

Dr. A. MU'NISA, S.Si., M.Si.

ANTIOKSIDAN

PADA TANAMAN DAN PERANANNYA
TERHADAP PENYAKIT DEGENERATIF

Suatu tanaman tidak pernah lepas dari kandungan senyawa aktif yang dimilikinya. Salah satu fungsi senyawa aktif pada tanaman adalah antioksidan. Adapun metode analisis aktivitas antioksidan selain HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) dan SET (*Single Electron Transfer*) terdapat juga metode uji yang banyak digunakan, yaitu: FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*), DPPH (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*), HORAC (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl), dan ABTS (*Hydroxyl Radical Activities*). Ada 4 jenis tanaman yang dibahas di dalam buku ini, yaitu: tanaman Cengkeh (*Eugenia aromatica* O.K), Sukun (*Artocarpus altilis*), Kayu Jawa (*Lannea cormendalica* Houtt), dan buah Tomat (*Lycopersicon esculentum*). Keempat tanaman tersebut memiliki kandungan antioksidan yang tinggi berupa senyawa fenolik dan turunannya. Berdasarkan beberapa hasil penelitian menunjukkan keberadaan kandungan senyawa antioksidan pada tanaman-tanaman tersebut memiliki efek terhadap penurunan kadar kolesterol, glukosa darah, asam urat yang berkaitan dengan beberapa penyakit degeneratif, seperti hiperkolesterolemia, atherosklerosis, dan diabetes mellitus.

**Brilian Internasional
Surabaya**

Anggota IKAPI, Nomor Anggota: 354/JTI/2022
Griya Candra Mas FA-10 Sedati, Sidoarjo, Jawa Timur
HP/WA: 0812 4927 5146, 0878 5254 7418
website : www.brilianinternasional.com
e-mail : brilianinternasional01@gmail.com

BIOKIMIA

ISBN 978-623-6776-47-6



Dr. A. MU'NISA, S.Si., M.Si.

ANTIOKSIDAN PADA TANAMAN

Brilian Internasional

Dr. A. MU'NISA, S.Si., M.Si.

ANTIOKSIDAN

PADA TANAMAN DAN PERANANNYA
TERHADAP PENYAKIT DEGENERATIF



**Brilian Internasional
Surabaya**

Dr. A. MU'NISA, S.Si., M.Si.

ANTIOKSIDAN

**PADA TANAMAN DAN PERANANNYA
TERHADAP PENYAKIT DEGENERATIF**

**enerbit
Brilian Internasional
Surabaya**

Dr. A. MU'NISA, S.Si., M.Si.

ANTIOKSIDAN

**PADA TANAMAN DAN PERANANNYA
TERHADAP PENYAKIT DEGENERATIF**

Surabaya, Brilian Internasional, 2023
xvi + 152 hal: 15 x 21 cm

ISBN 978-623-6776-47-6



Desain sampul & *lay-out*:
Tim Brilian Internasional Surabaya

Editor: **Drs. Agus Wijaya, S.Pd., M.M., M.Si.**

Cetakan ke-1: Februari 2023

enerbit

Brilian Internasional Surabaya
Anggota IKAPI, Nomor Anggota: 354/JTI/2022

Alamat Perusahaan:
Griya Candra Mas FA-10 Sedati, Sidoarjo, Jawa Timur

HP/WA: 0812 4927 5146, 0878 5254 7418
website: www.brilianinternasional.com
e-mail: brilianinternasional01@gmail.com

TENTANG PENULIS



Dr. A. Mu'nisa, S.Si., M.Si dilahirkan di Kota Ujung Pandang, yang sekarang bernama Kota Makassar pada 26 Mei 1972. Beliau menyelesaikan sekolah mulai dari tingkat dasar hingga S1 (strata 1) di Kota Makassar. Beliau menyelesaikan sekolah dasar di SDN Kompleks Labuang Baji (1978-1984), sekolah menengah di SMPN 1 (1984-1987) dan SMAN 11 (1987-1990) Kota Makassar. Beliau kuliah S1 (1991-1997) di Universitas Hasanuddin pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, S2 (1999-2002) di Universitas Gadjah Mada pada Fakultas Biologi di Kota D.I. Yogyakarta dan S3 (2003-2009) di Institut Pertanian Bogor pada Jurusan Biologi di Kota Bogor.

Dr. A. Mu'nisa, S.Si., M.Si mendalami spesialisasi bidang ilmu Fisiologi Hewan. Selama kuliah beliau mendapat beasiswa mulai dari tingkat S1 hingga S3. Pada saat S1 beliau mendapat beasiswa dari PT Kalbe Farma. Pada tingkat S2 dan S3 beliau mendapat beasiswa Pascasarjana dari Dirjen Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan Republik Indonesia.

Dr. A. Mu'nisa pernah meraih penghargaan sebagai Mahasiswa Berprestasi Akademik Gemilang selama kuliah di IPB (2004-2005),

Peneliti Terbaik I (2012), dan Dosen Teladan Terbaik 2 (2013) pada tingkat Universitas Negeri Makassar. Selain itu, beliau telah mendapat Setya Lencana Karya Satya X pada tahun 2015 dari President RI Ir. Joko Widodo.

Dr. A. Mu'nisa adalah seorang pengajar (dosen) pada Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam di Universitas Negeri Makassar sejak 1998 hingga sekarang. Beliau telah mempublikasikan tulisan hasil-hasil penelitian, baik hasil penelitian Desentralisasi maupun penelitian Kompetitif Nasional, yang didanai oleh Dikti (Kemdikbud Ristek-Dikti RI) mulai tahun 2011 sampai dengan 2020. Tulisan-tulisan beliau telah dimuat baik pada jurnal nasional maupun jurnal internasional dengan h-Indeks Google Scholar 6 dan Scopus 2.

KATA PENGANTAR

Buku referensi ini diberi judul *Antioksidan pada Tanaman dan Peranannya terhadap Penyakit Degeneratif*. Tujuan penerbitan buku ini adalah untuk menggali potensi berbagai tanaman khas Indonesia dan mudah diperoleh di sekitar kita, serta mengkaji kandungan senyawa antioksidannya yang berperan dalam pengobatan berbagai penyakit degeneratif. Buku ini sangat penting bagi mahasiswa S1, S2, dan S3 sebagai bahan referensi dalam penyusunan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi. Buku ini juga dapat digunakan oleh para dosen atau pengajar serta peneliti dalam bidang Kesehatan, Kimia, Biologi, dan Botani.

Buku ini terdiri atas 5 bab. Bab 1 Pendahuluan membahas mengenai peranan antioksidan dan metode analisis aktivitas antioksidan. Bab 2 hingga Bab 5 berturut-turut membahas mengenai tanaman Cengkeh, tanaman Sukun, tanaman Kayu Jawa, dan tanaman Tomat. Setiap bab terdiri atas subbab yang berisikan ekstraksi tanaman, kandungan senyawa aktif tanaman, dan efek farmakologinya yang bersumber baik dari hasil penelitian penulis yang telah dipublikasikan maupun berasal dari buku, jurnal nasional, maupun jurnal internasional.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada suami tercinta dan anak-anakku yang selalu memberi dukungan dalam proses penulisan buku ini. Penulis tak lupa menyampaikan ucapan terima kasih buat ibunda dan kakakku yang selalu memberi *support* dalam

proses penyelesaian buku ini. Kepada bapak Drs. Agus Wijaya, S.Pd., M.M., M.Si yang bersedia menjadi editor dan menerbitkan buku ini, penulis mengucapkan banyak terima kasih.

Harapan penulis buku ini dapat menjadi bahan acuan atau referensi dalam proses penelitian selanjutnya oleh para dosen dan peneliti, serta menjadi referensi dalam pembelajaran mata kuliah pada Program Studi Kesehatan, Kimia, Biologi, dan Botani.

Kota Makassar, 1 Januari 2023

Penulis,

Dr. A. Mu'nisa, S.Si., M.Si.

