

Penelitian

ISOLASI SENYAWA STEROID DARI TANAMAN *GYNURA PSEUDOCHINA* (LOUR) DC DAN UJI AKTIVITAS ANALGETIKA TERHADAP MENCIT JANTAN (*MUS MUSCULUS*)

Roby Pahala Januario Gultom

Staf Pengajar Prodi D-III Keperawatan STIKes Imelda Medan, Jalan Bilal Nomor 52 Medan

E-mail: robi.gultom@gmail.com

ABSTRAK

The secondary metabolites have been isolated from nonpolar fraction of methanol extract of *Gynura pseudochina* (Lour) DC plants. The extraction was done by maseration. Separation and purification were done by column chromatography. The isolated compound was a white solids with melting point 123 °C-125°C. The structure of this compound was determined based on spectral evidence including IR, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HSQC, HMBC and COSY. The spectral data analysis were suggested that the isolated compound is a mixture of two steroids which is stigmast-5-en-3-ol or β-sitosterol as a major compound. The analgesic activity of the isolated compound was tested in male mice by writhing test method with 1% acetic acid as the pain-inducer. The isolated compound showed that pain-inhibition activity were 56,2 % for 2 mg/20 g BB dose and 67 % for 4 mg/20 g BB dose. The analgesic activity of the isolated compound is lower than the aspirin.

Key words: *Gynura pseudochina* (Lour) DC; Steroid; Stigmast-5-en-3-ol; analgesic activity.

ABSTRAK

Telah dilakukan isolasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi nonpolar ekstrak metanol tanaman *Gynura pseudochina* (Lour) DC. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Pemisahan dan pemurnian senyawa hasil isolasi dilakukan dengan kromatografi kolom. Senyawa isolasi berupa padatan berwarna putih dengan titik leleh 123°C-125°C. Struktur dari senyawa hasil isolasi ditentukan berdasarkan data spektroskopi meliputi IR, ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HSQC, HMBC dan COSY. Berdasarkan analisa data spektrum, senyawa hasil isolasi merupakan campuran dua senyawa steroid, dimana senyawa stigmast-5-en-3-ol atau dikenal dengan nama lain β-sitosterol merupakan senyawa mayor. Senyawa hasil isolasi selanjutnya diuji aktivitas analgetiknya pada mencit jantan dengan metode geliat dengan asam asetat 1% sebagai pemberi rasa nyeri. Hasilnya, senyawa memiliki aktivitas menekan rasa nyeri untuk dosis 2 mg/20g BB sebesar 56,2 % dan dosis 4 mg/20 g BB sebesar 67 %. Aktivitas analgetika dari kedua dosis ini di bawah aktivitas aspirin.

Kata kunci: *Gynura Pseudochina* (Lour) DC; Steroid; Stigmast-5-en-3-ol; Aktivitas Analgetika.

PENDAHULUAN

Pada saat ini pemanfaatan tanaman untuk mengobati berbagai penyakit telah banyak diterapkan oleh masyarakat karena khasiat yang dihasilkannya sama baiknya dengan mengkonsumsi obat-obatan yang diolah secara modern yang cenderung lebih

mahal. Penggunaan obat-obatan untuk mengobati penyakit dapat juga memberikan efek samping yang kurang baik bagi tubuh apabila mengkonsumsinya dengan jumlah dosis yang berlebihan.

Secara umum penyakit yang ada di dalam tubuh dapat menimbulkan rasa nyeri yang membuat keadaan penderita merasa

tidak nyaman. Adanya respon tubuh terhadap nyeri dapat diartikan sebagai tanda adanya gangguan jaringan pada tubuh (Tjay dan Rahardja, 2002). Untuk meringankan bahkan menghilangkan rasa nyeri yang memberikan efek ketidaknyamanan pada penderita digunakan obat-obat analgetika.

Tanaman *Gynura pseudochina* (Lour) DC dapat berkhasiat sebagai tanaman obat dan dapat digunakan sebagai analgetika (Badan POM, 2001). Kandungan metabolit sekunder yang terdapat di dalam tanaman *G. Pseudochina* (Lour) DC antara lain flavonoid, terpenoid, steroid, alkaloid, tanin, saponin, polifenol, minyak atsiri serta asam fenolat (Harrizul, 2011; Herwindriandita dkk, 2006; Nirwan dan Aziz, 2006; dan Zaini, 2006). Uji analgetika terhadap ekstrak *Gynura procumbens* (Lour) Merr dan *Gynura segetum* (Lour) Merr memberikan hasil bahwa pemberian ekstrak tanaman tersebut dapat efektif menghambat respon rasa nyeri (Suhendi dkk, (2003) dan Putri dkk, (2009)).

Berdasarkan literatur bahwa uji aktivitas analgetika dari tanaman *Gynura* tersebut masih sebatas pada penggunaan ekstrak tanamannya saja. Namun senyawa-senyawa yang berperan aktif sebagai analgetika yang terkandung di dalam ekstrak tanaman tersebut belum diketahui secara pasti. Berdasarkan tinjauan adanya kandungan metabolit sekunder pada tanaman *G. pseudochina* (Lour) DC dan pemanfaatannya sebagai analgetika, maka dari itu perlu dilakukan isolasi senyawa dari ekstrak tanaman *G. pseudochina* (Lour) DC dan melakukan uji aktivitas analgetika dari senyawa hasil isolasinya tersebut.

METODE

Alat

Alat yang digunakan seperangkat alat destilasi, *rotary evaporator* R-114 Buchi dengan sistem vakum Buchi B-169, *chamber*, timbangan, KCV (Kromatografi Cair Vakum), lampu UV CAMAG 254 nm, kromatografi kolom gavitasi, alat pengukur titik leleh Fisher John, peralatan gelas. Spektrofotometer NMR Agilent DD2 (500 MHz untuk ^1H -NMR dan 125 MHz untuk ^{13}C -NMR), NMR 2D, FTIR Perkin ELMER *Spectrum One*,

spidol, spatula, sarung tangan plastik, *syringe* jarum suntik injeksi, *timer*, wadah mencit (kandang), *hot plate*, kamera *digital*, dan oral sonde tikus, lumpang.

Bahan

Bahan yang dibutuhkan sampel daun tanaman *Gynura pseudochina* (Lour) DC yang sudah kering, mencit jantan, pelarut metanol, n-heksana, etil asetat, kloroform, aseton, aquadest, silika gel 60 GF₂₅₄, silika gel 60G. Plat KLT Kiessel gel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, 20 x 20 cm, asam asetat glasial p.a, aspirin, karboksimetil selulosa (CMC), aqua pro-injeksi Otsuka, kapas, alkohol 70%, dan penampak noda (serium sulfat).

