

Uji Aktivitas Antiinflamasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein

(Anti-Inflammation Activity Test of Nanoparticles Ethanol Extract of Temulawak Rhizome (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) with Protein Denaturation Inhibition Method)

YUNAHARA FARIDA^{1*}, DENI RAHMAT¹, AGI WIDIA AMANDA¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Pancasila, Srengseng Sawah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640, Indonesia

Diterima 7 Mei 2018, Disetujui 10 September 2018

Abstrak: Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) dikenal memiliki banyak manfaat untuk kesehatan sebagai antibakteri, antiinflamasi, antidiabetes dan antikanker. Tujuan dari penelitian ini untuk membandingkan aktivitas antiinflamasi dari ekstrak rimpang temulawak dengan nanopartikelnya. Ekstrak rimpang temulawak dibuat dengan maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% (v/v). Ekstrak dibuat menjadi nanopartikel dengan metode gelasi ionik dimana menggunakan kitosan dan tripolifosfat. Uji antiinflamasi *in vitro* dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein. Hasil uji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein pada ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak menunjukkan bahwa ekstrak memiliki aktivitas antiinflamasi. Hasil menunjukkan nilai rata-rata penghambatan denaturasi protein (IC₅₀) dari ekstrak 521,67±5,80 bpj sedangkan nilai IC₅₀ dari nanopartikel ekstrak rimpang temulawak yang diuji yaitu 398,02±1,78 bpj. Sehingga hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak rimpang temulawak lebih baik daripada ekstrak rimpang temulawak.

Kata kunci: Temulawak, ekstrak, nanopartikel, antiinflamasi, denaturasi protein.

Abstract: Javanese turmeric rhizome (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*) has been known to have many health benefits as antibacterial, anti-inflammatory, antidiabetic and anticancer. The purpose of this study was to compare the anti-inflammatory activity of temulawak rhizome extract with its nanoparticles. Temulawak rhizome extract was obtained by maceration using 96% (v/v) ethanol as a solvent. The extracts were made into nanoparticles by ionic gelation method which used chitosan and tripolyphosphate. The results of anti-inflammatory activity test using a method of inhibiting protein denaturation showed the percentage of inhibition of protein denaturation (IC₅₀) of the extract of temulawak rhizome of 521.67±5.80 ppm while the IC₅₀ of the nanoparticles was 398.02±1.78 ppm. Accordingly, the anti-inflammatory activity of the nanoparticles was better than the extract of temulawak rhizome.

Keywords: *Temulawak*, extract, nanoparticles, anti-inflammatory, protein denaturation.

* Penulis korespondensi, HP 081317639394
e-mail: yunahara.faridah@nivpancasila.ac.id

PENDAHULUAN

TEMULAWAK diketahui memiliki banyak khasiat, salah satu khasiat temulawak adalah antiinflamasi. Rimpang temulawak mengandung kurkuminoid, yaitu suatu zat yang terdiri dari campuran komponen senyawa yang bernama kurkumin, desmetoksikurkumin, bidesmetoksikurkumin, dihidrokurkumin, dan heksahidrokurkumin. Kandungan kurkuminoid pada temulawak mempunyai khasiat yaitu dapat digunakan sebagai antioksidan dan hepatoprotektif, antikanker, gastroprotektif, antihiperlipidemik dan antiinflamasi. Kurkumin yang merupakan komponen utama dalam kurkuminoid dapat berfungsi dalam aktivitas biologi sebagai antiinflamasi dengan cara menghambat aktivasi NF- κ B yang berperan penting dari ekspresi COX-2^(1,2).

Rimpang temulawak dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (v/v). Ekstrak kental rimpang temulawak dapat dibuat menjadi nanopartikel dengan basis kitosan-Na tripolifosfat. Metode yang digunakan dalam pembuatan nanopartikel ekstrak temulawak adalah metode “buttop up” dengan teknik gelasi ionik. Teknik gelasi ionik yang melibatkan ikatan sambung silang antara kitosan dan sodium tripolifosfat dapat meningkatkan kestabilan dari nanopartikel yang terbentuk⁽³⁾.

