

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang memiliki kekayaan hayati yang sangat melimpah dan beragam, sehingga dapat dimanfaatkan sebagai sumber potensial bagi pengembangan bahan obat alami. Salah satu tanaman yang banyak dijumpai di berbagai daerah adalah daun wungu (*Graptophyllum pictum* L. Griff), yaitu tanaman perdu berbatang tegak dengan tinggi mencapai sekitar tiga meter dan umumnya tumbuh secara liar di lingkungan tropis (Meilani et al., 2023). *G. pictum* L. Griff atau yang dikenal juga dengan daun ungu, daun wungu dan hadeuleum merupakan bahan alam yang berasal dari famili *Acanthaceae* (Priyanto et al., 2024).

Secara tradisional daun wungu telah dimanfaatkan oleh masyarakat di beberapa daerah untuk mengatasi berbagai penyakit seperti pembengkakan, borok, bisul, luka, serta berbagai gangguan kulit lainnya (Meilani et al., 2023). Daun wungu diketahui memiliki kandungan fitokimia seperti senyawa flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, glikosida, dan steroid. Senyawa-senyawa ini diketahui dapat berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi, dengan mekanisme utama menghambat biosintesis prostaglandin (Noviandi et al., 2025). Kandungan alkaloid, flavonoid, dan tanin diduga bekerja dengan menghambat jalur pensinyalan inflamasi, sehingga menurunkan produksi sitokin proinflamasi dan enzim inflamasi alami (Shofiy et al., 2025).

Berdasarkan RISKESDAS 2018, prevalensi penyakit yang berkaitan dengan proses inflamasi tercatat mengalami peningkatan lebih dari 50% pertahunnya (Riskesdas, 2018). Inflamasi merupakan salah satu bentuk respon pertahanan tubuh terhadap rangsangan berupa cedera jaringan. Ketika terjadi cedera, tubuh akan menetralkan dan mengeluarkan zat-zat yang berbahaya serta melakukan proses persiapan perbaikan jaringan (Xu et al., 2025). Namun, respon inflamasi yang tidak terkendali juga dapat memperburuk kerusakan jaringan dan memicu terjadinya penyakit kronis (Widyasti et al., 2024).

Inflamasi biasanya terjadi dengan adanya aktivasi sistem imun dan pelepasan mediator inflamasi seperti sitokin, prostaglandin, kemokin, dan leukotrien (Nsangou et al., 2023). Pada kondisi inflamasi, protein dapat mengalami denaturasi akibat stres fisiologis seperti peningkatan suhu atau paparan radikal bebas sehingga memicu terjadinya pelepasan mediator inflamasi. Sementara itu, kondisi inflamasi juga dapat ditandai dengan terjadinya hemolisis pada sel darah merah. Hemolisis pada sel darah merah terjadi akibat pelepasan hemoglobin yang menunjukkan ketidakstabilan membran eritrosit, yang menyerupai kerusakan membran sel pada jaringan yang mengalami peradangan (Ihsan et al., 2021; Rahayu et al., 2024).

Pengobatan inflamasi yang umum digunakan oleh masyarakat saat ini yaitu penggunaan obat golongan kortikosteroid. Obat ini digunakan untuk menekan proses peradangan melalui penghambatan pembentukan mediator inflamasi (Naher et al., 2025). Meskipun efektif dalam mengendalikan gejala peradangan, penggunaan obat golongan kortikosteroid yang tidak sesuai dosis atau dalam jangka waktu yang panjang berisiko menimbulkan efek samping, seperti gangguan pencernaan, kerusakan hati, dan komplikasi kardiovaskular (Pamantung et al., 2025). Keterbatasan tersebut mendorong

perlunya pengembangan pengobatan antiinflamasi alternatif berbasis bahan alam yang memiliki efektivitas serupa namun dengan profil keamanan yang lebih baik.