Pengambilan dan Penyiapan Tanaman

Sampel tanaman *Gynura pseudochina* (Lour) DC diperoleh dan dikumpulkan dari Bandung. Bagian sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daunnya, yang sudah dikeringkan terlebih dahulu. Determinasi tanaman ditentukan oleh Herbarium Bogoriense, Bidang Botani Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong.

Prosedur Kerja

Ekstraksi Senyawa Metabolit

Sekunder

Sebanyak 1 kilogram serbuk kering daun, dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol sebanyak 3 liter selama 3 hari. Masing-masing ekstrak metanol yang diperoleh dipisahkan dari sampel dengan cara disaring dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* namun tidak sampai pekat dan disimpan di dalam wadah tertutup. Kemudian masing-masing ekstrak metanol tersebut selanjutnya digabungkan sehingga diperoleh ekstrak metanol total hasil maserasi, yang selanjutnya dipekatkan kembali dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat metanol total kemudian disimpan di dalam vial tertutup.

Uji Fitokimia

Uji Alkaloid

Sejumlah ekstrak pekat metanol dilarutkan dengan kloroform, selanjutnya ditambahkan larutan amoniak 5% dalam kloroform, kemudian diteteskan asam sulfat 2 N, campuran dikocok selama 1 menit. Setelah itu akan terbentuk dua lapisan, untuk selanjutnya dipisahkan lapisan atas dan lapisan bawahnya. Terhadap lapisan atas untuk selanjutnya diteteskan ke dalam beberapa tabung reaksi untuk diuji dengan pereaksi Meyer, pereaksi Wagner dan pereaksi Dragendroff. Positif adanya alkaloid dari masing-masing pereaksi ditunjukkan dengan adanya endapan.

Uji Terpenoid/Steroid

Lapisan bawah dari ekstrak kloroform pada uji alkaloid selanjutnya diuji menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard dengan cara menambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat pada lapisan bawah dari ekstrak kloroform tersebut, kemudian dibiarkan hingga kering. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes asam sulfat pekat, perubahan warna yang terjadi diamati. Adanya triterpenoid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah. Sedangkan adanya steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehijauan.

Pemisahan Senyawa Metabolit Sekunder

Sebanyak 20 g ekstrak pekat metanol dilakukan pemisahan dengan cara kromatografi cair vakum (KCV). Kromatografi kolom vakum menggunakan fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan dielusi pelarut dengan menggunakan kepolaran yang meningkat, dimulai dari fraksi nonpolar sampai fraksi polar yaitu: n-heksana : etil asetat (10:0 sampai 0:10), etil asetat : metanol (9:1 dan 8:2) dan metanol 100%.

Hasil pemisahan (eluat) ditampung dan dianalisis pola nodanya menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Eluat yang mempunyai pola noda yang sama digabung menjadi satu fraksi, sehingga didapatkan beberapa jumlah fraksi. Semua fraksi dianalisis pola nodanya kembali menggunakan KLT. Visualisasi noda

dilakukan dengan menggunakan lampu UV dan serium sulfat. Fraksi yang berpotensi dilakukan pemisahan dengan teknik kromatografi kolom untuk selanjutnya diperoleh senyawa murni hasil isolasi.

Uji Kemurnian Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi dilakukan uji kemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan berbagai sistem eluen. Kemurnian senyawa ditandai dengan menunjukkan satu noda pada KLT. Uji kemurnian selanjutnya dilakukan dengan mengukur titik leleh senyawa hasil isolasi dengan menunjukkan nilai *range* di bawah 2° C.

Penentuan Struktur Senyawa Hasil Isolasi

Senyawa hasil isolasi selanjutnya ditentukan struktur senyawanya dengan menggunakan spektroskopi UV, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR dan NMR 2D.

Uji Aktivitas Analgetika

Uji Aktivitas analgesik dilakukan dengan metode rangsangan kimia. Sebagai penginduksi nyeri digunakan larutan asam asetat 1%.

Persiapan Hewan Uji

Mencit jantan (*Mus musculus*) dengan berat badan kurang lebih 20-30 g diperoleh dari STIH ITB, Bandung. Sebelum digunakan mencit diadaptasikan dilaboratorium selama 2 minggu. Pada penelitian ini kelompok perlakuan dibagi ke dalam tiga kelompok, yang terdiri dari kelompok uji, kelompok pembanding (kontrol positif) dan kelompok kontrol negatif. Sebelum percobaan, mencit terlebih dahulu dipuaskan selama kurang lebih 10 jam, namun pemberian air minum tetap dilakukan.

Terhadap mencit dalam kelompok uji masing-masing diberikan senyawa isolasi dengan dosis 1 mg/20 g BB, 2 mg/20 g BB dan dosis 4 mg/20 g BB. Terhadap mencit kelompok pembanding diberikan aspirin dengan dosis 1,3 mg/20g BB yang berasal dari konversi dosis aspirin untuk usia orang dewasa terhadap mencit 20 g dengan pemberian dosis 0,5 ml untuk setiap 20 g BB. Mencit dalam kelompok kontrol negatif,

hanya diberikan larutan suspensi CMC 0,5% dengan volume pemberian setiap mencit yaitu 0,5 ml.

Pembuatan Larutan Asam Asetat 1% dan Suspensi CMC 0,5%

Diambil 1 ml asam asetat glasial dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan aqua pro-injeksi. Pembuatan suspensi CMC 0,5% di dalam 100 ml dilakukan dengan menimbang 500 mg CMC, ditaburkan di atas aquadest (30 ml) yang sudah dipanaskan dan dibiarkan sampai mengental sekitar 5-10 menit, kemudian diaduk sampai homogen, ditambahkan dengan aquadest sedikit dan diaduk kembali dengan cepat sampai terbentuk gel suspensi, kemudian diencerkan dengan aquadest ke dalam labu ukur 100 ml (Asteya, 2010).

