

Kadar Total Flavonoid dan Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Etanol Secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roxb.) Terhadap Penghambatan Denaturasi Protein *Bovien Serum Albumin*

Tukiran,^{1*} Suyatno,¹ Fauzia Indah Sabila,¹ Anisa Kurnia Sari¹

¹ Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya, Indonesia.

Corresponding author: tukiran@unesa.ac.id

Article history

Received: 28 November 2023

Received in revised form: 14 July 2023

Accepted: 14 July 2023

DOI:

10.17977/um0260v7i12023p031

Kata-kata kunci:

Antiinflamasi

Flavonoid

Denaturasi protein

Jahe merah

Secang

Abstrak

Inflamasi merupakan suatu respon protektif yang ditimbulkan oleh kerusakan jaringan salah satunya akibat dari denaturasi protein. Formulasi polih herbal memiliki aktivitas farmakologi yang dapat bekerja dinamis untuk menghasilkan manfaat terapeutik maksimal dengan efek samping minimal. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kadar total flavonoid dan aktivitas antiinflamasi dari ekstrak tunggal secang (ES) dan jahe merah (EJ) serta kombinasi kedua ekstrak tersebut, yaitu: formulasi F1 (1ES:1EJ), F2 (2ES:1EJ), dan F3 (1ES:2EJ). Penelitian ini termasuk penelitian eksperimental dan dilakukan secara *in vitro*. Ekstraksi secang dan jahe merah dilakukan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Penentuan kadar total flavonoid dilakukan menggunakan metode reaksi aluminium klorida dengan kuarsetin sebagai standart. Pengujian aktivitas antiinflamasi dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode denaturasi protein BSA dengan natrium diklofenak sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar total flavonoid dari ekstrak secang sebesar 37.96 ± 0.27 mgQE/g ekstrak dan ekstrak jahe merah sebesar 26.51 ± 0.79 mgQE/g ekstrak. Aktivitas antiinflamasi berdasarkan kekuatan nilai

IC₅₀ dapat dilaporkan sebagai berikut: natrium diklofenak ($9,360 \pm 0,154$ ppm) > secang ($109,289 \pm 0,889$ ppm) > F2 (2ES:1EJ) ($117,659 \pm 1,245$ ppm) > F1 (1ES:1EJ) ($130,026 \pm 1,661$ ppm) > F3 (1ES:2EJ) ($150,610 \pm 1,266$ ppm) > jahe merah ($160,356 \pm 2,468$ ppm). Hasil analisis statistika terkait nilai IC₅₀ menunjukkan perbedaan yang signifikan pada semua sampel (dengan $p=0,000$). Dengan demikian, ekstrak tunggal secang dan jahe merah serta kombinasi kedua ekstrak tumbuhan tersebut memiliki potensi sebagai antiinflamasi.

Abstract

Inflammation is a protective response caused by tissue damage, one of which is the result of protein denaturation. Polyherbal formulations have pharmacological activity that can work dynamically to produce maximum therapeutic benefits with minimal side effects. The purpose of this study was to determine the total contents of flavonoids and anti-inflammatory activity of single extracts of secang (ES) and red ginger (EJ) and the combination of the two extracts, namely: formulations F1 (1ES:1EJ), F2 (2ES:1EJ), and F3 (1ES:2EJ). This research is an experimental research and carried out *in vitro*. Secang and red ginger extraction was carried out using the maceration method with 96% ethanol. Determination of total flavonoid content was carried out using the reaction method of aluminum chloride with quercetin as a standard. Testing of anti-inflammatory activity was carried out *in vitro* using the BSA protein denaturation method with diclofenac sodium as a positive control. The results showed that the total flavonoid content of secang extract was 37.96 ± 0.27 mgQE/g extract and red ginger extract was 26.51 ± 0.79 mgQE/g extract. Anti-inflammatory activity based on the strength of the IC₅₀ value can be reported as follows: diclofenac sodium (9.360 ± 0.154 ppm) > secang (109.289 ± 0.889 ppm) > F2 (2ES:1EJ) (117.659 ± 1.245 ppm) > F1 (1ES:1EJ) (130.026 ± 1.661 ppm) > F3 (1ES:2EJ) (150.610 ± 1.266 ppm) > red ginger (160.356 ± 2.468 ppm). The results of the statistical analysis related to the IC₅₀ value showed a significant difference in all samples (with $p=0.000$). Thus, the single extract of sappan and red ginger and the combination of the two plant extracts have potential as anti-inflammatories.

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan suatu respon protektif yang muncul akibat kerusakan jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, zat kimia atau zat mikrobiologis [1]. Inflamasi dibedakan menjadi inflamasi kronis (merupakan bentuk peradangan jangka panjang) dan inflamasi akut (merupakan bentuk peradangan jangka pendek) [2]. Namun, peradangan kronis telah dilaporkan terlibat dalam perkembangan berbagai penyakit, seperti rinitis alergi [3], dermatitis atopik [4], dan rheumatoid arthritis [5].