DAFTAR ISI

TENTANG PENULIS	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Antioksidan Tubuh.....	1
1.2 Metode Analisis Aktivitas Antioksidan	4
1.3 Hiperkolesterolemia.....	13
1.4 Atherosklerosis.....	20
1.5 Diabetes Melitus	24
BAB 2 TANAMAN CENGKEH	29
2.1 Diskripsi Tanaman Cengkeh	29
2.2 Kandungan Senyawa Aktif Tanaman Cengkeh	31
2.3 Ekstraksi Daun Cengkeh	33
2.4 Farmakologi Ekstrak Daun Cengkeh.....	41
BAB 3 TANAMAN SUKUN	91
3.1 Diskripsi Umum Tanaman Sukun.....	91
3.2 Kandungan Kimia Daun Sukun	93
3.3 Aktivitas Antioksidan Daun Sukun.....	97
3.4 Ekstraksi Daun Sukun	99
3.5 Efek Farmakologi Ekstrak Daun Sukun.....	101

BAB 4 TANAMAN KAYU JAWA.....	107
4.1 Diskripsi Tanaman Kayu Jawa (<i>Lannea cormendalica. Houtt</i>)...	107
4.2 Kandungan Senyawa Aktif Tanaman Kayu Jawa.....	109
4.3 Efek Farmakologis Tanaman Kayu Jawa.....	110
BAB 5 TANAMAN TOMAT.....	121
5.1 Diskripsi Tanaman Tomat	121
5.2 Ekstraksi Buah Tomat.....	123
5.3 Kandungan Kimia Buah Tomat	124
5.4 Efek Farmakologi Buah Tomat.....	130
DAFTAR PUSTAKA	131
GLOSARIUM.....	149
INDEKS	153

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perolehan Sediaan Rendemen dan Total Fenol pada Daun Cengkeh dengan Menggunakan Pelarut Aquades, Metanol, dan Etanol	35
Tabel 2.2	Hasil Uji Fitokimia Ekstrak dan Simplisia Daun Cengkeh	39
Tabel 2.3	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar Kolesterol Total dan LDL Serum Darah Kelinci	45
Tabel 2.4	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar Kolesterol HDL dan Triglicerida Serum Darah Kelinci.....	49
Tabel 2.5	Indeks Aterogenik pada Kelinci Perlakuan.....	53
Tabel 2.6	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar MDA Hati dan Ginjal Kelinci	55
Tabel 2.7	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Aktivitas Enzim Antioksidan SOD, Katalase, dan GPx pada Hati Kelinci	60
Tabel 2.8	Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Aktivitas Enzim Antioksidan Sod,	61
	Katalase, Dan Gpx Pada Ginjal Kelinci.....	61

Tabel 2.9	Rataan Jumlah Sel Hati pada Berbagai Tingkat Kandungan Cu,Zn-SOD per lapang pandang (20x).....	66
Tabel 2.10	Rataan Jumlah Sel Tubulus Renalis pada Berbagai Tingkat Kandungan Cu, Zn-SOD per Lapang Pandang (20x).....	67
Tabel 2.11	Rataan Jumlah Butiran Lemak pada Jaringan per Lapang Pandang (40x).....	68
Tabel 2.12	Rataan Jumlah Corpusculus Renalis dengan Pengendapan Protein pada Jaringan Ginjal per Lapang Pandang (40x).....	75
Tabel 2.13	Rataan Pembentukan Lesi Aorta per Lapang Pandang (20x).....	80
Tabel 3.1	Kandungan Flavanoid Daun Sukun Muda, Tua, dan Gugur	96
Tabel 3.2	Persentase Penghambatan Ekstrak Daun Sukun dengan Pelarut Aquades, Metanol, dan Heksan dengan Pembanding Vitamin C dan BHT.....	97
Tabel 3.3	Rata-rata Kadar Glukosa Awal, Setelah Diinduksi Aloksan (Kondisi Hiperglikemia), dan Glukosa Akhir pada Mencit	103
Tabel 3.4	Kadar MDA Hati Mencit	104
Tabel 4.1	Hasil Pengamatan Uji Fitokimia Air Rebusan Daun Kayu Jawa.....	115
Tabel 4.2	Hasil Analisis Kualitatif Ekstrak Fenol dan Flavonoid Infusa Kayu Secang.....	116
Tabel 4.3	Hasil Analisis Kuantitatif Ekstrak Fenolik Infusa Kayu Jawa.....	117
Tabel 4.4	Hasil Analisis Kuantitatif Flavonoid pada Ekstrak Kayu Jawa.....	117

Tabel 4.5	Persentase Quercetin dan DPPH dengan Panjang Gelombang 515 nm.....	117
Tabel 4.6	Persentase Hambatan Kayu Secang dengan Panjang Gelombang 513,08 nm.....	118
Tabel 5.1	Pengukuran Absorban dan Kadar Likopen pada Tomat Lokal Daerah Toraja dan Malino dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada Panjang Gelombang 472 nm	127
Tabel 5.2	Aktivitas Antioksidan dan Nilai IC50 Ekstrak Aquades dan Metanol Tomat Asal Daerah Toraja dan Malino, serta Vitamin C sebagai Pembanding.....	128

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Reaksi Peroksida lipid	15
Gambar 1.2	Reaksi TBA dengan 2-heksenal dan dengan malonaldehida	16
Gambar 1.3	Peranan LDL dalam Aterosklerosis.....	22
Gambar 1.4	Pelepasan Insulin dari Sel Beta Pankreas.....	26
Gambar 2.1	<i>Eugenia aromatica</i> O.K.....	30
Gambar 2.2	Nilai absorbansi kontrol (PBS), α -tokoferol, dan ekstrak daun cengkeh dengan pelarut akuades, metanol, dan etanol.....	36
Gambar 2.3	Nilai periode induksi dan faktor protektif antioksi dan kontrol (PBS), α -tokoferol, dan daun cengkeh dengan pelarut akuades, metanol, dan etanol.....	37
Gambar 2.4	Kromatogram Hasil Fraksinasi Komponen Nonvolatil Ekstrak Metanol Daun Cengkeh dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	40

Gambar 2.5	Mekanisme Penghambatan Eugenol terhadap Peroksidasi lipid (Ogata et al. 2000).....	41
Gambar 2.6	Fotomikrograf Jaringan Hati Kelinci yang Diwarnai Secara Imunohistokimia terhadap Kandungan Cu,Zn-SOD	70
Gambar 2.7	Fotomikrograf Jaringan Ginjal Kelinci Perlakuan yang Diwarnai Secara Imunohistokimia terhadap Kandungan Cu,Zn-SOD	71
Gambar 2.8	Fotomikrograf Jaringan Hati Kelinci yang Diwarnai dengan Hematoksin Eosin	76
Gambar 2.9	Fotomikrograf Jaringan Ginjal Kelinci yang Diwarnai Hematoksin Eosin	78
Gambar 2.10	Fotomikrograf Aorta Kelinci yang Verhoeff-van Gieson	81
Gambar 3.1	Tanaman Sukun	92
Gambar 3.2	Nilai IC50 (mg/ml) Ekstrak Daun Sukun dengan Menggunakan Pelarut Aquades, Metanol, dan Heksan, dan Perbandingan Menggunakan Vitamin dan BHT. Nilai IC50 Mengindikasikan Tingginya Aktivitas Antioksidan.....	98
Gambar 4.1	Tanaman Kayu Jawa	108
Gambar 4.2	Uji Fitokimia Air Rebusan Daun Kayu Jawa.....	114
Gambar 5.1	Tanaman tomat ceri dan buah	123
Gambar 5.2	Struktur Kimia Likopen	125

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Antioksidan Tubuh

Tubuh memiliki sistem perlindungan untuk mencegah pembentukan oksidan dan peroksida lipid. Sistem perlindungan ini disebut antioksidan. Antioksidan dapat dibedakan atas antioksidan endogen yang terdiri atas enzim-enzim dan berbagai senyawa yang disintesis tubuh dan antioksidan eksogen yang diperoleh dari bahan makanan.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi antioksidan primer, sekunder, dan tertier. Antioksidan primer, berfungsi sebagai pelindung terhadap jenis radikal bebas yang baru dengan membentuk molekul yang kurang berbahaya dan terdapat pada intraseluler. Antioksidan primer terdiri atas Superoksida dismutase (SOD), Glutation peroksidase (GPX), Katalase, dan Koenzim Q (Ubiquinon). Antioksidan sekunder berfungsi untuk mengikat radikal bebas. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E (alfa-tokoferol), vitamin C (asam askorbat), beta karoten, asam yurik, bilirubin, dan albumin. Vitamin E dan vitamin C merupakan mikronutrien yang terdapat dalam suplemen makanan. Antioksidan sekunder tersebut umumnya terdapat pada ekstraseluler. Antioksidan tertier, berperan

untuk memperbaiki biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas. Contoh antioksidan tertier adalah enzim perbaikan DNA dan metionin sulfoksida reduktase (Evans & Richard 1992).