Pembuatan Sediaan Senyawa Uji dan Aspirin

Untuk sediaan pembanding (aspirin), sebanyak 0,25 g CMC ditaburkan di atas aquadest (20 ml) yang sudah dipanaskan dan dibiarkan sampai mengental sekitar 5-10 menit. Kemudian diaduk sampai homogen, ditambah sedikit aquadest dan diaduk kembali dengan cepat sampai terbentuk gel suspensi kemudian ditambahkan gel suspensi tersebut sedikit demi sedikit ke dalam 0,5 g aspirin yang telah dihaluskan, kemudian ditambahkan sedikit aquadest, diaduk dengan cepat sehingga terbentuk suspensi dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu diencerkan dengan aquadest.

Untuk pembuatan sediaan uji, sebanyak 0,05 g CMC ditaburkan di atas aquadest (5 ml) yang sudah dipanaskan dan dibiarkan sampai mengental sekitar 5-10 menit, kemudian diaduk sampai homogen, ditambah sedikit aquadest dan diaduk kembali dengan cepat sampai terbentuk gel suspensi kemudian ditambahkan gel suspensi tersebut sedikit demi sedikit ke dalam 0,1 g sampel senyawa isolasi, kemudian ditambahkan sedikit aquadest, diaduk dengan cepat sehingga terbentuk suspensi dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian diencerkan dengan aquadest.

Pelaksanaan Uji Aktivitas Analgetika

Masing-masing kelompok ditimbang tiga ekor mencit, dicatat bobotnya dan diberi tanda. Terhadap kelompok uji diberikan dosis senyawa isolasi, kemudian untuk kelompok kontrol positif diberikan dosis aspirin, dan kelompok kontrol negatif diberikan dosis CMC 0,5%, semua kelompok pemberian dosisnya secara peroral (p.o). Setelah 15-20 menit pemberian, setiap mencit dalam masing-masing kelompok disuntik dengan larutan asam asetat 1% secara intraperitoneal (i.p).

Respon geliat pada mencit diamati setiap 5 menit pertama, 5 menit kedua dan 5 menit ketiga, selanjutnya dicatat frekuensi geliat untuk semua kelompok perlakuan. Aktivitas hambatan nyeri ditentukan dengan cara mengamati penurunan frekuensi geliatnya dan data frekuensi geliat pada tiap kelompok tersebut dirata-ratakan.

Analisis Data

Penentuan Frekuensi Respon Nyeri (Geliatan)

Respon nyeri (geliatan) mencit masing-masing kelompok 5 menit pertama sampai 5 menit ketiga dijumlahkan kemudian dirata-ratakan. Dari data hasil penelitian selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metoda ANOVA serta untuk melihat pengaruh beda nyata terkecil respon geliatan dari setiap kelompok perlakuan menggunakan uji BNT.

Penentuan Hambatan Nyeri

Dari data frekuensi geliat pada mencit dalam masing-masing kelompok kecuali kelompok kontrol negatif, dihitung persentase (%) hambatan nyeri untuk mengetahui daya analgetikanya

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi Senyawa Steroid dari Tanaman *Gynura pseudochina* (Lour) DC

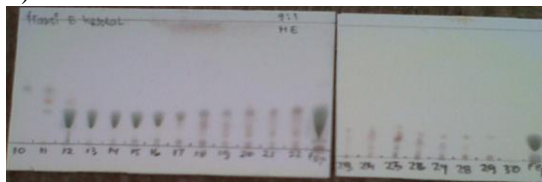
Sebanyak 1 kg serbuk kering daun dari tanaman *G. Pseudochina* (L) DC dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Hasil maserasi diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 35,71 g. Uji terpenoid/steroid dengan menggunakan

pereaksi Liebermann-Burchard menunjukkan positif terpenoid dengan munculnya warna merah dan menunjukkan positif steroid dengan munculnya warna hijau kebiruan. Uji alkaloid dengan menggunakan pereaksi Mayer, pereaksi Wagner dan pereaksi Dragendorff masing-masing menunjukkan positif alkaloid dengan adanya endapan pada masing-masing pereaksi.

Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Steroid dari Ekstrak Metanol *Gynura pseudochina* (Lour) DC

Sebanyak 20 g ekstrak pekat metanol dipisahkan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV). Hasil kromatografi cair vakum diperoleh 42 vial dan dikelompokkan menjadi sejumlah fraksi sesuai dengan pola noda yang sama dari hasil kromatografi lapis tipis. Hasil pengelompokan diperoleh 10 fraksi utama yaitu fraksi A (vial 1-6) (2,14 g), fraksi B (vial B) (0,39 g), fraksi C (vial 8-9) (0,08), fraksi D (vial 10-11) (0,46 g), fraksi E (vial 12-16) (0,62 g), fraksi F (vial 17-20) (0,53 g), fraksi G (vial 21-26) (0,78 g), fraksi H (vial 27-31) (1,04 g), fraksi I (vial 32-39) (1,79 g) dan vial J (vial 40-42) (5,05 g).

Fraksi B menghasilkan padatan yang masih berwarna hijau, selanjutnya dilakukan pencucian menggunakan n-heksana sehingga dihasilkan fraksi B (260 mg). Pemurnian terhadap fraksi B dilakukan dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan eluen n-heksana 100% dan n-heksana : etil asetat (98:2 ; 95:5 ; 9:1 ; dan 85:15). Masing-masing eluat hasil pemisahan selanjutnya dianalisis menggunakan plat KLT dengan eluen: n-heksana : etil asetat (9:1) (Gambar 1).

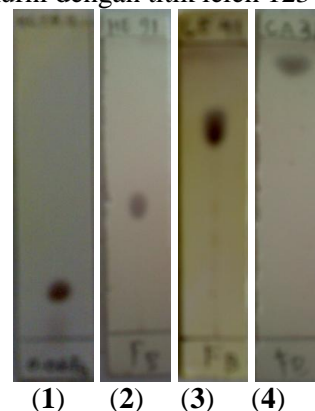


Gambar 1 . Hasil KLT pemisahan fraksi B

Eluat yang mempunyai pola noda yang sama digabungkan menjadi satu fraksi sehingga diperoleh 5 fraksi B yaitu fraksi B1 (vial 11) (0,017 g), fraksi B2 (vial 12) (0,030 g), fraksi B3 (vial 13-16) (0,165 g), fraksi B4 (vial 17-22) (0,013 g) dan fraksi B5 (vial 23-

28) (0,015 g). Fraksi B3 memperlihatkan satu noda pada plat KLT dan diperoleh berupa padatan putih sebanyak 165 mg.