Rheumatoid arthritis (RA) merupakan penyakit inflamasi yang ditandai dengan pembengkakan sendi, peradangan membran sinovial, dan kerusakan tulang rawan [6]. Denaturasi protein jaringan merupakan salah satu penyebab RA yang terdokumentasi dengan baik. Denaturasi protein menyebabkan protein kehilangan struktur sekunder dan tersiernya melalui perubahan ikatan hidrogen elektrostatik, hidrofobik, dan disulfida sehingga mengarah pada produksi autoantigen pemicu penyakit inflamasi seperti RA [7]. Oleh karena itu, senyawa yang dapat mencegah denaturasi protein dimanfaatkan untuk pengembangan obat anti-inflamasi [8].

Obat anti-inflamasi nonsteroid (NSAID) merupakan obat yang diperhitungkan dalam pencegahan denaturasi protein. NSAID digunakan dalam pengobatan inflamasi karena efektivitasnya yang terbukti dapat mengurangi rasa sakit dan peradangan [9]. Akan tetapi, NSAID memiliki beberapa efek samping terutama iritasi lambung yang memicu terjadinya tukak lambung [10] dan kerusakan ginjal [11]. Akibatnya, pencarian alternatif pengobatan inflamasi dengan tanaman herbal dianggap lebih aman karena bersifat biodegradable, alami, memiliki efek samping minimal, mudah diakses, dan relatif terjangkau [12]. Adapun beberapa spesies tanaman yang telah dipelajari kemanjurannya dalam pengobatan inflamasi diantaranya adalah secang dan jahe merah yang memiliki peran penting mengurangi rasa sakit dan peradangan terkait penyakit RA [13-14].

Secang mengandung konstituen fitokimia dengan beragam struktur senyawa jenis fenolik, yaitu: xanthone, kumarin, kalkon, flavon, homoisoflavonoid, dan brazilin [15], sappanone [16], caesalpinaphenol E dan F [17],

sappanchalcone [18], dan brazilein [19]. Selain itu, juga ada senyawa jenis triterpenoid dan steroid, seperti campsterol, stigmasterol, dan β -sitosterol [19]. Konstituen fitokimia utama yang ada di kayu secang adalah brazilin yang sejauh ini dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis, yaitu: vasorelaxant [20], antikanker [21], anti-inflamasi [22], dan juga digunakan dalam pengobatan RA [13]. Kemudian, ada beberapa senyawa yang ditemukan pada jahe merah telah efektif menghilangkan gejala penyakit radang kronis. Jahe merah mengandung beberapa senyawa bioaktif, yaitu: 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, 8-shogaol, 10-shogaol, zingerone, 6-paradol, 6- dan 10-dehydrogingerdione, serta 6- dan 10-gingerdione [23]. Aktivitas farmakologi utama jahe merah tampaknya disebabkan oleh gingerol dan shogaol [24]. Efek farmakologis dari jahe merah meliputi analgetik, anti-inflamasi, antikanker, anti-diabetes, hepatoprotektif, pelindung nefron, dan antioksidan [25].

Ditinjau dari uji praklinik terkait aktivitas anti-inflamasi dari kedua tanaman di atas, maka dapat dilakukan pengembangan uji anti-inflamasi menggunakan kombinasi antara tanaman secang dan jahe merah sebagai sediaan obat herbal. Formulasi polih herbal atau kombinasi ekstrak lebih dari satu tanaman herbal diyakini memiliki aktivitas farmakologi yang sinergis dan dapat bekerja sama secara dinamis untuk menghasilkan manfaat terapeutik maksimal dengan efek samping minimal [26]. Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk mengetahui potensi anti-inflamasi dari kombinasi ekstrak etanol kayu secang dan jahe merah melalui metode denaturasi protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) secara *in vitro*.

METODE

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, labu ukur, cawan Buchner, pompa vacuum, micropipette, neraca analitik, pH-meter, waterbath, vortex, vacuum rotatory evaporator, dan Spektrofotometer UV-Vis. Bahan-bahan yang digunakan antara lain: kayu secang, rimpang jahe merah, etanol 96%, etanol p.a, metanol p.a., aquades, kuersetin, $AlCl_3$, CH_3COOK , Tris Base (*tris*(hydroxymethyl)aminomethane), NaCl, CH_3COOH , dan natrium diklofenak.

Pembuatan Ekstrak Etanol Secang dan Jahe Merah

Sebanyak 500 mg serbuk kering kayu secang dan jahe merah masing-masing dimaserasi dengan 1000 mL pelarut etanol 96% selama 24 jam. Perlakuan maserasi ini diulangi sebanyak 3 kali. Maserat disaring. Filtrat dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* didapatkan masing-masing ekstrak pekat etanol secang dan jahe merah.

Penentuan Kadar Total Flavonoid

Penetapan kadar total flavonoid dengan metode alumunium klorida dilakukan dengan mengacu pada prosedur berikut [27] dengan beberapa modifikasi. Pengujian kadar total flavonoid diawali dengan pembuatan larutan standart kuersetin 1000 ppm dari 25 mg kuersetin yang dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a. Selanjutnya, larutan kuersetin 1000 ppm diencerkan menjadi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm untuk penentuan kurva standart. Kemudian, untuk larutan uji dibuat dari 25 mg ekstrak secang dan jahe merah masing-masing dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a untuk menghasilkan larutan uji 1000 ppm. Sebanyak 0,5 mL larutan kuersetin dalam berbagai konsentrasi dan larutan uji masing-masing ditambahkan 1,5 mL etanol p.a., 0,1 mL AlCl_3 10%, 0,1 mL CH_3COOK 1M, dan 2,8 mL aquades. Setelah itu, campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang dan dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang optimum.

