



AKTIVITAS KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.) DAN DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica* L.Urb) TERHADAP KELARUTAN KALSIUM BATU GINJAL SECARA *IN VITRO*

ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT COMBINATION BETWEEN SOURSOP (*Annona muricata* L.) LEAVES AND GOTU KOLA (*Centella asiatica* L.Urb) LEAVES ON THE SOLUBILITY OF KIDNEY STONE CALCIUM *IN VITRO*

Ni Wayan Swintari*, Yuliet, Khildah Khaerati

Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako, Palu.

Received 15 Juli 2016/Accepted 4 Oktober 2016

ABSTRAK

Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L.Urb) merupakan tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat peluruh batu ginjal. Hal ini karena adanya kandungan senyawa bioaktif antara lain flavonoid khususnya dibagian daun. Penggunaan kombinasi ekstrak daun sirsak dan pegagan dapat meningkatkan efektivitasnya untuk meluruhkan kalsium batu ginjal. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas serta menentukan kombinasi dosis ekstrak etanol daun sirsak (DS) dan daun pegagan (DP) yang efektif untuk melarutkan kalsium batu ginjal. Ekstrak dibuat dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% kemudian selanjutnya dilakukan uji penapisan fitokimia dan profil KLT pada masing-masing ekstrak. Hasil kromatogram menunjukkan ekstrak mengandung flavonoid. Pengujian aktivitas kombinasi ekstrak daun sirsak dan pegagan dilakukan dengan menggunakan tujuh perlakuan yaitu kombinasi 1 (DS 1% + DP 7,5%), kombinasi 2 (DS 0,5% + DP 3,75%), kombinasi 3 (DS 0,25% + DP 1,875%), ekstrak tunggal daun sirsak (1%), ekstrak tunggal pegagan (7,5%), kontrol negatif (Aquades) dan kontrol positif (Batugin eliksir). Batu ginjal kemudian dimasukkan sebanyak 100 mg ke dalam masing-masing perlakuan dan diinkubasi selama 6 jam (37 °C). Hasil filtrat kemudian didestruksi dan diukur kadar kalsium terlarut menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom. Hasil penelitian menunjukkan kombinasi ekstrak etanol daun sirsak dan daun pegagan dengan kombinasi ekstrak 2 (DS 0,5% + DP 3,75%) merupakan kombinasi yang efektif terhadap kemampuan melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro*.

Kata kunci : *Annona muricata* L, *Centella asiatica* L.Urb, Batu ginjal, Kalsium

ABSTRACT

Soursop (*Annona muricata* L.) and gotu kola (*Centella asiatica* L.Urb) is a plant that can be used as a laxative medicine kidney stones. This is because of the content of bioactive compounds including flavonoids, especially the leaf section. The use of a combination of soursop leaf extract and gotu kola can improve their effectiveness in order to remove calcium kidney stones. Therefore, this study aims to determine the activity and to determine dose combination soursop leaf ethanol extract (SS) and gotu kola leaf (GK) which is effective for dissolving potassium kidney stones. Extracts prepared by maceration method using ethanol 96% then subsequently tested phytochemical screening and thin layer chromatography profiles on each extract. Results chromatogram showed the extract containing flavonoids. Testing the activity of the combination of soursop and gotu kola extract performed using seven treatments, combination 1 (SS 1% + GK 7.5%), a combination of 2 (SS 0.5% + GK 3.75%), the combination of 3 (SS 0, 25% + GK 1.875%), single soursop leaf extract (1%), single gotu kola extract (7.5%), negative control (aquadest) and positive control (Batugin elixir). Kidney stones are then put as much as 100 mg in each treatment and incubated for 6 hours (37 °C). Results filtrate then didestruksi and dissolved calcium levels measured using Atomic Absorption Spectrophotometer. The results showed the combination soursop leaf ethanol extract and gotu kola leaf extract with a combination of 2 (SS 0.5% + GK 3.75%) is an effective combination of the ability to dissolve calcium kidney stones *in vitro*.

Keyword: *Annona muricata* L, *Centella asiatica* L.Urb, Kidney Stones, Calcium.

*Corresponding Author: Ni Wayan Swintari niwayan-swintari@yahoo.com (ph : +62-852-5636-3782)

PENDAHULUAN

Ginjal merupakan organ penting pada manusia. Ginjal memiliki banyak fungsi antara lain seperti pengatur keseimbangan air, konsentrasi kadar garam dalam darah, keseimbangan asam basa dalam darah, ekskresi zat sisa dan kelebihan garam (Pearce, 2002). Ginjal menjalankan fungsi vital sebagai pengatur volume dan komposisi kimia darah dan lingkungan dalam tubuh dengan mengekskresikan zat terlarut dan air seni secara selektif. Fungsi vital ginjal dicapai dengan filtrasi plasma darah melalui glomerulus dengan reabsorpsi sejumlah zat terlarut dan air dalam jumlah yang sesuai disepanjang tubulus ginjal. Kelebihan zat terlarut dan air diekskresikan keluar tubuh dalam urin melalui sistem pengumpulan urin (Price dan Wilson, 2005).