Selanjutnya uji kemurnian terhadap fraksi B3 dengan KLT menggunakan berbagai sistem eluen yaitu n-heksana : kloroform (6:4) (1), n-heksana : etil asetat (9:1) (2), kloroform : etil asetat (4:1) (3) dan kloroform : aseton (3:2) (4) menghasilkan satu noda dengan Rf masing-masingnya adalah 0,17; 0,37; 0,7 dan 0,9 (Gambar 2). Hasil KLT tersebut menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi (fraksi B3) sudah cukup murni. Hasil pengukuran titik leleh juga menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi ini cukup murni dengan titik leleh 123 – 125 °C.



Gambar 2. Hasil KLT uji kemurnian senyawa hasil isolasi dengan berbagai eluen

Identifikasi Senyawa Hasil Isolasi

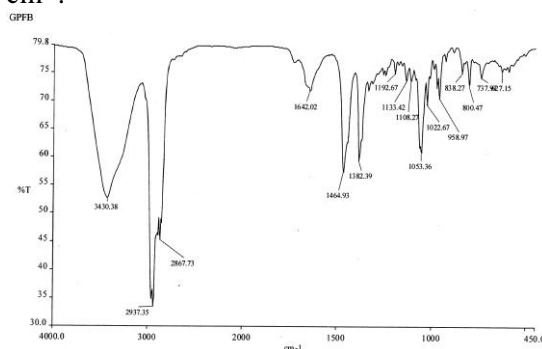
Identifikasi dengan spektrum IR

Spektrum IR (Gambar 3) menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan senyawa alifatik yang ditunjukkan tidak adanya serapan C-H aromatik pada bilangan gelombang 3000 cm^{-1} . Hal ini diperkuat dengan tidak adanya beberapa puncak khas serapan untuk gugus C=C terkonjugasi pada bilangan gelombang 1400-1600 cm^{-1} untuk senyawa aromatik, akan tetapi pada spektrum IR memperlihatkan adanya serapan yang lemah pada bilangan gelombang 1642 cm^{-1} yang berasal dari serapan C=C terisolasi yang lazimnya berasal dari senyawa alifatik.

Dugaan selanjutnya bahwa senyawa hasil isolasi adalah senyawa alifatik, didukung dengan adanya serapan kuat pada bilangan gelombang 2933 cm^{-1} yang

merupakan vibrasi ulur asimetri dari C-H dan 2869 cm^{-1} yang merupakan vibrasi ulur simetri dari C-H. Keberadaan serapan C-H ini didukung dengan munculnya vibrasi tekuk dari C-H pada bilangan gelombang 1463 dan 1384 cm^{-1} .

Spektrum IR juga memperlihatkan adanya serapan yang tajam yang berasal dari vibrasi ulur gugus OH pada bilangan gelombang 3430 cm^{-1} . Keberadaan gugus OH pada senyawa hasil isolasi diperkuat dengan adanya serapan yang tajam dari vibrasi ulur gugus C-O pada bilangan gelombang 1053 cm^{-1} .

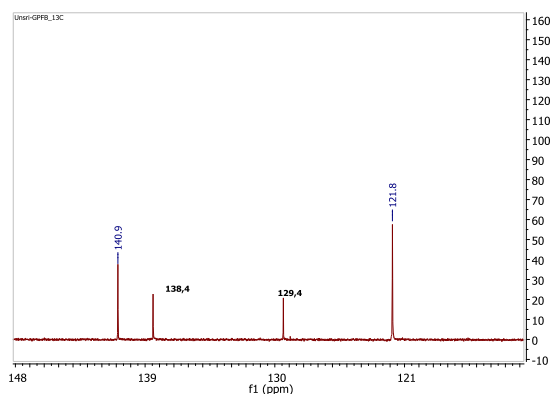


Gambar 3 . Spektrum IR senyawa hasil isolasi

Identifikasi Spektrum Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

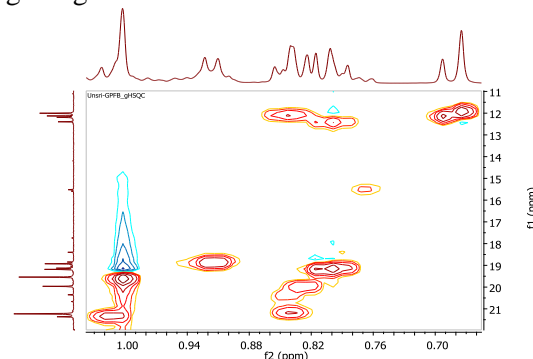
Data spektrum $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ mengindikasikan bahwa senyawa hasil isolasi merupakan campuran dua senyawa dengan perbandingan 2:1. Indikasi tersebut ditunjukkan dari spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dengan tingginya intensitas sinyal karbon kuarternar pada $\delta_{\text{C}} 140,9\text{ ppm}$ jika dibandingkan dengan intensitas sinyal karbon metin vinilik pada $\delta_{\text{C}} 138,4$ dan $129,4\text{ ppm}$.

Lazimnya intensitas karbon kuarternar (tidak mengikat proton) lebih rendah dari intensitas karbon yang mengikat proton (Gambar 4). Indikasi bahwa senyawa hasil isolasi merupakan campuran 2 : 1 ditunjukkan pada spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ dengan melihat melihat perbandingan intensitas sinyal dari karbon metin vinilik pada $\delta_{\text{C}} 121,8\text{ ppm}$ (sinyal dari campuran) dengan $\delta_{\text{C}} 138,4$ atau $129,4\text{ ppm}$ (sinyal dari senyawa minor).



