\text{C}$) pada senyawa 1. Geseran kimia $2,32 \text{ ppm}$ menunjukkan gugus metilen (CH_2) yang bertetangga dengan gugus olefin, sedangkan sinyal proton pada geseran kimia $4,21 \text{ ppm}$ menunjukkan adanya proton yang berasal dari karbon yang terikat dengan oksigen pada gugus ester.

Menurut hasil penelusuran literatur menunjukkan bahwa data spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ senyawa 1 adalah signifikan dengan data spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ senyawa (2Z,2'Z)-2,2'-(3Ar,10aS)-1,3,5,8,9,9-hexamethyl-1,2,3,3a-tetrahydrobenzo yang telah dilaporkan oleh Ghosh, dkk (2013).



Gambar 4.9 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa 1

Lukman-T12_1H



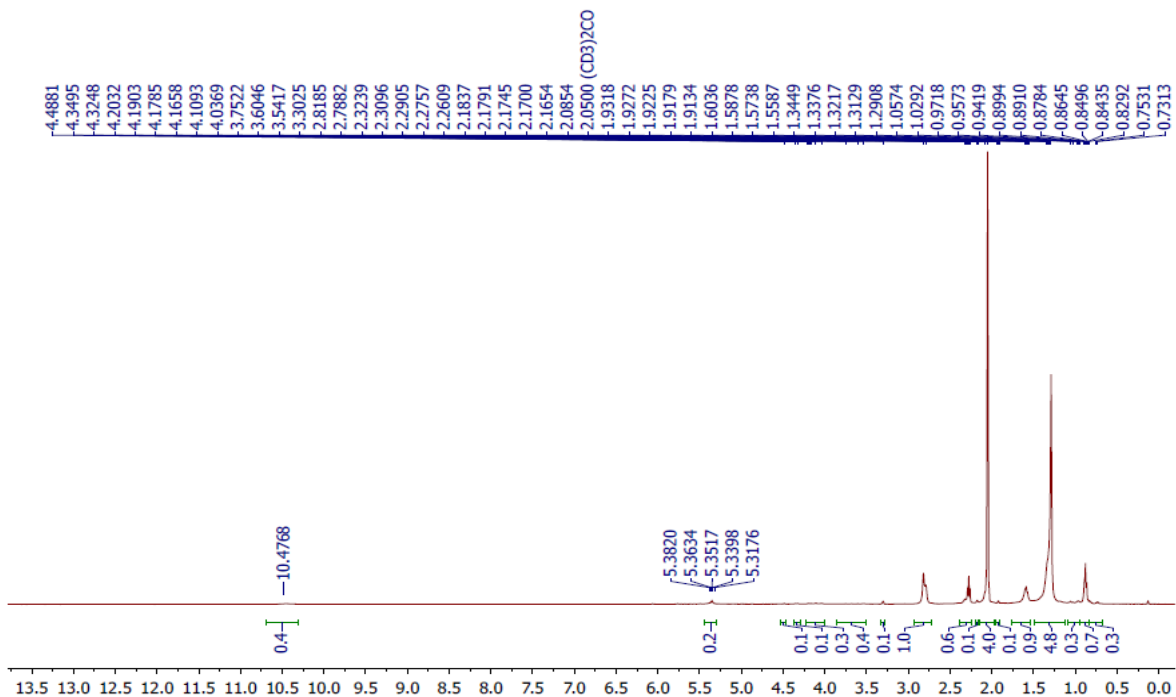
Gambar 4.10 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa Turunan Terpenoid

