

UJI AKTIVITAS ANTIINFLAMASI FRAKSI ETIL ASETAT DAN KLOOROFORM DARI EKSTRAK KLOOROFORM *Gracilaria verrucosa* sp. DENGAN METODE DENATURASI PROTEIN

Nazsya Tiarawati, Dhanti Erma Widiyati, Yoni Rina Bintari*
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Inflamasi merupakan respon terhadap cedera jaringan oleh trauma fisik, kimia atau agen mikrobiologi yang ditangani dengan *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID) dan steroid dapat menimbulkan efek samping pada ginjal, gastrointestinal, kardiovaskular serta organ lainnya. Penggunaan jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang serius sehingga perlu ditambahkan bahan alternatif. *Gracilaria verrucosa* adalah sumber bahan dari laut yang belum tereksplorasi yang diketahui mengandung bahan aktif yang dapat berpotensi sebagai antiinflamasi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antiinflamasi dari fraksi non polar *G.verrucosa* sp. menggunakan metode denaturasi protein sebagai indikator penghambatan proses inflamasi.

Metode: Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium *in-vitro*. Simplisia diekstrak dengan maserasi kinetik menggunakan pelarut kloroform. Selanjutnya, difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat dan kloroform. Uji aktivitas antiinflamasi dilakukan menggunakan metode denaturasi *Bovine Serum Albumine* (BSA) dengan variasi konsentrasi 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm dan 1000ppm. Kontrol positif menggunakan natrium diklofenak 1000ppm. Data hasil uji antiinflamasi diolah menjadi persamaan regresi linier dan diperoleh nilai IC_{50} . Hasil dilakukan analisa statistik dengan $p < 0,05$.

Hasil: Jumlah rata-rata rendemen didapatkan hasil fraksi etil asetat sebesar 0,15%(w/w) dan fraksi kloroform sebesar 0,4%(w/w). Fraksi kloroform mengandung senyawa metabolit triterpenoid sedangkan fraksi etil asetat tidak mengandung senyawa metabolit sekunder. Berdasarkan perhitungan IC_{50} fraksi etil asetat sebesar 1.346 μ g/mL dan fraksi kloroform sebesar 1.103 μ g/mL. Perbedaan pelarut pada fraksi etil asetat dan kloroform berbeda signifikan terhadap rendemen ($p < 0,05$) dan terhadap persen inhibisi fraksi etil asetat dan kloroform tidak terdapat perbedaan signifikan ($p > 0,05$).

Simpulan: Fraksi kloroform memperlihatkan aktivitas antiinflamasi yang lebih unggul daripada fraksi etil asetat karena memiliki nilai IC_{50} yang lebih rendah.

Kata Kunci: *Gracilaria verrucosa*, fraksi etil asetat, fraksi kloroform, antiinflamasi

*Penulis Korespondensi:

Yoni Rina Bintari, S.Si., M.Sc

Jl. MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail: yonirinabintari@unisma.ac.id

ANTIINFLAMATION ACTIVITY TEST OF ETHYL ASETATE AND KLOOROFORM FRACTIONS OF THE KLOOROFORM EXTRACT OF *Gracilaria verrucosa* sp. BY PROTEIN DENATURATION METHODS

Nazsya Tiarawati, Dhanti Erma Widiyati, Yoni Rina Bintari*
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is a response to tissue injury by physical trauma, chemical or microbiological agents treated with *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs) and steroids can cause side effects on the kidneys, gastrointestinal, cardiovascular and other organs. Long-term use can cause serious side effects so it is necessary to add alternative ingredients. *Gracilaria verrucosa* is an unexplored source of marine material known to contain active ingredients that can have potential as anti-inflammatory. This study aims to test the anti-inflammatory activity of the non-polar fraction of *G. verrucosa* sp. using the protein denaturation method as an indicator of inhibition of the inflammatory process.

Method: This study was an *in-vitro* laboratory experimental study. Simplisia was extracted by kinetic maceration using chloroform solvent. Subsequently, it was fractionated using ethyl acetate and chloroform solvents. The anti-inflammatory activity test was conducted using the *Bovine Serum Albumine* (BSA) denaturation method with concentration variations of 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm and 1000ppm. The positive control used 1000ppm diclofenac sodium. Data from the anti-inflammatory test results were processed into a linear regression equation and the IC_{50} value was obtained. The results were statistically analyzed with $p < 0.05$.

Results: The average yield of the ethyl acetate fraction was 0.15% (w/w) and the chloroform fraction was 0.4% (w/w). The chloroform fraction contains triterpenoid metabolite compounds while the ethyl acetate fraction does not contain secondary metabolite compounds. Based on the IC_{50} calculation, the ethyl acetate fraction is 1,346 μ g/mL and the chloroform fraction is 1,103 μ g/mL. The difference in solvents in the ethyl acetate and chloroform fractions is significantly different from the yield ($p < 0.05$) and the percent inhibition of the ethyl acetate and chloroform fractions has no significant difference ($p > 0.05$).

