

Perbandingan Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Roscoe. Var. Rubrum), Gingerol dan Shogaol sebagai Anti-Toksoplasma terhadap Parasit *Toxoplasma Gondii* Secara *In-Vitro*

Comparison of Red Ginger Extracts, Gingerols and Shogaol as Anti-Toxoplasma Activity againsts *Toxoplasma Gondii* In Vitro

Penulis	Siti Sa'diah ^{1,2*} , Effionora Anwar ³ , Mahdi Jufri ³ , Umi Cahyaningsih ⁴
Afiliasi	¹ Departemen Anatomi Fisiologi & Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University, Bogor, Jawa Barat, 16680, Indonesia. ² Pusat Studi Biofarmaka Tropika, IPB University, Indonesia. ³ Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia, Depok, Jawa Barat, 16424, Indonesia. ⁴ Departemen Ilmu Penyakit Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan, IPB University, Bogor, Jawa Barat, 16680, Indonesia.

ABSTRAK

Metode ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan akan berdampak pada proses penarikan komponen aktif sehingga akan berpengaruh juga pada aktivitasnya. Jahe merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) merupakan salah satu bahan rempah yang juga berpotensi sebagai tanaman obat. Salah satu khasiat ekstrak jahe merah adalah sebagai anti toksoplasma. Pada penelitian ini telah dilakukan pembuatan ekstrak jahe merah dengan dua jenis metode yaitu maserasi dan sokhletasi masing-masing menggunakan tiga jenis pelarut (etanol 30%, etanol 70% dan etanol 96%) sehingga diperoleh enam jenis ekstrak. Kemudian masing-masing ekstrak ditentukan kadar senyawa pencirinya meliputi 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol dan 6-shogaol dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Selanjutnya ekstrak diuji aktivitas antitoksoplasma secara *in vitro* terhadap parasit *Toxoplasma gondii* pada fase takhizoit yang ditumbuhkan pada sel vero. Penentuan aktivitas antitoksoplasma juga dilakukan pada senyawa murni 6, 8, 10-gingerol dan 6-shogaol serta kontrol positif antibiotik spiramisin. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% dengan metode maserasi adalah yang paling baik aktivitasnya dan 6-gingerol adalah senyawa penciri yang paling berperan sebagai anti-toksoplasma.

ABSTRACT

The extraction method and the type of solvent used will affect the process of the active component transfer so that it will also affect its activity. Red ginger (Zingiber officinale var. Rubrum) is one of the ingredients of spices which also has the potential as a medicinal plant. One of the benefits of red ginger extract is as anti-toxoplasma. In this study, red ginger extract was made with two types of methods, namely maceration and soxhletation, each using three types of solvents (30% ethanol, 70% ethanol and 96% ethanol) to obtain six types of extracts. Then each extract was determined of the active compound including 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol and 6-shogaol by HPLC method. The extract was then tested for anti-toxoplasma activity in vitro against Toxoplasma gondii parasites in the takhizoite phase grown on vero cells. Determination of anti-toxoplasma activity was also carried out on pure compounds 6, 8, 10-gingerol and 6-shogaol as well as positive control of Spiramycin antibiotics. The results show that 96% ethanol extract by maceration method is the best activity and 6-gingerol is a characteristic compound which has the most role as anti-toxoplasma.

Kata Kunci

- Anti-toksoplasma
- Gingerol
- Shogaol
- *Toxoplasma gondii*
- *Zingiber officinale* var. rubrum

Keywords

- Anti-toxoplasma
- Gingerol
- Shogaol
- *Toxoplasma gondii*
- *Zingiber officinale* var. rubrum

Diterima 2 Agustus 2019
Direvisi 28 Oktober 2019
Disetujui 4 November 2019

*Penulis Koresponding
Siti Sa'diah
email: sitisa@apps.ipb.ac.id



PENDAHULUAN

Rimpang jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) yang dikenal di Indonesia ada 3 jenis, yaitu jahe gajah/*white ginger* (*Z. officinale* Roscoe)/ yang umum digunakan sebagai bahan rempah untuk memasak, jahe emprit/*small white ginger* (*Z. officinale* Roscoe varian *Amarum*) dan jahe merah/*red ginger* (*Z. officinale* Roscoe varian *Rubrum*) (Adnyana dan Suciyati 2017). Jahe emprit dan jahe merah umum digunakan sebagai bahan baku obat tradisional karena memiliki rasa yang lebih pedas. Rasa pedas ini berkaitan dengan kadar gingerol dan shogaolnya yang tinggi (Heryani dan Winarti 2001). Gingerol dan shogaol merupakan komponen non-minyak atsiri dari rimpang jahe yang banyak berperan dalam memberikan efek farmakologis diantaranya antiinflamasi dan analgesik (Kim et al. 2005), anti apoptosis yang kuat (Kim et al, 2007), dan antifungal (Ficker et al. 2003).

Penelitian yang dilakukan Choi et al (2013) membuktikan bahwa ekstrak metanol *Zingiber officinale* dan fraksinya efektif terhadap *Toxoplasma gondii* secara *in vitro*. Pelarut metanol merupakan pelarut universal yang umumnya digunakan sebagai pelarut pengekstraksi senyawa bahan alam karena memiliki titik didih rendah sehingga lebih mudah dalam proses penguapan pelarut. Namun demikian, pelarut metanol bersifat toksik dibandingkan etanol (Pohanka 2016), sehingga pengkajian kembali potensi ekstrak jahe sebagai anti-toksoplasma dengan etanol sebagai pelarut pengekstraksi akan menjadi sebuah kebaruan. Untuk mendapatkan ekstrak etanol dengan potensi yang mendekati ekstrak metanol perlu dilakukan optimasi dengan metode ekstraksi dan konsentrasi etanol yang berbeda.