4.5.2 Analisis Spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ senyawa II

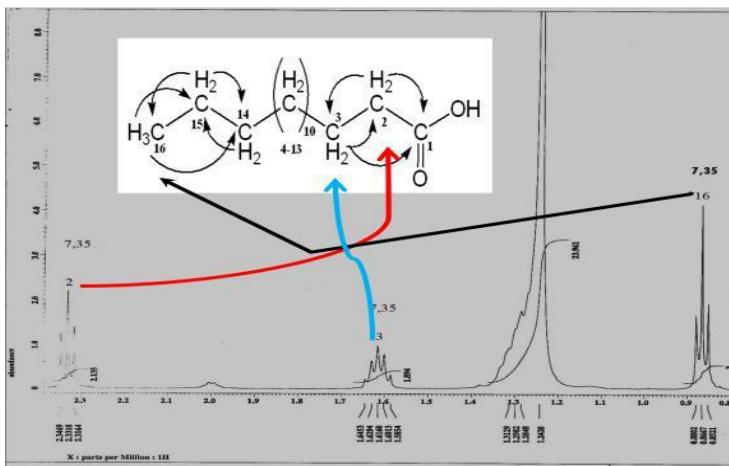
Spektrum $^1\text{H-NMR}$ senyawa 2 (T_{13}) (Gambar 4.11) memperlihatkan 6 puncak. Puncak dengan pergeseran kimia 0,89 ppm ($J = 8.9, 5.8$ Hz, dd) merupakan gugus metil (CH_3) dan 1,32 ppm ($J = 17.0$ Hz, dd) dengan intensitas yang tinggi menunjukkan adanya dua gugus CH_3 yang

simetris. Puncak dengan geseran kimia 5,37 ppm berbentuk triplet ($J = 5.9$ Hz, t) adalah gugus olefin (C=C). Adapun pada puncak dengan geseran kimia 3,32 ppm merupakan gugus oksikarbon (-OCH). Puncak dengan pergeseran kimia 2,82 ppm ($J = 14.5$ Hz, d) merupakan proton yang bertetangga dengan gugus oksikarbon (-OCH), sedangkan puncak dengan geseran kimia 2,29 ppm adalah proton yang bertetangga dengan gugus olefin (C=C). Menurut hasil penelusuran literatur menunjukkan bahwa data spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ senyawa 2 adalah signifikan dengan data spektroskopi $^1\text{H-NMR}$ senyawa *Hexadecanoic Acid* yang telah dilaporkan oleh Johannes, dkk (2013)

Lukman-T13_1H



Gambar 4.11 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ Senyawa 2



Gambar 4.12 Spektrum $^1\text{H-NMR}$ *Hexadecanoic Acid*

4.6 Uji Antiinflamasi

Aktivitas antiinflamasi pada senyawa murni akar *Sidaguri rhombifolia* L. diukur dengan menggunakan metode *COX Inhibitor Screening Assay Kit* (Cayman Chemical Catalog No. 560131). Aktivitas antiinflamasi dapat diketahui dengan besarnya nilai persen inhibisi sampel senyawa murni akar *Sidaguri rhombifolia* L. terhadap aktivitas enzim Siklooksigenase-2 (COX-2) (Dannhardt dan Laufer 2000). Hasil uji aktivitas antiinflamasi dari senyawa murni (1 dan 2) akar *Sidaguri rhombifolia* L. dapat dilihat pada Tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Uji antiinflamasi dengan konsentrasi 0,05 ppm

Senyawa	COX-1	Sisa yang tidak dihambat	% Inhibisi	% Tidak terhambat
1	1	19.16659	98,18	1,82 %
2	1	43.111978	95,91	4,09 %
1	2	202.64034	80,78	19,02 %
2	2	169.06788	83,97	16,03 %

Tabel 4. Uji Antiinflamasi dengan konsentrasi 0,025 ppm

Senyawa	COX-2	Sisa yang tidak dihambat	% Inhibisi	% Tidak terhambat
1	1	24.513984	97,67	2,33 %
2	1	34.013492	96,72	3,28 %
1	2	112.17121	89,36	10,64 %
2	2	173.32281	83,56	16,44 %

Tabel 5. Perbandingan persen inhibisi senyawa 1 dan 2

Senyawa	Konsentrasi	% Inhibisi COX-1	% Inhibisi COX-2
1	0,05 ppm	98,18	80,78
1	0,025 ppm	97,67	89,36
2	0,05 ppm	95,91	83,97
2	0,025 ppm	96,72	83,56

