

AKTIVITAS ANALGESIK EKSTRAK DAUN LILIGUNDI (*Vitex trifolia* L.) PADA MENCIT**ANTINOCICEPTIVE ACTIVITY OF *Vitex trifolia* L. LEAF EXTRACT IN MICE**

Putu Era Sandhi Kusuma Yuda¹, Ni Made Wiwik Setiawati¹, Ni Luh Kade Arman Anita Dewi¹,
Dwi Arymbhi Sanjaya¹, Erna Cahyaningsih¹

¹Laboratorium Farmasi Bahan ALam, Program Studi DIII Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Mahasaraswati, Denpasar

Naskah diterima tanggal 2 Oktober 2019

ABSTRACT

The use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in chronic pain in the long term can cause side effects especially disorders of the digestive tract. In Usada Bali, one of the plants used to reduce pain is the Liligundi (*Vitex trifolia* L.) family of Lamiaceae. This study aims to prove the analgesic activity of Liligundi leaves extract in mice. Liligundi leaves was extracted using 70% alcohol solvent followed by phytochemical screening and analgesic activity test using hot plate method with temperature of 55°C on 20 mice which were divided into four groups. Negative control group was given Tween 80, positive control group was given Ibuprofen 52 mg/kg BW, and treatment of Liligundi Leaves Extract (LLE) dose of 250 mg/kgBW and 500 mg/kgBW. Pain reaction in mice was measured in the 30th minute marked by jumping or licking the feet after being placed on a hot plate. Data were analyzed by ANOVA and Tukey test. From the study we find that LLE contains alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and terpenoids. LLE doses of 250 mg/kgBW and 500 mg/kgBW significantly extend the pain response compared to negative controls and produce a significantly longer pain response reaction time than Ibuprofen ($p < 0.05$).

Keywords : *Vitex trifolia*, analgesic, mice, ibuprofen

ABSTRAK

Penggunaan obat *antiinflamasi non steroid* (AINS) pada nyeri kronis dalam jangka waktu panjang dapat menimbulkan efek samping terutama gangguan pada saluran pencernaan sehingga diperlukan agen alternatif yang lebih aman terutama dari herbal. Dalam Usada Bali, salah satu tanaman yang digunakan untuk mengurangi nyeri adalah Liligundi (*Vitex trifolia* L.) famili *Lamiaceae*. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan aktivitas analgesik ekstrak daun Liligundi pada mencit. Daun Liligundi diekstraksi menggunakan pelarut alkohol 70% dilanjutkan dengan skrining fitokimia dan uji aktivitas analgesik menggunakan metode induksi panas (*hot plate*) suhu 55C pada 20 ekor mencit yang terbagi menjadi empat kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif diberikan Tween 80, kelompok kontrol positif diberikan Ibuprofen 52 mg/kg BB, dan perlakuan Ekstrak Daun Liligundi (EDL) dosis 250 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB. Waktu respon nyeri pada mencit diukur pada menit ke-30 ditandai dengan gerakan melompat ataupun menjilat kaki setelah diletakkan diatas *hot plate*. Data dianalisis secara *One Way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *Tukey*. Dari hasil penelitian diperoleh bahwa EDL mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan terpenoid. EDL dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB mampu memperpanjang respon nyeri secara bermakna dibandingkan kontrol negatif dan menghasilkan waktu respon nyeri yang lebih panjang secara bermakna dibandingkan Ibuprofen ($p < 0.05$).