Salah satu masalah kesehatan yang menempati urutan ketiga setelah infeksi saluran kemih dan kelainan prostat pada sekian banyak penyakit saluran kemih yang akibat terburuknya dapat menyebabkan gagal ginjal adalah batu ginjal (Wijaya dan Darsono, 2005). Batu ginjal merupakan gangguan kesehatan pada organ ginjal dimana terdapat batu-batu yang terbentuk di dalam ginjal akibat pengendapan yang terjadi di urin yang bergerak turun ke saluran kemih (ureter). Batu dapat terbentuk di seluruh saluran kemih terutama pada tempat-tempat yang sering mengalami hambatan aliran urin (statis urine) yaitu pada sistem kalises ginjal atau buli-buli. Bagian dari batu-batu tersebut seringkali terbawa keluar bersama air seni. Kadangkala batu-batu tersebut menjadi semakin besar apabila tidak diobati. Akibatnya dari batu-batu yang membesar ini maka keluarnya air seni terganggu, karena batu-batu tersebut bentuknya seperti karang yang pinggir-pinggirnya runcing sering menimbulkan pendarahan pada waktu buang air, rasa pedih dan sakit (Yasmine, 2007).

Batu ginjal dibagi menjadi beberapa jenis yaitu batu kalsium, batu infeksi, batu asam urat, dan batu sistin. Batu kalsium paling banyak ditemukan, yaitu 70-75% dari jumlah pasien batu ginjal. Penyebab terbentuknya batu ginjal antara lain kurang minum, terlalu lama menahan kencing, dehidrasi, infeksi ginjal, dan makanan yang mengandung zat yang mudah mengkristal (kalsium, oksalat, asam urat) (Marshal, 2003).

Upaya penyembuhan batu ginjal dengan pembedahan, endoskopi atau gelombang ultrasonik membutuhkan biaya relatif tinggi sehingga penggunaan obat yang dapat mencegah dan meluruhkan batu ginjal lebih dipilih. Batu ginjal yang masih berukuran kecil sampai sedang masih dimungkinkan untuk dilarutkan dengan senyawa tertentu. Beberapa tanaman dilaporkan dapat membantu kelarutan batu ginjal tertentu dan meningkatkan air kemih sebagai pembantu pembuangan melalui urin. Tanaman yang telah diuji tentang adanya pembentukan kompleks antara flavonoid dalam daun pandan wangi dengan kalsium dalam batu ginjal yang menyebabkan adanya daya melarutkan infus daun pandan wangi terhadap kalsium batu ginjal secara *in vitro* oleh Rahardjo (2003). Andrianto (2012), telah meneliti adanya kemampuan ekstrak daun ciplukan dalam melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro* dengan adanya pembentukan kompleks antara flavonoid dalam ekstrak daun ciplukan. Secara normal, pembentukan batu ginjal dihambat oleh flavonoid, kalium, magnesium, dan asam sitrat

Pegagan *Centella asiatica* (L) merupakan salah satu tumbuhan liar yang banyak tumbuh di perkebunan dan memiliki beragam manfaat untuk mengobati berbagai masalah kesehatan. Khasiat dan manfaat pegagan antara lain karena pegagan mengandung sejumlah nutrisi dan komponen zat kimia yang memiliki efek terapeutik. Herba pegagan dipilih sebagai bahan utama karena termasuk salah satu tanaman unggulan. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun pegagan mempunyai aktivitas diuretik pada dosis 500 mg/kg BB (Roopesh, 2011) dan pada penelitian Sri Endah Suhartatik (1989) menyatakan bahwa infusa daun pegagan dengan kadar 7,5% yang paling baik untuk melarutkan kalsium batu ginjal yaitu sebesar $153,7275 \pm 1,0155$ mg/L.

Selain pegagan, daun sirsak juga merupakan salah satu tanaman yang tumbuh di Indonesia yang memiliki banyak manfaat dan kegunaan. Tiap bagian dari tanaman ini memiliki banyak manfaat, salah satunya adalah daunnya. Daun sirsak telah digunakan oleh sebagian masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional, diantaranya sebagai obat sakit pinggang, mengurangi rasa nyeri, gatal-gatal, reumatik, obat bisul, dan penurun panas

(Mardiana, 2011). Berdasarkan penelitian Triana Susilawati (1999) tentang daya melarutkan fraksi air dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun sirsak terhadap batu ginjal kalsium, menyatakan bahwa ekstrak daun sirsak mampu melarutkan kalsium batu ginjal dengan konsentrasi paling baik yaitu 1%.