Conclusion: The chloroform fraction showed superior anti-inflammatory activity than the ethyl acetate fraction because it had a lower IC_{50} value.

Keyword: *Gracilaria verrucosa*, ethyl acetate fraction, chloroform fraction, anti-inflammatory

*Correspondence Author:

Yoni Rina Bintari, S.Si., M.Sc

Jl. MT. Haryono 193 Malang, East Java, Indonesia, 65144.

e-mail: yonirinabintari@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Inflamasi merupakan respon terhadap cedera jaringan oleh trauma fisik, kimia atau agen mikrobiologi⁽¹⁾. Penatalaksanaan terhadap inflamasi menggunakan obat antiinflamasi yakni golongan *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs* (NSAID) dan steroid. Penggunaan obat NSAID dapat menimbulkan efek samping seperti gangguan fungsi ginjal, edema, hipertensi dan perdarahan gastrointestinal⁽²⁾. Sedangkan obat steroid dapat menimbulkan efek samping seperti kelemahan otot, katarak, *Cushing syndrome*, serta diabetes mellitus⁽³⁾. Penggunaan jangka panjang dapat menimbulkan efek samping yang serius sehingga perlu ditambahkan bahan alternatif. *Gracilaria verrucosa* adalah sumber bahan dari laut yang belum tereksplorasi yang diketahui mengandung bahan aktif yang dapat berpotensi sebagai antiinflamasi.

G. verrucosa sp. diketahui memiliki kandungan senyawa aktif berupa alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan triterpenoid⁽⁴⁾. Alkaloid, flavonoid, fenolik, tannin, saponin dan triterpenoid merupakan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi⁽⁵⁾. Beberapa penelitian mengenai aktivitas antiinflamasi *Gracilaria verrucosa* telah dilakukan. Pada penelitian yang dilakukan Firdaus, *et al* (2024) ditemukan bahwa pada ekstrak kloroform pada *G. verrucosa* memiliki aktivitas antiinflamasi. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Shelvina, *et al* (2024) ekstrak *Gracilaria verrucosa* baik dari metode ekstraksi infudasi maupun dekotaksi memperlihatkan memiliki aktivitas sebagai antiinflamasi lemah.

Untuk mendapatkan senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiinflamasi, ada beberapa faktor yang dapat berpengaruh terhadap pengambilan bahan aktif. Polaritas pelarut berpengaruh terhadap senyawa aktif yang diambil. Sesuai dengan prinsip “*like dissolves like*”, suatu pelarut akan cenderung melarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sepadan⁽⁶⁾. Senyawa yang dapat larut dalam pelarut kloroform yaitu triterpenoid, fenol, flavonoid dan alkaloid⁽⁷⁾. Di dalam alga merah terdapat kandungan kimia yaitu terpenoid, fenolik, flavonoid, alkaloid⁽⁸⁾. Oleh karena itu, dalam penelitian ini pelarut kloroform dipilih sebagai pelarut maserasi.

Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi). Pemakaian pelarut pada fraksinasi bertingkat diawali

dengan pelarut yang kurang polar dan dilanjutkan dengan pelarut yang lebih polar. Pada penelitian ini, pelarut fraksinasi yang digunakan adalah etil asetat dan kloroform. Etil asetat menunjukkan sifat yang lebih polar dibandingkan kloroform. Sehingga kedua pelarut akan menarik senyawa berbeda yang berdampak aktivitas antiinflamasi yang berbeda⁽⁹⁾.

Salah satu metode yang dapat digunakan untuk pengujian antiinflamasi yaitu dengan menggunakan metode *in-vitro*. Uji aktivitas antiinflamasi secara *in-vitro* dapat menggunakan metode penghambatan denaturasi protein dengan *Bovine Serum Albumin* (BSA). Aktivitas penghambatan denaturasi protein dipresentasikan dalam persen penghambatan⁽¹⁰⁾.

Pada penelitian ini akan dibandingkan potensi antiinflamasi fraksi etil asetat dan kloroform *G. verrucosa*, sehingga dapat diketahui fraksi mana yang aktivitas antiinflamasi nya lebih efektif.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental secara *in vitro* di laboratorium untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi fraksi etil asetat dan kloroform ekstrak kloroform *Gracilaria verrucosa* dengan metode denaturasi protein. Penelitian dilaksanakan bulan Juli-September 2024 di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (LPRK FK UNISMA).