Kata Kunci: *Liligundi*, analgesik, mencit, ibuprofen

PENDAHULUAN

Nyeri adalah perasaan sensoris dan emosional yang tidak nyaman, berkaitan dengan kerusakan jaringan. Nyeri merupakan suatu perasaan subjektif pribadi dan ambang toleransi nyeri berbeda-beda bagi setiap orang (Nofianti, 2014). Obat-obatan opioid dan antiinflamasi non-steroid (AINS) merupakan obat yang sering dan telah lama digunakan untuk pengobatan nyeri. Salah satu AINS yang umum digunakan sebagai obat untuk mengatasi nyeri adalah ibuprofen. Namun, penggunaan obat tersebut dalam jangka waktu yang lama dapat menimbulkan efek samping pada saluran pencernaan, ginjal dan system pembekuan darah (Dhawale dkk., 2019; Bushra dan Aslam, 2010). Oleh sebab itu diperlukan suatu alternatif pengobatan yang relatif lebih aman sebagai analgesik terutama dari bahan herbal.

Pemanfaatan tanaman sebagai obat tradisional, yang di Bali lebih dikenal dengan Usada Bali masih tetap berkembang sebagai salah satu media penyembuhan penyakit. Kekayaan masyarakat Bali mengenai pengobatan tradisionalnya tertera dalam lontar Usada Bali yang merupakan sebuah manuskrip yang berisi sistem pengobatan, bahan obat serta cara pengobatan tradisional Bali. Usada merupakan bagian sistem pengobatan holistik dalam multikulturalisme yang bercirikan kebutuhan akan pengakuan dan legitimasi keragaman budaya pengobatan dan Bali sebagai daerah tujuan pariwisata dunia berpeluang mengangkat Usada atau pengobatan tradisional sebagai salah satu penunjang pariwisata kesehatan di Bali (Suatama, 2019). Salah satu tanaman yang terdapat dalam lontar Usada Bali yaitu tanaman Liligundi (*Vitex trifolia* L.) yang termasuk dalam famili Lamiaceae. Dalam lontar tersebut tertulis bahwa tanaman Liligundi dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk mengatasi konstipasi, sembelit, sakit perut dan perut kembung (Nala, 1992). Secara empiris, di Indonesia daun Liligundi digunakan sebagai obat peradangan yang disebabkan oleh kanker payudara dengan cara direbus kemudian diminum. Ekstrak daun Liligundi juga terbukti memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi dan anti kanker (Mustarichie dkk., 2018).

Sebuah tanaman dapat berkhasiat obat oleh karena adanya kandungan fitokimia/metabolit sekunder pada tanaman tersebut. Hasil penelitian terdahulu (Thenmozhi, 2011) menunjukkan bahwa daun Liligundi yang diekstraksi dengan alkohol mengandung metabolit sekunder flavonoid, tannin, phytosterol dan saponin. Flavonoid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang diketahui memiliki aktivitas sebagai analgesik dan antiinflamasi (Verri dkk., 2012). Flavonoid

dapat berperan sebagai analgesik dengan menghambat kerja enzim siklooksigenase yang dapat mengurangi produksi prostaglandin sehingga mengurangi rasa nyeri (Octavianus, 2014). Selain itu, dari penelitian terhadap *Vitex negundo* yang merupakan tanaman yang satu suku dengan *Vitex trifolia* L. diketahui memiliki aktivitas analgesik terhadap mencit dengan metode induksi panas (Dharmasiri dkk., 2003) serta efektif sebagai analgesik pada dosis 100 mg, 250 mg dan 500 mg/kg BB pada metode *tail flick* dan induksi asam asetat (Gupta dan Tandon, 2005). Leitao dkk (2011) menguji efek analgesik ekstrak tanaman *Vitex cymosa* yang juga secara tradisional digunakan untuk nyeri rematik dengan metode induksi asam asetat dan formalin untuk melihat efek analgesik perifer dan juga dengan metode *tail flick* dan *hot plate* untuk melihat adanya efek analgesik sentral pada spinal dan supraspinal. Dari penelitian tersebut ditemukan bahwa pada metode asam asetat dan formalin serta *tail flick* dihasilkan efek analgesik namun tidak ditemukan efek analgesik pada metode *hot plate*.