Penentuan Aktivitas Anti-Inflamasi

Pada penelitian ini, sampel yang digunakan adalah natrium diklofenak sebagai kontrol positif dan beberapa larutan uji berupa ekstrak secang (ES), ekstrak jahe merah (EJ), dan tiga formula hasil kombinasi dua ekstrak tersebut, yaitu: F1 (1ES:1EJ), F2 (2ES:1EJ), dan F3 (1ES:2EJ). Larutan kontrol positif dibuat dari 25 mg natrium diklofenak yang dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a. (1000 ppm), kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm. Larutan uji dibuat dari 25 mg (ekstrak secang, ekstrak jahe merah, dan tiga formula hasil kombinasi dari dua ekstrak tersebut dalam F1, F2 dan F3) masing-masing dilarutkan dalam 25 mL etanol p.a sehingga dihasilkan larutan uji 1000 ppm, kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Selanjutnya, pelarut etanol p.a

sebagai kontrol negatif, berbagai konsentrasi larutan kontrol positif dan larutan uji diambil masing-masing sebanyak 500 μL , ditambahkan larutan 0,2% BSA (dalam pelarut tris buffer saline dengan pH 6,4) hingga volume mencapai 5 mL. Setiap larutan tersebut diinkubasi pada suhu 25 °C selama 30 menit, kemudian dipanaskan selama 5 menit pada suhu 72 °C di dalam *water bath*, dan didinginkan selama 25 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, larutan divortex dan dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 660 nm. Persentase penghambatan (% inhibisi) terhadap denaturasi protein diukur menggunakan persamaan menurut [28] berikut:

$$\frac{\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}}{\text{absorbansi kontrol negatif}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y), sehingga didapatkan nilai IC_{50} dari kombinasi ekstrak secang dan jahe merah dan natrium diklofenak. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas anti-inflamasi [28].

Analisis Data

Analisis statistika data kadar total flavonoid disajikan dalam Mean \pm SD dan dibandingkan dua kelompok dengan analisis uji-t independent pada tingkat kepercayaan 95%. Sementara itu, analisis data aktivitas anti-inflamasi dari nilai IC_{50} disajikan dalam Mean \pm SD dan dibandingkan pada masing-masing kelompok dengan *one-way analysis of variance* (ANOVA) dilanjutkan dengan uji *Post Hoc-Tukey* menggunakan program SPSS ver. 25. Perbedaan yang signifikan antar kelompok ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Total Flavonoid

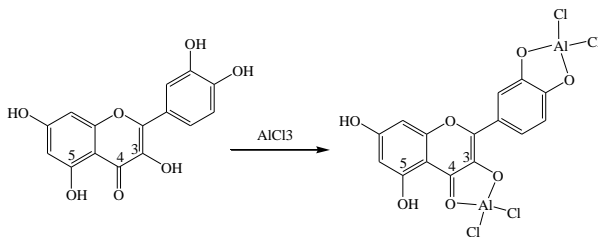
Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang dapat berfungsi sebagai anti-oksidan dalam tubuh sehingga baik untuk melindungi struktur sel, anti-inflamasi, dan sebagai antibiotik [29]. Penentuan kadar total flavonoid dilakukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis. Kuersetin digunakan sebagai senyawa standart karena senyawa flavonoid ini paling banyak ditemukan pada tumbuhan [30]. Pengukuran nilai absorbansi kuersetin sebagai standart dengan konsentrasi 10-50 ppm dilakukan pada panjang

gelombang optimum (435 nm). Adapun nilai absorbansi standart kuersetin disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai Absorbansi Standart Kuersetin

Kuersetin (ppm)	Absorbansi
10	0.072
20	0.150
30	0.218
40	0.297
50	0.379

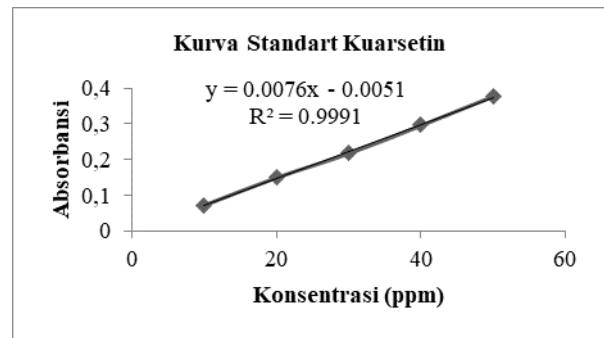
Berdasarkan data pada tabel 1 diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi larutan kuersetin, semakin besar nilai absorbansi. Hal tersebut disebabkan reaksi dari gugus keto pada C4 dan gugus hidroksil pada C3 atau C5 dari flavon atau flavonol bereaksi dengan AlCl₃ untuk membentuk senyawa kompleks dengan gugus *ortho*-dihidroksi dari senyawa flavonoid [31]. Semakin tinggi konsentrasi kuarsetin maka semakin besar kemungkinan senyawa kompleks yang terbentuk sehingga warna larutan uji semakin pekat dan mempengaruhi nilai absorbansi yang semakin besar pada pengujian spektrofotometer UV-VIS. Selain itu, fungsi penambahan kalium asetat untuk menstabilkan senyawa kompleks yang terbentuk [32].