Salah satu alternatif yang berpotensi dikembangkan sebagai pengobatan antiinflamasi berbasis bahan alam adalah daun wungu (*G. pictum* L. Griff). Tanaman ini telah terbukti secara empiris digunakan dalam pengobatan tradisional dan penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa daun wungu memiliki potensi sebagai antiinflamasi (Meilani et al., 2023; Ocvinta et al., 2024). Oleh karena itu, berdasarkan potensi tersebut penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun wungu secara *in vitro* melalui metode penghambatan denaturasi protein dan stabilisasi membran eritrosit. Kemampuan ekstrak dalam menghambat denaturasi protein serta mencegah terjadinya hemolisis diharapkan dapat menggambarkan aktivitasnya dalam menekan proses inflamasi, sehingga memberikan dasar ilmiah bagi pemanfaatan daun wungu sebagai kandidat obat herbal antiinflamasi yang aman dan efektif (Ihsan et al., 2021; Rahayu et al., 2024).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah penelitian ini, yaitu:

1. Apakah ekstrak etanol daun wungu (*G. pictum* L. Griff) menunjukkan potensi aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* melalui mekanisme penghambatan denaturasi protein?
2. Bagaimana pengaruh ekstrak etanol daun wungu (*G. pictum* L. Griff) terhadap stabilitas membran sel darah merah yang digunakan sebagai indikator inflamasi secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka tujuan penelitian ini, yaitu:

1. Mengetahui potensi aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun wungu (*G. pictum* L. Griff) secara *in vitro* melalui mekanisme penghambatan denaturasi protein.
2. Mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun wungu (*G. pictum* L. Griff) terhadap stabilitas membran sel darah yang digunakan sebagai indikator inflamasi secara *in vitro*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan antara lain *micropipet*, *microplate reader*, oven, *rotary evaporator*, *sentrifuge*, tabung *effendorf*, tabung *vacutainer*, vortex dan *water bath*.

Bahan yang digunakan berupa aquadest, aluminium foil, daun wungu (*G. pictum* L. Griff), ekstrak tanaman daun wungu (*G. pictum* L. Griff), etanol 96%, larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*), NaCl 0,225%, *microtube*, larutan natrium diklofenak, putih telur ayam dan sel darah merah hewan uji.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan yakni daun wungu (*G. pictum* L. Griff). Pengumpulan sampel dilakukan di kecamatan Tamalanrea, Perintis Kemerdekaan, Kota Makassar, Sulawesi Selatan.

2.2.2 Determinasi

Proses determinasi dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dengan cara mengamati berbagai karakter morfologi yang dimiliki tanaman tersebut. Selanjutnya, ciri-ciri morfologi yang diperoleh dari sampel tanaman dibandingkan dan disesuaikan dengan deskripsi tanaman yang telah teridentifikasi sebelumnya, sehingga dapat dipastikan kesesuaian identitas tanaman yang digunakan dalam penelitian (Risda et al., 2025).

2.2.3 Pembuatan Simplisia

Daun wungu yang telah dikumpulkan ditimbang terlebih dahulu, kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan bagian yang tidak layak digunakan. Daun dicuci secara menyeluruh dengan air mengalir hingga bersih, lalu dikeringkan di menggunakan oven dengan suhu 50°C. Setelah kering, akan disortasi kembali dan digiling hingga menjadi serbuk sebagai persiapan tahap ekstraksi, kemudian simplisia yang diperoleh ditimbang kembali untuk menentukan berat simplisia kering (Doratulmutmainnah et al., 2024).

2.2.4 Ekstraksi

Daun wungu diekstraksi dengan menggunakan maserasi. 120 gram serbuk simplisia kering dimasukkan ke dalam wadah kaca sebagai tempat maserasi, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 1200 mL. Wadah maserasi ditutup rapat menggunakan penutup yang dilapisi aluminium foil untuk mencegah penguapan pelarut, lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 3 × 24 jam. Selama proses berlangsung, pelarut diganti setiap 24 jam untuk menjaga efektivitas ekstraksi (Hanifah et al., 2025). Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali hingga larutan menjadi jernih. Proses penguapan dilakukan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C (Dhywinanda et al., 2025).