Saat ini penelitian ilmiah terhadap aktivitas analgesik ekstrak daun Liligundi khususnya yang ada di Bali belum pernah dilakukan padahal di Bali banyak terdapat tanaman Liligundi dan merupakan salah satu tanaman obat yang ada dalam lontar Usada Bali. Berdasarkan latarbelakang tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas analgesik ekstrak daun Liligundi pada mencit dengan metode *hot plate*.

METODE PENELITIAN

Alat

Ekstrak kental daun Liligundi dibuat dengan cara dikeringkan menggunakan oven (Memmert) dan *rotary evaporator* (Buchi R-300). Pengujian aktivitas analgesik dilakukan dengan menggunakan alat *hot plate* (Eddy's method).

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun Liligundi yang diperoleh dari daerah Gianyar-Bali, dipetik daun yang berwarna hijau tua. Bahan lainnya yaitu etanol (Bratachem), HCl p.a (Merck), pereaksi fitokimia, aquadest, kloroform p.a (Merck), H₂SO₄ (Merck), Tween 80 (Saba Kimia), dan ibuprofen (Novapharin Pharmaceutical Industries). Hewan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit putih jantan galur Swiss berumur ± 2 bulan dengan berat 21-30 g (26,2 ± 2,5 g).

Metode

1. Pembuatan Ekstrak Daun Liligundi

Sebanyak 200 g serbuk simplisia kering daun Liligundi dimaserasi dengan 1600 ml etanol 70% selama tiga hari. Selanjutnya filtrat disaring lalu diuapkan dengan menggunakan *rotary*

evaporator dan oven pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental.

2. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan sampel dalam bentuk larutan uji kemudian direaksikan dengan pereaksi fitokimia. Untuk uji alkaloid digunakan pereaksi Dragendorff. Hasil positif alkaloid ditunjukkan jika timbul endapan berwarna jingga atau merah (Velavan, 2015). Uji Flavonoid dilakukan dengan pereaksi Pb asetat 10%. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna kuning (Raphael, 2012). Sampel juga ditambah dengan beberapa tetes NaOH 20%. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna kuning (Ugochukwu dkk., 2013). Identifikasi saponin dilakukan dengan menambahkan larutan uji dengan aquades dan dikocok selama beberapa menit. Apabila terbentuk busa setinggi 1 cm maka teridentifikasi adanya saponin (Jayapriya dan Shoba, 2014). Pengujian senyawa tannin dilakukan dengan penambahan beberapa tetes FeCl₃ 5%. Hasil positif tanin ditunjukkan dengan terbentuknya larutan berwarna hitam kehijauan atau hitam (Nirwana dkk., 2015). Identifikasi golongan senyawa triterpenoid dan steroid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dengan kloroform kemudian ditambahkan asam sulfat pekat kemudian diamati warna yang terbentuk pada antarmuka kedua cairan (Jayapriya dan Shoba, 2014).

3. Pengujian aktivitas analgesik

Mencit diadaptasi dengan lingkungan penelitian selama 6 hari. Dua puluh ekor mencit dikelompokkan menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Sebelum diberi perlakuan mencit dipuasakan selama 6 jam tetapi tetap diberi minum. Kelompok 1 sebagai

kontrol negatif diberikan suspensi Tween 80 (2% dalam aquadest), kelompok 2 sebagai kontrol positif diberikan ibuprofen dengan dosis 52 mg/kg BB, kelompok 3 dan kelompok 4 sebagai kelompok uji diberikan ekstrak daun Liligundi (*Vitex trifolia* L.) dengan dosis masing-masing 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB. Kemudian pengujian aktivitas analgesik dilakukan pada menit ke 30 setelah pemberian perlakuan. Pengujian dilakukan dengan meletakkan mencit di atas *hot plate* dengan suhu 55°C kemudian waktu reaksi (respon nyeri) dihitung dengan menggunakan *stopwatch* sejak mencit menyentuh *hot plate* sampai mencit melompat atau mengangkat dan menjilat kaki (Suresha dkk., 2014).