Berdasarkan uraian diatas mengenai khasiat kandungan kimia daun sirsak dan daun pegagan, maka peneliti ingin mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata*) yang dikombinasi dengan pegagan (*Centella asiatica*) untuk melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro* untuk melihat efektivitas kedua ekstrak tersebut apakah memiliki aktivitas yang sinergis yang akan berefek potensiasi, yaitu kedua ekstrak saling memperkuat khasiatnya atau efek semakin berkurang karena terjadi interaksi antara kedua ekstrak.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L.), daun pegagan (*Centella asiatica* L.Urb), aquadest, batu ginjal kalsium, baku standar kalsium, etanol 96%, HNO₃, HCl pekat, metanol, kloroform, pereaksi Dragendroff, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner, polisorbitat 80, FeCl₃, *n*-butanol, asam asetat glasial, AlCl₃, ekstrak tempuyung yang beredar dipasaran (Batugin elixir[®]), aluminium foil, kapas, kertas label, tisu gulung, kertas saring, H₂SO₄ pekat.

Sampel Uji

Batu ginjal yang digunakan dalam penelitian ini diidentifikasi kandungankalsiumnya di laboratorium Klinik Prodia, Jalan S. Parman Palu.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif dengan menggunakan metode eksperimen laboratorium yaitu yang mana dilakukan pengukuran daya melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro*.

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini berlangsung dari bulan September 2015 sampai Maret 2016. Pembuatan ekstrak daun sirsak dan daun pegagan di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia dan pengujian *in vitro* dilakukan di Laboratorium

Farmakologi-Biofarmasi Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Tadulako, Palu dan di UPT Laboratorium Kesehatan, Palu, Sulawesi Tengah.

Tahap Persiapan Bahan Uji

a. Pengumpulan dan Identifikasi Daun Sirsak dan Herba Pegagan

Daun sirsak (*Annona muricata*) dan pegagan (*Centella asiatica*) yang segar diperoleh dari Kecamatan Balinggi Jati Kabupaten Parigi Mautong dan dilakukan identifikasi di Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Sumber Daya Hayati Sulawesi Universitas Tadulako Palu untuk memastikan bahwa daun sirsak dan pegagan adalah benar jenis *Annona muricata* dan *Centella asiatica*. Bagian dari tanaman ini yang digunakan adalah daun yang masih berwarna hijau.

b. Identifikasi Batu Ginjal

Batu ginjal yang digunakan dalam pengujian ini terlebih dahulu digerus dan diayak dengan ayakan mesh 40 untuk mendapatkan ukuran partikel yang sama. Kemudian dianalisis secara kualitatif kandungan Ca.

Tahap Ekstraksi

Daun sirsak dan pegagan yang sudah kering masing-masing sebanyak 300 g dimasukkan kedalam wadah maserasi terpisah yang berwarna gelap dan direndam dengan etanol 96% dan disimpan ditempat gelap sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari dilakukan penyaringan ampasnya direndam kembali. Penyarian ini dilakukan sebanyak 3 kali. Maserat dikumpulkan dan diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga didapat ekstrak kental etanol daun sirsak dan pegagan. Kemudian dihitung rendemen yang diperoleh.

Tahap Uji Penapisan Fitokimia (Harbone, 1987)

Ekstrak daun sirsak dan pegagan yang telah didapatkan kemudian diuji kualitatif terhadap adanya senyawa tanin, alkaloid, saponin, fenolik, flavonoid, dan steroid

Tahap Pengujian Aktivitas Daya Larut Batu Ginjal

a. Perendaman Batu Ginjal Kalsium

Perendaman dilakukan dengan cara menimbang 100 mg serbuk batu ginjal kemudian dilarutkan ke dalam masing-masing larutan uji ekstrak etanol kombinasi daun sirsak dan daun pegagan (kombinasi dosis 1+1 (1% + 7,5%), $\frac{1}{2} + \frac{1}{2}$ (0,5% + 3,75%), $\frac{1}{4} + \frac{1}{4}$ (0,25% + 1,88%), ekstrak tunggal daun sirsak (1%) dan ekstrak tunggal daun pegagan (7,5%). Masing-masing ditambahkan polisorbitat 80 untuk mendispersikan ekstrak dan serbuk batu ginjal kemudian dicukupkan volume hingga 25 ml, kontrol positif (ekstrak daun tempuyung yang beredar di pasaran) 25 ml dan kontrol negatif akuades 25 ml lalu diaduk dan diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C dimana setiap 15 menit dilakukan penggojokan.

b. Identifikasi Kadar Kalsium yang Terlarut

Masing-masing perlakuan dipipet 10 ml dan dimasukkan dalam vial. Ditambahkan 3 ml HNO₃ dibiarkan beberapa menit. Dipanaskan mula-mula dengan pemanasan yang rendah yaitu 4-5 kemudian dinaikkan secara perlahan-lahan, setelah 30 menit pemanasan dinaikkan, dihentikan sebentar. Hasil dekstruksi didinginkan, kemudian diencerkan dengan air suling sampai volume 100 ml. Dilakukan pengukuran kadar kalsium yang terlarut dengan SSA pada panjang gelombang 422,7 nm.

