

# **FITOKIMIA TUMBUHAN TEMUKUNCI**

*(Boesenbergia rotunda):*

**ISOLASI, IDENTIFIKASI STRUKTUR, AKTIVITAS  
BIOLOGI, DAN SINTESIS PRODUK NANOPARTIKELNYA**

## **UU No 19 Tahun 2002, Tentang Hak Cipta**

### **Fungsi dan Sifat hak Cipta Pasal 2**

1. Hak Cipta merupakan hak eksklusif bagi pencipta atau pemegang Hak Cipta untuk mengumumkan atau memperbanyak ciptaannya, yang timbul secara otomatis setelah suatu ciptaan dilahirkan tanpa mengurangi pembatasan menurut peraturan perundang-undangan yang berlaku.

### **Hak Terkait Pasal 49**

1. Pelaku memiliki hak eksklusif untuk memberikan izin atau melarang pihak lain yang tanpa persetujuannya membuat, memperbanyak, atau menyiarkan rekaman suara dan/atau gambar pertunjukannya.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 72**

1. Barangsiapa dengan sengaja dan tanpa hak melakukan perbuatan sebagaimana dimaksud dalam pasal 2 ayat (1) atau pasal 49 ayat (2) dipidana dengan pidana penjara masing-masing paling singkat 1 (satu) bulan dan/atau denda paling sedikit Rp 1.000.000,00 (satu juta rupiah), atau pidana penjara paling lama 7 (tujuh) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 5.000.000.000,00 (lima miliar rupiah).
2. Barangsiapa dengan sengaja menyiarkan, memamerkan, mengedarkan, atau menjual kepada umum suatu ciptaan atau barang hasil pelanggaran Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam ayat (1), dipidana dengan pidana penjara paling lama 5 (lima) tahun dan/atau denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)

# **FITOKIMIA TUMBUHAN TEMUKLUNCI**

***(Boesenbergia rotunda):***

**ISOLASI, IDENTIFIKASI STRUKTUR, AKTIVITAS  
BIOLOGI, DAN SINTESIS PRODUK NANOPARTIKELNYA**

Prof. Dr. Sri Atun

Dr. Sri Handayani



Penerbit K-Media  
Yogyakarta, 2017

**FITOKIMIA TUMBUHAN TEMUKUNCI**  
**(*Boesenbergia rotunda*): ISOLASI, IDENTIFIKASI STRUKTUR, AKTIVITAS**  
**BIOLOGI, DAN SINTESIS PRODUK NANOPARTIKELNYA**

**Prof. Dr. Sri Atun**  
**Dr. Sri Handayani**

Layout & Desain Cover : Uki

Copyright © 2017 by Penerbit K-Media  
All right reserved

Isi diluar tanggung jawab percetakan

Hak Cipta dilindungi Undang-Undang No 19 Tahun 2002.  
Dilarang memperbanyak/menyebarluaskan dalam bentuk apapun  
tanpa izin tertulis dari Penerbit K-Media.

Cetakan Pertama: Oktober 2017

Penerbit K-Media  
Anggota IKAPI  
Perum Pondok Indah Banguntapan, Blok B-15  
Potorono, Banguntapan, Bantul. 55196. Yogyakarta  
e-mail: kmedia.cv@gmail.com

---

**ATUN, Sri & Sri Handayani**

Fitokimia Tumbuhan Temukunci (*Boesenbergia Rotunda*): Isolasi, Identifikasi Struktur,  
Aktivitas Biologi, dan Sintesis Produk Nanopartikelnya, Sri Atun dan Sri Handayani.

-- Yogyakarta: Penerbit K-Media, 2017.

vi, 62 hlm. ; 20 cm.

ISBN: 978-602-451-083-1

-----  
Hak Cipta 2017, pada Penulis

## KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah hirobbil ‘alamin, penulis panjatkan segala puji kehadiran Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmad dan karuniaNya, yang karena izin-Nya jualah, penulis sampai pada tahap penyelesaian Buku Reference yang berjudul : Fitokimia Tumbuhan Temukunci (*Boesenbergia rotunda*): Isolasi, identifikasi Struktur, dan Sintesis Produk Nanopartikelnya. Buku ini disusun berdasarkan hasil penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dana IDB, DRPM, Menristek dikti, tahun anggaran 2016-2017. Fokus utama penulisan buku ini adalah isolasi dan identifikasi struktur senyawa utama dari rimpang tumbuhan temukunci, uji aktivitas biologi sebagai antioksidan dan antibakteri secara in vitro dan in vivo, serta sintesis nanopartikel dari ekstrak etanol temukunci. Diharapkan buku ini dapat dijadikan referensi bagi mahasiswa atau peneliti yang tertarik pada kajian senyawa organik bahan alam.

Secara khusus penulis ingin menyampaikan penghargaan dan rasa terimakasih kepada berbagai pihak yang telah berperan dalam penelitian yang telah kami lakukan, kepada: Menristek Dikti, Rektor Universitas Negeri Yogyakarta, Ketua LPPM Universitas Negeri Yogyakarta, Dekan FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta, serta semua pihak yang telah membantu dalam penelitian dan penyelesaian buku ini. Mudah-mudahan segala bentuk bantuan yang telah diberikan merupakan amal saleh disisi Alloh SWT, dan semoga buku ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Penulis

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI.....	vi
<b>BAB I KARAKTERISTIK TUMBUHAN TEMUKUNCI DAN PEMANFAATANNYA SECARA TRADISIONAL .....</b>	<b>1</b>
<b>BAB II KANDUNGAN KIMIA TEMUKUNCI .....</b>	<b>3</b>
<b>BAB III ISOLASI DAN IDENTIFIKASI STRUKTUR SENYAWA KIMIA DARI TEMUKUNCI .....</b>	<b>5</b>
<b>BAB IV PEMBUATAN NANOPARTIKEL DARI EKSTRAK ETANOL TEMUKUNCI.....</b>	<b>25</b>
<b>BAB V UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA BIOAKTIF DAN PRODUK NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL TEMUKUNCI .....</b>	<b>36</b>
<b>BAB VI AKTIVITAS ANTIBATERI SENYAWA BIOAKTIF DAN PRODUK NANOPARTIKEL DARI TEMUKUNCI.....</b>	<b>39</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>61</b>

# BAB I

## KARAKTERISTIK TUMBUHAN TEMUKUNCI DAN PEMANFAATANNYA SECARA TRADISIONAL

Temukunci (*Boesenbergia rotunda*), termasuk famili tumbuhan Zingiberaceae yang banyak digunakan sebagai rempah-rempah. Menurut Cronquist (1981) famili Zingiberaceae terdiri dari 47 genus dan sekitar 1000 spesies, tersebar di Asia Selatan dan Asia Tenggara. Tumbuhan ini dilaporkan banyak digunakan dan terdapat dalam ramuan obat tradisional jamu. Selain sebagai rempah-rempah, juga digunakan untuk obat-obatan, seperti untuk pengobatan penyakit kulit, penyakit yang berhubungan dengan saluran pernafasan, sinusitis, asma, peluruh dahak, nyeri perut, sembelit, bengkak, rematik, hepatitis, sakit mata, dan pengobatan wanita sesudah melahirkan (Dalimarta, 2003; Wu, 2002).

Beberapa khasiat yang dilaporkan dari temukunci antara lain sebagai peluruh dahak, obat cacing, dan penambah nafsu makan. Pengujian secara *in vitro* menunjukkan temu kunci dapat meningkatkan jumlah limfosit, antibodi spesifik, dan dapat membunuh sel kanker (Dalimarta, 2003). Minyak essensial dari temu kunci menunjukkan sifat anti jamur terhadap *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, dan *Mucor*. Demikian juga bersifat anti bakteri terhadap *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Torulopsis glabrata* (Jantan, 2003). Demikian juga penelitian Taweechaisupapong S.(2010) menunjukkan ekstrak *Boesenbergia pandurata* sangat efektif membunuh bakteri patogen *C. albican* secara *in vitro*. Selain mengandung minyak atsiri temukunci juga mengandung senyawa metabolit sekunder seperti pinostrobin, pinocembrin, cardamonin, panduratin, serta alpinetin. Aktivitas biologis yang lainnya yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti antara lain sebagai anti tumor, anti kanker, anti oksidan, maupun anti inflamasi (Chong T.E., 2012).



Gambar 1. Tumbuhan Temukunci dan rimbangnya

Determinasi tumbuhan temukunci

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Liliopsida

Ordo : Zingiberales

Famili : Zingiberaceae

Genus : *Boesenbergia*

Spesies : *Boesenbergia pandurata*

Nama Ilmiah : *Boesenbergia rotunda*,

Sinonim : *Gastrochillus panduratum* (Roxb) Schult, *Kaemferia pandurata* (Roxb),  
*Boesenbergia pandurata*

Nama lokal : Temukunci (Indonesia), Koncih (Sumatera), Tamukunci  
(Minangkabau), Konce (Madura), Kunci (Jawa Tengah), Dumu kunci  
(Bima), Tamukonci (Makasar), Tumukunci (Ambon), Anipa wakang  
(Hila-Alfuru), Aruhu konci (haruku), Sun (Buru), Rutu kakuzi  
(Seram), Tamputi (Ternate)

Nama asing : Fingerroot (Inggris), Krachai (Thailand), Chinesekey (Cina)

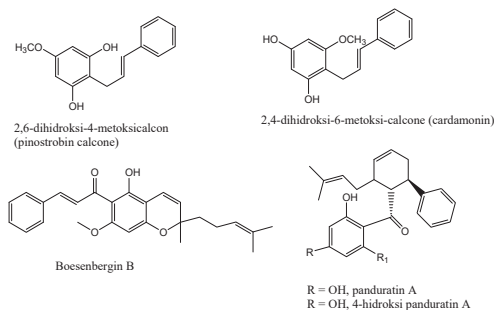
Tanaman ini banyak tumbuh di daerah tropis dataran rendah. Waktu berbunganya pada bulan Januari-Februari dan April-Juni. Daerah distribusi dan habitat tanaman ini adalah tumbuh liar pada dataran rendah, di hutan-hutan jati. Tanaman ini tumbuh baik pada iklim panas dan lembab pada tanah yang relatif subur dengan pertukaran udara dan tata air yang baik. Pada tanah yang kurang baik tata airnya (sering tergenang air, atau becek pertumbuhan akan terganggu dan rimpang cepat busuk). Selain di Indonesia, di negara lain juga banyak yang telah memanfaatkan temukunci. Di Thailand, rimpang temukunci biasa digunakan sebagai bumbu masak. Selain itu, tanaman ini juga telah digunakan sebagai obat *aprodisiac*, disentri, antiinflamasi, kolik, serta untuk menjaga kesehatan tubuh. Di Malaysia, rimpang temu kunci digunakan sebagai sebagai obat sakit perut dan dekoksi pada wanita pasca melahirkan. Pada tanaman temukunci mengandung diantaranya senyawa fenolik yang dikenal dapat menunjukkan aktivitas antibakteri. Senyawa aktif seperti flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan dalam responsnya terhadap infeksi oleh mikroorganisme sehingga senyawa ini efektif sebagai senyawa antimikroba terhadap sejumlah mikroorganisme.



## BAB II

### KANDUNGAN KIMIA TEMUKUNCI

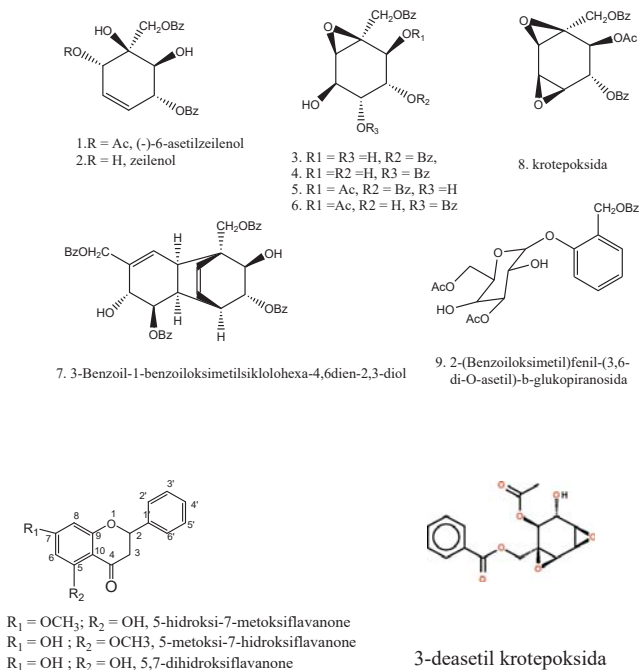
Rimpang temukunci mengandung minyak atsiri berupa 1,8-sineol, kamfer borneol, pinnen, seskuitepen, zingiberon, curcumin dan zeodarin. Kandungan lainnya berupa kardamonin, pinosembrin (5,7-dihidroksiflavin), pinostrobin (5-hidroksi-7-metoksiflavanon), panduratin A, dan 4-hidroksipanduratin. Temukunci (*Boesenbergia rotunda*) memiliki kemiripan dengan kuncipepet (*Kaempferia rotunda*), namun lebih banyak mengandung minyak atsiri, dan menunjukkan bau yang khas (Tan Eng Chong, 2012). Dilaporkan bahwa minyak atsiri dari *B. rotunda* bersifat antibakteri. Penelitian sebelumnya menunjukkan beberapa senyawa kimia maupun ekstrak dari temu kunci memiliki aktivitas antibakteri, antiinflamasi, analgetik, antipiretik, antitumor, anti HIV, dan antioksidan (Nwet Nwet Win, 2008). Senyawa kimia yang telah diisolasi dari *B. rotunda* antara lain terdapat pada gambar 2.



Gambar 2. Beberapa senyawa kimia yang diisolasi dari *B. rotunda*

Penelitian terhadap genus *Kaempferia* sinonim *Boesenbergia* belum banyak dilaporkan. Beberapa spesies dari genus *Kaempferia* yang sudah diteliti antara lain *Kaempferia parviflora* dan *Kaempferia pandurata* (Nwet Nwet W, 2008). Penelitian yang dilakukan oleh Leardkamolkarn V. (2009) terhadap ekstrak metanol *Kaempferia parviflora* menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi terhadap human cholangiocarcinoma (HuCCA-1 and RMCCA-1). Dari hasil penelitian tersebut juga berhasil diisolasi senyawa 5,7,4-trimethoxyflavone yang juga menunjukkan aktivitas sitotoksik yang tinggi (LC<sub>50</sub> 46,1 µg/ml). Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Yanti (2009) menunjukkan beberapa senyawa

seperti panduratin A yang ditemukan pada *Kaempferia pandurata* menunjukkan aktivitas sitotoksik tinggi terhadap sel kanker human epidermoid KB. Penelitian yang dilakukan oleh Ching A.Y.L ( 2007) menunjukkan adanya beberapa senyawa fenolik yang ditemukan dalam ekstrak metanol rimpang *Boesenbergia rotunda* yang merupakan sinonim dari *Kaempferia pandurata*, seperti 5-hidroksi-7-metoksiflavanon, 7-hidroksi-5-metoksiflavanon, 5,7-dihidroksiflavanon, kardamonin, dan panduratin A. Dilaporkan juga beberapa senyawa yang telah ditemukan dari *K. rotunda* antara lain asetilzeilenol (1), zeilenol (2), 1-benzoiloksimetil-1,6- epoksisikloheksan-2,3,4,5-tetrol (3-6), 3-benzoil-1-benzoiloksimetilsiklohexa-4,6-dien-2,3-diol (7), krotepoxide (8), 2-(benzoiloksimetilfenil-(3,6-di-O-asetil)-β-glukopiranosida (9), 2'-hidroksi'-4,4',6'-trimetoksicalcone, 3-asetil-4-benzoil-1-benzoiloksimetil-1,6- diepoksisiklohexan- 2,3,4,5-tetrol and flavanone (Stevenson, 2007; Lotulung, 2008; Lallo S, 2014; Sri Atun, 2015). Beberapa senyawa yang telah diisolasi dari *K. rotunda* terdapat pada gambar 3.



Gambar 3. Beberapa senyawa kimia yang telah diisolasi dari *K. rotunda*

## **BAB III**

### **ISOLASI DAN IDENTIFIKASI STRUKTUR SENYAWA KIMIA DARI TEMUKUNCI**

Isolasi senyawa kimia dari rimpang temukunci dilakukan dengan metode isolasi senyawa organik bahan alam dengan metode ekstraksi dan kromatografi sehingga diperoleh senyawa murni. Senyawa murni yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi strukturnya berdasarkan data spektroskopi Ultra violet (UV), inframerah (IR),  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR, dan spektroskopi MS.

#### **Alat dan bahan**

Alat yang dibutuhkan antara lain: evaporator Buchi Rotavapor R-114, kromatografi cair vakum (kcv) untuk fraksinasi dilakukan dengan silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub>, kromatografi gravitasi (kkg) dilakukan dengan silika gel 60 (35–70 mesh), kromatografi kolom tekan (kkt) menggunakan silika gel 60 (230–400 mesh), analisis kromatografi lapis tipis (klt) menggunakan plat Si-gel Merck 60 F<sub>254</sub> 0,25 mm. Lampu UV pada  $\lambda$  256 dan 366 nm, spektrofotometer IR, spektrofotometer UV-VIS,  $^1\text{H}$  dan  $^{13}\text{C}$  NMR satu dan dua dimensi.

Bahan yang dibutuhkan meliputi pelarut yang digunakan untuk isolasi dan pemurnian antara lain metanol, aseton, *n*-heksan, etil asetat, metilen klorida, kloroform dengan kualitas teknis dan p.a., sampel rimpang temukunci.

#### **Ekstraksi dan Isolasi Senyawa kimia dari Rimpang Temukunci**

##### **Ekstraksi Senyawa Kimia dari Rimpang Temukunci**

Bahan tumbuhan yang berupa serbuk kering umbi temukunci sebanyak 3 Kg, dimasukkan ke dalam jerigen plastik ukuran 20 L, dan ditambahkan pelarut etanol sebanyak 10 L, selanjutnya direndam selama 24 jam. Ekstrak dari masing-masing sampel selanjutnya disaring dan dikumpulkan filtratnya. Residu selanjutnya di maserasi kembali menggunakan etanol, dan diulang seperti prosedur sebelumnya sebanyak 2 kali. Filtrat yang diperoleh dari masing-masing sampel tumbuhan selanjutnya dipekatkan menggunakan evaporator vakum sampai 1/3 bagian. Ekstrak kental hasil maserasi yang diperoleh sebanyak 147,6 gram (rendemen 4,9 %).

Sebagian ekstrak etanol kental temukunci (100 g) kemudian dipartisi dengan menggunakan *n*-heksana terdestilasi dengan perbandingan volume ekstrak metanol : *n*-

heksana = 1 : 1, sehingga diperoleh ekstrak heksan. Sisa ekstrak etanol dipartisi kembali dengan kloroform, sehingga diperoleh ekstrak kloroform. Selanjutnya residu ekstrak etanol dipartisi dengan etil asetat, sehingga diperoleh ekstrak etil asetat. Masing-masing ekstrak selanjutnya diuapkan pada tekanan rendah sampai terbentuk ekstrak kental, ekstrak kloroform sebanyak 50 g dan ekstrak etil asetat sebanyak 30 g, sedangkan ekstrak heksan sulit untuk diuapkan.

## **Isolasi Senyawa Kimia dari Rimpang Temukunci**

### **Isolasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi etil asetat**

Fraksi etil asetat pekat diimpregnasi terlebih dahulu dengan serbuk silika gel Merck 60 (0,2-0,5 mm). Impregnasi dilakukan dengan tujuan mengabsorpsikan fraksi etil asetat yang dilarutkan dalam aseton ke dalam serbuk silika kasar (30-70 mesh). Kolom yang digunakan untuk KVC memiliki diameter 10 cm. Preparasi kolom dilakukan dengan menempatkan silika gel sebagai fasa diam ke dalam kolom hingga 2/3 kolom terpenuhi. Ekstrak etil asetat pekat yang telah ditimbang dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasi atau diadsorpsi dengan silika gel merk 60 (0,2-0,5 mm). Sampel tersebut dikeringkan terlebih dahulu supaya teradsorpsi sempurna kemudian dimasukkan dalam kolom dengan corong secara merata kemudian di atas permukaan dituang fasa diam hingga merata dengan kertas saring sebagai pembatas. Ekstrak etil asetat yang telah diimpregnasikan dalam silika gel selanjutnya dipisahkan secara kromatografi kolom vakum (KVC).