Analisis Data

Data yang diperoleh diuji secara statistik dengan program *SPSS 16for windows* menggunakan *One way ANOVA* dengan taraf kepercayaan 95% yang dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari proses ekstraksi didapatkan ekstrak kental sebanyak 51 gram dengan rendemen ekstrak sebanyak 25,5%.

Dari uji skrining fitokimia yang dilakukan, ekstrak etanol 70% daun Liligundi mengandung senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tannin dan terpenoid. Hasil pengujian skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil ini sedikit berbeda dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Mustarichie dkk (2018) dimana diketahui bahwa ekstrak etanol 96% daun Liligundi yang diperoleh di daerah Jawa Barat mengandung polifenol, flavonoid, steroid, monoterpen, sesquiterpen dan quinon namun tidak ditemukan kandungan alkaloid,

Tabel 1. Hasil Pengujian Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Liligundi (*Vitex*)

No.	Senyawa Fitokimia	Pereaksi	Hasil Pengujian	Ket
1.	Alkaloid	<i>Dragendorff</i>	Terbentuk endapan jingga	(+)
2.	Flavonoid	Larutan Pb-asetat 10%	Terbentuk endapan kuning	(+)
		Larutan NaOH 20%	Terbentuk larutan berwarna kuning	(+)
3.	Saponin	Aquadest	Terbentuk busa setinggi 1,5 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit.	(+)
4.	Tanin	FeCl ₃ 5%	Terbentuk larutan berwarna hitam kehijauan	(+)
5.	Steroid/Terpenoid	Kloroform + H ₂ SO ₄	Terpenoid : Terbentuk cincin berwarna coklat	(+)
			Steroid : Tidak terbentuk cincin berwarna hijau/biru	(-)

Keterangan: (+): Teridentifikasi, (-): Tidak teridentifikasi

Tabel 2. Hasil Pengujian Analgesik Ekstrak Daun Liligundi (*Vitex trifolia* L) pada Mencit 30 Menit Setelah Perlakuan

Mencit Nomor	Kelompok Perlakuan			
	KN	KP	EDL 250 mg/kg BB	EDL 500 mg/kg BB
1	10,03	16,77	14,37	20,63
2	8,07	14,24	14,16	19,4
3	6,68	15,67	13,01	18,4
4	8,81	18,4	14,56	19,33
5	10,4	13,12	13,15	20,9
(X ± SEM)	8,798 ± 0,674	15,640 0,927*	13,85 ± 0,321*	19,732 ± 0,459*#

Keterangan: KN: Kontrol Negatif, KP: Kontrol Positif (Ibuprofen), EDL: Ekstrak Daun Liligundi. Data ditampilkan dalam bentuk Mean X± SEM (n=5), *p<0.05 vs KN, # p<0.05 vs KP, Uji ANOVA diikuti dengan Uji *Tukey* dengan taraf kepercayaan 95%.

tanin dan saponin. Sedangkan dari hasil skrining fitokimia yang dilakukan oleh Rajakan dkk (2014) serta Murugan dan Mohan (2012) menemukan bahwa ekstrak Liligundi dari daerah Tamil Nadu, India mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, fenol, tanin dan terpenoid. Adanya perbedaan kandungan tersebut dapat dipengaruhi oleh faktor perbedaan konsentrasi pelarut ataupun perbedaan tempat tumbuh.