Gambar 4. Spektrum $^{13}\text{C-NMR}$ karbon sp^2

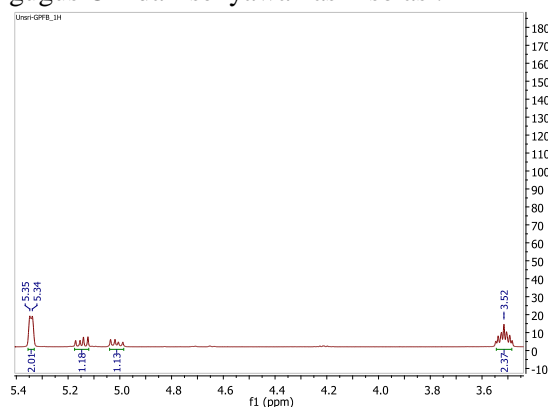
Spektrum $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ dan dengan bantuan data spektrum HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) mendukung secara tegas bahwa senyawa hasil isolasi adalah campuran. Hal ini ditunjukkan pada spektrum HSQC dengan munculnya 12 metil (CH_3), 4 diantara proton metil (CH_3) tersebut memiliki multiplisitas *singlet* yaitu pada $\delta_{\text{H}} 1,00\text{ ppm}$ (6H , *s*) untuk $\delta_{\text{C}} 19,5\text{ ppm}$ ($2 \times \text{CH}_3$) dan $\delta_{\text{H}} 0,67\text{ ppm}$ (3H , *s*) untuk $\delta_{\text{C}} 12,00\text{ ppm}$ serta $\delta_{\text{H}} 0,69\text{ ppm}$ (3H , *s*) untuk $\delta_{\text{C}} 12,19\text{ ppm}$ (Gambar 5). Lazimnya, senyawa golongan steroid mempunyai 6 gugus metil (CH_3) dengan 2 metil diantaranya memiliki multiplisitas *singlet*. Sedangkan pada senyawa hasil isolasi ini diperoleh 12 metil (CH_3), dimana 4 metil diantaranya muncul dengan multiplisitas *singlet*. Jadi hal ini memperkuat dugaan bahwa senyawa hasil isolasi adalah campuran dua senyawa yang berasal dari golongan steroid.



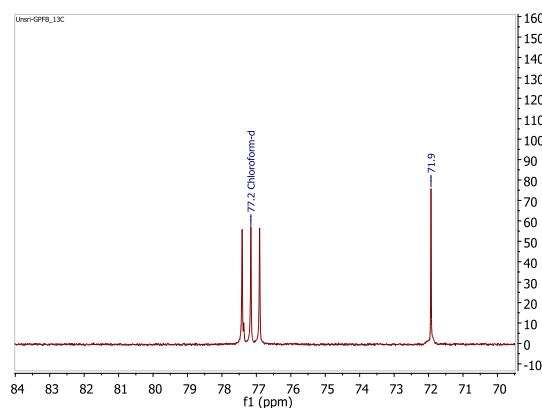
Gambar 5. Penggalan spektrum HSQC senyawa hasil isolasi

Spektrum $^1\text{H-NMR}$ memperlihatkan adanya sinyal pada $\delta_{\text{H}} 5,34\text{ ppm}$ (1H , *br d*, $J = 4,8\text{ Hz}$) yang merupakan sinyal dari proton

vinilik (proton yang terikat pada karbon sp^2 (Gambar 6). Keberadaan proton yang terikat dengan karbon sp^2 tersebut didukung oleh spektrum ^{13}C -NMR dengan munculnya sinyal pada δ_C 121,8 ppm yang khas untuk karbon sp^2 , selain itu pada spektrum 1H -NMR terdapat sinyal pada δ_H 3,52 ppm (1H, *m*) yang khas untuk proton yang terikat pada karbon yang mengikat O (oksimetin) (Gambar 7). Spektrum ^{13}C -NMR juga mendukung keberadaan karbon oksimetin yang muncul pada δ_C 71,9 ppm (Gambar 7). Adanya oksimetin ini mendukung data spektrum IR menunjukkan adanya serapan gugus OH dari senyawa hasil isolasi.



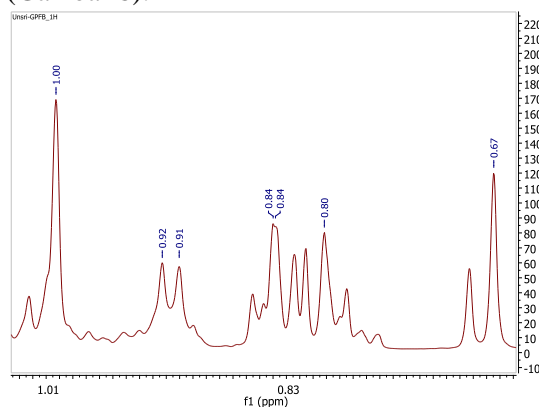
Gambar 6. Spektrum 1H -NMR proton vinilik pada δ_H 5,34 ppm



Gambar 7. Spektrum ^{13}C -NMR karbon oksimetin δ_C 71,9 ppm

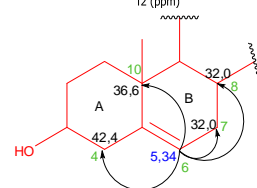
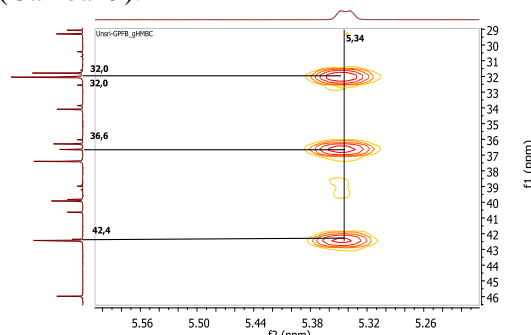
Spektrum 1H -NMR memperlihatkan adanya sinyal dari 6 buah gugus metil. Terdiri dari 2 gugus metil yang tidak terkopling yang muncul pada δ_H 0,67 ppm (3H, *s*) dan 1,00 ppm (3H, *s*). Tiga gugus metil dengan multiplisitas doublet pada δ_H 0,91 ppm (3H, *d*, $J = 6,4$ Hz); 0,83 ppm (3H,

d, $J = 6,7$ Hz) dan 0,80 ppm (3H, *d*, $J = 8,0$ Hz) dan satu gugus metil dengan multiplisitas triplet δ_H 0,84 ppm (3H, *t*, $J = 8,8$ Hz) (Gambar 8).



Gambar 8. Spektrum 1H -NMR proton metil (CH_3) pada δ_H 1,00; 0,91; 0,84; 0,83; 0,80 dan 0,69 ppm

Pada spektrum HMBC terdapat korelasi antara proton metin vinilik pada pergeseran kimia δ_H 5,34 ppm (1H, *br d*, $J = 4,8$ Hz) dengan karbon pada pergeseran δ_C 42,4 ppm (CH_2), δ_C 36,6 ppm (Cq), δ_C 32,0 ppm (CH_2), dan δ_C 32,0 ppm (CH). Namun tidak terdapat korelasi dari proton metin vinilik tersebut dengan karbon oksimetin pada δ_C 71,9 ppm. Hal ini mengindikasikan bahwa proton metin vinilik tersebut berada pada posisi C-6 (Gambar 9).