Gambar 1 : Reaksi Pembentukan Senyawa Kompleks antara AlCl₃ dengan Suatu Flavonol [33]

Data absorbansi standart kuersetin digunakan untuk membuat kurva standart. Diperoleh persamaan regresi linier, yaitu $y = 0.0073x - 0.014$ dengan nilai $r = 0,999$. Dengan demikian, koefisien korelasi (r) yang diperoleh telah memenuhi kriteria keberterimaan linieritas pada suatu pengujian, yaitu $r \geq 0,999$ [34].

Persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva standart kuersetin sebagaimana ditunjukkan pada Gambar 2 digunakan untuk menghitung kadar total flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol secang dan jahe merah. Hasil penentuan kadar total flavonoid ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 2. Kurva Standart Kuarsetin

Tabel 2. Kadar Total Flavonoid Larutan Uji

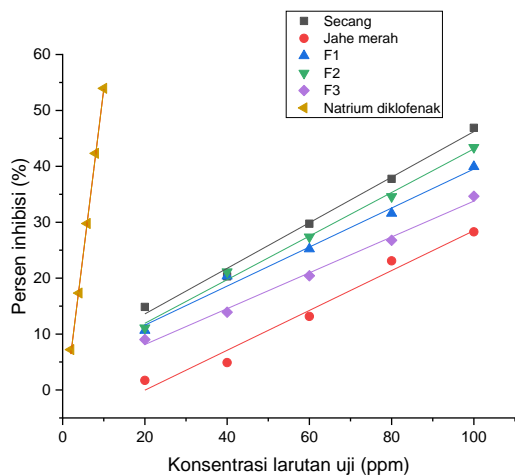
Sampel	Kadar Flavonoid (mgQE/g)
Secang	37.96 ± 0.27**
Jahe Merah	26.51 ± 0.79**
$p = 0.000$	

** menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$)

Aktivitas Antiinflamasi

Upaya identifikasi aktivitas anti-inflamasi pada tanaman obat banyak dilakukan dengan uji peradangan model *in vitro* dan *in vivo*. Namun, terdapat masalah terkait etika penggunaan hewan coba dan waktu pengujian yang relatif lama dalam penelitian farmakologis eksperimental menjadikan uji *in vivo* jarang digunakan [35]. Oleh karena itu, model *in vitro* dipilih untuk mempelajari respons seluler dalam sistem tertutup dengan mempertahankan kondisi eksperimen. Pengujian aktivitas anti-inflamasi dalam penelitian ini menggunakan metode denaturasi protein, yang diketahui merupakan salah satu penyebab inflamasi yang mengarah pada pembentukan antigen. Denaturasi protein menyebabkan perubahan struktur tiga dimensi protein karena gangguan pada interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan disulfidanya sehingga menyebabkan berkurangnya aktivitas enzimatik dan fungsi biologis protein yang memicu produksi autoantigen [36]. Proses denaturasi pada penelitian ini disebabkan oleh induksi panas yang meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul-molekul penyusun protein bergerak dan bergetar sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan hidrogen serta interaksi hidrofobik non polar protein [37]. Pada penelitian ini digunakan kontrol positif berupa natrium diklofenak, yaitu obat anti-inflamasi golongan non steroid yang bekerja secara non selektif dan memiliki kelarutan yang baik dengan air maupun pelarut organik [38]. Adapun persentase penghambatan (% inhibisi) denaturasi

protein dapat disajikan pada Gambar 3 dan Tabel 3.



Gambar 3. Grafik persen inhibisi (%) denaturasi protein terhadap konsentrasi larutan uji

Tabel 3. Aktivitas anti-inflamasi dari larutan uji (sampel)

Sampel	Konse ntrasi (ppm)	% Inhibisi ± SD	Persamaan Regresi Linier	IC50 ± SD
Ekstrak Secang (ES)	20	14.855 ± 0.388	$y = 0.4076x + 5.4542$ $R^2 = 0.9937$	109.289 ± 0.889**
	40	20.308 ± 1.559		
	60	29.743 ± 0.935		
	80	37.766 ± 0.200		
	100	46.889 ± 0.611		
Ekstrak Jahe Merah (EJ)	20	1.723 ± 0.212	$y = 0.3565x - 7.1627$ $R^2 = 0.9767$	160.356 ± 2.468**
	40	4.898 ± 0.330		
	60	13.158 ± 1.542		
	80	23.089 ± 0.536		
	100	28.283 ± 0.242		
F1 (1ES:1EJ)	20	10.665 ± 0.090	$y = 0.349x + 4.6207$ $R^2 = 0.9894$	130.026 ± 1.661**
	40	20.364 ± 1.477		
	60	25.233 ± 0.797		
	80	31.599 ± 0.218		
	100	39.950 ± 0.648		
F2 (2ES:1EJ)	20	11.116 ± 0.455	$y = 0.3899x + 4.1304$ $R^2 = 0.9946$	117.659 ± 1.245**
	40	21.151 ± 0.859		
	60	27.384 ± 0.648		

		0.117		
	80	34.584 ± 0.315		
	100	43.391 ± 0.147		
F3 (1ES:2EJ)	20	9.018 ± 0.511	$y = 0.3206x + 1.719$ $R^2 = 0.9937$	150.610 ± 1.266**
	40	13.917 ± 0.197		
	60	20.423 ± 0.140		
	80	26.769 ± 0.094		
	100	34.654 ± 0.010		
Natrium Diklofenak	2	7.213 ± 1.456	$y = 5.9223x - 5.4163$ $R^2 = 0.9987$	9.360 ± 0.154**
	4	17.341 ± 0.097		
	6	29.764 ± 0.540		
	8	42.326 ± 0.505		
	10	53.944 ± 1.271		

** menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui bahwa persen inhibisi denaturasi protein terhadap sampel bergantung pada konsentrasi sampel. Semakin besar konsentrasi sampel larutan uji, semakin besar pula persen inhibisi denaturasi protein. Menurut Williams [28], larutan uji yang memiliki persen inhibisi denaturasi protein di atas 20% dapat dikatakan memiliki aktivitas anti-inflamasi. Pada Tabel 3 ditunjukkan bahwa ekstrak secang (ES), F1, F2 dan F3 memiliki persen inhibisi > 20% pada konsentrasi lebih dari 40 ppm, sedangkan ekstrak jahe (EJ) memiliki persen inhibisi > 20% pada konsentrasi 80 ppm. Sementara, natrium diklofenak memiliki persen inhibisi > 20% pada konsentrasi 6 ppm. Hasil persen inhibisi denaturasi protein dari masing-masing sampel selanjutnya digunakan untuk menentukan persamaan regresi linier yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi sampel larutan uji dan persen inhibisi. Dari persamaan regresi linier tersebut dihitung nilai IC50 dari masing-masing sampel larutan uji. Nilai IC50 merupakan konsentrasi saat persen inhibisi denaturasi protein terjadi mencapai nilai 50%. Nilai IC50 menunjukkan efektivitas sampel larutan uji dalam menghambat denaturasi protein [28].

Hasil analisis menggunakan ANOVA satu arah dapat dilaporkan bahwa nilai IC50 dari natrium diklofenak, ES, EJ, F1, F2, dan F3 berbeda secara signifikan dengan ($p = 0,000$). Analisa data dilanjutkan dengan uji lanjut Post Hoc dan Tukey

yang masing-masing sampel larutan uji menunjukkan memiliki perbedaan nilai IC50 yang signifikan dan juga nilai IC50 dari masing-masing sampel bervariasi. Berdasarkan Tabel 3, natrium diklofenak memiliki aktivitas anti-inflamasi tertinggi dengan nilai IC50 9.360 ± 0.154 ppm, sedangkan ekstrak jahe merah memiliki aktivitas anti-inflamasi terendah dengan nilai IC50 160.356 ± 2.468 ppm. Adapun kekuatan aktivitas antiinflamasi berdasarkan hasil perhitungan IC50 berturut-turut, yaitu: natrium diklofenak > ekstrak secang > F2 > F1 > F3 > ekstrak jahe merah.

Natrium diklofenak diketahui memiliki kemampuan intrinsik untuk menstabilkan atau mencegah denaturasi protein dengan mempengaruhi perubahan konformasi yang dialami oleh protein saat diberi perlakuan panas pada pH fisiologis 6,2-6,5, yaitu pH yang dapat dicapai pada jaringan dalam kondisi inflamasi [39]. Kerja obat-obatan golongan NSAID (misal natrium diklofenak) dalam mencegah terjadi peradangan adalah dengan menghambat produksi prostaglandin pada metabolisme asam arakidonat dan menghalangi aktivitas enzim siklooksigenase [40-41].

Aktivitas inflamasi dari ekstrak etanol secang, jahe merah dan kombinasi keduanya tentu berkaitan dengan kandungan senyawa metabolit yang dikandung dalam ekstrak tersebut khususnya senyawa fenolik dan flavonoid. Berdasarkan pada pengujian kadar total flavonoid diketahui bahwa kandungan flavonoid dari ekstrak secang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak jahe merah. Hasil tersebut berpengaruh terhadap aktivitas anti-inflamasi dari larutan uji, dimana ekstrak secang memiliki aktivitas anti-inflamasi lebih besar dibandingkan dengan ekstrak jahe merah. Oleh karena itu, aktivitas anti-inflamasi dari kombinasi kedua ekstrak, dimana formulasi dengan perbandingan ekstrak secang lebih banyak memiliki aktivitas anti-inflamasi lebih besar, yaitu F2 (2ES:1EJ) > F1 (1ES:1EJ) > F3 (1ES:2EJ). Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa senyawa fenolik dan flavonoid berkontribusi secara nyata dan signifikan terhadap aktivitas anti-inflamasi dari banyak tanaman obat [42]. Flavonoid dapat mencegah denaturasi protein melalui interaksi antara flavonoid dengan asam amino pada aromatik tirosin, alifatik treonin dan daerah residu lisin dari protein BSA [28]. Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa flavonoid menghambat sintesa prostaglandin [43], siklooksigenase-2 (COX2), sintase oksida nitrat

[44], dan degranulasi neutrophil yang memicu mediator inflamasi [45]. Flavonoid juga diketahui menginduksi aktivitas anti-inflamasi dengan meredamkan radikal bebas [46].