Setelah dilakukan uji analgesik, diperoleh hasil waktu reaksi untuk masing-masing kelompok seperti pada Tabel 2. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa setidaknya terdapat dua kelompok yang memiliki perbedaan waktu respon nyeri yang bermakna ($p < 0.05$). Hasil uji *Tukey* menunjukkan bahwa pada menit ke-30 terdapat adanya perbedaan yang bermakna terhadap waktu timbulnya respon nyeri antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif, EDL 250 mg/kg BB dan EDL 500 mg/kg BB ($p < 0.05$). Hasil tersebut menunjukkan bahwa pemberian ibuprofen, ekstrak daun liligundi 250 mg/kg BB dan 500 mg/kg BB mampu memperpanjang respon nyeri pada mencit putih jantan. Waktu reaksi yang ditimbulkan oleh pemberian EDL 500 mg/kg BB lebih lama secara signifikan dibandingkan dengan kontrol positif ibuprofen ($p < 0.5$). Hal tersebut menandakan bahwa EDL 500 mg/kg BB mampu meningkatkan ambang rasa nyeri pada mencit yang diinduksi dengan panas (*hot plate*) lebih tinggi dibandingkan dengan ibuprofen pada waktu 30 menit setelah perlakuan. Dari hasil penelitian ini, dapat dikonfirmasi bahwa ekstrak etanol daun Liligundi memiliki efek analgesik yang bekerja secara sentral dimana metode *hot plate* umumnya digunakan untuk melihat adanya efek peningkatan ambang toleransi nyeri termal secara sentral. Adanya efek analgesik pada metode *hot plate* dapat diakibatkan adanya zat aktif dari ekstrak daun *Vitex trifolia* yang mampu memberikan efek analgesik supraspinal yang dikaitkan dengan adanya aktivasi penghambatan

nyeri secara endogen (Saade & Jabbur, 2008).

Kulkarni (2014) telah menguji aktivitas analgesik ekstrak etanol (99.5%) daun Liligundi yang diekstraksi menggunakan alat Soxhlet dengan metode induksi kimia (asam asetat) dan induksi termal *tail immersion* menggunakan pembanding indometasin dimana dihasilkan baik indometasin maupun ekstrak etanol daun Liligundi mampu menghambat respon nyeri pada mencit pada kedua metode tersebut namun pada metode *tail immersion* terdapat hasil yang kurang konsisten dibandingkan dengan metode induksi asam asetat sehingga efek analgesik yang diberikan oleh ekstrak daun Liligundi diinterpretasikan lebih dimediasi oleh efek perifer melalui hambatan pada sintesis mediator nyeri pada tempat iritasi. Hasil penelitian tersebut memperkuat hasil penelitian ini dimana ekstrak etanol Liligundi sepertinya dapat berpotensi menimbulkan efek analgesik baik secara sentral maupun perifer.

Ibuprofen merupakan obat analgesik non-opioid yang diketahui memiliki efek penghambatan nyeri secara perifer, namun pada penelitian ini ibuprofen juga menunjukkan efek analgesik pada metode *hot plate* yang umumnya untuk menguji aktivitas analgesik secara sentral. Hasil penelitian Suthakaran dan Senthil (2018) menunjukkan bahwa kombinasi antara ibuprofen dan pregabalina efektif meningkatkan aktivitas antinosiseptif di sistem saraf pusat pada pengujian analgesik dengan metode *hot-plate* dimana metode ini lebih dominan mengukur respon supraspinal terhadap rangsangan nyeri. Peningkatan efek analgesik tersebut dapat disebabkan oleh adanya aktivasi pada jalur antinosiseptif yang berbeda dibandingkan dengan sediaan tunggalnya. Hasil penelitian tersebut menyatakan adanya potensi efek sinergis antara kombinasi obat ibuprofen dan pregabalina dalam memperkuat hambatan respon nyeri sensoris melalui reseptor opioid perifer. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa opioid

juga dapat menghasilkan efek analgesik melalui mekanisme perifer setelah terjadinya kerusakan jaringan, melalui rangsangan reseptor opioid perifer. Efek analgesik perifer yang disebabkan oleh sistem opioid didasarkan dengan adanya pembukaan kanal kalium yang menyebabkan hiperpolarisasi pada saraf sensoris nyeri (Leitao dkk., 2011).