Analisis Data

Data selisih kadar kalsium terlarut hasil perendaman ekstrak etanol kombinasi daun sirsak dan pegagan, kontrol positif beserta kontrol negatif dianalisis secara statistik menggunakan metode One Way ANOVA pada tingkat kepercayaan 95% dilanjutkan dengan uji lanjut Duncan untuk melihat perbedaan nyata antar kelompok perlakuan.

HASIL

Hasil Ekstraksi

Simplisia daun sirsak dan pegagan sebanyak 300 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% masing-masing sebanyak 3 liter. Hasil ekstrak kental daun sirsak yaitu 19,45 gram dengan rendemen 6,48% dan pegagan yaitu 17,17 gram dengan rendemen 5,72%

Hasil Penapisan Fitokimia

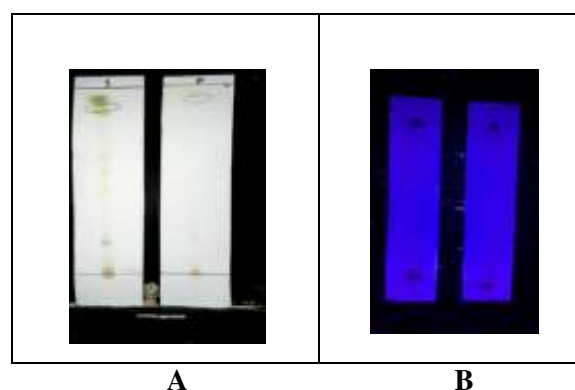
Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L.Urb)

No	Identifikasi	Pengamatan	Hasil		KET
			Sirsak	Pegagan	
1	Flavonoid	Warna kuning	+	++	
2	Fenolik	Warna hijau tua	+	++	positif
3	Saponin	Terbentuk buih	+	++	positif
4	Steroid	Warna hijau	++	+	positif
5	Alkaloid	Warna hijau tuaendapan coklat	+	++	positif
6	Tanin	Warna hitam	+	++	Positif

Ket : (+) = Perubahan warna jelas pada pengujian
(++) = Perubahan warna sangat jelas pada pengujian

Tabel 2. Hasil kromatografi lapis tipis senyawa flavonoid ekstrak etanol daun sirsak dan pegagan

Bahan uji	Penampakan dibawah lampu UV 254 dengan AlCl ₃		Penampakan dibawah lampu UV 366 dengan AlCl ₃	
	Warna	Nilai Rf	Warna	Nilai Rf
Ekstrak etanol daun sirsak	Kuning tua	0,89	Kuning tua	0,89
Ekstrak etanol pegagan	Kuning tua	0,92	Kuning tua	0,92



Gambar 1 Hasil KLT Ekstrak Daun Sirsak dan Pegagan

- Ket: A. Fase gerak : metanol-kloroform (1:39); fase diam silika gel GF 254 deteksi flavonoid pada panjang gelombang 254 nm
B. Fase gerak : metanol-kloroform (1:39); fase diam silika gel GF 254 deteksi flavonoid pada panjang gelombang 366 nm

Penentuan Kadar Kalsium (Ca) Pada Batu Ginjal Setelah Perlakuan

Hasil perhitungan kadar kalsium terlarut setelah direndam masing-masing dengan aquadest (kontrol negatif); batugin eliksir (kontrol positif); ekstrak tunggal daun pegagan; ekstrak tunggal daun sirsak; kombinasi 1 dan kombinasi 2 dilihat pada Tabel 4.3:

Tabel 2 Kadar kalsium terlarut kombinasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L.Urb)