Penelitian [47] menunjukkan bahwa ekstrak secang dan jahe merah juga mengandung senyawa fenolik yang memiliki kemampuan mengikat kation dan biomolekul lain, sehingga menstabilkan protein akibat adanya perlakuan panas [48]. Menurut penelitian [49] menegaskan peningkatan stabilitas protein termal dipicu oleh interaksi antara senyawa fenolik dengan glisin pada protein BSA. Interaksi fenol dengan situs pengikat protein sangat mempengaruhi struktur sekunder protein dengan menciptakan serangkaian interaksi hidrofobik yang selanjutnya dilengkapi dengan ikatan hidrogen. Hal tersebut mendukung penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa fenolik memiliki kemampuan untuk melindungi protein globular terhadap stress fisik atau kimia [50]. Selain itu, senyawa fenolik dapat memberikan efek modulasi pada biomarker seluler terkait dengan stress oksidatif dan peradangan sehingga mampu mengurangi pula peradangan yang didasarkan pada peristiwa berikut, yaitu tindakan langsung sebagai antioksidan, interferensi dalam pensinyalan stress oksidatif dan akhirnya penekanan transduksi pensinyalan pro-inflamasi [51]. Penelitian [52] menunjukkan bahwa ekstrak etanol secang, jahe merah dan kombinasi keduanya memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH. Hal tersebut menunjukkan adanya hubungan antara aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Peradangan dan oksidasi memiliki kaitan yang erat karena protein dalam tubuh rentan terhadap denaturasi yang disebabkan oleh terbentuknya radikal bebas yang menyebabkan mekanisme inflamasi dengan merangsang pelepasan mediator inflamasi [53].

KESIMPULAN

Dapat disimpulkan bahwa kadar total flavonoid dalam ekstrak secang lebih tinggi dari ekstrak jahe merah. Dilaporkan bahwa semua sampel larutan uji mencakup natrium diklofenak, ekstrak secang, ekstrak jahe merah, F1, F2 dan F3 memiliki aktivitas antiinflamasi dengan persen inhibisi terhadap denaturasi protein lebih dari 20%. Bioaktivitas antiinflamasi (IC50) dari sampel larutan uji menunjukkan perbedaan yang signifikan (dengan $p=0,000$) pada masing-masing sampel. Aktivitas antiinflamasi berdasarkan hasil perhitungan IC50 berturut-turut adalah natrium

diklofenak > ekstrak secang > F2 > F1 > F3 > ekstrak jahe merah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Direktorat Riset, Teknologi, dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset, dan Teknologi, Kemendikbud untuk dukungan pendanaan pada fiscal tahun 2022 melalui SK Rektor Nomor 313/UN38/HK/PP/2022 pada tanggal 16 Maret 2022. Penelitian ini dapat terlaksana atas fasilitas Laboratorium Jurusan Kimia, Universitas Negeri Surabaya, dan bantuan Laboratorium Farmasi, Unair.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. A. T. S. Dewi, N. M. D. Puspawati, and P. Suarya. (2015). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Eter Kulit Batang Tengkulun (*Protium javanicum* Burm) Terhadap Edema Pada Tikus Wistar Yang Diinduksi Dengan Karagenan, *Jurnal Kimia*, 1(1), 13–19. 2015.
- [2] M. Murakami and T. Hirano. (2012). The Molecular Mechanisms of Chronic Inflammation Development, *Frontiers in Immunology*, 3(323), 1–2.
- [3] S. C. Weninger and B. A. Yankner. (2001). Inflammation and Alzheimer Disease: The Good, The Bad, and The Ugly, *Nature Medicine*, 7(5), 527–528.
- [4] R. A. Flavell. (2002). The Relationship of Inflammation and Initiation of Autoimmune Disease: Role of TNF Super Family Members, *Current Topics in Microbiology Immunology*, 266(1), 1–9.
- [5] C. Christodoulou and E. H. Choy. (2006). Joint Inflammation and Cytokine Inhibition in Rheumatoid Arthritis, *Clinical and Experimental Medicine*, 6(1), pp. 13–19.
- [6] M. Sajida *et al.* (2017). Investigations on antiinflammatory And Analgesic Activities of *Alnus nitida* Spach (Endl) Stem Bark in *Sprague Dawley* Rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 198(1), 407–416.
- [7] R. Aichour, N. Benzidane, L. Arrar, N. Charef, and A. Baghiani. (2018). Hepatoprotective and Antiinflammatory Activities of Algerian *Capparis spinosa* L, *Annual Research & Review in Biology*, 25(3), 1–12.
- [8] S. Chandra, P. Chatterjee, P. Dey, and S. Bhattacharya. (2012). Evaluation of in Vitro Antiinflammatory Activity of Coffee Against The Denaturation of Protein, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), S178–S180.
- [9] P. A. Insel. (1996). *Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout*. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman A, editors. *The Pharmacological Basics of Therapeutics*. 9th ed. New York: McGraw Hill.
- [10] M. Marliyah and T. Ananthi, (2015). In Vitro Anti Inflammatory Activity of Extract of *Zea mays* (L.). *Journal of Global Biosciences*, 4(5), 2168–2173.
- [11] V. Sharma, Himanshu, and D. N. S. Gautam. (2018). In Vitro Antiinflammatory Activity of Unpurified and Purified Manahshila, *Asian Journal of Pediatric Practice*, 4(1), 179–183.
- [12] E. Umopathy, E. J. Ndebia, A. Meeme, B. Adam, P. Menziwa, B. N. Nkeh-Chungag and J.E. Iputo. (2010). An Experimental Evaluation of *Albuca setosa* Aqueous Extract on Membrane Stabilization, Protein Denaturation and White Blood Cell Migration During Acute Inflammation, *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(9), 789–795.
- [13] E. G. Jung, K. I. Han, S. G. Hwang, H. J. Kwon, B. B. Patnaik, Y. H. Kim and M. D. Han. (2015). Brazilin Isolated from *Caesalpinia Sappan* L. Inhibits Rheumatoid Arthritis Activity in a Type-II Collagen Induced Arthritis Mouse Model, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(124), 1–11.
- [14] S. M. Ezzat, M. I. Ezzat, M. M. Okba, E. T. Menze, and A. B. Abdel-Naim. (2018). The hidden mechanism beyond ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Potent In Vivo and In Vitro Antiinflammatory Activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 214, 113–123.
- [15] Nirmal, S. Mithun, Rajput, G. S. V. Rangabhatla, Prasad, and A. Mehraj. (2015). Brazilin from *Caesalpinia sappan* heartwood and Its Pharmacological Activities: A review,” *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8(6), 421–430.
- [16] M. J. Chu, Y. Z. Wang, K. Itagaki, H. X. Ma, P. Xin, X. G. Zhou, G. Y. Chen, S. Li and S. Q. Sun. (2013). Identification of Active Compounds from *Caesalpinia sappan* L. extracts Suppressing IL-6 Production in