Penelitian lain juga telah menunjukkan bahwa tanaman genus *Vitex* seperti *Vitex negundo* ditemukan memiliki aktivitas analgesik sentral dan perifer namun aktivitas analgesik sentral tersebut tidak diperantarai oleh reseptor opioid (Gupta dan Tandon, 2005). Dari penelitian yang dilakukan oleh Leitao dkk (2011), ekstrak *Vitex cymosa* memiliki efek analgesik sentral dan perifer yang diperantarai oleh sistem opioid. Ekstrak diketahui mengandung flavonoid. Flavonoid telah dilaporkan memiliki efek analgesik dan salah satunya adalah Luteolin yang dilaporkan memiliki efek analgesik yang lebih kuat dibandingkan aspirin, parasetamol, dipiron dan indometasin dengan model pengujian yang sama. Luteolin juga dideteksi pada buah *Vitex rotundifolia*. Selain itu senyawa triterpenoid yang diisolasi dari tanaman *Vitex cymosa* yang merupakan derivatif hidroksil dari asam ursolat dan oleanolat diketahui memiliki aktivitas sebagai analgesik (Costa dkk., 2003).

Menurut Swiboda dkk. (2013), ketika terjadi kerusakan jaringan, senyawa yang dapat memodulasi transmisi nyeri antara lain histamine, bradikinin, asetilkolin, leukotriene, dan prostaglandin dikeluarkan ke jaringan ekstraseluler. Penangkapan radikal bebas oleh antioksidan seperti flavonoid mampu menghambat pembentukan mediator inflamasi dan nyeri seperti histamine, bradikinin, asetilkolin, leukotriene, dan prostaglandin. Aktivitas analgesik yang ditimbulkan salah satunya dapat disebabkan karena adanya kandungan senyawa flavonoid dari ekstrak daun Liligundi. Flavonoid dapat berperan sebagai analgesik yang mekanisme kerjanya menghambat kerja enzim siklooksigenase (COX) yang berperan dalam menstimulasi pelepasan mediator nyeri, yaitu prostaglandin dan juga dapat menghambat mediator nyeri dan inflamasi seperti reaktif oksigen spesies (ROS) (Verri dkk., 2012; Cahyaningsih dkk., 2018). Namun demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui mekanisme kerja ekstrak daun Liligundi dalam menghambat respon nyeri secara molekuler serta zat aktif yang bertanggungjawab terhadap aktivitas tersebut, melihat adanya potensi daun Liligundi untuk dikembangkan menjadi bahan obat herbal terstandar sebagai terapi komplementer dan alternatif untuk mengatasi nyeri.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun Liligundi (*Vitex trifolia* L) dosis 250 mg/kgBB dan 500 mg/kgBB memiliki aktivitas analgesik pada mencit dan pada dosis 500 mg/kgBB menghasilkan penghambatan respon nyeri yang lebih panjang dibandingkan dengan ibuprofen.