METODE

Bahan

Rimpang jahe merah segar asal Kabupaten Bogor, metanol (PT. Bratachem, Indonesia), etanol 96% (PT. Bratachem, Indonesia), standar 6-gingerol (Sigma,

Jerman), standar 8-gingerol (Sigma-Jerman), 10-gingerol (Sigma-Jerman), 6-shogaol (Sigma-Jerman), akuades, akuabides, asetonitril (Sigma-Jerman), ekstrak jahe merah komersial (PT. Javaplant, Indonesia), kertas saring Whatman 0,45 µm, fase diam C18, asetonitril (Sigma-Jerman), *Buffered Peptone Water*/BPW (Gibco, USA), *Nutrient Agar* (Gibco, USA), *Potatoes Dextrose Agar*/PDA (Gibco, USA), agar *Eosin Methylen Blue*/EMB (Gibco, USA), isolat takhizoit (BBBALITVET, Indonesia), *Dulbecco's phosphate buffered saline*/PBS (Gibco, USA), *Dulbecco's Modifield Eagle Medium*/DMEM (Gibco, USA), *Fetal Bovine Serum*/FBS (Gibco, USA), Penisillin (Sigma, Jerman), Steptomycin (Sigma, Jerman), Spiramycin (Kimia Farma, Indonesia), trypan blue, glutamin, (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5(3-carboxy methoxy phenyl)-2-(4-sulfofenil)-2 tetrazolium (Sigma-Jerman).

Preparasi Ekstrak Jahe Merah

Rimpang jahe merah (asal Kabupaten Bogor) dikupas dan dicuci bersih dengan air mengalir selanjutnya diiris melintang dengan ketebalan 0,3 – 0,5 cm lalu dikeringkan dengan oven pengering suhu 50°C hingga kering. Jahe kering kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus. Serbuk jahe merah masing-masing diekstraksi dengan pelarut metanol (3) dan pelarut etanol dengan metode maserasi dan sokletasi. Preparasi ekstraksi jahe seperti yang tampak pada Tabel 1.

Standardisasi dan Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak

Standardisasi dilakukan terhadap serbuk simplisia rimpang jahe merah meliputi kadar air, kadar abu, kadar abu tak larut asam, cemaran logam berat, cemaran mikroorganisme dan uji organoleptik. Sedangkan pada ekstrak dilakukan penentuan kadar air dan kadar senyawa aktif 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol dan 6-shogaol. Parameter yang diamati mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes RI 2008).

Tabel 1. Preparasi Ekstraks Jahe Merah

Kode Ekstrak	Pelarut	Perbandingan Jahe:Pelarut	Metoda Ekstraksi
JM	Metanol	1:5	Maserasi 24 jam
JE30	Etanol 30%	1:5	Maserasi 48 jam, Sokletasi 8 jam
JE70	Etanol 70%	1:5	Maserasi 48 jam, Sokletasi 8 jam
JE96	Etanol 96%	1:5	Maserasi 48 jam, Sokletasi 8 jam

Keterangan :

JM= Ekstrak jahe merah dengan pelarut metanol, JE30=ekstrak jahe merah dengan pelarut etanol 30%,

JE70= Ekstrak jahe merah dengan pelarut etanol 70%, JE96= Ekstrak Jahe merah dengan pelarut etanol 96%



Tabel 2. Komposisi Fase Gerak untuk Penentuan 6-, 8-, 10-gingerol, dan 6-shogaol

Waktu(menit)	Akuabides(%)	Asetonitril(%)
0	60	40
10,0	60	40
40,0	10	90
40,5	0	100
45,0	0	100
45,5	60	40
50,0	60	40

Penentuan Kadar 6-.8-,10-gingerol dan 6-shogaol Ekstrak Jahe Merah

(Lee *et al.* 2007; Schwertner dan Deborah 2007)

Penentuan Larutan Standar 6-.8-,10-gingerol dan 6-shogaol

Larutan standar 6-gingerol 1000 ppm, 8-gingerol 500 ppm, 6-shogaol 1000 ppm, dan 10-gingerol 1000 ppm disiapkan masing-masing sebanyak 10 mL dalam metanol. Larutan kemudian dipipet sebanyak 5 mL; dan diencerkan pada labu 100, ditera dengan metanol. Campuran kemudian disonikasi selama 30 menit, kemudian didiamkan selama 15 menit, dan disonikasi kembali selama 30 menit kemudian disaring menggunakan kertas Whatman 0,45um, lalu diinjeksikan pada alat KCKT (UFLC-Shimadzu, Japan).

Preparasi Larutan Sampel

Ekstrak jahe merah sebanyak ±100 mg dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL, ditambahkan metanol untuk KCKT sebanyak 80 mL, kemudian campuran disonikasi sampai larut. Larutan tersebut disaring dengan kertas saring Whatman no. 41 ke dalam labu takar 100 mL, kemudian diimpitkan sampai tanda tera dengan metanol untuk KCKT. Larutan dalam labu takar 100 mL disaring menggunakan kertas saring Whatman 0,45 µm. Larutan sampel dan standar 6-, 8-, 10-gingerol, serta 6- shogaol dianalisis dengan KCKT Shimadzu LC 20A (UFLC-Shimadzu, Japan). Fase diam digunakan C18, dan fase gerak yang digunakan ialah gradien asetonitril dengan akuabides (Tabel 2). Laju alirnya 1 mL/menit. Panjang gelombang yang digunakan untuk deteksi ialah 280 nm.

