

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Inflamasi merupakan proses biologis esensial yang berperan sebagai garis pertahanan pertama tubuh terhadap berbagai rangsangan berbahaya, seperti patogen, sel yang rusak, dan zat iritan. Meskipun inflamasi akut memiliki peran penting dalam proses penyembuhan dan pemulihan jaringan, peradangan yang bersifat kronis justru dapat menimbulkan berbagai penyakit, termasuk kanker, gangguan kardiovaskular, hingga diabetes (Chavda et al., 2024).

Menurut *World Health Organization* (WHO, 2024), penyakit tidak menular yang erat kaitannya dengan proses inflamasi kronis bertanggung jawab terhadap sekitar 74% dari total kematian di dunia. Kondisi seperti penyakit jantung, *stroke*, penyakit pernapasan kronis, kanker, obesitas, dan diabetes merupakan penyebab utama kematian global akibat inflamasi berkepanjangan. Secara global, sekitar 3 dari 5 kematian (sekitar 60%) di seluruh dunia disebabkan oleh penyakit yang berkaitan dengan inflamasi kronis (Placha dan Jampilek, 2021).

Selama beberapa dekade, obat antiinflamasi golongan kortikosteroid telah menjadi terapi utama dalam mengatasi inflamasi. Golongan obat ini terbukti mampu memberikan efek cepat dalam meredakan gejala, namun efektivitas tersebut sering kali disertai risiko tertentu. Pemakaian yang tidak sesuai aturan, terutama jika dilakukan dalam jangka waktu lama, berpotensi menimbulkan gangguan serius pada tubuh, mulai dari iritasi lambung, kerusakan hati, hingga efek samping sistemik lainnya (Tavita et al., 2022).

Oleh karena itu, hal tersebut mendorong perlunya pencarian dan pengembangan agen antiinflamasi baru yang lebih aman bagi tubuh. Khususnya dari sumber alam yang berpotensi sebagai agen antiinflamasi. Pengembangan obat berbahan dasar alami diharapkan mampu menekan risiko efek samping sekaligus memberikan manfaat terapeutik yang lebih berkelanjutan bagi penderita penyakit inflamasi.

Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sebagai alternatif pengobatan untuk meredakan inflamasi adalah kayu kuning (*Arcangelisia flava* L.). Kayu kuning merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat secara turun temurun untuk mengobati malaria, penyakit diare, penyakit liver, antimikroba, dan antihiperlipidemia karena senyawa kimia yang terkandung pada kayu kuning antara lain alkaloid, fenolik, flavonoid, saponin, dan tanin (Sari et al., 2018). Selain itu, tanaman ini diketahui mengandung berbagai senyawa aktif biologis, termasuk glikosida, alkaloid (berberin, jatrorhizin, dan palmatin), flavonoid, saponin, serta triterpenoid (Diliarosta et al., 2021).

Denaturasi protein dapat memicu terjadinya inflamasi karena menyebabkan kerusakan pada struktur sekunder, tersier, dan kuaterner protein. Kerusakan ini umumnya disebabkan oleh paparan panas atau bahan kimia yang bersifat pendenaturasi, sehingga aktivitas biologis protein menurun. Faktor-faktor yang menyebabkan denaturasi protein yaitu panas, radiasi sinar ultraviolet, bahan kimia, dan pengocokan kuat (Prasetyo et al., 2020). Pemanasan protein dapat menyebabkan terjadinya reaksi-reaksi baik yang diharapkan maupun yang tidak

diharapkan. Reaksi-reaksi tersebut diantaranya denaturasi, kehilangan aktivitas enzim, perubahan kelarutan dan hidrasi dan perubahan warna (Darmawati et al., 2024). Ketika suhu meningkat, energi kinetik juga meningkat sehingga menyebabkan molekul-molekul penyusun protein bergerak atau bergetar dengan sangat cepat, yang dapat merusak struktur molekul protein. Proses denaturasi protein berlangsung secara permanen dan tidak dapat kembali ke bentuk semula (Shalihah et al., 2021). Selain itu, membran sel darah merah memiliki kesamaan sifat dengan membran lisosom, yang berperan penting dalam proses inflamasi. Stabilitas lisosom berfungsi membatasi respon inflamasi dengan mencegah pelepasan enzim dari dalamnya. Dengan demikian, uji stabilisasi membran sel darah merah akibat induksi larutan hipotonik dan suhu panas dapat digunakan sebagai gambaran kemampuan suatu senyawa dalam menstabilkan membran lisosom. Sehingga secara *in vitro*, aktivitas antiinflamasi dapat diuji melalui metode penghambatan denaturasi protein serta stabilisasi membran eritrosit (sel darah merah) (Trinovitasari et al., 2025).

