

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK N-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN METANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea Lam*)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna Memperoleh

Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Dalam Ilmu Kimia



Oleh:

Riyan Firmansyah

NIM: 2108036090

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG
2025**

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK N-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN METANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea Lam*)
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh:

Riyan Firmansyah

2108036090

Untuk Memenuhi Sebagian Syarat Guna Memperoleh

Gelar Sarjana Sains (S.Si)

Dalam Ilmu Kimia

**PROGRAM STUDI KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI WALISONGO
SEMARANG**

2025

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertandatangan dibawah ini:

Nama : Riyan Firmansyah

NIM : 2108036090

Jurusan : Kimia

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul:

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI EKSTRAK N-HEKSANA, ETIL
ASETAT DAN METANOL DAUN JOHAR (*Cassia siamea Lam*)
SECARA *IN VITRO***

Secara keseluruhan adalah hasil penelitian atau karya saya sendiri, kecuali bagian tertentu yang dirujuk sumbernya.

Semarang, 03 Juni 2025

Pembuat Pernyataan,



Riyan Firmansyah

NIM. 2108036090

PENGESAHAN

Naskah skripsi berikut ini:

Judul : Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak n-heksana,
Etil Asetat, dan Metanol Daun Johar (*Cassia
siamea Lam*) Secara *In Vitro*

Penulis : **Riyan Firmansyah**

NIM : 2108036090

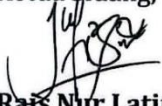
Program Studi : Kimia

Telah diujikan dalam sidang munaqosah oleh Dewan Penguji
Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo dan dapat
diterima sebagai salah satu syarat memperoleh gelar sarjana
dalam ilmu Kimia.

Semarang, 10 Juli 2025

DEWAN PENGUJI

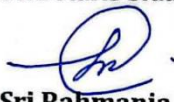
Ketua Sidang,



Rais Nur Latifah, M.Si

NIP.199203042019032019

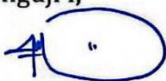
Sekretaris Sidang,



Sri Rahmania, M.Pd

NIP.199301162019032017

Penguji I,



Ana Mardiyah, M.Si

NIP. 198905252019032019

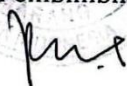
Penguji II,



Mutista Hafshah, M.Si

NIP.199401022019032015

Pembimbing,



Dr. R. Arizal Firmansyah, S.Pd., M.Si

NIP. 197908192009121001

NOTA DINAS

Semarang, 28 Mei 2025

Yth. Dekan Fakultas Sains dan Teknologi

Universitas Islam Negeri Walisongo

Di Semarang

Assalamu'alaikum. Wr. Wb.

Dengan ini diberitahukan bahwa saya telah melakukan bimbingan, arahan dan koreksi naskah skripsi dengan:

Judul : Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak n-heksana,
Etil Asetat, dan Metanol Daun Johar (*Cassia
siamea Lam*) Secara *In Vitro*

Nama : **Riyan Firmansyah**

NIM : 2108036090

Program Studi : Kimia

Saya memandang bahwa naskah skripsi tersebut sudah dapat diajukan kepada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Walisongo untuk diujikan dalam siding munaqosah.

Wassalamu'alaikum. Wr. Wb.

Dosen Pembimbing,



Dr. R. Arizal Firmansyah, S.Pd., M.Si

NIP. 197908192009121001

ABSTRAK

Judul : Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak n-heksana, Etil Asetat, dan Metanol Daun Johar (*Cassia siamea Lam*) Secara *In Vitro*

Nama : Riyan Firmansyah

NIM : 2108036090

Inflamasi merupakan respons alami tubuh terhadap infeksi atau kerusakan jaringan akibat trauma fisik atau kimia, yang melibatkan mediator untuk menghasilkan gejala seperti pembengkakan, kemerahan, panas, nyeri, dan gangguan fungsi. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun *Cassia siamea Lam* secara *in vitro* dengan menggunakan metode denaturasi protein *Bovine Serum Albumin* (BSA). Proses ekstraksi dilakukan melalui maserasi bertingkat berdasarkan urutan kepolaran pelarut, sehingga memungkinkan pemisahan senyawa aktif sesuai dengan tingkat kelarutannya. Berdasarkan hasil pengujian, ekstrak metanol menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi, dengan persentase inhibisi mencapai 92,416% pada konsentrasi 400 ppm. Aktivitas tersebut diikuti oleh ekstrak etil asetat dengan nilai %inhibisi pada konsentrasi 400 ppm sebesar 90,806% dan ekstrak n-heksana sebesar 74,534%. Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Cassia siamea* memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi alami yang efektif.

Kata Kunci: Daun Johar (*Cassia siamea Lam*); Ekstraksi; antiinflamasi; denaturasi protein; Flavonoid; BSA

TRANSLITERASI ARAB LATIN

Keputusan Bersama Menteri Agama dan Menteri Pendidikan
dan Kebudayaan RI Nomor: 158/1987 dan Nomor:
0543b/U/1987.

No	Arab	Latin
1	ا	Tidak dilambangkan
2	ب	b
3	ت	t
4	ث	ṡ
5	ج	j
6	ح	ḥ
7	خ	kh
8	د	d
9	ذ	ẓ
10	ر	r
11	ز	z
12	س	s
13	ش	sy
14	ص	ṣ
15	ض	ḍ

No	Arab	Latin
16	ط	ṭ
17	ظ	ẓ
18	ع	‘
19	غ	g
20	ف	f
21	ق	q
22	ك	k
23	ل	l
24	م	m
25	ن	n
26	و	w
27	ه	h
28	ء	’
29	ي	y

2. Vokal Pendek

— = a كَتَبَ kataba ... = ā قَالَ qāla
 ِ = i سَئِلَ su’ila اِيْ = ī قِيلَ qīla
 ُ = u يَذْهَبُ yaẓhabu اُوْ = ū يَقُولُ yaqūlu

3. Vokal Panjang

4. Diftong

اِيْ = ai كَيْفَ kaifa
 اُوْ = au هَؤُلَ hāula

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbi 'alamin, segala puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak n-Heksana, Etil Asetat, dan Metanol Daun Johar (*Cassia siamea Lam*) secara In Vitro”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.

Penyusunan skripsi ini bukanlah proses yang mudah. Banyak proses panjang yang harus dilalui, mulai dari pengumpulan referensi, perencanaan penelitian, pelaksanaan praktikum di laboratorium, hingga proses penulisan. Dalam setiap tahapan tersebut, penulis banyak menerima bantuan, doa, motivasi, dan dukungan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu, pada kesempatan ini, izinkan penulis menyampaikan rasa terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Nizar Ali, M.Ag. selaku Rektor UIN Walisongo, yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di UIN Walisongo.
2. Bapak Prof. Dr. H. Musahadi, M.Ag. selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi atas segala arahan,

kebijakan, dan dukungan yang memfasilitasi proses perkuliahan penulis selama ini.

3. Ibu Mulyatun, M.Si. selaku Ketua Program Studi, yang telah memberikan izin, dukungan, serta motivasi dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan skripsi ini.
4. Bapak Dr. R. Arizal Firmansyah, M.Si selaku dosen pembimbing skripsi, yang telah membimbing dengan penuh kesabaran, memberikan arahan dan masukan berharga dari awal hingga skripsi ini selesai.
5. Ibu Dr. Anisa Adiwena Putri, M.Sc. selaku dosen wali, yang sejak awal yang selalu sabar menjadi tempat bertanya dan berdiskusi dalam memberi arahan selama proses akademik di kampus dan selama penyusunan skripsi.
6. Seluruh dosen pengajar program studi Kimia, yang telah memberikan ilmu, keterampilan laboratorium, serta inspirasi yang sangat berharga dalam perjalanan studi penulis.
7. Bapak Masyanto dan Ibu Siti Muawanah selaku orang tua penulis, yang selalu menjadi sumber semangat, kasih sayang, dan doa yang tiada henti. Terima kasih atas segala pengorbanan, keikhlasan, dan dukungan dalam segala bentuk.

8. Khakim, Reza, Jefri, Andika, dan Syifa, selaku sahabat dekat yang selalu hadir dalam setiap suka dan duka. Terima kasih telah menjadi tempat berbagi keluh kesah, memberikan semangat, serta menemani penulis melalui masa-masa sulit selama menyelesaikan skripsi ini.
9. Rekan-rekan satu bimbingan, Kimia angkatan 21, KKN MIT-18 Posko 20 dan Sawah Pride, yang saling mendukung dan berbagi pengalaman dalam menghadapi dinamika penelitian dan revisi skripsi.
10. Seluruh pihak yang turut membantu, baik secara langsung maupun tidak langsung, yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Bantuan kalian sangat berarti bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan ke depan. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan menjadi bagian kecil dari kontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kimia bahan alam.

Semarang, 03 Juni 2025



Penulis

Riyan Firmansyah

DAFTAR ISI

PERNYATAAN KEASLIAN	ii
PENGESAHAN	iii
NOTA DINAS.....	iv
ABSTRAK	v
TRANSLITERASI ARAB LATIN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	8
C. Tujuan Penelitian.....	9
D. Manfaat Penelitian	9
BAB II LANDASAN PUSTAKA	10
A. Johar (<i>Cassia siamea Lam</i>)	10
B. Ekstraksi.....	12
C. Fitokimia Johar	14
D. Metabolit Sekunder	19
E. Metode Uji Antiinflamasi <i>In-Vitro</i> dengan Denaturasi Protein.....	20
F. Tinjauan Pustaka	22

G. Hipotesis.....	31
BAB III METODE PENELITIAN	32
A. Tempat dan Waktu Penelitian.....	32
B. Alat dan Bahan.....	32
C. Prosedur Kerja.....	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	44
A. Preparasi Sampel.....	44
B. Ekstraksi Serbuk Daun Johar	47
C. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Johar.....	50
D. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Johar Secara <i>In-Vitro</i>	56
E. Interaksi Molekuler Natrium Diklofenak dan Senyawa Aktif Johar Terhadap Protein BSA.....	66
F. Rasionalitas Penggunaan Natrium Diklofenak Sebagai Kontrol Positif dan Kaitannya Dengan Struktur Bioaktif Dalam Daun Johar.....	71
BAB V PENUTUP	74
A. Kesimpulan	74
B. Saran.....	75
DAFTAR PUSTAKA.....	76
LAMPIRAN	89
RIWAYAT HIDUP.....	107

DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
Tabel 2.1	Polaritas pelarut	13
Tabel 2.2	Metabolit sekunder pada tanaman johar	15
Tabel 2.3	Senyawa aktif pada tanaman johar	15
Tabel 2.4	Ringkasan penelitian terdahulu	26
Tabel 4.1	Organoleptik ekstrak kental	49
Tabel 4.2	Hasil uji skrining fitokimia ekstrak daun johar	51
Tabel 4.3	Hasil uji KLT dan nilai Rf ekstrak daun johar	53
Tabel 4.4	Hasil Aktivitas Antiinflamasi	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
Gambar 2.1	Pohon johar (<i>Cassia siamea Lam</i>)	11
Gambar 2.2	Struktur dan senyawa aktif pada daun johar	17
Gambar 2.3	Struktur dan senyawa aktif pada kulit batang johar	17
Gambar 2.4	Struktur dan senyawa aktif pada bunga johar	18
Gambar 2.5	Struktur dan senyawa aktif pada akar johar	18
Gambar 2.6	Struktur kerangka flavonoid	20
Gambar 4.1	Daun johar tua dan muda	46
Gambar 4.2	Hasil ekstrak kental masing-masing fraksi	50
Gambar 4.3	Hasil uji KLT	55
Gambar 4.4	Grafik %inhibisi uji aktivitas antiinflamasi	61
Gambar 4.5	Usulan interaksi natrium diklofenak dengan asam amino penyusun BSA	67
Gambar 4.6	Struktur kerangka flavonoid	68
Gambar 4.7	Usulan interaksi Flavonoid dengan asam amino penyusun BSA	69
Gambar 4.8	Usulan interaksi saponin dengan asam amino penyusun BSA	70

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
Lampiran 1	Skema cara kerja	89
Lampiran 2	Perhitungan %rendemen	92
Lampiran 3	Perhitungan nilai Rf KLT	93
Lampiran 4	Aktivitas antiinflamasi ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar	94
Lampiran 5	Hasil reaksi skrining fitokimia	100
Lampiran 6	Dokumentasi penelitian	104

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Inflamasi merupakan respons alami tubuh terhadap infeksi atau kerusakan jaringan akibat trauma fisik atau kimia, yang melibatkan mediator untuk menghasilkan gejala seperti pembengkakan, kemerahan, panas, nyeri, dan gangguan fungsi. Jika inflamasi gagal memperbaiki kerusakan jaringan hingga kembali ke kondisi semula atau berlanjut secara abnormal, hal ini bisa berkembang menjadi inflamasi kronis (Subowo, 2013). Kegagalan dalam menghilangkan agen yang menyebabkan peradangan dapat menyebabkan berbagai penyakit serius seperti diabetes, tumor dan kanker (Kresno et al., 2018). Berdasarkan data Riskesdas (2018), penyebaran kanker di Indonesia tercatat sebesar 1,79%, sedangkan penyebaran diabetes mencapai 10,9%. Selain itu, *International Diabetes Federation* (IDF) memprediksi bahwa jumlah dan penyebaran penderita diabetes pada rentang usia 20–79 tahun di Indonesia akan terus mengalami peningkatan (Kemenkes, 2023).

Pengobatan gejala inflamasi dapat dilakukan menggunakan senyawa sintesis dari golongan *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs* (NSAID), yang

memiliki efek antiinflamasi untuk mengurangi peradangan dan nyeri pada sendi. Contoh NSAID yang umum digunakan meliputi diklofenak, ibuprofen, ketorolac, meloxicam, piroxicam, dan celecoxib (Radiah et al., 2023). NSAID bekerja dengan menghambat sintesis prostaglandin, sehingga mengurangi rasa nyeri pada gejala inflamasi, tetapi NSAID juga menghambat enzim *Cyclooxygenase 1* (COX-1) yang berperan dalam sekresi mukus pada lambung, yang dapat menyebabkan pengikisan dinding lambung (Adiansyah et al., 2021). Penggunaan NSAID dalam jangka panjang dapat menimbulkan berbagai efek samping, seperti hipertensi, gangguan fungsi ginjal, pendarahan pada saluran pencernaan, pembengkakan (edema), hingga risiko komplikasi serius seperti stroke dan gagal jantung. (Landefeld & Gonzales, 2016; Lovell & Ernst, 2017).

Natrium diklofenak merupakan salah satu NSAID yang paling banyak digunakan karena efektivitasnya tinggi dalam menekan nyeri dan inflamasi. Namun, penggunaannya dapat menyebabkan efek samping berbahaya. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Gor dan Saksena (2011), sekitar 73% dari 100 pasien yang mengalami *adverse drug reactions* (ADRs) akibat NSAID adalah pengguna natrium

diklofenak, dengan gejala yang paling umum berupa gangguan saluran pencernaan (*gastrointestinal*) seperti mual, muntah, dan gastritis (peradangan pada dinding lambung). Hal ini menunjukkan bahwa meskipun senyawa sintetis seperti natrium diklofenak efektif secara farmakologis, penggunaannya tetap memiliki risiko yang perlu diperhatikan.

Berdasarkan dampak penggunaan senyawa sintetis, pengembangan alternatif antiinflamasi berbahan alami menjadi sangat penting, salah satunya melalui pemanfaatan tanaman. Di Indonesia, penggunaan obat herbal berbasis tanaman telah dikenal sejak lama dalam pengobatan tradisional karena efektivitasnya dalam mengatasi berbagai penyakit. Obat herbal juga cenderung memiliki efek samping yang lebih ringan dibandingkan dengan senyawa sintetis. Bagian tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat meliputi akar, daun, buah, bunga, hingga kulit batang. (Yulianto, 2017). Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai obat herbal adalah pohon johar, yang ekstraknya diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis, sebagai antioksidan (Kaur et al., 2006), antimalaria (Raharjo et al., 2014), antidiabetes (Tanty et

al., 2018), antibakteri (Poovendran et al., 2014), dan antiinflamasi (Ntandou et al., 2010).

Penelitian oleh Mehta et al. (2017) mengenai aktivitas antiinflamasi ekstrak johar dengan menggunakan metode *in vivo* penurunan edema pada tikus menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun johar pada konsentrasi 400 mg/kg memiliki aktivitas antiinflamasi sebesar $0,27 \pm 0,02$ ml pada waktu 4 jam, yang memiliki potensi dibandingkan natrium diklofenak sebesar $0,3 \pm 0,03$ ml. Sementara itu, ekstrak dari biji dan bunga pada konsentrasi 200 mg/kg dan 400 mg/kg juga menunjukkan potensi antiinflamasi, meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan ekstrak daunnya. Penelitian lain oleh Ntandou et al. (2010) yang menggunakan metode ekstraksi dengan pelarut dari non-polar hingga polar, menemukan bahwa ekstrak etanol dan air dari kulit batang johar pada konsentrasi 200 mg/kg dan 400 mg/kg memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan natrium diklofenak. Temuan ini menunjukkan bahwa proses ekstraksi bertingkat dapat membantu mengidentifikasi jenis ekstrak yang paling aktif, sehingga dapat diarahkan sebagai agen antiinflamasi potensial.

Penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun johar memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi. Salah satu metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah penggunaan pelarut dengan tingkat kepolaran berbeda secara bertahap, mulai dari non-polar hingga polar, untuk memisahkan jenis senyawa secara lebih selektif sehingga meningkatkan tingkat kemurnian ekstrak (Altemimi et al., 2017). Selain metode ekstraksi, kualitas bahan baku juga mempengaruhi kandungan senyawa bioaktif yang dihasilkan. Pada penelitian ini, bahan yang digunakan adalah daun johar tua, dengan pertimbangan bahwa siklus pertumbuhannya lebih panjang dibandingkan daun muda. Paparan terhadap faktor lingkungan seperti cahaya dalam waktu yang lebih lama diperkirakan mendorong akumulasi flavonoid yang lebih tinggi pada daun yang lebih tua. (Xia et al., 2022).

Temuan ini semakin diperkuat oleh studi komparatif antar spesies dalam genus *Cassia* yang menunjukkan adanya kesamaan metabolit sekunder pada spesies yang berbeda. Tumbuhan yang berkerabat dekat dalam satu genus biasanya memiliki metabolit sekunder yang mirip. Kesamaan ini terjadi akibat hubungan genetik yang erat, sehingga komposisi kimia

antar spesies dalam genus tersebut sering saling terkait. (Hao & Xiao, 2020). Penelitian pada tumbuhan dalam genus *Cassia*, seperti *Cassia nigricans* dan *Cassia tora*, menunjukkan adanya senyawa flavonoid golongan flavon yang serupa dengan yang ditemukan pada *Cassia siamea* (johar). Dari jenis senyawanya, pada *Cassia nigricans* ditemukan luteolin, pada *Cassia tora* terdapat *luteolin-7-O- β -glucopyranoside*, dan pada *Cassia siamea* juga ditemukan luteolin (Ingkaninan et al., 2000; Khurm et al., 2021; Vijayalakshmi et al., 2016).