Uji *In vitro* Ekstrak Jahe Merah

(Kavitha *et al.* 2012)

Pengujian *in vitro* dilakukan pada 13 sampel yang terdiri dari ekstrak metanol jahe merah (JM), 6 jenis ekstrak jahe merah hasil maserasi dan sokletasi, 4 senyawa murni yaitu 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol dan 6-shogaol, ekstrak komersial (PT. Javaplant), dan antibiotik spiramisin. Semua perlakuan dilakukan dengan 3 kali ulangan. Tahap prosedurnya meliputi:

Kultur Takhizoit: Takhizoit dari galur RH virulen *T. gondii* (dalam PBS/ *phosphate buffered saline*), pH 7,2, diberikan secara intraperitoneal pada mencit putih. Kemudian dalam interval 3-4 hari asites cairan diambil dari peritoneal mencit. Asites cairan yang diperoleh dari mencit yang terinfeksi disentrifugasi pada 200 rpm selama 10 menit pada suhu kamar untuk mengangkat sel inang dan puing-puing. Supernatan, yang berisi situs parasit, dikumpulkan dan disentrifugasi pada 1000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci dengan PBS, pH 7,2 dan kemudian di media DMEM tanpa serum janin sapi (FBS/*Fetal Bovine Serum*). Kelangsungan hidup parasit dievaluasi menggunakan *trypan blue* dalam waktu tidak lebih dari 30-40 menit sejak cairan asites diambil dari peritoneum. Selanjutnya pengujian *in vitro* dilakukan menggunakan sel Vero. Sel Vero dikultur dalam medium DMEM ditambah dengan 10% FBS, glutamin (2 RAM), penisilin (100 unit/ml) dan streptomisin (100 mg/ml). Sel-sel dikultur pada inkubator dengan kelembaban CO₂ 5% dan temperatur 37°C.

Uji Aktivitas Anti-Toksoplasma *In Vitro*

(Kavitha *et al.* 2012)



Tabel 3. Karakteristik Simplisia Jahe Merah

No	Parameter	Hasil	Rujukan (FHI)	Satuan	Metode
1	Rendemen	12,5		%	Gravimetri
2	Kadar air	4,40	<10	%	Gravimetri
3	Kadar abu	4,37	<5	%	Gravimetri
4	Kadar abu tak larut asam	1,65	< 2	%	Gravimetri
5	Cemaran As	Tidak terdeteksi	Negatif		AAS
	Logam berat Pb	Tidak terdeteksi	< 0,001	ppm	
6	Cemaran Angka Lempeng total	0,007	< 0,03	ppm	Kultur
	Mikroba Patogen/ <i>E.coli</i>	$3,7 \times 10^2$	< 10^7	kol/g	
	Kapang	Negatif	Negatif		
7	Bau	$3,4 \times 10^2$	< 10^4	kol/g	Pancaindera
	Rasa	Khas	khas Aromatik		
7	Uji Organoleptik Warna	Agak pedas	Agak pedas		
	Penampakan	Coklat kehijauan	Coklat muda-hingga coklat tua		
			Serbuk	-	

Sel Vero dipanen selama pertumbuhan eksponensial (hari 2) dalam pelat sumur 96 (ca. 6×10^4 sel/ml). Kemudian, 3×10^5 parasit/ml ditambahkan ke masing-masing pelat sumur (parasit : rasio sel = 5: 1, akhir volume 200 μ l). Enam jam setelah inokulasi, sel-sel yang terinfeksi dicuci dua kali dengan medium DMEM tanpa FBS untuk menghilangkan parasit tidak baik. Setelah 12 jam inkubasi, medium DMEM dengan FBS 2% ditambahkan ke masing-masing sumur plat, dan ekstrak/spiramisin kemudian ditambahkan pada konsentrasi yang sama (50 μ g/ml). Setelah 48 jam pengobatan, viabilitas *T. gondii* ditentukan menggunakan MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-5-(3-carboxy methoxy phenyl)-2-(4-sulfofenil)-2 tetrazolium) assay. Sebanyak 10 μ l MTT konsentrasi 5 ppm ditambahkan pada masing-masing sumur lalu campuran diinkubasi selama 4 jam. Medium DMEM kemudian dibuang dan diganti masing-masing dengan 100 μ l etanol untuk melisis sel. Selanjutnya plat sumur 96 dibaca menggunakan *Elisa reader* (Bio-Rad, California, USA) pada panjang gelombang 490 nm.

Sel vero yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sel line yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*) ATCC[®] 1587TM koleksi Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LPPM IPB. Prosedur pemeliharaan sel vero mengacu pada teknik yang dilakukan di PSSP. Adapun isolat takhizoit sebagai agen toksoplasma merupakan koleksi yang dimiliki

laboratorium parasitologi Balai Besar Penelitian Veteriner (BBalitvet).

Morfologi sel vero tunggal berbentuk bulat dan dalam perkembangannya sel vero yang dinkubasi dalam inkubator dengan kadar CO₂ 5% akan membelah diri dan menempel di dasar *flash* hingga membentuk jaringan yang rapat (konfluen 100%) seperti tampak di Gambar 3. Ketika memulai pemeliharaan sel vero dari kondisi yang dibekukan dengan nitrogen cair, untuk mencapai konfluen diperlukan waktu sekitar 5 hari. Tapi pada proses selanjutnya waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan sel vero semakin cepat sehingga setiap 2 hari sekali perlu dilakukan subkultur (memisahkan sel yang sudah konfluen menjadi sel tunggal kemudian sebagian besar sel dibuang, dan sebagian kecil ditanam ulang dalam media yang baru). Waktu yang diperlukan untuk mencapai kondisi yang rapat (konfluen 100%) sangat dipengaruhi konsentrasi jumlah sel dan volume media tanam. Semakin sedikit jumlah sel yang ditanam dengan volume media yang besar maka akan semakin lama waktu yang diperlukan untuk mencapai konfluen tersebut. Dalam sumur plat96, dengan 5000 sel per 200 μ l media, waktu untuk mencapai 100% konfluen adalah lebih dari 48 jam.