Sampel dan Populasi Penelitian

Simplisia rumput laut merah (*Gracilaria verrucosa*) diperoleh dari tambak rumput laut Dusun Tanjung Sari, Desa Kupang, Kecamatan Jabon, Kabupaten Sidoarjo. Tumbuhan ini telah ditentukan dengan nomor Determinasi 1111/O115/U.06/D/B.09/XII/2023

TAHAPAN PENELITIAN

Pembuatan Ekstrak *Gracilaria verrucosa sp.*

Pembuatan ekstrak *Gracilaria verrucosa* dilakukan dengan cara maserasi dengan *Gracilaria verrucosa* ditimbang sebanyak 50 gram yang sudah diayak dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, lalu tambahkan pelarut untuk kloroform sebanyak 500 ml. Selanjutnya dimaserasi pada suhu ruang dengan lama maserasi kinetik 24 jam pada suhu ruang. Ekstrak bercampur pelarut disaring

menggunakan kertas saring kasar dalam ekstrak sampai semua pelarut habis menguap yang ditandai dengan pelarut tidak menetes lagi dalam jangka waktu minimal 5 menit. Ekstrak kental yang diperoleh dimasukkan ke dalam botol sampel dan selanjutnya dihitung jumlah %rendemen. Hasil filtrasi kemudian ditampung di erlenmeyer. Filtrat kemudian dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 50°C dengan tekanan 100 mBar untuk menghilangkan pelarut. Proses berlangsung sampai semua pelarut habis menguap yang ditandai dengan pelarut tidak menetes lagi dalam jangka waktu minimal 5 menit. Diperoleh ekstrak kental dimasukkan ke dalam botol sampel.

Pembuatan fraksi etil asetat dan kloroform *Gracilaria verrucosa* sp.

Ekstrak kloroform *Gracilaria verrucosa* dilarutkan dengan kloroform 25 mL hingga larut, lalu dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambahkan dengan pelarut air sebanyak 25 mL setelah itu dikocok dalam corong pisah hingga homogen dan setelah itu akan terbentuk 2 fase. Kemudian fase air dan fase kloroform dipisahkan lalu selanjutnya fase air ditambahkan dengan etil asetat sebanyak 25 ml setelah itu dikocok dalam corong pisah hingga homogeny dan terbentuk 2 fase, lalu dipisahkan. Hasil fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat selanjutnya dipekatkan dengan vacuum rotary evaporator dengan suhu 50°C dan didapatkan fraksi kloroform fraksi etil asetat. Kemudian dihitung % rendemen fraksi.

$$\text{Rendemen fraksi} = \frac{\text{berat fraksi (gram)}}{\text{berat ekstrak kering (gram)}} \times 100\%$$

Analisa skrining fitokimia

Uji flavonoid

Ekstrak dilarutkan dengan 2 ml pelarut di dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 1ml larutan amoniak encer dan dikocok. Lalu amati perubahan warnanya dan sampel dianggap mengandung flavonoid apabila terjadi perubahan warna orange atau merah tomat⁽¹¹⁾.

Uji alkaloid

Kandungan Alkaloid diuji menggunakan uji Mayer. Ekstrak dilarutkan dengan 2 ml pelarut lalu ditambahkan ammonia 0,05 N dan asam sulfat 2 N dan tambahkan pereaksi Mayer. Sampel positif mengandung alkaloid jika terdapat endapan putih⁽¹¹⁾.

Uji triterpenoid

Ekstrak dilarutkan dengan 2 ml pelarut di dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan H₂SO₄ pekat. Sampel positif mengandung triterpenoid apabila terjadi perubahan warna coklat kemerahan antar muka lapisan⁽¹¹⁾.

Uji saponin

Ekstrak diuji menggunakan foam test. Ekstrak dilarutkan dengan 5ml pelarut lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian dikocok selama 60 detik lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Adanya metabolit sekunder golongan saponin ditunjukkan dengan adanya pembentukan busa permanen setinggi 1-10cm kurang lebih 10 menit⁽¹²⁾.

Uji fenolik

Ekstrak dilarutkan dengan 1ml pelarut. Kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Sampel direaksikan dengan 1-2 tetes FeCl₃. Sampel positif mengandung fenolik apabila terbentuk warna biru tua kehitaman⁽¹¹⁾.

Uji tannin

Ekstrak dilarutkan dengan 1 ml pelarut lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 2-3 tetes FeCl₃ 1%. Sampel mengandung tannin/fenolik bila terjadi perubahan warna dari warna awal hijau muda menjadi hijau kehitaman⁽¹²⁾.

Uji Aktivitas Antiinflamasi

Pembuatan larutan Tris Buffer Saline (TBS)

Tris base ditimbang sebanyak 0,3 gram dan NaCl sebanyak 2,1 gram, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur berukuran 250ml. kemudian dilanjutkan dengan penambahan 250mL aquades. Sesuaikan pH dengan menambahkan asam asetat dengan pH akhir 6,2-6,5.