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dari senyawa aktif dapat dilakukan dengan metode penghambatan denaturasi protein menggunakan Bovin Serum Albumin. Hal ini karena, denaturasi protein pada jaringan adalah salah satu penyebab inflamasi. Panas dapat digunakan untuk mempengaruhi ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik non polar karena panas meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul yang menyusun protein bergerak sangat cepat sehingga mengacaukan ikatan hidrogen. Selain itu, pemanasan akan membuat protein berubah kemampuan mengikat airnya. Energi panas akan mengakibatkan terputusnya interaksi non-kovalen yang ada pada struktur alami protein tetapi tidak memutuskan ikatan kovalennya yang berupa ikatan peptida. Proses ini terjadi pada rentang suhu yang sempit. Penghambatan denaturasi protein diketahui dengan pengukuran serapan secara spektrofotometri UV-Vis. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi dan dapat dijadikan sebagai nilai acuan untuk pengembangan obat⁽⁴⁾.

Pada penelitian ini akan dibandingkan aktivitas antiinflamasi ekstrak rimpang temulawak dengan bentuk nanopartikelnya sehingga dapat diketahui bentuk yang efektif dari ekstrak untuk pengembangan

sediaan farmasinya. Nanopartikel berbasis kitosan diharapkan dapat mempunyai luas permukaan yang besar terhadap interaksi dengan lingkungan yang berguna bagi aktivitas penghambatan denaturasi protein oleh panas.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb.*), etanol, kitosan, asam asetat glasial, propilen glikol, dimetil sulfoksida, natrium tripolifosfat, *bovine serum albumin* (BSA), tris base, NaCl, asam asetat glasial, natrium diklofenak, *aquadest*.

METODE. Determinasi Tanaman. Determinasi Tanaman dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Botani, Herbarium Bogoriense, Pusat Penelitian Biologi, LIPI, Cibinong, Bogor.

Pembuatan Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak. Bahan yang digunakan adalah rimpang diperoleh dari Balitro, Bogor dan pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96% secara maserasi berulang. Ditimbang sejumlah 500 g serbuk simplisia kemudian dimaserasi dengan 5 liter etanol 96% (v/v) selama 6 jam lalu didiamkan selama 24 jam. Hasil maserasi disaring dan dilakukan maserasi kembali sebanyak 10 kali dengan etanol 96% (v/v). Filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan rotavapor vakum. Penapisan fitokimia dilakukan pada ekstrak untuk mengetahui adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, steroid dan triterpenoid, minyak atsiri, kumarin^(5,6).

Pembuatan Nanosuspensi dari Ekstrak Etanol 96% Rimpang Temulawak. Kitosan sebanyak 1 g dilarutkan dalam 100 mL asam asetat glasial 1% menggunakan magnetik stirrer sehingga diperoleh konsentrasi kitosan 1% (b/v). Sebanyak 500 mg ekstrak etanol temulawak ditambahkan pelarut campur (20 mL propilenglikol : 20 mL etanol 70% : 20 mL DMSO 10%) dan 100 mL air. Kemudian ditambahkan larutan kitosan 1% (b/v) sebanyak 40 ml sehingga konsentrasi kitosan menjadi 0,2%. Campuran tersebut diaduk dengan menggunakan magnetic stirrer selama 10 menit. Selanjutnya ditetesi dengan 20 mL odium-TPP 0,4% ditetaskan dengan kecepatan 1 tetes / 3 detik dengan buret dan dalam *magnetic stirrer* 300 rpm hingga terbentuk nanopartikel yang ditandai dengan kekeruhan yang homogen. Pengadukan dilanjutkan selama 15 menit agar didapat suspensi nanopartikel ekstrak temulawak yang stabil. Pada suspensi nanopartikel ekstrak etanol temulawak dilakukan kestabilan selama 5 hari meliputi warna, kekeruhan dan endapan⁽³⁾.

Pembuatan Serbuk Nanopartikel Ekstrak Temulawak dengan Pengering Semprot (*Spray Drying*). Suspensi nanopartikel ekstrak temulawak dikeringkan dengan menggunakan pengering semprot (*spray dryer*) pada suhu inlet 160 °C.