Pengolahan Data

Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan perlakuan terhadap viabilitas sel



Tabel 4. Karakteristik Ekstrak Jahe Merah dengan Variasi Pelarut dan Metoda Ekstraksi

Ekstrak	Rendemen (%)	Kadar Air (%)	Kadar Abu (%)
JM	8,99	3,01	0,67
JE30M	11,47	3,90	0,52
JE70M	9,42	3,39	0,62
JE96M	8,89	3,36	0,69
JE30S	9,26	2,81	0,45
JE70S	10,21	2,88	0,65
JE96S	7,01	3,37	0,63

Keterangan:

JM=pelarut metanol (maserasi 24 jam); JE30M=pelarut etanol 30% (maserasi 48 jam); JE70M=pelarut etanol 70% (maserasi 48jam); JE96M=pelarut etanol 96% (maserasi 48jam); JE30S=pelarut etanol 30% (Sokletasi 8 jam); JE70S=pelarut etanol 70% (Sokletasi 8jam); JE96S=pelarut etanol 96% (Sokletasi 8jam).

dilakukan dengan *one way Anova* dan dilanjutkan dengan uji Duncan.

HASIL & PEMBAHASAN

Karakteristik Simplisia dan Ekstrak Jahe Merah

Karakteristik simplisia jahe merah yang dihasilkan seperti terangkum pada Tabel 3 secara umum telah memenuhi persyaratan Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes RI 2008) dan SNI rimpang Jahe. Karakterisasi simplisia perlu dilakukan sebagai bagian dari proses standardisasi dan keajegan khasiat dari bahan alam.

Karakteristik ekstrak jahe merah yang dihasilkan dari perbedaan konsentrasi pelarut dan metoda ekstraksi secara organoleptik karakteristiknya tidak jauh berbeda seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4. Degradasi warna ekstrak dari coklat muda hingga menjadi coklat tua tampak dengan semakin meningkatnya konsentrasi pelarut etanol. Variasi nilai rendemen selain adanya perbedaan komponen metabolit yang dapat tertarik oleh pelarut juga dipengaruhi oleh proses penyaringan hasil ekstraksi dan juga penguapan pelarut pengekstraksi. Bila diamati hasil kadar air yang relatif tidak berbeda artinya proses penguapan pelarut telah sempurna. Jika mengacu pada Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes RI 2008), bahwa rendemen ekstrak jahe merah tidak kurang dari 6,6%, kadar air tidak lebih dari 11%, dan kadar abu tidak lebih dari 1,0%, maka hasil yang diperoleh pada penelitian ini dengan perbedaan jenis pelarut dan metode ekstraksi masih menghasilkan ekstrak jahe merah yang memenuhi kriteria Farmakope Herbal Indonesia. Rendemen yang tinggi umumnya akan berkorelasi dengan tingginya komponen senyawa aktif yang dapat ditarik oleh pelarut tersebut. Kadar

senyawa aktif akan sangat dipengaruhi oleh umur tanaman ketika dipanen dan lokasi tempat tumbuh tanaman tersebut. Dalam hal ini jahe merah yang diperoleh dari petani di Kabupaten Bogor memiliki kadar senyawa aktif yang cukup tinggi. Jahe merah termasuk jenis tanaman yang sudah budidayakan sehingga peluang untuk mendapatkan jahe merah yang memenuhi kriteria yang diharapkan cukup mudah diperoleh. Waktu panen Jahe merah rata-rata pada usia tanam 7 bulan (Litbang Pertanian 2000). Kadar air akan berpengaruh pada umur simpan ekstrak. Semakin rendah kadar airnya, akan semakin kecil kerusakan ekstrak oleh cemaran mikroorganisme. Adapun kadar abu menunjukkan kandungan mineral pada ekstrak. Jika kadar abu sangat tinggi, kemungkinan ada cemaran logam dari unsur tanah yang mungkin terbawa pada saat pengolahan simplisia. Unsur mineral yang terkandung pada tanaman jahe yang utama adalah Kalium, Natrium, Mangan, dan Ferrum (Fe) (Ravindran 2005).

Kadar 6-gingerol, 8-gingerol, 6-gingerol dan 10-gingerol Ekstrak Jahe Merah

Penentuan kadar metabolit sekunder ekstrak jahe dilakukan terhadap 4 jenis metabolit yang diduga berperan dalam sejumlah aktivitas farmakologi. Senyawa 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, dan 6-shogaol dianalisis menggunakan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) karena merupakan senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap. Pemisahan terjadi disebabkan oleh perbedaan interaksi komponen dengan fase gerak dan fase diam, yang ditentukan oleh tingkat kepolaran senyawa (Harvey 2000). Pada penentuan kadar gingerol ini digunakan kolom C18 sebagai fase diam dan untuk fase geraknya