Pembuatan 0,2% Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA ditimbang sebanyak 0,2 gram lalu dimasukkan kedalam labu ukur berukuran 100ml. Kemudian ditambahkan larutan TBS hingga 100 ml.

Pembuatan larutan kontrol negatif

Mengambil 0,5ml larutan etanol dan ditambahkan BSA 0,2% ke dalam labu ukur berkapasitas 5ml.

Pembuatan larutan kontrol positif

Serbuk natrium diklofenak ditimbang sebanyak 10mg kemudian dituangkan di labu ukur berkapasitas 10ml dan dilarutkan dengan

larutan TBS. Diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000ppm sebagai larutan induk.

Pembuatan larutan uji

Sebanyak 20mg ekstrak dilarutkan dengan pelarut etanol di dalam labu ukur 20ml kemudian ditambahkan dengan pelarut hingga mencapai volume 20ml, untuk memperoleh konsentrasi 1000ppm sebagai larutan induk. Larutan dengan konsentrasi 1000ppm kemudian dibuat dalam deretan konsentrasi 200ppm, 400ppm, 600ppm, dan 800ppm untuk setiap ekstrak.

Pengukuran aktivitas antiinflamasi

Setiap konsentrasi larutan (uji dan kontrol) diambil 0,5ml dan menambahkan 0,2% *Bovine Serum Albumin* hingga mendapatkan volume 5ml. Sehingga untuk larutan ekstrak didapatkan konsentrasi 20ppm, 40ppm, 60ppm, 80ppm, 100ppm. Untuk konsentrasi natrium diklofenak didapatkan 100ppm. Tiap-tiap larutan diinkubasi dalam suhu 30°C selama 20 menit. Dilanjutkan dengan pemanasan pada suhu 85°C selama 10 menit, dan didinginkan pada suhu 25°C selama 20 menit. Kemudian dilakukan pengukuran absorbansi dengan spektrofotometri menggunakan gelombang 660nm. Pengujian antiinflamasi dilakukan sebanyak tiga kali (*triplo*).

Pengukuran presentasi penghambatan denaturasi protein

Pengukuran dilakukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs.kontrol negative} - \text{abs. uji}}{\text{Abs. kontrol negative}} \times 100\%$$

Keterangan:

Abs: Absorbansi

Jika senyawa dapat menghambat lebih dari 20% denaturasi protein, maka senyawa tersebut memiliki potensi antiinflamasi. Aktivitas antiinflamasi *in vitro* dinyatakan dengan menentukan besarnya IC_{50} (*inhibition concentration* 50). Nilai IC_{50} dihitung dengan membuat persamaan regresi linear antara konsentrasi (X) dengan % inhibisi (Y). Perhitungan dilakukan dengan menggunakan persamaan regresi linier karena hubungan antara daya hambat dan konsentrasi menghasilkan persamaan linier. Dari persamaan yang diperoleh $Y = ax + b$, kemudian dihitung nilai IC_{50} nya⁽¹⁴⁾.

ANALISA DATA

Data hasil penelitian ini dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif berupa hasil identifikasi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi etil asetat dan kloroform yang disajikan secara deskriptif. Data kuantitatif berupa rendemen fraksinasi dan perhitungan persen inhibisi akan dievaluasi dengan memanfaatkan *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 26, melakukan uji normalitas dan homogenitas dengan taraf signifikan $p > 0,05$. Kemudian analisis dilanjutkan dengan melakukan uji *Independent T-Test* untuk mengevaluasi perbedaan antara kelompok dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

HASIL PENELITIAN

Rendemen fraksinasi *Gracilaria verrucosa* sp.

Hasil rendemen fraksi kloroform memiliki nilai lebih besar dibandingkan dengan etil asetat secara berturut-turut sebesar $0,4\% \pm 0,34$ dan $0,15\% \pm 0,02$. Seperti yang ditunjukkan pada **Tabel 1**. Hasil analisa statistik pengaruh variasi pelarut pada fraksi terhadap rendemen dengan uji saphiro-wilk didapatkan data rendemen tidak normal dan homogen ($p < 0,05$). Selanjutnya diuji menggunakan Mann-Whitney U dan didapatkan hasil Sig 0,046 ($p < 0,05$) maka ada pengaruh perbedaan secara pelarut pada fraksi terhadap rendemen secara signifikan.

Tabel 1. Hasil % Rendemen Fraksinasi *Gracilaria verrucosa* sp.