I.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana kemampuan ekstrak etanol kayu kuning (*Arcangelisia flava* L.) dalam menghambat denaturasi protein sebagai indikator aktivitas antiinflamasi secara *in vitro*?
2. Bagaimana efektivitas ekstrak etanol kayu kuning (*Arcangelisia flava* L.) dalam menstabilkan membran eritrosit yang mengalami hemolisis akibat induksi panas dan larutan hipotonis?

I.3 Tujuan

1. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol kayu kuning dalam menghambat denaturasi protein sebagai salah satu mekanisme antiinflamasi *in vitro*.
2. Mengetahui bagaimana peran ekstrak etanol kayu kuning dalam menstabilkan membran eritrosit dari kerusakan akibat panas dan kondisi hipotonis.

BAB II

METODE PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain adalah *centrifuge*, *micropipet*, *microplate reader*, *microtube*, oven, *rotary evaporator*, tabung *effendorf*, tabung *vacutainer*, vortex, dan *waterbath*,

Bahan yang digunakan adalah aquades, DMSO, ekstrak kayu kuning, eritrosit, etanol 96%, kayu kuning, NaCl, Natrium diklofenak, dan PBS.

II.2 Metode Penelitian

II.2.1 Pengumpulan sampel

Sampel batang kayu kuning (*Arcangelisia flava* L.) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh di Kota Banjarbaru, Provinsi Kalimantan Tengah.

II.2.2 Determinasi

Proses determinasi tumbuhan dilakukan melalui pengamatan terhadap ciri-ciri morfologi, meliputi bentuk, ukuran, jumlah, serta struktur pada daun dan batang. Ciri morfologi yang ditemukan kemudian dipadankan dengan deskripsi tumbuhan yang sudah teridentifikasi sebelumnya, sehingga spesies yang diteliti dapat dikenali dengan lebih tepat (Amaliah et al., 2024).

II.2.3 Pembuatan simplisia

Batang kayu kuning segar (*Arcangelisia flava* L.) dikumpulkan, lalu dibersihkan melalui sortasi basah agar terpisah dari kotoran dan kontaminan lain. Setelah itu dilakukan sortasi kering untuk memastikan tidak ada bahan asing yang tertinggal pada simplisia. Sampel kemudian dikeringkan menggunakan lemari pengering, digiling dengan *blender* hingga menjadi serbuk, dan dimasukkan ke dalam wadah yang tertutup rapat (Shilva et al., 2025).

II.2.4 Ekstraksi

Sebanyak 105,448 gram serbuk kayu akar kuning ditimbang dengan teliti, kemudian dimasukkan ke dalam toples dan ditambahkan 1,05 liter etanol 96% sebagai pelarut. Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi selama 3x24 jam, dilanjutkan dengan proses remaserasi selama 3x24 jam. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 60°C dengan kecepatan 100 rpm hingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dimasukkan ke dalam cawan porselin yang telah ditimbang sebelumnya, lalu diuapkan menggunakan *waterbath* pada suhu 50–60°C hingga diperoleh ekstrak kental dengan hasil yang maksimal (Bawika dan Nurkhasanah, 2022).

II.2.5 Persentase rendemen ekstrak

Rendemen merupakan rasio antara jumlah ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia awal. Hasil rendemen dinyatakan dalam persen (%), di mana semakin besar nilainya menunjukkan bahwa ekstrak yang diperoleh semakin banyak. Berikut merupakan rumus untuk mencari nilai persen rendemen :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Jumlah berat ekstrak etanol}}{\text{jumlah berat simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

II.2.6 Penyiapan larutan uji ekstrak kayu kuning

Sebanyak 20 mg ekstrak kayu kuning dilarutkan ke dalam 0,2 mL DMSO (konsentrasi 100.000 µg/mL). Selanjutnya, larutan ini diencerkan dalam 5 seri konsentrasi berbeda yaitu (100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, dan 500 µg/mL) (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

II.2.7 Penyiapan larutan natrium diklofenak

Larutan natrium diklofenak baku digunakan sebagai larutan kontrol positif pada setiap pengujian. Natrium diklofenak ditimbang sebanyak 20 mg kemudian dilarutkan dengan 0,2 mL DMSO. Selanjutnya, dicukupkan volumenya hingga tanda batas lalu diperoleh larutan natrium diklofenak dengan konsentrasi 100.000 µg/mL. Setelah itu, dilakukan pengenceran untuk memperoleh 5 seri konsentrasi berbeda yaitu (100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL, dan 500 µg/mL) (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

II.2.7 Penyiapan suspensi eritrosit

Pada pembuatan suspensi eritrosit, digunakan sampel darah yang berasal dari tikus putih Wistar (*Rattus norvegicus*). Sampel darah disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit dan dicuci tiga kali menggunakan PBS lalu disentrifugasi kembali. Ditambahkan larutan PBS ke dalam tabung dan disimpan pada suhu 4°C (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

II.2.8 Uji penghambatan denaturasi protein

Denaturasi protein terjadi ketika struktur sekunder dan tersier protein rusak akibat pengaruh eksternal seperti panas, asam, basa, atau pelarut organik. Kerusakan ini dapat menyebabkan kematian sel dan memicu respon inflamasi. Oleh karena itu, senyawa yang mampu mencegah denaturasi protein berpotensi dikembangkan sebagai obat antiinflamasi (Rahayu et al., 2024).