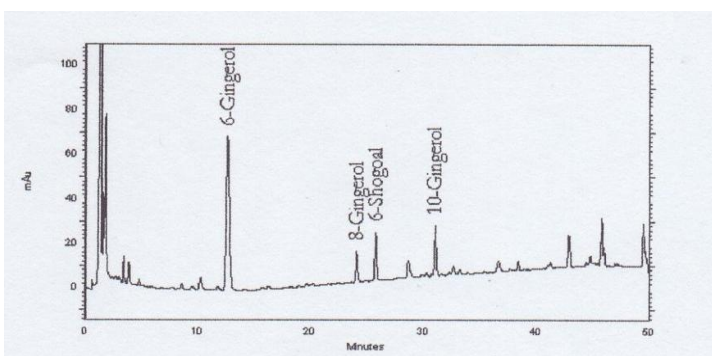


menggunakan kombinasi asetonitril:air. Analisis kualitatif dilakukan berdasarkan waktu retensi, sedangkan analisis kuantitatif dilakukan berdasarkan luas puncak yang dibandingkan dengan standar. Perbedaan panjang gelombang pengukuran tidak mengubah urutan waktu retensi senyawa gingerol dan shogaol namun berpengaruh pada besarnya puncak yang dihasilkan (He *et al.* 1998; Lee *et al.* 2007). Pada panjang gelombang 280 nm puncak yang dihasilkan dapat lebih tinggi dibandingkan pada panjang gelombang 230nm (He *et al.* 1998). Urutan senyawa gingerol berdasarkan waktu retensi jika digunakan kolom C-18 dan eluen asetonitril: akubides (60:40) berurut-turut adalah 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol dan 10-gingerol (6;12). Namun urutan waktu retensi berbeda dihasilkan jika digunakan eluen eluen metanol: akudes (65:35) menjadi berturut-turut 6-gingerol, 6-shogaol, 8-gingerol dan 10-gingerol (Schwertner dan Deborah 2007). Dengan demikian perbedaan jenis kolom dan jenis eluen serta gradien eluen dapat menyebabkan terjadinya perbedaan waktu rentensi senyawa aktif sedangkan panjang gelombang yang optimal berdampak pada puncak yang lebih tinggi dan luas area puncak yang lebih lebar. Pada penelitian ini, prosedur yang digunakan mengacu pada metode Lee *et al.* (2007) dengan bentuk kromatogram yang dihasilkan seperti tampak pada Gambar 1a, namun dilakukan pada panjang gelombang 280 nm seperti yang dilakukan oleh He *et al.* (1998) dan Schwertner & Rios (2007). Kromatogram standar keempat metabolit yang dihasilkan menunjukkan waktu retensi 6-, 8- dan 10-gingerol berturut-turut adalah pada menit ke 12,8; 24,2, dan 31,3; sedangkan 6-shogaol pada waktu retensi 25,9 menit (Gambar 1b), Luas puncak standar 6-, 8- dan 10-gingerol berturut-turut adalah 473702, 253835 dan

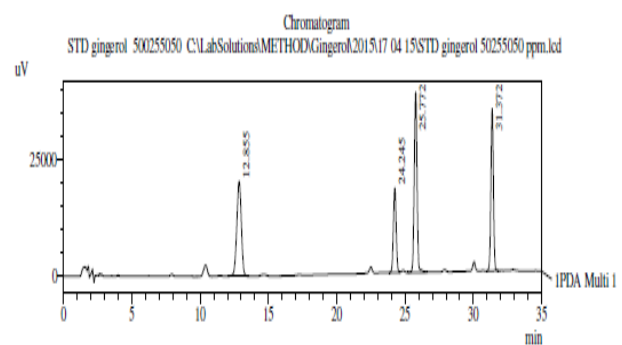
438796 sedangkan 6-shogaol luas areanya sebesar 542585. Luas puncak standar ini menjadi salah satu faktor yang dibutuhkan dalam perhitungan kadar metabolit sampel ekstrak jahe merah.

Kadar senyawa aktif ekstrak jahe merah dengan pelarut pengestraksi yang berbeda menunjukkan bahwa kadar 6-gingerol merupakan senyawa yang paling dominan dibanding 3 komponen aktif lainnya baik dengan metode maserasi maupun sokletasi (Gambar 2). Jika dibandingkan pengaruh konsentrasi pelarut etanol terhadap kadar senyawa aktifnya maka pada metode maserasi 48 jam, pelarut etanol 96% mampu menarik keempat komponen senyawa aktif lebih tinggi dibandingkan pelarut etanol 70% dan etanol 30%. Semakin rendah konsentrasi pelarut, kadar keempat senyawa aktifnya juga semakin kecil. Berbeda dengan metoda sokletasi (pemanasan 8 jam) pelarut etanol 98% dan etanol 70% mampu menarik 6-gingerol dengan kadar yang hampir sama tingginya yaitu sebesar 11,44 ppm dan 11,40 ppm, demikian juga dengan kadar 8-gingerol dan 6-shogaol juga hampir sama, namun untuk kadar 10-gingerol sama halnya dengan metoda maserasi, pelarut etanol 96% dapat menarik jauh lebih tinggi dibandingkan dua pelarut lainnya.

Apabila membandingkan metoda ekstraksi dengan jenis pelarut yang sama, maka metoda sokletasi 8 jam mampu menarik komponen aktif lebih tinggi dibandingkan metode maserasi 48 jam pada pelarut etanol 30% dan etanol 70%. Namun pelarut etanol 96% dengan metode maserasi 48 jam masih lebih tinggi kandungan aktifnya dibandingkan dengan metoda sokletasi 8 jam. Hal ini menunjukkan bahwa tingkat kepolaran etanol 30% dan etanol 70% lebih rendah dibandingkan polaritas senyawa gingerol sehingga



(a)



(b)

Gambar 1. Kromatogram standar campuran 6-,8-,10-gingerol dan 6-shogaol; (a) Rujukan urutan waktu retensi penelitian Lee *et al.* (2007), (b) hasil pengukuran dengan kolom C-18 dan eluen asetonitril:akuabidest (60:40) pada λ 280 nm.



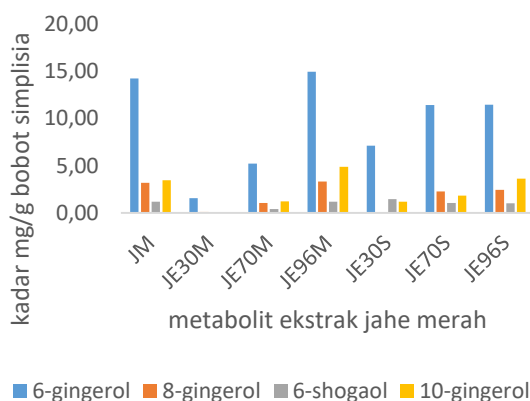
perlu bantuan pemanasan untuk dapat meningkatkan ekstraksinya. Penggunaan pelarut etanol 96% faktor pemanasan tidak terlalu berpengaruh pada proses ekstraksi bahkan dengan maserasi 48 jam senyawa aktif dapat tertarik lebih tinggi dibanding sokletasi 8 jam. Struktur kimia gingerol dan shogaol (Gambar 3) memiliki 1 buah cincin benzena dengan lebih dari 6 buah rantai karbon sehingga tidak terlalu polar (Bhattarai dan Duke 2001).