Penelitian mengenai aktivitas antiinflamasi pada tumbuhan yang satu genus dengan johar, menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Senna auriculata* pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ memiliki potensi sebagai antiinflamasi, dengan nilai penghambatan antara $84,2 \pm 1,15\%$. Hasil ini hampir mendekati efektivitas kontrol positif (aspirin) dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ yang menunjukkan nilai penghambatan sebesar $94,08 \pm 1,62\%$. Selain itu, nilai IC_{50} ekstrak ini terhadap denaturasi protein tercatat sebesar 55,7 $\mu\text{g/mL}$ (Prasathkumar et al., 2021). Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Shyeed et al. (2023), ekstrak daun *Senna occidentalis* menunjukkan penghambatan antiinflamasi tertinggi pada ekstrak metanol dengan konsentrasi 8

mg/mL sebesar 62,94% dan terendah pada ekstrak kloroform dengan konsentrasi 8 mg/mL sebesar 27,91%, sementara indometasin sebagai kontrol dengan konsentrasi 2,8 mg/mL memiliki nilai penghambatan sebesar 76,14%. Temuan ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol lebih efektif dibandingkan kloroform dalam menghambat antiinflamasi.

Berbagai temuan tersebut menguatkan bahwa tumbuhan dari genus *Senna* dan *Cassia* memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi alami. Pandangan ini sejalan dengan ajaran dalam Al-Qur'an yang menggambarkan keanekaragaman tumbuhan sebagai bukti kebesaran Allah. Dalam Surah Asy-Syu'ara ayat 7-8 disebutkan:

٧ أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ
 ٨ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً..... ٨

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik? Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kekuasaan Allah)...”(Q.S Asy-Syu'ara : 7-8).

Ayat ini memperkuat pandangan bahwa tumbuh-tumbuhan tidak hanya menjadi sumber kehidupan,

tetapi juga menyimpan manfaat kesehatan, termasuk sebagai bahan alami pengobatan.

Penelitian sebelumnya pada biji, bunga, dan daun Johar, serta kajian terhadap genus *Cassia*, menunjukkan bahwa daun Johar berpotensi memiliki aktivitas antiinflamasi. Meskipun penelitian khusus mengenai ekstraksi berurutan pada daun Johar belum banyak dilakukan, riset terdahulu mengindikasikan bahwa penggunaan pelarut dengan kepolaran berbeda dapat membantu mengidentifikasi jenis ekstrak yang paling aktif secara farmakologis. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dari ekstrak daun Johar (*Cassia siamea* Lam), serta mengidentifikasi ekstrak mana yang memiliki potensi paling tinggi sebagai agen antiinflamasi.

B. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar (*Cassia siamea* Lam) memiliki aktivitas antiinflamasi?
2. Berapa nilai % inhibisi uji antiinflamasi dari ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar (*Cassia siamea* Lam) dibandingkan kontrol positif?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui ekstrak aktif daun johar (*Cassia siamea Lam*) yang memiliki potensi aktivitas antiinflamasi.
2. Mengetahui nilai % inhibisi uji antiinflamasi dari ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar (*Cassia siamea Lam*) dibandingkan kontrol positif.

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi mengenai potensi daun johar (*Cassia siamea Lam*) sebagai agen antiinflamasi. Selain itu, hasil penelitian ini dapat menjadi landasan untuk studi lanjutan, seperti eksplorasi mekanisme kerja aktivitas antiinflamasi dari masing-masing ekstrak, uji toksisitas dan efektivitas ekstrak sebagai kandidat obat antiinflamasi.

BAB II

LANDASAN PUSTAKA

A. Johar (*Cassia siamea Lam*)

Tanaman johar (*Cassia siamea Lam*) adalah tanaman asli Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Pohon ini memiliki banyak nama sinonim, seperti *Senna siamea*, *Cassia florida*, dan *Senna sumatrana*. Pohon johar dapat berkembang di wilayah dataran rendah hingga daerah dengan ketinggian mencapai 1.400 meter di atas permukaan laut, dan dapat tumbuh hingga mencapai tinggi sekitar 20 meter (Dwiyani, 2013).

Menurut D. Kumar et al. (2017), klasifikasi ilmiah atau tata nama taksonomi dari tanaman Johar adalah sebagai berikut:

<i>Kingdom</i>	: <i>Plantae</i>
<i>Sub kingdom</i>	: <i>Tracheobionta</i>
<i>Super division</i>	: <i>Spermatophyta</i>
<i>Division</i>	: <i>Magnoliophyta</i>
<i>Class</i>	: <i>Magnoliopsida</i>
<i>Order</i>	: <i>Fabales</i>
<i>Family</i>	: <i>Caesalpinaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Cassia</i>
<i>Species</i>	: <i>Siamea</i>



Gambar 2. 1 Pohon Johar (*Cassia siamea* lam) 1. Batang 2. Daun 3. Cabang Bunga dan Bunga 4. Polong 5. Kulit batang (Kamagaté et al., 2014)

Pohon johar dapat tumbuh dengan tinggi antara 10 hingga 20 meter dan memiliki cabang yang menyebar lebar, membentuk tajuk padat berbentuk bulat. Batangnya berbentuk silindris, tumbuh tegak, dengan permukaan kulit kasar berwarna putih cerah hingga abu-abu kecokelatan. Daunnya termasuk daun majemuk menyirip genap, dengan panjang antara 10 hingga 35 cm. Bagian atas daun tampak licin dan mengkilap, sedangkan bagian bawahnya memiliki bulu-bulu halus. Bunganya berjenis majemuk dan tumbuh di ujung batang, dengan kelopak bunga berjumlah lima dan berwarna hijau kekuningan. Buah johar berbentuk polong pipih yang terbelah dua, dapat mencapai panjang 20 cm. Buah yang masih muda berwarna hijau, sementara buah yang telah matang berubah menjadi hitam. Bijinya berbentuk oval dan berwarna coklat kehijauan (Hidayat & Rodame, 2015).

B. Ekstraksi

Metabolit sekunder dari daun johar dapat diperoleh melalui proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dipilih karena memiliki prosedur yang sederhana, menggunakan peralatan yang mudah didapat, serta tidak memerlukan proses pemanasan, sehingga kandungan senyawa aktif dalam bahan alami tetap terjaga dan tidak terdegradasi. Metode ekstraksi ini memungkinkan lebih banyak senyawa yang dapat diekstraksi, meskipun beberapa di antaranya memiliki kelarutan terbatas dalam pelarut pada suhu ruang (Puspitasari & Proyogo, 2017). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dikenal sebagai pelarut pengekstrak, dan pemilihannya bergantung pada jenis tanaman, bagian yang akan diekstraksi, sifat senyawa bioaktif, serta ketersediaan pelarut tersebut (Abubakar & Haque, 2020).

Pelarut yang digunakan untuk mengekstrak metabolit sekunder dipilih berdasarkan kesesuaian polaritasnya dengan senyawa target. Metabolit sekunder akan larut optimal dalam pelarut yang memiliki polaritas serupa. Beberapa pelarut dapat digunakan berturut-turut dalam proses ekstraksi untuk menyaring jenis senyawa yang dihasilkan dan meningkatkan kemurnian hasil.

Urutan polaritas beberapa pelarut umum dari yang paling tidak polar hingga paling polar adalah: heksana < kloroform < etil asetat < aseton < metanol < air (Altemimi et al., 2017).

Berikut ini ada tabel urutan peningkatan polaritas pelarut dari nonpolar ke polar:

Tabel 2. 1 Polaritas Pelarut (*Abubakar & Haque, 2020.*)

Pelarut	Polaritas
n-heksana	0.009
Petroleum eter	0.117
Dietil eter	0.117
Etil asetat	0.228
Kloroform	0.259
Diklorometan	0.309
Aseton	0.355
n-Butanol	0.586
Etanol	0.654
Metanol	0.762
Air	1.000

Melalui pemahaman konsep "*like dissolves like*" serta mempertimbangkan urutan polaritas pelarut yang ditunjukkan pada **Tabel 2.1**, dipilih pelarut yang sesuai

untuk proses ekstraksi. Sebagai contoh, penelitian Alhawarri et al. (2021) berhasil mengekstrak berbagai ekstrak dari bunga *Cassia timoriensis* menggunakan urutan pelarut mulai dari n-heksana, etil asetat, metanol, hingga air.

C. Fitokimia Johar

Uji skrining fitokimia merupakan langkah awal yang dilakukan untuk mengetahui keberadaan metabolit sekunder dalam suatu ekstrak, yang berperan penting dalam mengidentifikasi potensi aktivitas biologis dari bahan alam tersebut. Metabolit sekunder yang sering ditemukan pada tumbuhan antara lain meliputi steroid, terpenoid, karotenoid, flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, serta glikosida seperti antrakuinon (Haryanto et al., 2024).

Beberapa penelitian telah melaporkan hasil skrining fitokimia pada tanaman johar, di mana daun johar mengandung senyawa seperti polifenol, antraquinon, biantraquinon, flavonoid, alkaloid, tannin dan steroid (Kamagaté et al., 2014). Bagian tanaman dari daun, kulit batang, dan bunga tanaman johar (*Cassia siamea Lam*) menunjukkan adanya metabolit sekunder, seperti yang ditampilkan pada **Tabel 2.2**.

Tabel 2. 2 Metabolit sekunder pada daun, kulit batang dan bunga tanaman johar (*Cassia siamea Lam*)

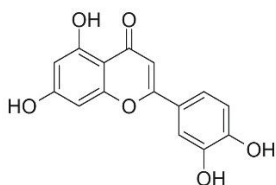
Bagian	Pelarut	Senyawa aktif	Refrensi
Daun	Etanol	Alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin	(Fitriah et al, 2017)
Kulit Batang	Metanol	Antrakuinon, alkaloid, tannin saponin, flavonoid, polifenol dan glikosida.	(Mohammed et al., 2013)
Bunga	Metanol	Kromon alkaloid, flavonoid dan asam fenolat	(Kamagaté et al., 2014)

Beberapa senyawa aktif yang terdapat dalam pohon johar (*Cassia siamea Lam*) disajikan pada **Tabel 2.3**, sementara struktur kimianya dapat dilihat pada **Gambar 2.2-2.5**.

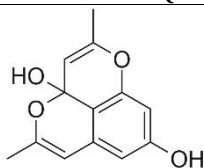
Tabel 2. 3 Senyawa aktif pada tanaman johar

Bagian	Senyawa Aktif	Referensi
Daun	Luteolin (1)	(Ingkaninan et al., 2000)
	Barakol (2)	(Thongsaard et al., 2001)
	Anhidrobarakol (3)	
	Cassiarin A (4)	(Morita et al., 2007)
	Cassiarin B (5)	
	Cassiarin G (6)	(Deguchi et al., 2012)
	Cassiarin H (7)	

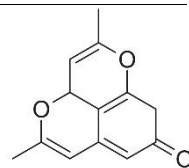
Batang	Cassiarin J (8)	(Hu et al., 2012)
	Cassiarin K (9)	
	Siachromone A (10)	
	Siachromone B (11)	
	Siachromone C (12)	
	Siachromone D (13)	
	Siachromone E (14)	
Bunga	Siachromone F (15)	(Oshimi et al., 2009)
	Siachromone G (16)	
	Cassiarin C (17)	
	Cassiarin D (18)	
	Cassiarin E (19)	
Akar	Cassiarin F (20)	(Deguchi et al., 2011)
	Barakol (21)	
	Bianthraquinon A (22)	
	Bianthraquinon B (23)	
	Cassiamin A (24)	



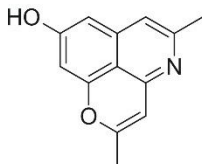
1



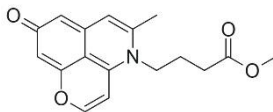
2



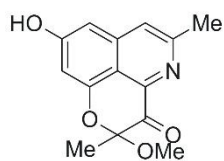
3



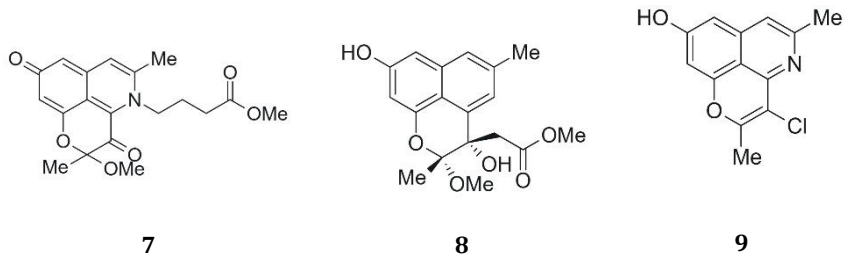
4



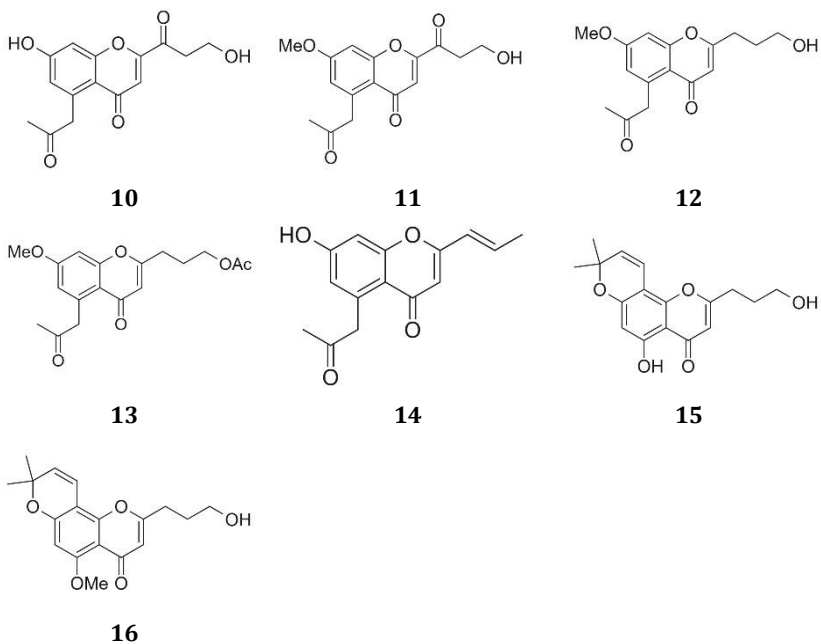
5



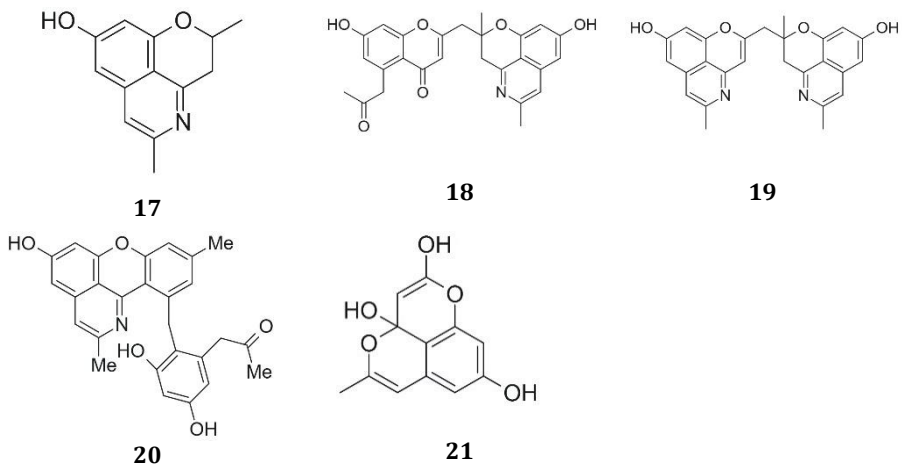
6



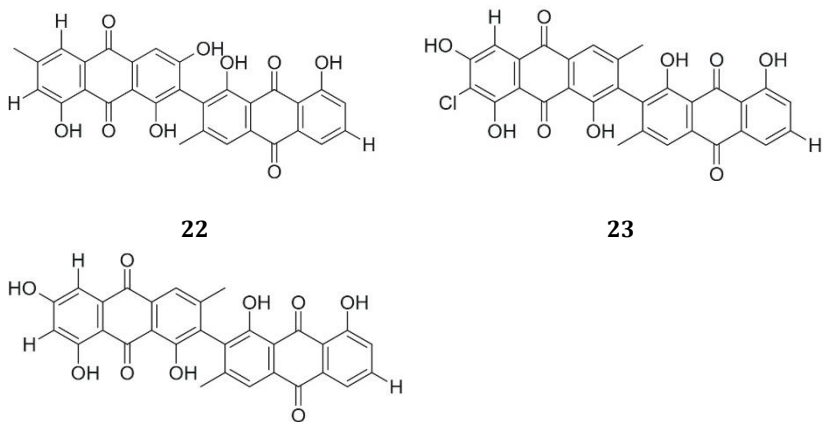
Gambar 2. 2 Struktur dari senyawa aktif pada daun johar (Deguchi et al., 2012; Ingkaninan et al., 2000; Morita et al., 2007; Thongsaard et al., 2001)



Gambar 2. 3 Struktur dari senyawa aktif pada kulit batang johar (Hu et al., 2012)



Gambar 2. 4 Struktur dari senyawa aktif pada bunga johar (Deguchi et al., 2011; Monton et al., 2015; Oshimi et al., 2009)



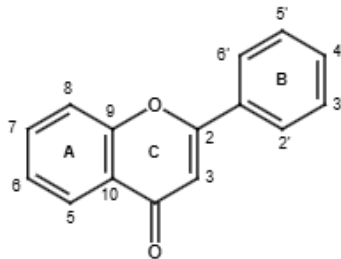
Gambar 2. 5 Struktur dari senyawa aktif pada akar johar (Koyama et al., 2001)

D. Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder yang berasal dari tumbuhan, sangat beragam dan sudah terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi. Di antara senyawa-senyawa tersebut, alkaloid, terpenoid, dan senyawa fenolik seperti tanin, kumarin, saponin, dan terutama flavonoid (Nunes et al., 2020).

Dalam sebuah penelitian yang bertujuan mengetahui aktivitas antiinflamasi dari quercetin, luteolin, kaempferol, dan taxifolin ditemukan bahwa sifat antiinflamasi senyawa ini berkaitan dengan struktur kimianya. Keberadaan gugus hidroksil pada posisi C3' dan C4' dari cincin B, yang membentuk sistem orto-di-hidroksilasi, sangat penting untuk menghambat pembentukan leukotrien. Kaempferol, yang tidak memiliki gugus hidroksil pada posisi 3' sehingga tidak memiliki sistem orto-di-hidroksilasi, menunjukkan efek 60% lebih rendah dibandingkan dengan quercetin, yang memiliki dua gugus hidroksil. Selain itu, ikatan rangkap antara karbon 2 dan 3 pada cincin C juga berperan penting dalam aktivitas antiinflamasi, karena ketidakadaan ikatan rangkap ini pada taxifolin mengakibatkan hilangnya kemampuan untuk menghambat inflamasi (Loke et al., 2008; Reginato et al.,

2015). Struktur kerangka flavonoid dapat dilihat pada **Gambar 2.6**, sedangkan struktur luteolin dapat dilihat pada senyawa aktif pohon johar **nomor 1**.