KVC yang digunakan berdiameter 10 Cm panjang 20 Cm, dengan isian silika gel halus (400 mesh) setinggi 10 Cm. Sampel selanjutnya dimasukkan ke dalam KVC dan dialiri dengan pelarut heksan. Selanjutnya secara berturut-turut digunakan pelarut n-Heksan-etil asetat dengan perbandingan yang ditingkatkan secara gradual. Beberapa perbandingan eluen yang digunakan pada kromatografi vakum cair ini adalah heksana 100%, heksana : etil asetat = 9 : 1; 8 : 2; 7 : 3; 6 : 4; etil asetat 100 % , aseton 100%, dan metanol untuk mencuci sampel dan kolom. Eluat hasil KVC tersebut kemudian ditampung dalam botol-botol fraksi berdasarkan eluen yang digunakan. Masing-masing fraksi diidentifikasi menggunakan KLT sehingga dapat dikelompokkan menjadi fraksi-fraksi berdasarkan jumlah noda dan R<sub>f</sub> yang sama (polar dan non polar). Kelompok fraksi yang diperoleh dipisahkan lebih lanjut dengan menggunakan teknik kromatografi kolom gravitasi (KKG) sampai diperoleh senyawa murni. Dari hasil pemisahan ini dapat diperoleh tiga senyawa murni yaitu senyawa 1 (125 mg); senyawa 2 (350 mg), dan senyawa 3 (200 mg). Senyawa murni yang diperoleh selanjutnya

diidentifikasi struktur molekulnya secara spektroskopi UV, IR, NMR (proton dan karbon satu dan dua dimensi).

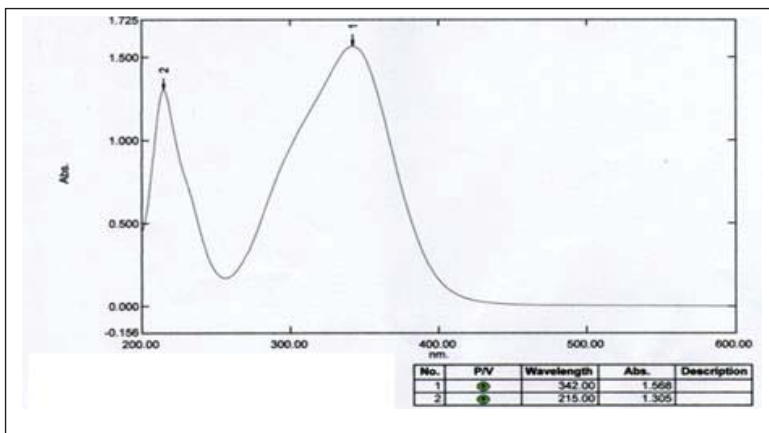
### Isolasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi kloroform temukunci

Fraksi kloroform sebanyak 50 gr dilarutkan dalam aseton dan diimpregnasikan dalam silika gel kasar, sehingga semua ekstrak terserap dalam silika gel, dan dikeringkan. Fraksi kloroform yang telah diimpregnasikan tersebut selanjutnya dipisahkan secara kromatografi kolom vakum dan kromatografi gravitasi seperti pada pemisahan senyawa metabolit sekunder dari fraksi etil asetat. Pemisahan senyawa dari fraksi kloroform diperoleh dua senyawa, yang masing-masing setelah dibandingkan secara TLC, data UV, dan IR sama dengan senyawa 2 dan 3 dari fraksi etil asetat.

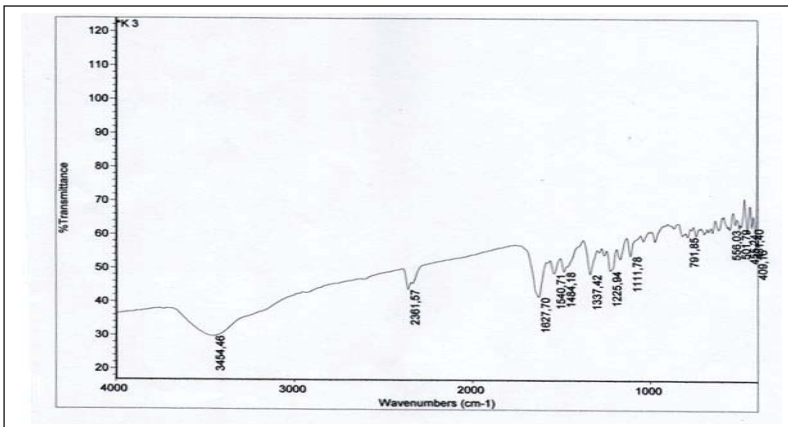
### Identifikasi struktur senyawa hasil isolasi dari ekstrak temukunci

Identifikasi struktur senyawa 1

Senyawa 1 sebanyak 200 mg, berupa padatan berwarna kuning muda. Data spektroskopi UV-VIS diperoleh spektrum seperti pada gambar 4. Spektrum IR terdapat pada gambar 5, sedangkan spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR pada gambar 6 dan spektrum  $^1\text{H}$  NMR gambar 7. Selanjutnya sebagian spektrum HMQC terdapat pada gambar 8 dan spektrum HMBC terdapat pada gambar 9.



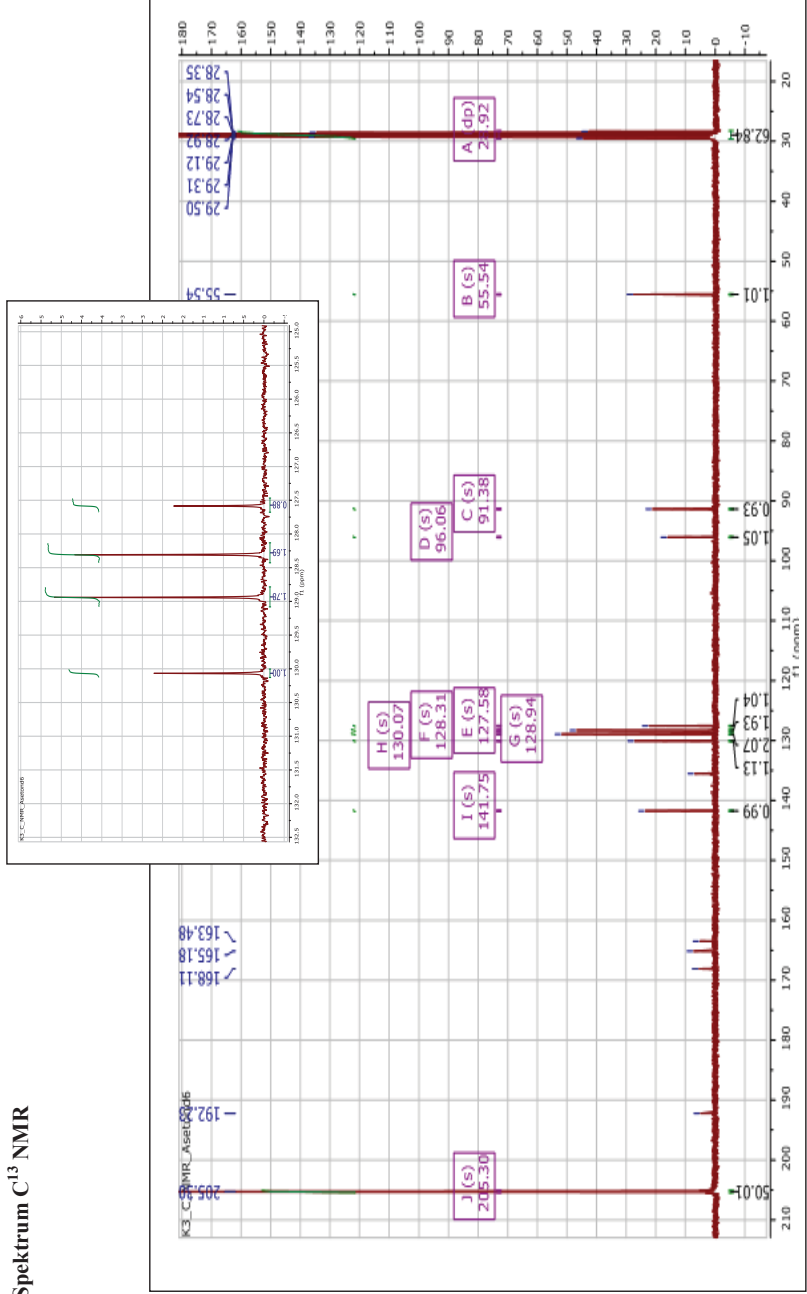
Gambar 4. Spektrum UV senyawa 1



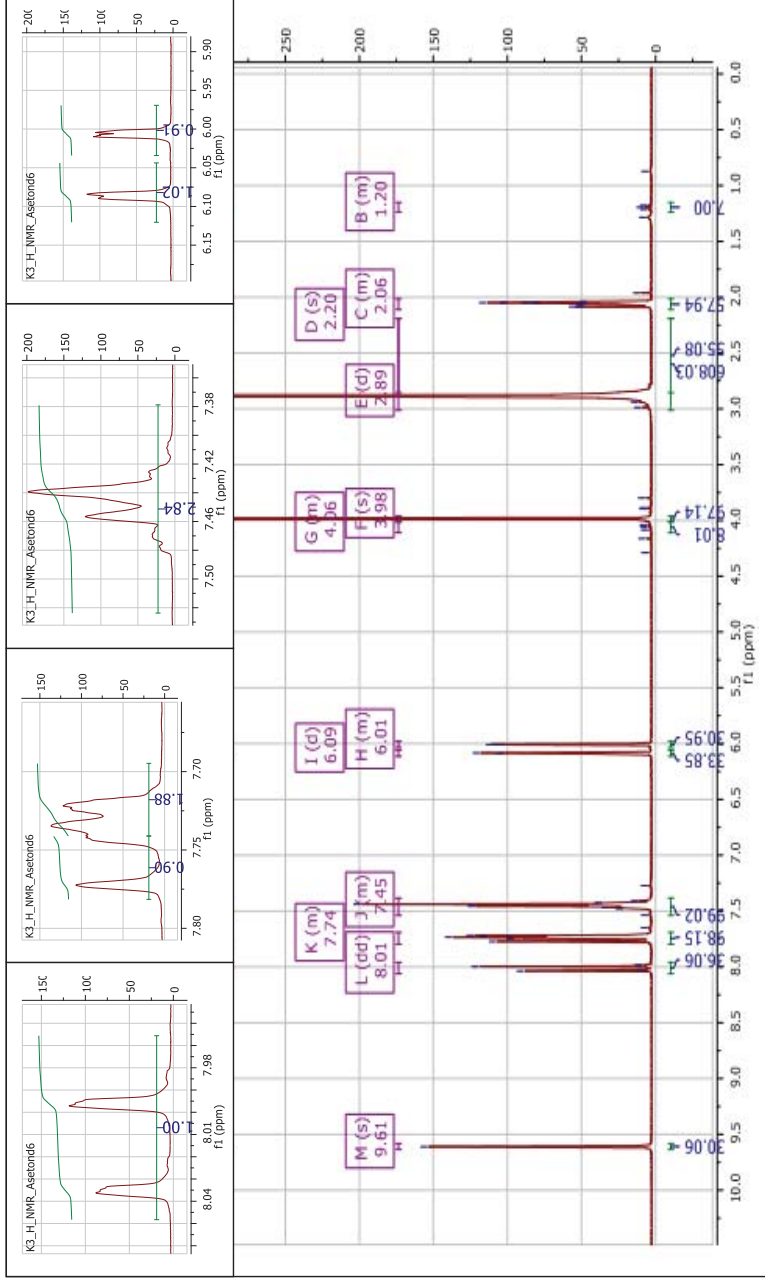
Gambar 5. Spektrum IR senyawa 1

Hasil analisis spektra UV-Vis dengan pelarut metanol menunjukkan panjang gelombang maksimum pada 342 nm dan 215 nm, menunjukkan adanya kromofor C=C yang terkonjugasi. Hasil spektra IR senyawa 1 menunjukkan adanya serapan melebar pada daerah  $3454,46 \text{ cm}^{-1}$  yang mengindikasikan adanya vibrasi gugus -OH. Serapan pada daerah  $1627 \text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya C=O karbonil. Serapan pada daerah  $1225,94 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi C-O eter dan serapan pada  $1540,71 \text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi C=C aromatik.

# Spektrum C<sup>13</sup> NMR

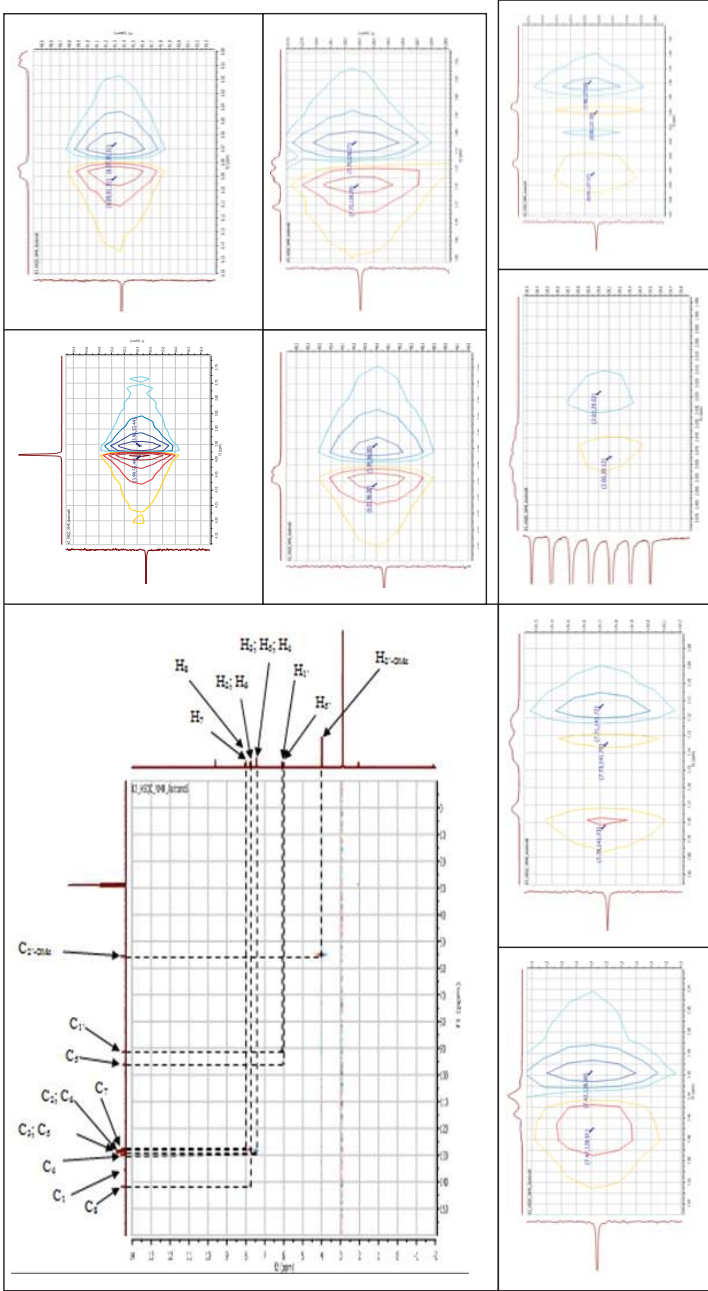


Gambar 6. Spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa I

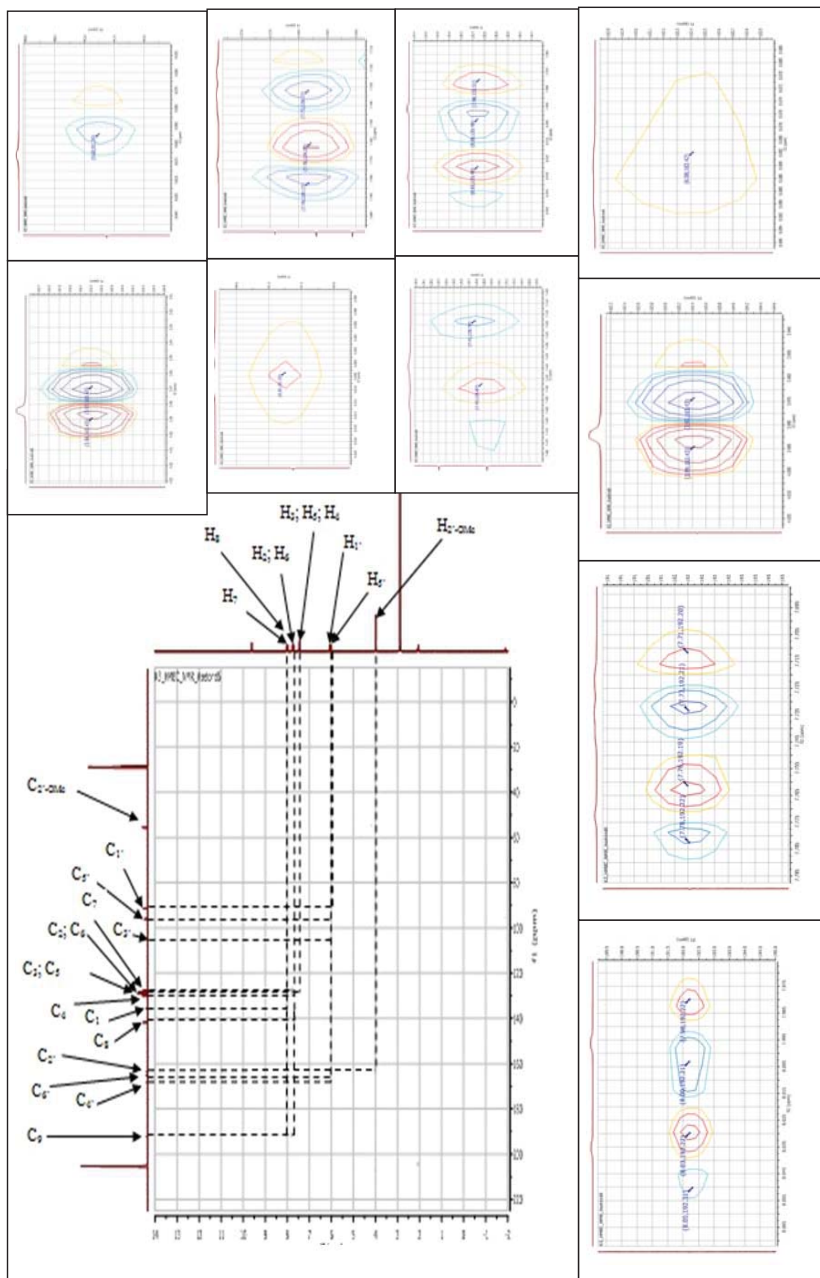


Gambar 7. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR Senyawa 1





Gambar 8 . Spektrum HSQC senyawa I



Gambar 9. Spektrum HMBC senyawa 1

Hasil analisis Spektrum  $^1\text{H}$  NMR;  $^{13}\text{C}$  NMR, HSQC, dan HMBC senyawa 1 diperoleh data seperti pada Tabel 1.

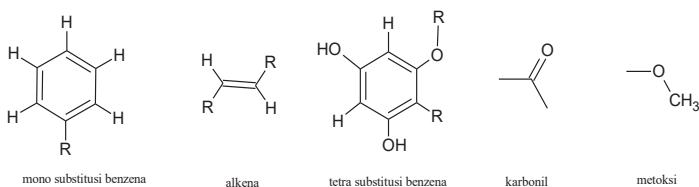
Tabel 1. Data analisis spektrum NMR senyawa 1

HSQC				HMBC H $\rightarrow$ C
$\delta$ C		$\delta$ H		
No	$\delta$ ppm	No	$\delta$ ppm (H, m, J Hz)	
C1	135,55	-	-	C7, C8
C2	128,31	H2	$\delta$ 7,73 (2H, d, J=6,89 Hz)	-
C3	128,94	H3	$\delta$ 7,45 (3H, m)	C5
C4	130,07	H4	$\delta$ 7,45 (3H, m)	C8
C5	128,34	H5	$\delta$ 7,45 (3H,m)	C3
C6	128,31	H6	$\delta$ 7,73 (2H, d, J=6,89 Hz)	C2, C8
C7	127,58	H7	$\delta$ 8,00 (1H, d, J=15,7 Hz)	-
C8	141,75	H8	$\delta$ 7,77 (1H, d, J=15,7 Hz)	C2
C9	192,23	-	-	C2, C6, C7, C8
C1'	91,38	H1'	$\delta$ 6,08 (1H, d, J=2,16 Hz)	C5', C6'-OH
C2'	163,48	-	-	C2'-OMe
C2'-OMe	55,54	H2'-OMe	$\delta$ 3,98 (3H, s)	-
C3'	105,29	-	-	C5'
C4'	168,41	-	-	-
C4'-OH	-	H4'-OH	$\delta$ 9,60 (2H, s)	-
C5'	96,06	H5'	$\delta$ 6,00 (2H, d, J=2,16 Hz)	C4'-OH
C6'	165,18	-	-	C1'
C6'-OH	-	H6'-OH	$\delta$ 9,60 (2H, s)	-

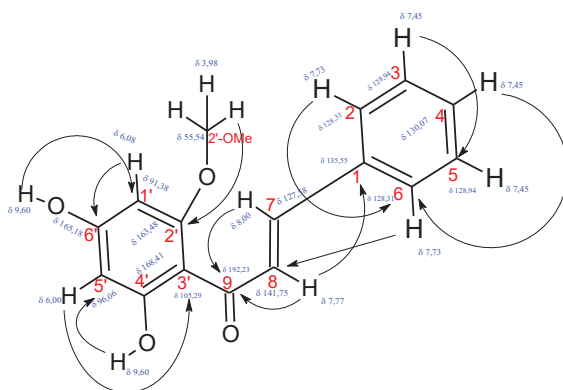
Data spektra  $^{13}\text{C}$ -NMR senyawa 1 memiliki 13 jenis atom C. Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR menunjukkan adanya sinyal pada daerah karbon aromatik yaitu pada pergeseran kimia 128,31 ppm (C2,C6); 128,94 ppm (C3,C5); 130,07 ppm (C4) dan 135,55 ppm (C7) dimana pada pergeseran kimia 128,31 ppm (C2,C6) dan 128,94 ppm (C3,C5) merupakan sinyal dengan integrasi dua, artinya terdapat dua karbon identik. Dari spektra juga muncul sinyal karbon oksiaril sebanyak tiga sinyal terdapat pada daerah pergeseran kimia 163,48 ppm; (C2') 165,18 ppm (C6') dan 168,11 ppm (C4'). Sinyal karbon gugus metoksi muncul pada daerah 55,54 ppm (C2'-OMe). Sinyal karbon pada daerah pergeseran kimia 192,23 ppm (C9) menunjukkan sinyal untuk karbon gugus karbonil. Dua sinyal karbon pada pergeseran kimia 91,38 ppm (C1') dan 96,06 ppm (C5') menunjukkan bahwa kedua karbon tersebut yang termasuk dalam cincin aromatik dipengaruhi oleh gugus hidroksi yang terdapat disekitar karbon. Sinyal pada pergeseran kimia 105,29 ppm (C3') juga termasuk sinyal karbon

aromatik. Terdapat dua sinyal karbon yang menunjukkan karbon alkena yaitu pada pergeseran kimia 127,58 ppm (C7) dan 141,58 ppm (C8).