Gingerol dapat terkonversi menjadi shogaol atau zingeron selama proses pemanasan (Wohlmuth *et al.* 2005). Kecepatan degradasi dari 6-gingerol menjadi 6-shogaol tergantung pada pH, stabilitas terbaik pada pH 4, sedangkan pada suhu 100°C dan pH 1 justru perubahan degradasi relatif cukup cepat (Bhattarai dan Duke 2001). Jika mengacu pada pendapat ini kadar shogaol pada proses sokhletasi seharusnya lebih tinggi dibandingkan pada proses maserasi. Hasil ini tampak pada pelarut etanol 30% dan etanol 70%, namun tingginya kadar shogaol ini tidak berkorelasi dengan lebih rendahnya kadar 6-gingerol pada proses

maserasi. Demikian juga pada pelarut etanol 96%, sekalipun 6-gingerol pada metode sokhletasi lebih rendah daripada metode maserasi, namun kadar shogaol pada metode sokhletasi tidak lebih tinggi dibandingkan dengan metode maserasi. Dugaan hal ini terjadi karena faktor pH tidak diperhatikan selama proses pembuatan ekstrak tersebut.

Proses ekstraksi sangat memengaruhi efisiensi hasil ekstrak yang diperoleh. Penggunaan perbandingan pelarut dalam penelitian ini tidak ada perbedaan antara maserasi dan sokletasi. Metode maserasi yang sangat sederhana dan tidak memerlukan energi sudah mampu menarik komponen aktif lebih tinggi dibandingkan sokletasi yang memerlukan suhu lebih tinggi walaupun waktu ekstraksi lebih singkat sehingga secara efisiensi energi metode maserasi lebih menguntungkan dibandingkan metode sokhletasi.

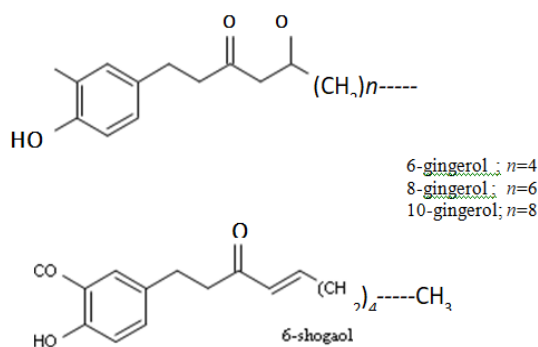
Menurut Lee *et al.* (2007), metanol dapat menghasilkan kadar 6-, 8-,10-gingerol dan 6-shogaol paling tinggi dibandingkan pelarut air, air:metanol (50:50), etanol dan heksana menggunakan metode



Gambar 2. Grafik perbandingan komposisi kadar 6-gingerol (biru), 8-gingerol (merah), 6-shogaol (hijau),10-gingerol (ungu) ekstrak jahe merah dengan variasi pelarut dan metoda ekstraksi

Keterangan:

JM=pelarut metanol (maserasi 24 jam); JE30M=pelarut etanol 30% (maserasi 48 jam); JE70M=pelarut etanol 70% (maserasi 48jam); JE96M=pelarut etanol 96% (maserasi 48jam); JE30S=pelarut etanol 30% (Sokletasi 8 jam); JE70S=pelarut etanol 70% (Sokletasi 8jam); JE96S=pelarut etanol 96% (Sokletasi 8jam).



Gambar 3. Struktur kimia gingerol dan shogaol
[Sumber: Battharai *et al.* 2001, telah diolah kembali]

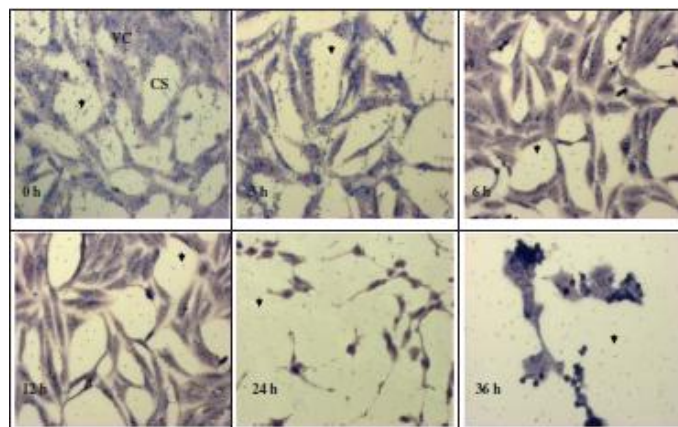


maserasi selama 24 jam. Kadar 6-gingerol yang diperoleh Lee *et al* tersebut, lebih rendah (9,7 mg/g pada ekstrak metanol dan 8,9 mg/g pada ekstrak etanol) dibandingkan yang diperoleh pada penelitian ini. Hal ini mungkin dapat terjadi karena yang digunakan pada penelitian ini adalah jahe merah sedangkan pada penelitian Lee *et al.*(2007) adalah jahe putih. Kandungan aktif jahe merah lebih tinggi dibandingkan jahe gajah/*white ginger*/jahe putih besar (Heryani dan Winarti 2001).

