

**LAPORAN AKHIR TAHUN**  
**PROGRAM INSINAS RISET PRATAMA**  
**INDIVIDU/~~KEMITRAAN~~/~~KONSORSIUM~~**



**PENGEMBANGAN SEDIAAN FARMASI PENINGKATAN MASA  
TULANG BERBASIS JOTANG (*Spilanthes acmella*) (LANJUTAN)**

Tahun ke-1 dari rencana 2 tahun

Rr. Retno Widyowati, S.Si, M.Pharm, Ph.D., Apt (0005017701)  
Dr. Wiwied Ekasari, M.Si., Apt (0022045004)  
Neny Purwitasari, S.Farm., M.Sc., Apt (0019048006)

**UNIVERSITAS AIRLANGGA**  
NOVEMBER, 2018

## HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PENGEMBANGAN SEDIAAN FARMASI  
PENINGKATAN MASA TULANG BERBASIS  
JOTANG (*Spilanthes acmella*)

**Peneliti/Pelaksana**  
Nama Lengkap : RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Apt, Ph.D  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0005017701  
Jabatan Fungsional : Lektor  
Program Studi : Farmasi  
Nomor HP : 081615886978  
Alamat surel (e-mail) : rr-retno-w@ff.unair.ac.id

**Anggota (1)**  
Nama Lengkap : NENY PURWITASARI S.Farm, Apt, M.Sc.  
NIDN : 0019048006  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**  
Nama Lengkap : Dr. Dra WIWIED EKASARI Apt, M.Si  
NIDN : 0022016902  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

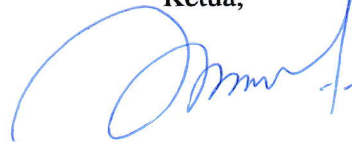
**Institusi Mitra (jika ada)**  
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 150,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 350,000,000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Farmasi Unair



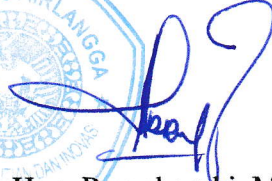
(Dr. Umi Athiyah, MS., Apt)  
NIP/NIK 195604071981032001

Surabaya, 21 - 11 - 2018  
Ketua,



(RR RETNO WIDYOWATI, S.Si, Apt, Ph.D)  
NIP/NIK 197701052002122002

Menyetujui,  
Ketua LPI Unair



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)  
NIP/NIK 196705071991021001

## RINGKASAN

### PENGEMBANGAN SEDIAAN FARMASI PENINGKATAN MASA TULANG BERBASIS JOTANG (*Spilanthus acmella*)

Indonesia mempunyai kekayaan hayati yang melimpah, salah satunya adalah tanaman obat dan pemanfaatannya belum optimal. *Spilanthus acmella* atau biasa disebut jotang merupakan tanaman yang mempunyai kandungan senyawa aktif berupa sesquiterpen, flavonoid dan polifenol serta memberikan efek farmakologi yang bermacam-macam yaitu obat gusi berdarah dan sakit gigi (bunga), obat diare (akar), analgesik lokal (akar; spilanthol), obat rematik dan osteoporosis. Penentuan aktivitas anti-osteoporosis baik ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air maupun isolat/senyawa dari tanaman tersebut perlu dilakukan untuk meningkatkan derajat kesehatan masyarakat. Penelitian ini dirancang selama dua tahun. Pada tahun pertama bertujuan untuk (1) mengetahui aktivitas anti-osteoporosis ekstrak etanol 70%, fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air dari *Spilanthus acmella*, terhadap peningkatan pembentukan masa tulang (sel osteoblast) dan penghambatan masa tulang (sel osteoklas), (2) mengetahui fraksi aktif yang mempunyai aktivitas anti-osteoporosis (formasi dan resorpsi) dalam tanaman tersebut, (3) mengetahui senyawa kandungan di dalam tanaman tersebut, senyawa aktif dan baru yang dapat menambah perbendaharaan senyawa kimia dalam tanaman Indonesia. Pada tahun kedua akan dilakukan uji toksisitas dan pembuatan sediaan (kapsul) yang diharapkan bisa menghasilkan produk yang inovatif.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi dengan menggunakan pelarut etanol 70%, kemudian dilanjutkan dengan fraksinasi. Baik ekstrak maupun fraksi tersebut dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* terhadap peningkatan aktivitas sel osteoblas (formasi tulang) dan penghambatan sel osteoklas (resorpsi tulang). Ekstrak etanol 70% tanaman ini mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sebesar 69% terhadap sel osteoblast MC3T3-E1 pada konsentrasi 50  $\mu$ g/ml. Fraksi yang mempunyai aktivitas paling baik merupakan fraksi aktif yaitu fraksi butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sebesar 26 dan 27%. Kemudian pada fraksi butanol ini dilakukan isolasi senyawa kandungan dan diperoleh 4 senyawa baru yaitu metil treonolakton glukosida (**1**), metil treonolakton fruktofuranosida (**2**), 2 piroglutamat (**3-4**). Selain itu juga didapatkan senyawa 2-C-metil-D-treono-1,4 lakton (**5**), 2-deoksi-D-ribono-1,4 lakton (**6**), metil piroglutamat (**7**), dendrantesosida A (**8**), dendrantesosida B (**9**), ampelopsiososida (**10**), ikarisida B2 (**11**), benzil- $\beta$ -L-arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glukopiranosida (**12**), kikoriin (**13**) and uridin (**14**). Dari senyawa-senyawa hasil isolasi tersebut, senyawa 3 dan 4 mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP yang berhubungan dengan pembentukan sel osteoblast sebesar 12 dan 11%. Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthus acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya.

## PRAKATA

Syukur Alhamdulillah kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat-Nya sehingga penyusun dapat melaporkan kemajuan Penelitian Program Insinas Riset Pratama Individu yang berjudul **“PENGEMBANGAN SEDIAAN FARMASI PENINGKATAN MASA TULANG BERBASIS JOTANG (*Spilanthus acmella*)”**.

Penelitian ini dapat diseelngarakan karena bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, beserta staff administrasi yang telah memberikan kesempatan, bantuan, dan fasilitas selama melakukan penelitian ini.
- Dekan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Semua yang sudah membantu dalam penyelesaian penelitian ini.

Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi pembaca, baik sebagai bahan kajian maupun sebagai sumber informasi untuk mengembangkan ilmu pengetahuan, khususnya dibidang Farmasi.

Surabaya, 20 November 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

|  | Halaman |
|--|---------|
| HALAMAN PENGESAHAN .....                   | ii      |
| RINGKASAN .....                            | iii     |
| PRAKATA .....                              | iv      |
| DAFTAR ISI .....                           | v       |
| DAFTAR TABEL.....                          | vi      |
| DAFTAR GAMBAR.....                         | vii     |
| DAFTAR LAMPIRAN .....                      | viii    |
| BAB I. PENDAHULUAN .....                   | 1       |
| BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN..... | 6       |
| BAB III. METODE PENELITIAN .....           | 7       |
| BAB IV. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI..... | 12      |
| BAB V. RENCANA TAHAP BERIKUTNNYA .....     | 17      |
| BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....          | 18      |
| DAFTAR PUSTAKA.....                        | 19      |
| LAMPIRAN .....                             | 20      |

## DAFTAR TABEL

|   | Halaman |
|---|---------|
| Tabel 3.1. Rencana Target Capaian Tahunan .....                                       | 11      |
| Tabel 4.1. Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% <i>Spilanthes acmella</i> .....   | 12      |
| Tabel 5.1. Rencana kegiatan penelitian yang akan dilakukan pada tahun berikutnya .... | 17      |

## DAFTAR GAMBAR

|   | Halaman |
|---|---------|
| Gambar 3.1. Bagan alur penelitian .....   | 7       |
| Gambar 4.1. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari ekstrak etanol 70% <i>Spilanthus acmella</i> ..... | 13      |
| Gambar 4.2. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari fraksi-fraksi <i>Spilanthus acmella</i> ....       | 13      |
| Gambar 4.3. Struktur dari senyawa dalam fraksi butanol <i>Spilanthus acmella</i> .....              | 15      |
| Gambar 4.4. Peningkatan aktivitas enzim ALP dari senyawa 1–4 terhadap sel osteoblast MC3T3-E1 ..... | 16      |

## DAFTAR LAMPIRAN

|   |    |
|---|----|
| Lampiran 1. Artikel ilmiah .....                    | 20 |
| Lampiran 2. Bukti telah disubmit dan direview ..... | 38 |
| Lampiran 3. Mengikuti seminar internasional .....   | 43 |
| Lampiran 4. Draft Paten .....                       | 46 |
| Lampiran 5. Prototipe ekstrak aktif .....           | 51 |



# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1. Latar Belakang**

Osteoporosis adalah penyakit tulang sistemik yang ditandai oleh penurunan densitas masa tulang dan perburukan mikroarsitektur tulang sehingga tulang menjadi rapuh dan mudah patah (Jennifer, 2008). Dengan meningkatnya usia harapan hidup, maka berbagai penyakit degeneratif dan metabolik, termasuk osteoporosis akan menjadi permasalahan muskuloskeletal yang memerlukan perhatian khusus, terutama di negara-negara berkembang. Sejak dicanangkannya *Bone Joint Decade* (BJD) 2000-2010 osteoporosis menjadi penting, karena selain termasuk dalam 5 besar masalah kelainan muskuloskeletal yang harus ditangani, juga kasusnya semakin meningkat sejalan dengan peningkatan jumlah usia tua (Irwan, 2008).

Di Indonesia telah mencapai pada tingkat yang perlu diwaspadai karena jumlah penderita osteoporosis ini jauh lebih besar dari data terakhir. Depkes yang mematok angka 19.7% dari seluruh penduduk dengan alasan perokok di Indonesia masuk dalam urutan ke-2 dunia setelah Cina. Selain itu jumlah usia lanjut di Indonesia diperkirakan akan naik 14% dalam kurun waktu 1990-2025, sedangkan perempuan menopause pada tahun 2000 diperhitungkan 15,5 juta akan naik menjadi 24 juta pada tahun 2015. Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan hasil bahwa faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Sudoyo & Simadibrta, 2006). Bayangkan betapa besar jumlah penduduk yang dapat terancam penyakit osteoporosis.

Pada umumnya pengobatan osteoporosis dibagi menjadi 2 bagian yaitu untuk menghambat hilangnya masa tulang (anti-resorpsi) dan meningkatkan masa tulang (formasi tulang) (NIH, 2001). Permasalahan terapi osteoporosis adalah kompleks dan erat hubungannya dengan cakupan penderita yang rendah akibat mahalannya biaya deteksi dini, pemeriksaan lanjutan dan obat-obatan untuk penyakit osteoporosis. Selain itu obat-

obatan yang ada pun masih belum ada yang ideal karena masalah efikasi dan toleransi yang ditimbulkan oleh obat-obatan tersebut.

Dewasa ini pengobatan osteoporosis banyak dilakukan dengan menggunakan terapi anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin. Meskipun mekanisme aksi dari masing-masing golongan ini berbeda, penghambatan sel osteoklas sebagai mediator dari resorpsi tulang merupakan tujuan akhir yang diinginkan (Fleisch, 1998), tapi dikarenakan efek samping yang sering terjadi, banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al.*, 2005; Whyte *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian obat anti-osteoporosis baru. Saat ini trend pengobatan masyarakat mengarah pada bahan alam atau *back to nature*. Pengobatan dengan bahan alam dipercaya masyarakat memiliki efek samping lebih ringan dan relatif mudah didapat dipasaran. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan skrining dari 32 tanaman Indonesia terhadap aktivitas dari alkaline fosfatase (ALP) sebagai marker dari diferensiasi osteoblas dan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 70% dari *Barleria lupulina*, *Graptophyllum pictum*, dan *Spilanthes acmella* menstimulasi aktivitas ALP sebesar 39%, 28% dan 69% (Retno, 2010). ALP mengkatalisis ester monofosfat yang berada di dalam membran plasma menjadi *phosphatidyl-glycolipid anchor* yang akan mempengaruhi proses pembentukan masa tulang kembali (Franceschi & Young, 1990). Ekstrak etanol 70% tanaman ini dikombinasikan dengan latihan fisik dapat meningkatkan jumlah sel osteoblas secara bermakna bila dibandingkan dengan hanya ekstrak etanol atau latihan fisik saja (Laswati *et al.*, 2015). Oleh karena itu perlu dilanjutkan penelitian terhadap aktivitas penghambatan masa tulang (resorpsi tulang) sehingga mekanisme kerja dari dua efek yang berbeda tapi saling mendukung kekuatan dari tulang dapat menjadikan terobosan baru untuk pengobatan penyakit osteoporosis.

Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthes acmella* berpotensi digunakan untuk pengobatan osteoporosis karena mampu meningkatkan pembentukan masa tulang dengan menstimulasi aktivitas dari enzim alkaline fosfatase (Retno, 2010), dan meningkatkan aktivitas sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur pada mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan induksi deksametason (Laswati *et al.*, 2015). Dengan diketahuinya efek-efek tersebut dari tanaman ini, diharapkan dapat mengungkap potensi *Spilanthes acmella* sebagai obat untuk penyakit osteoporosis baik

melalui peningkatan pembentukan masa tulang (formasi tulang) maupun melalui penghambatan masa tulang (anti-resorpsi) sehingga *remodeling* tulang dalam tubuh dapat berjalan semestinya. Oleh karena itu diperlukan standarisasi dalam hal ini yang dapat mempengaruhi baik mutu simplisia maupun mutu ekstrak yang diperoleh berdasarkan metode yang ditetapkan oleh Departemen Kesehatan RI.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa nilai penting yang akan didapatkan dalam penelitian yang diusulkan ini adalah: (1) menyediakan alternatif pengobatan untuk penyakit osteoporosis dengan pemanfaatan sumber daya alam Indonesia dari tanaman *Spilanthus acmella*, (2) menyediakan alternatif fraksi/senyawa bioaktif untuk anti-osteoporosis dari tanaman *Spilanthus acmella*, (3) diperoleh senyawa anti-osteoporosis hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia yang dapat diproduksi dan dipasarkan di Indonesia, (4) meningkatkan derajat kesehatan masyarakat serta mendukung upaya pengobatan penyakit osteoporosis, (5) menunjang payung penelitian tentang eksplorasi bahan aktif anti-osteoporosis dari bahan alam tanaman obat Indonesia di Universitas Airlangga.

Penelitian isolasi bahan aktif anti-osteoporosis dari *Spilanthus acmella* juga relatif baru, mengingat di Indonesia penelitian yang mengungkap tentang senyawa aktif anti-osteoporosis dari bahan alam belum banyak dilaporkan. Dari segi potensi aplikasi, penelitian ini relevan dengan kebutuhan pemerintah dalam mengatasi kelangkaan bahan baku obat dari bahan alam.

## **1.2. Urgensi (Keutamaan) Penelitian**

Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 jenis tanaman obat, namun hanya 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh dan pengembalian kesegaran tubuh (Pramono, 2007), sehingga pemanfaatan tanaman obat sebagai obat tradisional maupun modern masih terbuka lebar. Kesempatan ini menjadi penting karena akhir-akhir ini kecenderungan masyarakat memilih obat tradisional dari bahan alam “*Back to Nature*”. Obat tradisional juga memiliki efek samping yang lebih kecil dibandingkan obat modern jika digunakan dengan tepat. Tanaman yang digunakan sebagai obat tradisional dapat memiliki lebih dari satu efek farmakologi sehingga dalam ramuan obat tradisional dapat terjadi efek komplementer atau

sinergisme antar senyawa obat, sehingga penting untuk mengetahui jenis senyawa aktif untuk suatu pengobatan.

Saat ini permasalahan osteoporosis di Indonesia telah mencapai pada tingkat yang perlu diwaspadai karena jumlah penderita osteoporosis ini jauh lebih besar dari data terakhir Depkes yang mematok angka 19,7% dari seluruh penduduk dengan alasan perokok di Indonesia masuk dalam urutan ke-2 dunia setelah Cina. Selain itu jumlah usia lanjut di Indonesia diperkirakan akan naik 14% dalam kurun waktu 1990-2025, sedangkan perempuan menopause pada tahun 2000 diperhitungkan 15,5 juta akan naik menjadi 24 juta pada tahun 2015. Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan hasil bahwa faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Sudoyo & Simadibrta, 2006). Bayangkan betapa besar jumlah penduduk yang dapat terancam penyakit osteoporosis. Terapi penyakit osteoporosis dengan menggunakan anti-resorpsi, seperti golongan raloxifen (estrogen reseptor modulator), golongan bisfosfonat (alendranat, risedronat, ibandronat) dan kalsitonin memberikan efek samping yang tidak diinginkan dan tidak nyaman, sehingga banyak pasien yang menghentikan terapinya (Mashiba *et al.*, 2005; Whyte *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Upaya penanggulangan penyakit osteoporosis terus dilakukan terutama pencarian alternatif obat anti-osteoporosis baru. Salah satu tanaman obat Indonesia yang mempunyai banyak khasiat adalah *Spilanthes acmella*. Kandungan tanaman dari *Asteraceae* ini mampu meningkatkan aktivitas pembentukan tulang (*bone formation*) melalui peningkatan aktivitas enzim alkaline fosfatase baik ekstrak etanol 70% maupun fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air secara *in vitro* (Retno, 2010) dan peningkatan sel osteoblas pada tulang trabekula proksimal femur dari mencit jantan sebagai model osteoporosis dengan penginduksi deksametason *in vivo* (Laswati *et al.*, 2015). Oleh karena itu perlu dilanjutkan penelitian terhadap aktivitas penghambatan masa tulang (resorpsi tulang) sehingga mekanisme kerja dari dua efek yang berbeda tapi saling mendukung kekuatan dari tulang dapat menjadikan terobosan baru untuk pengobatan penyakit osteoporosis.

Dari uraian di atas dapat disimpulkan bahwa nilai penting yang akan didapatkan dalam penelitian yang diusulkan ini adalah: (1) menyediakan alternatif pengobatan untuk penyakit osteoporosis dengan pemanfaatan sumber daya alam Indonesia dari tanaman *Spilanthus acmella*, (2) menyediakan alternatif fraksi/senyawa bioaktif untuk anti-osteoporosis dari tanaman *Spilanthus acmella*, (3) diperoleh senyawa anti-osteoporosis hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia yang dapat diproduksi dan dipasarkan di Indonesia, (4) meningkatkan derajat kesehatan masyarakat serta mendukung upaya pengobatan penyakit osteoporosis, (5) menunjang payung penelitian tentang eksplorasi bahan aktif anti-osteoporosis dari bahan alam tanaman obat Indonesia di Universitas Airlangga.

Penelitian isolasi bahan aktif anti-osteoporosis dari *Spilanthus acmella* juga relatif baru, mengingat di Indonesia penelitian yang mengungkap tentang senyawa aktif anti-osteoporosis dari bahan alam belum banyak dilaporkan. Dari segi potensi aplikasi, penelitian ini relevan dengan kebutuhan pemerintah dalam mengatasi kelangkaan bahan baku obat dari bahan alam.

### **1.3. Kebaruan dan Terobosan Teknologi**

Penelitian ini mempunyai nilai penting yang akan didapatkan karena akan memiliki kebaruan dalam hal: (1) menyediakan alternatif pengobatan baru untuk penyakit osteoporosis dengan pemanfaatan sumber daya alam Indonesia dari tanaman *Spilanthus acmella*, (2) menemukan senyawa baru yang dapat menambah jumlah senyawa yang ada di dunia kimia sekarang ini, (3) diperoleh senyawa aktif baru sebagai anti-osteoporosis hasil eksplorasi sumber daya alam Indonesia

Penelitian isolasi bahan aktif anti-osteoporosis dari *Spilanthus acmella* juga relatif baru, mengingat di Indonesia penelitian yang mengungkap tentang senyawa aktif anti-osteoporosis dari bahan alam belum banyak dilaporkan. Dari segi potensi aplikasi, penelitian ini relevan dengan kebutuhan pemerintah dalam mengatasi kelangkaan bahan baku obat dari bahan alam. Teknologi yang digunakan adalah teknologi yang relevan dan baru serta bisa diterapkan di Indonesia. Pengujian secara *in vitro* pada sel dan *in vivo* pada hewan coba sangat memungkinkan dilakukan dan bisa mewakili kondisi sesungguhnya dalam tubuh manusia.

## **BAB II**

### **TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN**

#### **2.1. Tujuan penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

- (1) Mengetahui aktivitas anti-osteoporosis dari ekstrak maupun fraksi heksan, etil asetat, butanol dan air dari tanaman *Spilanthus acmella* terhadap penghambatan dan peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang
- (2) Mengetahui fraksi aktif dalam tanaman *Spilanthus acmella* sebagai anti-osteoporosis
- (3) Mengetahui senyawa kandungan di dalam tanaman tersebut, senyawa aktif dan baru yang berpotensi sebagai anti-osteoporosis
- (4) Melakukan uji standarisasi simplisia dan ekstrak untuk mendapatkan produk yang berkualitas dan seragam (tahun ke-2)
- (5) Melakukan uji toksisitas untuk mendapatkan produk yang aman (tahun ke-2)
- (6) Membuat produk OHT (obat herbal terstandar) yang dapat diterima oleh masyarakat (tahun ke-2)

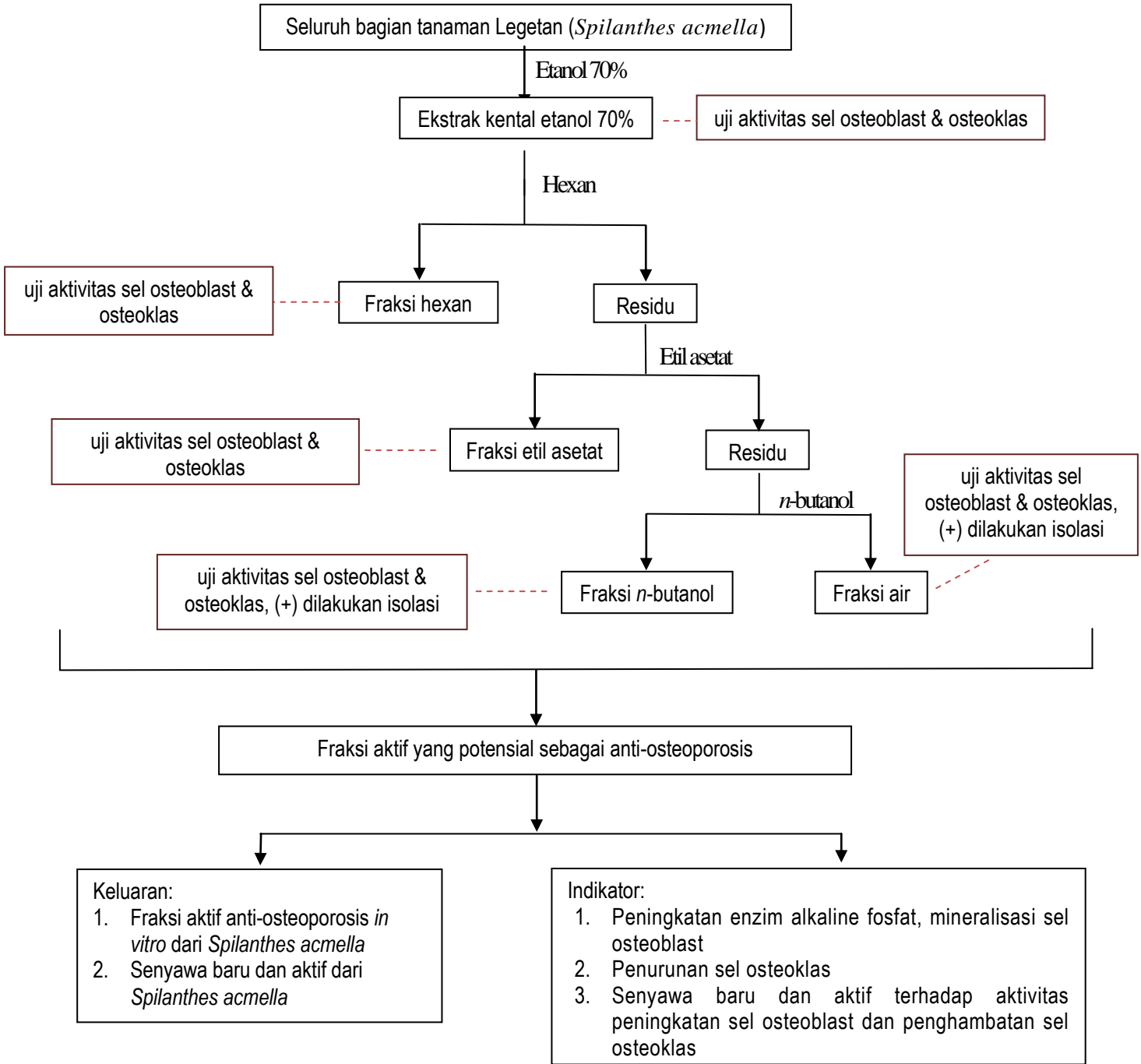
#### **2.2. Manfaat penelitian**

Manfaat dari penelitian ini adalah:

- (1) Diperolehnya suatu tumbuhan obat Indonesia yang mempunyai potensi untuk dikembangkan menjadi obat tradisional dalam pencegahan dan pengobatan penyakit osteoporosis yang potensial dan aman.
- (2) Memberikan data ilmiah bahwa pengaruh ekstrak etanol 70%, fraksi heksana, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air dari tanaman jatang (*Spilanthus acmella*) serta senyawa yang terkandung didalamnya dalam menghambat peningkatan ketidakseimbangan remodeling tulang sehingga bisa digunakan sebagai data ilmiah untuk penelitian selanjutnya.

# BAB III METODE PENELITIAN

## 3.1. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Bagan alur penelitian

### **3.2. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada dua laboratorium, yaitu Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi Unair, dan Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hiroshima. Untuk isolasi dan analisis bahan aktif dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi UNAIR, sedangkan pengukuran NMR untuk identifikasi senyawa akan dikirimkan sampel ke Universitas Hiroshima. Penelitian uji aktivitas sel osteoblas dan osteoklas akan dilakukan di Laboratorium Dasar Bersama Fakultas Farmasi UNAIR. Penelitian tahun pertama akan dilakukan selama 8 bulan dari April 2018 sampai awal Desember 2018.

### **3.3. Bahan Penelitian**

Semua tanaman yang digunakan diperoleh dari Kebun Raya, Purwodadi. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisa. Bahan kimia dapat dilihat pada rincian anggaran bahan kimia. Pengujian aktivitas pada sel osteoblast (MC3T3-E1) dan osteoklas yang diperoleh dari Universitas Hiroshima.

