



Identifikasi kalsium yang terlarut dalam fraksi etil asetat dan air dari daun duduk (*Desmodium triquetrum* (L) DC) secara *in vitro* dengan tehnik aktivasi neutron cepat

The identification on the solubility of calcium in ethyl acetate and water fraction of duduk leaves (Desmodium triquetrum (L) DC) in vitro using the rapid neutron activation tehniqe

Zainul Kamal, M. Yazid dan Rani Sapto Aji

Research Center for the Development of Advances Technology National Nuclear Energy Agency

KEYWORDS *kidney stone; irradiation; reactor; rapid neutron*

ABSTRACT *The study on the solubility of calcium kidney stone in the ethyl acetate and water fraction of Duduk leaves was intended to investigate the efectiveness of the kidney stone solubility. The kidney stone was obtained after surgery, and analyzed applying the infrared spectrophotometer to identify qualitatively the type of kidney stone. The study was performed by dissolving the calcium kidney stone 100 mg in 10 ml fraction of ethyl acetate and water Duduk leaves respectively. The mixtures were shaken and incubated at 370C for 4 hours in a waterbath and were then filtered. The solubility of calcium was determined by the rapid neutron activation tehniqe. The result indicated that calcium solubility in the water fraction was better than that in the ethyl acetate fraction.*

Untuk pengobatan terhadap penyakit oleh masyarakat pada umumnya dipilih cara yang praktis, murah dan diyakini lebih sedikit menimbulkan efek samping dan salah satunya adalah pengobatan menggunakan obat tradisional. Sampai saat ini, pemakaian obat tradisional terutama lebih mendasarkan pada pengalaman atau dugaan-dugaan yang dikomunikasikan secara turun-temurun, akan tetapi belum didasarkan pada hasil penelitian ilmiah, seperti halnya dengan daun Duduk yang dipakai dalam pengobatan penyakit batu ginjal.

Penyakit batu ginjal disebutkan sebagai penyebab kedua tersering yang memicu penyakit gagal ginjal. Karena tergolong memahayakan kesehatan, maka berbagai upaya selalu dilaksanakan untuk mencegah, menghindari dan mengatasi penyakit batu ginjal. Upaya pencegahan paling sederhana dilaksanakan dengan mengatur jenis makanan yang dikonsumsi dan banyak minum air putih serta melakukan olah raga teratur. Namun jika sudah terbentuk batu, maka pengobatan dilakukan dengan operasi,

penyiaran, obat-obatan baik tradisional maupun modern. Dalam pengobatan tradisional untuk peluruhan batu ginjal masyarakat telah mengenal dan menggunakan perasan air berbagai macam tanaman obat diantaranya daun Duduk yang lebih dikenal dengan nama sosor bebek. Selama ini daun Duduk telah diketahui mengandung beberapa bahan aktif antara lain alkaloid, hifaforin, dan tanin (Anonim, 1979; Dalimartha, 1999). Penggunaan daun Duduk sebagai peluruh batu ginjal telah berjalan bertahun-tahun namun data-data ilmiah yang membuktikan kebenaran khasiat daun Duduk belum banyak yang dipublikasikan. Berdasarkan hal tersebut maka dilakukan penelitian mengenai kemampuan daun Duduk sebagai peluruh batu ginjal secara *in vitro* dengan menggunakan pelarut air dan etil asetat.

Correspondence:

Zainul Kamal, Research Center for the Development of Advances Technology National Nuclear Energy Age, Kotak Pos 1008, Yogyakarta.

Dari hasil penelitian diharapkan dapat memperluas dan mengembangkan pemanfaatannya sebagai obat tradisional yang mempunyai data yang kuat serta pemakaiannya yang benar-benar dapat diper-tanggungjawabkan.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Duduk yang sudah tua (*Desmodium triquetrum* (L) DC) dan batu ginjal kalsium yang diperoleh dari hasil operasi di suatu rumah sakit.

Alat

Satu perangkat unit Analisis Pengaktifan Neutron Cepat (APNC) yang terdiri dari generator neutron type J-25-150 keV (SEMES).

Cara Kerja

Pembuatan ekstrak daun Duduk

Daun Duduk yang telah dicuci bersih, dikeringkan di bawah sinar matahari dan ditutup dengan menggunakan kain hitam. Daun Duduk yang sudah berupa serbuk setelah kering diayak dengan ayakan 5/8, sehingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Serbuk daun ditimbang sebanyak 30,0 gram dan dibungkus dengan kertas saring sedemikian rupa sehingga dapat ditempatkan pada alat sokhlet. Serbuk diekstraksi dengan 150 ml petroleum eter dengan pemanasan pada suhu 500 C hingga pelarut tak berwarna lagi. Serbuk yang sudah kering, dibuat fraksi air dan fraksi etil asetat.