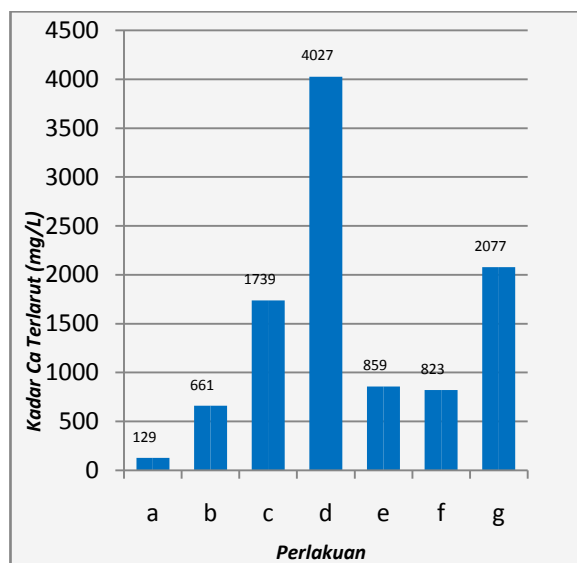
Perlakuan	Rerata Kadar Ca		Rerata Selisih (mg/L)	ke t
	Sebelum (mg/L)	Sesudah (mg/L)		
Kontrol negative	1.937	2060	129	a
Rata-rata ±SD	±24,16	±22,62	±45,25	a
Kontrol positif	6651	7609	661	bc
Rata-rata ±SD	±31,11	±250,632	±49,49	bc
Ekstrak 1 (DS 1% + DP7,5%)	6744	8483	1739	d
Rata-rata ±SD	±1818,67	±1172,38	±646,29	d
Ekstrak 2 (DS0,5 + DP3,75)	2754	6781,5	4027,5	ab
Rata-rata ±SD	±335,16	±1175,9	±840,7	ab
Ekstrak3 (DS0,25% + DP1,875%)	2149,5	3009	859,5	ab
Rata-rata ±SD	±31,81	±36,76	±4,94	ab
Ekstrak tunggal daun sirsak	2218	3077,5	823,5	c
Rata-rata ±SD	±1,41	±6010	±112,42	c
Ekstrak tunggal daun pegagan	2686	4763	2077	c
Rata-rata ±SD	±110,30	±50,91	±161,22	c

Keterangan:

Abjad yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Abjad yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan.

Berdasarkan hasil diatas kemudian dapat dibuat diagram batang yang merupakan hasil dari selisih kadar kalsium yang terlarut



Gambar 2. Grafik rerata kadar kalsium yang terlarut dengan menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom setelah perendaman selama 3 jam.

Ket:

Rata-rata selisih

a = kontrol negatif

b = kontrol positif

c = kombinasi ekstrak 1 (DS 1%+DP 7,5%)

d = kombinasi ekstrak2 (DS 0,5% + DP 3,75%)

e = kombinasi ekstrak3 (DS0,25% + DP 1,875%)

f = ekstrak tunggal sirsak

g = ekstrak tunggal pegagan.

PEMBAHASAN

Batu ginjal merupakan gangguan kesehatan pada organ ginjal dimana terdapat batu-batu kecil yang terbentuk di dalam ginjal akibat pengendapan yang terjadi di urin bergerak turun ke saluran kemih (ureter). Bagian dari batu-batu tersebut seringkali dibawa keluar bersama dengan air seni. Kadangkala batu-batu tersebut menjadi semakin besar yang akan mengganggu keluarnya air seni, karena batu-batu tersebut bentuknyaseperti karang yang pinggir-pinggirnya runcing sering menimbulkan pendarahan, rasa pedih, dan sakit (Yasmin, 2007).

Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui aktivitas kombinasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L. Urb) dalam melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro*. Batu ginjal yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari pasien yang telah melakukan operasi batu ginjal. Berdasarkan hasil identifikasi yang dilakukan di Klinik Prodia, diketahui bahwa batu ginjal yang digunakan

dalam penelitian ini positif mengandung kalsium.

Proses pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Metode maserasi dipilih karena pengerjaannya sederhana dan mudah. Selain itu bahan uji yang digunakan berupa daun yang teksturnya lunak dan mudah mengembang dalam cairan penyari. Selain itu, maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana karena cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif ini akan larut dan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dengan di luar sel menyebabkan larutan yang terpekat keluar hingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dengan di luar sel. Maserasi simplisia daun sirsak dan pegagan dilakukan dengan menggunakan etanol 96%. Hal ini karena flavonoid dalam tanaman umumnya berada dalam bentuk glikosida yang dapat larut dalam campuran air dan pelarut seperti etanol. Menurut Markham (1988), metanol, etanol, butanol dan lain-lain yang sering digunakan untuk ekstraksi glikosida flavonoid. Beberapa aglikon flavonoid kemungkinan juga dapat larut dalam campuran air-etanol (etanol 96%). Selain itu etanol 96% lebih selektif, kapang sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, memerlukan panas yang lebih sedikit untuk proses pemekatan, dan zat pengganggu yang larut terbatas.

Penapisan fitokimia merupakan uji kualitatif golongan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol (96%) daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L.Urb). Data hasil penapisan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol tersebut mengandung golongan senyawa flavonoid, fenolik, saponin, steroid, alkaloid dan tanin.

Analisis KLT flavonoid dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa golongan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak dan daun pegagan. Flavonoid merupakan senyawa polar yang dapat membentuk kompleks dengan ion logam. Berdasarkan sifat tersebut, maka dipilih fase diam dan fase gerak yang polar. Fase diam yang digunakan dalam pemisahan flavonoid adalah silika gel agar dapat dipisahkan, maka flavonoid harus dapat terbawa oleh fase gerak saat melewati fase diam. Fase gerak yang digunakan dalam penelitian ini adalah campuran methanol : kloroform (1:39) v/v (Gritter, 1991).

