

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Inflamasi

Inflamasi merupakan respon yang diberikan sistem imun tubuh terhadap rangsangan berbahaya, seperti adanya patogen, sel-sel rusak, senyawa beracun, atau iradiasi. Tubuh memiliki mekanisme pertahanan dengan membentuk sitokin-sitokin maupun mediator yang bertanggung jawab dalam proses inflamasi (Bare dkk., 2019). Inflamasi ditandai dengan adanya pembengkakan, kemerahan, panas, nyeri, dan perubahan fungsi (Andriyono, 2019).

Inflamasi dapat disebabkan oleh dua jenis *molecular patterns*, yaitu *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) yang disebabkan oleh infeksi dan *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) yang disebabkan oleh kerusakan jaringan akibat stres oksidatif. PAMPs dan DAMPs dapat bertindak sebagai ligan yang berikatan dengan *pattern recognition receptors* (PRRs) pada membran sel fagosit, kemudian memicu aktivasi jalur transduksi inflamasi, seperti NF- κ B, p38-JNK, dan JAK-STAT. Aktivasi tersebut akan menginduksi pelepasan sitokin pro-inflamasi, seperti IL-1 β , IL-6, TNF- α , dan IL-18. Fase pro-inflamasi juga dapat dimediasi oleh asam arakidonat yang dikatalisis oleh enzim siklooksigenase dan lipooksigenase, kemudian menghasilkan prostaglandin, tromboksan, dan leukotrien, yang berperan sebagai sitokin inflamasi. Sistem imun tubuh, seperti makrofag, neutrofil, dan fagosit juga akan menghilangkan patogen dan membersihkan jaringan yang rusak (Sobhon dkk., 2023).

Proses inflamasi diakhiri dengan adanya *specific pro-resolving mediators* (SPMs), yang terdiri dari *eicosapentaenoic acid* (EPA) dan *docosahexaenoic acid* (DHA). SPMs akan memberikan sinyal pada tubuh untuk memulai proses penyembuhan dengan melepaskan sitokin anti-inflamasi, seperti IL10, IL37, TGF β , dan TNF α . Sel makrofag juga akan mengalami perubahan dari fenotip pro-inflamasi (M1) menjadi fenotip anti-inflamasi (Sobhon dkk., 2023).

B. Obat Anti Inflamasi Non-Steroid (OAINS)

Obat Anti-Inflamasi Non-Steroid (OAINS) merupakan obat anti-inflamasi yang memiliki perbedaan struktur molekuler dari steroid. OAINS tergolong sebagai senyawa turunan dari asam asetat, asam propionat, pirazol, dan zat kimia lain. Obat ini memiliki kemampuan dalam menghambat kerja enzim siklooksigenase, yang berperan dalam sintesis prostaglandin. Spektrum kerja OAINS terbagi menjadi dua jenis, yaitu OAINS konvensional yang dapat menghambat kerja kedua enzim siklooksigenase dan OAINS selektif yang hanya bekerja pada enzim siklooksigenase-2 (Zahra dan Carolia, 2017). Contoh obat non-selektif adalah piroxicam, asam mefenamat, diklofenak, naproxen, dan contoh obat selektif adalah celecoxib dan rofecoxib (Al-Kaf, 2017).

Obat anti-inflamasi dapat menghambat enzim siklooksigenase dengan berbagai cara. Obat anti-inflamasi umumnya akan berikatan dengan sisi aktif enzim, seperti TYR385 dan ARG120. Cara berikatan dapat dilakukan secara hidrofobik dan elektrostatis. Beberapa obat anti-inflamasi seperti aspirin,

bekerja dengan memodifikasi struktur protein secara kovalen, spesifiknya yaitu residu SER529. Ada juga obat yang bekerja sebagai inhibitor reversibel, seperti ibuprofen dan naproxen (Al-Kaf, 2017).