Pelarut fraksinasi (n=3)	% Rendemen $\pm$ SD (w/w)
Kloroform	$0,4 \pm 0,34$
Etil asetat	$0,15 \pm 0,02$

Skrining uji fitokimia secara kualitatif

Hasil skrining uji fitokimia fraksi etil asetat dan kloroform *G. verrucosa* dapat dilihat pada **Tabel 2**. Fraksi kloroform mengandung senyawa triterpenoid sedangkan fraksi etil asetat tidak mengandung senyawa metabolit sekunder.

Tabel 2. Hasil uji skrining fitokimia

Uji fitokimia	Reagen	Sampel		Interpretasi hasil (+)
		Kloroform	Etil asetat	
Flavonoid	Amonia (NH ₃)	(-)	(-)	Warna orange atau merah tomat
Alkaloid	Mayer	(-)	(-)	endapan putih
Tannin	FeCl ₃	(-)	(-)	Warna hijau kehitaman
Fenolik	FeCl ₃	(-)	(-)	Warna biru tua kehitaman
Triterpenoid	H ₂ SO ₄ ,	(+)	(-)	Warna coklat kemerahan
Saponin	Perlakuan dengan dikocok kuat, HCl 1 N	(-)	(-)	pembentukan busa permanen setinggi 1-10cm

Uji aktivitas antiinflamasi**Hasil perhitungan persen inhibisi**

Hasil analisa statistik menunjukkan nilai Sig 0,084 ($p > 0,05$) sehingga dapat dimaknakan persen inhibisi fraksi etil asetat dan kloroform tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan. Hasil pengujian aktivitas antiinflamasi untuk kontrol positif (natrium diklofenak), fraksi kloroform dan fraksi etil asetat dapat dilihat pada **Tabel 3**. Senyawa yang menghambat denaturasi protein lebih besar dari 20% dianggap memiliki sifat antiinflamasi⁽¹⁰⁾. Dari tabel tersebut terlihat bahwa fraksi kloroform mulai 400ppm hingga 1000ppm memiliki persen inhibisi $>20\%$. Sedangkan fraksi etil asetat yang memiliki persen inhibisi $>20\%$ adalah konsentrasi 200ppm, 400ppm dan 1000ppm.

Tabel 3. Aktivitas antiinflamasi *G. verrucosa*

Pelarut	Konsentrasi (ppm)	Persen inhibisi(%) $\pm$ SD
Kloroform	200	19,91 $\pm$ 1,01
	400	21,20 $\pm$ 1,50
	600	35,57 $\pm$ 0,93
	800	49,14 $\pm$ 1,17
	1000	39,53 $\pm$ 4,47
Etil asetat	200	23,77 $\pm$ 8,44
	400	20,02 $\pm$ 5,18
	600	19,27 $\pm$ 1,65
	800	19,01 $\pm$ 4,62
	1000	26,52 $\pm$ 2,00
Natrium diklofenak	1000	37,06 $\pm$ 25,58

Hasil perhitungan IC₅₀

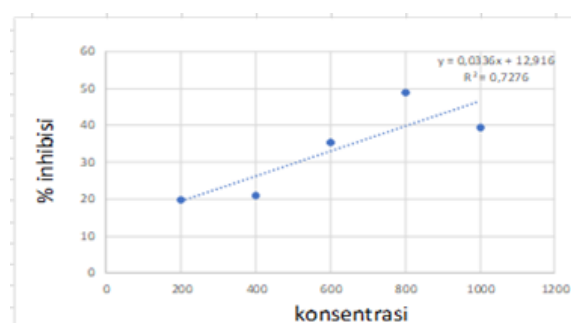
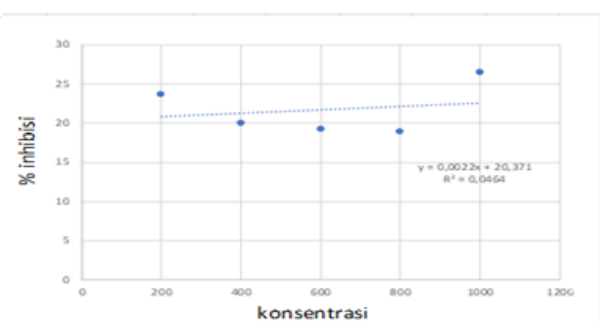
Nilai IC₅₀ didapatkan dari perhitungan grafik linear $y=mx+b$ dengan y =persentase inhibisi dan x =konsentrasi. Grafik diperoleh dengan menggunakan *Microsoft excel*. Hasil perhitungan IC₅₀ terlektak di **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil perhitungan IC₅₀ *Gracilaria verrucosa*

Pelarut	IC ₅₀ (μg/mL)
Kloroform	1.103
Etil asetat	1.346

Keterangan: Hasil perhitungan IC₅₀ pada *Gracilaria verrucosa* pelarut kloroform sebesar 1.104μg/mL dan pelarut etil asetat sebesar 1.346μg/mL.