Pada pemeriksaan flavonoid secara kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) seperti pada Gambar 4.1 menunjukkan etika diamati dibawah sinar UV 366 nm terlihat ada noda yang tampak berfluoresensi dengan latar gelap. Ketika disemprot dengan larutan 5% $AlCl_3$ dalam etanol, masing-masing noda semakin lebih jelas ketika diamatidi bawah sinar UV 366 nm. Noda memberikan perubahan warna menjadi lebih terang/berfluoresensi. Perubahan yang terjadi ini disebabkan adanya flavonoid. Reaksi antara $AlCl_3$ dengan golongan flavonoid membentuk kompleks dengan gugus hidroksi dan karbonil. Pereaksi semprot $AlCl_3$ bila disemprotkan pada klat KLT yang telah dikeringkan menunjukkan semua 5-hidroksi-flavonoid sebagai bercak berfluoresensi kuning dengan pengamatan dibawah sinar UV 366 nm.

Pengujian aktivitas kombinasi ekstrak daun sirsak dan pegagan dalam melarutkan batu ginjal kalsium dalam penelitian ini menggunakan 7 perlakuan dengan beberapa konsentrasi yaitu kombinasi 1 (DS 1%+DP 7,5%), kombinasi 2 (DS 0,5%+DP 3,75%), kombinasi 3 (DS 0,25%+DP 1,88%), ekstrak tunggal sirsak (1%) dan ekstrak tunggal pegagan (7,5%). Kontrol positif dalam penelitian ini digunakan batugin eliksir yang mengandung ekstrak daun tempuyung. Kontrol positif batugin eliksir yang mengandung ekstrak daun tempuyung dan daun keji beling digunakan karena merupakan salah satu obat yang digunakan dalam pengobatan batu ginjal dengan mekanisme kerja memecahkan atau menghancurkan batu urin atau batu saluran kemih sehingga lebih mempermudah pengeluaran dari dalam tubuh (Wahyudi, 1986). Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades. Akuades dipilih karena merupakan pelarut yang digunakan dalam melarutkan ekstrak etanol dan kontrol positif Batugin eliksir, selain itu penggunaan akuades disini untuk melihat banyaknya kalsium yang terlarut dalam akuades selama proses inkubasi dan pengadukan.

Proses inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 3 jam dan digojog setiap 15 menit. Hal ini dimaksudkan agar kondisi percobaan sedapat mungkin dibuat sama dengan kondisi di dalam tubuh. Alasan dipilihnya suhu 37 °C adalah karena pada umumnya manusia normal memiliki suhu tubuh 37°C. Berdasarkan penelitian Sri Endah (1989) mengenai kelarutan batu ginjal dengan menggunakan pegagan,

diperoleh bahwa hasil bahwa waktu inkubasi yang optimal adalah 3 jam, sehingga digunakan waktu selama 3 jam untuk proses inkubasi. Adapun maksud dari proses pencocokan atau pengadukan setiap 15 menit adalah untuk mendapatkan hasil yang optimal seperti yang terjadi di dalam tubuh saat batu ginjal mengalami pergerakan. Batu ginjal yang ada didalam ginjal mengalami gerakan-gerakan akibat aliran urin, maupun gerakan-gerakan akibat aktivitas dari tubuh manusia (Nisma, 2011).

Hasil inkubasi selama 3 jam diambil sebanyak 10 ml kemudian didestruksi dan dicukupkan volumenya sampai 100 ml. Proses destruksi bertujuan untuk memecah atau memutuskan ikatan unsur logam dengan lainnya, selain itu proses ini juga bertujuan agar terjadi pemecahan kalsium oksalat menjadi kalsium murni yang terukur pada alat spektrofotometer serapan atom (Sastroharmidjojo, 2001). Destruksi dimulai dengan pemanasan rendah yaitu 50-60°C kemudian ditinggikan perlahan-lahan sampai sampel larut sempurna. Proses pemanasan yang dilakukan bertujuan agar membantu mempercepat proses pelarutan atau pemutusan ikatan organik. Metode destruksi yang digunakan adalah metode destruksi basah. Metode ini digunakan karena pengerjaannya lebih sederhana, oksidasi kontinyu dan cepat dan unsur-unsur yang diperoleh mudah larut sehingga dapat ditentukan dengan metode analisis tertentu (Rasyid, Roslinda, 2011). Proses destruksi ini menggunakan asam nitrat sebagai pengoksidasi. Kesempurnaan proses destruksi ini ditandai dengan diperolehnya larutan jernih yang menunjukkan bahwa semua konstituen telah larut sempurna.