Uji kandungan kimia fraksi etil asetat dan fraksi air dengan kromatografi lapis tipis (KLT)

Larutan fraksi etil asetat dan fraksi air diambil masing-masing sebanyak 7,5 ml dan diuapkan dalam cawan porselin di atas penangas air, hingga tinggal kurang lebih 2 ml, lalu ditambah 10 ml etanol dan disaring. Filtrat dipakai untuk uji kromatografi lapis tipis.

Kedua fraksi diteteskan pada selulosa sebagai fase diam lalu dielusui dengan fase gerak, campuran n-butanol, asam asetat, air dengan

perbandingan 4:1:5 v/v, dengan jarak 10 cm. Pembanding yang digunakan untuk identifikasi flavonoida adalah rutin. Untuk penampakan bercak digunakan UV 366 mm, uap amoniak dan disemprotkan AICI₃. Hasil yang diperoleh dibandingkan dengan yang dikemukakan oleh Gritter pada tahun 1991.

Analisis kualitatif batu ginjal dengan spektrofotometer inframerah

Batu ginjal digerus dalam mortir sampai halus dan ditimbang sebanyak 1 - 3 mg serta kemudian ditambahkan sebanyak 300 mg KBr, lalu diaduk sampai halus dan homogen. Campuran dibuat tablet dengan tekanan ± 10.000 pounds per square inch (psi) selama 10 menit, sehingga diperoleh tablet yang jernih (tembus cahaya) dan siap untuk dianalisis. Spektrogram yang didapat dibandingkan dengan spektrogram baku (Daudon, 1978).

Perendaman batu ginjal

Larutan fraksi etil asetat dan fraksi air dibuat dalam berbagai konsentrasi, yaitu 10%, 12,5%, 15%, 17,5% dan 20%.

Dari setiap konsentrasi larutan yang telah dibuat diambil sebanyak 10,0 ml dan dipergunakan untuk merendam 100,0 mg batu ginjal. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasikan dalam inkubator pada 37°C selama 4 jam yang merupakan cara baku, dan digoncang-goncangkan pada waktu-waktu tertentu. Setelah diinkubasikan, larutan disaring, filtrat yang didapat dianalisis kadar kalsiumnya dengan teknik analisis aktivasi neutron cepat (Pujoraharjo, 1994; Darsono, 1998).

Pengukuran kadar kalsium batu ginjal terlarut dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun Duduk (*Desmodium triquetrum* (L) DC)

Kalsium standar dan filtrat hasil perendaman batu ginjal pada masing-masing fraksi dengan berbagai konsentrasi sebesar 10%, 12,5%, 15%, 17,5% dan 20% dimasukkan dalam kuvet yang kemudian diaktivasi selama 30 menit. Setelah selesai diaktivasi, maka sampel diambil untuk dicacah dengan spektrofotometer *gamma*.

Hasil pencacahan berupa intensitas dan energi *gamma* dari kalsium pada fraksi etil asetat

dan fraksi air daun Duduk serta kalsium standar. Hasil pengukuran kemudian dianalisis.

HASIL

Uji kromatografi lapis tipis

Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoida dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun Duduk yang diduga sebagai zat aktif yang berperan dalam melarutkan kalsium batu ginjal maka dilakukan uji kromatografi lapis tipis menurut Markham (1988) dan Gritter (1991). Sebagai pembanding flavonoida digunakan rutin, karena di dalam rutin terdapat flavonoida sebagai bahan baku dan kromatogram yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 1.

Bercak pada Gambar 1 dideteksi dengan sinar UV dengan panjang gelombang (λ) sebesar 366 nm dan akan terlihat warna yang khas, karena struktur flavonoida mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi dan hasilnya disajikan pada Tabel 1

Hasil analisis batu ginjal dengan spektrofotometer inframerah, yang disajikan dalam Gambar 2 dan 3 menunjukkan spektrogram dengan puncak-puncak yang khas untuk masing-masing batu ginjal. Dengan membandingkan spektrogram baku (Daudon, 1978) dan hubungan antara ikatan yang bervibrasi dengan bilangan gelombang maka komposisi batu ginjal bisa diketahui. Spektrogram hasil beserta spektrogram baku dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.