Persamaan linier IC₅₀ fraksi kloroform dan etil asetat dapat dilihat pada **Gambar 1** dan **2**.

**Gambar 1. Grafik linier fraksi kloroform *Gracilaria verrucosa*****Gambar 2. Grafik linier fraksi etil asetat *Gracilaria verrucosa***

PEMBAHASAN

Rendemen fraksinasi *Gracilaria verrucosa*

Hasil rendemen pada penelitian ini diperoleh dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut air, kloroform dan etil asetat. Pengukuran rendemen ini dilakukan dengan membandingkan massa fraksi (gr) dengan massa awal bahan sebelum proses ekstraksi (gr). Semakin tinggi rendemen ekstrak maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik ada pada suatu bahan baku⁽¹⁴⁾. Pada hasil penelitian diperoleh rendemen fraksi dengan pelarut kloroform $0,4 \pm 0,34$ dan pelarut etil asetat $0,15 \pm 0,02$. Sehingga pemilihan pelarut kloroform sebagai pelarut fraksinasi dapat menarik metabolit sekunder lebih baik dibandingkan pelarut etil asetat.

Penggunaan pelarut kloroform dan etil asetat dilakukan karena keduanya memiliki nilai kepolaran yang berbeda. Kloroform merupakan pelarut non polar yang memiliki nilai KD (Konstanta dielektrik) 4,81 memiliki kecenderungan dalam menarik senyawa bersifat hidrofobik dan metabolit sekunder non polar. Sedangkan etil asetat memiliki nilai KD 6,08 yang memiliki persentase rendemen paling rendah dikarenakan berperan sebagai pelarut non polar yang mengekstraksi metabolit sekunder bersifat lipofilik dan hidrofobik⁽¹⁵⁾. Tingginya rendemen fraksi kloroform dipengaruhi oleh tingkat kepolarannya yang lebih rendah dibanding etil asetat menunjukkan bahwa fraksi kloroform lebih efektif mengekstrak senyawa non polar dibanding etil asetat⁽¹⁶⁾.

Identifikasi fitokimia

Uji skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada fraksi kloroform dan etil asetat *G. verrucosa*. Tujuan dilakukannya skrining fitokimia ini untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi kloroform dan etil asetat *G. verrucosa* yang berpotensi sebagai senyawa aktif antiinflamasi. Berdasarkan hasil skrining fitokimia, fraksi kloroform terdapat 1 metabolit sekunder yakni triterpenoid. Sedangkan fraksi etil asetat terdapat tidak mengandung metabolit sekunder. Hal ini linier dengan rendemen yang dihasilkan oleh fraksi kloroform lebih tinggi dibandingkan fraksi etil asetat.

Triterpenoid adalah metabolit sekunder yang berasal dari terpenoid yang tulang punggung karbonnya berasal dari enam unit

isoprena (2-metilbutil-1,3- diena), yaitu tersusun dari enam unit C5 Kerangka karbonnya berasal dari hidrokarbon C30 asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini bersifat siklik atau asiklik dan sering memiliki gugus alkohol, aldehida atau asam karboksilat⁽¹⁷⁾. Triterpenoid berperan sebagai antiinflamasi dengan cara menghentikan mekanisme enzim siklooksigenase mengubah asam arakidonat menjadi prostaglandin, yang merupakan mediator inflamasi⁽¹⁸⁾.

Aktivitas antiinflamasi fraksi kloroform dan etil asetat *Gracilaria verrucosa*

Pengujian aktivitas antiinflamasi terhadap denaturasi protein menggunakan penambahan *Bovine serum albumin (BSA)* yang dimana akan mengalami denaturasi (perubahan struktur) pada saat dipanaskan. Hal ini yang menjadi penanda dimana albumin mengalami kerusakan pada saat diinduksi panas sehingga tubuh menganggap sebagai benda asing (antigen) dan tubuh akan melakukan perlawanan yaitu mekanisme inflamasi⁽¹⁹⁾.

Aktivitas penghambatan denaturasi protein fraksi kloroform dan etil asetat dari ekstrak kloroform *G. verrucosa* dilakukan dengan konsentrasi 200ppm, 400ppm, 600ppm, 800ppm dan 1000ppm, sedangkan pada natrium diklofenak dilakukan dengan konsentrasi 1000ppm. Perbedaan konsentrasi antara natrium diklofenak dengan fraksi kloroform dan etil asetat untuk mengetahui aktivitas antiinflamasi dengan konsentrasi yang rendah, jika dengan konsentrasi yang fraksi kloroform dan etil asetat mampu menghambat lebih dari 20% denaturasi protein dan nilai persentase inhibisinya lebih baik dari natrium diklofenak, maka fraksi kloroform dan etil asetat *G. verrucosa* dianggap dapat menghambat denaturasi protein dengan baik, sehingga dapat digunakan untuk mengurangi efek samping penggunaan obat antiinflamasi.