Natrium diklofenak adalah obat anti inflamasi non-steroid yang bersifat non-selektif COX. Obat ini kebanyakan dijual dalam bentuk sediaan peroral, sehingga memiliki kekurangan seperti mengiritasi lambung dan mengalami *first-pass metabolism* (Zakaria dkk., 2021). Natrium diklofenak memiliki daya antiinflamasi yang kuat dan sering digunakan untuk mengobati rasa nyeri, migrain, dan pegal (Aditya dkk., 2015). Natrium diklofenak memiliki kelarutan yang baik dalam etanol sehingga dapat digunakan sebagai kontrol pengujian aktivitas anti-inflamasi (Adhav dkk., 2025). Selain itu, obat ini juga terbukti memiliki kemampuan dalam menghambat denaturasi protein pada berbagai uji denaturasi BSA (Novika dkk., 2021).

C. Binahong

Binahong merupakan tumbuhan yang sering digunakan sebagai obat herbal dan banyak tersebar di Amerika Selatan. Tumbuhan binahong tumbuh dengan cara merambat, dengan batang berwarna merah atau hijau, akar rimpang, dan bunga berwarna krem keputihan. Daun binahong memiliki bentuk seperti jantung, berwarna hijau muda, dengan permukaan halus dan letak daun yang berselang-seling (Dillasamola dkk., 2023). Klasifikasi dan gambar dari tanaman binahong menurut Wahyuni dkk. (2016) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Bangsa : Caryophyllales
Suku : Basellaceae
Marga : *Anredera*
Spesies : *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis



Gambar 1. Daun Binahong (Wahyuni dkk., 2016)

Tanaman binahong digunakan oleh masyarakat sebagai obat penyembuhan luka, tifus, radang usus, disentri, dan hemoroid (Susanti, 2019). Daun binahong memiliki kandungan flavonoid, fenol, alkaloid, triterpenoid, dan saponin (Nafiisah dkk., 2024). Senyawa flavonoid dan fenolik dari daun binahong diketahui dapat berperan sebagai agen anti-inflamasi (Anisa dkk., 2019).

Daun binahong yang diekstraksi secara maserasi dengan etanol 96% diketahui memiliki kandungan total flavonoid dan fenolik masing-masing sebesar 1,35%QE dan 2,843%GAE (Dwitiyanti dkk., 2019; Hasri dkk., 2017). Hasil maserasi daun binahong dengan etanol 70% selama 3x24 jam memiliki total flavonoid dan fenolik masing-masing sebesar 0,483 mgRE/g dan 223,76 mgGAE/g (Herawati dkk., 2025). Daun binahong yang diekstrak dengan *ultrasonic cleaning bath* menggunakan etanol 70% pada frekuensi 40 kHz

selama 30 menit mampu menghasilkan total flavonoid sebesar 10,58%QE dan total fenol sebesar 10,16%GAE (Sjahid dkk., 2020).

D. Metabolit Sekunder sebagai Agen Anti-Inflamasi

Flavonoid merupakan senyawa pada tanaman yang termasuk sebagai metabolit sekunder dari polifenol. Flavonoid secara umum diklasifikasikan menjadi flavonol, flavon, flavanon, dan isoflavon. Flavonoid yang terikat dalam bentuk glikosida memiliki kelarutan yang baik dengan pelarut yang bersifat polar, seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dan dimetilformamida (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder dengan struktur kimia yang terdiri dari cincin benzena yang terikat langsung dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenolik dibagi menjadi senyawa yang memiliki struktur polifenol dan senyawa yang memiliki satu cincin fenol, seperti asam fenolik dan alkohol fenolik. Adanya gugus hidroksil pada struktur fenol dapat membantu kelarutannya dalam air dan pelarut organik seperti etanol, eter, dan kloroform (Shiyan, 2024).

Flavonoid yang terkandung dalam daun binahong termasuk ke dalam jenis glikosida flavon yaitu vitexin (Dwitiyanti dkk., 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Rosa dkk. (2016) menunjukkan bahwa vitexin dapat mengurangi migrasi neutrofil pada sel RAW 264.7 yang sudah diinduksi dengan lipopolisakarida. Vitexin bekerja dalam mengurangi mediator inflamasi

dengan menghambat fosforilasi jalur p38, ERK 1/2, dan JNK, yang berperan dalam regulasi dan produksi mediator inflamasi.