Dari hasil analisis kandungan batu ginjal dapat disimpulkan bahwa batu ginjal uji termasuk jenis *apatite*, *struvite*, *brushite*, *calcite* yang mengandung unsur kalsium, maka batu ginjal ini dapat dipakai dalam penelitian.

Kalsium batu ginjal yang terlarut dalam fraksi etil asetat dan fraksi air daun Duduk setelah diaktivasi menggunakan neutron cepat 14,5 MeV (Mega Elektron Volt) menunjukkan adanya energi *gamma* di daerah energi 511 ke-V yang berasal dari peluruhan radioisotop $Ca^{44}(n,2n)Ca^{44}$. Hasil yang diperoleh disajikan dalam Tabel 3 dan Gambar 4

PEMBAHASAN

Fase diam yang digunakan adalah selulosa, karena selulosa merupakan fase yang paling efektif untuk memisahkan flavonoida dan tidak mengandung logam, sehingga dapat menghindari terjadinya reaksi antara flavonoida dengan logam yang stabil terhadap asam. Fase gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol, asam asetat dan air dengan perbandingan 4:1:5 v/v, sedangkan sebagai pembandingnya digunakan rutin dengan jarak pengembangan 10 cm. Pemberian uap amonia menyebabkan gugus hidroksi flavonoida terionisasi, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang yang diserap dan mengakibatkan perubahan warna.

Pemberian pereaksi berupa semprotan $AlCl_3$ memberikan warna kuning, karena logam aluminium membentuk kompleks dengan gugus hidroksi pada posisi ortho, gugus hidroksi karbonil dan atau gugus ortho - glikosil.

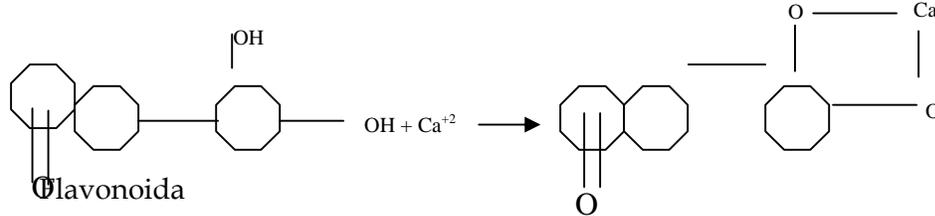
Dari hasil yang disajikan dalam Gambar 1 dan Tabel 1 maka bercak-bercak yang ditemukan kemungkinannya adalah flavonoida.

Batu ginjal kalsium yang terlarut dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dianalisis dengan teknik aktivasi neutron cepat. Penggunaan analisis aktivasi neutron cepat (APNC) sebagai metode untuk mengukur kadar kalsium batu ginjal terlarut karena neutron tidak bermuatan, sehingga tidak dapat mengionisasi medium dan mampu menembus inti atom kalsium batu ginjal yang terlarut dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun Duduk tanpa dipengaruhi oleh gaya-gaya Coulomb yang ada.

Dengan teknik aktivasi neutron cepat, inti atom kalsium akan mengalami eksitasi atom dan inti terganggu akan menjadi radioaktif. Untuk kembali ke keadaan dasarnya inti akan mengalami peluruhan dengan memancarkan radiasi. Radiasi yang dipancarkan dari inti yang tereksitasi dapat berupa pancaran radiasi sinar *alfa*, *beta* atau *gamma*.

Di alam, kalsium berada dalam 6 bentuk isotop dengan nomor massa 40, 42, 43, 44, 46 dan 68. Isotop yang mempunyai kelimpahan terbesar

adalah isotop dengan nomor massa 40, yaitu 96,64% energi sebesar 511 Ke-V, dan isotop bernomor massa 44 kelimpahannya 2,08% dengan energi sebesar 1156,82 Ke-V. sehingga dimungkinkan kalsium yang terkandung dalam batu ginjal adalah isotop Ca40 dan Ca44.



Fraksi air daun Duduk mempunyai kemampuan melarutkan kalsium batu ginjal yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi etil asetat dari daun Duduk, karena jenis dan jumlah flavonoida yang dapat membentuk kompleks dengan batu ginjal dalam fraksi air duduk lebih banyak daripada dalam fraksi etil asetat dari daun duduk.