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi *In Vitro*. Pembuatan pereaksi:

Pembuatan *Tris Buffer Saline* (TBS). Sebanyak 4,35 g NaCl dilarutkan dalam 200 ml aquadest, ditambahkan 605 mg Tris Base dicukupkan dengan air sampai 400 ml. Selanjutnya pH diatur dengan penambahan asam asetat glasial hingga pH 6,3, kemudian dicukupkan dengan air sampai 500 mL.

Pembuatan 0,2% BSA dalam TBS. Sebanyak 0,2 g *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian ditambahkan dengan larutan TBS hingga volume 100 mL⁽⁷⁾.

Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak sebagai Kontrol Positif. Sebanyak 25,0 mg natrium diklofenak dilarutkan dalam labu tentukur 25 mL dengan *aquadest* dicukupkan hingga volume 25 mL, sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 1000 bpj. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 500, 250, 125, 62,5 dan 31,3 bpj.

Pembuatan Kontrol Negatif. Sebanyak 500 µl aquadest ditambahkan dengan larutan BSA 0,2% dalam TBS ke dalam labu tentukur hingga volume 5 mL.

Pembuatan Larutan Ekstrak Temulawak. Sebanyak 200,0 mg ekstrak dilarutkan dalam labu tentukur 25 ml dengan aquadest dicukupkan hingga volume 25 ml, sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 8000 bpj. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 4000, 2000, 1000, 500 dan 250 bpj.

Pembuatan Larutan Kontrol Blanko. Larutan kontrol blanko yaitu *aquadest*.

Pengujian Aktivitas Antiinflamasi. Pembuatan Larutan Uji. Larutan uji dipipet 500 µL larutan ekstrak temulawak yang kemudian ditambah larutan BSA 0,2% hingga volume 5 mL sehingga didapatkan varian konsentrasi menjadi 800, 400, 200, 100, 50 dan 25 bpj.

Pembuatan Larutan Kontrol Positif. Larutan kontrol positif 500 µL larutan natrium diklofenak yang kemudian ditambahkan dengan larutan BSA 0,2% hingga volume 5 ml sehingga didapatkan variasi konsentrasi menjadi 100, 50, 25, 12,5, 6,25 dan 3,13 bpj.

Setiap larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ±25 °C lalu dipanaskan selama 5 menit pada suhu ±72 °C dengan water bath, kemudian didinginkan selama 25 menit pada suhu ruang dan diukur absorbannya dengan spektrofotometer UV-

visible pada panjang gelombang 660 nm.

Perhitungan Persentase Penghambatan Denaturasi Protein.

Persentase penghambatan denaturasi protein diukur dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = (\text{absorbansi kontrol negatif} - \text{absorbansi larutan uji}) / (\text{absorbansi kontrol negatif}) \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung dengan membuat persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y). Pada uji inhibisi ini, jika dihasilkan % inhibisi > 20% dianggap memiliki aktivitas antiinflamasi^(7,8).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penapisan Fitokimia Serbuk dan Ekstrak.

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap serbuk simplisia dan ekstrak etanol 96% rimpang temulawak. Tujuan dilakukannya penapisan fitokimia ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam tanaman tersebut yang berpotensi memiliki aktivitas biologi. Berdasarkan hasil penapisan fitokimia yang dilakukan terhadap serbuk simplisia maupun ekstrak etanol 96% rimpang temulawak, keduanya memiliki kandungan metabolit yang sama, yaitu flavonoid, saponin, triterpenoid dan minyak atsiri. Hasil penapisan fitokimia serbuk simplisia dan ekstrak rimpang temulawak dapat dilihat pada Tabel 1 dimana kurkumin termasuk ke dalam senyawa polifenol. Kurkumin berperan dalam aktivitas sebagai antiinflamasi.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia rimpang temu lawak.