1.1.1 *Superoksida dismutase (SOD)*

Superoksida dismutase (SOD) adalah enzim yang mengubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida. Enzim antioksidan intraseluler ini paling banyak ditemukan pada sel aerobik. Bentuk Cu-Zn ditemukan dalam inti dan sitoplasma, sementara mangan dalam mitokondria. Antioksidan ini mereduksi radikal menjadi hidrogen peroksida dengan reaksi sebagai berikut:



Aktivitas SOD dihambat oleh sianida dan H_2O_2 oleh sebab itu SOD sangat membutuhkan katalase. Aktivitas SOD (U/g jaringan) tertinggi ditemukan di dalam hati. SOD juga ditemukan pada kelenjer adrenalin, ginjal, darah, limpa, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium, dan timus (Halliwell dan Gutteridge 1999; Rice-Evan & Anthony 1991).

1.1.2 *Glutation peroksidase (GPX)*

Glutation peroksidase (GPX) adalah enzim yang mengubah hidrogen peroksida dan peroksida lemak menjadi molekul yang tidak berbahaya sebelum menjadi radikal bebas. Konsentrasi GPX tertinggi dijumpai pada hati dan juga ditemukan di ginjal, eritrosit, mata, otak, dan limpa. Reaksi perubahan peroksida dan peroksida lemak menjadi air adalah sebagai berikut:



Glutation peroksidase menggunakan glutation tereduksi (GSH) sebagai substrat. Glutation peroksidase mereduksi hidroperoksida dan pada saat yang sama glutation tereduksi mengalami oksidasi. Pada manusia, aktivitas glutation peroksidase sebanding dengan konsentrasi selenium (Se) plasma (Halliwell dan Gutteridge 1999).

Aktivitas GPX diukur dengan metode yang dikembangkan oleh. Prinsip metode ini adalah glutation peroksidase mengkatalis glutation tereduksi menjadi glutation teroksidasi dan glutation teroksidasi direduksi kembali menjadi glutation tereduksi oleh enzim glutation reduktase dengan kofaktor NADP dalam suasana asam. Jumlah glutation tereduksi diukur dengan menentukan jumlah mikromol NADPH sebagai tenaga pereduksi (Rice-Evan & Anthony 1991).

1.1.3 Katalase

Katalase adalah enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air. Katalase berlokasi di sitoplasma eritrosit tapi terdapat dalam peroksisom pada sel lain. Konsentrasi katalase tertinggi dalam hati dan eritrosit, tapi kurang terdapat pada otak, jantung, dan otot rangka. Konsentrasi katalase rendah pada saat produksi hidrogen peroksida direduksi secara efisien dalam sel oleh glutation peroksida dan berperan penting bila konsentrasi hidrogen peroksida tersebut tinggi (Halliwell dan Gutteridge 1999; Rice-Evan & Anthony 1991).

Efektivitas peranan enzim antioksidan dalam pertahanan tubuh sangat dipengaruhi oleh keseimbangan antara produksi radikal bebas dengan aktivitas senyawa antioksidan. Di lain pihak, aktivitas senyawa antioksidan sangat dipengaruhi oleh asupan senyawa penyusun antioksidan tersebut di dalam makanan serta faktor makanan yang dapat memodulasi produksi maupun aktivitas enzim antioksidan (Belitz & Grosch 1999).

Metode ini menggunakan zat warna bikromat sebagai indikator, ion bikromat dalam suasana asam dapat direduksi oleh H_2O menjadi kromat. Perubahan warna yang muncul dibaca secara spektrofotometri pada panjang gelombang 570 nm. Satu unit aktivitas katalase adalah banyaknya H_2O_2 yang dipakai oleh katalase permenit untuk mengubah kromat (Rice-Evan & Anthony 1991).

1.2 Metode Analisis Aktivitas Antioksidan

Analisis antioksidan merupakan pengukuran secara kuantitatif terhadap kemampuan suatu komponen sebagai agen pereduksi. Analisis antioksidan sendiri dibagi menjadi 2, yaitu: HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) dan SET (*Single Electron Transfer*), meski keduanya terkadang muncul hampir selalu bersamaan, tetapi keduanya memiliki mekanisme yang berbeda. Berikut adalah perbedaan keduanya, yaitu:

- a. *HAT Metode* yang digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan yang digunakan dalam menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom H. Efektif digunakan untuk komponen fenolik dan dalam pengujiannya menggunakan senyawa pewarna yang merupakan suatu radikal bebas. Pada pengujian ditandai adanya aktivitas antioksidan dengan perubahan warna, dari yang berwarna menjadi tidak berwarna. Jika dibandingkan dengan metode SET, maka metode ini jauh lebih dominan. Contohnya adalah pengujian menggunakan metode ABTS dan *Hydroxyl radical scavenging assay* ($ORAC_{OH^*}$)
- b. *SET Metode* yang berbasis pada reaksi redoks. Antioksidan yang diuji akan bereaksi dengan agen oksidasi yang juga merupakan senyawa fluorescence. SET diukur dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengukur perubahan warna yang berkorelasi dengan konsentrasi antioksidan dalam sampel. Metode ini dipengaruhi oleh pH dan solven yang digunakan. Sedangkan pengukurannya

berdasarkan pada perubahan warna yang terjadi, semakin besar perubahan warna maka semakin tinggi proses reduksi. Hal ini menandakan akitivitas antioksidan yang semakin besar pula. Contohnya adalah pengujian antioksidan menggunakan FRAP dan DPPH.

Berdasarkan kedua mekanisme analisis antioksidan tersebut, jenis uji yang banyak digunakan adalah FRAP, DPPH, HORAC, dan ABTS.

1.2.1 Metode Analisis FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

FRAP merupakan metode analisis yang biasa digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru. TPTZ sendiri adalah colorants dan Fe(III) merupakan radikal bebas. Kekuatan antioksidan yang diuji menggunakan FRAP, tidak perlu melibatkan perlakuan pre-treatment, karena dianggap konstan dan linear dengan hasil pengujian. Pada pengujian FRAP, idealnya sampel yang digunakan $>3000\mu\text{M}$ dan dilarutkan pada air ataupun ethanol, dan dilakukan uji pengulangan dengan pengenceran bertahap untuk pengukuran nilai FRAP. Proses pengujian dilakukan pada pH asam dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, menggunakan diode-array spectrophotometer (Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014). Metode ini sendiri dianggap dapat mengukur kombinasi efek antioksidan dari molekul biologi bukan enzim. Selain itu juga memberikan indeks kemampuan untuk mengurangi efek oksidatif dari radikal bebas. Biasanya uji digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada plasma dan fenol yang terekstraksi pada fasa aqueous atau methanol. FRAP mendeskripsikan hasil pengujian sebagai reaksi kinetik dan

hubungannya dengan dosis dari larutan yang diuji, serta menunjukkan aktivitas antioksidan setara dengan yang terjadi dalam plasma tubuh (Lopez-Alarcon dan Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014). Selain itu, sama seperti metode pengujian lain, pengujian ini menggunakan antioksidan standar yang sudah diketahui kemampuannya sebagai pembanding atau kombinasi interaksi antar keduanya. Contohnya adalah asam askorbat, α -tocopherol, dan bilirubin. Kelebihan dari penggunaan FRAP adalah cepat, cocok untuk sampel plasma (baik hanya dalam bentuk satu jenis antioksidan atau ketika bercampur dengan plasma), mudah, dan reagen mudah didapat. Berhubungan dengan karakteristik dosis (*dose dependent*) dari antioksidan yang akan berbeda bergantung dari aktivitas antioksidan dan jenisnya. (Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010; Al-Dabbas *et al.*, 2007; Embuscado, 2015; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Benzie dan Strain, 1996).