Ada perbedaan konsentrasi pada analisis kalsium batu ginjal terlarut untuk kelompok percobaan fraksi etil asetat dan fraksi air pada konsentrasi sebesar 10%, 12,5%, 15%, 17,5% dan 20% v/v. Variasi kadar dalam fraksi etil asetat dan fraksi air tersebut akan dipengaruhi kadar kalsium batu ginjal yang terlarut. Dalam fraksi air daun Duduk, yaitu dengan kadar 12,5% dan 17,5% telah terjadi penurunan kelarutan kalsium batu ginjal. Hal ini mungkin disebabkan oleh adanya hambatan kerja flavonoida dalam melarutkan batu ginjal. Dalam fraksi air, kelarutan kalsium batu ginjal dalam flavonoida paling tinggi pada kadar 20% adalah sebesar 459,16 mg/ml, sedangkan dalam fraksi etil asetat paling tinggi pada kadar 10% adalah sebesar 124,34 mg/ml.

Berdasarkan hasil yang diperoleh yang disajikan pada Tabel 3 dan Gambar 4 maka ada kemungkinan bahwa fraksi air dan fraksi etil asetat dari daun Duduk bisa melarutkan kalsium batu ginjal dan dalam hal ini diharapkan dapat digunakan sebagai alternatif lain untuk pengobatan peluruh batu ginjal. Mekanisme kelarutan kalsium batu ginjal dalam fraksi air dan etil asetat dari daun Duduk kemungkinan terjadi melalui pembentukan

Mekanisme reaksi kalsium batu ginjal oleh fraksi etil asetat dan fraksi air daun Duduk terjadi melalui pembentukan kompleks antara flavonoida dengan kalsium yang terdapat di dalam batu ginjal dengan reaksi berikut.

komplek antara flavonoida dengan ion kalsium batu ginjal.

KESIMPULAN

1. Fraksi air dari daun Duduk (*Desmodium triquetrum* (L) DC) mempunyai kemampuan untuk melarutkan kalsium batu ginjal yang lebih baik daripada fraksi etil asetat.
2. Fraksi air dari daun Duduk (*Desmodium triquetrum* (L) DC) memiliki daya melarutkan kalsium batu ginjal tertinggi pada kadar 20%, sedangkan fraksi etil asetat pada kadar 10%.
3. Zat aktif yang terkandung dalam fraksi air dan fraksi etil asetat ekstrak dari daun Duduk (*Desmodium triquetrum* (L) DC) yang berperan dalam melarutkan kalsium batu ginjal kemungkinan adalah flavonoida.

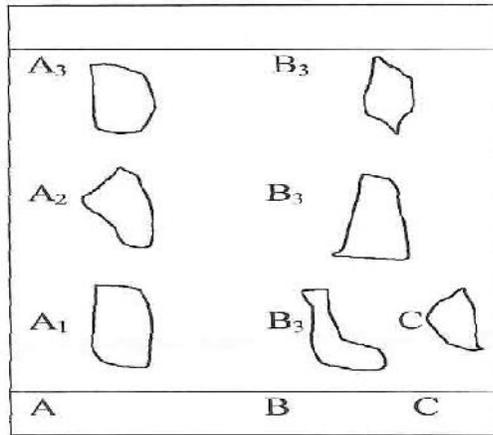
UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Anifa Tri Martina atas bantuannya dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim 1979. *Materia Medika Indonesia III*, 71, 73, 76, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Dalimartha S 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia I*, 41, 42, 43, Trubus Agriwijaya BATAN, Yogyakarta.
- Darsono 1998. *Pengenalan dan Aplikasi Akselerator*, 1-23, Pusat Pendidikan dan Pelatihan BATAN, Yogyakarta.
- Daudon M, Prostat MF, Reveilaud RJ 1978. *Analyse des Calcus par Spectrophotometrie Infrarouge, Avantages et Limites de la Methode*, vol. 36, 475-489, Ann. Biol. Clin, France.
- Gritter RJ 1991. *Pengantar Kromatografi*, Edisi II, 107, 108, 109, 125, ITB Press, Bandung.