No.	Golongan	Serbuk Simplisia	Ekstrak Etanol 96%
1.	Alkaloid	-	-
2.	Flavonoid	+	+
3.	Saponin	+	+
4.	Tanin	-	-
5.	Kuinon	-	-
6.	Steroid/triterpenoid	-/+	-/+
7.	Minyak atsiri	+	+
8.	Kumarin	-	-

Uji Stabilitas Nanopartikel Ekstrak Temulawak.

Hasil uji stabilitas nanosuspensi ekstrak temulawak dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Stabilitas nanosuspensi ekstrak.

Parameter	Hari ke-				
	1	2	3	4	5
Warna	Orange	Orange	Orange	Orange	Orange
Kekeruhan	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil	Stabil
Endapan	Tidak ada				

Nanopartikel ekstrak rimpang temulawak memiliki ukuran partikel dengan nilai sebesar 157,8 nm, artinya nanopartikel berhasil terbentuk dengan ukuran yang kecil dan telah memenuhi syarat, dimana suatu partikel dikatakan berukuran nano bila berada pada rentang 1-1000 nm sehingga diharapkan mampu memberikan aktivitas yang baik. Sedangkan distribusi ukuran partikel dinyatakan dalam indeks polidispersitas. Nilai polidispersitas yang baik adalah yang mendekati nilai 0 dimana semakin mendekati nilai 0 maka semakin homogen. Nanopartikel ekstrak temulawak pada percobaan ini memiliki nilai indeks polidispersitas 0,488. Hal ini menunjukkan bahwa nanopartikelekrak temulawak terdispersi relatif homogen⁽³⁾.

Dari hasil pemeriksaan potensial zeta didapatkan hasil Potensial zeta +51,4 mV. Potensial zeta merupakan parameter muatan listrik suatu partikel yang dapat melakukan interaksi elektrostatis sehingga dapat mempengaruhi kestabilan sistem nanopartikel. Dengan demikian, adanya gaya tarik menarik antar partikel memungkinkan terjadinya agregasi dan pengendapan sehingga suspensi nanopartikel yang terbentuk menjadi tidak stabil. Pada penelitian kali ini didapatkan nilai potensial zeta sebesar +51,4 mV maka nanopartikel ekstrak temulawak memiliki kestabilan yang baik. Dengan demikian, kemungkinan terjadinya agregasi antar partikel berkurang. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi nilai potensial zeta diantaranya karakteristik muatan polimer, pH, dan karakteristik muatan ekstrak yang digunakan.

Pengeringan Nanosuspensi dengan Spray Drying. Setelah dikeringkan dengan suhu outlet 80 0C, didapatkan serbuk dengan karakteristik fisik kering dan tidak lengket dan berwarna kuning muda dengan kadar air sebesar 9,4697%. Hal ini berarti menunjukkan bahwa serbuk nanosuspensi ekstrak rimpang temulawak yang dihasilkan sudah memenuhi syarat yaitu <10%.

Uji Aktivitas Antiinflamasi. Hasil uji kontrol positif (natrium diklofenak), ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak dapat dilihat pada Tabel 3, 4 dan 5.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antiinflamasi kontrol positif (natrium diklofenak).

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8315	0,8335	0,8250			
3,13	0,7824	0,7714	0,7636	5,90	7,45	7,44
6,25	0,7128	0,7116	0,7262	14,28	14,63	11,98
12,5	0,6040	0,6023	0,6203	27,36	27,74	24,81
25	0,5060	0,5092	0,5163	39,15	38,91	37,42
50	0,4389	0,4391	0,4218	47,22	47,32	48,87
100	0,0668	0,0587	0,0527	91,97	92,96	93,61

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antiinflamasi ekstrak rimpang temulawak.

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8238	0,8353	0,8257			
25	0,7632	0,7523	0,7663	7,36	9,94	7,19
50	0,6982	0,6934	0,6944	15,25	16,99	15,90
100	0,6143	0,6107	0,6141	25,43	26,89	25,63
200	0,5027	0,5046	0,5036	38,98	39,59	39,01
400	0,3947	0,3967	0,3973	52,09	52,51	51,88
800	0,3262	0,3271	0,3271	60,40	60,84	60,39

Tabel 5. Hasil uji nanopartikel ekstrak rimpang temulawak.