2.2.5 Perhitungan Nilai Rendemen Ekstrak

Hasil perhitungan nilai rendemen menunjukkan persentase ekstrak yang diperoleh dari bahan simplisia. Nilai rendemen ditentukan dengan menggunakan persamaan (Hanifah et al., 2025):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental}}{\text{Berat simplisia}} \times 100\% \quad (1)$$

2.2.6 Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun Wungu

Pembuatan larutan stok ekstrak dilakukan dengan melarutkan sebanyak 20 mg ekstrak ke dalam 200 μ L DMSO, sehingga diperoleh larutan stok dengan konsentrasi 100.000 μ g/mL (Agarwal dan Shanmugam, 2019). Larutan stok ini kemudian digunakan untuk membuat berbagai konsentrasi larutan uji dengan metode pengenceran menggunakan pelarut yang sama.

1. Larutan uji konsentrasi 100 μ g/mL, sebanyak 0,004 mL larutan stok dan 0,016 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
2. Larutan uji konsentrasi 200 μ g/mL, sebanyak 0,008 mL larutan stok dan 0,012 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
3. Larutan uji konsentrasi 300 μ g/mL, sebanyak 0,012 mL larutan stok dan 0,008 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
4. Larutan uji konsentrasi 400 μ g/mL, sebanyak 0,016 mL larutan stok dan 0,004 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
5. Larutan uji konsentrasi 500 μ g/mL, sebanyak 0,020 mL larutan stok diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.

2.2.7 Pembuatan Larutan Natrium Diklofenak

Pembuatan larutan baku natrium diklofenak dilakukan dengan sebanyak 20 mg natrium diklofenak dilarutkan ke dalam 200 μ L DMSO sehingga diperoleh larutan baku dengan konsentrasi 100.000 μ g/mL (Jannah et al., 2024). Larutan baku ini kemudian digunakan untuk membuat berbagai konsentrasi larutan kontrol positif dengan metode pengenceran menggunakan pelarut yang sama.

1. Larutan natrium diklofenak 100 μ g/mL, dibuat dengan cara 0,004 mL larutan stok baku dan 0,016 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
2. Larutan natrium diklofenak 200 μ g/mL, dibuat dengan cara 0,008 mL larutan stok baku dan 0,012 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
3. Larutan natrium diklofenak 300 μ g/mL, dibuat dengan cara 0,012 mL larutan stok baku dan 0,008 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
4. Larutan natrium diklofenak 400 μ g/mL, dibuat dengan cara 0,016 mL larutan stok baku dan 0,004 DMSO diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.
5. Larutan natrium diklofenak 500 μ g/mL, dibuat dengan cara 0,020 mL larutan stok baku diambil kemudian ditambahkan dengan 3,98 mL PBS.

2.2.8 Pengambilan Darah pada Hewan Uji

Sebelum proses pengambilan darah, tikus terlebih dahulu diberikan anestesi. Metode anestesi yang digunakan adalah anestesi inhalasi dengan eter. Prosedur dimulai dengan menyiapkan kotak yang ukurannya disesuaikan dengan tubuh tikus, kemudian kapas diletakkan di dalam kotak tersebut dan tikus dimasukkan ke dalamnya. Selanjutnya, tikus dibiarkan selama 2–5 menit hingga mencapai kondisi teranestesi (Irenesia et al., 2025). Pengambilan darah dilakukan secara perlahan untuk mengurangi rasa nyeri pada hewan uji melalui mata (plexus retro-orbital). Sampel darah kemudian dimasukkan ke dalam tabung vakutainer dan dihomogenkan dengan cara digoyang perlahan guna mencegah terjadinya lisis dan penggumpalan darah (Rosidah et al., 2020).

2.2.9 Pembuatan Suspensi Eritrosit 7,5% v/v

Sampel darah yang diambil dari hewan uji kemudian dimasukkan ke dalam tabung vakutainer. Sampel kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit,

dan supernatan yang terbentuk dipisahkan. Endapan sel darah merah yang diperoleh dicuci menggunakan larutan PBS, lalu disentrifugasi kembali. Proses pencucian ini diulangi tiga kali hingga supernatan menjadi jernih. Setelah itu, disiapkan suspensi sel darah merah 7,5% v/v dengan mencampurkan 750 μ L endapan sel darah merah dan dicukupkan hingga 10 mL larutan PBS (Armadany et al., 2019).