### **3.4. Alat Penelitian**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlemeyer, beker glass, gelas pengaduk, pinset, vial, corong pisah, corong gelas, *rotary evaporator*, NMR untuk analisa senyawa, dan laminar air flow untuk melakukan uji aktivitas.

### **3.5. Prosedur Penelitian**

#### **3.5.1. Pembuatan Ekstrak *Spilanthes acmella***

*Spilanthes acmella* diperoleh dari Kebun Raya Purwodadi, Jawa Timur, Indonesia. Seluruh bagian tanaman kering dihaluskan sampai terbentuk serbuk dan diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Penguapan etanol dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan *freeze dry*. Ekstrak yang sudah kering, ditimbang beratnya dan disimpan dalam eksikator. Ekstrak tersebut telah dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vitro* dan *in vivo* serta kombinasi latihan fisik.

#### **3.5.2. Pembuatan Fraksi Non polar, Semi polar dan Polar**

Ekstrak etanol 70% yang telah diperoleh dilarutkan dengan air sampai larut sempurna dan dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan



*n*-butanol. Masing-masing fraksi dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis *in vivo* dengan mengukur ketebalan tulang trabekula dari tulang femur mencit.

### 3.5.3. Uji aktivitas peningkatan ALP dari sel osteoblas

Pengobatan osteoporosis meliputi penghambatan aktivitas osteoklas atau peningkatan aktivitas osteoblas. Osteoblas merupakan fibroblas khusus yang dapat mengeluarkan dan menambah jumlah mineral pada matrik tulang. Diferensiasi osteoblas secara *in vitro* dan *in vivo* dibedakan menjadi 3 tahap, yaitu (a) proliferasi sel, (b) pematangan matrik and (c) mineralisasi matrik. Selama proses proliferasi, beberapa ekstraselular matrik dari protein terdeteksi (procollagen I, TGF- $\beta$ , dan fibronectin). Pematangan matrik ditandai dengan ekspresi maksimal dari alkaline fosfatase (ALP). Awal dari proses mineralisasi ditandai dengan ekspresi gen seperti OC, BSP dan OPN dan akhirnya proses mineralisasi telah selesai. Sel osteoblas MC3T3-E1 mampu melakukan proses diferensiasi menjadi osteoblas. Selama proses diferensiasi terjadi peningkatan aktivitas ALP yang diikuti oleh matrik ekstraselular (ECM) dan menghasilkan mineralisasi. Jadi peningkatan pertumbuhan sel MC3T3-E1 menunjukkan peningkatan ALP dan mineralisasi yang menyebabkan proses proliferasi dan diferensiasi terjadi sehingga terjadi peningkatan proses pembentukan tulang (Kostenuik *et al.*, 1999).

Sel yang 90% bergerombol dikultur dengan menggunakan medium  $\alpha$ -MEM yang mengandung 10 mM  $\alpha$ -glycerofosfate and 50  $\mu$ g/ml asam askorbat. Medium diganti setiap 2–3 hari, setelah 6 hari sel dikultur dengan medium yang mengandung 0.3% serum bovin and sampel selama 3 hari. Kemudian medium dibuang dan sel dicuci dengan menggunakan buffer fosfat salin sebanyak 3 kali. Sel dilisis dengan 0.2% triton X-100 dan disentrifuse pada 14000 x g selama 5 menit. Supernatan yang jernih digunakan untuk mengukur ALP dengan bantuan ALP assay kit (Retno *et. al.*, 2010).

### 3.5.4. Uji aktivitas penghambatan sel osteoklas

Osteoklas merupakan sel raksasa yang berinti dan diferensiasi dari sel makrofag hematopoietik yang dipengaruhi oleh reseptor aktivator of NF-kB ligand (RANKL) dan macrophage monocyte colony-stimulating factor (M-CSF). Osteoklas berperan penting dalam pengembangan penyakit osteoporosis, inflamasi, artritis and rematik. Penurunan

kekuatan tulang mempengaruhi aktivitas osteoklas yang berhubungan dengan sinovial fibroblas dan sel T helper dari RANKL (Oshita *et al.*, 2011).

Sel osteoklas ( $1,5 \times 10^4$  sel/well) dikultur dengan  $\alpha$ -MEM yang mengandung 50 ng/ml M-CSF dan 50 ng/ml RANKL. Mediaum diganti setiap 4 hari. Sampel ditambahkan pada hari ke-5. Kemudian sel dilisis dengan menggunakan bufer yang mengandung pNPP, reaksi dihentikan dengan penambahan larutan 0,3 N NaOH dan diukur absorbansinya dengan menggunakan mikroplate reader pada  $\lambda$  405 nm.

Sel osteoklas ( $1 \times 10^6$  sel/well) juga dikultur dengan menggunakan medium yang mengandung 50 ng/ml M-CSF and 50 ng/ml RANKL pada 6-well plates selama 7 hari pada 37°C dalam 5 % CO<sub>2</sub>, kemudian ditambahkan sampel uji. Total RNA dari sel diisolasi dengan menggunakan NucleoSpin. DNA sampel dianalisa dengan menggunakan PCR (Oshita *et al.*, 2011).

### **3.5.5. Analisa Statistik**

Data yang diperoleh dilakukan analisis deskriptif dan inferensial. Perbedaan rerata ketebalan trabekula dari setiap kelompok dianalisis menggunakan uji anova satu arah. Jika terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji post hoc dengan uji beda nyata terkecil/LSD untuk menguji perbedaan dan rata rata perlakuan. Jika data tidak berdistribusi normal digunakan uji Kruskal-Wallis. Nilai *p* dihitung kurang dari 0,05 sebagai signifikansi figure.

### **3.6. Luaran**

Luaran yang ditargetkan pada tahun pertama penelitian ini adalah (1) Produk fraksi aktif sebagai anti-osteoporosis untuk peningkatan derajat kesehatan dan penyembuhan penyakit dari tanaman obat Indonesia, (2) Publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal internasional. Untuk tahun kedua ditargetkan akan diperoleh produk sediaan kapsul antiosteoporosis dari tanaman ini yang sudah dilakukan uji standarisasi dan toksisitasnya dan luaran untuk tahun kedua adalah publikasi internasional, paten dan produk OHT.

Hasil penelitian ini akan dipublikasikan pada jurnal internasional yang terindeks scopus (Natural Product Communications) dan teregistrasi paten. Target dari penelitian ini tergambarakan seperti pada table 1.1.

**Tabel 3.1. Rencana Target Capaian Tahunan**

| No | Jenis Luaran                       |  | Indikator Capaian |            |
|----|------------------------------------|--|-------------------|------------|
|    |                                    |  | Tahun ke-1        | Tahun ke-2 |
| 1. | Publikasi ilmiah                   | Internasional/bereputasi Internasional | Accepted          | Published  |
|    |                                    | Nasional Terakreditasi                 | Tidak ada         | Tidak ada  |
| 2. | Hak Kekayaan Intelektual (HKI)     | Paten                                  | Draft             | Register   |
|    |                                    | Paten sederhana                        | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Hak cipta                              | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Merek dagang                           | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Rahasia dagang                         | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Desain produk industri                 | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Indikasi geografis                     | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Perlindungan varietas tanaman          | Tidak ada         | Tidak ada  |
|    |                                    | Perlindungan topografi sirkuit terpadu | Tidak ada         | Tidak ada  |
| 3. | Teknologi Tepat Guna               | Tidak ada                              | Draft             |            |
| 4. | Model/Purwarupa (Prototipe)/Desain | Draft                                  | Produk            |            |
| 5. | Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)   | 5                                      | 6                 |            |

### 3.7. Indikator Capaian yang Terukur

Indikator capaian yang terukur dari penelitian ini adalah (1) Peningkatan enzim alkaline fosfat, mineralisasi sel osteoblas, (2) Penurunan sel osteoklas, (3) Senyawa baru dan aktif terhadap aktivitas peningkatan sel osteoblast dan penghambatan sel osteoklas.

Sedangkan pada tahun kedua indikatornya adalah (1) parameter spesifik dan non spesifik dari simplisia dan ekstrak etanol 70% jotang, (2) dosis aman yang telah dilakukan pengujian toksisitas akut dan kronik, (3) prototipe/produk OHT anti-osteoporosis dari jotang, (4) publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal nasional terakreditasi dan internasional dan (5) paten sederhana.

## BAB IV HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

### 4.1. Hasil ekstraksi dan fraksinasi *Spilanthès acmella*

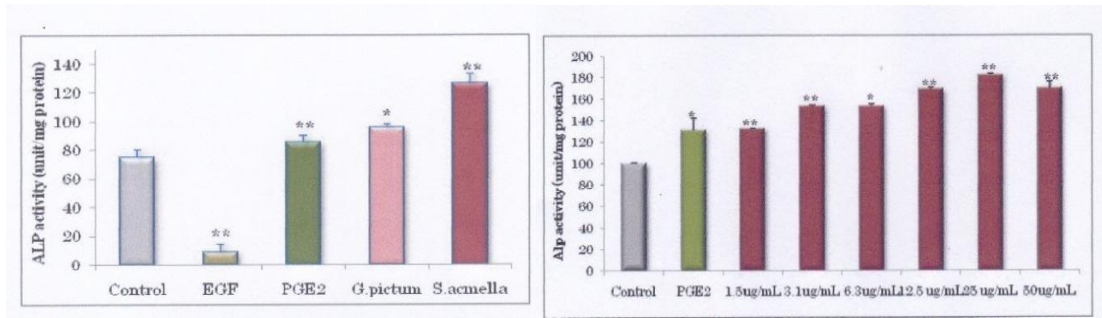
Dari 2 kg simplisia kering *Spilanthès acmella* dilakukan proses maserasi dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 10 l selama 3 kali, dan diperoleh hasil ekstrak etanol 70% sebanyak 200 g. Dilakukan fraksinasi pada ekstrak etanol 70% berdasarkan tingkat polaritasnya yaitu dengan mencampurkan ekstrak etanol 70% dengan sedikit aquadest (100 ml) dan dilakukan pengocokan dengan heksana (1 l) dengan menggunakan corong pisah, lalu diamkan sampai terjadi pemisahan (3 kali perlakuan). Filtratnya diuapkan dengan menggunakan rotavapor dan diperoleh fraksi heksana. Residu dikocok kembali dengan etil asetat (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan dengan etil asetat diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi etil asetat, residunya dikocok lagi dengan butanol (3 kali perlakuan). Filtrat hasil pengocokan diuapkan dengan rotavapor dan diperoleh fraksi butanol sedangkan residunya dikeringkan dengan menggunakan *freeze dry* dan diperoleh fraksi air.

**Tabel 4.1.** Hasil fraksinasi dari ekstrak etanol 70% *Spilanthès acmella*

| Fraksi      | Banyak pelarut | Berat Fraksi |
|-------------|----------------|--------------|
| Heksana     | 1000 ml        | 23,5 g       |
| Etil asetat | 1000 ml        | 40,4 g       |
| Butanol     | 1000 ml        | 47,5 g       |
| Air         | 100 ml         | 47 g         |

### 4.2. Uji aktivitas ALP dari ekstrak dan fraksi - fraksi *Spilanthès acmella*

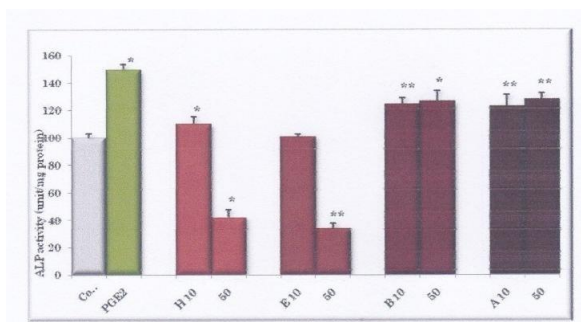
Ekstrak etanol 70% dari *Spilanthès acmella* mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sebesar 69% terhadap sel osteoblast MC3T3- E1 pada konsentrasi 50 µg/mL (gambar 5.1a). Kemudian dilakukan pengujian pada beberapa dosis ekstrak dan diperoleh hasil bahwa ekstrak tersebut mempunyai aktivitas peningkatan terhadap enzim ALP berdasarkan peningkatan dosis sampai dengan konsentrasi 25 µg/mL (gambar 5.1b).



**Gambar 4.1.** Peningkatan aktivitas enzim ALP dari ekstrak etanol 70% *Spilanthes acmella*

Ekstrak etanol 70% pada aktivitas ALP dari sel osteoblas MC3T3-E1 menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki efek bifasik, dimana pada konsentrasi rendah, mampu merangsang aktivitas ALP. Feng pernah melaporkan pada sampel yang berbeda yaitu enterolakton dan enterodiol memiliki efek bifasik terhadap kelangsungan hidup dan aktivitas ALP dari sel MG-63 dan sintesis DNA pada sel MCF-7 (sel kanker payudara). Pada konsentrasi yang relatif rendah, beberapa fitoestrogen mengekspresikan aktivitas estrogenik dan merangsang pertumbuhan sel, sementara pada konsentrasi yang lebih tinggi fitoestrogen yang sama tampaknya antiestrogenik dan menekan pertumbuhan sel. Cara kerja bifasik dapat mewakili terapi anabolik yang tepat untuk osteoporosis.