Larutan jernih hasil destruksi ini kemudian diencerkan dengan menggunakan akuades sampai 100 ml dengan tujuan agar serapannya dapat terbaca pada alat spektrofotometer serapan atom dan masih berada dalam range kurva baku. Pengukuran kadar kalsium yang terlarut dilakukan pada panjang gelombang 422,7 nm, karena logam kalsium dapat terbaca pada alat spektrofotometer serapan atom pada panjang gelombang 422,7 nm.

Pada penelitian ini digunakan metode spektrofotometer serapan atom karena metode ini tepat untuk melakukan penetapan kadar secara kuantitatif suatu logam dengan adanya bantuan lampu katoda spesifik sebagai sumber radiasi yang mengemisikan sinar pada panjang

gelombang yang tepat dan sama pada proses absorbansi sehinggadapat menentukan kadar suatu atom tertentu karena memang prinsip kerja alat ini berdasarkan pada absorbansi cahaya oleh atom dalam fase uap (Muljadan Suharman,1995). Spektrofotometerserapan atom dapat mendeteksi kalsium hingga kadar paling rendah 0,002 ppm. Pengukuran absorbansi larutan standar dilakukan untuk memperoleh persamaan kurva baku yang digunakan untuk menghitung kadar kalsium yang terlarut. Data absorbansi yang telah didapatkan kemudian dibuat kurva kalibrasi larutan baku kalsium (Lampiran 3).

Hasil rerata kadar kalsium yang terlarut, dilakukan pengolahan data dengan menggunakan metode statistik One Way ANOVA pada taraf kepercayaan 95%. Kemudian dilanjutkan dengan pengujian Duncan untuk mengetahui adanya perbedaan nyata antar perlakuan. Hasil analisis statistik analisis variansi (ANOVA) diperoleh nilai $p < 0,05$ ($p=0,000$) yang berarti adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan. Hal ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan terhadap kelarutan kalsium yang terlarut dan dilanjutkan dengan uji beda rata-rata Duncan untuk mengetahui perbedaan yang bermakna dari rerata kadar kalsium yang terlarut pada setiap perlakuan.

Hasil analisis statistik uji beda rata-rata Duncan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak tunggal sirsak (1%), kombinasi ekstrak 3 (DS 0,25%+DP 1,88%) dan kontrol positif Batugin eliksir menunjukkan perbedaan tidak signifikan dengan kontrol negatif. Namun apabila dilihat berdasarkan kadar kalsium terlarut ketiga perlakuan tersebut lebih besar dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini disebabkan variasi data kadar kalsium terlarut masing-masing replikasi berbeda cukup besar sehingga hasil uji statistik berbeda tidak signifikan.

Ekstrak tunggal pegagan dan kombinasi 1 (DS 1%+DP 7,5%) menunjukkan hasil yang berbeda tidak signifikan namun berbeda signifikan dengan ekstrak tunggal sirsak, kombinasi 3 dan kontrol positif dimana kadar kalsium terlarutnya lebih besar. Hal ini menunjukkan efek yang lebih baik terhadap peluruhan kalsium batu ginjal.

Kombinasi 2 (DS 0,5%+DP 3,75%) menunjukkan hasil yang berbeda signifikan dengan perlakuan lainnya dengan kadar kalsium terlarut yang paling besar dan lebih baik efeknya dibandingkan kontrol positif. Efek

peluruhan kalsium batu ginjal yang optimal diperoleh pada kombinasi 2 karena zat bioaktif dalam jumlah yang tepat sehingga memberikan efek yang optimal.

Kombinasi 3 (DS 0,25%+DP 1,88%) belum memberikan efek yang lebih baik karena kandungan senyawa bioaktifnya yang masih rendah sedangkan kombinasi 1 (DS 1%+DP 7,5%) efeknya juga tidak sebaik yang kombinasi 2 (DS 0,5%+ DP 3,75%) diduga karena adanya zat lain yang ikut tertarik pada saat proses ekstraksi sehingga mengurangi efek peluruhan kalsium batu ginjal.

Ekstrak tunggal pegagan memiliki efek yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak tunggal sirsak diduga karena kadar flavonoid total pada ekstrak pegagan lebih besar dibandingkan ekstrak sirsak. Hal ini sejalan dengan penelitian oleh Ayu (2015) yang menyatakan bahwa kadar flavonoid total ekstrak daun sirsak sebesar 0,663 mg/100 g simplisia sedangkan penelitian oleh Chew *et al* (2011) kadar flavonoid total pada ekstrak daun pegagan sebesar 181,25 mg/100 g simplisia.