- RAW 264.7 Cells by PLS, *Journal of Ethnopharmacology*, 148(1), 37–44.
- [17] B. S. Min, T. D. Cuong, T. M. Hung, B. K. Min, B. S. Shin, and M. H. Woo. (2012). Compounds from The Heartwood of *Caesalpinia sappan* and Their Antiinflammatory Activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(24), 7436–7439.
- [18] E. G. Jung *et al.* (2015). Antiinflammatory Activity of Sappanchalcone Isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a Collagen-Induced Arthritis Mouse Model, *Archives of Pharmacal Research*, 38(6), 973–983.
- [19] A. N. Bukke, F. N. Hadi, and C. S. Produtur. (2015). Comparative Study of In Vitro Antibacterial Activity of Leaves, Bark, Heart Wood and Seed Extracts of *Caesalpinia sappan* L., *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(11), 903–907.
- [20] Y. Yan *et al.*, (2015). Brazilin Isolated from The Heartwood of *Caesalpinia sappan* L. Induces Endothelium-Dependent and Independent Relaxation of Rat Aortic Rings, *Acta Pharmacologica Sinica*, 56(1), 1318–1326.
- [21] L.-Y. Tao, J. Li, and J. Zhang. (2013). Brazilin, a Compound Isolated from *Caesalpinia sappan* Linn., Induced Growth Inhibition in Breast Cancer Cells via Involvement of GSK-3 β /b-Catenin/cyclin D1 Pathway, *Chemico-Biological Interactions*, 206(1), 1–5.
- [22] K. J. Kim, K. Y. Yoon, H. S. Yoon, S. R. Oh, and B. Y. Lee. (2015). Brazilin Suppresses Inflammation through Inactivation of IRAK4-NF- κ B Pathway in LPS-Induced Raw264.7 Macrophage Cells, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 27589–27598.
- [23] J. E. Chrubasik, B. D. Roufogalis, and D. Chrubasik. (2007). Evidence of Effectiveness of Herbal Antiinflammatory Drugs in The Treatment of Painful Osteoarthritis and Chronic Low Back Pain, *Phytotherapy Research*, 21(7), 675–683.
- [24] B. A. Mir *et al.* (2015). A Review on Pharmacological Properties of Zingerone (4-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone), *The scientific World Journal*, 2015(6), 1–6.
- [25] A. Mbaveng and V. Kuete. (2017). *Zingiber officinale*. In: *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. Amsterdam: Elsevier.
- [26] Barik, Kanungo, Tripathy, Panda, and Padhi. (2015). A review on Therapeutic Potential of Polyherbal Formulations, *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 7(3), 211–228.
- [27] W. Puspita and H. Puspasari. (2021). Kadar Flavonoid Total dan Nilai Spf Ekstrak Etanol Daun Buas-Buas (*Premna serratifolia* L.) Asal Kabupaten Melawi Provinsi Kalimantan Barat, *Jurnal Ilmu Farmasi dan Farmasi Klinik*, 18(1), 24–30.
- [28] L. A. D. Williams *et al.* (2008). The In Vitro Antidenaturation Effects Induced by Natural Products and Non-Steroidal Compounds in Heat Treated (Immunogenic) Bovine Serum Albumin Is Proposed As a Screening Assay for The Detection of Antiinflammatory Compounds, Without The Use of Animals, *The West Indian Medical Journal*, 57(4), 327–351.
- [29] A. R. Ahmad, J. Juwita, and S. A. D. Ratulangi. (2015). Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Metanol Buah dan Daun Patikala (*Etilingera elatior* (Jack) R.M.SM), *Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(1), 1–10.
- [30] I. Ipandi, L. Triyasmono, and B. Prayitno (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun kajajahi (*Leucosyke capitellata* Wedd.), *Jurnal Pharmascience*, 3(1), 93–100.
- [31] Y. M. Ni'mah. (2020). Penentuan Kadar Senyawa Flavonoid Ekstrak Kombinasi Buah Anggur, Tin, Delima, dan Zaitun Menggunakan Analisis Spektrofotometri UV-Vis, Skripsi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- [32] M. Fawwaz, D. S. Muliadi, and A. Muflihunna. (2017). Kedelai Hitam (*Glicine soja*) Terhidrolisis Sebagai Sumber Flavonoid Total, *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(1), 194–198.
- [33] A. Fadillah, A. Rahmadani, and L. Rijai. (2017). Analisis Kadar Total Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelubut (*Passiflora foetida* L.), *Proceeding of the 5th Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 21–28.
- [34] A. Rochman. (2016). *Validasi dan penjaminan mutu metode analisis kimia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- [35] D. E. Ermawati. (2020). Sun Protecting Factor dan In Vivo ZnO Terdispersi Dalam