Diantara fraksi heksana, etil asetat, n-butanol dan fraksi air dari *Spilanthes acmella*, fraksi n-butanol dan air mampu meningkatkan aktivitas ALP sebesar 26% dan 27%, namun heksana dan etil asetat tidak menunjukkan aktivitasnya (Gambar 5.2).

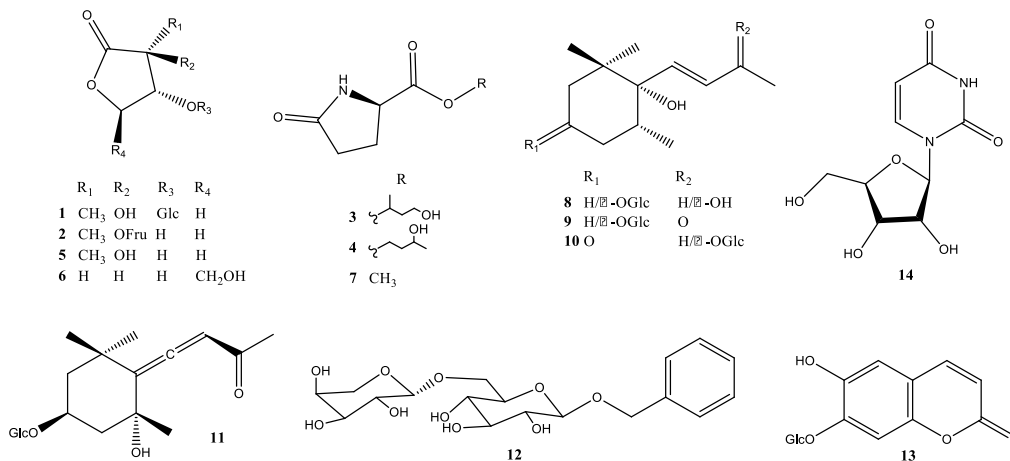


**Gambar 4.2.** Peningkatan aktivitas enzim ALP dari fraksi-fraksi *Spilanthes acmella*

### 4.3. Hasil isolasi senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

Pada fraksi butanol (40,0 g) dilakukan pemisahan menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam 300 g silika gel dan fase gerak metanol-kloroform secara gradien [hexana-kloroform (1:1), 4l, kloroform-metanol (50:1, 40:1, 30:1, 20:1,

15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2l), masing-masing 500 ml], dan diperoleh 19 fraksi (Sab1 – Sab12). Pada fraksi Sab11 (2,75 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 10 fraksi (Sab11-1 – Sab11-10). Fraksi Sab11-3 (442 mg) dan Sab11-4 (123 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh hasil senyawa **1** (metil treonolakton glukosida, 10,1 mg) and **8** (dendrantemosida A, 3,71 mg). Fraksi Sab10 (1,81 g) dipisahkan juga menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 7 fraksi (Sab10-1 – Sab10-7). Pada fraksi Sab10-1 (770 mg) dimurnikan menggunakan HPLC kolom YMC dengan pelarut air. Diperoleh 3 puncak pada 5, 18 dan 35 menit yaitu senyawa **2** (metil treonolakton fruktofuranosida, 7,62 mg), **5** (2-C-metil-D-treono-1,4 lakton, 9,31 mg), dan **14** (uridina, 27,5 mg). Sab10-2 (193 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 20% diperoleh senyawa **11** (ikarisida B2, 6,12 mg) and **13** (kikoriin, 2,99 mg). Fraksi Sab10- 3 (142 mg) juga dipisahkan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh hasil **9** (dendrantemosida B, 4,31 mg). Fraksi Sab5 (710 mg) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi dengan fase diam ODS dan fase gerak methanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) dan diperoleh 10 fraksi (Sab5-1 – Sab5- 10). Fraksi Sab5-1 (483 mg) and Sab5-2 (68,3 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air dan diperoleh senyawa **3** (turunan 2-piroglutamat 7,80 mg), **4** (turunan 2-piroglutamat, 4,21 mg) dan **7** (metil piroglutamat, 6,63 mg). Campuran dari fraksi Sab6, Sab7, Sab8 dan Sab9 (2,06 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh 10 fraksi (Sab6-9-1 – Sab6-9-10). Fraksi Sab6-9-1 (340 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut air didapatkan senyawa **6** (2- deoksi-D-ribono-1,4 lakton, 6,01 mg). Fraksi Sab6-9-4 (114 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dan pelarut metanol 40% diperoleh hasil **10** (ampelosisinosida, 5,43 mg). Fraksi Sab12 (5,36 g) dipisahkan kembali menggunakan kolom kromatografi ODS dan fase gerak metanol 10% – 100% secara gradien (400 ml) diperoleh sebanyak 10 fraksi (Sab12-1 – Sab12-10). Fraksi Sab12-3 (129 mg) dimurnikan menggunakan HPLC dengan pelarut metanol 35% dan diperoleh senyawa **12** (benzil- $\alpha$ -L- arabinopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopiranosida, 4,51 mg).

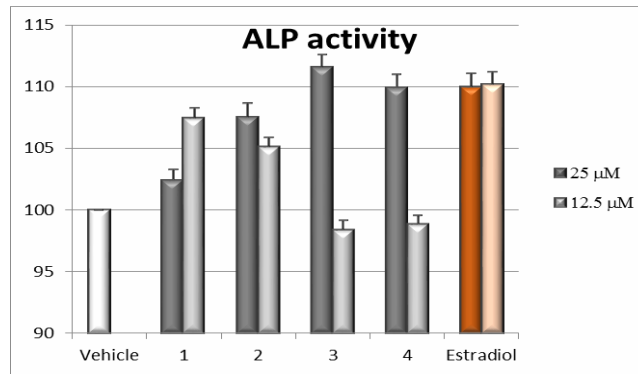


**Gambar 4.3.** Struktur dari senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

#### 4.4. Uji aktivitas ALP dari senyawa dalam fraksi butanol *Spilanthes acmella*

Osteoblas merupakan sel terpenting dalam jaringan tulang dan berhubungan dengan proses proliferasi dan diferensiasi pada pembentukan masa tulang dalam tubuh manusia. Selama proses diferensiasi, protein morfogenetik pada tulang (BMP) menginduksi ekspresi pembentukan sel osteoblast yang merupakan marker dari pembentukan masa tulang. Hal ini didukung oleh peningkatan jumlah enzim alkaline fosfatase (ALP). Pada proses proliferasi, ALP juga meningkatkan jumlah masa tulang. Jadi ALP merupakan enzim yang terikat membran dan sering digunakan sebagai penanda diferensiasi osteogenik.

Untuk mengetahui pengaruh senyawa **1 – 4** yang telah diisolasi dari fraksi butanol *Spilanthes acmella* terhadap fungsi sel osteoblas, dilakukan pengujian senyawa-senyawa tersebut terhadap peningkatan aktivitas enzim ALP yang berhubungan dengan pembentukan osteosid dan inisiasi pengendapan mineral. Dalam penelitian ini, ditemukan bahwa **1, 2, 3** dan **4** meningkatkan aktivitas enzim ALP yang juga menunjukkan bahwa senyawa tersebut meningkatkan pertumbuhan dan diferensiasi sel osteoblast (MC3T3-E1). Senyawa **3** dan **4** dengan konsentrasi 25 mM mampu meningkatkan aktivitas enzim ALP sampai dengan 112%, lebih kuat bila dibandingkan dengan kontrol positif, 17 $\beta$ -estradiol.



**Gambar 4.4.** Peningkatan aktivitas enzim ALP dari senyawa 1–4 terhadap sel osteoblast MC3T3-E1

#### 4.5. Luaran

Luaran yang telah didapatkan dari penelitian ini adalah

- (1) fraksi aktif (butanol) sebagai anti-osteoporosis dengan meningkatkan aktivitas enzim ALP pada sel osteoblas dalam peningkatan derajat kesehatan dan penyembuhan penyakit dari tanaman obat Indonesia
- (2) publikasi hasil penelitian (artikel ilmiah) di jurnal internasional, sebagian data penelitian telah disubmit di Natural Product Communications (NPC) dan diseminarkan pada seminar internasional “Bromo Conferences”
- (3) Draft paten



## BAB V RENCANA TAHAP BERIKUTNYA

Dari roadmap penelitian, telah dilakukan proses ekstraksi, fraksinasi dan isolasi senyawa kandungan dalam tanaman jotang dan juga telah dilakukan uji aktivitas dari masing-masing bahan uji seperti ekstrak, fraksi dan senyawa kandungan sehingga diperoleh fraksi aktif yaitu fraksi butanol dan 14 senyawa yang terkandung didalamnya. Rencana berikutnya di tahun kedua akan dilakukan proses standarisasi simplisia dan ekstrak untuk peningkatan mutu bahan baku, kemudian dibuat produk OHT dari ekstrak atau fraksi terpilih dan terakhir dilakukan uji toksisitas akut, sub akut dan kronik pada ekstrak dan melakukan formulasi produk OHT. Formulasi yang akan direncanakan adalah produk gel etosom dari tanaman ini karena bentuk sediaan seperti ini belum ada di Indonesia khususnya untuk terapi anti-osteoporosis selain itu bentuk sediaan ini lebih memudahkan pasien dalam penggunaannya dan meningkatkan kepatuhan pasien dalam menggunakan obat.

**Tabel 5.1.** Rencana kegiatan penelitian yang akan dilakukan pada tahun berikutnya

| No. | Target Uji   | Rencana Kegiatan   |
|-----|--|--|
| 1.  | Standarisasi ekstrak etanol 70% jotang                           | Dilakukan pengujian beberapa parameter seperti: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parameter non spesifik</li> <li>- Parameter spesifik</li> <li>- Uji kandungan kimia ekstrak</li> </ul> Semuanya dilakukan sesuai dengan buku <i>Materia Medica</i> atau <i>Farmakope Herbal Indonesia</i> |
| 2.  | Uji toksisitas akut, sub akut dan kronik pada ekstrak dan produk | Sebelum pengujian ditahap ini dilakukan maka harus dilakukan pengujian kode etik, kemudian dilakukan uji toksisitas: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Toksisitas akut</li> <li>- Toksisitas sub akut</li> <li>- Toksisitas kronik</li> </ul>   |
| 3.  | Formulasi inovasi produk OHT (gel etosom)                        | Dilakukan penentuan formula produk OHT (gel etosom), yang kemudian akan dilakukan uji terhadap: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Uji stabilitas produk</li> <li>- Uji Kenyamanan</li> <li>- Uji homogenitas</li> <li>- Uji sifat alir produk</li> <li>- Uji disolusi produk</li> </ul>     |

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Kesimpulan pada tahun pertama penelitian ini adalah:

- Fraksi aktif sebagai anti-osteoporosis dengan meningkatkan aktivitas enzim ALP pada sel osteoblas pada tanaman jotang (*Spilanthes acmella*) adalah fraksi butanol dan air
- Diperoleh 4 senyawa baru dari 14 total senyawa dari fraksi butanol dan mempunyai aktivitas meningkatkan aktivitas enzim ALP, khususnya dendratemosida B dan ikarisida B2 sampai dengan 12%

#### **6.2. Saran**

Dilakukan isolasi berlanjut untuk mengetahui senyawa lainnya pada fraksi etil asetat karena potensial di uji in vivo.

## DAFTAR PUSTAKA

- Fleisch H., 1998. Bisphosphonate: Mechanism of action. *Endocrine Reviews* 19, 80–100.
- Franceschi R.T., Young J., 1990. Regulation of Alkaline Phosphatase by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and Ascorbic acid in Bone-derived Cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 5, 1157–1167.
- Irwan M., 2008. Osteoporosis, Fakultas Kedokteran Universitas Riau, RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.
- Jennifer J.W., 2008. *Methods in Molecular Biology: Osteoporosis Methods and Protocol*, Human Press.
- Kostenuik P.J., Harris J., Halloran B.P., Turner R.T., Morey-Holton E.R., and Bikle D.D., 1999. Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insulin-like growth factor-I. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 21–31.
- Laswati H.P, Imam S., Retno W., Mangestuti A., Jahya A.P., 2015. Spilanthes acmella and Physical Exercise Increased Testosterone Levels and Osteoblast Cells in Glucocorticoid Induced Osteoporosis Male Mice. *Bali Medical Journal* 4 (2), 76–81.
- Mashiba T., Mori S., Burr D.B., Komatsubara S., Cao Y., Manabe T., 2005. The effects of suppress bone remodeling by bisphosphonates on microdamage accumulation and degree of mineralization in the cortical bone of dog rib. *Journal of Bone Mineral and Metabolism* 23, 36–42.
- NIH., 2001. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy: Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. *Journal of American Medical Association* 285, 785–795.
- Oshita K., Yamaoka K., Udagawa N., Fukuyo S., Sonomoto K., Maeshima K., 2011. Human mesenchymal stem cells inhibit osteoclastogenesis through osteoprotegrin production. *Arthritis Rheum.*, 63, 1658-1667
- Pramono, S., 2007. *Jamu in Indonesian daily life and industry*. Institute of natural medicine, University of Toyama, p 1.
- Retno W., Yasuhiro T., Tatsurou M., Suresh A., Shigetoshi K., 2010. Alkaline Phosphatase (ALP) Enhancing Iridoid Glucosides from The Indonesian Medicinal Plant *Barleria lupulina*. *Natural Product Communication* 5 (11), 1711–1716.
- Retno W., 2010. Alkaline Phosphatase Activity of *Graptophyllum pictum* and *Spilanthes acmella* Fractions againsts MC3T3-E1 Cells as Marker of Osteoblast Differentiation Cells. *Intern. J. Pharm. & Pharm. Sci.* 3 (1), 34–37.
- Sudoyo, S.A. dan Simadibrata, S., 2006, Osteoporosis. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Jilid II, Edisi IV, Jakarta, FKUI.
- Whyte M.P., Wenkert D., Clements K.L., McAlister W.H., Mumm S., 2003. Bisphosphonate-induced osteopetrosis. *The New England Journal of Medicine* 349, 457–463.
- Woo S.B., Hellstein J.W., Kalmar J.R., 2006. Systematic review: Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Annals of Internal Medicine.* 144, 753–761.