Sebanyak 2 gram putih telur ayam ditimbang lalu dihomogenkan (*mixing*) selama $\pm$ 1 menit. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 10 ml lalu disentrifugasi selama 5 menit. Campuran putih telur selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm, larutan supernatant yang terbentuk pada campuran kemudian diambil hingga habis (Fitriana et al., 2024).

Pada pengujian denaturasi menggunakan albumin, digunakan campuran 200 µL albumin dan 800 µL PBS sebagai larutan kontrol negatif. Sedangkan untuk larutan

kontrol positif, digunakan larutan natrium diklofenak dengan konsentrasi 100-500 µg/mL. Sebanyak 200 µL albumin, 250 µL ekstrak, dan 550 µL PBS digunakan sebagai larutan uji dengan lima seri konsentrasi berbeda yaitu konsentrasi 100-500 µg/mL. Seluruh campuran selanjutnya akan diinkubasi selama 30 menit dengan suhu 37°C lalu dilakukan pemanasan menggunakan *waterbath* selama 15 menit hingga mencapai suhu 70°C. kemudian, campuran didinginkan lalu absorbansi diukur pada panjang gelombang 660 nm menggunakan *microplate reader* yang sesuai. Persamaan berikut digunakan untuk menentukan persentase penghambatan denaturasi protein. (Madhuranga dan Samarakoon, 2023).

$$Inhibition \% = \frac{\text{Absorbansi kontrol}-\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (2)$$

II.2.9 Uji hemolisis yang diinduksi panas

Uji hemolisis yang diinduksi panas digunakan untuk menilai stabilitas membran sel darah merah saat mengalami stres termal. Metode ini membantu memahami bagaimana paparan panas atau bahan kimia dapat memengaruhi integritas eritrosit. Proses hemolisis dapat dikatakan berhasil apabila terjadi pemecahan sel darah merah dan mengeluarkan cairan ke medium, hal ini menjadi indikator penting untuk menilai tingkat kerusakan atau ketahanan membran sel (Deshpande et al., 2025).

Sebanyak 500 µL suspensi eritrosit 10% (v/v) dicampurkan dengan 500 µL ekstrak (100–500 µg/mL). Larutan ini diinkubasi dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 30 menit. Kemudian didinginkan hingga suhu ruang. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dan nilai absorbansi supernatan ditentukan menggunakan *microplate reader* pada 576 nm. Sebagai kontrol negatif, digunakan larutan suspensi eritrosit 10% (v/v) tanpa ekstrak kayu kuning sedangkan untuk kontrol positif, digunakan larutan natrium diklofenak dengan konsentrasi 100-500 µg/mL. Rumus yang digunakan untuk menghitung persentase penghambatan sebagai berikut (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

$$Inhibition \% = \frac{\text{Absorbansi kontrol}-\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

II.2.10 Uji hemolisis yang diinduksi hipotonisitas

Larutan hipotonik dapat menimbulkan hemolisis akibat masuknya cairan berlebih ke dalam sel yang menyebabkan pecahnya membran eritrosit. Kerusakan ini meningkatkan kerentanan sel terhadap stres oksidatif dan peroksidasi lipid yang dipicu oleh radikal bebas. Oleh karena itu, stabilisasi membran sel darah merah menjadi penting untuk mencegah kebocoran protein serta cairan ke jaringan, sekaligus mengurangi respon inflamasi yang berlebihan (Yesmin et al., 2020).

Sebanyak 0,25 mL ekstrak kayu kuning (100–500 µg/mL) ditambahkan ke dalam PBS dengan volume yang sama, kemudian ditambahkan 0,6 mL NaCl 0,225% dan 0,125 mL suspensi eritrosit 10% (v/v). Larutan tersebut diinkubasi pada suhu

37°C selama 30 menit. Campuran reaksi selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm dan absorbansi supernatan diukur pada panjang gelombang 576 nm menggunakan *microplate reader*. Sebagai kontrol negatif, digunakan campuran larutan suspensi eritrosit 10% (v/v) dengan larutan hipotonis. Untuk kontrol positif, digunakan larutan natrium diklofenak. Untuk menghitung persentase penghambatan proses hemolisis digunakan rumus sebagai berikut (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

$$Inhibition \% = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (4)$$

II.2.11 Analisis data

Data penelitian terlebih dahulu diolah menggunakan Microsoft Excel sebelum dianalisis. Proses analisis kemudian dilakukan dengan bantuan perangkat lunak GraphPad Prism 10, yang digunakan untuk mengolah data serta menyajikan hasil dalam bentuk statistik dan grafik sehingga diperoleh hasil interpretasi yang lebih tepat (Sari et al., 2023).