- Sediaan Nanoemulgel, *Jurnal Farmasetika*, 4(1), 233–239.
- [36] W. D. Ratnasooriya, J. R. A. C. Jayakody, and R. Pathirana. (2015). In Vitro Antirheumatoid Arthritic Activity of Sri Lankan Orthodox Black Tea (*Camellia sinensis* L.), *International Journal of Pharmacy Practice and Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 93–98.
- [37] M. R. T. Aditya, D. Marisa, and E. Suhartono (2015) Potensi Antiinflamasi Jus Buah Manggis (*Garcinia mangostana*) Terhadap Denaturasi Protein In Vitro, *Jurnal Berkala Kedokteran*, 11(2), 149–156.
- [38] Remington. (2005) *The Science and Practice of Pharmacy 21st Edition*, Lippincott Williams&Wlkins. Washington DC.USA.
- [39] S. W. Hajare, S. Chandra, J. Sharma, S. K. Tandan, J. Lal, and A. G. Telang. (2001). Antiinflammatory activity of *Dalbergia sissoo* Leaves, *Fitoterapia*, 72(2), 131–139.
- [40] T. Hutaaruk, A. Rosita, and I. Oktavianawati. (2014). Sintesis Asam 2-(2-(n-(2,6-diklorofenil)-4 fluorobenzamida)fenil) asetat sebagai Kandidat Obat Penghambat COX (siklooksigenase), *Jurnal Pustaka Kesehatan*, 2(2), 215–220.
- [41] G. Sangeetha and R. Vidhya. (2016). In Vitro Antiinflammatory Activity of Different Parts of *Pedaliium murex* (L.), *International Journal of Herbal Medicine Journal*, 4(3), 31–6.
- [42] C. Marrassini, I. Peralta, and C. Anesini. (2018). Comparative study of the Polyphenol Content-Related Antiinflammatory and Antioxidant Activities of Two *Urera aurantiaca* Specimens from Different Geographical Areas, *Chinese Medicine*, 13(22), 1–12.
- [43] A. Chatterjee, B. Sen, S. Das, and T. K. Chatterjee. (2015). Antiinflammatory and analgesic Activity of Methanolic Extract of Medicinal Plant *Rhodiola rosea* L, *Rhizomes*, 4(2), 1–8.
- [44] L. L. Marchand. (2002). Cancer preventive effects of flavonoids: a review, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 296–301.
- [45] E. J. R. Middleton, C. Kandaswami, and T. C. Theoharides. (2000). The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer, *Pharmacological Reviews*, 52(4), 673–751.
- [46] V. Sasikumar, A. Subramaniam, A. Aneesh, and G. Saravanan. (2015). Protective Effect of Alkaloids from *Amaranthus viridis* Linn. Against Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Damage in Human Erythrocytes (RBC), *International Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.*, 1(1), 49–53.
- [47] R. T. Amalia, Tukiran, F. I. Sabila, and Suyatno. (2021). Phytochemical Screening and Total Phenolic Compounds of Red Ginger (*Zingiber officinale*) and Secang Wood (*Caesalpinia sappan*) As Preliminary Test of Antiarthritis, *Chimica et Natura Acta*, 9(1), 14–19.
- [48] F. Alhakmani, S. A. Khan, and A. Ahmad. (2014). Determination of Total Phenol, In Vitro an Tioxidant and Antiinflammatory Activity of Seeds and Fruits of *Zizyphus spina* Christi Grown in Oman, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(2), S656–S660.
- [49] M. Ali *et al.* (2012). Characterization and modeling Of The Interactions Between Coffee Storage Proteins and Phenolic Compounds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(46), 11601–11608.
- [50] G. Paun *et al.* (2018). Antiinflammatory and antioxidant Activities of The Impatiens Noli-Tangere and *Stachys officinalis* Polyphenolic-Rich Extracts, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 28(1), 57–64.
- [51] H. Zhang and R. Tsao. (2016). Dietary Polyphenols, Oxidative Stress and Antioxidant and Antiinflammatory Effects, *Current Opinion in Food Science*, 8(1), 33–42.
- [52] D. K. Putri, Tukiran, Suyatno, and F. I. Sabila. (2021). Antioxidant Activity from The Combination Ethanol Extract Secang Wood (*Caesalpinia sappan* L.) and Red Ginger Rhizome (*Zingiber officinale* Roxb.), *International Joint Conference on Science and Engineering 2021*, Universitas Negeri Surabaya, 209, 143–147.
- [53] V. M. Adarsh, K. P. Ajay, D. Kavitha, and K. B. Anurag. (2011). Anti Denaturation and Antioxidant Activities of *Annona cherimola* In Vitro, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(2), 1–6.