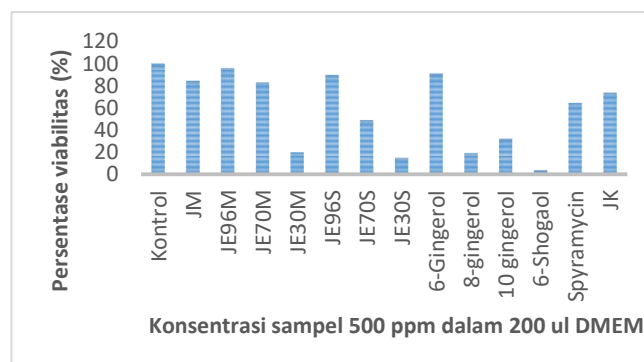
Hasil yang diperoleh Lee *et al.* (2007) juga mendukung hasil yang diperoleh pada penelitian ini yaitu bahwa kadar 6-gingerol jauh lebih tinggi dibandingkan 3 komponen aktif lainnya. Pada penelitian ini tampak bahwa pelarut etanol 96% dengan metode maserasi 48 jam mampu menghasilkan kadar keempat metabolit sekunder yang lebih tinggi dibandingkan pelarut metanol dengan maserasi 24 jam. Tetapi apabila dibandingkan terhadap 2 pelarut lainnya yaitu etanol 30% dan etanol 70% baik dengan metode

maserasi maupun sokletasi, pelarut metanol masih lebih tinggi. Oleh karenanya jika mengacu hanya pada kadar keempat metabolit sekunder yang paling tinggi, maka yang terbaik adalah pelarut etanol 96% dengan maserasi 2 kali lebih lama (48 jam) dibandingkan dengan pelarut metanol. Penggunaan etanol 96% ini lebih aman digunakan sebagai bahan aktif obat jika digunakan secara per-oral.

Berdasarkan rumus molekulnya, 6-, 8- dan 10-gingerol berbeda jumlah gugus metilnya, yaitu berturut-turut 4, 6 dan 8 gugus metil, artinya semakin banyak gugus metil kepolarannya semakin menurun. Pada penelitian ini tampak bahwa polaritas gingerol lebih mendekati etanol 96% dibandingkan etanol 30% dan 70%. Di antara ketiga senyawa gingerol tersebut 6-gingerol adalah yang paling polar sehingga yang paling banyak tertarik dibandingkan 2 senyawa gingerol lainnya.



Gambar 4. Sel vero yang diinfeksi takhizoit pada jam ke 0,3,6,12,24 dan 36. (VC) sel vero, (\blacktriangledown) takhizoit (Kavitha *et al.* 2012)



Gambar 5. Viabilitas sel vero yang terinfeksi takhizoit setelah diberikan perlakuan dengan konsentrasi 50 ppm dalam 200ul DMEM dan diinkubasi selama 48 jam

Keterangan:

JM=pelarut metanol (maserasi 24 jam); JE30M=pelarut etanol 30% (maserasi 48 jam); JE70M=pelarut etanol 70% (maserasi 48jam); JE96M=pelarut etanol 96% (maserasi 48jam); JE30S=pelarut etanol 30% (Sokletasi 8 jam); JE70S=pelarut etanol 70% (Sokletasi 8jam); JE96S=pelarut etanol 96% (Sokletasi 8jam).



Aktivitas Anti-toksoplasma (*in vitro*)

Pada penelitian ini Sel vero yang merupakan sel line yang berasal dari ginjal monyet hijau afrika (*African green monkey*) ATCC[®] 1587TM koleksi Pusat Studi Satwa Primata (PSSP) LPPM IPB digunakan sebagai tempat tumbuhnya sel takhizoit karena takhizoit merupakan parasit yang bersifat intraseluler (hidup di dalam sel). Hampir semua sel jaringan dapat ditumbuhi takhizoit seperti jaringan otak, paru-paru, hati (Al-Zanbagi 2009).

Isolat takhizoit *T. gondii* merupakan agen penyakit yang bersifat zoonosis yang dapat menginfeksi hewan dan juga manusia, maka untuk keamanan bagi peneliti dan juga lingkungan, penelitian uji *in vitro* dengan sel takhizoit ini harus dilakukan di laboratorium mikrobiologi dengan tingkat keamanan minimal standar ke 2 (*Biosafety Level 2*).

Bentuk sel takhizoit berbeda dengan sel vero. Takhizoit memiliki bentuk seperti bulan sabit dengan ukuran jauh lebih kecil dibanding sel vero dan bentuk tersebut dapat diamati pada pembesaran minimal 40X. Mengingat takhizoit dapat mengkontaminasi sel hidup, maka perlakuan harus dilakukan dalam laboratorium mikrobiologi khusus untuk infeksius dan terpisah dengan laboratorium kultur sel normal. Takhizoit jika diinfeksi pada sel normal, maka parasit ini akan masuk ke dalam sel dan memakan sel normal tersebut hingga selnya habis. Pada perbandingan jumlah sel parasit terhadap sel vero 5:1, sel vero akan habis termakan parasit takhizoit dalam waktu 48 jam. Berbeda dengan kontaminasi oleh bakteri yang menimbulkan kekeruhan pada media hanya dalam waktu 24 jam, infeksi takhizoit pada sel vero tidak menimbulkan kekeruhan pada jam ke 24, karena semua sel parasit masih berada di dalam sel vero. Kekeruhan akan muncul ketika sebagian besar sel vero telah habis sehingga kelebihan sel takhizoit akan terapung dalam media. Bentuk morfologi sel vero yang terinfeksi *T. gondii* seperti tampak pada Gambar 4.