1.2.2 Metode Analisis ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ABTS merupakan senyawa radikal kation organik yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bereaksi pada pH 7,4 berdasarkan waktu dan persentase diskolorasi sebagai bagian dari fungsi konsentrasi. Aktivitas dari ABTS ditandai dengan perubahan warna yang terjadi dari biru atau hijau, menjadi tidak berwarna. Pengukuran ABTS dilakukan, untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mendonorkan radikal proton, sehingga tercapai kestabilan. Kalorimeter digunakan untuk menghitung secara kuantitatif kemampuan antioksidan tersebut pada panjang gelombang 734nm. Sama seperti pengukuran lain, pengukuran metode ini menggunakan antioksidan pembanding sebagai kurva standar, seperti α -tocopherol, glutathione, dan uric acid. Kelebihan pada penggunaan metode ABTS atau biasa disebut sebagai TEAC dianggap sebagai

metode yang mudah, cepat, dapat digunakan baik pada fasa aqueous ataupun lipid (Karadag *et al.*, 2009; Badarinath *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2015; Boligon *et al.*, 2014; Fitriana *et al.*, 2015; Torres *et al.*, 2018).

1.2.3 Metode Analisis DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)

Uji aktivitas antioksidan ini ditemukan oleh Blois (1995), dimana dalam pengujian menggunakan DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl; C₁₈H₁₂N₅O₆, M=394.33) yang merupakan radikal bebas yang bersifat stabil (Kedar dan Sigh, 2011). Pada uji ini, DPPH akan bewarna ungu karena adanya delokalisasi, yang kemudian akan berubah warna menjadi kuning hydrazine ketika bereaksi dengan antioksidan dan mengalami proses reduksi. Proses reduksi terjadi karena adanya donor hidrogen dari substrat yang mengakibatkan warna ungu pada DPPH berkurang (Boligon *et al.*, 2014, Mishra *et al.*, 2012; Kedare dan Sigh., 2011; Van Goethem *et al.*, 2001).

Metode DPPH berfungsi dalam mengevaluasi potensi antioksidan dalam meredam radikal bebas (Praditasari, 2018). Dalam proses evaluasi antioksidan menggunakan uji DPPH, terdapat proses skrining yang bertujuan sebagai uji kuantitatif aktivitas antioksidan dengan menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm (Tamat *et al.*, 2007). DPPH hanya larut dalam pelarut organik seperti methanol dan etil asetat, juga digunakan untuk pengujian antioksidan yang bersifat polar (Pyrzynska & Pekal, 2013; Nurjanah, Izzati, & Abdullah, 2011). Selain itu, berdasarkan beberapa jurnal, karena sifatnya sebagai radikal bebas, uji DPPH dipengaruhi juga oleh: cahaya, pH, jenis pelarut, lama proses, ion organik, garam dan suhu (Ozcelik *et al.*, 2003; Pyrzynska & Pekal, 2013; Xie & Schaich, 2014; Mishra *et al.*, 2012; Al-Dabbas *et al.*, 2007). Konsentrasi aktivitas antioksidan yang diuji dengan menggunakan uji DPPH dinyatakan dengan parameter IC₅₀ (berasal dari inhibition concentration IC₅₀

atau bisa dinyatakan sebagai efficiency concentration EC50), dimana angka ini menyatakan konsentrasi antioksidan yang digunakan dalam mengurangi konsentrasi DPPH sebanyak 50%. Semakin sedikit nilainya maka menyatakan bahwa semakin besar aktivitas antioksidannya, yang kemudian dikalkulasi dengan menggunakan inhibition curve (Mishra *et al.*, 2012; Pyrzyńska dan Pekal, 2013; Yudiati *et al.*, 2014; Embuscado, 2015).

1.2.4 Metode Analisis ORAC_{OH*} atau HORAC (Hydroxyl Radical Activities)

Pada umumnya, ORAC menggunakan pengukuran reaksi antioksidan dengan senyawa radikal bebas AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane), dimana antioksidan akan transfer atom hydrogen untuk mereduksi radikal bebas. Aktivitas terjadi ketika adanya substitusi OH dengan struktur antioksidan yang diteliti. Banyak digunakan untuk pengujian pada sampel yang berbentuk plasma dan serum, tetapi tidak perlu ada proses protein removal. Metode ini dianggap sebagai sistem yang dapat menggunakan teknik area di bawah kurva dan mengkombinasikan hubungan antara waktu inhibisi dengan derajat inhibisi dari senyawa radikal oleh antioksidan. Dibandingkan dengan metode lain yang menggunakan waktu inhibisi pada waktu yang ditentukan sebagai hasil kuantitatif (Karadag *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 1997). Prinsip dari metode ini adalah ketika radikal bebas, yaitu azo-initiator ditambahkan molekul berwarna atau fluorescent seperti β -phicoerythrin kemudian dipanaskan, azo-initiator akan menghasilkan radikal bebas peroksil yang merusak β -phicoerythrin sehingga kehilangan warnanya atau menjadi tidak berwarna. Kurva intensitas vs waktu yang area dibawahnya merupakan kalkulasi antara pengaruh penambahan atau tanpa penambahan antioksidan. Lalu dikomparasi dengan kurva standard menggunakan antioksidan (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchromane-2-carboxylic acid, yang merupakan vitamin E analog (Karadag *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 1997).

1.2.5 Proses Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Faktor yang Memengaruhinya

Bagaimana kedua faktor, metode preparasi dan matriks penyusun, berpengaruh pada metode pengujian yang memengaruhi hasil aktivitas antioksidan untuk setiap metode. FRAP memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan uji lainnya. Pengujian FRAP menggunakan pH asam selama proses pengujian berlangsung. Hal ini berpengaruh terhadap matriks penyusun antioksidan. Contohnya pada sampel biopeptida yang mengandung Tyr dan Trp sangat bergantung pada nilai pH pengujian. Penggunaan pH rendah (pH 3,6) tidak dapat diaplikasikan beberapa jenis ikatan peptida yang mengandung asam amino tersebut. Namun, asam amino Cys-Cys diketahui tidak terpengaruh oleh pH, dan dapat menggunakan FRAP sebagai metode pengujiannya. (Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon dan Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010).

Selain itu, tidak semua antioksidan mampu mereduksi Fe(III) dengan waktu yang sesuai waktu inkubasi. Pada beberapa senyawa polifenol membutuhkan waktu untuk mencapai hasil maksimal. Ketika estimasi penggunaan metode FRAP hanya 4-6 menit saja. Hal ini juga terlihat pada minimnya uji FRAP yang digunakan pada sampel biopeptida, FRAP juga tidak dapat mendeteksi komponen antioksidan seperti thiol, glutathione dan protein (mengandung gugus SH) karena membutuhkan waktu reaksi yang lama. Faktor terakhir dari minimnya penggunaan metode FRAP adalah karena adanya senyawa pengganggu, banyak terdapat pada sampel biologis. Namun, FRAP memiliki beberapa kelebihan seperti cepat, mudah, tidak mahal, dan tidak membutuhkan peralatan spesifik, serta dapat dilakukan secara otomatis, semi-otomatis, atau manual (Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon dan Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010). Hal ini ditunjukkan pada sampel tinta *Loligo*

formosana, hasil pengujian FRAP lebih sedikit dibandingkan dengan pengujian antioksidan lainnya (Zhouyong *et al.*, 2017).

Selain itu, tidak terdapat hubungan antara angka FRAP dengan jumlah elektron yang didonorkan oleh antioksidan, karena donor elektron dari substansi bukan antioksidan dapat berkontribusi dalam angka FRAP. Hal ini disebabkan karena nilai potensial reduksi standar dari Fe (III)/Fe(II) adalah 0.77 V sehingga senyawa apapun dengan nilai potensial reduksi dibawah 0.77 V dapat mereduksi Fe(III) menjadi Fe(II) dan memberikan kontribusi pada pengukuran antioksidan dengan metode FRAP (Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010). Hal ini ditunjukkan pada sampel pepsin hydrosilates *Sephia pharaonic* dan biopeptida *Lamelli branchia*, pada pengujian FRAP hasil yang didapatkan lebih lebih tinggi dari uji DPPH dan HO scavenging. (Siahpoosh & Alikhani, 2016; Vate & Benjakul, 2013). Hal ini dapat disebabkan karena adanya senyawa bukan antioksidan dan adanya modifikasi metode yang memberikan nilai tambah pada aktivitas antioksidan.

Penggunaan ABTS diketahui dapat digunakan untuk fase hidrofilik ataupun hidrofobik. Sehingga dapat digunakan pada berbagai jenis matriks penyusun seperti pada biopeptida dan polisakarida. Namun, ketika jumlah molekul hidrofobik berlebih aktivitas ABTS akan jauh lebih rendah jika dibandingkan dengan pengujian HO scavenging yang lebih sensitif (Zou *et al.*, 2016).