Jenis fenol yang terkandung dalam daun binahong adalah asam fenolik, yaitu *p-coumaric acid* (Fachriyah dkk., 2018). Penelitian yang dilakukan oleh Zhu dkk. (2018) menunjukkan bahwa senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak *Oldenlandia diffusa* mampu mengurangi pembengkakan pada sendi kaki tikus dengan kondisi arthritis. Penelitian tersebut juga menunjukkan adanya penurunan tingkat mediator inflamasi yaitu TNF- α dan IL-6, yang berperan dalam meningkatkan produksi faktor rheumatoid dan kerusakan tulang.

Senyawa fenolik dapat menghambat kerja enzim pembentuk mediator inflamasi dengan cara berikatan pada protein secara kovalen maupun non-kovalen. Ikatan kovalen antara fenolik dan protein terjadi secara ireversibel melalui ikatan C-N atau C-S. Ikatan non-kovalen biasanya terjadi secara reversibel melalui interaksi hidrofobik, ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, dan interaksi van der Waals. Interaksi hidrofobik umumnya terjadi antara asam amino yang bersifat hidrofobik dan cincin aromatik dari fenol, ikatan hidrogen terjadi antara atom oksigen pada ikatan peptida dan gugus hidroksil dari fenol, ikatan elektrostatik terjadi antara gugus protein bermuatan positif dan gugus hidroksi fenol bermuatan negatif. Adanya ikatan tersebut dapat menstabilkan struktur protein yang berubah akibat adanya denaturasi dan mencegah pelepasan mediator inflamasi (Shahidi dkk., 2023).

Ekstrak etanol daun binahong sebesar 100 ppm mampu menghambat hemolisis sebesar 81% (Sutrisno dkk., 2016). Hemolisis terjadi selama inflamasi yaitu pada proses peningkatan permeabilitas membran. Terjadinya hemolisis disebabkan oleh akumulasi cairan secara berlebih, yang membuat membran sel darah merah menjadi rentan terhadap kerusakan yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Hal ini kemudian berakibat pada pelepasan protein serum dan cairan ke dalam jaringan (Yesmin dkk., 2020).

Ekstrak etanol 70% daun binahong sebesar 0,728, 1,456, dan 2,912 mg/kgBB terbukti mampu mengurangi penurunan berat badan, memperbaiki konsistensi feses, dan mengurangi keberadaan darah pada feses mencit dengan kondisi kolitis ulseratif. Kolitis ulseratif adalah bentuk gangguan inflamasi dari penyakit radang usus (Utami dkk., 2023). Penelitian yang dilakukan oleh Laksmiawati dkk. (2017) juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun binahong dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$ mampu mengurangi jumlah mediator inflamasi, yaitu $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 dan NO pada sel makrofag yang diinduksi dengan lipopolisakarida.

Penelitian yang dilakukan oleh Nur dkk. (2023) menunjukkan bahwa nilai IC_{50} penghambatan denaturasi protein dari ekstrak etanol 95% buah *Basella alba* sebesar $20,52 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$. IC_{50} adalah konsentrasi suatu senyawa yang dapat menghambat denaturasi protein sebesar 50%. Semakin rendah nilai IC_{50} , maka semakin kuat aktivitas anti-inflamasinya. Nilai IC_{50} suatu ekstrak yang kurang dari 50 ppm menunjukkan aktivitas anti-inflamasi sangat kuat, 50-100 ppm aktivitas kuat, 101-150 ppm aktivitas sedang, 151-200 ppm lemah,

dan tidak memiliki aktivitas anti-inflamasi jika nilainya lebih dari 200 ppm (Waruwu dkk., 2023).