Persentase inhibisi adalah ukuran yang digunakan untuk menjelaskan efektifitas suatu zat atau substansi yang dapat menghambat proses kimia tertentu. Dari data persen inhibisi kontrol positif (natrium diklofenak), fraksi kloroform dan etil asetat *G. verrucosa* pada konsentrasi 1000ppm yang dilakukan triplo dapat diketahui bahwa persen inhibisi fraksi kloroform sebesar 39,53%, fraksi etil asetat sebesar 26,52% dan natrium diklofenak sebesar 37,06%. Berdasarkan data tersebut, maka potensi penghambatan denaturasi protein fraksi kloroform lebih besar dibandingkan kontrol

positif dan fraksi etil asetat lebih kecil dibandingkan kontrol positifnya.

Nilai IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak (ppm) yang mampu menghambat sebesar 50%, sehingga nilai 50 disubstitusikan untuk nilai y . Setelah mensubstitusikan akan didapatkan nilai x sebagai IC_{50} . Berdasarkan hasil penelitian diperoleh bahwa nilai IC_{50} fraksi kloroform 1.104 $\mu\text{g/mL}$ (hasil ekstrapolasi) dan fraksi etil asetat sebesar 1.346 $\mu\text{g/mL}$ (hasil ekstrapolasi). Kedua fraksi ini menunjukkan aktivitas antiinflamasi yang sangat rendah. Penggolongan aktivitas antiinflamasi disesuaikan dengan penelitian yang dilakukan Minarti (2021), bahwasanya nilai $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sebagai sangat kuat, nilai $IC_{50} 50-100 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sebagai kuat, nilai $IC_{50} 101-250 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sebagai sedang, nilai $IC_{50} 251-500 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sebagai lemah dan nilai $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ dikategorikan sebagai sangat lemah⁽²⁰⁾. Fraksi kloroform dan etil asetat memiliki aktivitas antiinflamasi lemah, kemungkinan disebabkan karena pada kedua fraksi tersebut tidak mengandung senyawa flavonoid. Diketahui bahwa flavonoid dapat mencegah denaturasi protein dengan cara struktur gugus hidroksil dan cincin aromatik berinteraksi dengan albumin melalui ikatan hydrogen mengakibatkan struktur protein menjadi lebih stabil dan tidak mudah mengalami denaturasi⁽²⁰⁾.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian dapat diambil kesimpulan:

1. Fraksi kloroform *G. verrucosa* memiliki hasil rendemen tertinggi yakni sebesar $0,4\% \pm 0,34$.
2. Fraksi kloroform *G. verrucosa* mengandung triterpenoid. Fraksi etil asetat *G. verrucosa* tidak mengandung senyawa metabolit.
3. Fraksi kloroform memiliki aktivitas antiinflamasi lebih besar dibandingkan fraksi etil asetat.

SARAN

Saran berdasarkan pada hasil penelitian, pembahasan, serta kesimpulan yaitu:

1. Perlu ditambahkan berat ekstraksi agar hasil rendemen lebih tinggi sehingga senyawa metabolit sekunder terdeteksi.

2. Perlu dilakukan eksplorasi fraksinasi menggunakan pelarut polar untuk dilakukan uji antiinflamasi.
3. Perlu dilakukan validasi metode pengujian aktivitas antiinflamasi.
4. Perlu dilakukan kombinasi dengan herbal lain untuk meningkatkan aktivitas antiinflamasi.
5. Perlu untuk dilakukan penelitian formulasi sediaan yang nantinya dapat digunakan di masyarakat yang dapat digunakan sebagai antinflamasi.

UCAPAN TERIMAKASIH

Saya mengucapkan terimakasih kepada IOM dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah memberikan kesempatan dan mendanai penelitian ini sehingga dapat berjalan dengan baik dan lancar. Saya mengucapkan terimakasih juga kepada Laboran FK UNISMA yaitu Mohammad Thoif, S.Si serta Pak Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD sebagai *Peer Review* jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dewi SR. Uji efek anti inflamasi rebusan daun jambang (*Syzygium cumini*) pada mencit (*Mus musculus*). *Media Farmasi*. 2018 Jun 30;14(1):8-13.
2. Idacahyati K, Nofianti T, Aswa GA, Nurfatwa M. Hubungan tingkat kejadian efek samping antiinflamasi non steroid dengan usia dan jenis kelamin. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2019 Dec;6(2):56-61.
3. Ericson-Neilsen W, Kaye AD. Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Ochsner Journal*. 2014 Jun 20;14(2):203-7.
4. Nurjanah JA, Bestari E, Seulalae AV. Karakteristik bubuk rumput laut *Gracilaria verrucosa* dan *Turbinaria conoides* sebagai bahan baku body lotion. *Jurnal Akuatek*. 2020;1(2):73-83.
5. Khotimah SN, Muhtadi A. Beberapa tumbuhan yang mengandung senyawa aktif antiinflamasi. *Farmaka*. 2016;14(2):28-40.
6. Simamora AC, Yusasrini NL, Putra IN. Pengaruh jenis pelarut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun tenggulun (*Protium javanicum* Burm. F) menggunakan