- Markham KR 1988. *Cara mengidentifikasi Flavonoida*, 1, 2, 5, 6, 7, 7, 15, ITB Press, Bandung.
- Pudjoraharjo SD 1994. *Petunjuk Praktikum aktivasi Neutron Cepat*, Bidang Fisika Nuklir dan Atom, PPNY BATAN, Yogyakarta



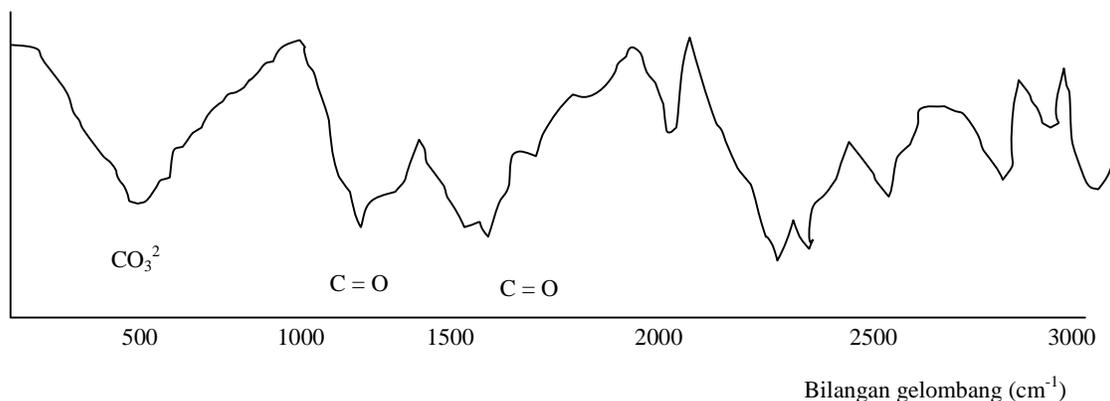
Gambar 1. Kromatografi fraksi air, fraksi etil asetat dari daun Duduk dan rutin
 Nilai Rf : A1 = 0,51 , A2 = 0,67 , A3 = 0,88
 : B1 = 0,48 , B2 = 0,72 , B3 = 0,90

Keterangan:
 A = Fraksi air B = Fraksi etil asetat C = rutin (sebagai pembanding)
 Rf = Retention factor

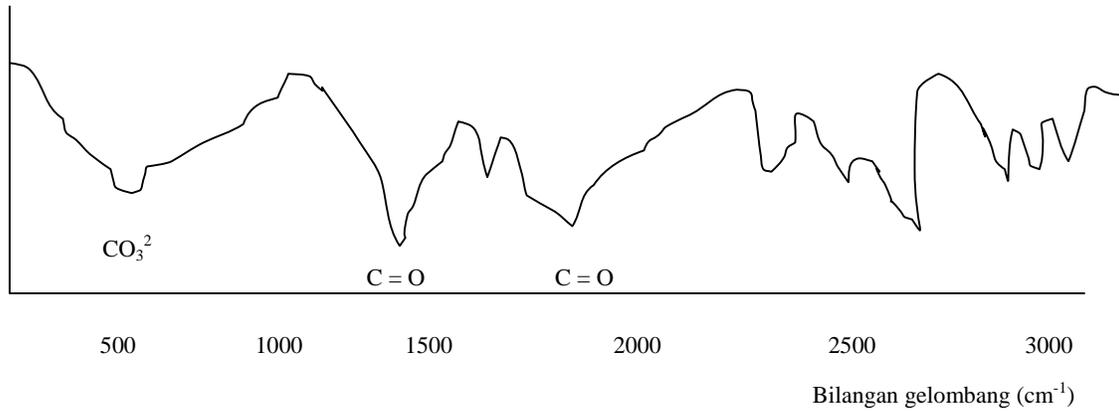
Tabel 1. Data kromatografi lapis tipis dari fraksi air dan fraksi etil asetat dari daun Duduk

Sampel	Harga Rf	Warna bercak		
		UV 366 nm	NH3 / UV 366 nm	AlCl3
Fraksi air	A1 = 0,51	Kuning	Kuning	Kuning
	A2 = 0,67	Biru muda	Biru muda	Kuning
	A3 = 0,88	Ungu gelap	Ungu gelap	Kuning
Fraksi etil asetat	B1 = 0,48	Kuning Hijau	Kuning Hijau	Kuning
	B2 = 0,72	Hijau Biru	Hijau Biru	Kuning
	B3 = 0,90	Ungu gelap	Ungu gelap	Kuning
Rutin	C = 0,53	Ungu gelap	Ungu gelap	Kuning

Keterangan :
 A = Fraksi air B = Fraksi etil asetat C = rutin (sebagai pembanding)
 Rf = Retention factor