**LAMPIRAN  
BUKTI LUARAN YANG TELAH DICAPAI**

**I. ARTIKEL ILMIAH DI NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS**

Original Paper

**NPC**

**Natural Product Communications**

**An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of  
*Spilanthes acmella* Murr.**

**2018**

**Vol. ?**

**Retno Widyowati\*, Wiwied Ekasari, Neny Purwitasari**

*Department Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy,  
Airlangga University, Dharmawangsa dalam, Surabaya, Indonesia*

\*corresponding author: [rr-retno-w@ff.unair.ac.id](mailto:rr-retno-w@ff.unair.ac.id)

**Received: August ??, 2018; Accepted: ??, 2018**

A benzenepropanoic acid, 4 hydroxy-2-oxo-3 piperidinyl ester (**1**) was isolated from the ethyl acetate layer of whole plant of *Spilanthes acmella* Murr. together with dendranthemoside A (**2**), uridine (**3**), icariside B2 (**4**), chicoriin (**5**), dendranthemoside B (**6**), ampelopsiosionoside (**7**) and benzyl- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**). These were isolated using many kind of chromatographic techniques, such as silica gel, octadecyl silylated silica gel (ODS), and HPLC. They were determined by spectrometric analysis using UV, infrared (IR), high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR-ESI-MS), 1D, and 2D NMR. The benzenepropanoic acid (**1**) was reported for the first time from *Spilanthes acmella* and naturally

**Keywords:** *Spilanthes acmella* Murr., benzenepropanoic, ethyl acetate layer

*Spilanthes acmella* Murr. is included in Asteraceae, used as traditional remedy for tooth-aches, skin diseases, sexual deficiencies [1], dysentery, snake bite remedies [2], rheumatism, fever [3], influenza, cough, rabies diseases, tuberculosis, swelling, arthritis, purgative, sprain, tonsillitis, and other mouth related trouble [4]. Recent bioactivity study reported that this plant had antipyretic [5,6], analgesic [7,8], local anesthetic [6], antimicrobial [9,10], antifungal [9,10,11,12], antimalarial [13,14,15,16], antioxidant [10,17,18,19], vasorelaxant [10,19,20,21], diuretic [22,23,24], immunestimulant [25,26] and anti-inflammatory [17,27]. In Sumatra, it used as panacea (Sumatra) and in Java, as stomatitis [28].

This plant originates from Africa, America, Borneo, India, Sri Lanka, Bangladesh China, Japan, Thailand and Indonesia. It is annual or short-term herb with a height of 40-60. It grows in moist area and has low rate of germination or poor vegetative propagation. The flowers are yellow and have pungent taste accompanied by tingling and numbness on the tongue.

**Figure 1:** Isolated compound from *Spilanthes acmella*

Generally, *Spilanthes acmella* is dominated by presences of alkamide (spilantol), phenolic, coumarin (scopoletin), sesquiterpenoids (polygodial), phytosterol (stigmasterol, amyriols), essential oil (limonene,  $\beta$ -caryophyllene, *Z*- $\beta$ -ocimene,  $\gamma$ -cadinen, thymol, germacrene D and myrcene), vanillic acid, *trans*-ferulic acid, *trans*-isoferulic acid, scopolelin, 3-acetylaleuritic acid,  $\beta$ -sitostenone and amide derivatives [5,29]. Several study showed the major constituent in this plant was spilanthol (N-isobutylamide) and there also triterpenoids [30]. Suthikrai *et al.* (2010) reported that it contains 0.59-1.39 ng/g of phytotestosterone [31]. In our present study, we herein report an amine derivative, a benzenepropanoic acid, 4 hydroxy-2-oxo-3 piperidinyl ester (**1**), from the ethyl acetate layer of the plant. It was reported for the first time from this species and naturally isolated. While in the butanol layer of this plant were isolated dendranthemoside A (**2**), uridine (**3**), icaraside B2 (**4**), chicoriin (**5**), dendranthemoside B (**6**), ampelopsionoside (**7**) and benzyl- $\beta$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside (**8**).

Compound **1** was obtained as yellow amorphous powder, with a molecular formula of C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>NNa as determined by HR-ESI-MS at a *m/z* of 286.1052 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>O<sub>4</sub>NNa : 286.1050). The IR spectrum of **1**

displayed adsorption bands at 3390 and 1777 cm<sup>-1</sup> indicated presence of hydroxyl and carbonyl functionality. The UV spectrum revealed maximal absorption band at 210 and 267 nm.

**Table 1:** <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR data of **1** (in methanol-d<sub>4</sub>, 600 MHz)

| Carbon no. | $\delta_C$ | $\delta_H$                | Cosy  | HM BC     |
|------------|------------|---------------------------|-------|-----------|
| 2          | 180.3      | -                         |       | 4,6       |
| 3          | 74.4       | 4.03 (d, 2.1)             |       | 5         |
| 4          | 82.4       | 4.95 (ddd, 8.0, 5.1, 2.1) |       | 5,6       |
| 5          | 24.7       | 2.35 (m)                  |       |           |
|            |            | 2.23 (m)                  |       | 3,6       |
| 6          | 29.4       | 2.59 (dd, 10.4, 7.2)      |       |           |
|            |            | 2.51 (dd, 10.4, 6.3)      |       |           |
| 1'         | 173.8      | -                         |       | 3,2'      |
| 2'         | 41.9       | 3.46 (m)                  | 3'    | 3'        |
| 3'         | 36.8       | 2.81 (m)                  | 2'    | 2, 5',9'  |
| 4'         | 140.2      | -                         |       | 2',3'     |
| 5',9'      | 130.0      | 7.28 (dd, 6.7, 1.5)       |       | 3',6', 8' |
| 6',8'      | 129.7      | 7.25 (dd, 6.7, 1.5)       | 7'    | 5', 7',9' |
| 7'         | 127.5      | 7.19 (dd, 7.0, 1.5)       | 6',8' | 5',9'     |

*J*-values were given in Hz

The <sup>1</sup>H-NMR spectrum (**table 1**) displayed protons of monosubstituted benzene ring in the region  $\delta_H$  7.19-7.28 and two oxygenated methine protons H-3 and H-4 ( $\delta_H$  4.03 and 4.95). While four methylene protons of H-5 and H-6 were observed as two sets of multiplet centered at  $\delta_H$  2.23 and 2.35 and double of doublet at  $\delta_H$  2.51 and 2.59, respectively. In addition two methylene protons of H-2' and H-3' at  $\delta_H$  3.46 and 2.81 were analyzed. The <sup>13</sup>C-NMR and DEPT 135 spectra (**table 1**) revealed presence of two carbonyls ( $\delta_C$  180.3 and 173.8; C-2 and C-1'), aromatic ring ( $\delta_C$  127.5, 129.7, 130.0 and 140.2; C-7', C-6', C-8', C-5', C-9' and C-4'), oxygenated methine ( $\delta_C$  74.4 and 82.4; C-3 and C-4) and methylene carbons ( $\delta_C$  24.7, 29.4, 36.8 and 41.9; C-5, C-6, C-3', and C-2').

**Figure 2:** Cosy and HMBC correlations of compound **1**.

The position of the benzenepropanoic moiety was deduced to be at C-3 by analysis of the HMBC data, showing correlations of H-3 to carbons at  $\delta_C$  173.8 (**figure 2**). All COSY and HMBC correlations showed at **figure 2** and **table 2**. Based on spectrum analysis and HMBC correlations, the

structure of **1** was determined to be benzenepropanoic acid, 4-hydroxy-2-oxo-3-piperidinyl ester.

### Experimental

**General:** Infrared (IR) and UV spectra were recorded on a HORIBA FT-720 and JASCO V-520 UV/Vis spectrophotometer, respectively. The  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded in methanol- $d_4$  using a Bruker Ultrashield 600 spectrometer at 600 MHz and 150 MHz, respectively, with TMS as an internal standard. Positive ion HR-ESI-MS was performed with an Applied Biosystems QSTAR XL NanoSpray<sup>TM</sup>. Silica gel open column chromatography (CC) and reversed phase (ODS) CC were performed on silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt, Germany). HPLC was performed on an ODS column (Inertsil ODS-3, GL Science, Tokyo, Japan;  $\Phi=6$  mm,  $L=250$  mm), and the eluate was monitored with a JASCO RI-930 intelligent detector and a JASCO PU-1580 intelligent pump.

**Plant material:** Whole plants of *Spilanthes acmella* were collected in late June 2007 in Kebun Raya Purwodadi, Malang, Indonesia, and voucher specimens were deposited at the Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University.

**Extraction and purification:** The air-dried plants (2.0 kg) were extracted with methanol (MeOH, 10.0 L  $\times$  3). The methanol solution was concentrated and adjusted to 95% aq. methanol by the addition of water and then partitioned with *n*-hexane (1.0 L  $\times$  3, 23.5 g). The remaining aqueous methanol layer was evaporated and suspended in 0.5 L of water and then partitioned with ethyl acetate (1.0 L  $\times$  3, 40.4 g) and 1-butanol (1.0 L  $\times$  3, 47.5 g), successively.

The ethyl acetate layer (39.0 g) was subjected on silica gel (300 g) CC with hexane- $\text{CHCl}_3$  (1:1) and then increasing amounts of MeOH in  $\text{CHCl}_3$  [4 L,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2 l), 500 mL fractions being collected], yielding 19 fractions (Fr. Sae1–Sae12). The fraction Sae5 (710 mg) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sae5-1–Sae5-10). The residue of fraction Sab5-4 (231 mg) were purified by 60% aq. MeOH with HPLC to give **1** (benzenepropanoic acid, 4-hydroxy-2-oxo-3-piperidinyl ester, 11.1 mg).

The 1-butanol layer (40.0 g) was subjected on silica gel (300 g) CC with hexane- $\text{CHCl}_3$  (1:1) and then increasing amounts of MeOH in  $\text{CHCl}_3$  [4 L,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (50:1, 40:1, 30:1, 20:1, 15:1, 10:1, 7:1, 5:1, 3:1, 2:1, 2 l), 500 mL fractions being collected], yielding 19 fractions (Fr. Sab1–Sab12). The fraction Sab11 (2.75 g) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL), linear gradient, lead 10 fractions (Fr. Sab11-1–Sab11-10). The residue of fraction Sab11-4 (123 mg) were purified by 35% aq. MeOH with HPLC to give **2** (dendranthemoside A, 3.71 mg). The fraction Sab10 (1.81 g) was subjected to ODS

CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL) and lead 7 fractions (Fr. Sab10-1–Sab10-7). The residue of fraction Sab10-1 (770 mg) also was purified by HPLC (100% aqua, YMC column). Compound **3** (uridine, 27.5 mg) were collected. The remaining residue of fraction Sab10-2 (193 mg) was purified by HPLC (20% aq. MeOH) to give **4** (icariside B2, 6.12 mg) and **5** (cichoriin, 2.99 mg). The residue of fraction Sab10-3 (142 mg) was purified by HPLC (35% aq. MeOH) to give **6** (dendranthemoside B, 4.31 mg). The fraction Sab5 (710 mg) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL) and lead 10 fractions (Fr. Sab5-1–Sab5-10). The mixture of fraction Sab6, Sab7, Sab8, and Sab9 (2.06 g) were subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL) and lead 10 fractions (Fr. Sab6-9-1–Sab6-9-10). The residue of fraction Sab6-9-4 (114 mg), was purified by HPLC (40% aq. MeOH) to give **7** (ampelosisinoside, 5.43 mg). The fraction Sab12 (5.36 g) was subjected to ODS CC in 10% aq. MeOH (400 mL)–100% MeOH (400 mL) and lead 10 fractions (Fr. Sab12-1–Sab12-10). The residue of fraction Sab12-3 (129 mg) was purified by HPLC (35% aq. MeOH) to give **8** (benzyl- $\beta$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside, 4.51 mg).

**Dendranthemoside A (2)** [32]. Yellow powder;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 0.84 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-13), 0.88 (3H, s, H<sub>3</sub>-12), 0.96 (3H, s, H<sub>3</sub>-11), 1.24 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-10), 1.49 (1H, dd,  $J = 12.0, 7.0$  Hz, H-4 $\square$ ), 1.56 (1H, ddd,  $J = 12.0, 5.1, 2.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 1.67 (1H, dd,  $J = 12.0, 7.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 1.82 (1H, m, H-4 $\square$ ), 1.95 (1H, m, H-5), 3.13 (1H, dd,  $J = 8.0, 7.0$  Hz, H-2'), 3.26 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-5'), 3.27 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-4'), 3.34 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-3'), 3.65 (1H, m, H-6' $\square$ ), 3.86 (1H, m, H-6' $\square$ ), 3.95 (1H, m, H-3), 4.29 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-9), 4.35 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 5.55 (1H, dd,  $J = 16.0, 7.0$  Hz, H-7), 5.73 (1H, dd,  $J = 16.0, 7.0$  Hz, H-8) and  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 16.6 (C-13, CH<sub>3</sub>), 24.3 (C-10, CH<sub>3</sub>), 25.3 (C-12, CH<sub>3</sub>), 26.0 (C-11, CH<sub>3</sub>), 35.7 (C-5, CH), 38.3 (C-4, CH<sub>2</sub>), 40.6 (C-1), 42.7 (C-2, CH<sub>2</sub>), 63.0 (C-6', CH<sub>2</sub>), 69.4 (C-9, CH), 71.9 (C-4', CH), 75.3 (C-2', CH), 75.8 (C-3, CH), 78.0 (C-5', CH), 78.2 (C-3', CH), 78.4 (C-6), 102.8 (C-1', CH), 133.9 (C-7, CH), 135.7 (C-8, CH); positive HR-ESI-MS  $m/z$  337.0684 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>(calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>Na: 337.0683).