- metode maserasi. Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan. 2021;10(4):681.
7. Dewatisari WF. Perbandingan pelarut kloroform dan etanol terhadap rendemen ekstrak daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata*. Prain) menggunakan metode maserasi. InProsiding Seminar Nasional Biologi 2020 Sep 3 (Vol. 6, No. 1, pp. 127-132).
 8. Julyasih S. Senyawa Bioaktif Beberapa Jenis Rumput Laut dan Aktivitas Penghambatan Terhadap Jamur *Aspergillus flavus* pada Tanaman Jagung (*Zea mays* L.). Jurnal Perikanan Unram. 2022 Sep 30;12(3):450-6.
 9. Kumalasari E, Septia A, Febrianti DR, Aisyah N. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Dan Fraksi Etanol, Fraksi Kloroform, Fraksi N-Heksana, Fraksi Air, Fraksi Etil Asetat Dari Daun Bawang Dayak (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.). Jurnal Ilmiah Manuntung. 2023 Dec 29;9(2):167-73.
 10. Novika DS, Ahsanunnisa R, Yani DF. Uji aktivitas antiinflamasi ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap penghambatan denaturasi protein. Stannum: Jurnal Sains Dan Terapan Kimia. 2021 Apr 30;3(1):16-22.
 11. Ibrahim FT, Fadli Z, Bintari YR. Pengaruh metode ekstraksi (dekotasi, infudasi, dan microwave) terhadap aktivitas antioksidan pada rumput laut *gracilaria verrucosa*. Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine). 2021 Apr 1;9(1).
 12. Aliwu I, Rorong JA, Suryanto E. Skrining fitokimia dan uji efek sedatif pelarut dari daun takokak (*Solanum Turvum* Swartz) pada tikus putih galur wistar. Chemistry Progress. 2020 Jun 5;13(1).
 13. Mulyani T, Setyahadi S, Wibowo AE. Uji Aktivitas Antiinflamasi Kombinasi Ekstrak Daun Torbangun (*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng.) dan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein. PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia). 2023 Aug 8;20(1):26-32.
 14. Senduk TW, Montolalu LA, Dotulong V, Ratulangi S, Bahu KU. Rendemen ekstrak air rebusan daun tua mangrove *Sonneratia alba*. Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis. 2020;11(1):9-15.
 15. Firdaus S, Fadli MZ, Bintari YR. Aktivitas Antiinflamasi Melalui Metode Denaturasi Bsa (Bovine Serum Albumin) Pada Ekstrak Rumput Laut Merah (*Gracilaria Verrucosa*) Dengan Variasi Pelarut. Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine). 2024 Jun 3;12(1).
 16. Anam C, Agustini TW. Pengaruh pelarut yang berbeda pada ekstraksi spirulina platensis serbuk sebagai antioksidan dengan metode soxhletasi. Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan. 2014 Oct 29;3(4):106-12.
 17. Sari EK, Anantarini NP, Dellima BR. Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Serai Wangi (*Cymbopogon nardus* L.) Secara In Vitro Dengan Metode Hrbc (Human Red Blood Cell). Kartika: Jurnal Ilmiah Farmasi. 2024 Apr 29;9(1):1-7.
 18. Fachri HO, Adriatmoko W, Astuti P. Khasiat Ekstrak Buah Markisa Kuning (*P. Edulis Sims*) sebagai Antiinflamasi Dilihat dari Jumlah Monosit pada Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). STOMATOGNATIC- Jurnal Kedokteran Gigi. 2018 Oct 9;15(2):34-6.
 19. Farida YU, Rahmat DE, Amanda AW. Uji Aktivitas Antiinflamasi Nanopartikel Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan Metode Penghambatan Denaturasi Protein. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. 2018;16(2):225-30.
 20. Minarti M, Ruga R, Marlina E. Aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol daun pare hutan (*Momordica balsamina* Linn.) dalam menghambat denaturasi protein. InPROSIDING SEMINAR NASIONAL KIMIA 2021 Oct 3(pp. 103-107)