Gambar 2. 6 Struktur kerangka flavonoid (Reginato et al., 2015)

E. Metode Uji Antiinflamasi *In-Vitro* dengan Denaturasi Protein

Uji aktivitas antiinflamasi dapat dilakukan baik secara *in-vitro* maupun *in-vivo*. Namun, dalam penelitian ini, dipilih metode *in-vitro* untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi. Beberapa metode yang umum digunakan dalam uji antiinflamasi *in-vitro* meliputi denaturasi protein (Alhawarri et al., 2021), stabilisasi membran sel darah merah (Fayez et al., 2023) dan aktivitas penghambatan *lipoksigenase* (Sherif et al., 2023). Penelitian ini memilih metode denaturasi protein di antara ketiga metode yang ada karena tidak bersifat asam dan membutuhkan biaya yang lebih rendah (Novika et al., 2021).

Denaturasi protein merupakan proses kerusakan struktur protein yang disebabkan oleh interaksi dengan senyawa eksternal, seperti asam atau basa kuat, garam organik, pelarut organik, maupun paparan panas (Abidin et al., 2019). Dalam penelitian ini, denaturasi terjadi oleh peningkatan suhu, yang menyebabkan energi kinetik protein bertambah. Hal ini membuat molekul protein bergerak dan bergetar lebih cepat, sehingga mengganggu ikatan hidrogen serta interaksi hidrofobik di dalam struktur protein (Rizky et al., 2015).

Pengujian aktivitas antiinflamasi dilakukan dengan mengukur kemampuan ekstrak untuk menghambat denaturasi protein. Proses ini melibatkan penggunaan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur kekeruhan larutan (Mulyani et al., 2023). Pada penelitian ini, protein BSA (*Bovine Serum Albumin*) dicampurkan dengan berbagai konsentrasi ekstrak, kemudian diinkubasi dan dipanaskan. Semakin rendah kekeruhan larutan yang dihasilkan, semakin kuat aktivitas antiinflamasi ekstrak tersebut (Prasathkumar et al., 2021). Hasil penelitian sebelumnya pada daun *Senna auriculata*, yang merupakan genus yang sama dengan johar, juga menunjukkan bahwa metode

pegujian antiinflamasi dengan spektrofotometri uv-vis efektif dalam menguji aktivitas antiinflamasi (Prasathkumar et al., 2021).

F. Tinjauan Pustaka

Penelitian mengenai aktivitas antiinflamasi pohon johar (*Cassia siamea Lam*) sudah dilakukan. Salah satu studi menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun johar pada dosis 400 mg/kg ($0,30 \pm 0,02$ mL) memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan natrium diklofenak ($0,33 \pm 0,02$ mL). Selain itu, ekstrak biji dan bunga johar pada dosis 200 mg/kg dan 400 mg/kg juga menunjukkan potensi antiinflamasi, meskipun sedikit lebih rendah dibandingkan ekstrak daunnya. Penelitian lain melakukan ekstraksi secara bertahap menggunakan pelarut dari tingkat nonpolar hingga polar, yaitu petroleum eter, kloroform, etanol, dan air. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak air dari kulit batang johar pada konsentrasi 100, 200, dan 400 mg/kg memberikan efek penghambatan inflamasi yang hampir setara dengan natrium diklofenak, dengan nilai penghambatan masing-masing sebesar $1,03 \pm 0,23$, $1,09 \pm 0,14$, dan $0,97 \pm 0,14$ mL pada waktu 24 jam. Sebagai pembanding, natrium diklofenak pada konsentrasi 5 mg/kg menghasilkan penghambatan sebesar $0,80 \pm 0,10$

mL. Berdasarkan hasil penelitian ini, pohon johar memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi (Mehta et al., 2017; Ntandou et al., 2010).

Dalam penelitian lain yang dilakukan oleh Amirah & Herman, (2015), uji aktivitas antiinflamasi dilakukan menggunakan 15 ekor tikus Wistar yang dibagi menjadi 5 kelompok. Satu kelompok kontrol diberi suspensi Na.CMC 1% w/v, satu kelompok pembanding menerima natrium diklofenak 0,35 mg/kg, dan tiga kelompok uji lainnya diberikan fraksi kloroform daun Johar dengan dosis 75 mg/kg, 150 mg/kg, dan 300 mg/kg. Aktivitas antiinflamasi dievaluasi dengan mengukur volume awal kaki tikus, diikuti dengan pemberian obat secara oral sesuai dosis masing-masing kelompok. Setelah itu, inflamasi diinduksi melalui injeksi intraplantar karagenan 1%, dan derajat inflamasi diukur setiap jam selama 8 jam. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol (Na.CMC) mengalami peningkatan volume kaki yang jauh lebih besar, menandakan tidak adanya efek antiinflamasi. Kelompok yang menerima natrium diklofenak menunjukkan penghambatan inflamasi terbaik dengan nilai penghambatan sebesar $2,51 \pm 0,24$ mL. Di antara kelompok uji fraksi kloroform, dosis 75 mg/kg

memberikan efek penghambatan terbaik dibandingkan dengan dosis lainnya, dengan nilai penghambatan sebesar $2,36 \pm 0,31$ mL, yang sebanding dengan natrium diklofenak.

Lebih lanjut, kajian Prasathkumar et al., (2021), tentang genus *Senna auriculata*, yang satu genus dengan pohon johar (*Cassia siamea Lam*), menemukan bahwa ekstrak metanol *Senna auriculata* mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, dan terpenoid. Uji in vitro dengan metode denaturasi protein menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang signifikan, dengan nilai penghambatan 23,38% dan 84,2% pada konsentrasi 20 dan 100 $\mu\text{g/mL}$, yang hampir setara dengan aspirin sebagai kontrol positif. Penelitian yang dilakukan oleh Alhawarri et al. (2021) mengkaji aktivitas antiinflamasi bunga *Cassia timoriensis*. Ekstrak etil asetat dan metanol bunga ini diidentifikasi mengandung flavonoid, tanin, antrakuinon glikosida, steroid, terpenoid, kumarin, protein, dan karbohidrat. Uji aktivitas antiinflamasi bunga *Cassia timoriensis* dilakukan dengan metode denaturasi protein terhadap ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol, dan air. Hasil dari ekstrak etil asetat dan metanol menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang kuat

dengan nilai penghambatan sebesar 92,38% dan 89,45% pada konsentrasi 100 mg/ml, yang mendekati nilai kontrol positif indometasin, yaitu 90,04%.

Selain itu, penelitian oleh Rahman et al. (2023) yang masih dalam satu genus menguji aktivitas antiinflamasi dari ekstrak etil asetat daun *Senna tora* yang mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder, seperti flavonoid, tanin, terpenoid, steroid, alkaloid, glikosida, dan saponin. Uji aktivitas antiinflamasi menggunakan metode denaturasi protein menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun *Senna tora* mampu menghambat denaturasi bovine serum albumin (BSA) dengan rentang inhibisi sebesar 32,617% hingga 91,731%, mendekati kontrol positif ibuprofen. Meskipun ibuprofen menunjukkan inhibisi yang lebih tinggi, ekstrak *Senna tora* memberikan hasil yang sebanding dalam mencegah inflamasi.

Penelitian yang dilakukan oleh Shyeed et al. (2023), yang masih dalam satu genus dengan pohon johar menguji aktivitas antiinflamasi daun *Senna occidentalis* yang diekstraksi menggunakan metanol, n-heksana, dan kloroform. Ekstrak tersebut mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, triterpenoid, dan senyawa fenolik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa

ekstrak metanol pada konsentrasi 8 mg/ml memiliki penghambatan hemolisis tertinggi sebesar 62,94%, sedangkan ekstrak kloroform pada konsentrasi 8 mg/ml hanya menunjukkan penghambatan 27,91%. Sebagai pembanding, indometasin menunjukkan penghambatan hemolisis sebesar 76,14%, sehingga ekstrak metanol memiliki efek antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan ekstrak kloroform, namun belum mendekati indometasin.

Untuk informasi lebih lanjut dan rincian lengkap mengenai kajian pustaka ini, dapat lihat pada **Tabel 2.4**

Tabel 2. 4 Ringkasan Penelitian Terdahulu

Peneliti	Objek penelitian	Jenis ekstrak	Hasil aktivitas antiinflamasi
(Ntandou et al., 2010)	Kulit batang johar (<i>Cassia siamea</i> ,)	petroleum eter, kloroform, metanol, dan air	Aktivitas antiinflamasi ekstrak air pada konsentrasi 100, 200, dan 400 mg/kg masing-masing sebesar $1,03 \pm 0,23$, $1,09 \pm 0,14$, dan $0,97 \pm 0,14$ mL, sebanding dengan natrium diklofenak pada dosis 5 mg/kg ($0,80 \pm 0,10$ mL).

(Mehta et al., 2017)	Bunga, daun, kulit batang <i>Cassia javanica</i> dan <i>Cassia siamea</i>	Etanol	Ekstrak etanol daun <i>cassia siamea</i> dan kulit batang <i>cassia javanica</i> dengan dosis 200 dan 400 mg/kg mengurangi edema secara dengan efek signifikan pada 200 mg/kg ($p < 0,001$).
(Amirah & Herman, 2015)	Daun Johar	Kloroform	Natrium diklofenak menunjukkan penghambatan inflamasi dengan nilai penghambatan sebesar $2,51 \pm 0,24$ mL. Fraksi kloroform pada konsentrasi 75 mg/kg menunjukkan potensi sebanding dengan kontrol positif.
(Prasathkumar et al., 2021)	Daun <i>Senna auriculata</i>	Metanol	Ekstrak menunjukkan penghambatan signifikan sebesar $23,38 \pm 0,28\%$ hingga $84,2 \pm 1,15\%$, hampir setara dengan aspirin ($39,6 \pm 0,62\%$ hingga

			94,08 ± 1,62%), dengan IC50 sebesar 55,7 µg/mL.
(Alhawarri et al., 2021)	bunga <i>Cassia timoriensis</i>	n-heksana, etil asetat, metanol dan air	ekstrak etil asetat dan metanol pada konsentrasi 100 µg/mL menunjukkan penghambatan sebesar 92,38 ± 0,74 dan 89,45 ± 1,25%, dengan pola aktivitas antiinflamasi yang mirip kontrol positif indometasin (90,04 ± 0,87%).
(Rahman et al., 2023)	Daun <i>Senna tora</i> (L.) Roxb	Etil asetat	Ekstrak etil asetat daun <i>Senna tora</i> menghambat denaturasi BSA sebesar 32,617%–91,731% dengan IC50 22,980 µg/mL. Ibuprofen menghambat 41,978%–93,194% (IC50 4,956 µg/mL). Meski lebih lemah, ekstrak etil asetat

			menunjukkan efisiensi sebanding dalam menghambat inflamasi.
(Shyeed et al., 2023)	Daun <i>Senna occidentalis</i>	Metanol, n-heksana, kloroform	ekstrak metanol menunjukkan penghambatan hemolisis tertinggi (62,94%), sedangkan kloroform terendah (16,24%) dan indometasin memiliki penghambatan sebesar 76,14%.
(Mworia et al., 2021)	Daun <i>Senna didymobotrya</i>	Diklorometan	Perbedaan tidak signifikan pada 200 dan 250 mg/kg bb; ekstrak ini memiliki potensi yang mendekati diklofenak pada dosis tinggi..
(Pal et al., 2021)	Daun <i>Cassia fistula</i>	Metanol	Ekstrak metanol daun <i>Cassia fistula</i> 250 dan 500 mg/kg secara signifikan ($p < 0,05$) mengurangi edema secara dosis-responsif,

			setara dengan diclofenac.
--	--	--	------------------------------

Hasil penelitian pada **Tabel 2.5** menunjukkan potensi antiinflamasi dari pohon johar (*Cassia siamea Lam*) dan genus *Cassia* secara keseluruhan. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa daun johar memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan dengan bagian lain dari pohon ini, seperti bunga, biji dan kulit batang. Berdasarkan temuan tersebut, penelitian ini akan melakukan ekstraksi bertingkat pada bagian daun johar, dengan fokus untuk mengetahui ekstrak yang aktif berperan sebagai agen antiinflamasi.

G. Hipotesis

Daun Johar (*Cassia siamea* Lam) memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi alami, dan ekstrak metanol diduga menunjukkan aktivitas antiinflamasi paling tinggi dibandingkan ekstrak n-heksana dan etil asetat. Hal ini didasarkan pada asumsi bahwa senyawa bioaktif yang bersifat polar, seperti flavonoid dan tanin, lebih mudah terekstraksi menggunakan pelarut polar seperti metanol, yang mampu melarutkan senyawa aktif yang berperan dalam menghambat proses inflamasi. Selain itu penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak lain.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Sampel daun Johar tua diambil di Desa Tambakroto, Kecamatan Sayung, Kabupaten Demak. Pembuatan ekstrak, skrining fitokimia dan uji aktivitas antiinflamasi dilakukan di Laboratorium Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Muhammadiyah Semarang. Proses penelitian dan analisis data berlangsung dari November hingga Maret 2025.

B. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat kaca, spatula, toples kaca, termometer, pH meter (OHAUS), timbangan analitik (AND), blender (Cosmos), satu set alat destilasi, hotplate (Maspion), Oven (Universal UN55), water bath, chamber (CAMAG), satu set *vacuum rotary evaporator* (IKA), dan *instrument spektrofotometer* UV-Vis (DLAB SP-UV1100).

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari daun johar (*Cassia siamea Lam*) diperoleh dari Desa Tambakroto Kecamatan Sayung Kabupaten Demak, metanol (CH_3OH , smartlab, teknis), n-heksana (C_6H_{14} , smartlab, teknis), etil asetat ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, smartlab, teknis), kloroform (CCl_3 , Merck, p.a), asam klorida 2 N (HCl , Merck, p.a), natrium hidroksida (NaOH , Merck, p.a), asam sulfat pekat (H_2SO_4 , Merck, p.a), pereaksi wagner (nitra kimia, teknis), pereaksi dragendrof (nitra kimia, teknis), FeCl_3 (Merck, p.a), bovine serum albumin (BSA) (nitra kimia, p.a), timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, Merck, p.a) natrium klorida (NaCl , Merck, p.a), kalium klorida (KCl , Merck, p.a), dinatrium hidrogen fosfat (Na_2HPO_4 , Merck, p.a), Potassium Dihidrogen Phosphat (KH_2PO_4 , Merck, p.a), plat KLT silica gel 60 F_{254} (Merck, p.a) natrium diklofenak dan aquades.

C. Prosedur Kerja

1. Pengambilan Sampel

Daun Johar yang dipilih untuk penelitian ini adalah daun yang sudah tua, ditentukan secara visual berdasarkan ciri-ciri fisik yang tampak, seperti ukuran, tekstur dan warna daun. Pengambilan sampel dilakukan di Desa Tambakroto Pilang, Kecamatan Sayung, Kabupaten Demak, pada tanggal 10 Oktober 2024. Pengambilan daun dilakukan pada musim kemarau.

2. Pembuatan Serbuk Daun Johar

Daun johar yang telah dikumpulkan terlebih dahulu dibersihkan dengan air mengalir, lalu dikeringkan pada suhu ruang. Setelah proses pengeringan selesai, daun dipotong menjadi bagian-bagian kecil dan dihaluskan hingga berbentuk serbuk menggunakan blender (Ayele et al., 2023).

3. Ekstraksi Serbuk Daun Johar

Sebanyak 120 gram bubuk daun Johar dimasukkan ke dalam toples kaca dan diekstraksi menggunakan 750 mL n-heksana selama dua hari (48 jam) dengan metode maserasi. Setelah itu, campuran disaring untuk memisahkan filtrat dari

residu, lalu residu dikeringkan dalam oven bersuhu 40°C guna menghilangkan sisa pelarut. Filtrat n-heksana diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C dan rpm 50 untuk memperoleh ekstrak kental. Selanjutnya, residu kering hasil ekstraksi n-heksana diekstraksi ulang menggunakan 750 mL etil asetat selama dua hari, kemudian disaring, dikeringkan kembali, dan filtratnya diuapkan seperti tahap sebelumnya untuk memperoleh ekstrak etil asetat. Proses yang sama dilakukan untuk ekstrak metanol, dengan mengekstraksi residu kering hasil etil asetat menggunakan 750 mL metanol selama dua hari, dilanjutkan dengan penyaringan, pengeringan, dan penguapan filtrat untuk mendapatkan ekstrak metanol. Dihitung kadar rendemen ekstrak dengan menggunakan **persamaan 3.1** (Alhawarri et al., 2021).

$$\%Rendemen = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{massa sampel}} 100\% \dots\dots\dots (3.1)$$

4. Skrining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

1) Pereaksi wagner

Setiap ekstrak daun johar diambil dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambahkan 2–3 tetes reagen wegner. Terbentuknya endapan berwarna coklat menandakan hasil positif (Khafid et al., 2023).

2) Pereaksi dragendrof

Setiap ekstrak daun johar diambil dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi terpisah, kemudian ditambahkan 2–3 tetes reagen Dragendorff. Jika muncul endapan berwarna merah atau jingga, maka menunjukkan hasil positif (Khafid et al., 2023).

b. Uji Flavonoid

1) Uji alkali

Sebanyak 1 mL masing-masing ekstrak daun johar dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian

ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH dan dikocok. Munculnya warna kuning pekat yang memudar setelah penambahan HCl menjadi indikator keberadaan senyawa flavonoid. (Abubakar & Haque, 2020).