**Uridine (3)** [33]. Yellow powder;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 4.20 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz, H-5' $\square$ ), 4.31 (1H, dd,  $J = 12.0, 2.0$  Hz, H-5' $\square$ ), 4.66 (1H, m, H-4'), 4.92 (2H, d, m, H-2', 3'), 5.80 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 6.83 (1H, d,  $J = 4.0$  Hz, H-1'), 8.54 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-6) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 62.1 (C-5', CH<sub>2</sub>), 71.6 (C-3', CH), 76.5 (C-2', CH), 86.7 (C-4', CH), 90.8 (C-1', CH), 102.8 (C-5, CH), 141.5 (C-6, CH), 152.7 (C-2), 164.8 (C-4). Positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 267.0587 [ $\text{M}+\text{Na}$ ]<sup>+</sup>(calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Na: 267.0587).

**Icariside B2 (4)** [34]. Colorless solid;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 1.10 (3H, s, H<sub>3</sub>-12), 1.52 (3H, s, H<sub>3</sub>-11), 1.53 (3H, s, H<sub>3</sub>-13), 1.67 (1H, dd,  $J = 12.1, 2.0$  Hz, H-4 $\square$ ),

2.21 (3H, s, H-10), 2.39 (1H, ddd,  $J = 12.1, 4.0, 2.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 2.88 (1H, ddd,  $J = 12.1, 4.0, 2.0$  Hz, H-4 $\square$ ), 3.92 (1H, m, H-5'), 4.10 (1H, t,  $J = 8.3$  Hz, H-2'), 4.28 (1H, t,  $J = 9.2$  Hz, H-3'), 4.31 (1H, t,  $J = 9.2$  Hz, H-4'), 4.42 (1H, dd,  $J = 12.1, 2.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 4.54 (1H, dd,  $J = 12.1, 5.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 4.98 (1H, m, H-3), 5.12 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 5.91 (1H, s, H-8) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 26.9 (C-10, CH<sub>3</sub>), 29.6 (C-11, CH<sub>3</sub>), 31.5 (C-13, CH<sub>3</sub>), 32.4 (C-12, CH<sub>3</sub>), 36.7 (C-1), 47.5 (C-4, CH<sub>2</sub>), 48.5 (C-2, CH<sub>2</sub>), 63.2 (C-6', CH<sub>2</sub>), 71.7 (C-5), 72.2 (C-4', CH), 72.3 (C-3, CH), 75.8 (C-2', CH), 78.8 (C-5', CH), 79.1 (C-3', CH), 100.9 (C-8, CH), 103.5 (C-1', CH), 120.3 (C-6, CH), 198.2 (C-7), 210.1 (C-9); positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 409.1836 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Na: 409.1833).

**Cichoriin (5)** [35]. Colorless solid;  $^1\text{H}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 4.13 (1H, ddd,  $J = 7.0, 6.2, 2.0$  Hz, H-3'), 4.28 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-2'), 4.30 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-4'), 4.36 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-5'), 4.39 (1H, dd,  $J = 11.1, 5.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 4.58 (1H, dd,  $J = 11.1, 2.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 5.61 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 6.24 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H-3), 7.13 (1H, s, H-8), 7.60 (1H, br s, H-4), 7.69 (1H, s, H-5) and  $^{13}\text{C}$  NMR (pyridine- $d_6$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 62.9 (C-6', CH<sub>2</sub>), 71.7 (C-4', CH), 75.4 (C-2', CH), 78.9 (C-5', CH), 79.7 (C-3', CH), 104.7 (C-1', CH), 104.9 (C-8, CH), 111.9 (C-10), 113.0 (C-3, CH), 116.9 (C-5, CH), 144.6 (C-7), 144.7 (C-7), 152.5 (C-6), 154.3 (C-9), 161.8 (C-2). Positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 363.0686 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>Na: 363.0687).

**Dendranthemside B (6)** [32]. Yellow powder;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 0.77 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-13), 0.83 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-11), 1.00 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-12), 1.47 (1H, dd,  $J = 12.0, 7.0$  Hz, H-4 $\square$ ), 1.55 (1H, ddd,  $J = 12.0, 5.1, 2.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 1.67 (1H, dd,  $J = 12.0, 7.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 1.83 (1H, m, H-4 $\square$ ), 2.08 (1H, m, H-5), 2.23 (3H, d,  $J = 7.0$  Hz, H<sub>3</sub>-10), 3.10 (1H, dd,  $J = 8.0, 7.0$  Hz, H-2'), 3.23 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-4', 5'), 3.30 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-3'), 3.62 (1H, m, H-6' $\square$ ), 3.83 (1H, m, H-6' $\square$ ), 3.95 (1H, m, H-3), 4.33 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 6.31 (1H, dd,  $J = 16.0, 7.0$  Hz, H-8), 6.85 (1H, dd,  $J = 16.0, 7.0$  Hz, H-7) and  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 16.6 (C-13, CH<sub>3</sub>), 25.2 (C-12, CH<sub>3</sub>), 26.1 (C-11, CH<sub>3</sub>), 27.5 (C-10, CH<sub>3</sub>), 35.5 (C-5, CH), 38.0 (C-4, CH<sub>2</sub>), 41.1 (C-1), 42.6 (C-2, CH<sub>2</sub>), 63.0 (C-6', CH<sub>2</sub>), 71.9 (C-4', CH), 75.3 (C-2', CH), 75.6 (C-3, CH), 78.0 (C-5', CH), 78.2 (C-3', CH), 79.2 (C-6), 102.9 (C-1', CH), 131.7 (C-8, CH), 154.4 (C-7, CH), 201.0 (C-9); positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 411.1991 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>Na: 411.1989).

**Ampelosinoside (7)** [36]. Yellow powder;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 0.90 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H<sub>3</sub>-13), 0.93 (3H, s, H<sub>3</sub>-12), 0.99 (3H, s, H<sub>3</sub>-11), 1.32 (3H, d,  $J = 6.0$  Hz, H<sub>3</sub>-10), 1.82 (1H, d,  $J = 14.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 2.11 (1H, dd,  $J = 13.0, 2.0$  Hz, H-4 $\square$ ), 2.28 (1H, m, H-5), 2.44 (1H, t,  $J = 13.0$  Hz, H-4 $\square$ ), 2.87 (1H, dd,  $J = 14.0, 3.0$  Hz, H-2 $\square$ ), 3.12 (1H, t,  $J = 8.0$  Hz, H-5'), 3.18 (2H, dd,  $J = 9.0, 7.0$  Hz, H-2'), 3.29 (1H, m, H-4'), 3.35 (1H, t,  $J = 4.0$  Hz, H-3'), 3.65 (1H, dd,  $J = 11.0, 5.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 3.84 (1H, m, H-6' $\square$ ), 4.35 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1'), 4.44 (1H, q, H-9), 5.73 (1H, d,  $J = 16.0$  Hz, H-

7), 5.91 (1H, dd,  $J = 16.0, 7.0$  Hz, H-8) and  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 16.5 (C-13, CH<sub>3</sub>), 21.5 (C-10, CH<sub>3</sub>), 25.0 (C-11, CH<sub>3</sub>), 25.4 (C-12, CH<sub>3</sub>), 37.8 (C-5, CH), 43.9 (C-1), 46.4 (C-4, CH<sub>2</sub>), 52.5 (C-2, CH<sub>2</sub>), 62.7 (C-6', CH<sub>2</sub>), 71.6 (C-4', CH), 75.4 (C-2', CH), 77.8 (C-6, C-9), 78.1 (C-5', CH), 78.2 (C-3', CH), 102.6 (C-1', CH), 134.0 (C-7, CH), 134.9 (C-8, CH), 214.9 (C-3); positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 411.1990 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>O<sub>6</sub>Na: 411.1989).

**Benzyl- $\square$ -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\square$ -D-glucopyranoside (8)** [37]. Colorless solid;  $^1\text{H}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{H}}$ ): 3.24 (1H, dd,  $J = 9.1, 8.0$  Hz, H-2'), 3.28 (1H, m, H-3'), 3.29 (2H, m, H-4', 5'), 3.44 (1H, dd,  $J = 6.0, 3.3$  Hz, H-3''), 3.46 (1H, dd,  $J = 8.0, 2.0$  Hz, H-5'' $\square$ ), 3.52 (1H, dd,  $J = 9.1, 7.0$  Hz, H-2''), 3.68 (1H, dd,  $J = 12.1, 6.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 3.74 (1H, m, H-4''), 3.79 (1H, dd,  $J = 12.1, 3.3$  Hz, H-5''), 4.05 (1H, dd,  $J = 12.1, 2.0$  Hz, H-6' $\square$ ), 4.28 (1H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-1''), 4.35 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-1'), 4.66 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-7 $\square$ ), 4.81 (1H, d,  $J = 12.1$  Hz, H-7 $\square$ ), 7.26 (1H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-4), 7.32 (2H, t,  $J = 7.0$  Hz, H-3, 5), 7.43 (2H, d,  $J = 7.0$  Hz, H-2, 6) and  $^{13}\text{C}$  NMR (methanol- $d_4$ ,  $\delta_{\text{C}}$ ): 66.8 (C-5'', CH<sub>2</sub>), 69.6 (C-4'', CH), 69.7 (C-6', CH<sub>2</sub>), 71.9 (C-4', CH), 72.1 (C-7, CH<sub>2</sub>), 72.6 (C-2'', CH), 74.4 (C-3'', CH), 75.3 (C-2', CH), 77.2 (C-5', CH), 78.1 (C-3', CH), 103.6 (C-1', CH), 105.4 (C-1'', CH), 128.8 (C-4, CH), 129.3 (C-2, C-6, CH), 129.4 (C-3, C-5, CH), 139.3 (C-1). Positive HR-ESI-MS  $m/z$ : 425.1414 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>O<sub>10</sub>Na: 425.1418).

**Acknowledgments:** This research was supported by Insinas Grant Project from the Ministry of Higher Education of Indonesia.

## References

- [1] Sharma V, Boonen J, Chauhan NS, Thakur M, Spiegeleer BD, Dixit VK (2011) *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. *Phytomedicine*, 18, 1161–1169.
- [2] Tiwari KL, Jadhav SK, Joshi V (2011) An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. *Chin J Integr Med*, 9, 1170–1178.
- [3] Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Chartchalerm INA, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2008) Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int J Mol Sci*, 9, 2724–2744.
- [4] Ramsewak RS, Erickson AJ, Nair MG (1999) Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. *Phytochemistry*, 51, 729–732.
- [5] Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR (2001) Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol*, 33, 2-16.
- [6] Chakraborty A, Devi BRK, Thokchom I, Sanjebam R, Khumbong S (2010) Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J Pharmacol*, 42, 277–279.
- [7] Ratnasooriya WD, Pieris KPP (2005) Attenuation of persistent pain and hyperalgesia by *Spilanthes acmella* flowers in rats. *Pharm Biol*, 43, 614–619.
- [8] Bermúdez-Ocaña DY, Ambriz-Tututi M, Pérez-Severiano F, Granados-Soto V (2006) Pharmacological evidence for the participation of NO–cyclic GMP–PKG–K<sup>+</sup> channel pathway in the antiallodynic action of resveratrol. *Pharmacol Biochem Behav*, 84, 535–542.
- [9] Arora S, Vijay S, Kumar D (2011) Phytochemical and antimicrobial studies on the leaves of *Spilanthes acmella*. *J Chem Pharm Res*, 3, 145–150.
- [10] Prachayasittikul S, Suphamong S, Wora-chartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2009) Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, 14, 850–867.
- [11] Phongpaichit S, Subhadhirasakul S, Wattanapiromsakul C (2005) Antifungal activities of extracts from Thai medicinal plants against opportunistic fungal pathogens associated with AIDS patients. *Mycoses*, 48, 333–338.
- [12] Rani SA, Murty SU (2006) Antifungal potential of flower head extract of *Spilanthes acmella* Linn. *Afr J Biomed Res*, 9, 67–69.
- [13] Spelman K, Depoix D, McCray M, Mouray E, Grellier P (2011) The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthal and undeca-2E-ene- 8,10-diyonic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* anti-malarial activity. *Phytother Res*, 25, 1098–1101.
- [14] Mbeunkui F, Grace MH, Lategan C, Smith PJ, Raskin I, Lila MA (2011) Isolation and identification of antiplasmodial N-alkyl-amides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. *J Chromatogr B*, 879, 1886–1892.
- [15] Pandey V, Agrawal V (2009) Efficient micro-propagation protocol of *Spilanthes acmella* L. possessing strong antimalarial activity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 45, 491–499.
- [16] Bae SS, Ehrmann BM, Ettefagh KA, Cech NB (2010) A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthal in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. *Phytochem Analysis*, 21, 438–443.
- [17] Wu LC, Fan NC, Lin MH, Chu IR, Huang SJ, Hu CY (2008) Antiinflammatory effect of spilanthal from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J Agric Food Chem*, 56, 2341–2349.
- [18] Nanasombat S, Teckchuen N (2009) Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *J Med Plants Res*, 3, 443–449.
- [19] Wongsawatkul O, Prachayasittikul S, Isarankura-Na-Ayudhya C, Satayavivad J, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2008) Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *Int J Mol Sci*, 9, 2724–2744.
- [20] Prachayasittikul S, Wongsawatkul O, Suksrichavalit T, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2010) Bioactivity evaluation of *Eclipta prostrata* linn: A potential vaso-relaxant. *Eur J Sci Res*, 44, 167–176.
- [21] Sharma V, Boonen J, Chauhan NS, Thakur M, De Spiegeleer B, Dixit VK (2011) *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. *Phytomedicine*, 18, 1161–1169.