Data spektra  $^1\text{H-NMR}$  senyawa 1 memiliki 8 jenis proton. Adanya dua sinyal proton di daerah aromatik menunjukkan adanya cincin benzena monosubsitusi pada daerah  $\delta$  7,73 ppm (2H, d,  $J=6,89$  Hz, H2, H6) dan  $\delta$  7,45 ppm (3H, m, H3, H4, H5). Sinyal proton aromatik dengan kopling meta masing-masing terdapat pada daerah  $\delta$  6,08 ppm (1H, d,  $J=2,16$  Hz, H1') dan  $\delta$  6,00 ppm (1H, d,  $J=2,16$  Hz, H5') serta terdapat sinyal proton hidroksi pada  $\delta$  9,60 ppm (2H, s, H4'-OH; H6'-OH) menunjukkan adanya cincin 4,6-dihidroksi-tetrasubsitusibenzena. Satu sinyal proton pada daerah metoksi yaitu pada  $\delta$  3,98 ppm (3H, s, H2'-OMe). Terdapat dua sinyal proton alkena yaitu pada  $\delta$  8,00 ppm (1H, d,  $J=15,7$  Hz, H7);  $\delta$  7,77 ppm (1H, d,  $J=15,7$  Hz, H8). Unit-unit struktur senyawa 1 adalah sebagai berikut:



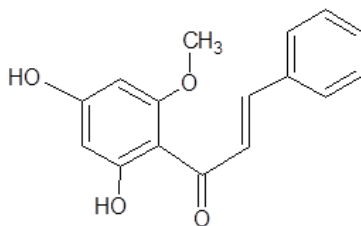
Analisis NMR dua dimensi HSQC menunjukkan adanya hubungan antara atom karbon dengan proton yang terikat. Sedangkan hubungan antara atom C dengan atom H yang diikat oleh atom C lain dalam dua atau tiga ikatan dapat diidentifikasi dengan HMBC. Hasil analisis data spektrum HSQC dan HMBC diperoleh struktur sebagai berikut:



Gambar 10. Struktur molekul berdasarkan data HSQC dan HMBC senyawa 1

Selanjutnya untuk memastikan struktur senyawa 1 diperoleh dengan membandingkan data-data spektrum yang diperoleh dari literatur. Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Amy et al (2007) menunjukkan bahwa senyawa 1 identik dengan kardamonin. Kemiripan data spektrum NMR proton dan karbon dapat dilihat pada Tabel 2.

Struktur senyawa kardamonin adalah sebagai berikut:



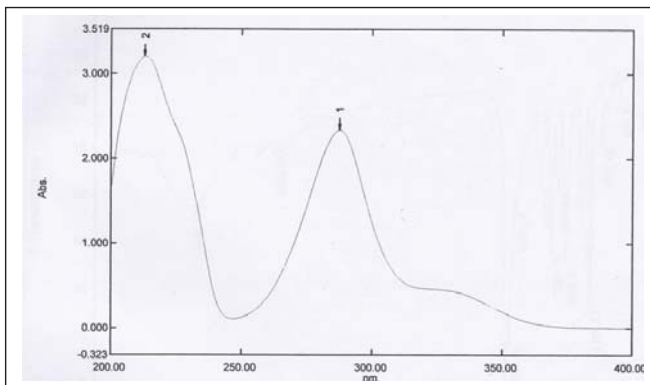
Kardamonin

Tabel 2. Data perbandingan spektra NMR senyawa 1 dan Kardamonin

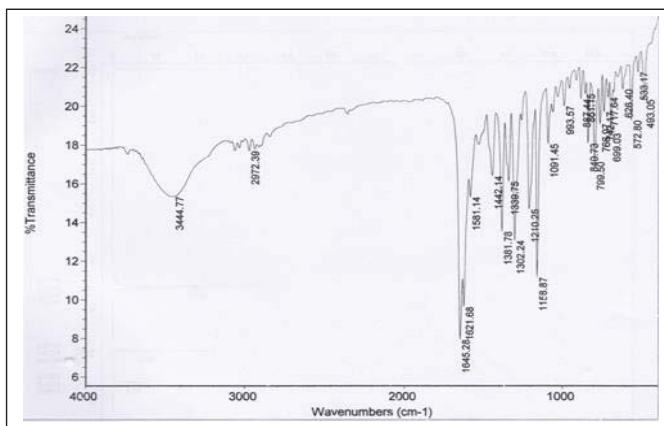
Posisi	P1 diukur dengan pelarut Aseton-D6		Kardamonin diukur dengan MeO D (Ching A.Y.L., et al., 2007)	
	$\delta$ ppm $^{13}\text{C}$	$\delta$ ppm $^1\text{H}$	$\delta$ ppm $^{13}\text{C}$	$\delta$ ppm $^1\text{H}$
1	135,55	-	137,0	-
2	128,31	$\delta$ 7,73 (2H, d, J=6,89 Hz)	129,3	$\delta$ 7,43 (5H, m)
3	128,94	$\delta$ 7,45 (3H, m)	130,1	$\delta$ 7,43 (5H, m)
4	130,07	$\delta$ 7,45 (3H, m)	131,2	$\delta$ 7,43 (5H, m)
5	128,34	$\delta$ 7,45 (3H,m)	130,1	$\delta$ 7,43 (5H, m)
6	128,31	$\delta$ 7,73 (2H, d, J=6,89 Hz)	129,3	$\delta$ 7,43 (5H, m)
7	127,58	$\delta$ 8,00 (1H, d, J=15,7 Hz)	128,9	$\delta$ 7,84 (1H, d, J=15,6)
8	141,75	$\delta$ 7,77 (1H, d, J=15,7 Hz)	142,9	$\delta$ 7,59 (1H, d, J=15,6)
9	192,23	-	191,9	-
1'	91,38	$\delta$ 6,08 (1H, d, J=2,16 Hz)	92,6	$\delta$ 5,93 (1H, d, J=2,76 Hz)
2'	163,48	-	168,8	-
2'-OMe	55,54	$\delta$ 3,98 (3H, s)	56,3	$\delta$ 3,84 (3H, s)
3'	105,29	-	106,6	-
4'	168,41	-	167,0	-
4'-OH	-	$\delta$ 9,60 (1H, s)	-	$\delta$ 4,54 (1H, s)
5'	96,06	$\delta$ 6,00 (2H, d, J=2,16 Hz)	97,5	$\delta$ 5,85 (1H, d, J=2,72 Hz)
6'	165,18	-	164,8	-
6'-OH	-	$\delta$ 9,60 (1H, s)	-	$\delta$ 4,54 (1H, s)

## Identifikasi senyawa 2

Senyawa 2 (400 mg) berupa kristal putih, hasil identifikasi secara spektroskopi menunjukkan spektrum spektrum UV (gambar 11), spektrum IR (gambar 12), spektrum  $^1\text{H}$  NMR (gambar 13),  $^{13}\text{C}$  NMR (gambar 14), dan spektroskopi dua dimensi HMQC (gambar 15), dan HMBC (gambar 16).

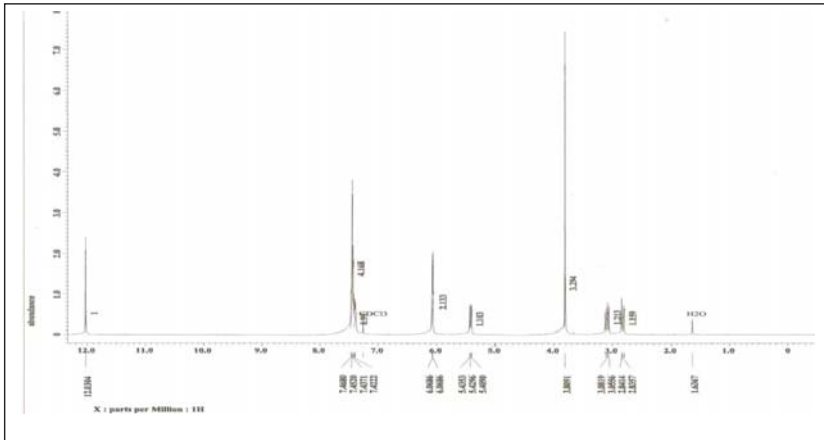


Gambar 11. Spektrum UV-Vis senyawa 2 dalam etanol

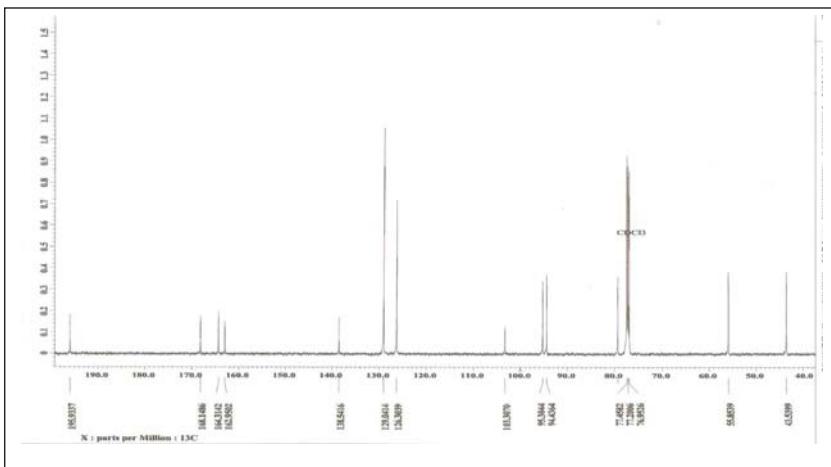


Gambar 12. Spektrum IR senyawa 2 dalam pelet KBr

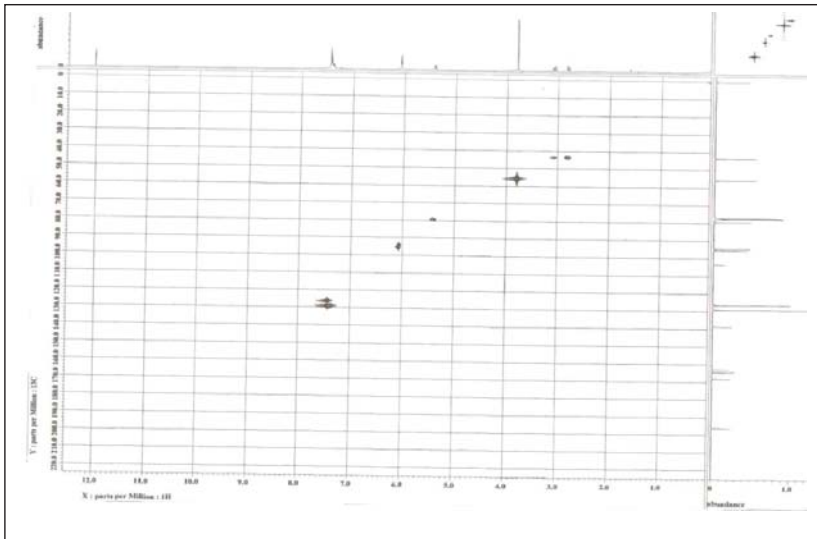
Data spektroskopi UV dalam metanol menunjukkan panjang gelombang pada 220 dan 289 nm, sedangkan data spektrofotometer IR (dalam pelet KBr) menunjukkan serapan pada 3444; 1645; 1381; dan 1158  $\text{cm}^{-1}$ .



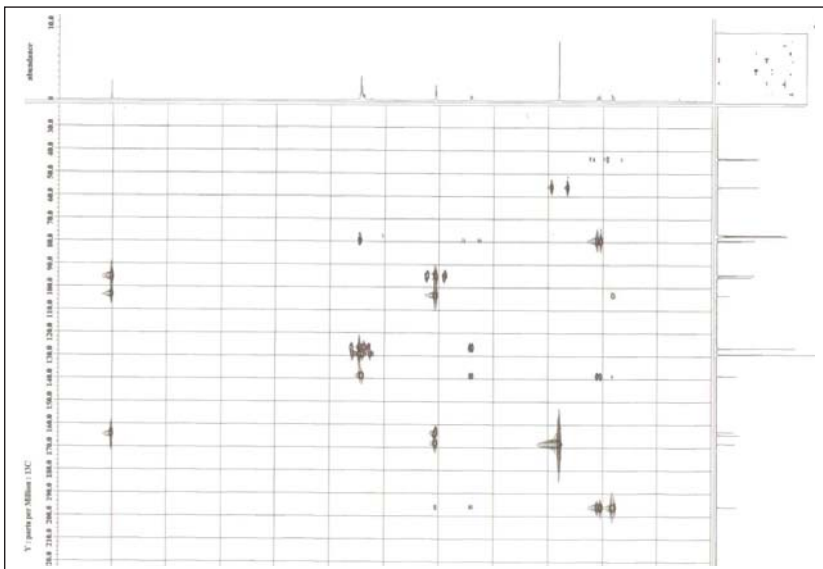
Gambar 13. Spektrum  $^1\text{H}$  NMR senyawa 2 dalam  $\text{CDCl}_3$



Gambar 14. Spektrum  $^{13}\text{C}$  NMR senyawa 2 dalam  $\text{CDCl}_3$



Gambar 15. Spektum HMQC total senyawa 2



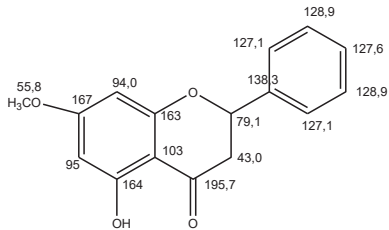
Gambar 16. Spektum HMBC total dari senyawa 2



Tabel 3. Hasil analisis data spektrum NMR proton dan karbon satu dan dua dimensi

No	$\delta$ C ppm	$\Delta$ H ( $\Sigma$ H; m; J Hz)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	-		
2	77.45	5.43 (1H, d, 12.0)	C4; C1'; C3
3	43.50	3.08 (1H, dd, 2.8; 12.0 ); 2.84 (1H, d, 2.8)	C4; C2
4	195.93	-	
5	164.30	-	C5; C7
6	95.30	6.04 (1H, br s)	C8; C5
7	168.30	-	
8	94.43	6.06 (1 H, br s)	C10; C5
9	163.14	-	
10	103.30	-	
1'	138.54	-	
2'	126.30	7.43 (1 H, br s)	C1';C2
3'	129.00	7.42 (1H, brs)	
4'	126.30	7.43 (1 H, br s)	
5'	129.00	7.42 (1H, brs)	
6'	126.30	7.43 (1 H, br s)	
5-OH	-	12.03 (1H, s)	C6; C10; C5
7-OCH3	55.85	3.81 (3H, s)	

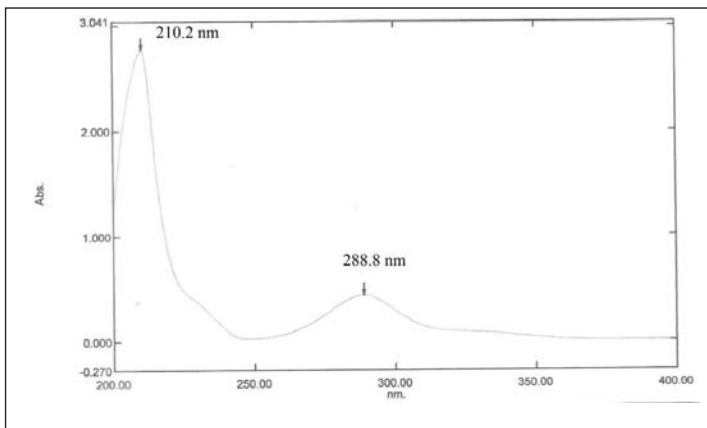
Data  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) dalam pelarut  $\text{CDCl}_3$  menunjukkan :  $\delta$  2,82 (1H,dd,  $J=3$ ; 3,6 Hz) ppm; 3,09 (1H, d,  $J=3$ ; 13 Hz) ppm; 3,8 (3H,s) ppm; 5,44 (1H, dd,  $J=3$ ;13 Hz) ppm; 6,08 (2H,dd,  $J=2,5$  Hz) ppm; 7,3 (5H, br s) ppm; 12,02 (1H, br s) ppm. Data  $^{13}\text{C}$  NMR (400 MHz) dilengkapi dengan Dept 135 dalam pelarut  $\text{CDCl}_3$  menunjukkan :  $\delta$  43,38 ppm ( $\text{CH}_2$ ); 55,68 ppm ( $\text{CH}_3$ ); 79,1 ppm (CH); 94,3 ppm (CH); 95,14 ppm (CH);102,3 ppm (C); 103,13 ppm (C); 126,12 ppm (2 CH); 126,86 (2 CH); 138,35 ppm (C); 162,77 ppm (C); 164,14 ppm (C); 167,98 ppm (C); 195,75 ppm (C). Dari data-data tersebut menunjukkan bahwa senyawa 2 hasil isolasi dari ekstrak etil asetat dari temu kunci adalah flavanoid yang memiliki gugus metoksil dan hidroksil yang pernah ditemukan sebelumnya dari kunci pepet yaitu pinostrobin (5-hidroksi-7-metoksi-flavanon) dengan struktur sebagai berikut:



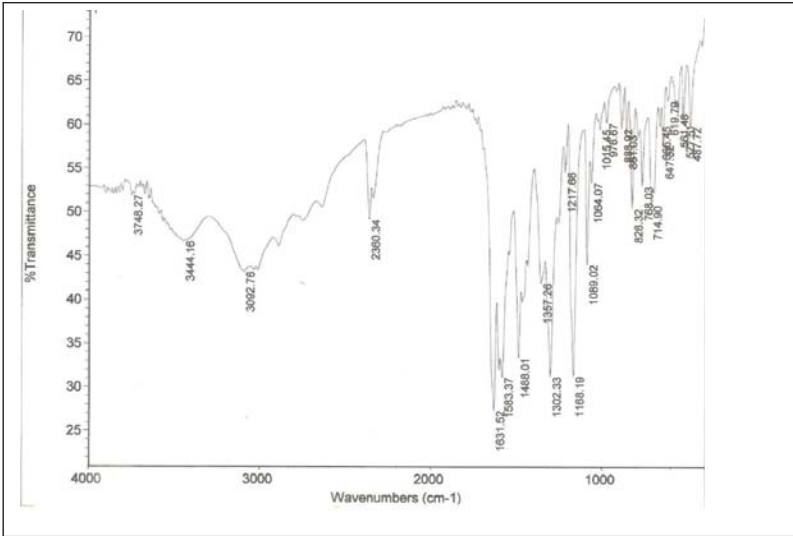
Pinostrobin

### Identifikasi struktur senyawa 3

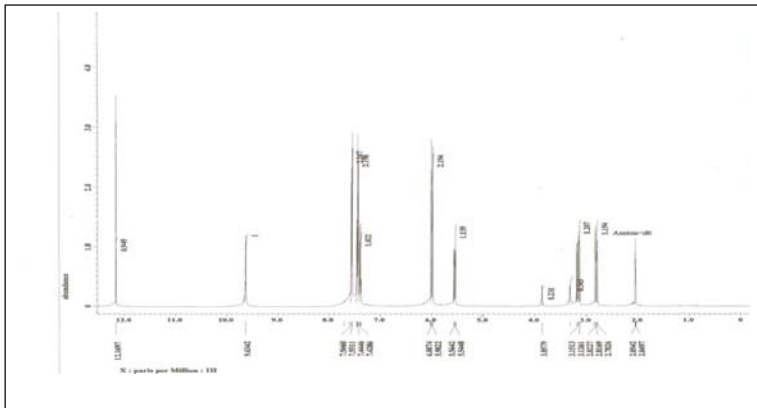
Senyawa 3 sebanyak 120 mg berupa padatan kuning pucat. Data spektrum UV, IR, Dan NMR satu dan dua dimensi terdapat pada gambar 17 sampai 22.