Pada sampel hidrosilat pepsin *Sepia pharaonic* dan chitosan pada Chiton, hasil pengujian ABTS lebih rendah nilai IC50 dibandingkan dengan pengujian lain (Siahpoosh & Alikhani, 2016; Rasti *et al.*, 2017). Hal ini disebabkan karena ABTS memiliki batas waktu pengujian seperti FRAP, sehingga bisa saja aktivitas antioksidan pada sampel terjadi setelah batas waktu pengujian. Sehingga hasil aktivitas antioksidan

tidak mencapai titik maksimum. Hal ini berlaku pada sampel berasal dari senyawa fenolik ataupun produk alami yang membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai titik akhir. Sehingga pembacaan aktivitas antioksidan tidak maksimal dan nilai IC50 tidak mencapai dibawah 50 ataupun persentase aktivitas lebih rendah dibandingkan pengujian lainnya (Karadag *et al.*, 2009; Badarinath *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2015).

Metode ABTS merupakan pengujian untuk mengetahui proses *scavenging* pada radikal bebas ABTS dan tidak menggambarkan proses serupa pada proses oksidatif dalam tubuh. Hal ini disebabkan karena radikal ABTS tidak ditemukan dalam tubuh, sehingga tidak dapat menggambarkan proses aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Berdasarkan hal tersebut, menunjukkan bahwa ABTS tidak menjadi pilihan untuk pengujian aktivitas antioksidan. Meski begitu, ABTS memiliki beberapa kelebihan seperti proses pengujian pada pH netral dengan rentang yang cukup panjang, sehingga dapat diaplikasikan pada berbagai jenis antioksidan (Boligon *et al.*, 2014; Fitriana *et al.*, 2015).

Pada uji HO *scavenging*, banyak digunakan pada sampel biopeptida, juga digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan *hyaluronic acid* pada *Amassium pleuronectus* serta memberikan hasil yang signifikan. Pada sampel biopeptida semakin panjang rantai akan memiliki kelarutan yang lebih tinggi pada proses pengujian, hal ini akan meningkatkan aktivitas HO *scavenging*. Meski begitu, molekul dengan berat molekul yang lebih rendah tetap memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Berbanding terbalik dengan ABTS, semakin banyak asam amino bersifat hidrofobik pada ikatan peptida akan meningkatkan aktivitas antioksidan pada pengujian. Selain pengujian pada sampel hidrofobik, pada sampel hidrofilik HO *scavenging* dapat memberikan

hasil pengukuran secara langsung saat antioksidan pada sampel merusak rantai radikal hidroksil.

HO[•] merupakan radikal reaktif dan biasa ditemukan dalam tubuh. HO *scavenging* atau biasa dikenal sebagai HORAC, merupakan metode terbaru yang banyak digunakan dalam proses uji aktivitas antioksidan. Metode ini memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, sehingga mampu menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang lebih baik. Namun, metode pengujian ini membutuhkan biaya yang cukup mahal dan peralatan khusus (Zou *et al.*, 2016; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Pengujian selanjutnya adalah uji DPPH. Hampir pada setiap sampel moluska menggunakan uji DPPH. Hasil pengujian memiliki aktivitas antioksidan yang cukup signifikan. DPPH sendiri hanya larut dalam pelarut organik seperti methanol dan etil asetat, juga digunakan untuk pengujian antioksidan yang bersifat polar, hal ini sesuai digunakan untuk pengujian sampel yang bersifat polar (Pyrzynska dan Pekal, 2013; Nurjanah *et al.*, 2011). Penggunaan metode DPPH hampir selalu digunakan pada semua sampel. Contohnya terdapat pada sampel *hyaluronic acid Amassium pleuronectus* (Kanchana *et al.*, 2013).

Metode pengujian yang bersifat cepat, mudah, reversibel dan hanya membutuhkan spektrofotometer sebagai alasan banyaknya penggunaan DPPH untuk pengujian. Namun, terdapat beberapa kelemahan pada metode pengujian DPPH yaitu: peka terhadap cahaya, mudah terkoagulasi, pada beberapa jenis antioksidan reaksi berjalan lambat, tidak cocok untuk uji aktivitas antioksidan dalam plasma. Hal ini yang menyebabkan beberapa hasil pengujian DPPH tidak lebih tinggi, jika dibandingkan dengan pengujian aktivitas antioksidan pada HO radical scavenging (Kedare dan Singh, 2011; Lopez-Alarcon dan Denicola, 2012; Mishra *et al.*, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Karadag *et al.*, 2009; Fitriana *et al.*, 2015).

1.3 Hiperkolesterolemia

Peroksidasi lipid adalah suatu reaksi rusaknya proses oksidasi akibat adanya radikal bebas dan di bawah kondisi stres oksidatif pada membran sel, lipoprotein, dan struktur sel lainnya yang mengandung lipid. Modifikasi peroksidasi pada fosfolipid tak jenuh, glikolipid, dan kolesterol dapat terjadi dalam reaksi yang dipicu oleh jenis radikal bebas seperti radikal oksil, radikal peroksi, dan radikal hidroksil sebagai hasil reaksi dari Fe^{2+} , dan peroksi hidrogen atau jenis nonradikal seperti oksigen tunggal, ozon, dan peroksinitrit yang dihasilkan oleh reaksi superoksida dengan oksida nitrit (Girotti 1998).

Peroksidasi lipid lebih luas diamati dalam reaksinya dengan radikal bebas. *Polyunsaturated fatty acids* (PUFAs) paling rentan mengalami peroksidasi dan sekali proses tersebut dimulai, akan terjadi 3 rangkaian reaksi yang meliputi inisiasi, propagasi, dan terminasi (Murray *et al.* 1997). Inisiasi adalah tahap pembentukan awal radikal-radikal bebas. Energi untuk reaksi ini diberikan oleh cahaya ultraviolet dengan reaksi sebagai berikut:



Reaksi propagasi merupakan tahap perkembangbiakan radikal bebas baru dalam suatu reaksi rantai dan reaksinya adalah sebagai berikut:



Reaksi terakhir adalah terminasi yang merupakan tahap reaksi yang dapat mengubah radikal bebas menjadi senyawa stabil dan tidak reaktif sehingga dapat mengakhiri reaksi propagasi radikal bebas. Reaksinya adalah sebagai berikut:



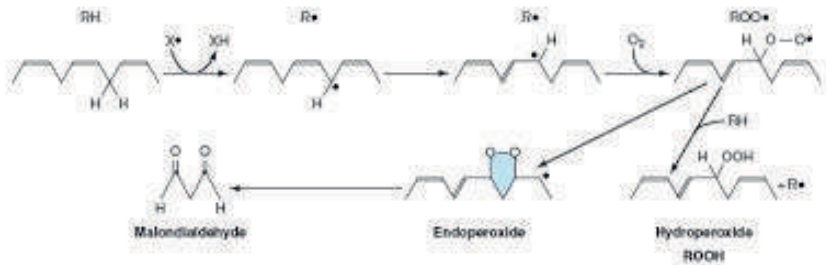


Prekursor molekuler untuk memulai proses ini umumnya berupa produk hidroperoksida ROOH, maka peroksida lipid merupakan rangkaian reaksi bercabang dengan berbagai efek yang memiliki potensi untuk merusak.

Inisiasi pada peroksidasi lipid disebabkan oleh penyerangan beberapa jenis radikal yang cukup reaktif ke suatu atom hidrogen pada grup metil (-CH₂-) PUFA. Suatu atom hidrogen adalah suatu radikal bebas dengan elektron tunggal yang tidak berpasangan, lalu dipindahkan ke suatu elektron tanpa pasangan pada atom karbon (-CH-). Radikal karbon distabilkan oleh pengaturan ulang ikatan rangkap untuk membentuk diena konjugasi, diikuti oleh reaksi dengan oksigen untuk memberi suatu radikal peroksi lipid (ROO·). Selanjutnya radikal peroksi dapat memisahkan suatu atom hidrogen dari rantai asam lemak yang berdekatan untuk membentuk hidroperoksi lipid, tapi dapat juga bergabung dengan protein membran yang lain. Ketika radikal peroksil memisahkan atom hidrogen dari molekul asam lemak lain, radikal karbon lain dapat bereaksi dengan oksigen untuk membentuk radikal peroksil lagi sehingga propagasi pada rangkaian reaksi peroksidasi lipid dapat berlanjut terus. Oleh karena itu, radikal substrat tunggal dapat menghasilkan konversi rantai asam lemak ke peroksidasi lipid. Perpanjangan rantai propagasi sebelum terminasi bergantung pada beberapa faktor, yaitu konsentrasi oksigen dan sejumlah antioksidan yang dapat memutuskan rantai (Gutteridge 1995).