- [22] Vanamala U, Elumalai A, Eswaraiah MC, Shaik A (2012) An updated review on diuretic plants-2012. *Int J Pharm Biol Arch*, 3, 29–31.
- [23] Kumar BNS, Swamy BMV, Swamy A, Murali A (2010) A review on natural diuretics. *Res J Pharm Biol Chem Sci*, 1, 615–634.
- [24] Ratnasooriya WD, Pieris KPP, Samaratunga U, Jayakody JRAC (2004) Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. *J Ethnopharmacol*, 91, 317–320.
- [25] Savadi R, Yadav R, Yadav N (2010) Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract *Spilanthes acmella* Murr. Leaves. *Indian J Nat Prod Resour*, 1, 204–207.
- [26] Rios MY (2012) Natural alkaloids: Pharmacology, chemistry and distribution. Drug discovery research in pharmacognosy. *InTech 2012*, 107–144.
- [27] Barman S, Sahu N, Deka S, Dutta S, Das S (2009) Antiinflammatory and analgesic activity of leaves of *Spilanthes acmella* (ELSA) in experimental animal models. *Pharmacologyonline*, 1, 1027–1034.
- [28] Hossain S, Agarwala B, Sarwar S, Karim M, Jahan R, Rahmatullah M (2010) Traditional use of medicinal plants in Bangladesh to treat urinary tract infections and sexually transmitted diseases. *Ethnobotany Research and Applications*, 8, 61–74.
- [29] Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V (2009) Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. *Molecules*, 4, 850–867.
- [30] Dubey S, Maity S, Singh M, Saraf SA and Saha S (2013) Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A review. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1–9.
- [31] Suthikrai W, Jintana R, Sophon S, Usawang S and Hengtakulsin R (2010) The study on testosterone, progesterone and estradiol 17- $\beta$  levels in Thai. *J Toxicol.*, 25(2), 183.
- [32] Otsuka <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489> - A373-1 H, Takeda <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489> - A373-1 Y, Yamasaki <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-961489> - A373-1 K, Takeda Y (1992) Structural elucidation of Dendranthemosides A and B: Two new  $\beta$ -ionone glucosides from *Dendranthema shiwogiku*. *Planta Medica*, 58, 373–375.
- [33] Chen HX, Geng CA, Cao TW, Zhang XM, Ma YB, Huang XY, Chen JJ (2013) Chemical structure of capsicoside A from fruits of *Capsium annuum*. *J Chinese Materia Medica*, 38(12), 1934–1937.
- [34] Miyase T, Ueno A, Takizawa N, Kobayashi H, Karasawa H (1987) Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* MORR. Var. *thunbergianum* (MIQ.) NAKAI. I. *Chem Pharm Bull*, 35, 1109–1117.
- [35] Zhou H, Qin M, Hong J, Wu G (2009) Chemical constituents of *Viola yedoensis*. *Chin J Nat Med*, 7, 290–292.
- [36] Marino SD, Borbone N, Zollo F, Lanaro A, Meglio PD, Lorizzi M (2004) Megastigmane and phenolic components from *Laurus nobilis* L. leaves and their inhibitory effects on nitric oxide production. *J Agric Food Chem*, 52, 7525–7531.
- [37] Rosa S, Giulio A, Tommonaro G (1996) Aliphatic and aromatic glycosides from the cell cultures of *Lycopersicon esculentum*. *Phytochemistry*, 42, 1031–1034

## II. BUKTI TELAH DI SUBMIT DAN DIREVIEW

### Natural PRODUCT COMMUNICATION



**Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity  
11 – 12 JULY 2018, Surabaya, INDONESIA**

#### FULL PAPER ACCEPTANCE NOTIFICATION

September 28, 2018

To:  
Dr Rr Retno Widyowati  
Universitas Airlangga

**Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity  
11 – 12 JULY 2018, Surabaya, INDONESIA**

Dear Dr Rr Retno Widyowati,

We are very pleased to inform you that your paper entitled, "**An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of *Spilanthes acmella* Murr.**" has been reviewed and **ACCEPTED for further submission to Natural Product Communication.**

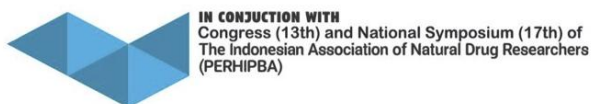
Please note that there is **one more review process conducted by publisher** to select the manuscript for publication in the journal or proceeding. We will send the notification of acceptance/rejection to you after we receive the result from the publisher around December 2018.

Please be informed that request for manuscript retraction and revision is not allowed from the time this notification sent.

Should you have any question, please contact us at [scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id).

Best regards,

Prof. Bambang Prajogo  
Bromo Conference  
Symposium on Natural Product and Biodiversity  
Universitas Airlangga, Surabaya, 11<sup>th</sup>-12<sup>th</sup> July 2018



Secretariat :  
Faculty of Pharmacy Universitas Airlangga  
Campus B, Dharmawangsa Dalam Surabaya, 60286-INDONESIA  
Phone +62315033710, Ext. 307 Fax. +62315020514  
Email: [bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:bromo2018@ff.unair.ac.id)  
Website <http://bromo.ff.conference.unair.ac.id>

**retno\_biotek** <retno\_biotek@yahoo.com>  
**To:Scientific Bromo Conference Universitas Airlangga**  
Aug 19 at 1:17 PM

Dear Committee of Scientific Bromo Conference,

Here with I submit the paper for NPC.  
Thank you very much.

Best regards,

Retno Widyowati, Ph.D  
Department of Pharmacognosy and Phytochemistry  
Faculty of Pharmacy  
Universitas Airlangga  
Jl. Darmawangsa dalam 1-3 Surabaya  
September 10, 2018

To:

Dr Rr Retno Widyowati  
Universitas Airlangga

Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity

11 – 12 JULY 2018, Surabaya, INDONESIA

Dear Dr Rr Retno Widyowati,

Based on the review results, we regret to inform you that your paper entitled,

**An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of  
Spilanthes acmella Murr**

has been reviewed with Major Revision. The manuscript will have opportunity to be processed for further submission to NPC.

The reviewers suggested some revision of your manuscript (attached files). Please revise your fullpaper according to reviewer's suggestion and rewords your manuscript if similarity of your manuscript more than 20% (attached file). Please submit your response and/or revised paper through [scientific-bromo2018@f.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@f.unair.ac.id) by September 15, 2018 at the latest.

For the paper with high result of plagiarism, please revised the word and sentences structure (attached).

We attached the declaration of originality and copyright form, please submit together with the revised manuscript.

For further question, please do not hesitate to contact us. Thank you in advance and we look forward for your response.

--

Best Regards

Scientific Committee

Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity

Faculty of Pharmacy Universitas Airlangga Surabaya

Darmawangsa Dalam Surabaya 60286

[bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:bromo2018@ff.unair.ac.id)

<http://ff.unair.ac.id/conferences/bromo2018>

**pkagrawal@naturalproduct.us**

Tue, Nov 13, 9:42 PM (9 days ago)

to me, wahyuni.tutiksri

Dear Prof. Widyowati,

With reference to your manuscript entitled "An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of *Spilanthes acmella* Murr." (Bromo-006), it looks like that compound 1 is a known compound which is It was reported for the first time from this species. However stereo at C-2 and C-3 is missing. We would greatly appreciate to hear from you about your views and your early response would be highly appreciated.

We are thankful for your submission and looking forward to hear from you,

With best regards,

Sincerely yours

Pawan K. Agrawal

**pkagrawal@naturalproduct.us**

Fri, Nov 16, 3:00 AM (6 days ago)

to me, wahyuni.tutiksri

Dear Prof. Widyowati,

We hope that you are in receipt of our message concerning revision/correction of your manuscript entitled "An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of *Spilanthes acmella* Murr." (Bromo-006).

In relation to the above, we wish to inform you that we have not yet received your response. Your cooperation will be much appreciated; therefore, we ask that you return your revised manuscript promptly.

Looking forward to hear from you,

With best regards

Yours sincerely,

Pawan K. Agrawal

**rr retno widyowati** <rr-retno-w@ff.unair.ac.id>

Fri, Nov 16, 1:32 PM (6 days ago)  
to pkagrawal

Dear Professor Pawan K Agrawal,

I am so sorry that I am late to reply this email. Based on my opinion both position have beta conformation.

Thank you very much.

Retno Widyowati, Ph.D

Attachments area



**pkagrawal@naturalproduct.us**

Sat, Nov 17, 4:49 AM (5 days ago)

to me

Dear Prof. Widyowati,

With reference to revised version of your manuscript entitled "An amine derivative from the ethyl acetate layer of the whole part of *Spilanthes acmella* Murr." (Bromo-006), please discuss about about  $\beta$ -orientation of substituents at C-2 and C-3 and their configuration (*R* and/or *S*) in your manuscript. Compound should either be hydrolyzed or <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for benzene propanoic acid and 3,4 dihydroxy-2-oxo-piperidine form literature should be added .

Spectroscopic data for known compounds can also be eliminated.

We are thankful for your submission and looking forward to receive corrected/revised version by November 18, 2018.

### **III. MENGIKUTI SEMINAR INTERNASIONAL**

#### **Bromo Conference**

**Dari:** Bromo Conference Universitas Airlangga <[scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id)>

**Tanggal:** 13 Mei 2018 23.31.47 WIB

**Kepada:** [retno\\_biotek@yahoo.com](mailto:retno_biotek@yahoo.com)

**Subjek: Notification of Abstract Acceptance to BROMO Conference Surabaya - 2018**

**Balas-Ke:** Bromo Conference Universitas Airlangga <[scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id)>

**28<sup>nd</sup> April 2018**

**To:** [retno\\_biotek@yahoo.com](mailto:retno_biotek@yahoo.com)

**Abstract No.133**

**Rr Retno Widyowati S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt  
Faculty of Pharmacy**

**Dharmawangsa dalam  
Surabaya, Indonesia**

**Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity**

**11 – 12 JULY 2018, Surabaya, INDONESIA**

Dear Rr Retno Widyowati S.Si., M.Pharm., Ph.D., Apt

We are very pleased to inform you that your abstract entitled, "**Benzopyrones and Fatty Acids from Ethyl Acetate Layer of**



**Spilanthes acmella Murr**” (Abstract No. 133) has been accepted for **oral\_presenter** at Bromo Conference Symposium on Natural Products and Biodiversity scheduled on 11 – 12 July 2018 in Surabaya, Indonesia. The exact time and room of your presentation session will be specified on the Bromo Conference website: <http://ff.unair.ac.id/conferences/bromo2018/> at the beginning of June, 2018.

Please note that individual requests for specific presentation dates and/or times cannot be addressed. Oral presentations cannot exceed 10 min (including discussion). The details of oral presentation guideline is available on the conference website.

It is a condition of abstract acceptance that you or a nominated presenting co-author completes the registration and payment process before **14<sup>th</sup> May 2018**. To register to attend the conference, please follow the link: <http://ff.unair.ac.id/conferences/bromo2018/reg1>

Should the addressee above not be the nominated presenter, please inform us the name and email address of the presenter immediately to: [scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id).

Again, congratulations on the acceptance of your abstract. If you are interest to publish your full paper to our proceeding or journal of Natural Product communication please submit your full paper to [scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:scientific-bromo2018@ff.unair.ac.id). On behalf of the Scientific Program Committee, we look forward to your full participation in the Bromo Conference in Surabaya.

Yours Sincerely,

Prof. Bambang Prajogo EW  
Chairman of the Organizing Committee  
Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga  
Dharmawangsa Dalam, Surabaya, 60286, INDONESIA  
E-mail: [bromo2018@ff.unair.ac.id](mailto:bromo2018@ff.unair.ac.id)  
Website: <http://ff.unair.ac.id/conferences/bromo2018/>

---

**OP14**

**Benzopyrones and Fatty Acids from Ethyl Acetate Layer of *Spilanthes acmella* Murr**

Retno Widyowati\*, Wiwied Ekasari, and Neny Purwitasari

*Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya 60285*

\*Presenting author

Email: [rr-retno-w@ff.unair.ac.id](mailto:rr-retno-w@ff.unair.ac.id), Phone: +6281615886978

---

**ABSTRACT**

**Background:** The main constituents from the whole aerial parts, flower heads and roots of *Spilanthes acmella* Murr. (Compositae) yield “spilanthol” and “acmellonate,” they are sometimes used to reduce the pain associated with toothaches, induce saliva secretion and is a powerful insecticide and local anesthetic. It also has an important source of highly valuable bioactive compounds such as fatty acids, phenolics, coumarin (scopoletin), triterpenoids and flavonoids.