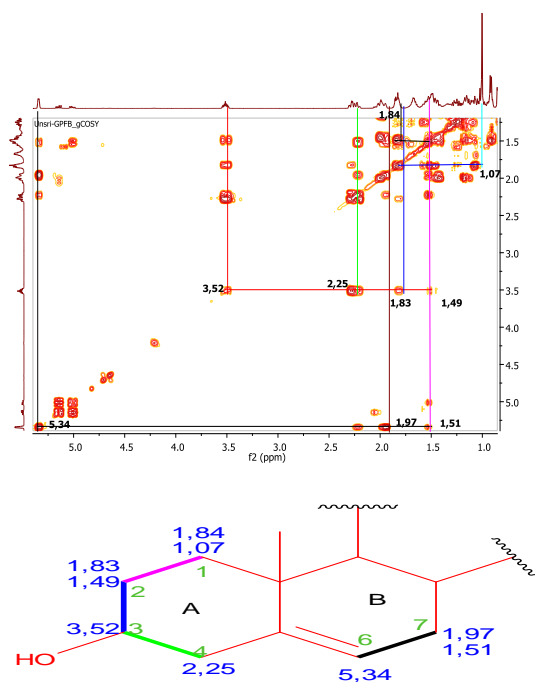


Gambar 9. Spektrum HMBC proton metin vinilik pada δ_H 5,34 ppm

Penempatan proton metin vinilik pada posisi C-6 didukung oleh spektrum COSY

yang memperlihatkan adanya korelasi antara proton metin vinilik pada δ_H 5,34 ppm dengan proton metilen (CH_2) pada δ_H 1,51 dan 1,97 ppm (C-7). Korelasi tersebut membuktikan bahwa proton metin vinilik bertetangga dengan proton metilen (CH_2) pada posisi C-7 yang mengakibatkan multiplisitas proton vinilik menjadi *broad doublet* pada spektrum 1H -NMR (Gambar 10).

Spektrum COSY memperlihatkan terdapatnya korelasi antara proton oksimetin pada δ_H 3,52 ppm dengan proton metilen pada δ_H 2,25 ppm (untuk C-4) dan dengan proton metilen pada δ_H 1,83 dan 1,49 ppm (untuk C-2) Selanjutnya spektrum COSY juga menunjukkan adanya korelasi antara proton metilen pada C-2 dengan proton metilen pada C-1. Hal ini diperlihatkan dengan adanya korelasi antara proton pada δ_H 1,83 ppm dengan δ_H 1,07 ppm dan korelasi antara proton pada δ_H 1,49 ppm dengan δ_H 1,84 ppm (Gambar 10).



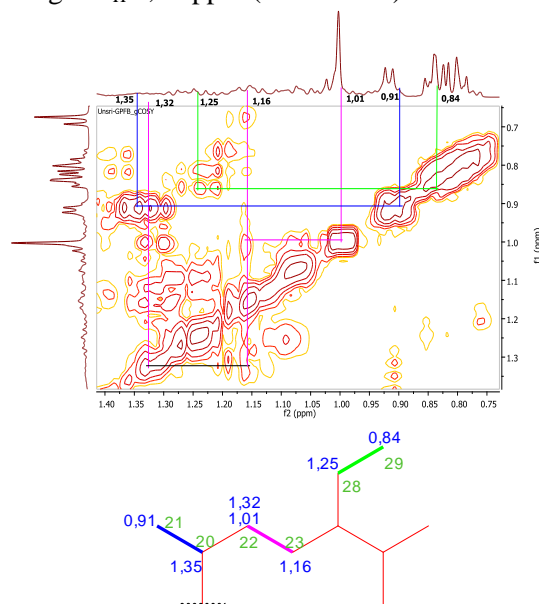
Gambar 10. Spektrum COSY proton metin vinilik pada δ_H 5,34 ppm; proton oksimetin pada δ_H 3,52 ppm dan proton metilen (CH_2) pada δ_H 1,83 dan 1,49 ppm

Korelasi antara proton-proton metilen (CH_2) dan metil (CH_3) pada rantai samping steroid ditunjukkan berdasarkan spektrum

COSY. Spektrum COSY memperlihatkan adanya korelasi antara sinyal proton pada δ_H 1,32 ppm (H-22) dan δ_H 1,01 ppm (H-22) dengan proton pada δ_H 1,16 ppm (H-23) (Gambar 11).

Spektrum 1H -NMR menunjukkan terdapat satu gugus metil yang memiliki multiplisitas triplet berada pada daerah δ_H 0,84 ppm (3H, *t*, $J=8,8$ Hz) ditempatkan pada posisi C-29 pada rantai samping steroid. Berdasarkan dukungan spektrum COSY menunjukkan adanya korelasi antara proton δ_H 0,84 ppm dengan proton metilen (CH) tetangganya pada δ_H 1,25 ppm yang mengarahkan posisi karbon metilen itu pada posisi C-28 (Gambar 11).

Sinyal proton metil (CH_3) lainnya pada rantai samping steroid terdapat pada daerah δ_H 0,91 ppm (3H, *d*, $J=6,4$ Hz) ditempatkan pada posisi C-21 dan dengan bantuan spektrum COSY dapat diketahui sinyal proton metin (CH) tetangganya yaitu C-20 pada δ_H 1,35 ppm dengan adanya korelasi antara sinyal proton pada δ_H 0,91 ppm dengan δ_H 1,35 ppm (Gambar 11).

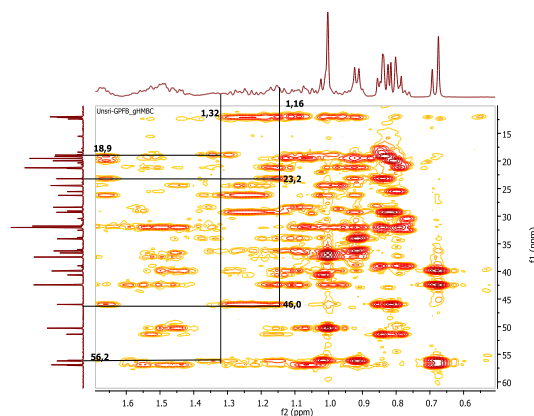


Gambar 11 Spektrum COSY proton metil (CH_3) pada δ_H 0,84ppm; proton metil (CH_3) pada δ_H 0,91 ppm dan proton metilen (CH_2) pada δ_H 1,16 ppm