Hasil peroksidasi lipid dalam dekomposisi hidroperoksida lipid menjadi radikal alkoksil lipid dan reaksi *cleavage*-β pada radikal alkoksi menghasilkan sejumlah aldehid yang berbeda. Oksidasi asam lemak menghasilkan aldehid jenuh dan tak jenuh. Heksanal adalah aldehid

jenuh selama oksidasi LDL *in vitro*, sementara malondialdehida (MDA) dan 4-hidroksinonenal (HNE) termasuk aldehida tak jenuh. Aldehida dibentuk selama oksidasi sejumlah asam lemak dalam LDL. Hexanal dan HNE derivat dari oksidasi asam linoleat dan asam arakidonat, sementara asam arakidonat adalah sumber terbesar MDA. Secara umum MDA mengandung lebih dari 3 ikatan rangkap (Estebauer *et al.* 1992).

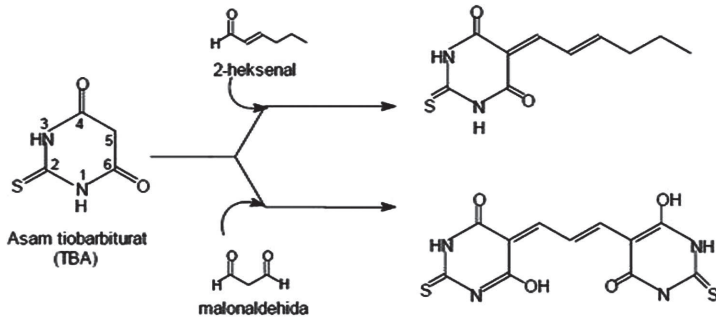


Gambar 1.1 Reaksi Peroksida lipid

Sumber: Murray *et al.*, 1997

Kadar peroksida lipid dapat diukur dengan metode TBARS berdasarkan reaksi asam tiobarbiturat (TBA) dengan malondialdehid (MDA) sebagai produknya. TBA akan bereaksi dengan gugus karbonil dari MDA, yaitu satu molekul MDA akan berikatan dengan dua molekul TBA (Halliwell & Gutteridge 1999).

Membran-membran mikrosom hati menjalani peroksidasi lipid secara enzimatis. Peroksidasi lipid yang bergantung pada NADPH atau NADH yang berperan sebagai reduktor yang akan mereduksi Fe³⁺ menjadi Fe²⁺. Proses reduksi ini dikarenakan Fe²⁺ akan menstimulasi peroksidasi lipid karena memiliki kecepatan reaksi yang lebih besar, serta adanya reaktivitas yang tinggi dari radikal alkoksi (RO•) yang dihasilkan (Halliwell & Gutteridge 1999).



Gambar 1.2 Reaksi TBA dengan 2-heksenal dan dengan malonaldehida

Sumber: Guzman-Chiza, dkk., 1998

Membran mikrosomal hati rentan terhadap peroksidasi lipid karena banyaknya kandungan PUFA pada membran ini dan akan menyebabkan perubahan kekentalan pada membran. Produksi MDA saat peroksidasi lipid tersebut pada membran mikrosomal bervariasi pada tipe jaringan yang berbeda. Variasi ini disebabkan oleh jumlah PUFA yang tidak sama (St. Angelo 1992).

Kadar lipid peroksidasi yang berlebih pada darah maupun organ dapat mengakibatkan berbagai penyakit degeneratif. Bila kadar peroksidasi lipid di hati meningkat, peroksidasi lipid ini keluar dari hati menuju pembuluh darah, dan akan merusak organ atau jaringan lain. Pada manusia, lipid peroksidasi akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia, tetapi jumlahnya tidak boleh melebihi kadar normalnya, yaitu 4 nmol/ml (Yagi, 1994).

Penambahan kolesterol 1% pada pakan, selain meningkatkan kolesterol plasma juga dapat meningkatkan kadar kolesterol hati. Kolesterol makanan membutuhkan waktu beberapa hari untuk mengimbangi kolesterol dalam plasma dan beberapa minggu untuk mengimbangi kolesterol dalam jaringan. Pergantian kolesterol dalam

hati berlangsung relatif cepat bila dibandingkan waktu paruh-total kolesterol tubuh yang lamanya beberapa minggu. Kolesterol dalam plasma dan hati akan seimbang dalam waktu beberapa jam saja. Kenaikan kolesterol plasma menunjukkan suatu kelainan metabolisme sebagai hasil dari kegagalan untuk memindahkan lipoprotein dari darah, produksi lipoprotein yang berlebihan atau kombinasi dari keduanya (Gurr 1992; Wresdiyati *et al.* 2006a).

Pemakaian kolesterol dalam jumlah banyak pada tubuh berfungsi untuk membentuk asam kolat yang merupakan dasar dari asam empedu yang disintesis dalam hati. Reaksi γ -hidroksilasi terhadap kolesterol merupakan tahap pertama dalam biosintesis asam empedu. Reaksi tersebut dikatalisis oleh γ -hidroksilase, suatu enzim yang mikrosomal, yang memerlukan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450 oksidase. Dengan semakin meningkatnya konsentrasi kolesterol plasma dalam tubuh pada kondisi hiperkolesterolemia maka semakin banyak asam empedu yang disintesis dan terjadi pemakaian lebih banyak oksigen dan NADPH, serta peningkatan aktivitas sitokrom P-450 oksidase (Mayes 1996; Wresdiyati *et al.* 2006a). Peningkatan aktivitas sitokrom P-450 oksidase akan menghasilkan radikal bebas yang berlebihan, di antaranya radikal anion superoksida O_2^- (Dhaunsi *et al.* 1992).

Kondisi hiperkolesterolemia biasanya diikuti dengan tingginya kadar LDL, yang membawa sekitar 65-75% kolesterol dari hati ke jaringan perifer. Metabolisme LDL diawali dengan terikatnya partikel LDL pada reseptor spesifik apo B-100/E, yang terletak pada permukaan sel. Reseptor LDL bereaksi dengan ligan pada LDL dan LDL diambil dalam keadaan utuh melalui endositosis. Setelah melepaskan LDL, reseptor kembali ke permukaan sel. Lipoprotein berkepadatan rendah yang terpisah masuk ke dalam lisosom. Di dalam lisosom komponen protein LDL dihidrolisis oleh protease lisosom menjadi asam amino

dan komponen ester kolesterolnya dihidrolisis menjadi kolesterol bebas dan asam lemak oleh kolesterol esterase.

Asam lemak, yang juga dihasilkan dari proses hidrolisis ester kolesterol komponen LDL, di dalam semua sel tubuh termasuk sel-sel tubuli renalis akan dioksidasi oleh β -oksidasi di peroksisom. Pada kondisi normal β -oksidasi di peroksisom hanya merupakan jalur minor untuk mengoksidasi asam lemak. Namun dalam kondisi kelaparan, diabetes, dan diet tinggi lemak, jalur ini meningkat. Meningkatnya β -oksidasi akan meningkatkan pula jumlah radikal bebas sebagai hasil sampingnya (Orellana *et al.* 1992; Wresdiyati *et al.* 2006b).

Radikal bebas adalah sebuah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital kulit terluarnya. Radikal bebas dapat terbentuk melalui dua cara, yaitu secara endogen, sebagai respon normal dari rantai biokimia dalam tubuh dan secara eksogen dari polusi yang didapat dari lingkungan dan bereaksi di dalam tubuh melalui pernapasan, pencernaan, dan penyerapan.

Radikal bebas di dalam tubuh memiliki peranan ganda, dapat menguntungkan tetapi dapat pula merugikan. Keuntungan yang diberikan radikal bebas, yaitu memegang peranan penting bagi proses fagositosis, transpor elektron, dan transduksi signal. Namun, bila jumlah radikal bebas meningkat dapat menyebabkan berbagai penyakit di antaranya tumor, penyakit jantung, dan penuaan dini.

Senyawa radikal bersifat reaktif dan tidak stabil sehingga mampu menarik elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya. Hal ini menyebabkan radikal bebas akan merusak komponen penyusun membran (asam lemak tak jenuh) dan menyebabkan kerusakan lebih lanjut pada organel sel dan DNA. Kerusakan pada tingkat sel berakibat munculnya penyakit degeneratif seperti katarak, gangguan sistem imun, tumor, dan penuaan dini (Noguchi & Niki 1999).