2.2.10 Uji Penghambatan Denaturasi Protein

Sebanyak 2 gram putih telur ayam ditimbang, kemudian divortex selama 1 menit dengan kecepatan rendah. Ditambahkan 10 mL aquadest kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Ambil bagian supernatannya (Fitriana et al., 2024). Disiapkan kontrol negatif berupa suspensi albumin sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan 0,8 mL larutan PBS. Kontrol positif digunakan larutan natrium diklofenak. Kemudian untuk larutan uji dibuat dalam beberapa seri konsentrasi berupa 100 μ g/mL, 200 μ g/mL, 300 μ g/mL, 400 μ g/mL, dan 500 μ g/mL. Pada larutan uji untuk masing-masing konsentrasi dibuat dengan cara ditambahkan 0,2 mL suspensi albumin, 0,25 mL ekstrak dan 0,55 mL larutan PBS. Kemudian diinkubasi pada suhu $37 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 30 menit, lalu dipanaskan dalam *water bath* pada suhu $70 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 15 menit. Setelah didinginkan dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 660 nm menggunakan *microplate reader* (Madhuranga & Samarakoon, 2023). Untuk menilai kemampuan ekstrak dalam menghambat antiinflamasi melalui metode denaturasi protein dapat diketahui melalui persamaan berikut:

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

2.2.11 Uji Hemolisis yang Diinduksi Panas

Sebanyak 0,5 mL suspensi eritrosit 7,5% (v/v) dicampur dengan 0,5 mL ekstrak tanaman pada konsentrasi 100–500 μ g/mL. Campuran diinkubasi dalam *water bath* pada suhu 56°C selama 30 menit. Setelah itu, tabung didinginkan hingga suhu ruang di bawah air mengalir, kemudian disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit. Absorbansi supernatan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 576 nm. Kontrol negatif berupa suspensi eritrosit tanpa ekstrak dan natrium diklofenak (100-500 μ L) sebagai kontrol positif (Agarwal dan Shanmugam, 2019). Persentase inhibisi hemolisis dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

2.2.12 Uji Hemolisis yang Diinduksi Larutan Hipotonis

Sebanyak 0,125 mL suspensi eritrosit 7,5% (v/v), kemudian ditambahkan 0,25 mL ekstrak tanaman dengan konsentrasi 100–500 μ g/mL yang telah dilarutkan menggunakan PBS dan ditambahkan 0,6 mL NaCl 0,225% (hipotonis). Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit. Absorbansi supernatan diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 576 nm. Kontrol negatif yang digunakan berupa suspensi eritrosit dengan larutan hipotonik dan untuk kontrol positif yang digunakan yakni larutan natrium diklofenak (Agarwal dan Shanmugam, 2019).

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

2.2.13 Analisis Data

Data hasil penelitian dikumpulkan kemudian diolah menggunakan Microsoft Excel untuk perhitungan awal, selanjutnya dianalisis aplikasi *GraphPad Prism* 10. Data tersebut kemudian dilakukan uji normalitas (*Shapiro–Wilk*) untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas bertujuan menentukan jenis analisis statistik yang sesuai, karena uji parametrik mensyaratkan distribusi data normal. Apabila data terdistribusi normal ($p > 0,05$), maka dilanjutkan dengan uji ANOVA (*Analysis of Variance*) yang digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata yang signifikan antar dua kelompok perlakuan. Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$), maka dilakukan uji lanjutan (*post hoc*) *Šidák's multiple comparisons test* untuk mengetahui kelompok yang berbeda signifikan. Sebaliknya, apabila data tidak terdistribusi normal ($p < 0,05$), maka digunakan uji *Mann–Whitney* sebagai uji nonparametrik untuk membandingkan dua kelompok independen dan mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan.