

Potensi Antiinflamasi Ekstrak dan Fraksi *n*-Heksana Daun Galam (*Melaleuca cajuputi*) Asal Kalimantan Selatan

Sutomo^{a,1*}, Arnida^{b,2}, Amalina^{c,3}, Fadlilaturrahmah^{d,4}, Mia Fitriana^{e,5}

^aBagian Biologi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

^bPusat Studi Obat Berbasis Bahan Alam Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin

^cProgram Studi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

^dBagian Kimia Farmasi Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

^eBagian Teknologi Farmasi Fakultas MIPA Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru

*sutomo01@unlam.ac.id

Kata kunci:

M. cajuputi;

Galam;

Antiinflamasi;

Denaturasi protein;

Ekstrak dan fraksi

ABSTRAK

Kalimantan Selatan memiliki keunikan topografi wilayah dengan daerah pasang surutnya serta sebagaimana merupakan lahan rawa dan gambut. Salah satu sumber hayati yang secara alami dapat tumbuh dengan baik adalah tumbuhan galam (*Melaleuca cajuputi*). Tumbuhan tersebut oleh sebagian Masyarakat digunakan sebagai obat inflamasi seperti radang usus, nyeri tenggorokan, gatal-gatal pada kulit, dan rematik. Tumbuhan *M. cajuputi* mengandung senyawa golongan flavonoid yang diduga dapat berfungsi sebagai agen antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* asal Kalimantan Selatan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein berdasarkan nilai IC₅₀. Sebagai kontrol positif dalam penelitian ini menggunakan senyawa natrium diklofenak. Hasil uji aktivitas antiinflamasi menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ natrium diklofenak, ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* secara berturut-turut sebesar 14,948; 51,577; dan 61,700 ppm. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara nilai IC₅₀ natrium diklofenak terhadap nilai IC₅₀ ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana. Berdasarkan penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana memiliki aktivitas antiinflamasi, tetapi aktivitas antiinflamasinya lebih lemah dibandingkan natrium diklofenak.

Key word:

M. cajuputi;

Galam;

Antiinflammation;

Protein Denaturation;

Extract and fraction

ABSTRACT

South Kalimantan has a unique topography that includes tidal areas and swamps, and peatlands. One of the natural resources that grows well in this area is the galam tree (*Melaleuca cajuputi*). Traditionally, this plant has been used to treat various inflammatory conditions, such as intestinal inflammation, sore throat, itchy skin, and rheumatism. *M. cajuputi* contains flavonoid compounds that are believed to have anti-inflammatory properties. This study aimed to determine the anti-inflammatory activity of ethanol extracts and *n*-hexane fractions of *M. cajuputi* leaves from South Kalimantan using a protein denaturation inhibition method with IC₅₀ values as the parameter. Sodium diclofenac was used as the positive control in this study. The results of the anti-inflammatory activity test showed that the IC₅₀ values for sodium diclofenac, ethanol extract, and *n*-hexane fraction of *M. cajuputi* leaves were 14.948; 51.577; and 61.700 ppm, respectively. Statistical analysis revealed a significant difference between the IC₅₀ value of sodium diclofenac and those of the ethanol extract and *n*-hexane fraction. Based on the study conducted, it can be concluded that the ethanol extract and *n*-hexane fraction have anti-inflammatory activity, although their potency is lower than that of sodium diclofenac.

Pendahuluan

Hampir setiap orang selama hidupnya pernah mengalami pembengkakan (inflamasi) yang diakibatkan oleh kondisi tertentu, misalnya benturan, infeksi, alergi, autoimun, dan lain-lain. Dalam tubuh manusia terjadinya inflamasi diakibatkan adanya respon sistem kekebalan tubuh terhadap rangsangan berbahaya seperti patogen, sel rusak, senyawa beracun, atau iradiasi. Sistem imun tersebut biasanya bekerja dengan menghilangkan rangsangan yang merugikan dan memulai proses penyembuhan. Inflamasi dapat ditandai dengan adanya warna kemerahan pada bagian tubuh, bengkak, panas, nyeri, dan hilangnya fungsi jaringan akibat respon sel inflamasi terhadap infeksi atau cedera (Chen *et al.*, 2017).

Inflamasi umumnya diobati menggunakan obat antiinflamasi sintetis yang tersedia di beberapa fasilitas kesehatan, diantaranya adalah obat antiinflamasi golongan steroid ataupun non steroid. Penggunaan obat tersebut pada manusia jika diberikan terus-menerus akan menghasilkan efek samping yang tidak diinginkan yaitu iritasi lambung untuk obat antiinflamasi golongan nonsteroid dan hipertensi untuk obat golongan steroid (Astika *et al.*, 2022). Pemanfaatan tumbuhan telah lama menjadi isu sosial yang dibuktikan dengan banyaknya produk obat dari tumbuhan yang telah beredar di masyarakat. Salah satu tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tumbuhan galem (*Melaleuca cajuputi*).

Tumbuhan *M. cajuputi* adalah tumbuhan yang berasal dari famili *Myrtaceae*. Tumbuhan ini secara empiris berkhasiat sebagai obat untuk penyakit pernafasan, radang usus, nyeri tenggorokan, gatal-gatal pada kulit, sakit gigi, diare, rematik, dan pusing. Kombinasi ekstrak bunga dan buah *M. cajuputi* mempunyai aktivitas antibakteri dan antijamur (Isnaini *et al.*, 2021), serta ekstrak daunnya memiliki nilai IC₅₀ sebesar 54,4906 ppm yang termasuk dalam rentang antioksidan yang kuat (Wardhani *et al.*, 2023).

Aktivitas pada tumbuhan tersebut disebabkan oleh adanya kandungan kimia obat yang terdapat di dalamnya. Ekstrak daun *M. cajuputi* mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, dan kuinon (Wardhani *et al.*, 2023). Flavonoid termasuk ke dalam kelompok senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi. Salah satu mekanismenya adalah dengan bertindak sebagai antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas, sehingga mencegah terjadinya peroksidasi lipid dan menjaga integritas membran sel. Golongan senyawa tersebut juga dapat menghambat pelepasan mediator inflamasi seperti prostaglandin dan histamin (Audina *et al.*, 2018). Selain itu dalam fraksi *n*-Heksana dapat mengandung senyawa golongan non polar seperti terpenoid dan minyak atsiri lainnya yang berperan sebagai anti inflamasi (Ge *et al.*, 2022).

Selain *in-vivo*, pengujian antiinflamasi dapat dilakukan dengan metode *in vitro*, salah satunya yaitu metode penghambatan denaturasi protein menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022). Metode tersebut sebagai langkah awal pada penetapan aktivitas antiinflamasi terhadap suatu sampel. Berdasarkan uraian di atas, belum banyak penelitian mengenai aktivitas antiinflamasi secara kuantitatif terhadap tumbuhan *M. cajuputi* terutama *M. cajuputi* yang berasal dari Kalimantan Selatan. Hal tersebut menjadi alasan peneliti untuk melakukan penelitian terhadap ekstrak dan fraksi *n*-Heksana daun galem (*M.cajuputi*) asal Kalimantan Selatan menggunakan metode uji penghambatan denaturasi protein.

Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *aluminium foil*, ayakan 14 mesh (Retsch), batang pengaduk, *blender*, cawan porselen, *chamber*, corong kaca (Pyrex), corong pisah (Pyrex), gelas beker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), *hotplate stirrer* (Stuart), inkubator (Memmert), kain flannel, kertas saring, labu ukur (Pyrex), lampu UV 254 dan 366 nm (Lokal), lemari pendingin (LG), maserator, mikropipet (Socorex), *oven* (Finco Inc OV 50), pH meter (ATC), pinset, pipa kapiler (Nesco), pipet ukur (Pyrex), pipet tetes, plat *silica* gel GF₂₅₄ (Merck), propipet, rak tabung reaksi, sendok tanduk, spatel, spektrofotometer UV-Vis (PerkinElmer UV/Vis Lambda 356), *stopwatch*, tabung reaksi (Pyrex), termometer (Pyrex), timbangan analitik (Ohaus), *vortex mixer* (Lab Companion), dan *waterbath* (Memmert).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu asam asetat glasial 100% *pro analysis* (Merck), aquadest (teknis), *bovine serum albumin* (Himedia), etanol 96% (Merck), etil asetat (Merck), FeCl₃ 10%, H₂SO₄ 10%, metanol *pro analysis* (Merck), NaCl (Merck), *n*-butanol (Merck), *n*-heksana (Teknis), natrium diklofenak (Aarti Drugs Limited), reagen Dragendorff, reagen Liebermann Burchard, simplisia daun *M. cajuputi*, dan *triss base* (Merck).

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sampel daun *M. cajuputi* di ambil di Jalan Gubernur Syarkawi, Kecamatan Gambut, Kabupaten Banjar, Provinsi Kalimantan Selatan. Simplisia daun yang diambil adalah bagian daun segar, tidak rusak, dan berwarna hijau tua. Serbuk simplisia daun *M. cajuputi* ditimbang seberat 750 mg untuk diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% (teknis). Pengadukan dilakukan setiap 4 jam dan sampel disimpan pada suhu kamar serta dijauhkan dari cahaya atau sinar matahari langsung. Ekstraksi dilakukan sampai bening dengan pergantian pelarut setiap 1 x 24 jam. Setelah 1 x 24 jam, dilakukan penyaringan kemudian pelarut diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 50°C.

Ekstrak dilakukan fraksinasi dengan metode cair-cair. Ekstrak etanol kental difraksinasi menggunakan pelarut *n*-heksana. Ekstrak etanol 10 gram disuspensikan dengan aquadest terlebih dahulu dengan perbandingan ekstrak dan akuades sebesar (1:2,5 v/v), kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan dengan menambahkan 40 mL *n*-heksana dan dilakukan refraksinasi hingga bening dengan penambahan pelarut *n*-heksana 30 mL setiap pengulangan fraksi. Fraksi *n*-heksana yang didapat diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan dilanjutkan penguapannya dengan *waterbath* pada suhu 50°C hingga bobot tetap. (Kemenkes RI, 2017).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji deteksi senyawa kimia dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Ekstrak dan fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* dilakukan dengan cara melarutkan ekstrak dan fraksi dalam vial menggunakan metanol *pro analisis* dengan konsentarsi 2%. Sampel dielusi dengan campuran gradien fase gerak *n*-heksana-etil asetat (7:3). Fase diam yang digunakan adalah plat KLT silika gel GF₂₅₄, dimana sebelumnya diaktifkan dalam oven selama 15 menit dengan suhu 105°C. Ekstrak dan fraksi yang telah dilakukan proses KLT selanjutnya diamati di bawah lampu UV-254 dan 366 nm.

Uji Aktivitas Antiinflamasi secara *In Vitro*

a. Pembuatan larutan TBS

Larutan TBS dibuat dengan cara dilarutkan 4,35 gram NaCl ke dalam aquadest 200 mL pada gelas beker, kemudian ditambahkan 605 mg *tris base* dan 200 mL aquadest. Asam asetat glasial juga ditambahkan ke dalam gelas beker dengan tujuan untuk mengatur pH yaitu hingga pH 6,3. Selanjutnya larutan diencerkan kembali dengan menambahkan aquadest sebanyak 100 mL (Mulyani *et al.*, 2023).

b. Pembuatan larutan BSA 0,2%

Larutan BSA 0,2% dibuat dengan cara melarutkan 0,2 gram BSA (*Bovine Serum Albumin*) dengan 100 mL larutan TBS (*Tris Buffer Saline*) pada labu ukur 100 mL (Mulyani *et al.*, 2023).

c. Pembuatan larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif dibuat dengan cara diambil 500 μ L metanol ke dalam labu ukur 5 mL, kemudian ditambahkan larutan BSA 0,2% hingga tanda batas (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022).

d. Pembuatan larutan kontrol positif dan larutan uji ekstrak dan fraksi *n*-Heksana

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu natrium diklofenak. Larutan kontrol positif dan larutan uji dibuat dengan cara menimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan pada pelarut metanol p.a menggunakan labu ukur 25 mL, sehingga akan didapatkan larutan induk kontrol positif dan larutan uji 2000 ppm. Langkah selanjutnya yaitu larutan induk kontrol positif dan larutan uji dilakukan pengenceran bertingkat menjadi 1750 ppm; 1500 ppm; 1250 ppm; 1000 ppm; 750 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 200 ppm; 100 ppm dan 50 ppm menggunakan metanol p.a (Mulyani *et al.*, 2023).

e. Pembuatan konsentrasi larutan kontrol positif, ekstrak, dan fraksi *n*-Heksana

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini yaitu natrium diklofenak karena mempunyai efek yang cepat dalam menghilangkan inflamasi serta memiliki kelarutan yang baik di dalam air ataupun pelarut organik. Larutan kontrol positif dan larutan uji dibuat dengan cara menimbang natrium diklofenak, ekstrak, dan fraksi *n*-heksana sebanyak 50 mg. Selanjutnya dilarutkan pada pelarut metanol menggunakan labu ukur 25 mL, sehingga masing-masing didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 2000 ppm. Langkah selanjutnya yaitu pada larutan induk dilakukan pengenceran bertingkat menjadi 1750 ppm; 1500 ppm; 1250 ppm; 1000 ppm; 750 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 200 ppm; dan 100 ppm dimana untuk larutan kontrol positif juga dibuat dengan konsentrasi 50 ppm menggunakan metanol (Mulyani *et al.*, 2023).

Pengujian aktivitas antiinflamasi kontrol positif, ekstrak, dan fraksi *n*-heksana

Pengujian aktivitas antiinflamasi larutan kontrol positif, ekstrak, dan fraksi *n*-heksana dilakukan dengan cara yaitu masing-masing diambil sebanyak 500 μ L dari setiap konsentrasi larutan, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, selanjutnya ditambahkan 0,2% larutan BSA ke dalam labu ukur hingga volume mencapai tanda batas, sehingga akan didapatkan larutan masing-masing dengan konsentrasi sebesar 10 ppm; 20 ppm; 25 ppm; 50 ppm; 75 ppm; 100 ppm; 125 ppm; 150 ppm; 175 ppm; dan 200 ppm (serta 5 ppm untuk larutan uji kontrol positif). Larutan yang sudah didapatkan, kemudian diukur pH-nya. Langkah selanjutnya, semua larutan yang didapatkan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, kemudian dilakukan pemanasan pada suhu 70°C selama 5 menit di atas *hotplate* dan didiamkan hingga dingin, lalu di-*vortex*. Larutan yang telah didapatkan kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm. (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022).

Analisis Data

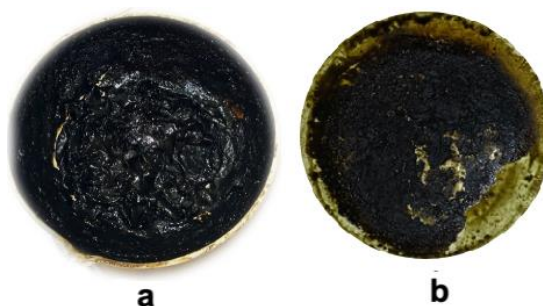
IC₅₀ dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% ke dalam persamaan kurva standar sebagai y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi IC₅₀. Nilai IC₅₀ yang didapatkan kemudian dilanjutkan ke tahapan analisis statistik dengan menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics 25*. Tahapan awal dari uji statistika ini adalah dengan melakukan uji normalitas (*Shapiro-Wilk normality test*) uji homogenitas menggunakan uji (*Levene's homogeneity test*). Data yang sudah terdistribusi normal ($p \geq 0,05$) dan

homogen merupakan syarat dari data parametrik sehingga dapat dilakukan analisis *One-Way ANOVA*. Uji Kruskal-Wallis dilakukan jika data tidak terdistribusi normal dan dilanjutkan dengan *Mann-Whitney*.

Hasil dan Pembahasan

Pembuatan ekstrak etanol dilakukan dengan metode ekstraksi dingin yaitu metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Metode maserasi sangat sering digunakan dalam ekstraksi pada sampel tumbuhan yang belum diketahui ketahanan senyawa kimianya. Beberapa senyawa dapat rusak dan hilang saat dilakukan ekstraksi dengan cara panas misalnya golongan terpen-terpen yang mudah menguap. Untuk larutan ekstraksi menggunakan etanol 96% karena pelarut tersebut bersifat polar dengan struktur kimia yang mampu menarik komponen baik polar, semi polar, maupun non polar. Selain tu pemilihan pelarut tersebut yaitu karena tingkat keamanannya lebih tinggi dan kemudahan ketika dilakukan penguapan karena suhu dididhnya yang relatif rendah (Ramadhani *et al.*, 2021). Maserasi dilakukan selama 10 hari, dilakukan penyaringan ekstrak cair, dan penggantian pelarut baru setiap 24 jam. Ekstrak cair yang didapatkan, kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* serta *waterbath* dengan suhu 50°C hingga didapatkan bobot tetap. Penggunaan *rotary evaporator* dapat mengurangi suhu saat penguapan karena dibantu dengan vakum yang terdapat pada alat tersebut. Ekstrak kental yang didapatkan yaitu sebanyak 194,46 gram (25,928%) dengan warna hijau tua, rasa agak pahit, dan bau khas seperti minyak kayu putih tetapi agak lemah.

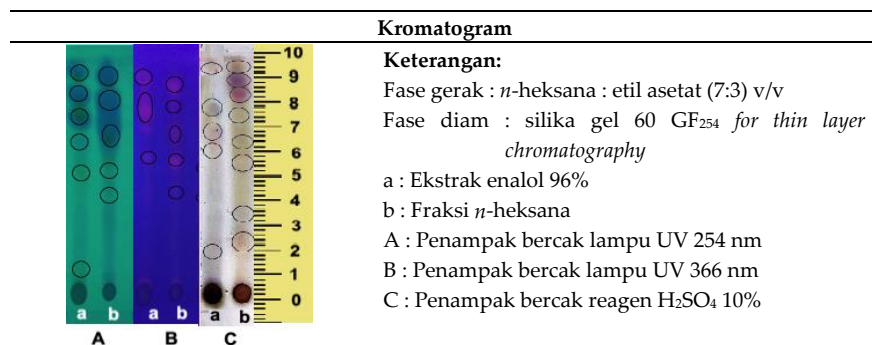
Metode fraksinasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu fraksinasi cair-cair. Metode tersebut cukup mudah dilakukan dan dapat memberikan pemisahan yang sempurna dan cukup singkat apabila dilakukan secara tepat. Pemisahan yang sempurna yang dimaksud adalah semua senyawa yang larut dalam pelarut *n*-heksana dapat terpisah dan dapat dibuktikan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Hal tersebut sesuai dengan prinsip *like dissolve like*, yaitu senyawa yang bersifat nonpolar akan tertarik oleh pelarut nonpolar, senyawa yang bersifat semipolar akan tertarik oleh pelarut semipolar, dan senyawa yang bersifat polar akan tertarik oleh pelarut polar (Munadi *et al.*, 2024). Hasil fraksinasi dari 20 g ekstrak etanol daun *M. cajuputi* dengan pelarut *n*-heksana didapatkan fraksi kering sebesar 2,48 g (12,4 %). Hal tersebut menggambarkan besarnya metabolit sekunder yang dapat tertarik dalam pelarut *n*-heksana. Fraksi *n*-heksana memiliki karakteristik berbau khas, warna hijau tua, dan rasa agak pahit, dimana ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Ekstrak etanol (a) dan fraksi *n*-heksana (b) daun *M. cajuputi*

Uji penegasan menggunakan KLT digunakan untuk memastikan kandungan senyawa yang terdapat pada ekstrak dan fraksi daun *M. cajuputi*. Data yang didapatkan yaitu berupa nilai R_f dan warna bercak pada plat KLT sebagai hasil dari elusi lempeng KLT. Hasil pemisahan dideteksi menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm kemudian disemprot dengan penampak bercak H_2SO_4 (Gambar 2). Beberapa manfaat penampak bercak UV 254 nm yaitu dapat mendeteksi danya senyawa yang memiliki cincin aromatik misalnya fenol dan benzen senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi pada beberapa senyawa golongan flavonoid (Silverstein, R. M., *et al.*, 2014). Untuk penampak bercak UV 366 nm dapat mendeteksi senyawa-senyawa yang memiliki gugus kromofor

dan berfluoresensi seperti senyawa golongan flavonoid, alkaloid, maupun terpenoid dengan struktur tertentu (Tiwari *et al.*, 2011). Kromatogram dari hasil deteksi menggunakan H₂SO₄ 10% memberikan informasi terhadap kandungan kimia secara umum. H₂SO₄ 10% yang disemprotkan pada permukaan plat KLT dapat memperjelas bercak senyawa yang ada pada sampel, dimana H₂SO₄ sendiri memiliki sifat oksidator untuk merusak gugus kromofor zat aktif sampel (Muthia *et al.*, 2023).



Gambar 2. Profil kromatogram ekstrak etanol 96% dan fraksi *n*-heksana daun galem (*M. cajuputi*).

Berdasarkan hasil profil KLT tersebut menunjukkan bahwa fase gerak *n*-heksana : etil asetat dengan perbandingan 7:3) v/v menghasilkan pemisahan yang baik dikarenakan noda memisah dengan jelas. Eluen dikatakan baik jika mampu memisahkan senyawa dalam sampel dengan karakteristik bercak yang jelas sehingga mempermudah dalam perhitungan nilai *retention factor* dan berada pada rentang 0,2 – 0,9 (Forestryana & Arnida, 2020). Dari profil kromatogram dapat diketahui beberapa senyawa yang dapat larut dalam ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana apabila dielusi dengan fase gerak *n*-heksana : etil asetat (7:3) v/v. Beberapa senyawa mengalami perpendaran apabila dideteksi dengan UV 366 nm, begitu juga dengan adanya perubahan warna dan jumlah senyawa ketika disemprot dengan H₂SO₄ 10%. Hasil uji skrining kimia diketahui bahwa pada ekstrak etanol terdapat senyawa golongan alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, fenolik, dan tanin, sedangkan dalam fraksi *n*-heksana mengandung senyawa golongan alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, dan tanin. Hasil skrining kimia disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil deteksi KLT ekstrak dan fraksi daun *M. cajuputi*

Golongan Senyawa	Ekstrak Etanol	Fraksi <i>n</i> -Heksana
Alkaloid	+	+
Steroid	+	+
Terpenoid	+	+
Flavonoid	+	+
Fenolik	+	-
Tanin	+	+

Ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* diuji aktivitas antiinflamasi menggunakan metode penghambatan denaturasi protein. Protein yang digunakan untuk uji ini yaitu *Bovine Serum Albumin* (BSA) dengan pelarut *Tris-Buffered Saline* (TBS), dimana ketika BSA dipanaskan akan menyebabkan denaturasi protein. *Bovine Serum Albumin* dilarutkan dalam larutan TBS karena dapat membantu mempertahankan pH larutan sehingga larutan selalu dalam kondisi yang stabil. Uji aktivitas antiinflamasi pada penelitian ini melalui pencampuran larutan BSA dengan larutan uji melalui pemanasan dengan suhu 70°C, dimana larutan mengalami perubahan dari bening menjadi keruh. Hal tersebut menunjukkan bahwa senyawa protein yang terdapat di larutan uji telah terdenaturasi yaitu terjadinya perubahan pada struktur protein (Saraswati *et al.*, 2024). Keadaan tersebut menyebabkan terganggunya atau hilangnya struktur sekunder, tersier, dan kuaterner, tanpa pemutusan ikatan kovalen pada protein (Mulyani *et al.*, 2023).

Kontrol positif yang digunakan pada uji ini yaitu natrium diklofenak. Natrium diklofenak digunakan sebagai kontrol positif karena memiliki efek yang cepat dalam mengatasi inflamasi, selain itu obat ini bersifat non selektif dalam mekanismenya, serta memiliki kelarutan yang baik dalam air maupun pelarut organik (Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022). Natrium diklofenak terbukti dapat mengikat albumin dan menjadikan protein lebih stabil dan tidak terdenaturasi (Ratri *et al.*, 2022). Hasil pengujian antiinflamasi terhadap kontrol positif dan sampel uji disajikan pada tabel 2.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ natrium deklofenac dan sampel uji daun *M. Cajuputi*

Sampel	IC ₅₀ (ppm)			IC ₅₀ Rata-Rata	SD	%RSD
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3			
Natrium Diklofenak	14,948	14,879	15,003	14,948	0,062	0,004
Ekstrak etanol	51,894	51,188	51,644	51,577	0,358	0,007
Fraksi <i>n</i> -heksana	62,134	61,553	61,437	61,700	0,373	0,006

Berdasarkan nilai IC₅₀ sampel pada uji aktivitas antiinflamasi menggunakan uji penghambatan denaturasi protein yaitu didapatkan nilai IC₅₀ dari yang terkecil hingga paling terbesar diantaranya adalah natrium diklofenak (14,948 ppm), ekstrak etanol daun *M. cajuputi* (51,577 ppm), fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* (61,700 ppm). Perbedaan nilai IC₅₀ yang didapatkan disebabkan oleh penyebaran golongan senyawa metabolit sekunder berdasarkan kepolarannya. Hasil tersebut menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksana memiliki nilai IC₅₀ yang lebih besar dari ekstrak etanol maupun natrium diklofenak, dimana semakin besar nilai IC₅₀ maka semakin kecil aktivitasnya sebagai anti inflamasi. Beberapa hal yang mendasari diantaranya adalah, 1) senyawa-senyawa dalam fraksi *n*-heksana banyak mengandung komponen yang kurang berpotensi sebagai antiinflamasi seperti klorofil, lemak, protein, atau golongan terpen tertentu yang tidak aktif sebagai antiinflamasi, 2) adanya sifat sinergisme pada senyawa yang terdapat pada fraksi *n*-heksana dengan senyawa yang tidak larut pada pelarut *n*-heksana tidak terjadi karena telah berpisah berdasarkan tingkat kepolarannya (Harborne, 1987), 3) beberapa sifat senyawa yang mudah menguap pada fraksi *n*-heksana sebagian hilang saat diuapkan dengan pemanasan, terutama golongan terpen dengan struktur yang kecil seperti eugenol, lemonen, eucaliptol, maupun sineol (Bakkali *et al.*, 2008; Rosmainar *et al.*, 2023), dan (4) ekstrak lebih banyak mengandung senyawa aktif dibanding fraksi yang berkontribusi terhadap aktivitas antiinflamasi daripada fraksi yang hanya mengandung sebagian kecil senyawa dari ekstrak jika pada jumlah sampel yang sama antara ekstrak dan fraksi (Hakim & Sugijanto, 2014; Rahmadani & Nasution, 2021).