Materi biologis radikal bebas diproduksi melalui reaksi oksidasi xantin, *lipoxigenase cyclo oxygenase*, aktivitas quinon, dan reaksi rantai elektron. Contoh radikal bebas antara lain adalah radikal hidroksil (OH), radikal superoksida ($O_2\cdot$), oksida nitrit (NO), lipid peroksil (LOO), sedangkan yang termasuk nonradikal adalah hidrogen peroksida (H_2O_2), oksigen tunggal ($\cdot O_2$), lipid hidroperoksida (LOOH), asam hipoklorit (HOCl), peroksida hidrogen (H_2O_2), ozon (O_3), radikal thiyyl, dan radikal karbon (Noguchi & Nikki 1999; Droge 2002).

Radikal superoksida ($O_2\cdot$) terbentuk melalui beberapa cara, antara lain ialah reaksi yang dikatalisis oleh NADH/NADPH oksidase dan enzim xantin oksidase. Akan tetapi, superoksida dengan mudah meningkat ketika ada komponen eksogen. Superoksidasi pertama kali dihasilkan dalam membran internal mitokondria (ubiquinin NADH reduktase dan sitokrom c ubiquinon reduktase). Jenis ini direduksi dan membentuk peroksida hidrogen (H_2O_2). Hasil radikal superoksida pada tingkat membran (NADPH oksidase) dalam sel diawali dengan berfungsinya fagosit (makrofag) (Droge 2002).

Peroksida hidrogen (H_2O_2) dihasilkan dalam reaksi berenzim. Enzim-enzim tersebut berlokasi dalam mikrosom, peroksisom, dan mitokondria. Dalam sel hewan dan tanaman, superoksida dismutase menghasilkan H_2O_2 oleh dismutasi O_2 kemudian berperan dalam reaksi-reaksi oksidatif. H_2O_2 juga dapat berdifusi dengan mudah melewati membran sel (Rice-Evan & Anthony 1991).

Radikal hidroksil ($\cdot OH$) dihasilkan dari hasil reaksi Fe^{2+} dan Cu dengan H_2O_2 dan merupakan jenis yang paling reaktif



Dekomposisi Fe^{2+} pada peroksida oksigen, merupakan reaksi yang umum dalam sistem biologi dan sebagai sumber berbagai kerusakan

dari hasil peroksidasi lipid. Reaksi lainnya meliputi mieloperoksidase dan ion Cl⁻ yang berperan penting dalam proses produksi OH dalam neutrofil selama fagositosis (Rice-Evan & Anthony 1991).

Ketidakeimbangan antara radikal bebas (oksidan) dan peroksidasi lipid pada satu bagian dan aktivitas sistem antioksidan (enzimatis dan nonenzimatis) pada bagian lain disebut stress oksidatif. Ketidakeimbangan ini terjadi akibat berkurangnya antioksidan endogen, rendahnya masukan antioksidan dari diet, meningkatnya bentuk radikal bebas, dan jenis reaktif lainnya. Stres oksidatif dapat menimbulkan perkembangan dan komplikasi berbagai penyakit meliputi diabetes, aterosklerosis, neoplasma, inflamasi, hipertensi, dan lain-lain (Szczechowska *et al.* 1998).

1.4 Atherosklerosis

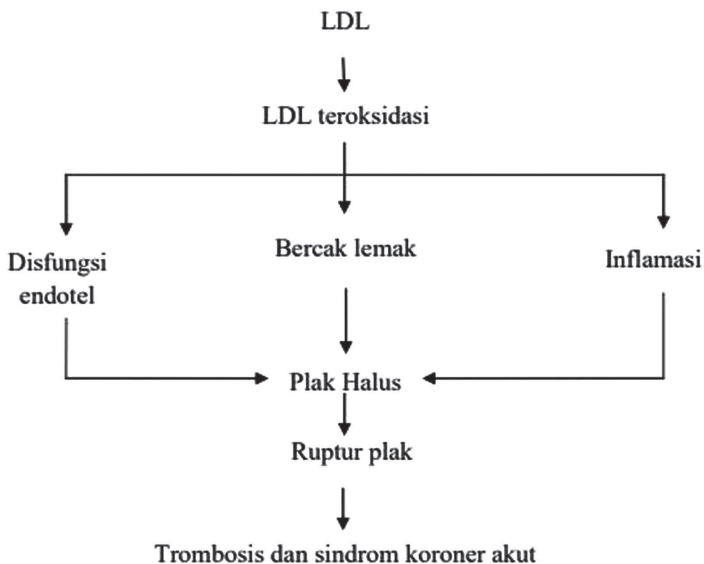
Aterosklerosis adalah suatu penyakit yang ditandai dengan hilangnya elastisitas akibat penebalan dan pengerasan pembuluh darah, terutama arteri, sehingga terjadi penyempitan lumen pembuluh darah dan terbatasnya aliran darah ke seluruh tubuh. Aterosklerosis adalah penebalan lapisan bagian pembuluh darah karena adanya akumulasi plak yang kaya akan lipid pada bagian dalam pembuluh darah arteri (intima) pada tubuh. Penambahan plak terjadi akibat suatu akumulasi kolesterol, ester kolesterol, fosfolipid, kalsium, dan komponen lain yang meliputi kolagen, elastin, dan proteoglikan. Adanya plak tersebut dapat membatasi aliran pada jaringan atau dapat membatasi lumen pada arteri, membatasi aliran darah, elastisitas pembuluh darah, merangsang pembentukan pembekuan darah yang dapat menghambat aliran darah, dan dapat mengakibatkan kerusakan pada jantung, otak, dan jaringan paru-paru yang sifatnya sangat fatal (Marinetti, 1990).

Kerusakan arteri pada aterosklerosis dapat dibagi menjadi 4 tingkatan, yaitu a) tingkat *fatty streak* (garit lemak) mulai terlihat dengan menumpuknya lipid dalam sel pada tunika intima, b) tingkat proliferasi, yaitu terjadinya penumpukan lipid di luar dan di dalam tunika intima, c) tingkat pembentukan jaringan ikat oleh lipid ekstrasel, dan d) tingkat pengerasan jaringan ikat atau kalsifikasi (Marnett 1990).

Proses terjadinya aterosklerosis dapat dilihat pada Gambar 1.3. Proses ini dimulai dengan masuknya LDL ke dalam bagian subendotelium (intima) dan selanjutnya LDL mengalami modifikasi (teroksidasi). Modifikasi LDL akan menstimulasi sel endotel untuk mensekresikan beberapa molekul, yaitu molekul adesi intraseluler, molekul adesi sel (ICAM), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM), *monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), granulosit dan *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF). Molekul-molekul tersebut menyebabkan terjadinya adesi monosit pada endotel yang diikuti dengan kemotaksis ke dalam subendotel dan terjadi aktivasi serta diferensiasi makrofag. Produk dari reaksi ini membuat komponen protein LDL (Apolipoprotein B-100) lebih bermuatan negatif, selanjutnya LDL yang telah teroksidasi sempurna oleh reseptor makrofag membentuk sel busa (Berliner *et al.*, 1995).

Lipoprotein berkepadatan rendah yang telah teroksidasi bersifat sitotoksik pada sel vaskuler, merangsang lipid dan enzim lisosom ke dalam ekstrasel intima, dan akhirnya menghasilkan lesi aterosklerosis. Modifikasi LDL berperan penting dalam pembentukan formasi sel busa dan aterosklerosis. Antara oksidasi LDL dan aterosklerosis memberikan suatu pemikiran yang sederhana dan tepat mengenai manfaat antioksidan pada kejadian penyakit jantung koroner (Diaz *et al.*, 1997). *Native* LDL meliputi hilangnya antioksidan dan asam le-

mak tidak jenuh rangkap, fosfatidil kolin, ester kolesterol dan kelompok amino bebas pada protein apo-B. Selain itu, terjadi peningkatan oksisterol, hidroksil, hidroperoksi asam lemak tidak jenuh rangkap, diena konjugasi, MDA, dan aldehid lainnya, yang dapat mempertinggi mobilitas elektroforetik, fragmentasi, dan konformasi pengaturan ulang protein apo-B pada oksidasi LDL (Yuan dan Brunk 1998).