Gambar 2. Spektrogram Batu Ginjal Uji



Gambar 3. Spektrogram Batu Ginjal Standar yang sesuai

Tabel 2. Hubungan antara ikatan yang bervibrasi dengan bilangan gelombang

Ikatan yang bervibrasi	Tipe vibrasi	Posisi bilangan gelombang cm-1		Keterangan
		Daerah Umum	Daerah Khusus	
O-H	Tekuk		1675; 1625	Struvite
			1647	Brushite
	Tekuk (osilan)		875; 760; 690	Struvite
N-H	Ulur	3330 - 2800		Struvite, urate, D'ammonium
NH ₃	Ulur	3130 - 3030		Cystine
	Tekuk	1660 - 1610	1620	Cystine
CO ₃ -2			1435 - 1415	Calcite
			1465; 1415	Carbapatite
	Ulur (asim)	1200 - 950	1095	Apatite
	Ulur (asim)		1000,985,965	Struvite
	Tekuk	640 - 550	600	Apatite
P-OH	Alur		870	Brushite

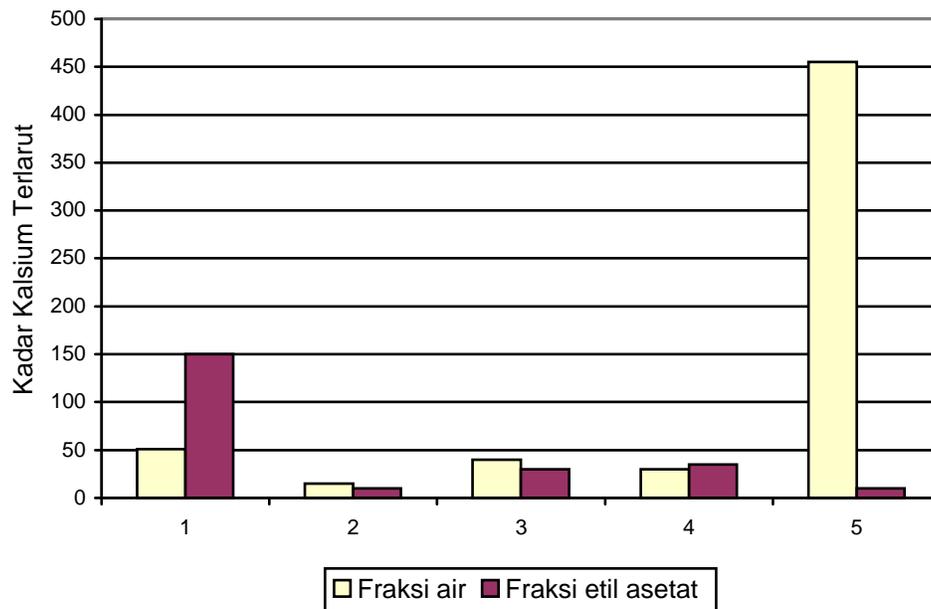
Keterangan :

OH : Hidroksida NH : Nitrogen Hidroksida NH₃ : Nitrogen Tri Hidroksida
 CO₃ : Carbon Tri Oksida POH : Fosfor Hidroksida

Tabel 3. Cacah Kalsium, Waktu Tunda, Energi dan Kadar Kalsium Batu Ginjal Terlarut

No	Kadar Fraksi	Cacah Kalsium (CPS)	Waktu Tunda (detik)	Energi (Ke-V)	Kadar Kalsium (mg/ml)
1	Standar	0,90	786	1342,64	500
2	Air 10%	0,99	129	1351,90	67,02
3	Air 12,5%	0,43	254	1352,08	14,78
4	Air 15%	1,60	381	1375,63	36,68
5	Air 17,5%	0,89	626	1348,69	18,62
6	Air 20%	3,47	66	1338,21	459,16
7	Etil asetat 10%	0,84	59	1355,21	459,16
8	Etil asetat 12,5%	0,64	951	1352,70	5,88
9	Etil asetat 15%	0,96	311	1361,71	26,96
10	Etil asetat 17,5%	1,00	436	1269,77	22,43
11	Etil asetat 20%	0,81	562	1333,88	10,12

Keterangan : CPS = Cacah persekon
KE - V = Kilo Elektron Volt



Gambar 4. Histogram dari hubungan antara kadar kalsium batu ginjal terlarut dalam fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun Duduk.

Keterangan : Fraksi 1 : Kadar 10% fraksi air / fraksi asetat
Fraksi 2 : kadar 12,5% fraksi air / fraksi asetat
Fraksi 3 : kadar 15% fraksi air / fraksi asetat
Fraksi 4 : kadar 17,5% fraksi air / fraksi asetat
Fraksi 5 : kadar 20% fraksi air / fraksi asetat