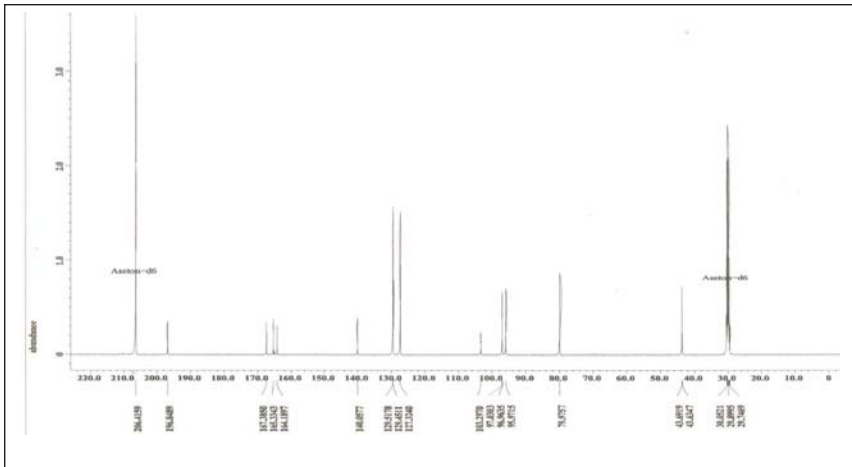
Gambar 17. Spektrum UV-Vis senyawa 3 dalam etanol



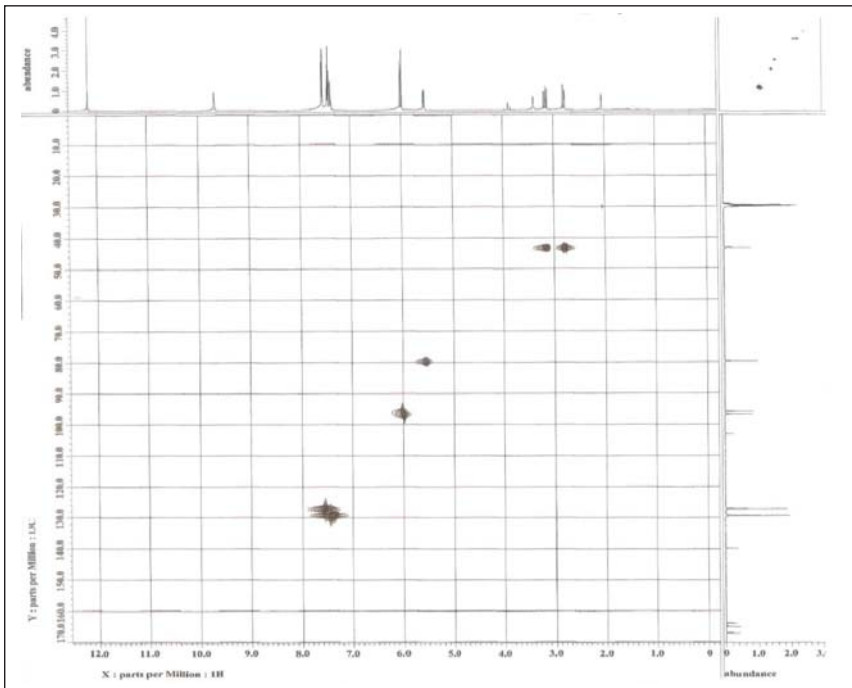
Gambar 18. Spektrum IR senyawa 3 dalam pelet KBr



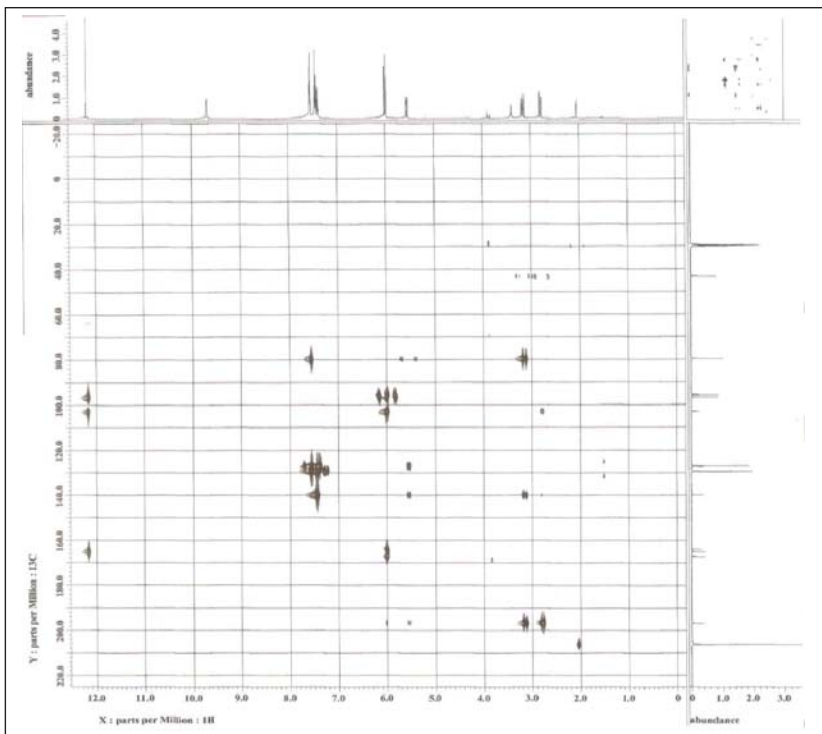
Gambar 19. Spektrum <sup>1</sup>H NMR senyawa 3 dalam aseton-d<sub>6</sub>



Gambar 20. Spektrum <sup>13</sup>C NMR senyawa 3 dalam aseton-d<sub>6</sub>

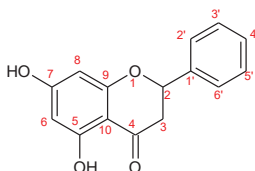


Gambar 21. Spektrum HMQC total senyawa 3



Gambar 22. Spektrum HMBC total dari senyawa 3

Hasil analisis spektrum UV-VIS senyawa 3 menunjukkan adanya panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) pada 210 dan 288 nm. Spektra IR senyawa 3 menunjukkan adanya puncak serapan pada bilangan gelombang 3444; 1631; 1168  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya gugus  $-\text{OH}$ ,  $\text{C}=\text{O}$ , dan  $\text{C}=\text{C}$  aromatik. Hasil analisis NMR proton dan karbon satu dan dua dimensi secara lengkap terdapat pada tabel 4. Berdasarkan data-data tersebut menunjukkan bahwa senyawa 3 adalah 5,7-dihidroksiflavanon. Dengan struktur sebagai berikut:



5,7-dihidroksiflavanon

Tabel 4. Hasil analisis data spektrum NMR proton dan karbon satu dan dua dimensi Senyawa 3

No	$\delta$ C ppm	$\Delta$ H ( $\Sigma$ H; m; J Hz)	HMBC
1	-		
2	79.47	5.56 (1H, dd, 2.9; 12.6)	C4; C1'; C3
3	43.63	2.82 (1H, dd, 2.9; 12.6); 3.18 (1H, dd, 2.9; 12.6)	C4; C2
4	196.85	-	
5	165.33	-	
6	96.60	5.98 (1H,d, 8.0)	C4
7	164.19	-	
8	95.91	6.01 (1H, br s)	C10; C5
9	167.38	-	
10	103.29	-	
1'	140.06	-	
2'	127.32	7.56 (1 H, d, 8.0)	C1'; C2'
3'	129.45	7.45 (1H, t,8.0; 8.0)	C2'; C1
4'	129.51	7.42 (1H, t, 8.0; 8.0)	C3'; C2'
5'	129.45	7.45 (1H, t,8.0; 8.0)	C2'; C1'
6'	127.32	7.56 (1 H, d, 8.0)	C1'; C2'
5-OH		12.16 (1H, br s)	C10; C6
7-OH		9.63 (1H, br s)	

## BAB IV

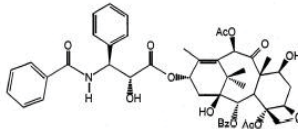
### PEMBUATAN NANOPARTIKEL DARI EKSTRAK ETANOL TEMUKUNCI

Dewasa ini penggunaan nanoteknologi banyak dikembangkan dalam bidang pengobatan. Nanoteknologi mengacu pada pemahaman dan penguasaan materi pada dimensi antara sekitar 1 dan 100 nanometer, dikenal sebagai skala nano. Pada skala nano akan memunculkan sifat fisik, kimia, dan biologi yang menunjukkan sifat yang karakteristik. Nanoteknologi telah diterapkan dalam berbagai bidang seperti elektronik, energi, ruang, obat-obatan, makanan, kimia sensor maupun manufaktur molekular. Nano adalah cabang yang berfokus pada penerapan teknologi dalam diagnosis cepat, pemberian obat, pencitraan, dan terapi. Sistem pengiriman obat berbasis nanopartikel telah membuat perbedaan yang luar biasa dalam penelitian menggunakan agen kemoterapi, karena sifat fisik, kimia dan biologis yang sangat menarik. Beberapa produk nanopartikel telah dikembangkan dan digunakan secara klinis (li X.Y, 2008; Dreaden E, 2012). Penggunaan nanoteknologi dalam penemuan obat kanker menunjukkan dapat mengurangi kerusakan pada sel normal, daya absorpsi dan distribusi yang dapat diatur sehingga obat kanker dapat bekerja lebih optimal (Ranganathan R, 2012).

Prinsip-prinsip desain dari nanopartikel, meliputi nano-emulsi, dendrimers, nano-gold, liposom, konjugat obat-*carrier*, antibodi kompleks, dan nanopartikel magnetik, terutama didasarkan pada proses sintesis, alami, atau biologis komponen, termasuk penggunaan polimer sintesis, ion logam, minyak, dan lipid sebagai bahan dasar gugus pembawa (*delivery system*). Namun, potensi keberhasilan partikel-partikel ini di klinik bergantung pada pertimbangan parameter penting seperti strategi fabrikasi nanopartikel, efisiensi penggunaan obat, potensi pelepasan obat, dan yang paling penting, toksisitas minimal dari gugus pembawa (Puri A, 2009).

Dalam beberapa tahun terakhir, jumlah produk yang mengandung bahan nanopartikel telah meningkat karena menunjukkan sifat fisik dan kimia yang dapat menguntungkan dalam pengiriman obat. Nanopartikel dapat terdiri dari lipid, gula, *degradable* atau *non-degradable* polimer, logam dan senyawa organik atau anorganik (Desai P, 2010). Beberapa obat kanker telah dibuat dalam bentuk nanopartikel dan telah disetujui oleh FDA antara lain abraxane (*FDA approved* Januari 2005), suatu obat kanker payudara dibuat dari taxol (paclitaxel) diikatkan dengan albumin dan memiliki ukuran

partikel 130 nanometer. Doxil juga merupakan obat kanker ovarium dalam bentuk nanopartikel lipid dengan polietilen glikol (PEG). Selain obat kanker juga ada obat penurun kolesterol dengan nama dagang Tricor (*FDA approved* Desember 2004) dalam bentuk nanokristal koloid.



Taxol

Kurkuminoid merupakan senyawa yang banyak ditemukan dari rimpang tumbuhan genus *Curcuma*, seperti *Curcuma zedoria*, *Curcuma mangga* yang memiliki aktivitas sitotoksik terhadap beberapa jenis sel kanker, saat ini banyak dikembangkan dalam bentuk nanopartikel. Hasil penelitian Mulik R., et al (2009) menunjukkan kurkuminoid yang dibuat nanopartikel dengan poli(butil)sianoakrilat bersifat lebih stabil terhadap kondisi asam dan tidak mengalami kerusakan pada penyimpanan sampai 6 bulan. Demikian juga hasil penelitian Tiyaboonchai W. et al (2007) menunjukkan kurkuminoid dalam bentuk solid lipid nanopartikel menunjukkan sifat stabilitas yang lebih baik.

### **Pembuatan nanopartikel ekstrak etanol temukunci**

#### **Nanopartikel ekstrak etanol temu kunci-kitosan-natrium tripolifosfat**

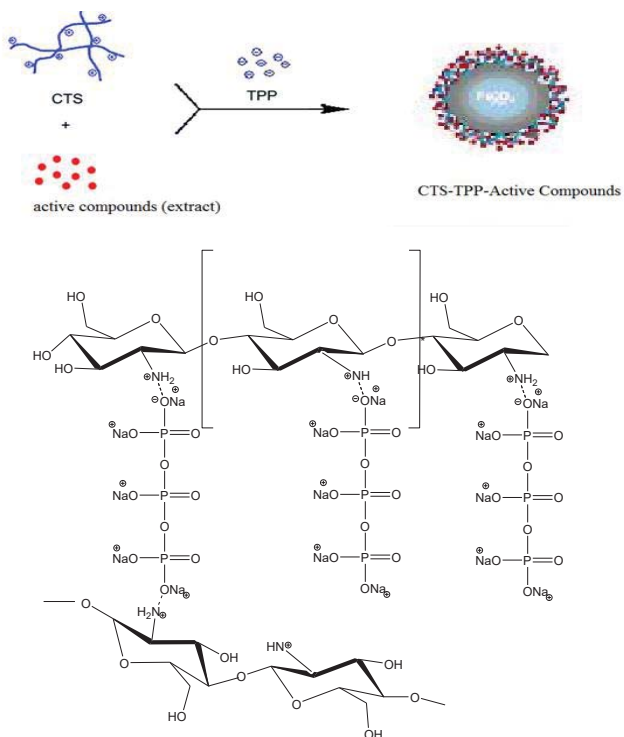
Pembuatan nanopartikel fraksi etanol temukunci dengan kitosan menggunakan metode gelasi ionik. Metode ini dipilih karena relatif sederhana, dan tidak membutuhkan pemanasan tetapi hanya dilakukan pada suhu kamar sehingga tidak akan merusak senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak. Dalam metode gelasi ionik digunakan natrium tripolifosfat sebagai penyambung silang partikel kitosan sehingga terbentuk matrik berukuran nanopartikel, yang selanjutnya komponen aktif akan terikat ke dalam pori-pori nanopartikel tersebut. Cara pembuatan nanopartikel yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1 g ekstrak etanol temukunci dilarutkan dalam 35 ml etanol absolut dan ditambah 15 ml akuades. Selanjutnya ditambahkan 100 ml larutan kitosan 0,1% (0,1 g kitosan dilarutkan dalam larutan 1% asam asetat). Campuran selanjutnya dihomogenkan dengan menggunakan magnetik stirer selama 10 menit. Selanjutnya ke dalam campuran ditambahkan 350 ml larutan natrium tripolifosfat 0,02%. Campuran selanjutnya dihomogenkan menggunakan



magnetik stirer selama 2 jam. Selanjutnya distabilkan dengan cara didiamkan selama satu malam dalam freezer. Campuran selanjutnya disentrifuge dengan kecepatan  $80 \times 10.000$  rpm selama 15 menit. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan dikeringkan dalam fresszerr. Dalam penelitian ini dilakukan variasi konsentrasi kitosan dan konsentrasi natrium tripolifosfat. Hasil sintesis nanopartikel selanjutnya dikarakterisasi menggunakan PAS; zeta potensial, dan SEM. Data yang diperoleh terdapat pada Tabel 5.

Mekanisme reaksi pembentukan produk nanopartikel ekstrak etanol temukunci-kitosan-Natrium tripolifosfat (Na-TPP) dapat digambarkan pada Gambar 1. Kitosan merupakan polimer linier yang memiliki gugus amino yang dengan asam membentuk ion amonium yang bermuatan positif. Pada penambahan natrium tripolifosfat yang memiliki muatan negatif akan terjadi interaksi ionik, sehingga terbentuk polimer jaringan tiga dimensi yang memiliki pori. Komponen-komponen senyawa dalam ekstrak akan terjebak ke dalam pori tersebut.



Gambar 23. Mekanisme reaksi terjadinya nanopartikel kitosan

Tabel 5. Hasil sintesis nanopartikel pada berbagai Variasi komposisi pembuatan matrik kitosan dengan Na-TPP dari ekstrak etanol temukunci

Kode For mula	Sampel ekstrak etanol (g)	Konsentrasi kitosan (% dalam 100 ml larutan asam asetat)	Variasi konsentrasi Natrium tripolifosfat (%)	Rerata produk; warna (mg)	Berat produk; warna	% Nanopartikel	Ukuran nanopartikel (nm)	% mikropartikel kel	Ukuran mikropartikel (µm)	Rerata Zeta Potensial (mV)
A1	1	0,1	0,02	334; muda	Coklat	1,3	877	98,7	1005-1510	-
A2	1	0,2	0,02	444; muda	coklat	68,7	510-877	31,3	1005-1510	26,83
A3	1	0,3	0,02	395; muda	coklat	0	-	100	1005-1729	-
A4	1	0,4	0,02	523; muda	coklat	1	766-877	99	1005-2269	-
A5	1	0,1	0,01	440; muda	coklat	75,8	389-877	24,2	1005-1151	14,40
A6	1	0,08	0,01	501; muda	coklat	98,1	389-877	1,9	1005	41,87
A7	1	0,09	0,01	380; muda	coklat	70,1	296-877	29,9	1005-1729	-
A8	1	0,10	0,01	414; muda	coklat	45,7	339-877	54,3	1005-1729	-
A9	1	0,11	0,01	478; muda	coklat	19,0	766-877	81,0	1005-1151	-
A10	1	0,12	0,01	413; muda	coklat	53,7	339-877	46,3	1005-1510	-

### **Nanopartikel ekstrak etanol temukunci-asam alginat-Ca<sup>2+</sup>**

Sintesis nanopartikel ekstrak etanol temukunci dengan asam alginat dan ion Ca<sup>2+</sup> menggunakan metode gelasi ionik. Metode ini dipilih karena relatif sederhana, dan tidak membutuhkan pemanasan tetapi hanya dilakukan pada suhu kamar sehingga tidak akan merusak senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak. Dalam metode gelasi ionik digunakan Ca<sup>2+</sup> sebagai penyambung silang partikel asam alginat, sehingga terbentuk matrik berukuran nanopartikel, yang selanjutnya komponen aktif akan terikat ke dalam pori-pori nanopartikel tersebut. Hasil yang diperoleh pada sintesis nanopartikel setelah dikeringkan seperti terdapat pada tabel 6.

### **Nanopartikel ekstrak etanol temukunci dengan penambahan kitosan-asam alginat-Ca<sup>2+</sup>**

Sintesis nanopartikel ekstrak etanol temu kunci dengan penambahan kitosan-asam alginat-Ca<sup>2+</sup> pada berbagai variasi konsentrasi juga dilakukan dengan metode gelasi ionik, asam alginat dapat membentuk jaringan dengan kitosan, ion karboksilat dari asam alginat akan berinteraksi dengan gugus amino dari kitosan, demikian juga ion Ca<sup>2+</sup> juga akan berinteraksi secara ionik dengan gugus karboksilat yang lainnya. Hasil sintesis diperoleh data seperti pada Tabel 7.