2) Uji timbal asetat ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)

Masing-masing ekstrak daun johar dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 2 ml. kemudian ditambahkan beberapa tetes larutan timbal asetat. Hasil positif jika terbentuk endapan berwarna kuning (Azizah et al., 2020).

c. Uji Saponin

Sebanyak 2 mL dari masing-masing ekstrak daun johar dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL air panas dan dikocok selama kurang lebih 1 menit. Kehadiran saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih stabil setinggi 1–10 cm yang bertahan setidaknya selama 10 menit. Setelah ditetesi 1 tetes HCl 2N, buih

tersebut tetap tidak menghilang. (Suleman et al., 2022).

d. Uji Terpenoid

Masing-masing ekstrak daun johar diambil sebanyak 2 mL dan tambahkan 2 ml larutan kloroform, 10 tetes asam asetat anhidrat dan 3 tetes H_2SO_4 pekat. Kemudian kocok dan diamkan campuran. Pembentukan warna merah atau ungu atau terbentuk cincin coklat menunjukkan adanya terpenoid (Azalia et al., 2023)

e. Uji Steroid

Masing-masing ekstrak daun johar diambil sebanyak 2 mL dan tambahkan 2 ml larutan kloroform, 2 mL asam asetat dan 5 tetes larutan H_2SO_4 pekat. Kemudian kocok dan diamkan. Perubahan warna menjadi hijau menunjukkan adanya terpenoid (Rahman et al., 2023).

f. Uji Tanin

Setiap ekstrak daun johar sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi 2–3 tetes larutan FeCl_3 1%. Jika terjadi perubahan warna menjadi hijau

kehitaman, maka sampel menunjukkan hasil positif mengandung tanin. (Fitriyah et al., 2021).

g. Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Plat KLT dipotong berukuran 10 x 4 cm dengan tepi atas 0,5 cm dan bawah 1,5 cm. Fase gerak yang digunakan campuran 2 pelarut n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 7:3, lalu dijenuhkan fase gerak dalam chamber selama ± 1 jam. Setelah itu, masing-masing ekstrak ditotolkan pada plat dan dikeringkan. Plat kemudian dimasukkan ke dalam chamber hingga eluen naik mendekati tepi atas, lalu diangkat dan dikeringkan. Noda yang terbentuk diamati di bawah lampu UV, kemudian dihitung nilai R_f menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \dots\dots\dots(3.2)$$

(S. Kumar et al., 2013).

5. Uji Antiinflamasi Ekstrak Daun Johar Secara *In-Vitro*

Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak daun Johar dilakukan secara *in vitro* dengan mengukur kemampuannya untuk menghambat denaturasi protein BSA. Uji ini dilakukan dengan beberapa tahapan sebagai berikut:

a. Pembuatan Larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

Sebanyak 8 gram NaCl, 0,20 gram KCl, 1,44 gram Na₂HPO₄, dan 0,24 gram KH₂PO₄ ditimbang, kemudian ditambahkan aquades sebanyak 900 mL. pH larutan distabilkan dengan penambahan HCl hingga mencapai pH 6,2–6,5. Setelah itu, volume larutan ditambahkan aquades hingga mencapai 1000 mL menggunakan labu ukur (Armaini et al., 2022).

b. Pembuatan Larutan BSA 0,2% (*Bovine Serum Albumin*)

Sebanyak 0,2 gram BSA (*Bovine Serum Albumin*) dilarutkan dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu ditambahkan

larutan PBS hingga mencapai volume akhir 100 mL (Reynaldi & Yani, 2021).

c. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Labu ukur 5 mL diisi dengan 2 mL larutan BSA 0,2%, 1,5 mL larutan PBS, dan aquades hingga mencapai tanda batas (Rusli & Setiani, 2020).

d. Pembuatan Larutan Kontrol Positif Natrium Diklofenak

Larutan natrium diklofenak sebagai kontrol positif dibuat dengan melarutkan 0,025 gram natrium diklofenak dalam labu ukur 25 mL, kemudian ditambahkan aquades hingga volume mencapai 25 mL sehingga diperoleh larutan induk berkonsentrasi 1000 ppm. Larutan induk tersebut selanjutnya diencerkan untuk memperoleh konsentrasi 100, 200, dan 400 ppm (Mulyani et al., 2023).

e. Pembuatan Larutan Uji Fraksi Daun Johar

Sebanyak 0,1 g ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar masing-masing dilarutkan dalam 100 mL n-heksana, etil asetat, dan metanol untuk menghasilkan larutan induk dengan konsentrasi 1000

mg/L. Larutan induk tersebut kemudian diencerkan masing-masing sebanyak 1 mL, 2 mL, dan 4 mL dalam labu ukur 10 mL, untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak sebesar 100 mg/L, 200 mg/L, dan 400 mg/L (Armaini et al., 2022).

f. Pengujian Aktivitas Antiinflamasi

Sebanyak 1 mL larutan uji dengan konsentrasi (100, 200 dan 400 mg/L), termasuk kontrol positif dan negatif, dicampurkan dengan 2 mL larutan BSA 0,2% dalam PBS sampai pH 6,2-6,5. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 37 °C selama 30 menit, lalu suhu dinaikkan menjadi 70 °C untuk inkubasi lanjutan selama 5 menit. Setelah inkubasi, sampel segera didinginkan pada suhu ruang, dan kekeruhan larutan diukur pada panjang gelombang 660 nm dan diulang sebanyak tiga kali (*triplo*) (Prasathkumar et al., 2021)

g. Perhitungan Persentase inhibisi

Perhitungan presentase penghambatan denaturasi protein dihitung menggunakan rumus pada **persamaan 3.3** sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol negatif} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol negatif}} \times 100\% \dots (3.3)$$

(Alhawarri et al., 2021).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi Sampel

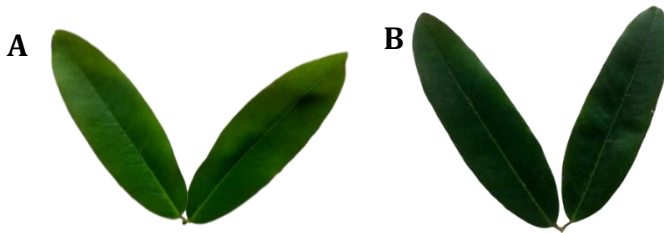
Penelitian ini menggunakan sampel daun Johar (*Cassia siamea Lam*) yang diperoleh dari Desa Tambakroto Pilang, Kecamatan Sayung, Kabupaten Demak. Desa ini dipilih karena ketersediaan tanaman Johar yang tumbuh secara alami di lingkungan tersebut, serta kondisi geografisnya yang terletak di dataran rendah dengan suhu dan intensitas cahaya yang mendukung pertumbuhan tanaman. Suhu tinggi di daerah ini berpotensi menyebabkan tanaman mengalami stres panas, yang menurut Ashraf et al. (2018) dapat menurunkan efisiensi fotosintesis tetapi meningkatkan produksi metabolit sekunder sebagai respons adaptif terhadap stres oksidatif.

Penelitian yang dilakukan oleh Leviana et al. (2023) menunjukkan bahwa daun durian tua memiliki kadar total fenol dan flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun muda. Hasil uji aktivitas antioksidan juga memperlihatkan bahwa daun tua memiliki aktivitas antioksidan yang secara signifikan lebih tinggi daripada daun muda. Berdasarkan temuan

tersebut, penelitian ini difokuskan pada penggunaan daun Johar yang sudah tua, karena diduga mengandung metabolit sekunder dalam jumlah lebih tinggi dibandingkan daun muda, sehingga berpotensi memberikan aktivitas biologis yang lebih kuat.

Langkah awal dalam penelitian ini pemilihan daun Johar yang sudah tua. Ketuaan daun ditentukan secara visual berdasarkan ciri-ciri fisik, daun muda memiliki tekstur yang lebih lembut dan berwarna hijau cerah, sedangkan daun tua memiliki tekstur yang lebih kaku dan berwarna hijau gelap hingga coklat. Daun tua dipilih karena memiliki siklus perkembangan yang lebih panjang daripada daun muda, serta telah terpapar tekanan lingkungan seperti cahaya dalam jangka waktu lebih lama, yang diperkirakan menyebabkan akumulasi flavonoid lebih tinggi pada daun tua dibandingkan daun muda (Xia et al., 2022).





Gambar 4. 1 A. Daun muda B. Daun tua

Setelah daun tua dipilih, langkah selanjutnya adalah proses persiapan sebelum ekstraksi, yang dimulai dengan pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran. Proses ini juga mencegah kotoran kembali menempel pada permukaan daun (BPOM, 2023). Daun kemudian dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan, mempercepat pengeringan, dan memaksimalkan penyerapan panas selama proses pengeringan (Arviani et al., 2023).

Proses pengeringan dilakukan pada suhu ruang selama lima hari untuk mencegah degradasi senyawa bioaktif akibat panas. Pengeringan ini bertujuan agar sampel tidak mudah rusak dan dapat disimpan dalam waktu yang lama (Ariani et al., 2022). Daun johar yang telah dikeringkan kemudian dihaluskan hingga menjadi serbuk. Proses penghalusan ini bertujuan untuk

memperkecil ukuran partikel, karena menurut Asworo & Widwastuti (2023), ukuran partikel yang lebih kecil dapat mempermudah pelarut menembus struktur sel tanaman, sehingga meningkatkan efisiensi hasil ekstraksi. Dari proses ini, diperoleh serbuk daun johar kering sebanyak 250 gram yang siap digunakan dalam tahap ekstraksi.

B. Ekstraksi Serbuk Daun Johar

Proses ekstraksi pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini dipilih karena prosedurnya sederhana, peralatannya mudah, dan tidak memerlukan pemanasan, sehingga senyawa dalam bahan tetap terjaga tanpa mengalami penguraian (Puspitasari & Proyogo, 2017). Maserasi dilakukan secara bertingkat dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol untuk memisahkan metabolit sekunder berdasarkan tingkat polaritasnya, sehingga memungkinkan ekstraksi senyawa bioaktif secara lebih menyeluruh dan optimal.

Pemilihan pelarut n-heksana didasarkan pada nilai kepolaran yang jauh lebih rendah dibandingkan petroleum eter, sehingga penyerapan metabolit sekunder non-polar menjadi lebih efektif. Penggunaan etil asetat dipilih karena lebih baik dibandingkan pelarut seperti

kloroform dan diklorometana (DCM), hal ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa penggunaan kloroform menghasilkan ekstrak yang kurang maksimal (Amirah & Herman, 2015; Shyeed et al., 2023), demikian pula dengan DCM (Mworia et al., 2021). Selain itu, kloroform dan DCM diketahui memiliki efek samping berbahaya, termasuk potensi karsinogenik. Sementara itu, pemilihan metanol dalam penelitian ini didasarkan pada sifatnya yang bersifat universal dan mampu mengekstraksi berbagai jenis metabolit sekunder yang belum larut dalam pelarut sebelumnya (Verdiana et al., 2018). Berdasarkan berbagai studi terdahulu, metanol juga menunjukkan hasil yang lebih baik dibandingkan etanol karena memiliki nilai kepolaran yang lebih tinggi.

Sebanyak 120 gram serbuk daun Johar diekstraksi secara bertahap menggunakan ketiga pelarut berdasarkan tingkat polaritasnya. Pada tahap pertama, serbuk direndam dalam 750 mL n-heksana selama 48 jam. Perendaman ini dilakukan untuk memastikan seluruh permukaan sampel terendam secara merata oleh pelarut, sehingga senyawa non-polar dapat larut secara optimal. Penentuan waktu maserasi selama 48 jam bertujuan untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang digunakan untuk uji antiinflamasi tanpa menyebabkan degradasi

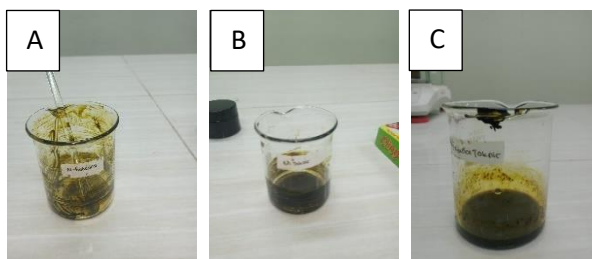
akibat perendaman yang terlalu lama (Wahyuningsih et al., 2024). Campuran kemudian disaring untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C hingga pelarut menguap \pm 2 jam, sedangkan filtrat diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada tekanan rendah dan suhu 40°C serta kecepatan putaran 50 rpm. Proses ini kemudian diulang menggunakan etil asetat dan metanol dengan prosedur serupa hingga diperoleh ekstrak dari masing-masing pelarut.

Setelah proses penguapan menggunakan *vacuum rotary evaporator*, ekstrak yang diperoleh kemudian dikentalkan menggunakan *water bath* pada suhu 40–50°C hingga mencapai konsistensi ekstrak kental. Organoleptik ekstrak kental yang dihasilkan dari masing-masing pelarut dapat dilihat pada **Tabel 4.1**

Tabel 4. 1 Organoleptik masing-masing ekstrak kental daun johar

Organoleptik	Ekstrak	Ekstrak	Ekstrak
Ekstrak	n-heksana	Etil Asetat	Metanol
Warna	Kuning	Kuning	Kuning
	Kehijuan	Kehijuan	Kehijuan
Bentuk	Kental	Kental	Kental
Berat (gr)	3,854	1,896	3,938
Rendemen (%)	3,211	1,58	3,281

ekstrak yang diperoleh dari ketiga pelarut menunjukkan karakteristik organoleptik yang serupa, yaitu berwarna kuning kehijauan dengan konsistensi kental. Namun, berat masing-masing ekstrak dan nilai rendemennya menunjukkan variasi. ekstrak metanol menghasilkan berat tertinggi, yaitu 3,938 gram dengan rendemen 3,281%, diikuti oleh ekstrak n-heksana sebesar 3,854 gram (3,211%), dan ekstrak etil asetat sebesar 1,896 gram (1,58%). Gambar ekstrak kental masing-masing ekstrak dapat dilihat pada **Gambar 4.2**



Gambar 4. 2 A. Ekstrak n-heksana B. Ekstrak Etil asetat C. Ekstrak Metanol

C. Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Johar

Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuji fitokimia untuk mengidentifikasi keberadaan metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas biologinya (Haryanto et al., 2024). Hasil dari uji fitokimia ini disajikan pada **Tabel 4.2**.

Tabel 4. 2 Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun Johar

Metabolit Sekunder	Ekstrak n-heksana	Ekstrak Etil Asetat	Ekstrak Metanol
Alkaloid			
• Wegner	+	+	+
• Dregendorff	+	+	+
Flavonoid			
• Alkali	-	-	+
• Pb Asetat	-	-	+
Saponin	-	-	+
Tannin	-	+	+
Steroid	+	+	+
Terpenoid	+	-	-

Keterangan:

(+) mengandung metabolit sekunder

(-) Tidak mengandung metabolit sekunder

Uji fitokimia menunjukkan bahwa alkaloid dan steroid terdeteksi di semua ekstrak, dengan hasil positif pada uji alkaloid berdasarkan reaksi warna pada pereaksi Wagner dan Dragendorff. Sementara itu, senyawa flavonoid, saponin, dan tanin hanya teridentifikasi dalam ekstrak metanol, yang mengindikasikan bahwa senyawa-senyawa tersebut bersifat lebih polar. Temuan ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Fitriah et al. (2017) namun terdapat dua perbedaan, yaitu terdeteksinya alkaloid dalam ekstrak n-heksana dan steroid dalam

ekstrak metanol pada penelitian ini, yang tidak dijumpai dalam studi sebelumnya.

Sebelum dilakukan uji kromatografi lapis tipis (KLT) utama, terlebih dahulu dilakukan serangkaian percobaan awal untuk menentukan eluen yang paling sesuai dalam memisahkan senyawa-senyawa dari masing-masing ekstrak secara optimal. Beberapa sistem eluen yang diuji meliputi campuran pelarut kloroform:etil asetat (7:3), kloroform:metanol (9:1), n-heksana:etil asetat:metanol (7:2:1), dan n-heksana:etil asetat (8:2). Namun, sistem eluen tersebut menunjukkan hasil yang kurang memuaskan, ditandai dengan terbentuknya bercak yang terlalu rapat, hanya membentuk satu noda, atau bahkan membentuk garis lurus tanpa pemisahan yang jelas. Beberapa eluen bahkan tidak menghasilkan pola bercak yang dapat diamati secara visual, sehingga tidak dapat digunakan untuk analisis lebih lanjut. Gambar dari uji KLT dengan eluen yang tidak berhasil ini ditampilkan dalam **Lampiran 6** sebagai bagian dari pertimbangan dalam proses pemilihan eluen.

Setelah serangkaian uji dilakukan, diperoleh kombinasi eluen n-heksana:etil asetat dengan perbandingan 7:3 dan volume total 20 mL sebagai

sistem pelarut yang paling optimal karena mampu menghasilkan pola pemisahan bercak yang jelas dan terdistribusi dengan baik. Fase diam yang digunakan berupa silika gel 60, sedangkan fase gerak berupa campuran n-heksana dan etil asetat. Fase gerak yang bersifat nonpolar akan menahan senyawa polar pada fase diam (silika gel) yang juga bersifat polar, sementara senyawa yang kurang polar akan lebih mudah terbawa oleh fase gerak dan naik ke atas lempeng kromatografi (Husna et al., 2020). Hasil nilai R_f dari uji KLT ini disajikan pada **Tabel 4.3**

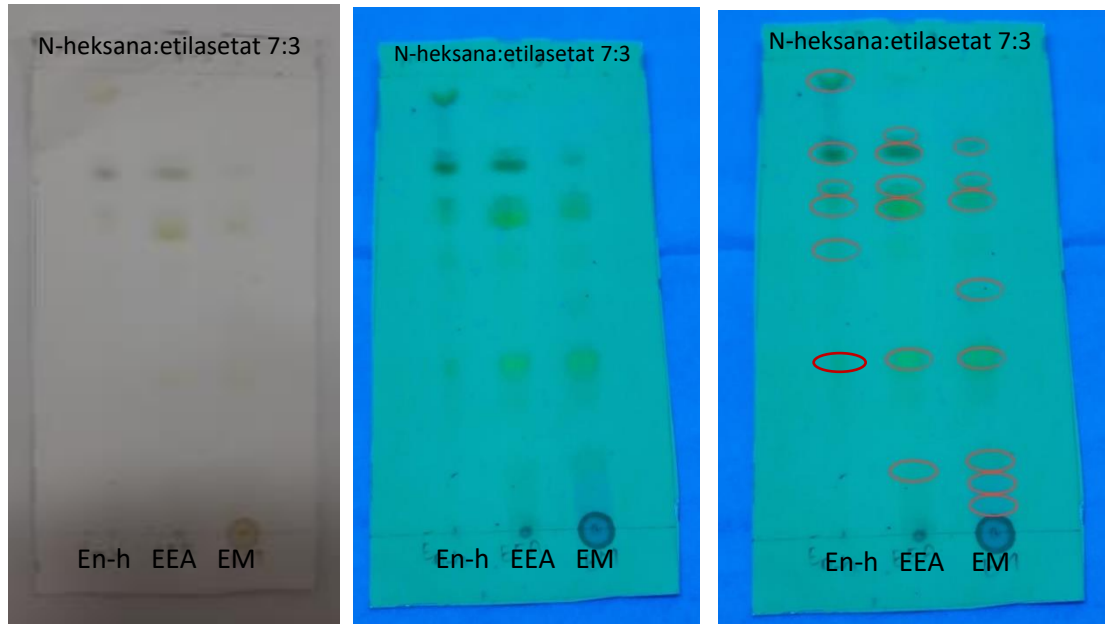
Tabel 4. 3 Hasil uji KLT dan nilai R_f dari masing-masing ekstrak

Ekstrak	Jumlah noda	Nilai R_f
n-heksana	6	0,373; 0,6; 0,693; 0,72; 0,8; 0,973.
Etil asetat	6	0,146; 0,373; 0,666; 0,72; 0,8; 0,84
Metanol	8	0,066; 0,106; 0,16; 0,373; 0,48; 0,666; 0,72; 0,826.