Konsentrasi (bpj)	Serapan			% inhibisi		
	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Seri 1	Seri 2	Seri 3
Kontrol negatif	0,8215	0,8238	0,8294			
25	0,7016	0,7078	0,7094	14,60	14,08	14,47
50	0,6482	0,6485	0,6568	21,10	21,28	20,81
100	0,5524	0,5541	0,5563	32,76	32,74	32,93
200	0,4322	0,4360	0,4357	47,39	47,07	47,47
400	0,3186	0,3189	0,3159	61,22	61,29	61,91
800	0,2553	0,2574	0,2586	68,92	68,75	68,82

Uji aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan denaturasi protein dilakukan terhadap kontrol negatif, kontrol positif, ekstrak dan nanopartikel ekstrak. Pengujian ini dilakukan secara triplo. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode penghambatan denaturasi protein *Bovine Serum Albumin* (BSA) dimana akan mengalami denaturasi (perubahan struktur primer dan sekunder) pada saat dipanaskan. Hal ini yang jadi penanda dimana albumin mengalami kerusakan pada saat diinduksi panas sehingga oleh tubuh dianggap sebagai bahan asing

(antigen) oleh karena itu tubuh melakukan perlawanan yaitu melalui mekanisme inflamasi. Kemudian masing-masing larutan tersebut diukur serapannya pada λ 660 nm. Data serapan yang diperoleh selanjutnya dihitung persentase inhibisinya. Larutan dapat memiliki aktivitas antiinflamasi jika persen inhibisinya lebih dari 20%^(9,10).

Dari data persen inhibisi larutan kontrol positif (natrium diklofenak), ekstrak dan nanopartikel ekstrak rimpang temulawak yang dilakukan triplo dapat diketahui bahwa larutan kontrol positif pada konsentrasi 12,5 bpj sudah dapat menghambat denaturasi protein. Penghambatan denaturasi protein pada ekstrak mulai ditunjukkan pada konsentrasi 100 bpj, sedangkan penghambatan denaturasi protein pada nanopartikel ekstrak ditunjukkan pada konsentrasi 50 bpj. Berdasarkan data tersebut, maka potensi penghambatan denaturasi protein yang dimiliki oleh ekstrak lebih kecil dibandingkan dengan nanopartikel ekstrak dan nanopartikel ekstrak memiliki potensi penghambatan denaturasi protein lebih kecil daripada larutan kontrol positifnya. Denaturasi protein adalah proses dimana protein kehilangan struktur tersier dan struktur sekunder dengan penerapan tekanan eksternal atau senyawa, seperti asam kuat atau lemah, garam anorganik terkonsentrasi, pelarut organik atau panas. Kebanyakan protein biologis kehilangan fungsi biologisnya ketika terjadi denaturasi⁽⁴⁾.

Kitosan dipilih sebagai bahan nanopartikel karena tidak toksik, bersifat mukoadhesif dan peningkat penetrasi, dan mudah didapat sedangkan BSA dipilih karena merupakan indikator denaturasi protein yang lebih peka dibandingkan dengan indikator albumin yang lainnya. Pada penelitian ini digunakan natrium diklofenak sebagai kontrol positif karena merupakan salah satu obat yang umum digunakan sebagai antiinflamasi. Uji aktivitas antiinflamasi dengan penghambatan denaturasi protein pernah dilakukan penelitiannya terhadap beberapa ekstrak tanaman dan jus buah. Proses denaturasi protein pada penelitian ini dipengaruhi oleh panas. Pada saat suhu naik maka dapat meningkatkan energi kinetik dan menyebabkan molekul penyusun protein bergerak atau bergetar sangat cepat sehingga merusak molekul tersebut. Proses denaturasi protein berlangsung secara tetap dan tidak berubah, suatu protein yang mengalami proses denaturasi akan berkurang kelarutannya sehingga mudah mengendap. Protein dalam tubuh rentan untuk mengalami denaturasi yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas yang menyebabkan mekanisme peradangan dengan merangsang pelepasan mediator inflamasi. Adapun mekanisme kerja natrium diklofenak adalah dengan penghambatan sintesa prostaglandin dimana efek sistemik dari inflamasi

adalah demam^(11,12,13).