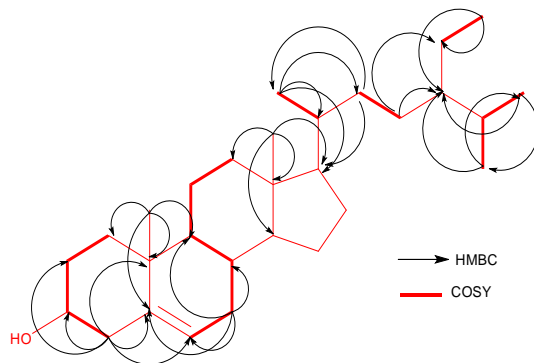
Penempatan posisi kedua karbon metilen (CH_2) untuk C-22 dan C-23 pada rantai samping didukung oleh spektrum HMBC yang memperlihatkan adanya korelasi antara

proton pada δ_H 1,32 ppm (H-22) dengan karbon metil pada δ_C 18,9 ppm (C-21) dan dengan karbon metin (CH) pada δ_C 56,2 ppm (C-17). Selanjutnya juga terdapat korelasi HMBC antara proton pada δ_H 1,16 ppm (H-23) dengan karbon metin pada δ_C 46,0 ppm (C-24) dan dengan karbon metilen pada δ_C 23,2 ppm (C-28). (Gambar 12).

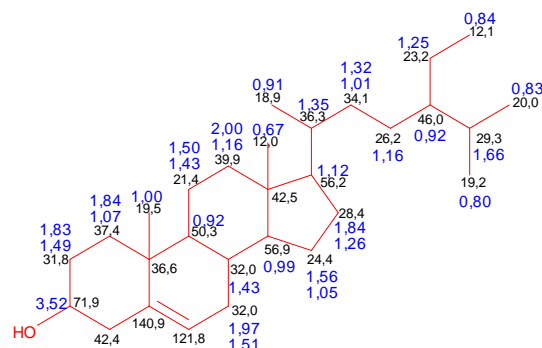
Korelasi COSY dan beberapa korelasi HMBC penting dari senyawa hasil isolasi ditunjukkan pada Gambar 13 sedangkan data NMR dari senyawa hasil isolasi selengkapnya dapat dilihat pada Gambar 14. Berdasarkan data-data spektroskopi di atas maka disimpulkan bahwa senyawa mayor hasil isolasi adalah stigmast-5-en-3-ol atau yang lebih dikenal dengan nama β -sitosterol dengan rumus molekul $C_{29}H_{50}O$.



Gambar 12. Spektrum HMBC proton metilen (CH_2) δ_H 1,32 dan δ_H 1,16 ppm



Gambar 13. Korelasi spektrum COSY dan beberapa HMBC penting senyawa hasil isolasi



Gambar 14. Posisi proton dan karbon berdasarkan spektrum HSQC

Hasil Uji Aktivitas Analgetika

Pengaruh Pemberian Suspensi CMC 0,5%, Aspirin, dan Dosis Sampel Uji Terhadap Jumlah Geliatan Mencit pada 5 Menit Pertama, Kedua dan ketiga

Berdasarkan hasil analisa anova menunjukkan bahwa pemberian dosis untuk kelompok aspirin dan sampel uji secara peroral (p.o) pada 5 menit pertama, kedua dan ketiga semuanya memberikan perbedaan yang nyata jika dibandingkan dengan pemberian dosis untuk kontrol negatif (CMC 0,5%). Hal ini terbukti bahwa $F_{hitung} > F_{tabel}$ dari setiap 5 menit perlakuan yang berarti, pemberian dosis kelompok aspirin dan sampel uji menunjukkan pengaruh analgetika yang menyebabkan penurunan jumlah geliatan dibandingkan dengan kontrol negatif.

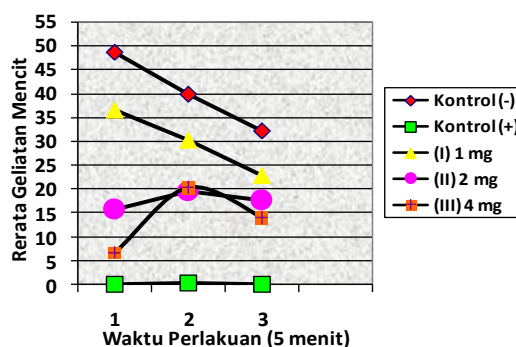
Untuk dapat melihat beda nyata dari masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) sehingga pengaruh analgetika terhadap jumlah geliatan yang dihasilkan masing-masing kelompok perlakuan dalam penelitian ini dapat diketahui. Pada 5 menit pertama berdasarkan jumlah geliatannya dari kelompok aspirin, kelompok II dan III sangat berbeda nyata yang berarti memberikan pengaruh analgetika dengan menunjukkan jumlah geliatan yang kecil jika dibandingkan dengan kelompok I. Kelompok I tidak berbeda nyata dengan kontrol negatif karena jumlah geliatan yang sama besarnya dengan kelompok kontrol negatif sehingga

disimpulkan bahwa pengaruh analgetika kelompok I tidak ada.

Kelompok II dan III sangat berbeda nyata terhadap kelompok kontrol negatif akan tetapi kelompok aspirin sangat berbeda nyata terhadap semua kelompok perlakuan. Maka dari itu disimpulkan bahwa untuk kelompok aspirin pada 5 menit kedua tetap memberikan pengaruh analgetika yang lebih baik dari pada semua kelompok perlakuan hal ini dapat dilihat sedikitnya jumlah geliatan yang dihasilkan.

Pada 5 menit ketiga berdasarkan uji BNT menunjukkan kembali kelompok aspirin sangat berbeda nyata dengan semua kelompok perlakuan. Maka dari itu dapat disimpulkan bahwa pemberian aspirin pada penelitian ini tetap memberikan pengaruh analgetika terbaik dari setiap waktu perlakuan yang ada jika dibandingkan dengan kelompok II dan III yang memiliki pengaruh analgetika lebih rendah dari aspirin.

Jumlah geliat rata-rata mencit selama 5 menit pertama, kedua dan ketiga dibuat kedalam grafik untuk membandingkan jumlah geliat masing-masing kelompok perlakuan. Pemberian dosis sampel uji secara bertingkat terhadap waktu pengamatan mampu menurunkan jumlah geliatan. Hal ini berarti semakin besar jumlah dosis yang diberikan maka semakin kecil jumlah geliatannya (Gambar 15).