Hasil uji KLT menunjukkan perbedaan jumlah noda dan nilai R_f pada setiap ekstrak, sebagaimana disajikan dalam **Tabel 4.3**. Ekstrak n-heksana menghasilkan lima noda dengan nilai R_f antara 0,373 hingga 0,973, sedangkan ekstrak etil asetat menunjukkan enam noda dengan jarak R_f antara 0,146 hingga 0,84. Sementara itu, ekstrak metanol memiliki

jumlah noda terbanyak, yaitu delapan noda, dengan nilai R_f berkisar dari 0,066 hingga 0,826. Perbedaan ini mencerminkan variasi kandungan senyawa dalam masing-masing ekstrak serta tingkat polaritasnya.

Secara umum, dalam KLT, senyawa yang lebih mirip dengan fase gerak akan bergerak lebih jauh karena mengikuti prinsip kelarutan "*Like Dissolves Like*" (S. Kumar et al., 2013). Senyawa yang lebih larut dalam fase gerak akan terdorong lebih tinggi pada pelat KLT, sedangkan senyawa yang memiliki afinitas lebih besar terhadap fase diam akan tertahan di bagian bawah. Hal ini terlihat dari hasil KLT, di mana ekstrak n-heksana menunjukkan noda pada bagian atas pelat yang diduga merupakan senyawa nonpolar. Sementara itu, ekstrak etil asetat dan metanol juga membentuk noda, tetapi tidak mencapai bagian atas dan justru tertahan di bagian bawah pelat yang diduga merupakan senyawa polar. persebaran noda pada masing-masing ekstrak tersebut mengindikasikan bahwa proses ekstraksi telah berhasil memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya. Gambar hasil KLT disajikan pada **Gambar 4.3**, yang menunjukkan pola pergerakan dan distribusi senyawa dari masing-masing ekstrak pada pelat KLT.



Gambar 4. 3 Hasil uji KLT sebelum dan sesudah terkena sinar UV 254 nm

D. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Daun Johar Secara *In-vitro*

Inflamasi merupakan respons biologis tubuh terhadap cedera, infeksi, atau paparan zat asing yang dapat mengganggu fungsi fisiologis. Jika tidak terkontrol, peningkatan mediator inflamasi dapat merusak jaringan tubuh (Subowo, 2013). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antiinflamasi dari berbagai ekstrak daun johar sebagai alternatif pengobatan alami. Salah satu metode yang digunakan adalah uji denaturasi protein, yang menilai kemampuan ekstrak dalam menghambat kerusakan struktur protein akibat pemanasan (Abidin et al., 2019). Penghambatan denaturasi protein ini diukur melalui perseninhibisi (%I), yang kemudian digunakan untuk menentukan nilai IC_{50} . Semakin tinggi nilai persen inhibisi (>20%) dan semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin efektif suatu ekstrak dalam menghambat denaturasi protein bovine serum albumin (BSA), karena mampu bekerja pada konsentrasi yang relatif (Nirmala et al., 2023).

Dalam penelitian ini, berbagai ekstrak diuji pada konsentrasi yang berbeda untuk menilai efektivitas antiinflamasi terhadap denaturasi protein. Pengujian ini

dilakukan dengan membandingkan hasil %inhibisi ekstrak dengan kontrol positif berupa natrium diklofenak, yang merupakan senyawa sintesis antiinflamasi, dan kontrol negatif tanpa perlakuan untuk memastikan bahwa perubahan yang diamati benar-benar disebabkan oleh perlakuan yang diberikan. Persentase inhibisi (%Inhibisi) dari masing-masing sampel dianalisis untuk menentukan sejauh mana ekstrak dapat menghambat denaturasi protein, dengan nilai yang lebih tinggi menunjukkan potensi antiinflamasi yang lebih kuat.

Kontrol positif dan ekstrak kental dari masing-masing daun johar terlebih dahulu dibuat menjadi larutan induk dengan konsentrasi 1000 ppm. Larutan ini dibuat dengan cara menimbang 0,1 gr dari masing-masing ekstrak dan melarutkannya ke dalam pelarut organik yang sesuai dengan jenis fraksinya. Selanjutnya, larutan induk tersebut diencerkan menjadi tiga konsentrasi uji, yaitu 100, 200, dan 400 ppm, untuk mengetahui hubungan antara tingkat konsentrasi dan efektivitasnya dalam menghambat denaturasi protein.

Konsentrasi 100, 200, dan 400 ppm dipilih dalam penelitian ini berdasarkan beberapa pertimbangan metodologis dan acuan literatur. Rentang

konsentrasi tersebut merujuk pada penelitian sebelumnya yang menggunakan metode denaturasi protein, seperti pada studi Mehta et al. (2017), Ntandou et al. (2010) dan (Alhawarri et al., 2021), di mana ekstrak tanaman diuji dalam kisaran 100–400 ppm untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*. Penggunaan konsentrasi bertingkat dua kali lipat (100, 200, dan 400 ppm) juga dimaksudkan untuk mengamati pola dosis-responsif, yaitu hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya efek inhibisi protein yang terjadi. Dari sisi efektivitas, konsentrasi di bawah 100 ppm cenderung menghasilkan persentase inhibisi yang sangat rendah dan sulit mencapai ambang efektivitas yang dapat dianalisis secara statistik. Oleh karena itu, rentang 100–400 ppm dianggap optimal, karena cukup sensitif untuk menghasilkan efek inhibisi yang terukur.

Prosedur pengujian dilakukan dengan mencampurkan larutan uji pada masing-masing konsentrasi dengan larutan BSA (*Bovine Serum Albumin*) (0,2%) dan larutan PBS buffer pH 6,4. Bovine Serum Albumin (BSA) dipilih sebagai model protein dalam penelitian ini karena merupakan salah satu protein yang paling banyak digunakan dalam studi

biokimia dan medis. Hal ini disebabkan oleh ketersediaannya yang luas, kestabilannya secara kimia, serta kemiripannya yang tinggi dengan Human Serum Albumin (HSA). BSA memiliki identitas sekuens asam amino sebesar 72–82% dan kesamaan struktural sebesar 83–88% terhadap HSA (Chruszcz et al., 2013). Fungsi larutan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dalam campuran ini adalah untuk membantu melarutkan serbuk BSA serta mempertahankan pH larutan tetap stabil dalam rentang pH fisiologis selama proses perlakuan berlangsung (Nirmala et al., 2023). Campuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit, Suhu ini dipilih karena mencerminkan suhu fisiologis tubuh manusia saat inflamasi dan dinilai dapat menjaga aktivitas protein BSA tetap optimal sebelum perlakuan denaturasi dilakukan (Hidayah, 2023). Setelah inkubasi awal, larutan dipanaskan pada suhu 70°C selama 5 menit, yang bertujuan untuk memicu proses denaturasi protein. Berdasarkan teori, pada suhu ini BSA akan mulai membentuk agregat primer dan sekunder sebagai ciri awal denaturasi (Borzova et al., 2016). Kemudian larutan didinginkan untuk memberikan waktu pemisahan antara protein yang terdenaturasi dan tidak terdenaturasi sebelum dibaca di spektrofotometer UV-

Vis pada panjang gelombang 660 nm (Nirmala et al., 2023). Kekeruhan larutan yang lebih rendah menunjukkan bahwa ekstrak tumbuhan memiliki aktivitas antiinflamasi yang lebih kuat.

Hasil lengkap dari pengujian ini disajikan pada

Tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Hasil aktivitas antiinflamasi kontrol (+), ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol daun johar

	Konsentrasi (ppm)	%I ± SD
Kontrol (-)	-	0
Kontrol (+)	100	91,451 ± 0,298
	200	95,966 ± 0,309
	400	96,450 ± 0,305
En-h	100	4,670 ± 1,527
	200	36,932 ± 0,738
	400	74,534 ± 0,190
EEA	100	46,453 ± 0,494
	200	80,161 ± 0,147
	400	90,806 ± 0,068
EM	100	73,226 ± 0,183
	200	78,869 ± 0,410
	400	92,416 ± 0,614

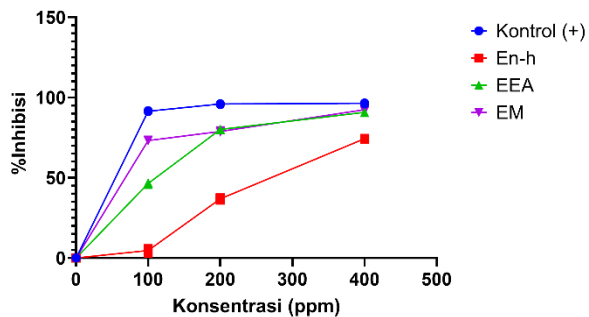
Keterangan

En-h : Ekstrak n-heksana

EEA : Ekstrak etil asetat

EM : Ekstrak metanol

Grafik perbandingan %inhibisi antara ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol, dan kontrol positif dapat dilihat pada **Gambar 4.4**. Grafik ini menggambarkan persentase inhibisi masing-masing sampel pada berbagai konsentrasi, yang digunakan untuk menilai efektivitas ekstrak dalam menghambat denaturasi protein.



Gambar 4. 4 Grafik %inhibisi masing-masing ekstrak

Kontrol negatif (tanpa perlakuan) menunjukkan persentase inhibisi sebesar 0%, yang mengindikasikan bahwa tanpa sampel uji, tidak terjadi efek antiinflamasi. Sebaliknya, kontrol positif pada konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 400 ppm menunjukkan persentase inhibisi yang sangat tinggi, yaitu masing-masing sebesar 91,451%, 95,966%, dan 96,450%. Hasil ini menunjukkan bahwa kontrol positif memiliki efek yang

sangat kuat dalam menghambat denaturasi protein, yang menjadi indikator aktivitas antiinflamasi.

Salah satu senyawa yang sering digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dalam pengujian efek antiinflamasi adalah natrium diklofenak. Obat ini termasuk dalam golongan antiinflamasi nonsteroid (NSAID), yaitu obat yang digunakan untuk meredakan peradangan dan nyeri. Natrium diklofenak dipilih sebagai kontrol positif karena memiliki aktivitas antiinflamasi yang tinggi dan struktur kimia yang mendukung interaksi kuat dengan protein target. Berdasarkan studi Kozłowska et al. (2017), diklofenak memiliki dua cincin aromatik yang tidak sejajar dan ikatan hidrogen intramolekul yang membuatnya lebih stabil serta mampu meniru substrat alami COX-2, menghasilkan efek inhibisi yang lebih efektif terhadap antiinflamasi. Jika dibandingkan senyawa sintetik lain seperti ibuprofen, aspirin, dan ketorolac, diklofenak lebih unggul dalam hal efektivitas, kestabilan. Selain itu, senyawa ini telah banyak digunakan dalam literatur sebagai pembanding standar pada uji inhibisi denaturasi protein BSA.

Mekanisme kerja natrium diklofenak melibatkan interaksi dengan protein melalui interaksi

hidrofobik, ikatan van der Waals, dan ikatan hidrogen antara gugus hidroksilnya dengan gugus karboksilat atau amina pada protein. Interaksi ini membantu menstabilkan struktur protein dan mencegah terjadinya denaturasi (Bou-Abdallah et al., 2016).

Dalam penelitian ini, tiga jenis ekstrak diuji untuk menilai aktivitas antiinflamasi, yaitu ekstrak n-heksana (En-h), ekstrak etil asetat (EEA), dan ekstrak metanol (EM). Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana memiliki efek antiinflamasi yang relatif rendah dibandingkan dengan kontrol positif. Pada konsentrasi 100 ppm, ekstrak ini hanya mampu menghambat denaturasi protein sebesar 4.670%, menunjukkan aktivitas yang sangat lemah. Namun seiring dengan peningkatan konsentrasi, aktivitas penghambatannya meningkat secara signifikan. Pada konsentrasi 200 ppm, persentase inhibisi mencapai 36.932%, dan pada 400 ppm meningkat lebih jauh hingga 74.534%.

Ekstrak etil asetat (EEA) menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak n-heksana. Pada konsentrasi 100 ppm, inhibisi yang dicapai sebesar 46.453%, jauh lebih tinggi dibandingkan En-h pada konsentrasi yang sama.

Aktivitas inhibisi ini terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi, dengan persentase inhibisi sebesar 80.161% pada 200 ppm dan hampir menyamai kontrol positif pada 400 ppm dengan nilai inhibisi mencapai 90.806%. Ekstrak etil asetat menunjukkan %inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksana, hal ini menunjukkan potensinya yang lebih besar dalam menghambat denaturasi protein dan efektivitas yang lebih tinggi sebagai agen antiinflamasi.

Di antara ketiga ekstrak yang diuji, ekstrak metanol menunjukkan aktivitas antiinflamasi tertinggi. Pada konsentrasi 100 ppm, ekstrak ini menghasilkan persentase inhibisi sebesar 73,226%, yang secara signifikan lebih tinggi dibandingkan ekstrak n-heksana (En-h) dan etil asetat (EEA) pada konsentrasi yang sama. Nilai ini terus meningkat menjadi 78,869% pada 200 ppm, dan mencapai 92,416% pada 400 ppm, mendekati nilai inhibisi yang diperoleh pada kontrol positif.

Karena seluruh nilai % inhibisi ekstrak metanol dan kontrol positif berada jauh di atas 50%, maka penentuan nilai IC_{50} tidak dapat dilakukan secara valid. Oleh karena itu, nilai IC_{50} tidak dilaporkan pada penelitian ini. Sebagai gantinya, %inhibisi digunakan

sebagai indikator efektivitas antiinflamasi, semakin tinggi nilai %inhibisi, maka semakin kuat potensi aktivitas antiinflamasi ekstrak (Amalia et al., 2024).

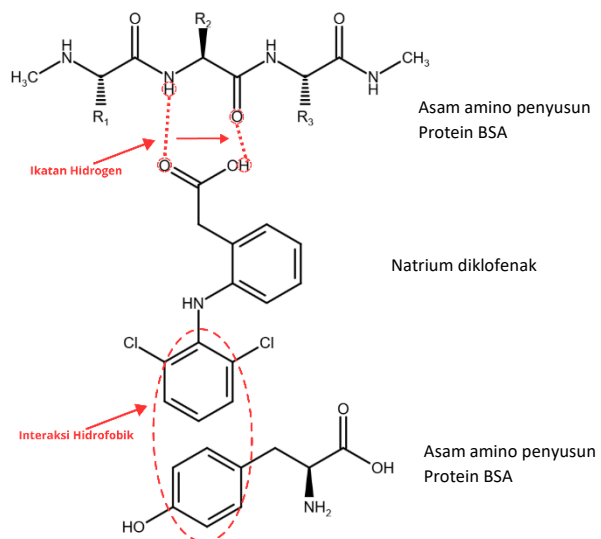
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol dari sampel yang diuji memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan ekstrak etil asetat dan n-heksana. Potensi aktivitas ini diduga kuat berkaitan dengan kandungan senyawa bioaktif yang lebih tinggi dalam ekstrak metanol, khususnya saponin dan flavonoid yang hanya terdeteksi pada ekstrak tersebut. Saponin merupakan senyawa glikosida yang tersusun atas bagian aglikon berupa triterpenoid atau steroidal yang terikat dengan satu atau lebih rantai gula (Garg et al., 2023). Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak metanol menunjukkan hasil positif pada uji saponin dan steroid, namun negatif pada uji terpenoid. Hal ini mengindikasikan bahwa saponin yang terkandung dalam ekstrak metanol kemungkinan berasal dari golongan saponin steroidal.

E. Interaksi Molekuler Natrium Diklofenak dan Senyawa Aktif Daun Johar Terhadap Protein BSA (*bovine serum albumin*)

Denaturasi protein merupakan proses kerusakan struktur tiga dimensi protein akibat pemanasan (Abidin et al., 2019). Proses ini menyebabkan terganggunya interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan ikatan disulfida dalam struktur protein, sehingga menurunkan aktivitas enzimatik dan fungsi biologis protein yang pada akhirnya dapat memicu terbentuknya autoantigen penyebab inflamasi. Dalam penelitian ini, denaturasi diinduksi oleh kenaikan suhu yang meningkatkan energi kinetik molekul protein, yang menyebabkan gangguan pada ikatan hidrogen serta interaksi hidrofobik (Tukiran et al., 2023).

Pada penelitian ini senyawa yang digunakan sebagai pembanding (kontrol positif) dalam pengujian efek antiinflamasi adalah natrium diklofenak. Senyawa ini termasuk dalam golongan antiinflamasi nonsteroid, yaitu senyawa sintesis yang digunakan untuk meredakan peradangan dan nyeri. Mekanisme kerja natrium diklofenak melibatkan interaksi dengan protein melalui interaksi hidrofobik, ikatan van der Waals, dan ikatan hidrogen antara gugus hidroksilnya dengan

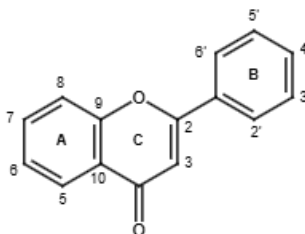
gugus karboksilat atau amina pada protein. Interaksi ini membantu menstabilkan struktur protein dan mencegah terjadinya denaturasi (Bou-Abdallah et al., 2016). Usulan interaksi molekuler antara natrium diklofenak dengan asam amino penyusun protein BSA (*bovine serum albumin*) dapat dilihat pada **Gambar 4.5**.



Gambar 4. 5 Usulan interaksi molekuler antara natrium diklofenak dengan asam amino penyusun protein BSA

Berdasarkan hasil penelitian yang ditampilkan pada **Tabel 4.4**, fraksi metanol dari daun johan menunjukkan potensi sebagai agen antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan fraksi etil asetat dan n-heksana. Potensi aktivitas ini diduga kuat berkaitan dengan

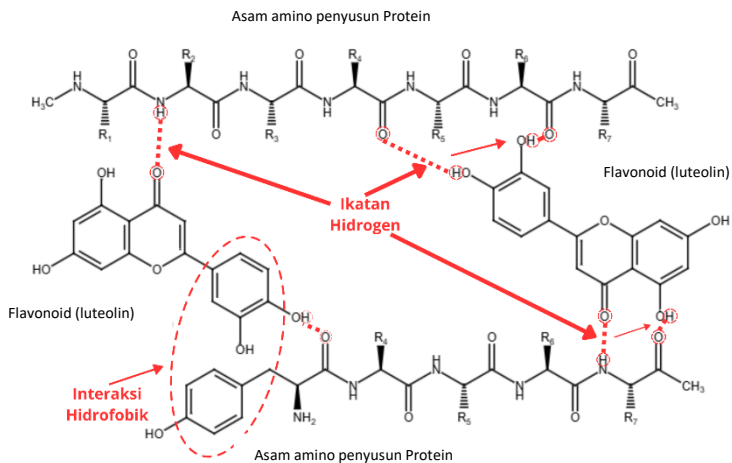
kandungan senyawa bioaktif yang lebih tinggi hanya dalam ekstrak metanol, yaitu berupa flavonoid dan saponin. Kerangka struktur umum flavonoid dapat dilihat pada **Gambar 4.6**.