Senyawa bahan alam seperti golongan flavonoid terbukti secara *in vivo* dan *in vitro* mampu menstabilkan membran lisosom dan menghambat proses enzimatik selama inflamasi. Senyawa flavonoid memiliki aktivitas antiinflamasi dengan mekanisme kerjanya melalui penghambatan degranulasi neutrofil, penghambatan aktivitas enzim siklooksigenase (COX), dan lipooksigenase sehingga tidak terbentuk mediator inflamasi seperti prostaglandin (Maifitrianti *et al.*, 2019). Senyawa yang mampu menghambat inflamasi apabila dalam strukturnya memiliki gugus hidroksil dan ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat berikatan dengan residu asam amino pada struktur protein (*bovine serum albumin*), sehingga senyawa tersebut mampu menstabilkan struktur protein yang disebabkan oleh pengaruh pemanasan (Latief *et al.*, 2021; Fadlilaturrahmah *et al.*, 2022).

Hasil uji aktivitas antiinflamasi berdasarkan nilai IC₅₀ natrium diklofenak, ekstrak, dan fraksi *n*-heksana daun *M. cajuputi* pada masing-masing replikasi yang dilakukan uji statistik menggunakan *software* IBM SPSS Statistic 25 yaitu didapatkan hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* yang menunjukkan data nilai IC₅₀ natrium diklofenak, ekstrak, dan fraksi daun *M. cajuputi* terdistribusi normal dengan *p-value* ≥ 0,050 masing-masing sebesar 0,876; 0,681; dan 0,727. Hasil uji *Levene homogeneity statistic*

diperoleh bahwa nilai IC₅₀ natrium diklofenak, ekstrak, dan fraksi daun *M. cajuputi* dengan nilai *p-value* sebesar 0,039 ($p < 0,050$) artinya data tidak homogen sehingga tidak bisa dilanjutkan dengan uji *one way* ANOVA, dan analisis dilanjutkan ke tahap analisis uji nonparametrik yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* IC₅₀ natrium diklofenak, ekstrak, dan fraksi daun *M. cajuputi* yaitu didapatkan nilai *p-value* sebesar 0,012 ($p < 0,050$) artinya terdapat perbedaan bermakna pada tiap data hasil IC₅₀ sehingga perlu dilanjutkan ke uji *Mann-Whitney* untuk mengetahui perbedaan spesifik dari tiap kelompok uji. Hasil uji dengan menggunakan uji *Mann-Whitney* didapatkan nilai *p-value* 0,050 ($p \leq 0,050$) pada perbandingan setiap sampel uji. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna antara natrium diklofenak dengan ekstrak maupun ekstrak dengan fraksi (Ihsan *et al.*, 2021). Ekstrak etanol maupun fraksi *n*-heksana terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi, meskipun aktivitasnya masih lebih rendah dibandingkan natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Ekstrak maupun fraksi berpotensi dikembangkan sebagai agen antiinflamasi alami, namun efektivitasnya belum sebanding dengan obat standar.

Kesimpulan

Ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana memiliki senyawa golongan alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, serta tanin. Aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol dan fraksi *n*-heksana menggunakan metode denaturasi protein secara berturut-turut memiliki nilai IC₅₀ sebesar 51,577 ppm; dan 61,700 ppm sehingga berpotensi untuk digunakan sebagai agen antiinflamasi.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Universitas Lambung Mangkurat melalui LPPM yang telah mendukung penelitian ini melalui pendanaan program Dosen Wajib Meneliti Tahun 2025.

Daftar Pustaka

- Astika, R. Y., F. Sani K & Elisma. 2022. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni*) pada Mencit Putih Jantan. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 8: 14–23.
- Audina, M., Yuliet & K. Khaerati. 2018. Efektivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Sumambu (*Hyptis capitata* Jacq.) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus* L.) yang Diinduksi Dengan Karagenan. *Biocelbes*. 12: 17–23.
- Bakkali F., S. Averbeck, D. Averbeck, & M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol*, 46 (2) : 446-75
- Chen, L., H. Deng, H. Cui, J. Fang, Z. Zuo, J. Deng, Y. Li, X. Wang & L. Zhao. 2017. Inflammatory Responses and Inflammation-Associated Diseases in Organs. *Oncotarget*. 9: 1–15.
- Fadlilaturrahmah, F., J. Amilia, Y. Sukmawaty & N. Wathan. 2022. Identifikasi Fitokimia dan Uji Aktivitas Antiinflamasi *In Vitro* Fraksi *N*-Heksana Kapur Naga (*Calophyllum soulattri* Burm F) dengan Metode Uji Penghambatan Denaturasi Protein Menggunakan Spektrofotometer Uv-Vis. *Jurnal Pharmascience*. 9: 355-367.
- Forestryana, D. & Arnida. 2020. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. 11: 113-124.
- Ge, J., Z. Liu, Z. Zhong, L. Wang, X. Zhuo, J. Li, X. Jiang, X. Ye, T. Xie, R. Bai. 2022. Natural terpenoids with anti-inflammatory activities: Potential leads for anti-inflammatory drug discovery. *Bioorganic Chemistri* (124), 105817
- Hakim, L. & N. E. N. Sugijanto. 2014. Aktifitas Antimikroba Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etil Asetat yang Diisolasi dari *Aglaia Odorata* Lour. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*. 3: 29–34.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia*. ITB, Bandung.