Kemampuan kombinasi ekstrak daun sirsak dan pegagan dalam melarutkan kalsium batu ginjal diduga karena adanya kandungan flavonoid yang terdapat didalamnya sesuai hasil uji penapisan fitokimia. Ion kalsium penyusun batu ginjal dapat membentuk senyawa kompleks dengan gugus hidroksil karbonil dengan molekul flavonoid dengan membentuk Ca-flavonoid. Senyawa kompleks ini diduga lebih mudah larut dalam air, sehingga air yang ada dalam urin akan membantu kelarutan batu tersebut (Suharjo, 2009).

Senyawa yang diduga berperan dalam peluruh batu ginjal selain flavonoid adalah kalium. Kalium menyebabkan tumbuhan berkhasiat sebagai diuretik. Kalium akan bereaksi dengan batu ginjal yang berupa kalsium karbonat, karena kalium akan menyingkirkan kalsium untuk bergabung dengan oksalat yang merupakan pembentuk batu ginjal. Endapan batu ginjal tersebut akhirnya larut dan keluar bersama urin (Rasyid, 2011). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa, kombinasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dan pegagan (*Centella asiatica* L. Urb) memiliki aktivitas dalam melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro*, kombinasi ekstrak etanol daun sirsak *Annona muricata* L. dan pegagan *Centella asiatica* L. Urb yang efektif melarutkan kalsium batu ginjal secara *in vitro*

adalah kombinasi ekstrak 2 (DS 0,5%+DP 3,75%).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Staf UPT Laboratorium Kesehatan, yang membantu identifikasi kadar kalsium.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrianto. (2012). *Pengaruh Ekstrak Daun Ciplukan (Physallis peruviana L.) Terhadap Kelarutan Batu Ginjal Kalsium Secara In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional Kimia Unesa. Program Keahlian Analisis Kimia Direktorat Program Diploma. IPB. Bogor.
- Ayu, K.S (2015). *Penetapan kadar Polifenol Total, Flavonoid Total, dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (Annonamuricata) Dari Jember Pada Ketinggian Tanah Yang Berbeda*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Chew. K.K. (2011). *Effect Of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature On The Recovery Of Phenolic Compound and Antioxidant Capacity Of Centella asiatica Extracts*. *Internationan Food Research Journale*.
- Gritter,RJ. Bobbit.JM, dan Saharting.AE, (1991), *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*, Penerbit ITB, Bandung.
- Harbone. (1987). *Tumbuhan Berguna Indonesia (Vol.III)*. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Mardiana, L. Dan Ratnasari, J. (2011). *Ramuan dan Khasiat Sirsak*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Markham,K.R. (1988), *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, diterjemahkan oleh Kosasi Padmawinata,15. Penerbit ITB. Bandung.
- Marshall, Eftinger,B., (2003). *Medical Management of Urolithiasis in Stone Disease*. Public Health. Hal 138-142.
- Nisma, Fatimah. (2011). *Pengaruh Penambahan Ekstrak Etanol 70% Buah*

Anggur Biru (Vitis vinifera L.) Terhadap Kelarutan Kalsium Batu Ginjal. Farmasi FMIPA UHAMKA. Jakarta.

- Rahardjo. (2003). *Pengaruh Infusa Daun Pandan Wangi (Pandanus amaryllifolius Roxb) Terhadap Kelarutan Kalsium Batu Ginjal Secara In Vitro Menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom* (Skripsi). Fakultas Farmasi Universitas Sanata Darma. Yogyakarta
- Rasyid, Roslinda, Mahyuddin, Agustin M. (2011). *Pemeriksaan Kadar Kalsium Dan Natrium Herba Pegagan (Centella asiatica L. Dengan Metode Fotometri Nyala.* Fakultas Farmasi. Universitas Andalas.
- Roopesh, Citrala, Salomi, Ruth, Nagarjuna dan Reddy.(2011). *Diuretic Activity Of Methanolic And Ethanolic Ekstract Centella asiatica Leaves In Rats. Research Journal Of Pharmacy 2 (11), 163-165.* Antapur, India.
- Suhartatik, E. sri (1989). *Pengaruh Infus Daun Pegagan (Centella asiatica L) Terhadap Daya Larut Batu Ginjal Kalsium.* Fakultas farmasi UGM. Yogyakarta.
- Susilawati Triana. (1999). *Daya Melarutkan Fraksi Air dan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Batu Ginjal Kalsium.* Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
- Pearce, C. Evelyn.(2002).*Anatomi Dan Fisiologi Untuk Para Medic.* Jakarta: Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama.
- Wijaya, Sumi dan Farida L. Darsono, (2005). *Uji Daya Antikalkuli Perasan Buah Ketimun (Cucumis sativus L) Terhadap Tikus Putih Jantan Dengan Metode Kalkuli.* Majalah Farmasi Indonesia .
- Yasmin, Elizabeth., (2007). *At a Glance Sistem Ginjal.* (Terjemahan). Penerbit Erlangga. Jakarta.