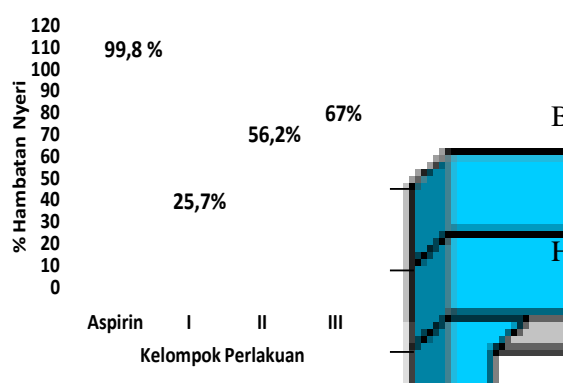
Gambar 15. Perbandingan rerataan geliatan mencit kelompok perlakuan pada 5 menit pertama, kedua dan ketiga

Gambar 15 menunjukkan bahwa kelompok I, II dan III sudah mengalami respon geliatan pada 5 menit pertama akibat

dari pemberian asam asetat 1% mulai bekerja, hal ini berbeda dengan kelompok aspirin pada 5 menit pertama mencit tidak mengalami geliatan yang menunjukkan pengaruh analgetika sudah bekerja pada 5 menit pertama. Jumlah geliatan dari kelompok I, II dan III berbeda-beda pada 5 menit pertama, keadaan ini menunjukkan adanya perbedaan pengaruh analgetika dari setiap dosis yang diberikan.

Kelompok I menunjukkan jumlah geliatan yang besar pada 5 menit pertama, keadaan ini menyatakan bahwa kelompok I tidak berpotensi memberikan pengaruh analgetika. Kelompok II dan III pada pada Gambar 15 mulai menunjukkan pengaruh analgetika pada 5 menit kedua dengan ditandainya penurunan jumlah geliatan sampai pada 5 menit ketiga, keadaan ini menyatakan bahwa kelompok II dan III berpotensi sebagai analgetika namun efek analgetika kelompok II dan III berada di bawah aspirin. Berdasarkan Gambar 15 menyatakan bahwa kelompok aspirin sebagai kontrol positif memberikan pengaruh analgetika terbaik dari kelompok I, II dan III. Selain dilihat dari hasil jumlah geliatan yang kecil, efek obat aspirin sudah mulai bekerja pada 5 menit pertama.

Suatu obat dapat dikatakan mempunyai aktivitas sebagai analgetika apabila mampu menurunkan jumlah geliatan mencit $\geq 50\%$ (Sirait dkk, 1993). Gambar 16 memperlihatkan bahwa kelompok I memiliki persentase hambatan nyeri kurang dari 50% sehingga dapat dikatakan belum mempunyai aktivitas analgetika. Pada kelompok II dan III memiliki persentase hambatan nyeri lebih dari 50% sehingga dapat dikatakan kelompok II dan III mempunyai aktivitas analgetika.



Gambar 16. Grafik % hambatan nyeri rata-rata mencit setiap kelompok perlakuan

Persentase hambatan nyeri selanjutnya dapat dijadikan dasar untuk menghitung persentase efektivitas analgetika dengan cara membandingkan persentase hambatan nyeri kelompok uji terhadap kelompok aspirin. Persentase efektivitas analgetika berguna untuk mengetahui keefektifan analgetika kelompok uji dalam berbagai dosis yang diberikan terhadap aspirin karena aspirin sudah terbukti sebagai obat analgetika yang paling efektif dalam mengurangi rasa nyeri. Persentase efektivitas analgetika pada kelompok II sebesar 56,3 % dan kelompok III sebesar 67,1% terhadap aspirin. Jadi, dari persentase hambatan nyeri dan efektivitas analgetika dapat diketahui bahwa aktivitas analgetika kelompok II dan III berada di bawah aspirin

KESIMPULAN

1. Senyawa golongan steroid dengan nama stigmast-5-en-3-ol sebagai β -sitosterol telah diisolasi dari ekstrak metanol daun *Gynura pseudochina* (Lour) DC.
2. Pemberian dosis 2 mg/20 g BB dan dosis 4 mg/20 g BB menunjukkan aktivitas sebagai analgetika dengan waktu kerja obat pada 5 menit kedua.
3. Perbandingan persentase efektivitas dosis 2 mg/20 g BB sebesar 56,3 % dan dosis 4 mg/20 g BB sebesar 67,1% terhadap aspirin

DAFTAR PUSTAKA

Asteya, D.M. (2010). *Sintesis Asam 2-(2'Klorobenzoiloksi) Benzoat dan Uji*

Aktivitas Analgesik pada Mencit (Mus musculus). Skripsi Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga, Surabaya.

Badan Pengawasan Obat dan Makanan. (2001). *Kebijakan Obat Alam/Herbal Medicine Indonesia*. Jakarta : Badan POM

Harrizul, R. (2011). *Karakteristik Ekstrak Daun Dewa (Gynura Pseudochina (L) DC) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi*. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol 5 (3), hal (134-141).

Herwindriandita., Siti, K dan As'ari, N. (2006). *Telaah Fitokimia Daun Dewa (Gynura Pseudochina (Lour) DC)*. Skripsi Departemen Farmasi, ITB, Bandung.

Nirwan dan Aziz, S.A. (2006). *Multiplikasi dan Pigmentasi Antosianin Daun Dewa (Gynura Pseudochina (L) DC) In Vitro*. *Buletin Agronomi*, Vol 34 (2), Hal (112-118).

Putri, C.A.R., Setjari, W dan Hendrik. (2009). *Daun Dewa dapat Menghambat Respon Rasa Nyeri*. *Oral Biology Dental Journal*, Vol (1), hal (28-31).

Sirait, M.D., Hargono., Wattimena., Husin., Sumadilaga dan Santoso. (1993). *Pedoman Pengujian dan Pengembangan Fitofarmaka, Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Bahan Alam*. Jakarta: Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam Phytomedica.

Suhendi, A., Kuswandi dan Nugroho, A.E. (2003). *Efek Analgetik Infusa Daun Dewa (Gynura Procumbens (Lour) Merr) Pada Mencit Putih Jantan Galur DDI*. *International Scientific Journal Database*, Vol (4), hal (77-83).

Tjay, T.H., dan Rahardja K. (2002). *Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya*. Edisi Keenam. Jakarta: Elex Media Komputindo.

Zaini, R. (2006). *Isolasi Komponen Bioaktif Flavonoid dari Tanaman Daun Dewa (Gynura Pseudochina (Lour) DC)*. Tesis Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor: IPB.