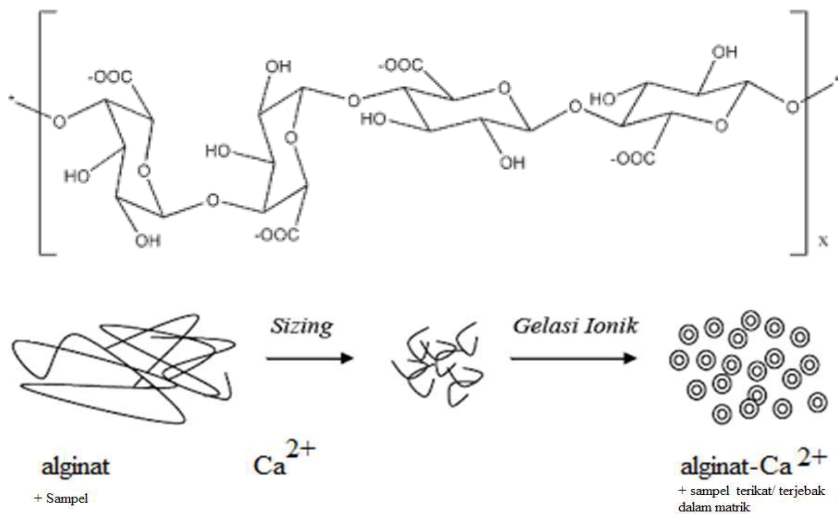
Tabel 6. Hasil sintesis nanopartikel pada berbagai Variasi komposisi pembuatan matrik asam alginat dengan ion  $Ca^{2+}$  dari ekstrak etanol temukunci

Kode For mula	Sampel fraksi kloroform kunci pepet (g)	Konsentrasi asam alginat (%)	Variasi konsentrasi kalsium klorida (%),	Rerata Berat produk; warna (mg)	% Nano partikel dan	Ukuran nano partikel (nm)	% mikro partikel	Ukuran mikro partikel ( $\mu m$ )	Rerata Zeta Potensial (mV)
B1	1	0,1	0,1	569; Coklat muda	0	-	100	2269-3409	-
B2	1	0,3	0,1	576; coklat muda	0	-	100	1005-3409	-
B3	1	0,5	0,1	894; coklat muda	0	-	100	3905-5122	-
B4	1	0,1	0,2	649; coklat muda	16,5	510-669	83,5	6000	-
B5	1	0,1	0,3	637; coklat muda	0	-	100	1151-1318	-
B6	1	0,1	0,4	597; coklat muda	0	-	100	1318-6000	-
B7	1	0,1	0,01	167, coklat muda	80,8	226-877	19,2	1005-1318	89,5
B8	1	0,1	0,015	227, coklat muda	83,3	259-877	16,7	1005-1981	84,7
B9	1	0,1	0,02	246, coklat muda	90,2	197-877	9,8	1005-1151	82,1
B10	1	0,1	0,03	228, coklat muda	65,5	259-877	34,5	1005-1510	-
B11	1	0,1	0,04	182, coklat muda	95,2	339-877	4,8	2269-3905	72,1

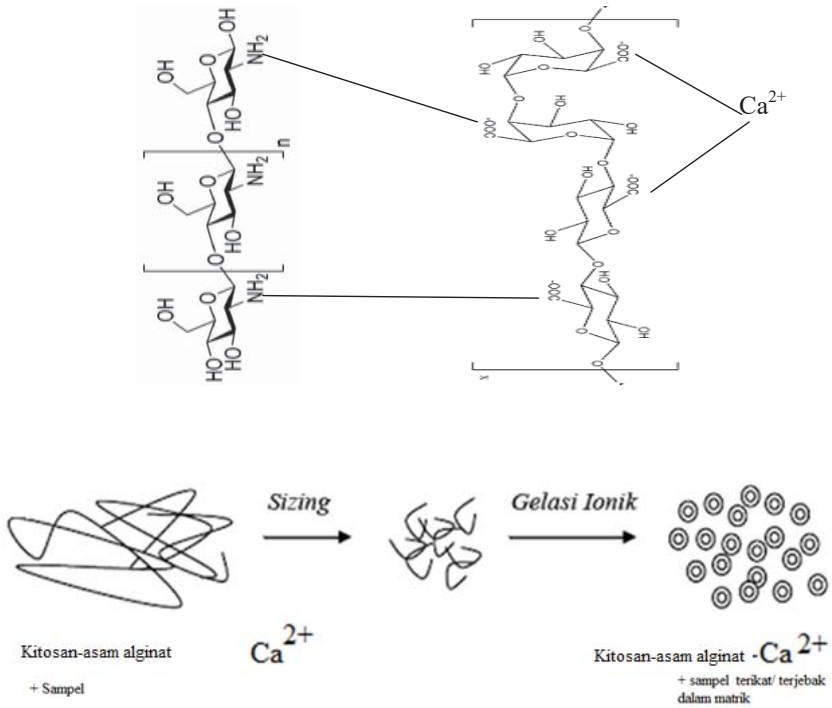
Tabel 7. Hasil sintesis nanopartikel ekstrak etanol tembakung dengan kitosan- asam alginat -  $\text{Ca}^{2+}$

Kode Formula	Sampel fraksi kloroform kunci pepet (g)	Variasi konsentrasi alginat (%)	Variasi konsentrasi kitosan volume 50 ml (dalam asam asetat glasial)	Konsentra si kalsium klorida (%),	Rerata produk; warna	Berat	% Nano partikel	Ukuran nano partikel (nm)	% mikropartikel	Ukuran mikro partikel ( $\mu\text{m}$ )	Rerata Zeta Potensial (mV)
C1	1 g	0,1	0,05	0,015	592; Coklat muda		0	-	100	2269-3409	-
C2	1 g	0,1	0,01	0,015	610; coklat muda		1,4	877	98,6	1005-6000	-
C3	1 g	0,1	0,03	0,015	427; coklat muda		29,7	226-877	70,3	1005-1729	-
C4	1 g	0,01	0,1	0,015	384; coklat muda		3,6	877	96,4	1005-6000	-
C5	1 g	0,05	0,1	0,015	504; coklat muda		0	-	100	1510-2269	-

Mekanisme reaksi pembentukan nanopartikel ekstrak etanol temukunci dengan asam alginat dan ion  $\text{Ca}^{2+}$  digambarkan pada Gambar 24. Asam alginat yang merupakan polimer linier memiliki gugus karboksil akan berinteraksi secara ionik dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga akan membentuk jaringan tiga dimensi. Jaringan yang terbentuk memiliki pori-pori sehingga komponen-komponen yang terdapat dalam ekstrak akan masuk ke dalam pori tersebut. Demikian pula mekanisme yang terjadi pada reaksi pembentukan nanopartikel ekstrak etanol temukunci dengan kitosan-asam alginat dan ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang terdapat pada Gambar 3. Ion karboksil yang bermuatan negatif dari asam alginat akan berinteraksi dengan ion amonium dari gugus amino ( $\text{NH}_2$ ) dari kitosan yang dalam asam membentuk ion  $\text{NH}_3^+$ , disamping itu ion karboksil juga akan berinteraksi dengan ion  $\text{Ca}^{2+}$



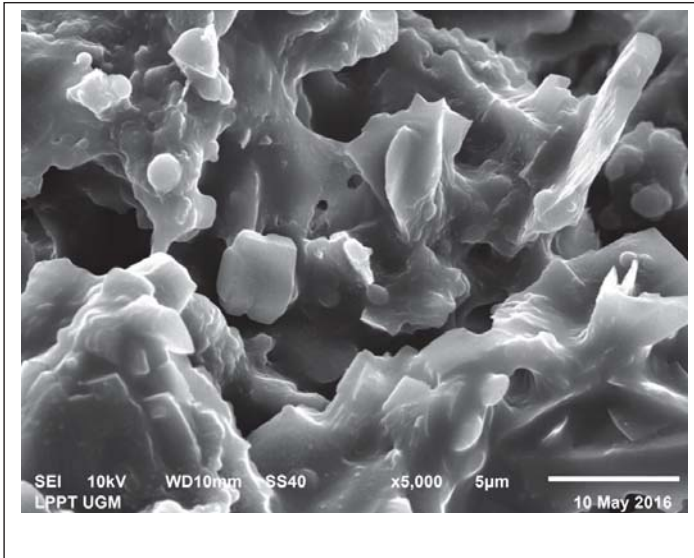
Gambar 24. Proses terjadinya nanopartikel asam alginat- $\text{Ca}^{2+}$



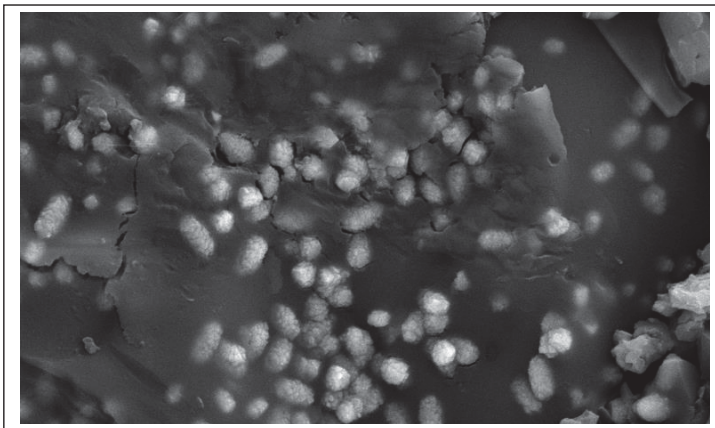
Gambar 25. Proses terjadinya nanopartikel kitosan - asam alginat- $\text{Ca}^{2+}$

### Identifikasi bentuk permukaan nanopartikel menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*)

Produk hasil sintesis yang mengandung komponen nanopartikel selanjutnya dianalisis bentuk morfologi permukaan nanopartikel menggunakan SEM (*Scanning Electron Microscopy*). Data morfologi dari produk yang menunjukkan prosentasi nanopartikel terbesar (A6; B11; C3) terdapat pada Gambar 26, 27, dan 28.

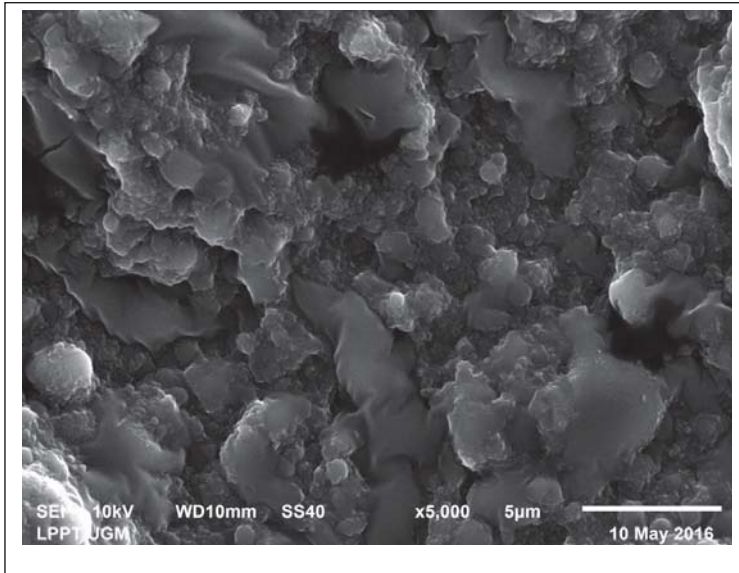


Gambar 26. Nano partikel ekstrak etanol temu kunci-kitosan-NaTPP (5000x)



Gambar 27. Nano partikel ekstrak etanol temu kunci-asam alginat-Ca<sup>2+</sup> (5000x)





Gambar 28. Nano partikel ekstrak etanol temu kunci-kitosan-asam alginat- $\text{Ca}^{2+}$  (5000x)

## BAB V

### UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN SENYAWA BIOAKTIF DAN PRODUK NANOPARTIKEL EKSTRAK ETANOL TEMUKUNCI

Penyakit degeneratif umumnya terjadi akibat kerusakan sel, jaringan lemak, protein, sistem kekebalan, dan DNA yang disebabkan oleh berbagai faktor baik terjadi secara alami, terkena radiasi, atau oleh zat-zat kimia yang bersifat karsinogenik. Ada berbagai macam teori yang dapat menjelaskan penyebab penyakit degeneratif. Salah satu teori yang dianggap cukup signifikan adalah teori reaksi radikal bebas. Menurut teori ini penyebab penyakit degeneratif adalah akibat timbulnya radikal hidroksil dalam mekanisme biokimia yang terjadi di dalam tubuh.

Radikal bebas (*free radical*) adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai satu elektron atau lebih yang tidak berpasangan. Secara teoritis radikal bebas dapat terbentuk bila terjadi pemisahan ikatan kovalen. Radikal bebas dianggap berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya, dapat pula terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya terambil untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Oleh karena sifatnya yang sangat reaktif dan gerakannya yang tidak beraturan, maka apabila terjadi di dalam tubuh makhluk hidup akan menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel (Muhilal, 1991; Auroma, 1994). Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain kerusakan membran sel, protein, DNA, dan lipid. Kerusakan tersebut dapat menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif seperti katarak, kanker, atherosklerosis, dan proses ketuaan (Muhilal, 1991).

Salah satu cara pencegahan pembentukan radikal bebas adalah dengan menggunakan zat gizi yang dapat berperan sebagai antioksidan seperti vitamin E, karoten, vitamin C, maupun obat-obatan lain yang mampu menangkap radikal tersebut. Senyawa-senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenol seperti flavonoid, oligoresveratrol, maupun asam fenolat. Penelitian yang dilakukan oleh Antonia M.M (2001) menunjukkan bahwa resveratrol dan oligomer resveratrol menunjukkan sifat antioksidan yang jauh lebih tinggi dibanding BHT dan vitamin E. Demikian juga penelitian yang dilakukan oleh Kim (2002) yang menunjukkan bahwa tran  $\epsilon$ -viniferin memiliki sifat antioksidan yang lebih tinggi dibanding vitamin C.

### Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH, menggunakan reagen 2,2-difenil-pikrilhidrasil (DPPH) sebagai sumber radikal. Sampel dilarutkan dalam etanol pada berbagai variasi konsentrasi (1000 – 10 µg/mL). Sebanyak 5 ml sampel dicampurkan dengan 5 ml larutan DPPH dalam etanol (0,12 mM) diletakkan dalam ruang gelap pada temperatur kamar selama 30 menit. Aktivitas serapan sampel diukur dengan menggunakan spektrometri 20 (Genesys) pada panjang gelombang 516 nm dan dibandingkan terhadap serapan larutan kontrol. Aktivitas antioksidan dari masing-masing sampel dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{[A \text{ kontrol} - A \text{ sampel}]}{[A \text{ kontrol}]} \times 100\%$$

Selanjutnya dari % aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi digunakan untuk menghitung harga IC<sub>50</sub> tiap sampel. Aktivitas antioksidan dibandingkan juga terhadap kontrol positif (vitamin C) dan ekstrak etanol sebelum perlakuan. Hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak, senyawa hasil isolasi temukunci, dan produk nanopartikel terdapat pada Tabel 7.

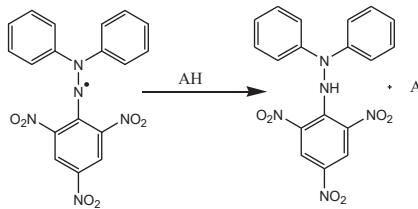
Tabel 7. Aktivitas Inhibisi (IC<sub>50</sub>) dari ekstrak, senyawa hasil isolasi, dan produk nanopartikel temukunci (*B. rotunda*)

Sampel	IC <sub>50</sub> µg/mL	Note
Ekstrak etanol temukunci ( <i>B. rotunda</i> )	92,64	aktif
2',4'-dihidroksi-6-metoksikalkon (1)	46,66	aktif
5-hidroksi-7-metoksihoxyflavanone (2)	62,84	aktif
5, 7- dihidroksiflavanone (3)	62,66	aktif
A6. Nanopartikel kitosan (98.1%)	153,27	Kurang aktif
B9. Nanopartikel asam alginat (90.2%)	99,14	aktif
C3. Nanopartikel kitosan- asam alginat (29.7%)	27,05	aktif
B11. Nanopartikel asam alginat (95.2%)	139,0	Kurang aktif
Vitamin C (kontrol positif)	3,77	Sangat aktif

IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL Kurang aktif; 100-10 µg/mL aktif; < 10 µg/mL Sangat aktif

Uji aktivitas antioksidan untuk ekstrak etanol sampel, senyawa hasil isolasi dari temukunci, produk nanopartikel ekstrak etanol temulunci, dan asam askorbat (kontrol positif)

diidentifikasi dengan metode DPPH. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, yang didasarkan pada reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan melalui mekanisme transfer atom oksigen, yang akan menghasilkan molekul DPPH-H yang tidak radikal bentuknya stabil (Molyneox P, 2004). Reaksi penangkapan DPPH radikal oleh antioksidan ditunjukkan pada gambar 29.



Gambar 29. Reaksi penangkapan radikal DPPH oleh antioksidan

Akibat adanya senyawa antioksidan akan mengurangi konsentrasi DPPH yang ditunjukkan oleh penurunan intensitas warna ungu dibandingkan senyawa antioksidan. Adanya penurunan konsentrasi DPPH ditentukan menggunakan spektrometri UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm dibandingkan dengan larutan kontrol. Aktivitas antioksidan dihitung sebagai persentase penurunan konsentrasi DPPH bila dibandingkan dengan kontrol. Perhitungan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH didasarkan pada nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  adalah konsentrasi sampel yang mampu memberikan penghambatan 50%. Nilai  $IC_{50}$  berbanding terbalik dengan kemampuan sampel yang bersifat antioksidan, semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan aktivitas antioksidan lebih kuat. Hasil perhitungannya adalah pada Tabel 7. Hasil tersebut menunjukkan bahwa pinostrobin memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada ekstrak etanol rimpang temukunci. Hal ini disebabkan ekstrak etanol temukunci banyak komponen lain yang mengandung aktivitas rendah sebagai antioksidan. Asam askorbat merupakan senyawa antioksidan yang banyak diketahui, menunjukkan aktivitas antioksidan sangat tinggi dan digunakan sebagai kontrol positif seperti yang dilakukan oleh Biswas (2010). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol temukunci dan pinostrombin memiliki  $IC_{50}$  di bawah  $100 \mu\text{g/mL}$ , sehingga aktivitas antioksidannya termasuk tinggi.

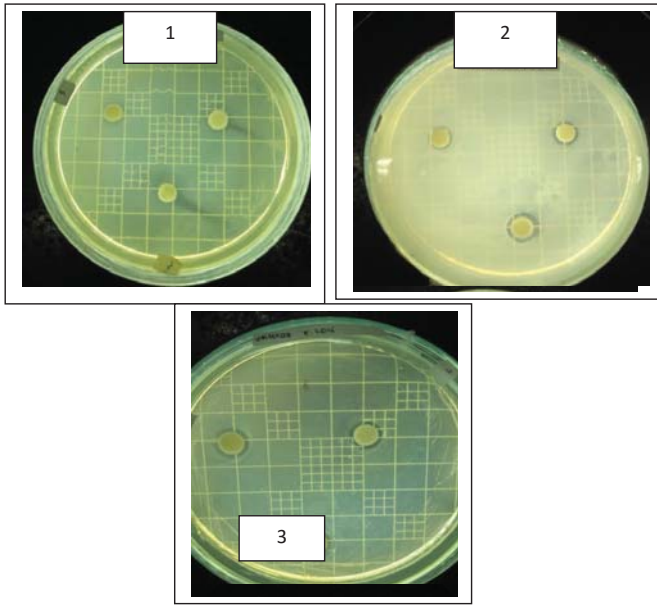
## BAB VI

### AKTIVITAS ANTIBAKTERI SENYAWA BIOAKTIF DAN PRODUK NANOPARTIKEL DARI TEMUKUNCI

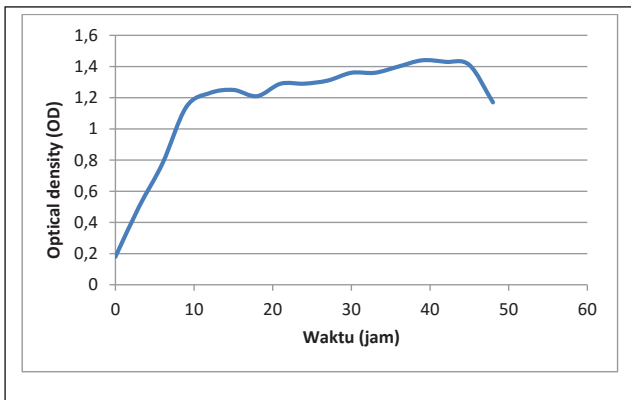
Sampel yang diuji antibakteri adalah ekstrak etanol *B. rotunda*; nanopartikel kitosan ekstrak etanol *B. rotunda*; nanopartikel asam alginat ekstrak etanol *B. rotunda*, senyawa hasil isolasi yaitu kardamonin, pinostrobin, dan 5,7-dihidroksiflavanoid. Sebagai kontrol positif digunakan kloramfenicol, sedangkan kontrol negatif digunakan pelarutnya yaitu DMSO (dimetil sulfoksida).

#### **Hasil uji aktivitas terhadap bakteri *S. mutans***

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol dari temukunci dan produk nanopartikel kitosan dan asam alginat dari ekstrak etanol temukunci menggunakan bakteri patogen *S. mutans* dengan metode uji Kirby-Bauer secara metode difusi agar (Gambar 30). Pengukuran kurva pertumbuhan bakteri *S. mutans* (Gambar 31) menunjukkan fase logaritmik pada 3 sampai 15 jam, karena pada saat itu menunjukkan peningkatan nilai absorbansi yang cepat. Pengamatan di zona diameter penghambatan di sekitar cakram masing-masing sampel dilakukan setiap 6 jam selama 24 jam inkubasi. Hasil analisis antibakteri dari ekstrak etanol temukunci, produk nanopartikel dan senyawa hasil isolasi terdapat pada tabel 8. Dalam penelitian ini digunakan DMSO yang tidak diencerkan untuk melarutkan sampel, dan DMSO juga digunakan sebagai kontrol negatif. Zona diameter penghambatan untuk DMSO setelah 6 jam adalah  $7,98 \pm 0,42$  mm. Hasil ini menunjukkan bahwa setiap sampel pada berbagai konsentrasi (0,5 sampai 500  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) menunjukkan penghambatan zona yang lebih besar, sehingga sampel yang diteliti memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *S. mutans*.



Gambar 30. Skrining aktivitas antibakteri *S. mutans* menggunakan metode difusi dari Kirby Bauer test (1=DMSO (negative control); 2= sample; 3=Chloramphenicol (positive control))



Gambar 31. Kurva pertumbuhan dari *Streptococcus mutans*

Tabel 9. Diameter penghambatan dari ekstrak etanol dan produk nanopartikel kitosan dan asam alginat dari *B. rotunda* pada berbagai variasi konsentrasi terhadap bakteri *S. mutans*

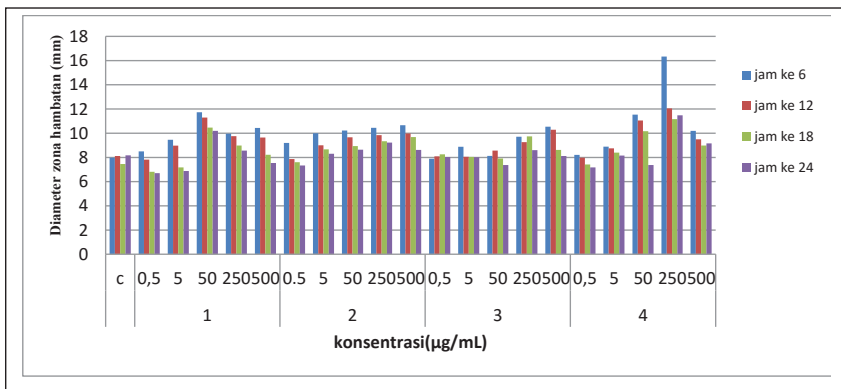
No	sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
C	DMSO	-	7.98 $\pm$ 0.42	8.12 $\pm$ 0.61	7.46 $\pm$ 0.39	8.17 $\pm$ 0.69
1	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.50 $\pm$ 0.41	7.82 $\pm$ 0.34	6.81 $\pm$ 0.47	6.70 $\pm$ 0.43
		5	9.46 $\pm$ 0.56	8.97 $\pm$ 0.73	7.18 $\pm$ 0.53	6.88 $\pm$ 0.41
		50	11.73 $\pm$ 1.13	11.29 $\pm$ 0.93	10.46 $\pm$ 1.08	10.19 $\pm$ 0.99
		250	9.96 $\pm$ 0.43	9.76 $\pm$ 0.36	8.98 $\pm$ 0.45	8.56 $\pm$ 0.62
		500	10.44 $\pm$ 1.00	9.64 $\pm$ 1.09	8.22 $\pm$ 0.73	7.54 $\pm$ 0.67
2	Nanopartikel kitosan dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	9.20 $\pm$ 1.09	7.87 $\pm$ 0.33	7.60 $\pm$ 0.39	7.33 $\pm$ 0.29
		5	10.00 $\pm$ 0.62	9.00 $\pm$ 0.32	8.67 $\pm$ 0.54	8.30 $\pm$ 0.48
		50	10.22 $\pm$ 0.34	9.66 $\pm$ 0.44	8.94 $\pm$ 0.26	8.64 $\pm$ 0.74
		250	10.45 $\pm$ 0.48	9.84 $\pm$ 0.62	9.34 $\pm$ 0.52	9.23 $\pm$ 0.57
		500	10.66 $\pm$ 0.98	9.98 $\pm$ 0.72	9.68 $\pm$ 0.37	8.62 $\pm$ 0.65
3	Nanopartikel alginat dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	7.89 $\pm$ 0.60	8.09 $\pm$ 0.62	8.26 $\pm$ 0.69	8.03 $\pm$ 0.60
		5	8.88 $\pm$ 0.64	8.05 $\pm$ 0.68	8.04 $\pm$ 1.26	8.01 $\pm$ 0.31
		50	8.13 $\pm$ 0.47	8.56 $\pm$ 0.63	7.91 $\pm$ 0.91	7.37 $\pm$ 2.83
		250	9.71 $\pm$ 0.73	9.26 $\pm$ 0.49	9.74 $\pm$ 1.03	8.60 $\pm$ 0.34
		500	10.54 $\pm$ 1.04	10.29 $\pm$ 1.23	8.62 $\pm$ 0.59	8.12 $\pm$ 1.27
4	Pinostrobin	0.5	9.63 $\pm$ 0.73	9.01 $\pm$ 1.10	8.32 $\pm$ 1.01	7.70 $\pm$ 1.32
		5	11.58 $\pm$ 2.11	8.40 $\pm$ 0.64	7.73 $\pm$ 0.88	7.37 $\pm$ 0.55
		50	10.75 $\pm$ 0.66	6.65 $\pm$ 1.00	6.93 $\pm$ 0.94	5.88 $\pm$ 0.76
		250	8.33 $\pm$ 0.95	8.34 $\pm$ 0.98	7.97 $\pm$ 1.78	7.41 $\pm$ 1.23
		500	8.15 $\pm$ 1.01	6.86 $\pm$ 0.77	6.87 $\pm$ 0.56	6.07 $\pm$ 0.61
	5,7 Dihidroksi-Flavanon	0.5	9.20 $\pm$ 0.75	9.25 $\pm$ 0.71	9.31 $\pm$ 0.81	9.08 $\pm$ 0.69
		5	12.91 $\pm$ 2.15	14.06 $\pm$ 2.30	13.32 $\pm$ 1.62	10.92 $\pm$ 1.35
		50	8.31 $\pm$ 0.51	8.88 $\pm$ 1.05	8.68 $\pm$ 0.95	8.06 $\pm$ 0.83
		250	6.83 $\pm$ 0.87	9.06 $\pm$ 0.74	8.62 $\pm$ 0.60	6.57 $\pm$ 0.72
		500	9.23 $\pm$ 0.73	8.49 $\pm$ 0.70	8.25 $\pm$ 0.76	7.13 $\pm$ 1.13
6	Kardamonin	0.5	8.62 $\pm$ 0.55	8.29 $\pm$ 0.63	8.26 $\pm$ 0.75	8.17 $\pm$ 0.84
		5	8.73 $\pm$ 0.72	8.20 $\pm$ 0.93	8.87 $\pm$ 0.71	8.24 $\pm$ 1.21

No	sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
		50	9.94 $\pm$ 1.37	8.47 $\pm$ 0.77	8.85 $\pm$ 0.66	8.50 $\pm$ 0.77
		250	8.45 $\pm$ 1.16	6.42 $\pm$ 0.89	7.08 $\pm$ 0.71	6.15 $\pm$ 0.55
		500	8.03 $\pm$ 0.44	7.62 $\pm$ 0.82	8.15 $\pm$ 1.01	7.51 $\pm$ 0.91
7	Kloramfenikol (kontrol positif)	0.5	8.21 $\pm$ 0.46	7.98 $\pm$ 0.44	7.42 $\pm$ 0.45	7.18 $\pm$ 0.69
		5	8.89 $\pm$ 0.88	8.75 $\pm$ 0.74	8.40 $\pm$ 0.67	8.15 $\pm$ 0.60
		50	11.54 $\pm$ 0.75	11.05 $\pm$ 0.44	10.17 $\pm$ 0.47	7.37 $\pm$ 0.90
		250	16.33 $\pm$ 2.45	12.05 $\pm$ 1.03	11.16 $\pm$ 0.28	11.48 $\pm$ 1.05
		500	10.19 $\pm$ 0.49	9.50 $\pm$ 0.87	8.98 $\pm$ 0.85	9.16 $\pm$ 1.40

\*Rerata dari 9 kali pengukuran

\*Analisis statistik menggunakan SPSS version of windows 16.0 menunjukkan ada pengaruh variasi waktu terhadap diameter zona inhibisi terhadap bakteri *S. mutans* ( $p < 0.05$ ); Ada pengaruh konsentrasi terhadap diameter zone inhibisi terhadap bakteri *S. mutans* ( $p < 0.05$ ); Ada pengaruh variasi jenis sampel terhadap diameter zone inhibisi terhadap bakteri *S. mutans* ( $p < 0.05$ )

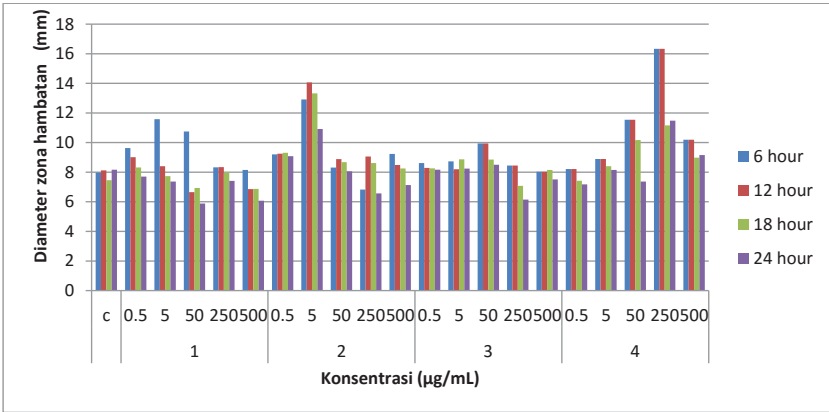
Dari data tersebut apabila dibuat dalam bentuk diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi diperoleh data seperti pada Gambar 32.



Gambar 32. Diagram aktivitas inhibisi terhadap *S. mutans* dari masing-masing konsentrasi

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= ekstrak etanol *B. rotunda*; 2= Nanopartikel kitosan ekstrak etanol *B. rotunda*; 3= Nanopartikel asam alginat dari ekstrak etanol *B. rotunda* ; 4= kloramfenikol (kontrol positif)



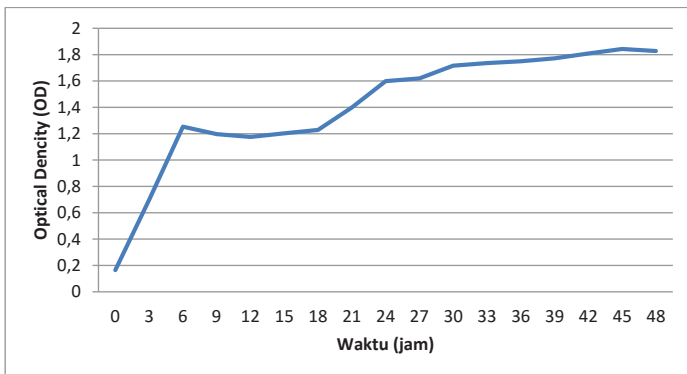


Gambar 33. Diagram aktivitas inhibisi terhadap *S. mutans* sampel pada variasi konsentrasi dan waktu

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= Pinostrobin 2=5,7 Dihidroksiflavanon; 3=Kardamonin; 4= kloramfenikol (kontrol positif)

**Hasil uji aktivitas terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923**

Uji aktivitas terhadap bakteri *S. aureus* ATCC25923 diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 34. Hasil analisis uji aktivitas terdapat pada Tabel 10.



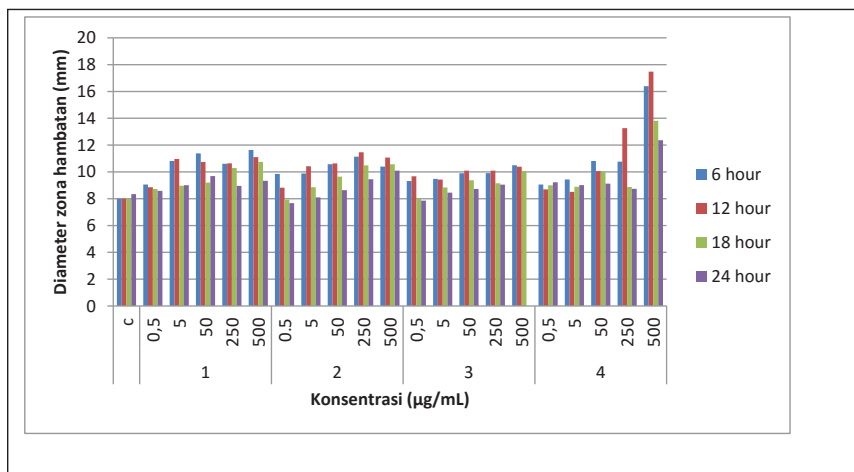
Gambar 34. Kurva pertumbuhan dari *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Tabel 10. Diameter penghambatan dari ekstrak tanol dan produk nanopartikel kitosan dan asam alginat dari *B. rotunda* pada berbagai variasi konsentrasi terhadap bakteri *S. aureus* ATCC 25923

No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
C	DMSO	-	8.38 $\pm$ 1.06	8.03 $\pm$ 0.95	8.75 $\pm$ 1.31	8.34 $\pm$ 0.96
1	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	9.06 $\pm$ 0.44	8.86 $\pm$ 0.45	8.72 $\pm$ 0.91	8.59 $\pm$ 0.89
		5	10.82 $\pm$ 1.72	10.97 $\pm$ 1.82	8.97 $\pm$ 1.16	9.01 $\pm$ 1.28
		50	11.38 $\pm$ 0.88	10.74 $\pm$ 1.07	9.20 $\pm$ 1.18	9.69 $\pm$ 0.99
		250	10.61 $\pm$ 0.73	10.64 $\pm$ 2.9	10.29 $\pm$ 1.37	8.96 $\pm$ 0.54
		500	11.63 $\pm$ 0.86	11.10 $\pm$ 0.98	10.75 $\pm$ 1.31	9.34 $\pm$ 0.96
2	Nanopartikel kitosan dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	9.85 $\pm$ 1.50	8.82 $\pm$ 0.44	7.93 $\pm$ 0.32	7.67 $\pm$ 0.22
		5	9.88 $\pm$ 0.49	10.42 $\pm$ 0.43	8.86 $\pm$ 0.46	8.10 $\pm$ 0.55
		50	10.57 $\pm$ 0.33	10.63 $\pm$ 0.43	9.65 $\pm$ 0.95	8.64 $\pm$ 0.68
		250	11.14 $\pm$ 0.65	11.46 $\pm$ 2.22	10.49 $\pm$ 1.08	9.45 $\pm$ 0.51
		500	10.40 $\pm$ 0.80	11.07 $\pm$ 0.40	10.57 $\pm$ 0.70	10.09 $\pm$ 0.45
3	Nanopartikel alginat dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	9.32 $\pm$ 0.26	9.67 $\pm$ 0.54	8.00 $\pm$ 0.39	7.86 $\pm$ 0.48
		5	9.48 $\pm$ 0.38	9.43 $\pm$ 0.37	8.84 $\pm$ 0.51	8.45 $\pm$ 0.55
		50	9.90 $\pm$ 0.47	10.09 $\pm$ 0.29	9.38 $\pm$ 0.61	8.73 $\pm$ 0.80
		250	9.91 $\pm$ 0.48	10.09 $\pm$ 0.46	9.15 $\pm$ 0.42	9.05 $\pm$ 0.33
		500	10.50 $\pm$ 0.51	10.39 $\pm$ 0.62	10.07 $\pm$ 0.47	-
4	Pinostrobin	0.5	8.27 $\pm$ 0.54	7.89 $\pm$ 0.29	6.86 $\pm$ 0.46	8.37 $\pm$ 0.61
		5	10.03 $\pm$ 0.49	8.34 $\pm$ 0.31	8.44 $\pm$ 0.72	8.93 $\pm$ 0.78
		50	10.24 $\pm$ 0.26	7.52 $\pm$ 0.33	7.73 $\pm$ 0.44	8.13 $\pm$ 0.56
		250	9.13 $\pm$ 0.81	7.21 $\pm$ 0.56	7.93 $\pm$ 0.76	8.56 $\pm$ 0.69
		500	8.36 $\pm$ 0.48	8.82 $\pm$ 0.37	9.28 $\pm$ 0.63	9.40 $\pm$ 0.67
5	5,7 Dihidroksi-Flavanon	0.5	10.08 $\pm$ 0.76	8.76 $\pm$ 0.36	9.24 $\pm$ 0.84	9.39 $\pm$ 0.61
		5	9.62 $\pm$ 0.58	6.07 $\pm$ 0.50	9.28 $\pm$ 0.85	9.44 $\pm$ 1.01
		50	9.86 $\pm$ 0.88	7.46 $\pm$ 0.55	7.92 $\pm$ 0.46	8.18 $\pm$ 0.61
		250	9.62 $\pm$ 0.60	8.12 $\pm$ 0.27	8.61 $\pm$ 0.55	8.58 $\pm$ 0.49
		500	8.90 $\pm$ 0.37	8.54 $\pm$ 0.27	8.46 $\pm$ 0.85	10.30 $\pm$ 1.01
6	Kardamonin	0.5	8.02 $\pm$ 0.62	6.32 $\pm$ 0.16	7.20 $\pm$ 0.86	8.23 $\pm$ 0.35
		5	8.43 $\pm$ 0.79	6.18 $\pm$ 0.32	6.73 $\pm$ 0.68	7.77 $\pm$ 0.47

No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
		50	9.20 $\pm$ 0.79	6.74 $\pm$ 0.73	7.00 $\pm$ 0.65	8.30 $\pm$ 0.56
		250	13.08 $\pm$ 0.75	7.46 $\pm$ 0.26	6.94 $\pm$ 0.82	8.69 $\pm$ 0.54
		500	11.81 $\pm$ 0.97	6.81 $\pm$ 0.39	7.93 $\pm$ 0.72	8.38 $\pm$ 0.18
7	Kloramfenikol (Kontrol Positif)	0.5	9.06 $\pm$ 0.51	8.70 $\pm$ 0.41	9.00 $\pm$ 0.74	9.23 $\pm$ 0.79
		5	9.44 $\pm$ 0.66	8.51 $\pm$ 0.48	8.89 $\pm$ 0.83	9.02 $\pm$ 0.86
		50	10.82 $\pm$ 1.20	10.06 $\pm$ 0.71	10.03 $\pm$ 1.14	9.13 $\pm$ 1.17
		250	10.77 $\pm$ 0.62	13.26 $\pm$ 1.19	8.87 $\pm$ 1.41	8.74 $\pm$ 0.94
		500	16.39 $\pm$ 1.01	17.48 $\pm$ 0.91	13.81 $\pm$ 2.32	12.36 $\pm$ 2.26

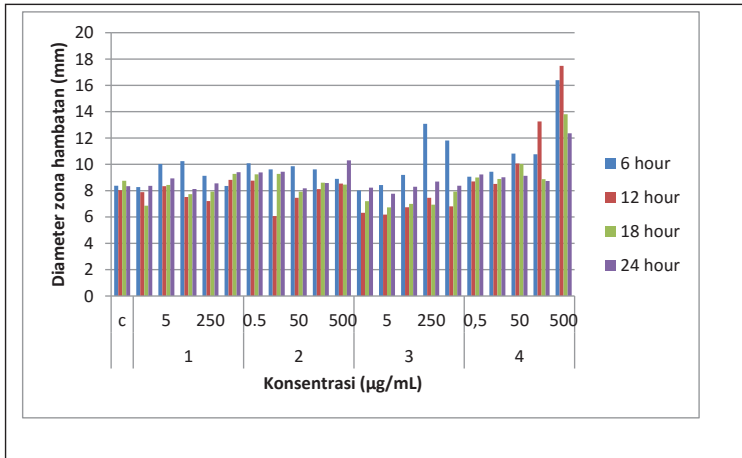
Data dalam bentuk diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi diperoleh data seperti pada Gambar 35.



Gambar 35. Diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi

*S. aureus* ATCC 25923

Note C=kontrol negatif (DMSO); 1= ekstrak etanol *B. rotunda*; 2= Nanopartikel kitosan ekstrak etanol *B. rotunda*; 3= Nanopartikel asam alginat dari ekstrak etanol *B. rotunda*; 4= kloramfenikol (kontrol positif)



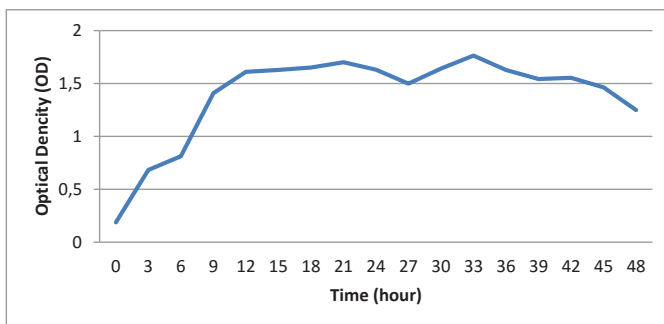
Gambar 36. Diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi

*S. aureus* ATCC 25923

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= Pinostrobin 2=5,7 Dihidroksilflavanon; 3=Kardamonin; 4= kloramfenikol (kontrol positif)

### Hasil uji aktivitas terhadap bakteri *S. Epidermidis* FNCC 0048

Uji aktivitas terhadap bakteri *S. epidermidis* FNCC 0048 diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 37. Hasil analisis uji aktivitas terdapat pada Tabel 11.



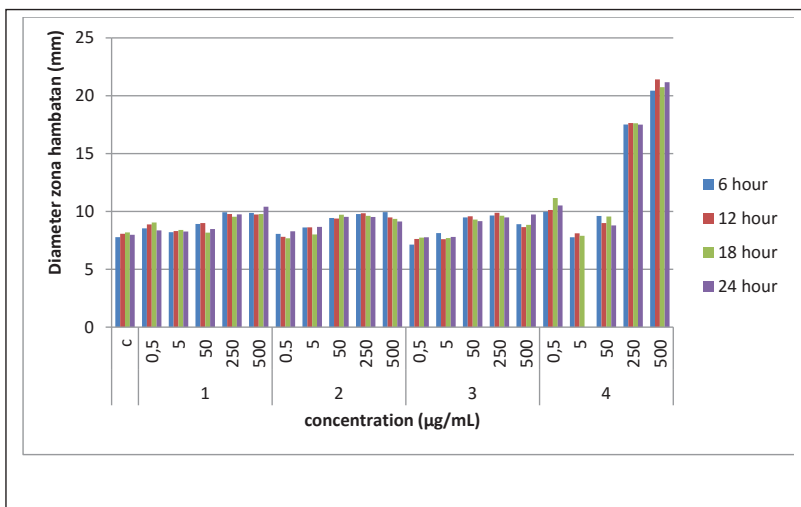
Gambar 37. Kurva pertumbuhan dari *Staphylococcus epidermidis* FNCC 0048

Tabel 11. Diameter penghambatan dari ekstrak etanol dan produk nanopartikel kitosan dan asam alginat dari *B. rotunda* pada berbagai variasi konsentrasi terhadap bakteri *S. epidermidis* FNCC 0048

No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
C	DMSO	-	7.78 $\pm$ 0.32	8.07 $\pm$ 0.34	8.19 $\pm$ 0.61	7.98 $\pm$ 0.31
1	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.54 $\pm$ 0.72	8.88 $\pm$ 0.59	9.04 $\pm$ 0.27	8.36 $\pm$ 0.59
		5	8.21 $\pm$ 0.39	8.30 $\pm$ 0.57	8.40 $\pm$ 0.38	8.26 $\pm$ 0.65
		50	8.92 $\pm$ 0.43	8.99 $\pm$ 0.28	8.17 $\pm$ 0.78	8.48 $\pm$ 1.02
		250	9.93 $\pm$ 0.68	9.77 $\pm$ 0.36	9.54 $\pm$ 0.44	9.75 $\pm$ 0.57
		500	9.87 $\pm$ 0.41	9.74 $\pm$ 0.41	9.77 $\pm$ 0.48	10.41 $\pm$ 0.74
2	Nanopartikel kitosan dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.06 $\pm$ 0.76	7.81 $\pm$ 0.50	7.68 $\pm$ 0.48	8.28 $\pm$ 0.43
		5	8.61 $\pm$ 0.54	8.62 $\pm$ 0.78	8.01 $\pm$ 1.10	8.66 $\pm$ 0.41
		50	9.43 $\pm$ 0.72	9.38 $\pm$ 0.91	9.72 $\pm$ 0.32	9.53 $\pm$ 0.74
		250	9.77 $\pm$ 0.48	9.84 $\pm$ 0.43	9.62 $\pm$ 0.50	9.52 $\pm$ 0.89
		500	9.94 $\pm$ 0.43	9.48 $\pm$ 0.69	9.36 $\pm$ 0.47	9.13 $\pm$ 0.63
3	Nanopartikel alginat dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	7.13 $\pm$ 0.07	7.62 $\pm$ 0.55	7.74 $\pm$ 0.60	7.77 $\pm$ 0.52
		5	8.13 $\pm$ 0.15	7.60 $\pm$ 1.04	7.70 $\pm$ 0.89	7.80 $\pm$ 0.80
		50	9.48 $\pm$ 0.34	9.58 $\pm$ 0.46	9.30 $\pm$ 0.34	9.16 $\pm$ 0.52
		250	9.65 $\pm$ 0.42	9.88 $\pm$ 0.40	9.63 $\pm$ 0.91	9.48 $\pm$ 0.67
		500	8.90 $\pm$ 0.55	8.64 $\pm$ 0.39	8.84 $\pm$ 0.38	9.74 $\pm$ 0.47
4	Pinostrobin	0.5	10.37 $\pm$ 0.23	11.29 $\pm$ 0.69	11.17 $\pm$ 0.67	10.37 $\pm$ 0.93
		5	9.91 $\pm$ 0.64	10.23 $\pm$ 0.87	10.38 $\pm$ 0.84	9.99 $\pm$ 0.97
		50	10.60 $\pm$ 0.33	10.54 $\pm$ 0.70	10.63 $\pm$ 0.65	10.10 $\pm$ 0.96
		250	9.90 $\pm$ 0.86	10.51 $\pm$ 0.65	9.91 $\pm$ 0.85	10.30 $\pm$ 0.80
		500	9.22 $\pm$ 0.97	8.89 $\pm$ 0.57	9.17 $\pm$ 0.56	8.93 $\pm$ 0.88
5,7	DihidroksiFlavanon	0.5	10.70 $\pm$ 0.62	10.97 $\pm$ 0.51	10.80 $\pm$ 0.83	10.63 $\pm$ 0.63
		5	10.26 $\pm$ 0.54	10.70 $\pm$ 0.84	10.41 $\pm$ 0.50	10.56 $\pm$ 0.38
		50	10.75 $\pm$ 0.65	10.71 $\pm$ 0.80	9.26 $\pm$ 0.86	9.20 $\pm$ 0.81
		250	9.69 $\pm$ 0.83	10.63 $\pm$ 0.64	9.27 $\pm$ 0.69	9.29 $\pm$ 1.00
		500	9.64 $\pm$ 0.86	10.13 $\pm$ 0.35	9.16 $\pm$ 0.95	9.01 $\pm$ 0.67
6	Kardamonin	0.5	10.86 $\pm$ 0.49	10.85 $\pm$ 0.56	11.19 $\pm$ 0.62	11.07 $\pm$ 0.55
		5	10.18 $\pm$ 0.35	10.08 $\pm$ 0.58	9.34 $\pm$ 0.73	9.37 $\pm$ 0.89
		50	9.64 $\pm$ 0.84	10.28 $\pm$ 0.36	9.89 $\pm$ 0.68	9.94 $\pm$ 0.49

No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
		250	9.40 $\pm$ 0.53	9.28 $\pm$ 0.57	9.28 $\pm$ 0.64	9.16 $\pm$ 0.88
		500	8.57 $\pm$ 0.69	7.98 $\pm$ 0.63	7.60 $\pm$ 0.49	8.00 $\pm$ 0.79
7	Kloramfenikol (Kontrol Positif)	0.5	9.97 $\pm$ 0.95	10.13 $\pm$ 1.21	11.16 $\pm$ 1.93	10.52 $\pm$ 1.30
		5	7.77 $\pm$ 0.51	8.11 $\pm$ 0.13	7.89 $\pm$ 0.41	-
		50	9.61 $\pm$ 1.15	8.99 $\pm$ 0.92	9.56 $\pm$ 1.31	8.79 $\pm$ 0.50
		250	17.51 $\pm$ 1.23	17.64 $\pm$ 1.13	17.62 $\pm$ 1.05	17.50 $\pm$ 0.66
		500	20.44 $\pm$ 0.53	21.41 $\pm$ 0.71	20.74 $\pm$ 0.76	21.17 $\pm$ 0.74

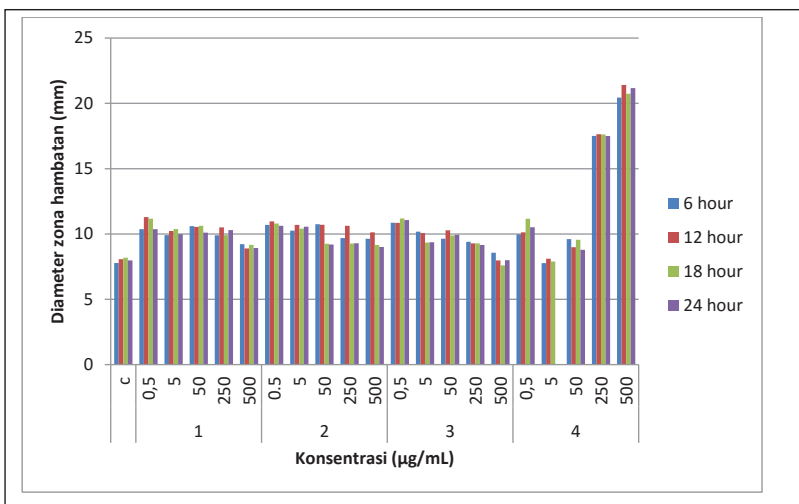
Data dalam bentuk diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi diperoleh data seperti pada Gambar 38 dan 39.



Gambar 38. Diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi

*S.epidermidis*FNCC 0048

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= ekstrak etanol *B. rotunda*; 2= Nanopartikel kitosan ekstrak etanol *B. rotunda*; 3= Nanopartikel asam alginat dari ekstrak etanol *B. rotunda* ; 4= kloramfenikol (kontrol positif)

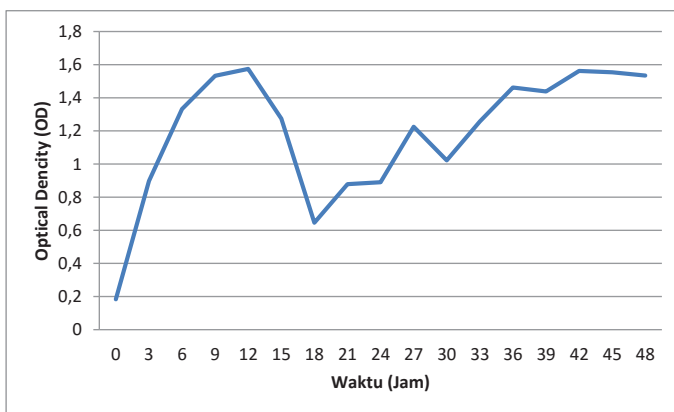


Gambar 39. Diagram aktivitas inhibisi dari masing-masing konsentrasi senyawa terhadap *S. epidermidis* FNCC 0048

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= Pinostrobin 2=5,7 Dihidroksiflavanon; 3=Kardamonin; 4= kloramfenikol (kontrol positif)

### Hasil uji aktivitas terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229

Uji aktivitas terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229 diperoleh kurva pertumbuhan seperti pada Gambar 40. Hasil analisis uji aktivitas terdapat pada Tabel 12.



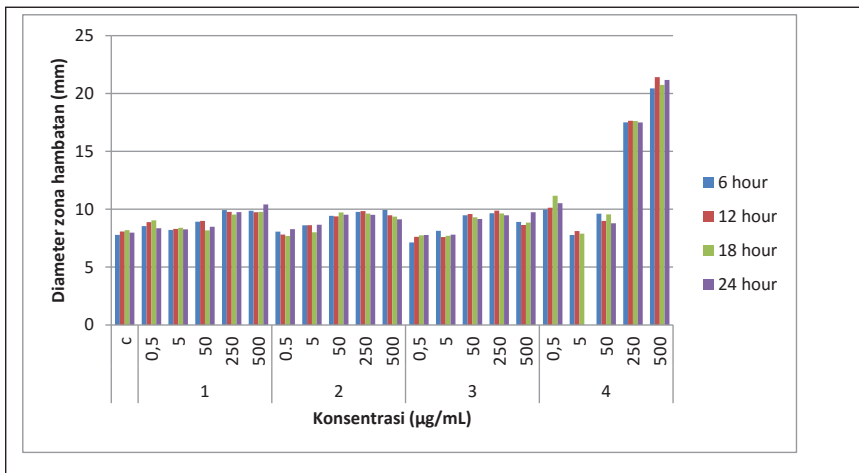
Gambar 40. Kurva pertumbuhan dari *Escherichia coli* ATCC 11229

Tabel 12. Diameter penghambatan dari ekstrak etanol dan produk nanopartikel kitosan dan asam alginat dari *B. rotunda* pada berbagai variasi konsentrasi terhadap bakteri *E. coli* ATCC 11229

No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
C	DMSO	-	7.56 $\pm$ 0.19	8.43 $\pm$ 0.37	8.12 $\pm$ 0.44	7.26 $\pm$ 0.42
1	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.03 $\pm$ 0.44	8.41 $\pm$ 0.29	8.14 $\pm$ 0.18	8.58 $\pm$ 0.48
		5	8.33 $\pm$ 0.48	8.69 $\pm$ 0.27	8.37 $\pm$ 0.17	9.10 $\pm$ 0.52
		50	8.83 $\pm$ 0.76	8.86 $\pm$ 0.64	8.32 $\pm$ 0.54	8.87 $\pm$ 0.45
		250	9.11 $\pm$ 0.30	9.22 $\pm$ 0.40	8.99 $\pm$ 0.40	9.44 $\pm$ 0.46
		500	9.36 $\pm$ 0.36	9.32 $\pm$ 0.24	9.36 $\pm$ 0.37	10.04 $\pm$ 0.65
2	Nanopartikel kitosan dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.18 $\pm$ 0.30	8.07 $\pm$ 0.24	8.28 $\pm$ 0.65	9.31 $\pm$ 0.65
		5	8.78 $\pm$ 0.48	8.32 $\pm$ 0.44	9.55 $\pm$ 0.28	9.43 $\pm$ 0.42
		50	9.47 $\pm$ 0.62	9.24 $\pm$ 0.42	10.50 $\pm$ 0.44	10.60 $\pm$ 0.82
		250	9.49 $\pm$ 0.41	8.58 $\pm$ 0.37	9.46 $\pm$ 0.43	9.64 $\pm$ 0.53
		500	10.58 $\pm$ 0.71	8.97 $\pm$ 0.10	9.85 $\pm$ 0.54	10.36 $\pm$ 0.73
3	Nanopartikel alginat dari ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	0.5	8.83 $\pm$ 0.70	8.48 $\pm$ 1.13	9.44 $\pm$ 0.39	9.47 $\pm$ 0.39
		5	8.97 $\pm$ 0.53	8.73 $\pm$ 0.84	9.29 $\pm$ 0.20	9.51 $\pm$ 0.49
		50	9.45 $\pm$ 0.41	9.10 $\pm$ 0.62	9.17 $\pm$ 0.23	9.34 $\pm$ 0.46
		250	8.66 $\pm$ 0.52	7.85 $\pm$ 1.17	8.93 $\pm$ 0.57	9.23 $\pm$ 0.53
		500	10.29 $\pm$ 0.31	8.70 $\pm$ 0.37	10.38 $\pm$ 0.54	10.21 $\pm$ 0.65
4	Pinostrobin	0.5	9.57 $\pm$ 0.61	9.89 $\pm$ 0.58	9.76 $\pm$ 0.48	10.12 $\pm$ 0.45
		5	9.60 $\pm$ 0.39	9.65 $\pm$ 0.88	9.09 $\pm$ 0.45	9.57 $\pm$ 0.45
		50	8.96 $\pm$ 0.64	8.91 $\pm$ 0.46	8.79 $\pm$ 0.40	9.40 $\pm$ 0.63
		250	10.03 $\pm$ 0.60	10.86 $\pm$ 0.39	9.92 $\pm$ 0.72	10.90 $\pm$ 0.53
		500	8.96 $\pm$ 0.27	9.37 $\pm$ 0.42	8.52 $\pm$ 0.48	9.13 $\pm$ 0.71
5	5,7 DihidroksiFlavanon	0.5	10.20 $\pm$ 0.72	9.94 $\pm$ 0.61	9.78 $\pm$ 0.45	10.30 $\pm$ 0.68
		5	11.66 $\pm$ 0.76	9.86 $\pm$ 0.53	9.24 $\pm$ 0.27	11.43 $\pm$ 0.63
		50	12.09 $\pm$ 0.84	10.10 $\pm$ 0.59	9.20 $\pm$ 0.50	10.87 $\pm$ 0.94
		250	10.90 $\pm$ 0.88	10.46 $\pm$ 0.49	10.33 $\pm$ 0.70	11.18 $\pm$ 0.83
		500	13.20 $\pm$ 0.76	9.19 $\pm$ 0.62	9.63 $\pm$ 0.51	10.41 $\pm$ 0.43
6	Kardamonin	0.5	8.81 $\pm$ 0.47	10.25 $\pm$ 0.65	9.44 $\pm$ 0.37	9.68 $\pm$ 0.76
		5	8.94 $\pm$ 0.27	11.11 $\pm$ 0.66	9.74 $\pm$ 0.36	10.30 $\pm$ 0.60
		50	9.78 $\pm$ 0.54	12.00 $\pm$ 0.84	9.94 $\pm$ 0.32	10.90 $\pm$ 0.85



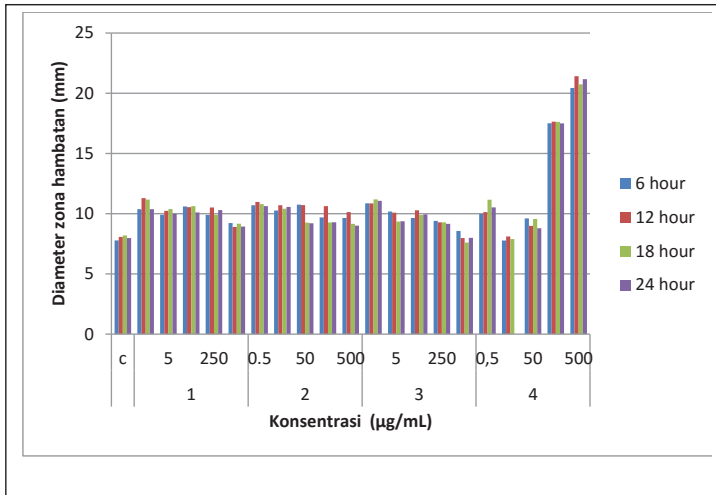
No	Sampel	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
		250	9.66 $\pm$ 0.24	10.88 $\pm$ 0.72	9.48 $\pm$ 0.35	10.06 $\pm$ 0.89
7	Kloramfenikol (kontrol positif)	500	10.34 $\pm$ 0.77	11.33 $\pm$ 1.12	9.66 $\pm$ 0.57	11.93 $\pm$ 0.41
		5	7.54 $\pm$ 0.45	7.24 $\pm$ 0.40	7.41 $\pm$ 0.39	7.91 $\pm$ 0.73
		50	16.16 $\pm$ 0.49	8.84 $\pm$ 0.83	8.81 $\pm$ 0.57	9.78 $\pm$ 0.65
		250	22.80 $\pm$ 0.99	18.83 $\pm$ 0.77	18.73 $\pm$ 0.46	19.75 $\pm$ 0.79
		500	22.38 $\pm$ 1.69	19.27 $\pm$ 1.69	19.09 $\pm$ 1.03	20.78 $\pm$ 0.65



Gambar 41. Grafik aktivitas penghambatan pada variasi konsentrasi dan waktu terhadap

*E. coli* ATCC 11229

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= ekstrak etanol *B. rotunda*; 2= Nanopartikel kitosan ekstrak etanol *B. rotunda*; 3= Nanopartikel asam alginat dari ekstrak etanol *B. rotunda* ; 4= kloramfenikol (kontrol positif)



Gambar 42. Grafik aktivitas penghambatan pada variasi konsentrasi dan waktu terhadap *E. coli* ATCC 11229

Note : C=kontrol negatif (DMSO); 1= Pinostrobin 2=5,7 Dihidroksiflavanon; 3=Kardamonin; 4= kloramfenikol (kontrol positif)

### Uji aktivitas antibakteri secara *in vivo*

Uji aktivitas antibakteri secara *in vivo* digunakan mencit putih jantan Balbesiana umur 2 bulan berat badan 20-25 g. Bakteri yang digunakan *streptococcus mutans* dan *E. coli*. Sampel uji yang digunakan ekstrak etanol temukunci, produk nanopartikel kitosan dan alginat. Hasil uji aktivitas secara *in vivo* diperoleh hasil sebagai berikut:

### Uji *in vivo* terhadap bakteri *S. mutans*

Hasil uji *in vivo* terhadap bakteri *S. mutans* diperoleh data seperti tercantum pada Tabel 13. Bakteri *S. mutans* tidak bersifat membunuh tapi menyebabkan kerusakan gigi, sehingga hasil penelitian ini setelah hari ke 6 hampir semua hewan uji masih hidup, hanya ada dua mencit yang mati karena sakit yang disebabkan bukan dari faktor perlakuan.