DAFTAR PUSTAKA

- Bushra, R. dan Aslam, N., 2010. An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*, Volume 25, Issue 3, 155-161.
- Cahyaningsih, E., Yuda, P.E.S.K., dan Susanthi., I.M., 2018. Uji Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Salam India (*Murraya koenigii* L) Terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Yang Diinduksi Karagenan 1%. *Medicamento* Vol 4(1): 25-31.
- Costa VB, Coube CS, Marinho BG, Matheus ME, Leitão SG, Fernandes PD, 2003. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Bouchea fluminensis*. *Fitoterapia* 74: 364371.
- Dharmasiri, M.G., Jayakody, J.R.A.C., Galhena, G., Liyanage, S.S.P., Ratnasooriya, W.D. 2003. Anti-inflammatory and analgesic active.ies of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(3):199-206
- Dhawale T, Kumar S, Dharmadhikari S, 2019. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activity of ibuprofen and duloxetine in animal models. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 9 (9):842-846.
- Gupta, R.K., dan Tandon, V.R., 2005. Antinociceptive activity of *Vitex-negundo* Linn leaf extract. *Indian J Physiol Pharmacol* 49(2):163-70.
- Jayapriya, G. dan Shoba, F.G. 2014. Screening for phytochemical activity of *Urechites lutea* plant. *Asian J. Plant Sci. Res.* 4(6):20-24.
- Kulkarni, LA, 2014. Analgesic Potential of *Vitex Trifolia* Linn (Verbanaceae). *Asian J Pharm Clin Res* Vol 7 (1) 157-159.
- Leitao, SG., Santos, TC., Monache, FD., Matheus, ME., Fernandes, PD., Marindo., BG, 2011. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(5): 874-883.
- Mustarichie R, Sumiwi SA, Hanifah AT, 2018. ED50 from anti-inflammatory properties of *Vitex trifolia* L. ethanol extract. *Natl J Physiol Pharm Pharmacol* 8(5):719-725.
- Murugan M, Mohan VR, 2012. Efficacy of different solvent extracts of *Vitex trifolia* L. and *Aristolochia indica* L. for potential antibacterial activity. *Sci Res Rep* 2:110-4.
- Nala, N., 1992. Usada Bali, Upada Sastra,

- Denpasar. Indonesia
- Nirwana, A.P., Astirin, O.P dan Widiyani, T, 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Benalu Kersen (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq.). *EL-VIVO* 3(2): 9-15
- Nofianti Tita, 2014. Aktivitas Analgesik Daun Alpukat (*Persea Americana*) Pada Menci, *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 12 (1):41-46
- Octavianus Stella, Fatimawali, Lolo Widya A, 2014. Uji Efek Analgesik Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) Pada Mencit Putih Jantan (*Mus musculus*), *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 3(2):87-92.
- Prochazkova, D., Bousova, I., and Wilhelmova, N, 2011. Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids, *Fitoterapia*, 82:513-523
- Rajakan NI, Balakrishnan M, Karthikeyan R, Jagadheesan V, 2014. Screening of antibacterial activity, qualitative and quantitative analysis of phytochemicals in *Vitex trifolia*. *Int J Res Dev Pharm Life Sci* 3:1085-8.
- Raphael, E., 2012. Phytochemical constituents of some leaves extract of *Aloe vera* and *Azadirachta indica* plant species, *Journal of Environmental Science and Toxicology*, 1(2), 014-017
- Saadé NE, Jabbur SJ, 2008. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: Spinal and supraspinal mechanisms. *Prog Neurobiol* 86: 22-47.
- Suatama, I.B., 2019. Multikulturalisme Usada Bali. *E-Jurnal Widya Kesehatan*, Volume 1, No.1.
- Suresha, R.N., Amoghmath, S., Vaibhavi, P.S., Shruthi., S.L., Jayanthi, M.K dan Kalabharathi, H.L. 2014. Evaluation of Analgesic Activity of Perindopril in Albino Mice. *J Adv Pharm Technol Res*; 5(3): 129-133.
- Suthakaran C., Senthil G, 2018. Evaluation of Analgesic and AntiInflammatory Activity of Ibuprofen-Pregabalin in Animal Models. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Vol 12(9): FC05-FC08
- Ugochukwu, S. C., Arukwe, U.I., Onuoha, I., 2013. Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of *Dennetia tripetala* G. Baker, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 3(3):10-13.
- Velavan, S., 2015. Phytochemical Technique, A Review. *World Journal of Science and Research*. 1(2): 80-91.
- Verri, W.A., Vicentini, F.T.M.C., Baracat, M.M., Georgetti, S.R., Cardoso, R.D.R., Cunha, T.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., Fonseca, M.J., Casagrande, R., 2012. Flavonoids as

Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs: Mechanisms of Action and Perspectives in the Development of Pharmaceutical Forms. *Bioactive Natural Products*, Vol. 36.