**Objective:** This research has purpose to find the chemical constituents contain in the ethyl acetate layer of the 70% ethanol extract of *Spilanthel acmella*.

**Methods:** The structures of these compounds were isolated by various chromatographic techniques such as silica gel, ODS, HPLC and determined as follows by spectrometric analysis (UV, IR, HR-ESI-MS, 1D and 2D NMR) and based on chemical evidences.

**Results:** The investigation of the ethyl acetate layer of this plant has demonstrated the present of a benzene propanoic (1), 9,11-octadecadienoic methyl ester acid (2), tridecanoic methyl ester acid (3), and pentadecanoic acid (4).

**Conclusion:** The ethyl acetate layer of *Spilanthes acmella* contains benzopyrones and fatty acids.

**Keywords:** *Spilanthes acmella*, benzopyrones, fatty acids.

---

## IV. DRAFT PATEN

### Deskripsi

#### **PEMBUATAN EKTRAK ETANOL 70% JOTANG (*Spilanthes acmella* Murr.) DAN PENGGUNAANNYA SEBAGAI BAHAN ANTI OSTEOPOROSIS**

##### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan pembuatan ekstrak etanol 96% Jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dari familia Asteraceae. Lebih khusus, ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) digunakan sebagai bahan anti-osteoporosis pada kasus peningkatan masa tulang yang disebabkan oleh pengeroposan tulang.

##### **Latar Belakang Invensi**

Osteoporosis merupakan salah satu penyakit serius yang berhubungan dengan usia lanjut, penyakit ini dapat menyebabkan patah tulang yang sering terjadi pada pinggul dan punggung, juga menyebabkan nyeri kronis, kehilangan keseimbangan dan dapat menimbulkan kematian.

Insiden osteoporosis lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki-laki dan merupakan problem pada wanita pascamenopause. Osteoporosis di klinik menjadi penting karena problem fraktur tulang, baik fraktur yang disertai trauma yang jelas maupun fraktur yang terjadi tanpa disertai trauma yang jelas.

Penelitian Roeshadi di Jawa Timur mendapatkan hasil bahwa puncak masa tulang dicapai pada usia 30-34 tahun dan rata-rata kehilangan masa tulang pascamenopause adalah 1,4% per tahun. Penelitian yang dilakukan di klinik Reumatologi RSCM mendapatkan faktor resiko osteoporosis yang meliputi usia, lamanya menopause dan kadar estrogen yang rendah, sedangkan faktor proteksinya adalah kadar estrogen yang tinggi, riwayat berat badan lebih atau obesitas dan latihan yang teratur (Irwan, 2008).

Ada 2 penyebab utama osteoporosis, yaitu pembentukan masa puncak tulang yang kurang baik selama masa pertumbuhan dan meningkatnya pengurangan masa tulang setelah menopause. Masa tulang meningkat secara konstan dan mencapai puncak sampai usia 40 tahun, pada wanita lebih muda sekitar 30-35 tahun. Walaupun demikian tulang yang hidup tidak pernah beristirahat dan akan selalu mengadakan remodeling dan memperbaharui cadangan mineralnya sepanjang garis beban mekanik. Faktor pengatur formasi dan resorpsi tulang dilaksanakan melalui 2 proses yang selalu berada dalam keadaan seimbang dan disebut coupling. Proses coupling ini memungkinkan aktivitas formasi tulang sebanding dengan aktivitas resorpsi tulang. Proses ini berlangsung 12 minggu pada orang muda dan 16-20 minggu pada usia menengah atau lanjut. Remodeling rate adalah 2-10% masa skelet per tahun (Stevenson & Marsh, 2007).

Proses remodelling ini dipengaruhi oleh beberapa faktor, yaitu faktor lokal yang menyebabkan terjadinya satu rangkaian kejadian pada konsep Activation – Resorption – Formation (ARF). Proses ini dipengaruhi oleh protein mitogenik yang berasal dari tulang yang merangsang preosteoblas supaya membelah menjadi osteoblas akibat adanya aktivitas resorpsi oleh osteoklas. Faktor lain yang mempengaruhi proses pembentukan tulang kembali (remodeling) adalah faktor hormonal. Proses ini akan ditingkatkan oleh hormon paratiroid, hormon pertumbuhan dan  $1,25(\text{OH})_2$  vitamin D. Sedang yang menghambat proses ini adalah kalsitonin, estrogen dan glukokortikoid. Proses-proses yang mengganggu remodeling tulang inilah yang menyebabkan osteoporosis.

Sediaan farmasi yang digunakan untuk pengobatan osteoporosis adalah golongan bisfosfonat seperti alendronate, namun masalah penyakit ini masih belum teratasi, karena pemicunya yang sangat kompleks. Mekanisme kerja obat osteoporosis kebanyakan menurunkan resorpsi tulang sedangkan permasalahan osteoporosis tidak hanya pada resorpsi tulang saja tapi bagaimana terjadinya keseimbangan antara proses pembentukan dan resorpsi tulang terjadi. Oleh karena itu perlunya ditemukan obat baru yang dapat menjaga keseimbangan remodeling tulang melalui peningkatan pembentukan masa tulang dan penurunan resorpsi tulang. Selain itu penggunaan obat osteoporosis dalam jangka panjang dan melalui oral membuat pasien menjadi bosan dan tidak patuh. Sediaan semisolida yaitu cream atau gel ethosom sangat cocok dan inovatif digunakan untuk pengobatan ini dalam memperbaiki kepatuhannya. Beberapa sediaan dilaporkan mengandung bahan sintetik atau bahan kimia terlarang dan memiliki efek samping yang berbahaya, salah satunya yaitu menimbulkan kanker.

Produk anti-osteoporosis yang menggunakan bahan baku berasal dari alam memiliki efek samping relatif lebih kecil dibandingkan bahan baku sintesis atau semi-sintesis. Dari aspek kualitas, keamanan, dan efektivitas produk, maka pengembangan sediaan anti-osteoporosis dengan bahan alam merupakan suatu peluang yang menjanjikan. Hasil temuan berupa bahan anti-osteoporosis yang berasal dari jatang (*Spilanthes acmella* Murr.) dalam bentuk ekstrak etanol 96% diharapkan memiliki nilai komersial yang tinggi untuk diproduksi di Indonesia.

Jumlah penduduk yang sangat besar sebagai pasar dengan diversitas pengguna yang luas, tersedianya bahan baku jatang di seluruh Indonesia yang selama ini tumbuh liar tanpa tergantung musim dan masih belum memiliki nilai komoditas, merupakan potensi yang menunjang pengembangan jatang sebagai bahan antiosteoporosis.

Invensi ini diajukan berkaitan dengan penggunaan ekstrak etanol 96% jatang sebagai bahan anti-osteoporosis dalam menjaga keseimbangan tulang melalui peningkatan masa tulang dan penurunan resorpsi tulang. Ekstrak ini mengandung flavonoid, triterpenoid dan alkaloid.

#### **Uraian singkat Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan proses pembuatan ekstrak etanol 96% jatang sebagai bahan anti-osteoporosis dan kandungan flavonoid, triterpenoid, dan alkaloid. Ekstrak dibuat dengan cara merendam 500 g simplisia seluruh bagian tanaman jatang ke dalam wadah maserasi yang berisi 5 liter etanol 96% selama 3 hari sambil diaduk-aduk sesekali, ekstrak diuapkan dengan *rotary evaporator*. Analisis kandungan flavonoid, triterpenoid dan alkaloid dalam ekstrak etanol 96% jatang dilakukan secara kualitatif menggunakan pereaksi warna dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Penggunaan ekstrak etanol 96% jatang (*Spilanthes acmella* Murr.) untuk pembuatan sediaan anti-osteoporosis.

#### **Uraian Lengkap Invensi**

Ekstrak etanol 96% jatang diperoleh dari 5 kg seluruh bagian tanaman segar jatang yang dikeringkan dengan cara dianginkan, kemudian diserbuk dan didapat sebanyak 568 g serbuk kering (*mesh* 20). Sebanyak 500 g serbuk diekstraksi dengan 5 liter etanol 96% selama 3 hari, selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh 57 g ekstrak kering. Kandungan flavonoids, triterpenoid dan alkaloid dianalisis secara kualitatif dengan pereaksi warna dan dan KLT.

Uji aktivitas anti-osteoporosis ekstrak etanol 96% jatang dilakukan secara in-vitro dalam meningkatkan masa tulang menggunakan sel MC3T3-E1 dan menurunkan resorpsi tulang menggunakan sel RWA 264,7. Tahapan pengujian peningkatan masa tulang dimulai dari sel MC3T3-E1 yang 90% bergerombol, dikultur dengan menggunakan medium  $\alpha$ -MEM yang

mengandung 10 mM  $\beta$ -glycerofosfat and 50  $\mu$ g/ml asam askorbat. Medium diganti setiap 2–3 hari, setelah 6 hari sel dikultur dengan medium yang mengandung 0,3% serum anak sapi and sampel selama 3 hari. Kemudian medium dibuang dan sel dicuci dengan menggunakan buffer fosfat salin sebanyak 3 kali. Sel dilisis dengan 0,2% triton X-100 dan disentrifuse pada 14000 x g selama 5 menit. Supernatan yang jernih digunakan untuk mengukur ALP dengan bantuan ALP assay kit (Retno et. al., 2010).

Sedangkan tahapan uji penurunan resorpsi tulang dilakukan dengan cara sebanyak  $5 \times 10^5$  sel RAW 264,7/sumur dan medium DMEM yang mengandung 10% FBS, 100 units/ml penisilin dan 100  $\mu$ g/ml streptomisin ditanam dalam 24-well plates untuk menguji sel viabilitas dan proliferasi. Setelah 1 hari inkubasi, dimasukkan sejumlah sampel dengan konsentrasi tertentu (100, dan 10  $\mu$ g/ml ekstrak etanol 70% maserasi, ekstrak etanol 70% modifikasi dan ekstrak air tanduk rusa) beserta medium baru dan diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C. Setelah inkubasi 1 hari, medium dibuang dan ditambahkan dengan 200  $\mu$ l MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) dan diinkubasi selama 4 jam. Untuk melarutkan kristal formazan yang terbentuk setelah inkubasi, ditambahkan 100  $\mu$ l DMSO dan diukur absorbansinya pada 570 nm dengan menggunakan enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Tecan Trading AG, Tecan, Switzerland). Relatif sel viabilitas diukur dalam persen relatif sel yang dibandingkan terhadap kontrol.

Hasil Uji aktivitas anti-osteoporosis menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% jotang mampu meningkatkan pembentukan masa tulang melalui mekanisme peningkatan enzim ALP yang merupakan marker dari sel osteoblas sebesar 63%. Selain itu ekstrak tersebut juga mampu menghambat penurunan resorpsi tulang melalui penghambatan pertumbuhan sel RAW 264,7 sebesar 30%.

#### **Klaim**

1. Proses pembuatan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dilakukan dengan tahapan-tahapan berikut: mengeringkan seluruh bagian tanaman segar jotang dengan cara dianginkan, kemudian diserbuk sampai ukuran 20 mesh; serbuk tersebut direndam dengan etanol 96% selama 3 hari, selanjutnya diuapkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kering.
2. Penggunaan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) menurut klaim 1 untuk pembuatan sediaan anti-osteoporosis dalam menjaga keseimbangan remodeling tulang melalui peningkatan pembentukan masa tulang dan penghambatan resorpsi tulang
3. Penggunaan menurut klaim 2, dilakukan dengan memberikan sebanyak 5% ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.).

## Abstrak

### **PEMBUATAN EKTRAK ETANOL 96% JOTANG (*Spilanthes acmella* Murr.) DAN PENGGUNAANNYA SEBAGAI BAHAN ANTI OSTEOPOROSIS**

Ruang lingkup invensi ini mencakup penggunaan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dari familia Asteraceae sebagai bahan anti-osteoporosis pada kasus jumlah sel osteoblas dan osteoklas tidak seimbang di dalam tulang.

Proses pembuatan ekstrak etanol 96% jotang (*Spilanthes acmella* Murr.) dilakukan melalui beberapa tahapan; yaitu pengeringan seluruh bagian tanaman segar jotang, kemudian diserbuk sampai ukuran 20 *mesh*. Selanjutnya direndam dengan menggunakan etanol 96% selama 3 hari sampai diperoleh konsentrasi 5%, selanjutnya dilakukan penguapan cairan yang telah didapat dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kering.

Terhadap ekstrak kering jotang ini dilakukan uji aktivitas anti-osteoporosis dengan metode *in vitro* pada sel osteoblas (MC3T3-E1) dan sel osteoklas (RAW 264,7). Larutan ekstrak kering jotang menunjukkan kemampuan meningkatkan pembentukan masa tulang melalui mekanisme peningkatan enzim ALP yang merupakan marker dari sel osteoblas sebesar 63%. Selain itu ekstrak tersebut juga mampu menghambat penurunan resorpsi tulang melalui penghambatan pertumbuhan sel RAW 264,7 sebesar 30%. Untuk pengembangan formula sediaan topikal anti-osteoporosis dengan bahan aktif ekstrak etanol 96% jotang digunakan konsentrasi 5%.

## V. Prototipe Ekstrak Aktif