E. Sonikasi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu komponen dari satu atau lebih komponen lain dari suatu bahan menggunakan pelarut. Ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang relatif lebih besar dan dapat terhindar dari perubahan kimia karena tidak melalui proses pemanasan. Sonikasi adalah metode ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik, yang dapat disebut sebagai *Ultrasonic-Assisted Extraction* (UAE). Ultrasonik merupakan gelombang suara dengan frekuensi diatas pendengaran manusia atau di atas 20 kHz. Kelebihan dari metode ini, diantaranya yaitu lebih sederhana, penanganan mudah, biaya rendah, menggunakan sedikit pelarut organik, serta waktu ekstraksi yang singkat (Purwayantie dkk., 2023).

Faktor-faktor yang dapat berpengaruh pada keberhasilan proses sonikasi adalah intensitas sonikasi, frekuensi gelombang ultrasonik, suhu, dan jenis pelarut. Intensitas sonikasi dan frekuensi gelombang yang digunakan harus optimal supaya gelembung kavitasi dapat terbentuk dan dinding sel mudah pecah. Suhu yang rendah menghasilkan kavitasi yang lebih baik karena tidak merusak kandungan senyawa dari bahan yang diekstraksi. Pelarut yang digunakan juga harus disesuaikan dengan polaritas senyawa yang akan diekstraksi (Ameta dkk., 2018).

F. Denaturasi Protein

Denaturasi protein merupakan salah satu penyebab dari inflamasi. Denaturasi protein terjadi karena protein kehilangan struktur sekunder yang disebabkan oleh senyawa eksternal, seperti asam kuat, basa kuat, garam anorganik, maupun pemanasan. Protein dalam tubuh rentan terhadap denaturasi yang disebabkan oleh pembentukan radikal bebas. Protein yang terdenaturasi akan mengakibatkan proses inflamasi dengan merangsang pelepasan mediator inflamasi (Shalihah dkk., 2021).

Pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in-vitro* dengan metode denaturasi protein dilakukan menggunakan *Bovine Serum Albumin* (BSA). BSA merupakan indikator yang paling sensitif dibandingkan dengan indikator albumin lainnya sehingga digunakan sebagai sampel dalam metode denaturasi protein. BSA akan diinkubasi pada suhu 37°C untuk menyesuaikan kondisi dengan suhu tubuh manusia, kemudian dipanaskan untuk mendenaturasi protein (Vikasari dkk., 2024). Protein yang dipanaskan dapat menyebabkan molekul penyusun protein bergerak dengan cepat sehingga ikatan hidrogennya terputus. Pemanasan juga dapat mempengaruhi kemampuan pengikatan air dari protein dan terputusnya ikatan non-kovalen pada struktur protein, tetapi ikatan peptidanya tidak terputus (Farida dkk., 2018).

Senyawa fitokimia seperti flavonoid, fenolik, dan steroid atau triterpenoid memiliki gugus hidroksil dan ikatan rangkap terkonjugasi yang dapat mengikat residu asam amino dalam struktur BSA. Interaksi tersebut akan menstabilkan struktur protein sehingga denaturasi protein dapat dicegah

(Vikasari dkk., 2024). Aktivitas penghambatan denaturasi protein diukur pada panjang gelombang 660 nm karena protein yang terdenaturasi akan membuat larutan menjadi keruh dan menghamburkan cahaya, yang kemudian dapat terbaca oleh spektrofotometer. Kemampuan penghambatan denaturasi protein ditandai dengan berkurangnya absorbansi dan dinyatakan hasilnya dalam bentuk persentase penghambatan (Sabalingam, 2025). Senyawa yang memiliki persentase penghambatan denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki aktivitas anti-inflamasi (Novika dkk., 2021).

G. Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun binahong dengan metode sonikasi mengandung total flavonoid sebesar 10,5-11%QE dan total fenol sebesar 10,2-10,5%GAE.
2. Persentase penghambatan denaturasi tertinggi dari ekstrak etanol daun binahong adalah 70-90%.
3. Ekstrak etanol daun binahong memiliki nilai IC_{50} sebesar 20-50 ppm.