Gambar 4. 6 struktur kerangka flavonoid

Struktur flavonoid sangat berperan dalam menentukan aktivitas biologisnya. Umumnya, flavonoid mengalami substitusi gugus hidroksil dan metoksil pada posisi tertentu pada cincin A dan B, di mana pola substitusi tersebut diketahui mempengaruhi afinitas flavonoid terhadap protein BSA (Heim et al., 2002). Penelitian oleh Tang et al. (2020) menunjukkan bahwa keberadaan gugus hidroksil pada posisi C3, C6, C4', dan C5' dapat memperkuat ikatan hidrogen antara flavonoid dengan protein, sedangkan substitusi pada posisi C3' dapat melemahkan afinitas ikatannya. Hal ini mengindikasikan bahwa interaksi flavonoid dengan BSA sangat dipengaruhi oleh gugus hidroksil. gugus hidroksil berperan sebagai donor ikatan hidrogen dan

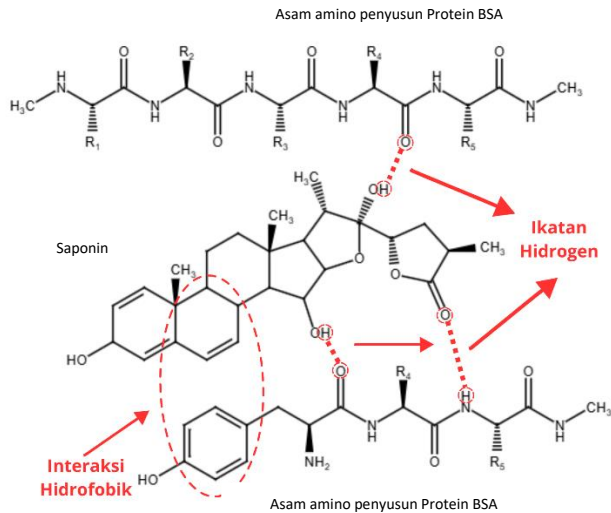
menentukan konformasi pengikatan terhadap protein. Interaksi antara flavonoid dan protein BSA melibatkan interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, dan gaya van der Waals (Ma et al., 2017). Usulan interaksi molekuler tersebut antara flavonoid dengan asam amino penyusun protein BSA dapat dilihat pada **Gambar 4.7**.



Gambar 4. 7 Usulan interaksi molekuler tersebut antara flavonoid dengan asam amino penyusun protein BSA

Selain flavonoid, saponin juga diduga sebagai senyawa aktif yang terdapat pada fraksi metanol. Interaksi antara protein dan saponin dapat terjadi melalui ikatan hidrogen, gaya hidrofobik, dan elektrostatik. Saponin dapat meningkatkan stabilitas protein dengan memperkuat struktur protein melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik, sehingga

dapat menunda atau menghambat proses denaturasi akibat pemanasan (Kaspchak et al., 2020). Usulan interaksi molekuler antara saponin dengan asam amino penyusun protein BSA (*bovine serum albumin*) dapat dilihat pada **Gambar 4.8**.



Gambar 4. 8 Usulan interaksi molekuler antara saponin dengan asam amino penyusun protein BSA

F. Rasionalitas Penggunaan Natrium Diklofenak Sebagai Kontrol Positif dan Kaitannya Dengan Struktur Bioaktif Dalam Daun Johar

Natrium diklofenak memiliki dua cincin aromatik yang tidak berada dalam bidang sejajar serta gugus $-COOH$ yang memungkinkan terjadinya pembentukan ikatan hidrogen (Kozłowska et al., 2017). Konformasi non-sejajar antara kedua cincin aromatik tersebut meningkatkan fleksibilitas molekul dan memungkinkan interaksi yang lebih luas dengan sisi aktif protein. Interaksi ini membantu menstabilkan struktur protein dan mencegah terjadinya denaturasi (Bou-Abdallah et al., 2016). Struktur dan interaksi dari natrium diklofenak dengan asam amino penyusun protein BSA dapat dilihat pada **Gambar 4.5**

Hal serupa juga ditemukan pada struktur flavonoid, seperti luteolin, yang memiliki kerangka dasar flavon dengan dua cincin aromatik (cincin A dan B) serta gugus hidroksil pada posisi tertentu, seperti C3' dan C4' pada cincin B, yang mampu membentuk ikatan hidrogen dengan residu asam amino pada protein target. Struktur kerangka flavonoid dapat dilihat pada **Gambar 4.6**. Flavonoid juga memiliki kemampuan berinteraksi secara hidrofobik dengan sisi nonpolar

protein, dan membentuk ikatan hidrogen, yang dapat menghambat proses denaturasi protein (Ma et al., 2017). Interaksi dari flavonoid dengan asam amino penyusun protein BSA dapat dilihat pada **Gambar 4.7**

Dengan adanya kemiripan dalam fungsi gugus fungsional, jenis interaksi molekuler terhadap protein, serta kemampuan dalam menstabilkan struktur protein dan mencegah denaturasi, maka natrium diklofenak dinilai tepat sebagai pembanding dalam mengevaluasi efektivitas senyawa flavonoid dan senyawa aktif lainnya pada ekstrak daun Johar. Kesamaan ini menjadi dasar kuat pemilihan natrium diklofenak sebagai kontrol positif dalam uji aktivitas antiinflamasi secara in vitro berbasis inhibisi denaturasi protein BSA.

Namun demikian, kemiripan struktur ini tidak hanya terbatas pada flavonoid. Senyawa lain seperti tanin, saponin, alkaloid, dan steroid yang juga terdapat dalam daun Johar memiliki potensi membentuk interaksi molekuler serupa dengan protein target. Flavonoid dalam hal ini diambil sebagai contoh representatif karena telah banyak diteliti dan memiliki struktur aromatik yang khas dan relevan untuk dianalisis secara komparatif dengan natrium diklofenak.

Berdasarkan hasil penelitian, metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan metanol berhasil memisahkan senyawa metabolit sekunder daun Johar (*Cassia siamea Lam*) sesuai tingkat polaritasnya. Ekstrak metanol diketahui mengandung senyawa bioaktif terbanyak, seperti flavonoid, saponin, alkaloid, tannin, dan steroid, yang diperkuat dengan hasil KLT menunjukkan jumlah dan variasi noda terbanyak. Uji aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak metanol menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi, dengan persentase inhibisi mencapai 92,416% pada konsentrasi 400 ppm. Aktivitas tersebut diikuti oleh ekstrak etil asetat dengan nilai %inhibisi pada konsentrasi 400 ppm sebesar 90,806% dan ekstrak n-heksana sebesar 74,534%. Dalam penelitian ini, karena masih menggunakan ekstrak kasar, belum dapat dipastikan bahwa efek antiinflamasi berasal dari satu atau dua senyawa tertentu. Efek yang diamati kemungkinan besar merupakan hasil sinergis dari beberapa senyawa, seperti flavonoid, saponin, alkaloid, steroid dan tanin, yang saling berkontribusi dalam menstabilkan struktur protein dan menghambat proses denaturasi.

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

1. Ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol dari daun johar (*Cassia siamea Lam*) terbukti memiliki aktivitas antiinflamasi, yang ditunjukkan melalui kemampuannya dalam menghambat denaturasi protein pada uji *in vitro*. Di antara ketiganya, ekstrak metanol menunjukkan aktivitas paling tinggi dibandingkan ekstrak lainnya.
2. Persentase inhibisi tertinggi diperoleh pada ekstrak metanol dengan nilai $92,416 \pm 0,614\%$ pada konsentrasi 400 ppm, yang mendekati inhibisi yang ditunjukkan oleh kontrol positif (natrium diklofenak) sebesar $96,450 \pm 0,305\%$ pada konsentrasi yang sama. Diikuti oleh ekstrak etil asetat dengan nilai $90,806 \pm 0,068\%$, dan ekstrak n-heksana sebesar $74,534 \pm 0,190\%$ pada konsentrasi 400 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas penghambatan denaturasi protein paling tinggi di antara ketiga ekstrak yang diuji.

B. Saran

Penelitian selanjutnya disarankan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa aktif dalam fraksi metanol daun Johar (*Cassia siamea Lam*), khususnya saponin dan flavonoid, agar diketahui senyawa mana yang paling berperan dalam aktivitas antiinflamasi. Selain itu, uji lanjutan secara *in vivo* pada hewan percobaan dapat dilakukan untuk memperkuat hasil uji *in vitro* yang telah diperoleh. Penelitian juga perlu mencakup uji keamanan, seperti uji toksisitas, guna memastikan ekstrak metanol aman digunakan. Dengan begitu, ekstrak metanol berpotensi dikembangkan lebih lanjut sebagai bahan dasar obat herbal antiinflamasi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z., Putri, U. A., & Widiastuti, H. (2019). Potensi Anti-inflamasi Fraksi Etil Asetat Ranting Patah Tulang (*Euphorbia tirucalli* L.) dengan Uji Penghambatan Denaturasi Protein. *J.Pharm.Sci*, 2(2), 49–54.
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10.
- Adiansyah, E. E. P. S., Ariyani, H., & Hendera. (2021). Studi Liteeratur Efek Penggunaan Non-Steroida Anti Inflammatory Drugs (NSAID) Pada Sistem Gastrointestinal. *Journal Of Current Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 2598–2095.
- Alhawarri, M. B., Dianita, R., Razak, K. N. A., Mohamad, S., Nogawa, T., & Wahab, H. A. (2021). Antioxidant, anti-inflammatory, and inhibition of acetylcholinesterase potentials of cassia timoriensis dc. Flowers. *Molecules*, 26(9), 1–14.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants*, 6(4), 1–23.
- Amalia, A., Rahman, R., Maryam, S., & Razak, R. (2024). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica* Val.) Secara In Vitro. *Makassar Pharmaceutical Science Journal*, 2(2), 2024–2336.
- Amirah, S., & Herman, H. (2015). Uji Efek Antiinflamasi Fraksi Kloroform Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) Dengan Metode Rat Hind Paw Edema. *As-Syifaa*, 07(02), 182–189.

- Ariani, N., Musiam, S., Niah, R., Rizki Febrianti Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan ISFI Banjarmasin, D., & Selatan, K. (2022). Pengaruh Metode Pengeringan Terhadap Kadar Flavonoid Ekstrak Etanolik Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Pharmascience*, 9(1), 40–47.
- Armaini, Syafrizayanti, & Aulia, Z. (2022). Penentuan Kadar Astaxanthin, Uji Antiinflamasi Dan Sitotoksik Terhadap Sel Kanker Payudara Ekstrak Aseton Spirulina Platensis. *Jurnal Kimia Unand*, 11(1), 25–32.
- Arviani, Larasati, D., Melati, A. R. R. L. V., Anasthasia, P., Monik, K. S. K., Salsabiela, D. S., Rita, I. D. C., & Lyna, L. I. (2023). *Farmakognosi Menelusuri Rahasia Obat dari Alam* (M. J. F. Sirait, Ed.; 1st ed.). Yayasan Kita Menulis.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018). Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants. In *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress* (pp. 153–167). Elsevier.
- Asworo, R. Y., & Widwiastuti, H. (2023). Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia dan Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*, 3(2), 256–263.
- Ayele, T. M., Abebe, E. C., Muche, Z. T., Agidew, M. M., Yimer, Y. S., Addis, G. T., Baye, N. D., Kassie, A. B., Alemu, M. A., Yiblet, T. G., Tiruneh, G. A., Dagnew, S. B., Moges, T. A., Tadesse, T. Y., & Zelalem, A. E. (2023). In vivo antidiarrheal activity of the crude extract and solvent fractions of *Rhamnus prinoides* (Rhamnaceae) leaves. *Heliyon*, 9(6), 1–13.

- Azalia, D., Rachmawati, I., Zahira, S., Andriyani, F., Melia, S. T., Supriyatin, & Rahmi, A. N. (2023). Uji Kualitatif Senyawa Aktif Flavonoid dan Terpenoid Pada Beberapa Jenis Tumbuhan Fabaceae dan Apocynaceae di Kawasan TNGPP Bodogol. *BIOMA : Jurnal Biologi Makasar*, 8(1), 32–43.
- Azizah, Z., Elvis, F., Misfadhila, S., Chandra, B., & Desni Yetti, R. (2020). Penetapan Kadar Flavonoid Rutin pada Daun Ubi Kayu (*Manihot Esculenta* Crantz) Secara Spektrofotometri Sinar Tampak. *Jurnal Farmasi Higea*, 12(1), 90–98.
- Borzova, V. A., Markossian, K. A., Chebotareva, N. A., Kleymentov, S. Y., Poliansky, N. B., Muranov, K. O., Stein-Margolina, V. A., Shubin, V. V., Markov, D. I., & Kurganov, B. I. (2016). Kinetics of thermal denaturation and aggregation of bovine serum albumin. *PLoS ONE*, 11(4), 1–29.
- Bou-Abdallah, F., Sprague, S. E., Smith, B. M., & Giffune, T. R. (2016). Binding thermodynamics of Diclofenac and Naproxen with human and bovine serum albumins: A calorimetric and spectroscopic study. *Journal of Chemical Thermodynamics*, 103, 299–309.
- BPOM. (2023). *Pedoman Penyiapan Bahan Baku Obat Bahan Alam Berbasis Ekstrak/ Fraksi* (Vol. 1). BPOM.
- Chruszcz, M., Mikolajczak, K., Mank, N., Majorek, K. A., Porebski, P. J., & Minor, W. (2013). Serum albumins - Unusual allergens. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(12), 5375–5381.
- Deguchi, J., Hirahara, T., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Shiota, O., Shiro, M., & Morita, H. (2012). New Tricyclic Alkaloids, Cassiarins G, H, J, and K from Leaves of *Cassia siamea*. *Chem. Pharm. Bull.*, 60(2), 219–222.

- Deguchi, J., Hirahara, T., Oshimi, S., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Shiota, O., Honda, T., & Morita, H. (2011). Total synthesis of a novel tetracyclic alkaloid, cassiarin F from the flowers of *Cassia siamea*. *Organic Letters*, 13(16), 4344–4347.
- Dwiyani, R. (2013). *Mengenal Tanaman Pelindung Di Sekitar Kita*. Denpasar : Udayana University Press.
- Fayez, N., Khalil, W., Abdel-Sattar, E., & Abdel-Fattah, A. F. M. (2023). In vitro and in vivo assessment of the anti-inflammatory activity of olive leaf extract in rats. *Inflammopharmacology*, 31(3), 1529–1538.
- Fitriah, Mappiratu, & Prismawiryanti. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) Dari Beberapa Tingkat Kepolaran Pelarut. *KOVALEN*, 3(3), 242–251.
- Fitriyah, I., Saputri, R. D., Tjahjandarie, T. S., & Tanjung, M. (2021). Aktivitas Antikanker Senyawa Turunan Kumarin Dari *Melicope latifolia*. *Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 15(1), 1–7.
- Fransina, E. G., Tanasale, M. F. J. D. P., Latupeirissa, J., Malle, D., & Tahapary, R. (2019). Phytochemical screening of water extract of gayam (*Inocarpus edulis*) Bark and its amylase inhibitor activity assay. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509(1), 1–7.
- Garg, P., Awasthi, S., Horne, D., Salgia, R., & Singhal, S. S. (2023). The innate effects of plant secondary metabolites in preclusion of gynecologic cancers: Inflammatory response and therapeutic action. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1878(4), 1–14.

- Hanifah, N., Heriyanto, Y., Anggrawati, H., & Fatikhah, N. (2021). Description of Understanding About Sterilization of Dental Equipment in Level II Students Majoring in Dental Nursing. *Jurnal Kesehatan Siliwangi*, 2(1), 362–368.
- Hao, D. cheng, & Xiao, P. gen. (2020). Pharmaceutical resource discovery from traditional medicinal plants: Pharmacophylogeny and pharmacophylogenomics. *Chinese Herbal Medicines*, 12(2), 104–117.
- Haryanto, Ariawan, M. W., Utami, Y. P., Duppa, M. T., Ghosay, M. R., Paerah, I. A. P., Husain, F., Junita, N., Salman, Puspitasari, A., Halimatushadyah, E., Rahmadani, & Subehan. (2024). *Fitokimia dan Farmakognisi* (A. Jabbar & Wahyuni, Eds.). Eureka Meda Aksara.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Nutritional Biochemistry*, 13(1), 572–584.
- Hidayah, N. (2023). *Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Bambu Tali (Gigantochloa Apus) Secara In Vitro* [Skripsi]. UIN Walisongo Semarang.
- Hidayat, S., & Rodame, M. N. (2015). *Kitab Tumbuhan Obat* (F. A. Nurrohmah, Ed.). Jakarta : AgriFlo.
- Hu, Q.-F., Zhou, B., Gao, X.-M., Yang, L.-Y., Shu, L.-D., Shen, Y., Li, G.-P., Che, C.-T., & Yang, G.-Y. (2012). Antiviral Chromones from the Stem of *Cassia siamea*. *Journal of Natural Products*, 75(11), 1909–1914.
- Husna, F., Soraya, & Ratnawulan, M. (2020). Identifikasi Bahan Kimia Obat Dalam Obat Tradisional Stamina Pria Dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Farmaka*, 18(2), 16–25.

- Ingkaninan, K., Ijzerman, A. P., & Verpoorte, R. (2000). Luteolin, a compound with adenosine A1 receptor-binding activity, and chromone and dihydronaphthalenone constituents from *Senna siamea*. *Journal of Natural Products*, 63(3), 315–317.
- Kamagaté, M., Koffi, C., Mathieu Kouamé, goran, Akoubet, A., Alain Roland Yao, guessan, & Maxime Die-Kakou, H. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of *Cassia siamea* Lam. *The Journal of Phytopharmacology*, 3(1), 57–76.
- Kaspchak, E., Misugi Kayukawa, C. T., Meira Silveira, J. L., Igarashi-Mafra, L., & Mafra, M. R. (2020). Interaction of Quillaja bark saponin and bovine serum albumin: Effect on secondary and tertiary structure, gelation and in vitro digestibility of the protein. *LWT*, 121(1), 1–6.
- Kaur, G., Alam, M. S., Jabbar, Z., Javed, K., & Athar, M. (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 340–348.
- Kemenkes. (2023). *Laporan Tematik Survei Kesehatan Indonesia Tahun 2023* (S. O. Frans & M. Widiastuti, Eds.). Kementrian Kesehatan RI.
- Khafid, A., Dwijunianto, W. M., Christyaji, P. A., Khoirunnisa, N., Awalia, K. P. A., Widodo, A. S. S., & Nurchayati, Y. (2023). Uji Kualitatif Metabolit Sekunder pada Beberapa Tanaman yang Berkhasiat sebagai Obat Tradisional. *Buletin Anatomi Dan Fisiologi*, 8(1), 61–70.
- Khurm, M., Wang, X., Zhang, H., Hussain, S. N., Qaisar, M. N., Hayat, K., Saqib, F., Zhang, X., Zhan, G., & Guo, Z. (2021). The genus *Cassia* L.: Ethnopharmacological and phytochemical overview. *Phytotherapy Research*, 35(5), 2336–2385.

- Koyama, J., Morita, I., Tagahara, K., & Aqil, M. (2001). Bianthraquinones from *Cassia siamea*. *Phytochemistry*, 56(8), 849–851.
- Kozłowska, M., Rodziewicz, P., & Kaczmarek-Kedziera, A. (2017). Structural stability of diclofenac vs. inhibition activity from ab initio molecular dynamics simulations. Comparative study with ibuprofen and ketoprofen. *Structural Chemistry*, 28(4), 999–1008.
- Kresno, S. B., Kadir, A., Sutandyo, N., Harianto, S. H., & Setiawan, L. (2018). *Imuno-Onkologi* (S. B. Kresno & T. K. Widiastih, Eds.; Edisi 1). Sagung Seto.
- Kumar, D., Jain, A., & Verma, A. (2017). Phytochemical and Pharmacological Investigation of *Cassia Siamea* Lamk: An Insight. *The Natural Products Journal*, 7(4), 1–12.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1), 126–132.
- Landefeld, K., & Gonzales, H. (2016). Hypertensive Crisis: The Causative Effects of Nonsteroidal Anti- Inflammatory Drugs. *Journal of Clinical Case Reports*, 6(7), 1–3.
- Leviana, F., Nurharisna, L., Mariastuti, Z., & Fazah Iyah, H. (2023). Perbandingan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol Total dan Flavonoid Total Ekstrak Daun Durian (*Durio zibethinus* L.) Muda dan Tua. *MEDFARM: Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*, 12(1), 40–49.

- Loke, W. M., Proudfoot, J. M., Stewart, S., McKinley, A. J., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2008). Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical Pharmacology*, 75(5), 1045–1053.
- Lovell, A. R., & Ernst, M. E. (2017). Drug-Induced Hypertension: Focus on Mechanisms and Management. *Current Hypertension Reports*, 19(5), 1–12.
- Ma, R., Pan, H., Shen, T., Li, P., Chen, Y., Li, Z., Di, X., & Wang, S. (2017). Interaction of flavonoids from *woodwardia unigemmata* with bovine serum albumin (BSA): Application of spectroscopic techniques and molecular modeling methods. *Molecules*, 22(8), 1–19.
- Mehta, J. P., Parmar, P. H., Vadia, S. H., Patel, M. K., & Tripathi, C. B. (2017). In-vitro antioxidant and in-vivo anti-inflammatory activities of aerial parts of *Cassia* species. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1654–S1662.
- Mohammed, A., Liman, M. L., & Atiku, M. K. (2013). Chemical composition of the methanolic leaf and stem bark extracts of *Senna siamea* Lam. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(5), 98–100.
- Monton, C., Charoenchai, L., Kulvanich, P., Suksaeree, J., & Kraisintu, K. (2015). Determination of the barakol content of mature leaves, young flowers of *Senna siamea* (Lam.) Irwin and Barneby and in the herbal recipes. *Journal of Analytical Science and Technology*, 6(1), 1–9.

- Morita, H., Oshimi, S., Hirasawa, Y., Koyama, K., Honda, T., Ekasari, W., Indrayanto, G., & Zaini, N. C. (2007). Cassiarins A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters*, 9(18), 3691–3693.
- Mulyani, T., Setyahadi, S., & Wibowo, A. E. (2023). Uji Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 20(01), 26–32.
- Mworia, J. K., Kibiti, C. M., Ngeranwa, J. J. N., & Ngugi, M. P. (2021). Anti-inflammatory potential of dichloromethane leaf extracts of eucalyptus globulus (Labill) and senna didymobotrya (fresenius) in mice. *African Health Sciences*, 21(1), 397–409.
- Nirmala, A. R., Permatasari, L., Muliasari, H., & Fersiyana Deccati, R. (2023). Review: analisis kondisi optimal metode penghambatan denaturasi protein bovine serum albumin (BSA) pada pengujian aktivitas antiinflamasi berbagai ekstrak daun tanaman. *Journal of Agritechology and Food Processing*, 3(2), 101–113.
- Novika, D. S., Ahsanunnisa, R., & Yani, D. F. (2021). Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Penghambatan Denaturasi Protein. *Stannum : Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*, 3(1), 16–22.
- Ntandou, N. G. F., Banzouzi, J. T., Mbatchi, B., Elion-Itou, R. D. G., Etou-Ossibi, A. W., Ramos, S., Benoit-Vical, F., Abena, A. A., & Ouamba, J. M. (2010). Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 108–111.

- Nunes, C. dos R., Arantes, M. B., de Faria Pereira, S. M., da Cruz, L. L., de Souza Passos, M., de Moraes, L. P., Vieira, I. J. C., & de Oliveira, D. B. (2020). Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. *Molecules*, 25(16), 1–22.
- Oktavia, F. D., & Sutoyo, S. (2021). Skrining Fitokimia, Kandungan Flavonoid Total, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol. *Jurnal Kimia Riset*, 6(2), 141–153.
- Oshimi, S., Deguchi, J., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Wahyuni, T. S., Zaini, N. C., Shiota, O., & Morita, H. (2009). Cassiarins C-E, antiplasmodial alkaloids from the flowers of *Cassia siamea*. *Journal of Natural Products*, 72(10), 1899–1901.
- Pal, Y., Kumar, P., bharadwaj, S., singh, S. dev, & tiwari, S. bhooshan. (2021). Pharmacological Screening Of Anti Inflammatory Activity Of Methanolic Extract Of *Cassia Fistula* Leaves. *International Journal Of Creative Research Thoughts (IJCRT)*, 9(1), 4159–4163.
- Poovendran, P., Ramanathan, N., & Prabhu, N. (2014). Evaluation of the Antibacterial Activity of *Aegle marmelos* and *Cassia siamea* Extracts Against Biofilm and Extended Spectrum-Lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Microbiological Research*, 5(3), 217–221.
- Prasathkumar, M., Raja, K., Vasanth, K., Khusro, A., Sadhasivam, S., Sahibzada, M. U. K., Gawwad, M. R. A., Al Farraj, D. A., & Elshikh, M. S. (2021). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetic, and wound healing attributes of *Senna auriculata* (L.) Roxb. leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, 14(9), 1–13.

- Puspitasari, A. D., & Proyogo, L. S. (2017). Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendekia Eksakta*, 1–8.
- Radiah, N., Arista Pratama, I., & Pahmi, K. (2023). Studi Penggunaan NSAID (Nonsteroidal Anti Inflammatory Drugs) Pasien Osteoarthritis Usia Lanjut di Rumah Sakit X Sumbawa Barat. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 5(3), 424–428.
- Raharjo, A., Ekasari, W., & Fuad Hafid, A. (2014). Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Air Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk) Terhadap *Plasmodium berghei* Secara In Vivo. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 1(1), 6–9.
- Rahman, M. M., Al Noman, M. A., Khatun, S., Alam, R., Shetu, M. M. H., Talukder, E. K., Imon, R. R., Biswas, M. Y., Anis-Ul-Haque, K. M., Uddin, M. J., & Akhter, S. (2023). Evaluation of *Senna tora* (L.) Roxb. leaves as source of bioactive molecules with antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial potential. *Heliyon*, 9(1), 1–27.
- Reginato, F. F. Z., Silva, A. R. H. da, & Bauermann, C. L. de F. (2015). Evaluación del uso del flavonoides en el tratamiento de la inflamación. *Revista Cubana de Farmacia*, 49(3), 569–582.
- Reynaldi, & Yani, D. F. (2021). Potensi Anti-inflamasi Ekstrak Etanol Daun Cocor Bebek (*Kalanchoe pinnata* L) Terhadap Denaturasi Protein Secara In vitro. *SPIN Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia*, 3(1), 12–21.
- Riskesdas, T. (2018). *Laporan Nasional RISKESDAS 2018*. Lembaga Penerbit Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (LPB).

- Rizky, M., Aditya, T., Marisa, D., & Suhartono, E. (2015). Potensi Antiinflamasi Jus Buah Manggis (*Garcinia Mangostana*) Terhadap Denaturasi Protein In Vitro. *Berkala Kedokteran*, 11(2), 149–156.
- Rusli, Z., & Setiani, L. A. (2020). Modifikasi Metode Analisis Daya Hambat terhadap Proses Denaturasi Protein yang Diinduksi oleh Panas. *CHEESA: Chemical Engineering Research Articles*, 3(2), 55–62.
- Sherif, A. E., Sajid-ur-Rehman, M., Asif, M., Qadeer, I., & Khan, K. ur R. (2023). Anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic potential of *Oxystelma esculentum* (L. f.) Sm. using in vitro, in vivo, and in silico studies. *Frontiers in Pharmacology*, 14(1), 1–17.
- Shyeed, Md. A., Al Bashera, M., Sazal, O. S., Ali, Md. M., Hossain, M. P., Kumar Mondol, H. S., Chowdhury, M. A., Hossain, K. R., & Hossain Molla, M. T. (2023). Investigation of wound healing and anti-inflammatory activity of *Senna occidentalis* leaf extract, and in silico screening for both activities. *Pharmaceutical Science Advances*, 1(2), 1–10.
- Subowo. (2013). *Imunologi Klinik* (Edisi ke-2). Sagung Seto.
- Suleman, I. F., Sulistijowati, R., Hamidah Manteu, S., Nento, W. R., Teknologi, J., Periklanan, H., Periklanan, F., & Kelautan, I. (2022). Identifikasi Senyawa Saponin dan Antioksidan Ekstrak Daun Lamun (*Thalassia Hemprichii*). *Jambura Fish Processing Journal*, 4(2), 94–102.
- Tang, H., Huang, L., Zhao, D., Sun, C., & Song, P. (2020). Interaction mechanism of flavonoids on bovine serum albumin: Insights from molecular property-binding affinity relationship. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239(1), 1–13.

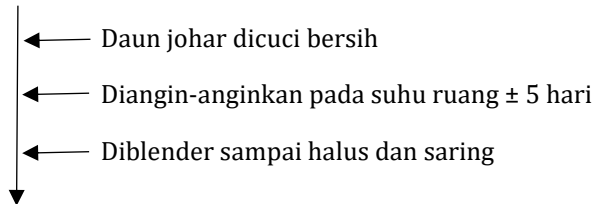
- Tanty, H., Permai, S. D., & Pudjihastuti, H. (2018). In vivo anti-diabetic activity test of ethanol extract of the leaves of *Cassia Siamea* Lamk. *Procedia Computer Science*, 135, 632–642.
- Thongsaard, W., Chainakul, S., Bennett, G. W., & Marsden, C. A. (2001). Determination of barakol extracted from *Cassia siamea* by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 853–859.
- Tukiran, T., Suyatno, S., Sabila, F. I., & Sari, A. K. (2023). Kadar Total Flavonoid dan Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Etanol Secang (*Caesalpinia sappan* L.) dan Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roxb.) Terhadap Penghambatan Denaturasi Protein Bovien Serum Albumin. *JC-T (Journal Cis-Trans): Jurnal Kimia Dan Terapannya*, 7(1), 30–39.
- Verdiana, M., Widarta, I. W. R., & Permana, I. D. G. M. (2018). Pengaruh Jenis Pelarut Pada Ekstraksi Menggunakan Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* (Linn.) Burm F.). *Jurnal Ilmu Teknologi Pangan*, 7(4), 213–222.
- Vijayalakshmi, A., Jayakumari, S., & Masilamani, K. (2016). In-vitro antioxidant potential of the flavonoid glycosides from *Cassia tora* linn. Leaves. *International Journal of Engineering Technology and Sciences*, 3(1), 19–26.
- Xia, X., Chen, C., Yang, L., Wang, Y., Duan, A., & Wang, D. (2022). Analysis of metabolites in young and mature *Docynia delavayi* (Franch.) Schneid leaves using UPLC-ESI-MS/MS. *PeerJ*, 10(1), 1–15.
- Yulianto, S. (2017). Penggunaan Tanaman Herbal Untuk Kesehatan. *Jurnal Kebidanan Dan Kesehatan Tradisional*, 2(1), 1–59.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Cara Kerja

1. Preparasi sampel daun johar (*Cassia siamea Lam*)

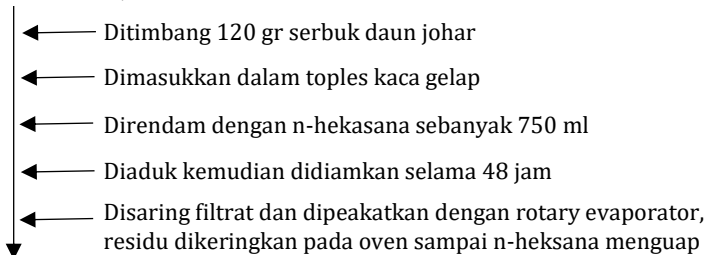
Daun Johar tua



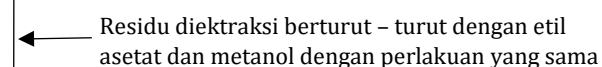
Serbuk daun johar

2. Ekstraksi serbuk daun johar

Serbuk daun johar



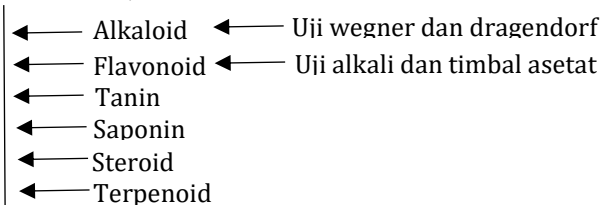
Ekstrak kental n-heksana



Ekstrak kental etil asetat dan metanol

3. Skrining Fitokimia fraksi daun johar

Ekstrak daun johar



Hasil

4. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT silica gel 60 F₂₅₄ 20x20

- ← Plat KLT dipotong (10 x 4 cm: atas 0,5 cm, bawah 1,5 cm)
- ← Eluen dicari hingga sesuai dengan metaboli sekunder
- ← Eluen dijenuhkan dalam chamber ± 1 jam
- ← Ekstrak ditotolkan pada plat dan keringkan
- ← Dimasukkan plat dalam chamber dan tunggu sampai batas atas
- ← Diangkat plat dan keringkan
- ← Diamati noda di bawah lampu uv
- ← Dihitung rf yang dohasilkan noda



Hasil

5. Uji Antiinflamasi ekstrak daun johar

a) Pembuatan larutan PBS

- ← Ditimbang 8 gr NaCl; 0,2 gr KCl; 1,44 gr Na₂HPO₄; 0,24 gr KH₂PO₄ dan larutkan
- ← Dilarutkan dalam 900 mL aquades
- ← pH distabilkan pada 6,2-6,5 dengan HCl
- ← Ditambahkan dengan aquades sampai tanda batas



Hasil

b) Pembuatan larutan BSA 0,2%

- ← Ditimbang 0,1 gr BSA
- ← Dilarutkan BSA dengan larutan PBS
- ← Dimasukkan dalam labu ukur 50 mL
- ← Ditambahkan larutan PBS sampai tanda batas



Hasil

c) Pembuatan larutan kontrol negatif

- ← Diambil 2 mL larutan BSA dan 1,5 mL larutan PBS
- ← Dimasukkan dalam labu ukur 5 mL
- ← Ditambahkan aquades samapai tanda batas



Hasil

d) Pembuatan larutan kontrol positif 1000 ppm

Natrium diklofenak

- ← Ditimbang 0,025 gr natrium diklofenak dan larutkan
- ← Dimasukkan dalam labu ukur 25 mL
- ← Ditambahkan aquades samapai tanda batas
- ← Diencerkan menjadi 100, 200 dan 400 ppm

Hasil

e) Pembuatan larutan uji 1000 ppm

Ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol

- ← Ditimbang 0,1 gr masing-masing fraksi
- ← Dilarutkan dengan masing-masing fraksi
- ← Dimasukkan dalam labu ukur 100 mL
- ← Ditambahkan pelarutnya sampai tanda batas
- ← Diencerkan menjadi 100, 200 dan 400 ppm

Hasil

f) Pengujian aktivitas antiinflamasi ekstrak daun johar

Kontrol dan fraksi daun johar

- ← Diambil 1 mL dari larutan uji/ kontrol
- ← Ditambahkan 2 mL larutan BSA 0,2%
- ← Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit
- ← Dinaikkan suhu ke 70°C selama 5 menit
- ← Dinginkan sampel pada suhu ruang
- ← Diukur kekeruhan sampel pada λ 660 nm
- ← Pengukuran diulangi sebanyak 3x

Hasil

Lampiran 2. Perhitungan %Rendemen

Perhitungan %Rendemen

Berat Sampel : 120 gr
 Berat ekstrak n-heksana : 3,854 gr
 Berat ekstrak etil asetat : 1,896 gr
 Berat ekstrak metanol : 3.938

- Ekstrak n-heksana

$$\begin{aligned}\% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,854 \text{ gr}}{120 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 3,211\%\end{aligned}$$

- Ekstrak etil asetat

$$\begin{aligned}\% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{1,896 \text{ gr}}{120 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 1,58 \%\end{aligned}$$

- Ekstrak metanol

$$\begin{aligned}\% \text{Rendemen} &= \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{3,938 \text{ gr}}{120 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 3,281\%\end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan nilai Rf Kromatografi Lapis Tipis

Contoh perhitungan nilai Rf Kromatografi Lapis Tipis

Diketahui:

Jarak tempuh eluen : 7,5 cm

Ekstrak	Jumlah noda	Jarak tempuh noda (cm)
n-heksana	6	2,8; 4,5; 5,2; 5,4; 6,0; 7,3.
Etil asetat	6	1,1; 2,8; 5,0; 5,4; 6,0; 6,3.
Metanol	8	0,5; 0,8; 1,2; 2,8; 3,6; 5,0; 5,4; 8,2.

Ekstrak n-heksana

$$\begin{aligned}
 R_f &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{4,5 \text{ cm}}{7,5 \text{ cm}} = 0,6
 \end{aligned}$$

Ekstrak Etil Asetat

$$\begin{aligned}
 R_f &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{1,1 \text{ cm}}{7,5 \text{ cm}} = 0,146
 \end{aligned}$$

Ekstrak Metanol

$$\begin{aligned}
 R_f &= \frac{\text{Jarak tempuh noda}}{\text{Jarak tempuh eluen}} \\
 &= \frac{0,5 \text{ cm}}{7,5 \text{ cm}} = 0,066
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak n-heksana, etil asetat dan metanol Daun Johar

1. Perhitungan pembuatan larutan BSA 0,2%

Sebanyak 0,2 gr BSA dilarutkan dalam 100 ml larutan pbs sehingga diperoleh konsentrasi 0,2 %.

$$\begin{aligned}\% (W/V) &= \frac{\text{Massa zat terlarut}}{\text{Volume larutan}} \times 100\% \\ &= \frac{0,2 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} \times 100\% \\ &= 0,2\%\end{aligned}$$

2. Perhitungan pembuatan natrium diklofenak 1000 ppm

Sebanyak 0,020 gr Natrium diklofenak dilarutkan dalam 20 ml aquades sehingga didapatkan konsentrasi larutan induk 1000 ppm.

$$\begin{aligned}\text{Ppm} &= \frac{\text{Massa zat terlarut } (\mu\text{g})}{\text{Volume larutan } (\text{ml})} \\ &= \frac{0,020 \text{ gr}}{20 \text{ ml}} = \frac{20.000 \mu\text{g}}{20 \text{ ml}} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 1000 \text{ ppm}\end{aligned}$$

- a. Pengenceran konsentrasi

- 1) 400 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

- 2) 200 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 4 \text{ ml}$$

3) 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

3. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 0,1gr ekstrak (n-heksana, etil asetat dan metanol) dilarutkan dengan 100 ml pelarutnya sehingga diperoleh konsentrasi larutan induk 1000 ppm.

$$\begin{aligned} \text{Ppm} &= \frac{\text{Massa zat terlarut } (\mu\text{g})}{\text{Volume larutan (ml)}} \\ &= \frac{0,1 \text{ gr}}{100 \text{ ml}} = \frac{100.000 \mu\text{g}}{100 \text{ ml}} = 1000 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} = 1000 \text{ ppm} \end{aligned}$$

b. Pengenceran konsentrasi

1) 400 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 400 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 8 \text{ ml}$$

2) 200 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 200 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 4 \text{ ml}$$

3) 100 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 100 \text{ ppm} \times 20 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ ml}$$

4. Hasil aktivitas antiinflamasi dari masing- masing ekstrak dan kontrol positif

Data Absorbansi sampel uji

Konsentrasi	Abs ₁	Abs ₂	Abs ₃
Kontrol (-)	0,204	0,208	0,207
Kontrol (+)			
100 ppm	0,018	0,017	0,018
200 ppm	0,008	0,009	0,008
400 ppm	0,008	0,007	0,007
Fn-h			
100 ppm	0,199	0,196	0,196
200 ppm	0,131	0,130	0,130
400 ppm	0,053	0,053	0,053
FEA			
100 ppm	0,109	0,111	0,112
200 ppm	0,041	0,041	0,041
400 ppm	0,019	0,019	0,019
FM			
100 ppm	0,055	0,056	0,055
200 ppm	0,044	0,043	0,044
400 ppm	0,017	0,015	0,015

Keterangan

En-h : Ekstrak n-heksana

EEA : Ekstrak etil asetat

EM : Ekstrak metanol

Hasil %Inhibisi sampel uji

Konsentrasi	%I ₁	%I ₂	%I ₃	%I ± SD	IC ₅₀
Kontrol (-)	0	0	0	0	-
Kontrol (+)					
100 ppm	91,219	91,346	91,787	91,451 ± 0,298	7,832
200 ppm	95,609	96,153	96,135	95.966 ± 0,309	
400 ppm	96,097	96,634	96,618	96,450 ± 0,305	
Fn-h					
100 ppm	2,926	5,769	5,314	4,670 ± 1,527	209,3
200 ppm	36,097	37,5	37,198	36.932 ± 0,738	
400 ppm	74,146	74,519	74,396	74,534 ± 0,190	
FEA					
100 ppm	46,829	46,634	45,893	46,453 ± 0,494	100,2
200 ppm	80	80,288	80,193	80,161 ± 0,147	
400 ppm	90,731	90,865	90,821	90,806 ± 0,068	
FM					
100 ppm	73,17	73,076	73,429	73,226 ± 0,183	38.28
200 ppm	78,536	79,326	78,743	78,869 ± 0,410	
400 ppm	91,707	92,788	92,753	92,416 ± 0,614	

Keterangan

En-h : Ekstrak n-heksana

EEA : Ekstrak etil asetat

EM : Ekstrak metanol

Contoh perhitungan %inhibisi BSA oleh ekstrak dan kontrol positif:

Kontrol positif

$$\begin{aligned}\% \text{ inhibisi} &= \frac{\text{abs kontrol negatif} - \text{abs sampel uji}}{\text{abs kontrol negatif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,208 - 0,018}{0,208} \times 100\% \\ &= 91,436\%\end{aligned}$$

Ekstrak n-heksana

$$\begin{aligned}\% \text{ inhibisi} &= \frac{\text{abs kontrol negatif} - \text{abs sampel uji}}{\text{abs kontrol negatif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,208 - 0,130}{0,208} \times 100\% \\ &= 37,5\%\end{aligned}$$

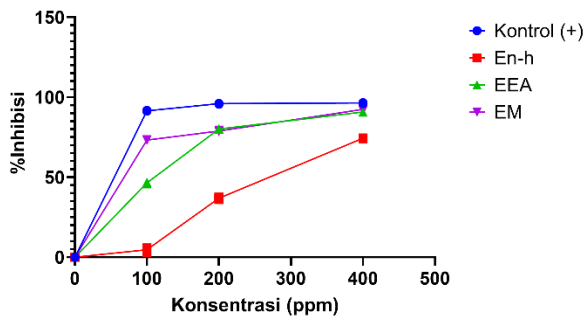
Ekstrak Etil Asetat

$$\begin{aligned}\% \text{ inhibisi} &= \frac{\text{abs kontrol negatif} - \text{abs sampel uji}}{\text{abs kontrol negatif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,208 - 0,041}{0,208} \times 100\% \\ &= 80,288\%\end{aligned}$$

Ekstrak Metanol

$$\begin{aligned}\% \text{ inhibisi} &= \frac{\text{abs kontrol negatif} - \text{abs sampel uji}}{\text{abs kontrol negatif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,208 - 0,015}{0,208} \times 100\% \\ &= 92,788\%\end{aligned}$$

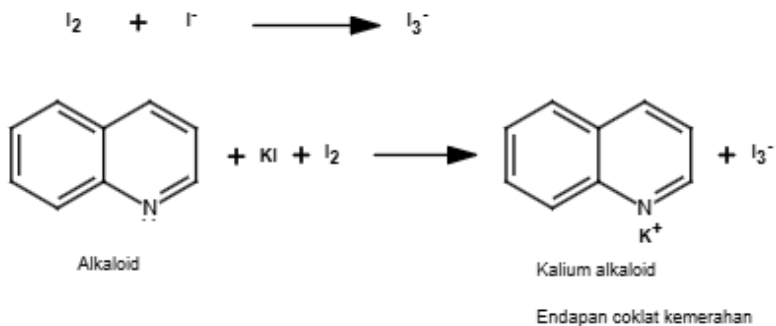
5. Grafik %Inhibisi masing-masing sampel uji



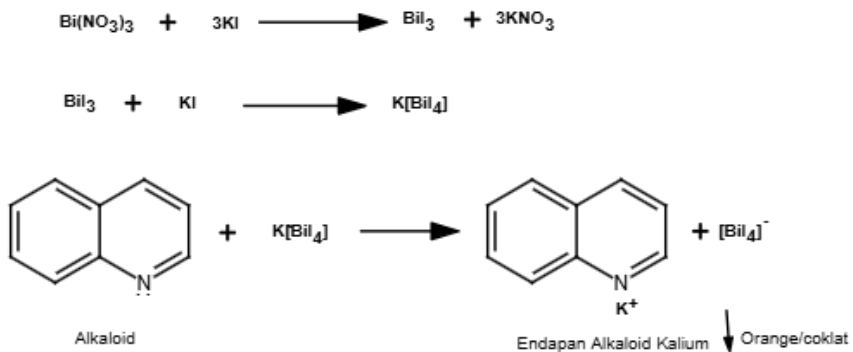
Lampiran 5. Hasil Reaksi Skrining Fitokimia

1. Alkaloid (Hanifah et al., 2021)

a. Wegner

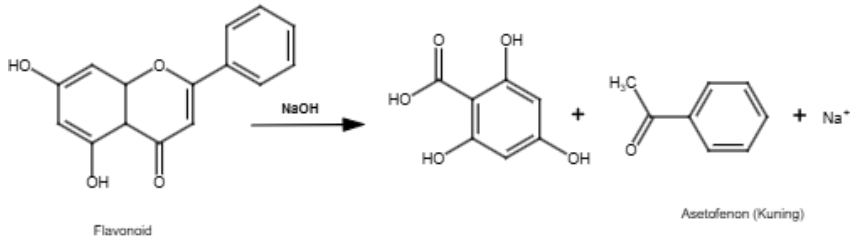


b. Dragendorff

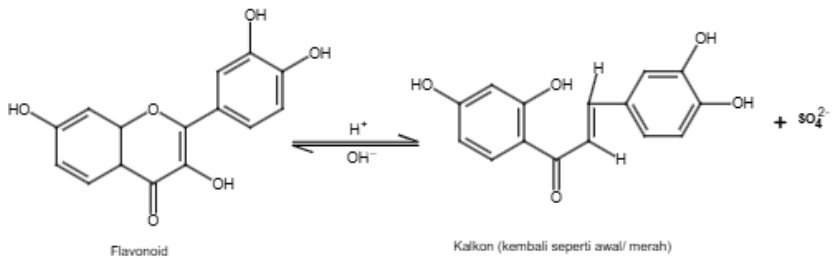


2. Flavonoid (Alkali) (Fransina et al., 2019)

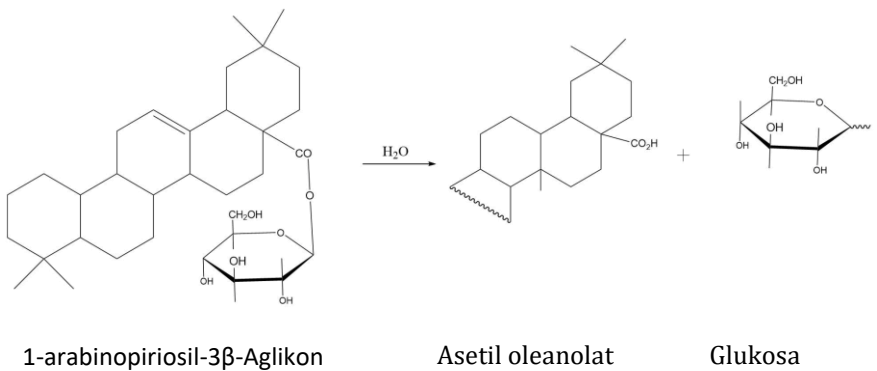
Ketika ditambah NaOH



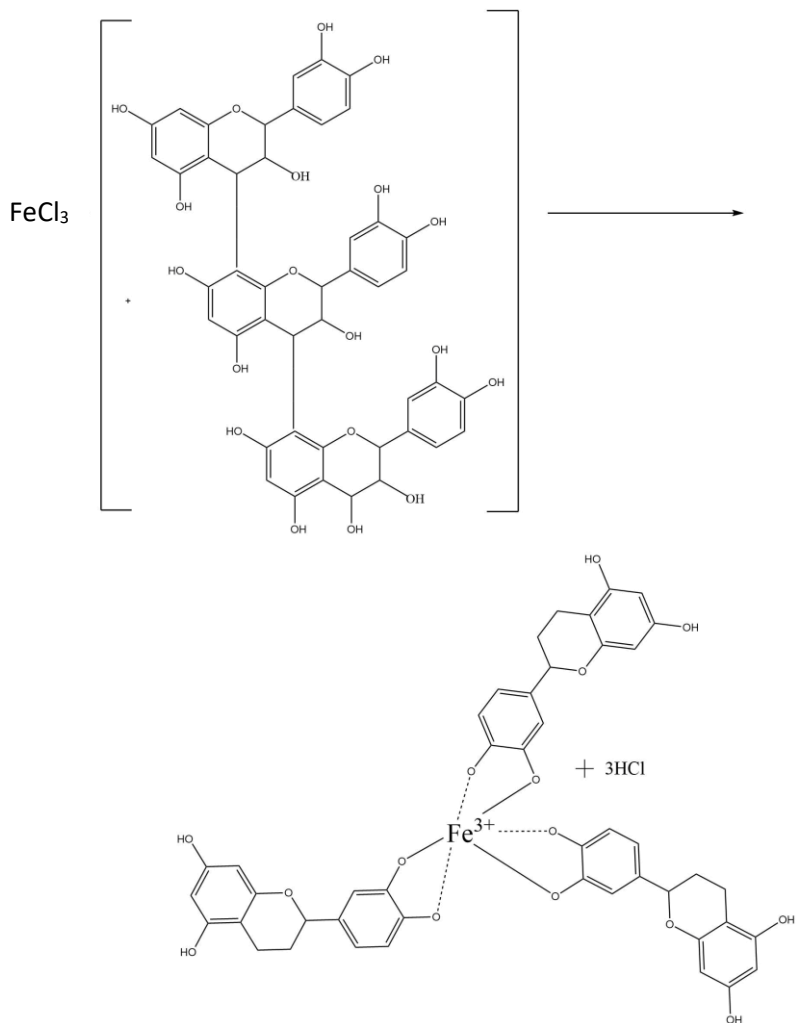
Ketika ditambah H_2SO_4



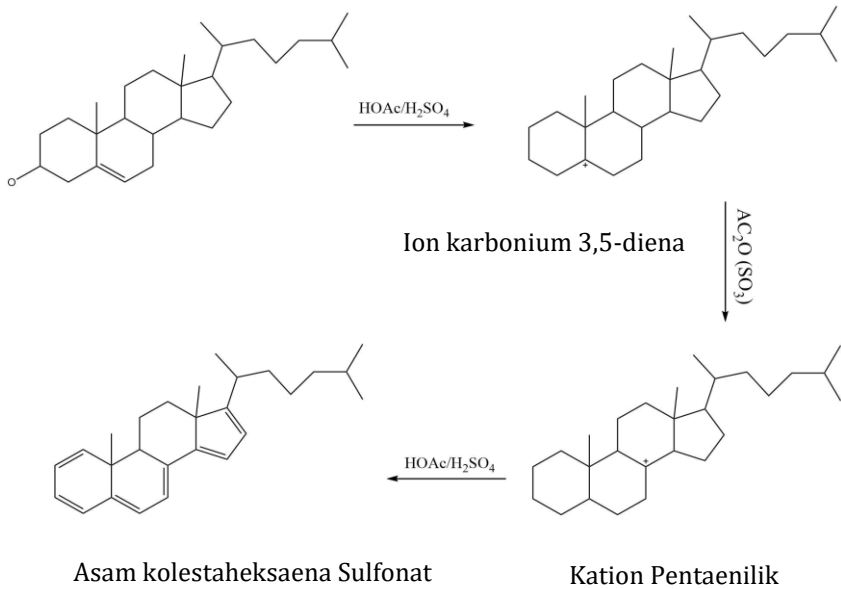
3. Saponin (Oktavia & Sutoyo, 2021)



4. Tannin (Hanifah et al., 2021)



5. Steroid dan Terpenoid (Oktavia & Sutoyo, 2021)



Lampiran 6. Dokumentasi Penelitian



Serbuk daun Johar



Maserasi



Waterbath



Ekstrak n-heksana



Ekstrak etil asetat



Ekstrak metanol



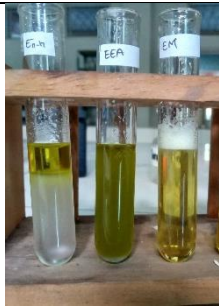
Uji Alkaloid



Uji Flavonoid



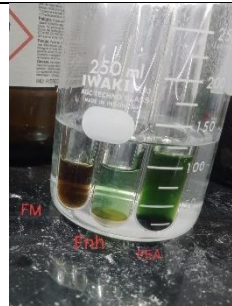
Uji Tanin



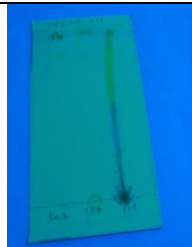
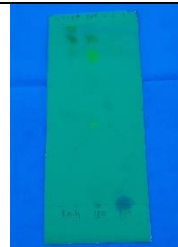
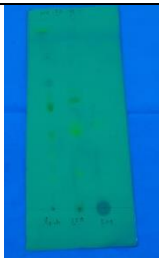
Uji Saponin



Uji Steroid



Uji Terpenoid

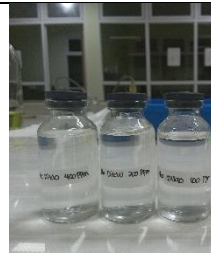
Uji KLT Klorofom: Etil
asetat 7:3Uji KLT Klorofom:
Metanol 9:1Uji KLT n-heksana: Etil
asetat: metanol 7:2:1Uji KLT n-heksana: Etil
Asetat 8:2Uji KLT n-heksana: Etil
Asetat 7:3Uji Kromatografi Lapis
tipis



Pembuatan larutan PBS
pH 6,2-6,5



Larutan induk 1000
ppm 3 ekstrak



Larutan Na diklofenak
100, 200 dan 400 ppm



Larutan ekstrak n-
heksana 100, 200 dan
400 ppm



Larutan ekstrak Etil
Asetat 100, 200 dan 400
ppm



Larutan ekstrak Metanol
100, 200 dan 400 ppm



Sampel uji di inkubasi
pada suhu 37°C



Suhu dinaikkan
menjadi 70°C



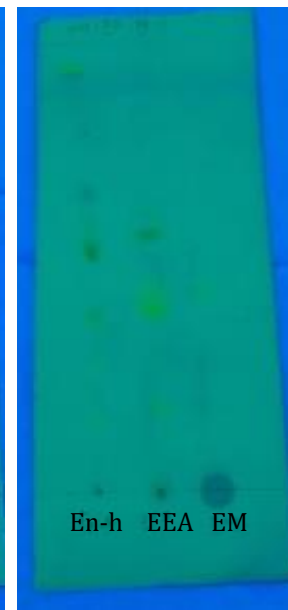
Sampel habis kenaikan
suhu 70°C



Kloroform : Etil Asetat 7:3



Kloroform : Metanol 9:1

n-heksana : Etil Asetat:
Metanol 7:2:1

n-heksana : Etil Asetat 8:2

RIWAYAT HIDUP

A. Identitas Diri

1. Nama : Riyan Firmansyah
2. Tempat & Tgl. Lahir : Demak, 03 Januari 2003
3. Alamat Rumah : Tambakroto Pilang RT 03
RW 02, Kecamatan Sayung,
Kabupaten Demak
4. No. HP : 083838265458
5. E-mail : riyann708@gmail.com

B. Riwayat Pendidikan

1. Pendidikan Formal:
 - a. TK Mekarsari Tambakroto
 - b. SDN Tambakroto
 - c. MTS Hidayatul Muhtadi'in Bulusari
 - d. SMAN 1 Karangtengah
2. Pendidikan Non-Formal:
 - a. Pelatihan Multimedia BLKK

Semarang, 03 Juni, 2025



Riyan Firmansyah

NIM. 2108036090