Data pada Tabel 4 dan 5, didapatkan persen inhibisi terhadap COX-1 dari senyawa 1 dan 2 pada konsentrasi 0,05 ppm sebesar 98,18% dan 95,91% dan terhadap COX-2 80,78% dan 83,97% secara berturut-turut. Sedangkan pada konsentrasi 0,025 ppm, senyawa 1 dan 2 memiliki % inhibisi terhadap COX-1 sebesar 97,67% dan 96,72% dan terhadap COX-2 96,72% dan 83,56% secara berturut-turut. Senyawa 1 dan 2 tidak memiliki perbedaan yang berarti

dalam proses menginhibisi aktivitas COX-1 maupun COX-2. Dengan hasil data di atas dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 dan 2 dari ekstrak akar *Sidaguri rhombifolia* L. berpotensi sebagai antiinflamasi. Adapun tingkat selektivitas dari senyawa 1 dan 2 dengan konsentrasi yang berbeda dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Tingkat Selektivitas Senyawa 1 dan 2

Senyawa	Konsentrasi	% Selektivitas COX-2
1	0,05 ppm	0,82
2	0,05 ppm	0,87
1	0,025 ppm	0,91
2	0,025 ppm	0,86

Hasil analisis data untuk uji selektivitas senyawa 1 dan 2 tidak memperlihatkan perbedaan penghambatan yang signifikan terhadap COX-2. Pada konsentrasi 0,05 ppm memiliki nilai selektivitas 0,82% dan 0,87% sedangkan nilai selektivitas pada konsentrasi 0,025 ppm sebesar 0,91% dan 0,86%. Berdasarkan uraian hasil data di atas, maka dapat disimpulkan bahwa senyawa 1 dan 2 cenderung berpotensi dapat dijadikan sebagai obat antiinflamasi karena mampu menghambat aktivitas prostaglandin dari COX-2 tetapi memberikan efek samping karena sifatnya yang tidak selektif. Dikatakan tidak selektif karena senyawa 1 dan 2 mampu menghambat pembentukan prostaglandin pada COX-1 dan COX-2 serta jika ditinjau dari % selektivitas inhibisi terhadap COX-2, kedua senyawa diatas tidak mencapai Standar Indeks inhibisi ($SI > 100$) (Anonim, 2017).

Obat antiinflamasi adalah obat yang digunakan untuk meredakan nyeri peradangan. Obat antiinflamasi yang sering digunakan adalah golongan *non-steroid*. Obat antiinflamasi *non-steroid*, yang dikenal dengan NSAIDs (*non steroid anti-inflammatory Drugs*) ada dua jenis, yaitu selektif dan non selektif. Perbedaan selektif dan non-selektif didasarkan pada mekanisme kerjanya, dimana golongan selektif menghambat enzim COX-2 saja sedangkan yang non-selektif menghambat enzim COX-1 dan COX-2 (Tjay dan Rahardja, 2002). Menurut Dannhardt dan Laufer (2000), enzim COX-1 bersifat konstitutif, artinya keberadaannya selalu tetap dan tidak dipengaruhi oleh adanya stimulus. Sebaliknya, enzim COX-2 merupakan enzim inducibel, artinya keberadaannya tergantung adanya induksi dari stimulus. Obat NSAIDs ideal hendaknya hanya menghambat COX-2 (peradangan) dan tidak COX-1 (perlindungan mukosa lambung) (Tjay dan Rahardja., 2002).

BAB 5

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, diperoleh data bahwa senyawa yang berhasil diisolasi pada ekstrak non-polar akar Sidaguri rhombifolia L. yaitu asam lemak (Z)-3,6,6-trimethylhept-2-en-1-ol (untuk senyawa 1) dan Nonanoic Acid (untuk senyawa 2). Kedua senyawa murni yang didapatkan berpotensi sebagai antiinflamasi dan dapat digunakan sebagai obat, namun memiliki efek samping karena sifat senyawa yang tidak selektif terhadap penghambatan prostaglandin pada COX-2.

5.2 Saran

Perlu dilakukan formula sediaan gigi seperti mounth wash atau gel untuk lebih memudahkan pada proses aplikasinya secara klinik.