Nilai IC_{50} menunjukkan efektivitas ekstrak dalam menghambat denaturasi protein. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi saat persentase penghambatan denaturasi protein mencapai nilai 50%⁽¹⁴⁾. Hasil perhitungan IC_{50} pada larutan kontrol positif (natrium diklofenak) rata-rata IC_{50} sebesar $47,74 \pm 0,33$ bpj. Pada ekstrak hasil rata-rata IC_{50} sebesar $521,67 \pm 5,80$ bpj dan pada nanopartikel rata-rata IC_{50} sebesar $398,02$ bpj $\pm 1,78$ bpj.

SIMPULAN

Hasil uji aktivitas antiinflamasi dengan menggunakan metode penghambatan denaturasi protein pada nanopartikel ekstrak rimpang Temulawak menunjukkan bahwa IC_{50} yaitu $398,02 \pm 1,78$ bpj. Sehingga hasilnya menunjukkan bahwa aktivitas antiinflamasi nanopartikel ekstrak rimpang temulawak lebih baik daripada aktivitas ekstrak etanol 96% rimpang temulawak.

DAFTAR PUSTAKA

1. Choi, S., H.S. Cha and Y.S. Lee. Physicochemical a1. Aggarwal S, Takada Y, Singh S, Myers JN, Aggarwal BB. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling. *Int J Cancer*. 2004. 111:679–92.
2. Devaraj S, Ismail S, Ramanathan S, Yam MF. Investigation of antioxidant and hepatoprotective activity of standardized *Curcuma xanthorrhiza* rhizoma in carbon tetrachloride-induced hepatic damaged rats. *The Scientific World Journal*. 2014. 1-8.
3. Wirawan D. Pengaruh nanopartikel ekstrak temulawak (*curcuma xanthorrhiza roxb.*) berbasis kitosan natrium polifosfat dalam sediaan gel terhadap aktivitas antiacne. Skripsi Universitas Pancasila. 2015
4. Verma MA, Kumar PA, Kavitha D, Anurag KB. Anti denaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in vitro. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2011. 2(2):1-6
5. Tiwari P, Kumar B, Kaur B, Kaur G, Kau H. Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011. 1(1): 98-106.
6. Ayoola GA, Coker HAB, Adesegun SA, Bello AAA, Obaweya K1, Ezennia EC, Atangbayila TO. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2008. 7 (3): 1019-24.
7. Williams LA, O'Connar A, Latore L, Dennis O, Ringer S, Whittaker JA, et al. The in vitro anti-denaturation

- effects included by natural products and non steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is purposed as a screening assay for the detection of anti inflammatory compounds, without the uses of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian Med J.* 2008. 57 (4): 327-30
8. Mizushima Y and Kobayashi M. Interaction of antiinflammatory drugs with serum preteins, especially with some biologically active proteins. *J of Pharma Pharmacol.* 1968. (20):169-73.
 9. Leelaprakash G, Mohan Dass S. In vitro antiinflammatory activity of methanol extract of *Enicostemma axillare*, *International Journal of Drug Development & Research.* 2010. (3):189-96.
 10. Ingle PV, Patel DM. C-reactive protein in various disease condition an overview, *Asian J Pharm Clin Res.* 2011. 4(1):9-13.
 11. Mann G. *Chemistry of the proteids.* London and New York. 1906. 336-44.
 12. Robertson T B. *The physical chemistry of the proteins.* New York and London. 1918.
 13. Chick, H, Martin, C.J. On the heat coagulation of protein. *J Physiol.* 1910. (4):404-30.
 14. Hayun H, Arrahman A, Purwati EM, Yanuar A, Fortunata F, Suhargo F, *et al.* Synthesis, anti-inflammatory and antioxidant activity of mannich bases of dehydrozingerone derivatives. *J Young Pharm.* 2018. 10(2):6-10.