Hasil perlakuan uji *in vitro* terhadap sel vero yang telah diinfeksi takhizoit menunjukkan bahwa ekstrak dengan pelarut etanol 30% baik secara maserasi maupun sokhletasi menghasilkan persentasi kematian sel vero tertinggi hingga lebih dari 80%, artinya ekstrak tersebut tidak memiliki efektivitas untuk menghambat pertumbuhan takhizoit akibatnya takhizoit terus mematikan sel vero hingga viabilitas sel atau jumlah sel yang hidup menjadi rendah. Aktivitas ekstrak dengan pelarut 30% ini jika dikaitkan dengan komponen aktifnya (Gambar 2) cukup berkorelasi karena kadarnya juga paling rendah dibandingkan 2 pelarut pengekstraksi

lainnya. Aktivitas ekstrak dengan pelarut metanol, etanol 96% dan juga etanol 70% berdampak positif sebagai anti-toksoplasma, yang ditandai dengan nilai viabilitas lebih dari 100%, yang berarti terjadi pertumbuhan sel vero lebih tinggi dibandingkan kondisi normalnya.. Jumlah sel vero yang lebih tinggi dibandingkan kontrol normal tanpa infeksi takhizoit dimungkinkan terjadi karena pada kontrol normal setelah inkubasi 48 jam kondisinya menjadi terlalu konfluen sehingga medium kurang mencukupi kebutuhan nutrisi sel yang menyebabkan kematian sel. Sel vero yang diberi takhizoit dapat menyebabkan kematian sel, namun ketika diberikan ekstrak yang dapat mematikan takhizoit, maka sel vero yang hidup dapat menjadi lebih banyak. Persentase viabilitas sel vero setelah perlakuan dapat diamati pada Gambar 5.

Hasil analisis secara statistik menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% maserasi (JE96M) secara signifikan lebih efektif dibandingkan ekstrak-ekstrak lainnya bahkan juga lebih baik dibandingkan senyawa tunggal 6-gingerol karena viabilitas sel vero lebih tinggi. Dengan demikian JE96M berpotensi untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai anti-toksoplasma.

SIMPULAN

Ekstrak jahe merah yang diproses menggunakan pelarut etanol 96% baik dengan cara maserasi maupun sokhletasi menunjukkan aktivitas anti-toksoplasma yang paling baik dibandingkan ekstrak dengan pelarut etanol 30% dan 70%. Ekstrak etanol 96% dengan cara maserasi mampu menghasilkan kadar 6-gingerol yang lebih tinggi dibandingkan dengan cara sokletasi. Senyawa aktif yang paling berperan sebagai anti-toksoplasma adalah 6-gingerol dibandingkan 8, 10 gingerol dan juga shogaol. Oleh karena itu Ekstrak jahe merah dengan pelarut etanol 96% yang diproses dengan cara maserasi lebih potensial untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai anti-toksoplasma. Metoda ekstraksi jahe merah yang efektif sebagai antitoksoplasma ini telah didaftarkan paten dengan nomor registrasi P00201810635.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada Pusat Studi Biofarmaka Tropika yang telah mendanai penelitian ini melalui skim penelitian internal sebagai Pusat Unggulan IPTEK (PUI- PT) dengan sumber dana dari Kemenristek Dikti.



DAFTAR PUSTAKA

- Adnyana IK, & Suciwati SW. 2017. Red ginger (*Zingiber officinale* Roscoe var *Rubrum*): a review. *Pharmacology On Line*. 2:60–65.
- Al-Zanbagi NA. 2009. In vivo effect of some home spices extracts. *Journal Family Community Med*. 16(2);59–65.
- Bhattarai S, Tran VH, dan Duke CC. 2001. The stability of gingerol and shogaol in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 90:1658-1664.
- Choi WH, Jiang MH, & Chu JP. 2013. Antiparasitic effects of *Zingiber officinale* (ginger) extract against *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Biomedicine*. 11(1); 15–26.
- Harvey D. 2000. *Modern Analytical Chemistry*. Ed ke-1. Amerika (US): The McGraw-Hill Companies, Inc.
- He XG, Bernart MW, Lian LZ, Lin LZ. 1998. High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Mass Spectrometric Analysis Of Pungent Constituents Of Ginger. *Journal Of Chromatography*. 796:327-334.
- Heryani, Winarti C. 2001. Kandungan bahan aktif jahe dan pemanfaatannya dalam bidang kesehatan, status teknologi hasil penelitian jahe, www.balitro.litbang.pertanian.go.id
- Kavitha N, Noordin R, Chan KL, & Sasidharan S. 2012. In vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity of root extract/fractions of *Eurycoma longifolia* Jack. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 12(1);91. Doi:10.1186/1472-6882-12-91.
- Kementerian Kesehatan RI. 2008 Karakteristik simplisia jahe merah, Farmakope Herbal Indonesia, edisi I, Jakarta.
- Lee S, Khoo C, Halstead CW, Huynh T, Bensoussan A. 2007. Liquid Chromatographic Determination of 6-, 8-, 10-gingerol and 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) as the raw herb and dried aqueous extract. *Journal of AOAC International*. 90(5):1219-1226.
- Litbang Pertanian. 2000. Budi daya Jahe, sumber: Sistem Informasi Manajemen Pembangunan di Pedesaan, BAPPENAS, editor Kemal Prihatman. <http://nad.litbang.pertanian.go.id/ind/images/dokumen/modul/18-BUDIDAYA%20JAHE.pdf>
- Pohanka M. 2016. Toxicology and the biological role of methanol and ethanol: Current view. *Biomedical Papers*. 160(1):54–63.
- Ravindran PN, and Babu KN. 2005. *Ginger the Genus Zingiber*, RC Press, New York. 87-90.
- Schwertner HA, Deborah C, Rios. 2007. High-performance liquid chromatographic dietary supplements, spices, teas, and beverages. *Journal of Chromatography B*. 856(1-2): 41-47.
- Wohlmuth H, Leach DN, Smith MK, dan Myers SP. 2005. Gingerol content of diploid and tetraploid clones of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 53:5772-5778.