REFERENSI

- Anonim. Indonesia Serius Kembangkan Pengobatan Herbal.2012. Available from:<http://www.gatra.com/life-health/sehat/15149-indonesia-serius-kembangkan-pengobatan-herbal.html>. Diakses tanggal 23 Desember 2016.
- Ema Ratna Sari. Skrining Aktivitas Antimikroba Dari Daun Tumbuhan Sidaguri. *J Scienta* vol.2 No.1, Februari 2012. pp 41-4
- Grossman LI, Oliet S, Del Rio CE. *Endodontic practice*. 11th ed. Philadelphia. Lea and Febriger. 1988; p. 122 - 58.
- Harsini, Widjijono. Penggunaan Herbal di bidang Kedokteran Gigi. *Maj Ked Gi*; Juni 2008; 15(1). pp 61-64
- Ingle JI, Bakland LK. *Endodontics*. 4th ed. Philadelphia. Lea and Febriger. 1994; p. 677 - 9.
- Karyanto. Obat dan Suplemen Kesehatan Herbal, Kian Digandrungi. *Kabar Sehat*, Edisi 002, Juli – September 2008. Available from: <http://www.dexa-medica.com/printview.php?cid=1&id=318>. Diakses tanggal 23 Desember 2016.
- Kinho Julianus dkk. Tumbuhan Obat Tradisional di Sulawesi Utara Jilid I. Badan penelitian dan Pengembangan Kehutanan Kementrian Kehutanan. 2011. pp 83-6.
- Kundabala, M., & Suchitra, U.2002. *Enterococcus Faecalis* an Endodontic Pathogen. *J Endod*, p 11-3.
- Loe H, Silness, J. Periodontal Disease in Pregnancy. I Prevalence and severity. *Acta odontol scand*. 1963 dec (21): pp, 533–551
- Maria Tanumihardja, Nurhayaty Natsir, Indrya K. Mattulata and Lukman M. Pharmacological evaluation of ethanol extract of *Sida rhombifolia* L. roots (Malvaceae). 2016, 8(1):770-774
- Rukmo Mandojo. The Development of Method on Assessment of Periapical Disease Healing After Endodontic Treatment. Procending Kongres IKORGI ke IX dan Seminar Ilmiah Nasional Recent advances in Conservative Dentistry; November 25-27, JW Marriot, Surabaya, 2011, pp 2-6.
- Stashenko et al. Th1 Immune Response Promotes Severe Bone Resorption Caused by *Porphyromonas gingivalis*. *American Journal of Pathology*. 2007.170: pp. 203-213.
- Syarifuddin. Mengenal Sidaguri. Artikel Herbal Jawa. Agustus 2011. Available from: <http://www.herbaljawa.biz/2011/08/mengenal-sidaguri.html>. Diakses tanggal 23 Desember 2016. p 19-20
- Utomo H. Mekanisme Imunoneuromodulasi Terapi “Assisted Drainage” pada Reaksi Tikus Alergi yang Terpapar Lipopolisakarida *Porphyromonas gingivalis*; Studi eksperimental laboratoris. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya. 2009
- Weine FS. *Endodontic therapy*. 5th edition. St. Louis, Mosby, USA, 1996; 693-712.

INTER-PROFESSIONAL EDUCATION | CERTIFICATE

This is to certify that

Dr. drg. Maria Tanumihardja, MD.Sc.
as Speaker

has participated in **International Conference on Inter-Professional Education (IPE)**
at Four Points by Sheraton Hotel, Makassar on September 28th-29th 2017.

SKP IAI No. 233/SK-SKP/PP.IAI/VIII/2017

(Speaker 7.5 SKP, Moderator 3 SKP, Committee 3 SKP, Participant Workshop 7.5 SKP and Participant Conference 11.5 SKP)

SKP PPNJ No. 0846/DPP.PPNI/SK/K.SIX/2017 (Speaker 4 SKP, Committee/Moderator 3 SKP and Participant 2 SKP)

SKP IBI No. 201/SKP-PD.IBI/IX/2017 (Speaker 3 SKP, Committee/Moderator/Participant 2 SKP)


2017

■ Prof. Dr. rer.nat Marianti A. Manggau, Apt.
Chair Person



■ Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, M.A.
Rector of Hasanuddin University



Collaboration of
Hasanuddin University and
Deutscher Akademischer Austauschdienst