Tabel 13. Hasil uji in vivo terhadap bakteri *S. mutans*

No	Kelompok Perlakuan	Pengamatan jumlah mencit yang (hidup/ mati) pada hari ke					
		1	2	3	4	5	6
1	Kontrol + CMC 0,5 ml	5/-	5/-	4/1	4/1	4/1	4/1
2	Kontrol positif +Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml+ CMC	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
3	Eksperimen ++Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 500 mg/kg bb	5/-	5/-	4/1	4/1	4/1	4/1
4	Eksperimen ++Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 300 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
5	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 100 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
6	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + kloramfenikol 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
7	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
8	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 300 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
9	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 500 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
10	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml +	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-

No	Kelompok Perlakuan	Pengamatan jumlah mencit yang (hidup/ mati) pada hari ke					
		1	2	3	4	5	6
	nanopartikel alginat 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb						
11	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel alginat 0,5 ml dosis 300 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-
12	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 500 mg/kg bb	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-	5/-

\* pelarut suspensi CMC (Carboksi metil selulose + akuadest 1%)

\* bakteri tidak menyebabkan kematian, semua mencit tetap sehat

a. Uji *in vivo* terhadap bakteri *E.colli*

Hasil uji aktivitas *in vivo* terhadap bakteri *E. coli* diperoleh data seperti terdapat pada Tabel 14. Bakteri *E. coli* yang dapat menyebabkan kematian apabila tidak diberi obat antibakteri. Dari hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol temukunci dosis 500 mg/Kg BB menunjukkan aktivitas perlindungan sebesar 60% sama dengan aktivitas kloramfenikol pada dosis 100 mg/Kg BB, sedangkan untuk sampel yang lain menunjukkan aktivitas yang lebih rendah.

Tabel 14. Hasil uji aktivitas *in vivo* terhadap bakteri *E.colli*

No	Kelompok Perlakuan	Pengamatan jumlah mencit yang (hidup/ mati) pada hari ke					% Kemampuan perlindungan (5-jml yang mati/5) x 100 %) setelah hari ke lima
		1	2	3	4	5	
1	Kontrol + CMC 0,5 ml	5/0	5/0	5/0	5/0	5/0	100
2	Kontrol positif +Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml+ CMC	5/0	¼	¼	¼	0/5	0
3	Eksperimen + +Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 500 mg/kg bb	5/0	3/2	3/2	3/2	3/2	60

No	Kelompok Perlakuan	Pengamatan jumlah mencit yang (hidup/ mati) pada hari ke					% Kemampuan perlindungan (5-jml yang mati/5) x 100 %) setelah hari ke lima
		1	2	3	4	5	
4	Eksperimen ++Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 300 mg/kg bb	5/0	3/2	3/2	2/3	¼	20
5	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + ekstrak etanol temukunci dosis 100 mg/kg bb	5/0	2/3	2/3	2/3	2/3	40
6	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + kloramfenikol 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb	5/0	3/2	3/2	3/2	3/2	60
7	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb	5/0	0/5	0/5	0/5	0/5	0
8	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 300 mg/kg bb	5/0	2/3	2/3	0/5	0/5	0
9	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 500 mg/kg bb	5/0	2/3	2/3	2/3	2/3	40
10	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel alginat 0,5 ml dosis 100 mg/kg bb	5/0	0/5	0/5	0/5	0/5	0
11	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel alginat 0,5 ml dosis 300 mg/kg bb	5/0	2/3	2/3	¼	¼	20
12	Eksperimen + Bakteri <i>S. mutans</i> 0,5 ml + nanopartikel kitosan 0,5 ml dosis 500 mg/kg bb	5/0	¼	¼	0/5	0/5	0

\* pelarut suspensi CMC (Carboksi metil selulose + akuadest 1%)

\* bakteri menyebabkan kematian, jika mencit tidak diobati

### **Pengembangan produk sebagai *dental care***

Karies gigi dan penyakit periodontal merupakan penyakit gigi dan mulut yang paling sering dijumpai di Indonesia. Kedua penyakit ini dapat menyerang semua lapisan masyarakat termasuk yang rawan terhadap penyakit gigi dan mulut. Karies gigi adalah penyakit yang multifaktorial sehingga untuk terjadinya karies gigi harus ada faktor-faktor permukaan gigi itu sendiri, substrat, mikroorganisme dan waktu. Penyakit tersebut banyak dikaitkan juga sebagai penyebab penyakit jantung koroner, gagal ginjal, kanker lambung, kanker usus besar, maupun kanker mulut. Dampak negatif yang mudah dilihat adalah timbulnya plak yang melekat pada permukaan gigi, yang apabila tidak segera ditanggulangi dapat menyebabkan kerusakan email yang menyebabkan karies maupun gigi berlubang (Kolenbrander, 2002; Baeheni, 2003). Beberapa antibiotik telah ditemukan untuk mencegah dan mengurangi terbentuknya plak, namun dapat menimbulkan efek samping bila digunakan secara terus – menerus, yaitu timbulnya strain – strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan tidak dapat diabsorpsi oleh jaringan sehingga tetap tinggal di rongga mulut (Philip, 2006). Senyawa – senyawa antibakteri lain selain antibiotik telah banyak digunakan pada pasta gigi, obat kumur dan pemakaian secara topikal untuk perawatan penyakit periodontal. Pemakaian antibiotik sering mengakibatkan terjadinya resistensi, sedangkan pemakaian antiseptik, seperti khlorhexidin dapat mencegah bahkan dapat menghilangkan plak yang telah terbentuk, namun menimbulkan efek samping yaitu diskolorasi gigi dan lidah serta gangguan pengecapian setiap selesai berkumur. Oleh karena itu perlu ditemukan antibakteri baru dari bahan alami yang tidak memiliki efek samping.

Pengembangan produk sebagai bahan *dental care* dibuat dalam bentuk sediaan pasta dan gel, dengan penambahan berbagai bahan yang digunakan dalam pembuatan pasta gigi. Produk yang diperoleh selanjutnya dianalisis sifat fisik dan aktivitasnya terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil formulasi bentuk pasta dan gel terdapat pada Tabel 15.

Tabel 15. Produk formula dental care bentuk pasta dan gel

No	Bentuk produk	Bahan	% bahan	Sifat fisik Produk		
				1	2	3
1	Pasta-1	Ekstrak etanol temukunci	2	Kurang homogen/ warna putih agak kuning	Kurang homogen/ warna putih agak kuning	Kurang homogen/ warna putih agak kuning
		Na-CMC	1			
		CaCO <sub>3s</sub>	42			
		Gliserin	25			
		Na Lauril sulfat	2			
		Na-siklamat	0,2			
		Minyak permen	0,5			
		Metil paraben	0,2			
		akuades	27,1			
2	Pasta-2	Nanopartikel kitosan	2	Homogen/ warna putih	Homogen/ warna putih	Homogen/ warna putih
		Na-CMC	1			
		CaCO <sub>3</sub>	42			
		Gliserin	25			
		Na Lauril sulfat	2			
		Na-siklamat	0,2			
		Minyak permen	0,5			
		Metil paraben	0,2			
		akuades	27,1			
3	Pasta-3	Nanopartikel alginat	2	Kurang homogen/ warna coklat	Kurang homogen/ warna coklat	Kurang homogen/ warna coklat
		Na-CMC	1			
		CaCO <sub>3</sub>	42			
		Gliserin	25			
		Na Lauril sulfat	2			
		Na-siklamat	0,2			
		Minyak permen	0,5			
		Metil paraben	0,2			
		akuades	27,1			
4	Gel-1	Ekstrak etanol temukunci	2,5	Kurang homogen/ warna kuning coklat	Kurang homogen/ warna kuning coklat	Kurang homogen/ warna kuning coklat
		CMC	4			
		Sorbitol	40			
		Mentol	0,5			
		Natrium bensoat	0,5			

No	Bentuk produk	Bahan	% bahan	Sifat fisik Produk		
				1	2	3
		Pepermint oil	0,3			
		akuadest	52,2			
5	Gel-2	Nanopartikel kitosan	2,5	Homogen/ warna kuning muda	Homogen/ warna kuning muda	Homogen/ warna kuning muda
		CMC	4			
		Sorbitol	40			
		Mentol	0,5			
		Natrium bensoat	0,5			
		Pepermint oil	0,3			
		akuadest	52,2			
6	Gel-3	Nanopartikel alginat	2,5	Kurang homogen/ warna coklat tua	Kurang homogen/ warna coklat tua	Kurang homogen/ warna coklat tua
		CMC	4			
		Sorbitol	40			
		Mentol	0,5			
		Natrium bensoat	0,5			
		Pepermint oil	0,3			
		akuadest	52,2			



Gambar 43. Bentuk formulasi produk *dental care* bentuk gel dan pasta dengan bahan aktif ekstrak etanol temukunci; produk nanopartikel dari ekstrak etanol temukunci, dan produk alginat dari ekstrak etanol temukunci



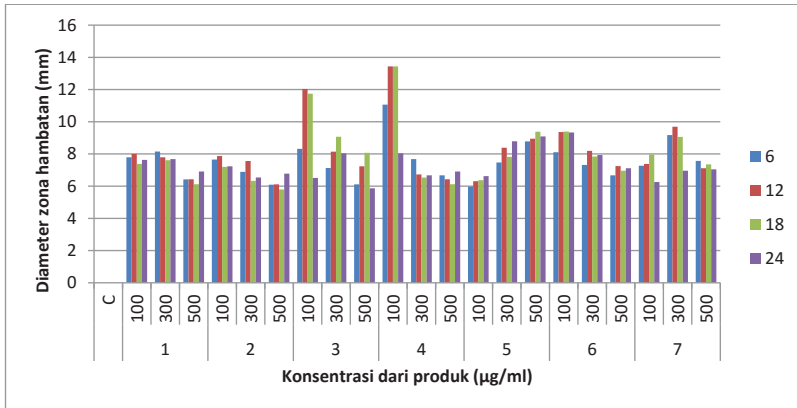
### Uji aktivitas antibakteri produk formulasi *dental care*

Masing-masing formula yang dibuat selanjutnya diuji aktivitas antibakterinya terhadap *Streptococcus mutans*, diperoleh hasil seperti terdapat pada Tabel 16.

Tabel 16. Hasil uji aktivitas produk *dental care* terhadap bakteri *S. mutans*

No	Sampel produk	konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diameter Zona of Inhibition (Mean $\pm$ SD) mm*			
			Pengamatan pada jam ke			
			6	12	18	24
C	akuades	-	0	0	0	0
1	Produk gel	100	7,79 $\pm$ 0,72	8,00 $\pm$ 0,53	7,38 $\pm$ 0,49	7,63 $\pm$ 0,76
	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	300	8,15 $\pm$ 0,96	7,79 $\pm$ 1,77	7,61 $\pm$ 1,65	7,68 $\pm$ 1,48
		500	6,42 $\pm$ 0,78	6,43 $\pm$ 0,76	6,12 $\pm$ 0,69	6,91 $\pm$ 0,75
2	Produk pasta	100	7,65 $\pm$ 0,66	7,87 $\pm$ 0,82	7,20 $\pm$ 0,82	7,23 $\pm$ 0,64
	Ekstrak etanol <i>B. rotunda</i>	300	6,89 $\pm$ 0,55	7,56 $\pm$ 0,68	6,33 $\pm$ 0,44	6,54 $\pm$ 0,56
		500	6,09 $\pm$ 0,35	6,11 $\pm$ 0,52	5,80 $\pm$ 0,52	6,78 $\pm$ 0,61
3	Produk gel nanokitosan	100	8,32 $\pm$ 0,62	12,04 $\pm$ 2,97	11,74 $\pm$ 2,77	6,51 $\pm$ 0,63
		300	7,13 $\pm$ 1,22	8,14 $\pm$ 2,38	9,07 $\pm$ 1,56	8,04 $\pm$ 1,73
		500	6,11 $\pm$ 0,82	7,23 $\pm$ 0,96	8,07 $\pm$ 0,81	5,87 $\pm$ 0,71
4	Produk pasta nanokitosan	100	11,06 $\pm$ 2,07	13,44 $\pm$ 2,91	13,44 $\pm$ 2,69	8,04 $\pm$ 1,36
		300	7,68 $\pm$ 0,61	6,73 $\pm$ 0,43	6,53 $\pm$ 0,68	6,67 $\pm$ 0,71
		500	6,67 $\pm$ 0,63	6,43 $\pm$ 0,76	6,12 $\pm$ 0,69	6,91 $\pm$ 0,75
5	Produk gel nanoalginat	100	5,97 $\pm$ 0,43	6,31 $\pm$ 0,58	6,37 $\pm$ 0,78	6,62 $\pm$ 0,74
		300	7,47 $\pm$ 0,71	8,39 $\pm$ 0,80	7,82 $\pm$ 1,09	8,79 $\pm$ 0,96
		500	8,78 $\pm$ 0,93	8,95 $\pm$ 1,09	9,38 $\pm$ 1,37	9,09 $\pm$ 1,15
6	Produk pasta nanoalginat	100	8,11 $\pm$ 0,83	9,36 $\pm$ 0,51	9,39 $\pm$ 0,45	9,33 $\pm$ 0,96
		300	7,32 $\pm$ 1,07	8,19 $\pm$ 0,57	7,84 $\pm$ 0,77	7,93 $\pm$ 0,93
		500	6,67 $\pm$ 0,60	7,25 $\pm$ 0,52	6,96 $\pm$ 0,45	7,16 $\pm$ 0,81
7	Produk pasta siwak (kontrol positif)	100	7,27 $\pm$ 0,72	7,38 $\pm$ 0,90	7,97 $\pm$ 0,76	6,26 $\pm$ 0,97
		300	9,17 $\pm$ 1,55	9,69 $\pm$ 1,97	9,06 $\pm$ 2,57	6,96 $\pm$ 0,55
		500	7,57 $\pm$ 0,35	7,11 $\pm$ 1,06	7,35 $\pm$ 0,83	7,04 $\pm$ 1,03

- *Pelarut akuadest*



Gambar 44. Grafik aktivitas penghambatan pada variasi konsentrasi dan waktu dari masing-masing produk terhadap bakteri *S. mutans* (1= produk gel ekstrak etanol temukunci; 2= produk pasta ekstrak etanol temukunci; 3= produk gel nanokitosan; 4=produk pasta nanokitosan; 5=produk gel nanoalginat; 6=produk pasta nanoalginat; 7= kontrol positif produk pasta)

Dari data uji aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* produk gel dan pasta yang ditambahkan dengan senyawa aktif nanopartikel kitosan dari ekstrak etanol temukunci menunjukkan aktivitas yang paling tinggi di antara produk yang lainnya. Demikian juga jika ditinjau dari sifat fisiknya produk dengan penambahan nanokitosan menunjukkan lebih homogen.

## DAFTAR PUSTAKA

- Antonia MM, (2001), Antioxidant Activity of Resveratrol Compared with Common Food Additives, *Journal of food protection*, 64(3):379-84 ·
- Auroma O.I (1994). Free radicals and antioxidant strategies in sports, *J. Nutr. Biochem.* Vol. 5 hal. 370-381
- Baehni P.C, Takeuchi Y. (2003), Antiplaque agent in the prevention of biofilm associated oral diseasea, *Oral Dis*, 9, 23-29.
- Biswas M, Haldar P.K., Kumar A.G., (2010), Antioxidant and free-radical-scavenging effects of fruits of *Dregea volubilis*, *J. Nat Sci Biol Med*, 1(1): 29-34.
- Dalimarta, S. (2003), Atlas tumbuhan obat Indonesia, jilid 2, Trubus Agriwidya
- Desai P.,1, Ram R. P., and Mandip S., (2010), Interaction of nanoparticles and cell-penetrating peptides with skin for transdermal drug delivery, *Mol Membr Biol.* 27(7): 247–259.
- Dreaden E.,Lauren A A., Megan A M. and Mostafa A, (2012), Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery, *Ther Deliv.* 3(4): 457–478.
- Kim H.J., Eun J. C., Sung H.C., Shin K. C., Heui D. P., Sang W.C., (2002), Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*, *Biosci. Biotechnol.*, 66 (9), 1990-1993.
- Kolenbrander PE, Andersen R.N, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer JR, (2002), Communication among oral bacteria, *Microbiol Mol Biol Rev*, 66, 486-505
- Leardkamolkarn V., Tiamyuyen S., Sripanidkulchai B.O., (2009), Pharmacological Activity of *Kaempferia parviflora* against Human Bile Duct Cancer Cell Lines, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, Vol 10, 2009* 697.
- Li X.Y., XiangYe K., Shuai S., XiuLing Z., Gang Guo, YuQuan W.and ZhiYong Q., (2008), Preparation of alginate coated chitosan microparticles for vaccine delivery, *BMC Biotechnology*, 8:89
- Lotulung Puspa DN, Minarti, Kardono LBS, Kawanishi K, (2008), Antioxidant compound from *Kaempferia rotunda* L. *Pakistan J of Biol Sciences*, 11(20): 2447-2450.
- Lallo S., Lee S, Dibwe D.F., Tezuka Y, Morita H, (2014), A new polyoxygenated cyclohexane and other constituents from *Kaempferia rotunda* and their cytotoxic activity *Natural Product Research*, Vol. 28, No. 20, 1754–1759.
- Muhilal (1991), Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran, *Cermin Dunia Kedokteran* No. 73 hal. 9-11
- Mulik R, Mahadik K, Paradkar A.(2009), Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study. *Eur J Pharm Sci.* 2009 Jun 28;37(3-4):395-404.
- Molyneux, P. Songklanakarin, (2004),The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *J.Sci. Technol*, 26(2), 211-219.

- Nwet Nwet W., Suresh A., Hiroyasu E., Yasuhiro T., and Shigetoshi K., (2008), Panduratin D—I, Novel Secondary Metabolites from Rhizomes of *Boesenbergia pandurata*, *Chem. Pharm. Bull.* 56(4) 491—496.
- Philip D. Marsh (2006), Proceedings Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease, *BMC Oral Health*, 6.
- Puri A., Kristin L., Brandon S., Jae-Ho Lee, Amichai Y. Eli H., and Robert B. (2009), Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic, *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 26(6): 523–580.
- Ratana Banjerdpongchai, Kittiphon Suwannachot, Viboon Rattanapanone, Bungorn Sripanidkulchai, (2008), Ethanolic Rhizome Extract from *Kaempferia parviflora* Wall.ex. Baker Induces Apoptosis in HL-60 Cells, *Asian Pacific J Cancer Prev*, 9, 595-600
- Ranganathan R.,Shruthilaya M.,Akila K.Ganga B.,Yoganathan R.,Krishnamoorthy, Roy S.,Ponraju D., Suresh K. R., Ganesh V., (2012), Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications, *Int. J.of Nanomedicine*,7 ,1043–1060
- Sri Atun, Retno Arianingrum, (2012), Bahan aktif antimutagenik dari rimpang tumbuhan famili Zingiberaceae, Pendaftaran paten, No. P00201200231, 29 Maret 2012
- Sri Atun, Retno A, Eddy S, Nurfina Az. (2013). Isolation and antimutagenic activity of some flavanone from *Kaempferia rotunda*, *J. Inter. Chem. And Analyt. Chemistry*, 4, 3-8.
- Sri Atun, Retno A, (2015), Anticancer activity of bioactive compounds from *Kaempferia rotunda* rhizome against human breast cancer, *Inter. J. Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 7 (2): 262-269.
- Tan Eng-Chong, Lee Yean-Kee, Chee Chin-Fei, Heh Choon-Han, Wong Sher-Ming, Christina Thio Li-Ping, Foo Gen-Teck, Norzulaani Khalid, Noorsaadah Abd Rahman, Saiful Anuar Karsani, Shatrah Othman, Rozana Othman, and Rohana Yusof, 2012, *Boesenbergia rotunda* : FromEthnomedicine to Drug Discovery, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* , Article ID 473637, 25 pages
- Tanjung M, Tjahjandarie TS, and Sentosa MH, (2013), Antioxidant and cytotoxic agent from the rhizomes of *Kaempferia pandurata*, *Asian Pac J Trop Dis*, 3(5): 401-404
- Stevenson PC, Veitch NC, Simmonds MSJ. (2007). Polyoxygenated cyclohexane derivatives and other constituents from *Kaempferia rotunda* L. *Phytochemistry*. 68:1579–1586.
- Yanti, Yaya R., Kwan-Hyoung Lee, Jal Kwan Hwang (2009), Activity of Panduratin A isolated from *K. pandurata* Roxb. Against multi species oral biofilm In vitro, *J. Oral Science* 51, 87-95.