- Ihsan, H., I. S. Pratama & N. I. Hanifa. 2021. Uji Aktivitas Antiinflamasi Infusa Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa* L.) secara In Vitro. *Acta Pharmaciae Indonesia : Acta Pharm Indo.* **9**: 21–30.
- Isnaini, A. Biworo, H. Khatimah, K. M. Gufron & S. R. Puteri. 2021. Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Ekstrak Galam (*Melaleuca cajuputi* Subsp. *Cumingiana* (Turcz.) Barlow) Terhadap Bakteri *E.coli* Dan Jamur *C. albicans*. *Journal Od Agromedicine and Medical Sciences.* **7**: 79–83.
- Latief, M., A. T. Fisesa, P. M. Sari & I. L. Tarigan. 2021. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) pada Mencit Terinduksi Karagenan. *Jurnal Farmasi Sains Dan Praktis.* **7**: 144–153
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2017. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi II.* Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Maifitrianti, L. R. Sjahid, Nuroh, R. A. M. Acepa & W. D. Murti. 2019. Aktivitas Antiinflamasi Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol 95% dari Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.) pada Tikus Putih Jantan. *Pharmaceutical Journal of Indonesia.* **16**: 1–16.
- Mulyani, T., S. Setyahadi & A. E. Wibowo. 2023. Uji Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia).* **20**: 26–32.
- Munadi, R., Jasmiadi & E. Rossalinda Ruslan. 2024. Uji Aktivitas Antioksidan Hasil Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Ilalang (*Imperata cylindrica* Linn.) dengan Metode DPPH. *Cokroaminoto Journal of Chemical Science.* **6**: 1–4.
- Muthia, F., S. Sukmawati & F. Fitriana. 2023. Antibacterial Activity of Ethanol Extract of Qust Al Hindi Plant Root (*Saussurea lappa*) Against Bacteria *Staphylococcus aureus* And *Escherichia coli* By TLC-Bioautography. *Journal Microbiology Science.* **3**: 20–29.
- Rahmadani, D. & H. M. Nasution. 2021. Potensi Antioksidan Fraksi Etil Asetat dan Fraksi N-Heksana Ekstrak Etanol Kulit Buah Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) terhadap Penangkalan Radikal Bebas. *FARMASAINKES: Jurnal Farmasi, Sains, Dan Kesehatan.* **1**: 28–37.
- Ratri, L. K., C. D. A. Nugraha, N. H. Rahma & D. N. Afifah. 2022. Potensi Tangkai Terong (*Solanum melongena*) sebagai Immune Booster. *Journal of Nutrition College.* **11**: 105–113.
- Rosmainar L, W. Nugroho, I.N. Sudyana, N. Ayuhecaria. 2023. Senyawa Minyak Atsiri Dari Tumbuhan Galam (*Melaleuca* sp). *Jurnal Cendekia Kimia* 01 (02) : 93-98.
- Saraswati I., Muslimin, Farmaditya E.P., Hardia, Renni Y., Rahma Y.N., Alviona D.A., Tangkas M.P., Vinka D.A, Novi K. 2024. Pengaruh Waktu Pemanasan Dan Pengasaman Terhadap Kadar Albumin Ekstrak Ikan Gabus. *JPHPI*, 27 (2) : 104-111.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2014). *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* Wiley.
- Tiwari, P., Kaur, M. and Kaur, H. (2011) "Phytochemical screening and extraction: A review." *International Pharmaceutica Scientia*, 1(1) : 98–106
- Wardhani, A. H. Ramadani, F. Widyaningrum & V. Famelia. 2023. The Effect of Extraction Method on Total Flavonoid Content of *Ageratum conyzoides* Ethanol Extract. *Journal Of Biology Education.* **6**: 136–148