Gambar 1.3 Peranan LDL dalam Aterosklerosis

Sumber: Rackley dalam Price, 2002

Pada studi aterosklerosis ada dua tipe lesi yang dapat terjadi pada hewan model, yaitu lesi spontan dan lesi induksi. Lesi spontan adalah tipe lesi yang terjadi akibat adanya asosiasi hiperkolesterolemia genetik, sedangkan lesi induksi adalah tipe lesi yang terjadi akibat respons terhadap diet aterogenik. Kelinci merupakan hewan model yang paling sering digunakan dalam penelitian yang berkaitan dengan

pembentukan lesi aterosklerosis, baik secara induksi maupun secara spontan (Amstrong & Heistad, 1990).

Pada kejadian aterosklerosis, pengamatan terhadap kelainan histopatologis hati dan ginjal penting dilakukan karena kedua organ ini sensitif terhadap perubahan yang terjadi pada aterosklerosis tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan pengamatan pada hati dan ginjal. Pengamatan pada hati adalah perlemakan hati, sedangkan pada ginjal yang diamati ialah kelainan glomerulus.

Perlemakan hati atau penimbunan lemak di dalam hati adalah suatu keadaan menumpuknya butiran lemak di dalam sitoplasma sel epitel hati. Perlemakan hati berkaitan dengan pelepasan asam lemak berlebihan dari jaringan adiposa yang mengakibatkan peningkatan permintaan jumlah asam lemak bebas oleh hati. Karena hati tidak dapat menggunakan semua asam lemak, hati menyimpannya sebagai lemak netral. Faktor lainnya antara lain karena keracunan etanol sehingga asam lemak tidak dapat diesterifikasi menjadi trigliserida. Selain itu pada kondisi hipertrigliserida terjadi peningkatan, pembentukan, dan pelepasan trigliserida oleh hati, dan juga pembentukan asetat yang bergabung dengan koenzim membentuk asetil KoA yang mengalami biosintesis menjadi asam lemak. Kejadian ini biasanya ditemukan pada penderita alkoholik (Jones & Hunt, 1983; Price & Wilson, 2006).

Perlemakan hati merupakan penyakit metabolik yang terjadi pada penderita diabetes mellitus, dislipidemia, dan hipertensi. Penyakit metabolik tersebut sangat berkaitan erat dengan kejadian aterosklerosis, yang selanjutnya dapat memicu terjadinya penyakit kardiovaskular (Watanabe *et al.*, 2008).

Pada beberapa penyakit ginjal dan kelainan pada ginjal yang tidak berbahaya, terjadi peningkatan permeabilitas kapiler glome-

rusus dan ditemukan protein dalam urin dalam jumlah besar. Sebagian protein ini berupa albumin dan kelainan ini biasanya disebut mikroalbuminuria (Ganong 1998). Mikroalbuminuria telah digunakan sebagai petanda umum bagi ginjal terhadap kerusakan endotel vaskular dan aterosklerosis awal. Menurut Mann *et al.* (2008) terdapat hubungan antara mikroalbuminuria dengan disfungsi endotelia, *stress* oksidatif, dislipidemia, dan kejadian aterosklerosis.

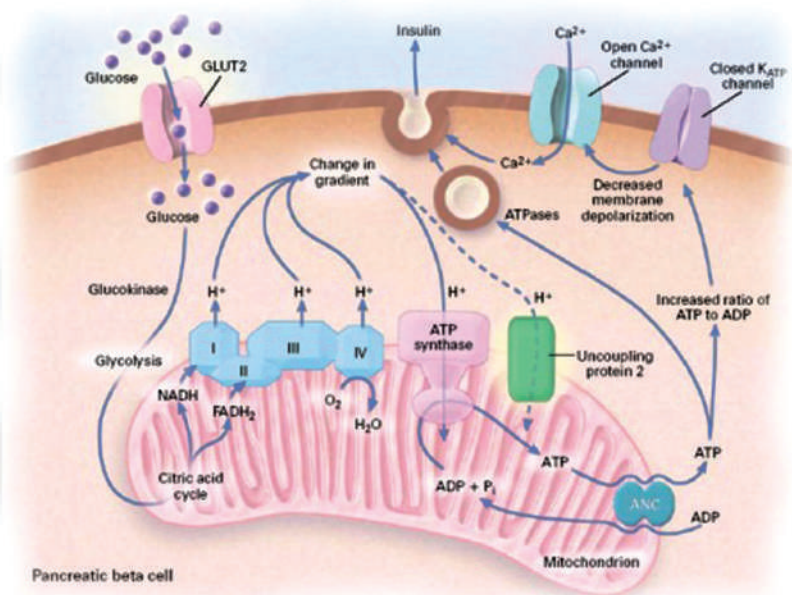
1.5 Diabetes Melitus

Penyakit degeneratif ini merupakan penyakit nomor satu di Asia Tenggara. Berdasarkan data WHO tahun 2008, angka kematian di Asia Tenggara sekitar 14,5 juta, sekitar 55% (7,9 juta) disebabkan oleh penyakit degeneratif. Angka kematian akibat penyakit ini diprediksi akan meningkat 21% pada tahun 2018 (WHO, 2011). Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Radikal bebas bersifat tidak stabil dan sangat reaktif yakni cenderung bereaksi dengan molekul lainnya untuk mencapai kestabilan. Radikal dengan kereaktifan yang tinggi ini dapat memulai sebuah reaksi berantai dalam sekali pembentukannya sehingga menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh. (Badarinath *et al.*, 2010). Diabetes Mellitus merupakan penyakit kronis yang kompleks ditandai kadar glukosa darah yang tinggi dan disebabkan karena defisiensi sekresi insulin atau aktivitasnya atau kedua-duanya. Keadaan hiperglikemia yang kronis akan membawa pasien ke komplikasi makro dan mikrovaskular. Bila ini terjadi maka akan terjadi peningkatan risiko penyakit-penyakit kardiovaskular, serta penyulit lainnya. Diabetes mellitus yang muncul di usia muda yang ditandai dengan kerusakan sel beta pankreas disebut *Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (IDDM) atau Diabetes Mellitus tipe 1, sedangkan diabetes mellitus yang muncul di usia dewasa yang terjadi karena in-

sensitivitas insulin disebut *Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus* (NIDDM) atau Diabetes Mellitus Tipe 2 (DMT2). Pendekatan terhadap DM selalu diawali dengan pengobatan non-farmakoterapi antara lain pengaturan diet, pengelolaan berat badan bila pasien memiliki berat badan berlebih atau sampai obesitas, sedangkan pengobatan dengan obat saat ini di berbagai negara dianjurkan untuk memulainya dengan metformin. Bila tidak berhasil maka diberikan obat-obat tambahan kedua bahkan ketiga. Hasil dari diabetes ditentukan, untuk sebagian besar, oleh kepatuhan pasien terhadap pengobatan dan perubahan gaya hidup, dan mempertahankan kepatuhan terhadap obat antidiabetes oral telah menjadi salah satu langkah penting dalam mencapai kontrol glikemik jangka panjang. Pengelolaan diabetes tanpa efek samping masih menjadi tantangan bagi sistem medis. Meningkatnya minat orang-orang pada penelitian antioksidan pada tanaman karena kemungkinan penggunaannya sebagai aditif alami untuk menggantikan yang sintesis.

Sejumlah penelitian telah melaporkan kegunaan senyawa fenolik dalam menunjukkan aktivitas biologis potensial seperti antioksidan, antidiabetes, antimikroba dan antikanker (S. Kumar, A.K. Pandey, 2013). Senyawa fenolik dari beberapa sumber tanaman telah terbukti menghambat aktivitas amilase dan α -glukosidase dan memungkinkan kontrol kadar glukosa darah yang lebih baik. Pengelolaan diabetes tanpa efek samping masih menjadi tantangan bagi sistem medis (Kameswara Rao B, Kesavulu MM, Apparao C., 2003). Diabetes melitus adalah penyakit kronis yang disebabkan oleh defisiensi produksi insulin oleh pankreas yang diwariskan dan/atau didapat, atau oleh ketidakefektifan produksi insulin. Kekurangan seperti itu mengakibatkan peningkatan konsentrasi glukosa dalam darah, yang pada gilirannya merusak banyak sistem tubuh, khususnya pembuluh darah dan saraf.

Obat-obatan herbal banyak diresepkan karena efektivitasnya, efek samping yang rendah dan biaya yang relatif rendah. Banyaknya senyawa bioaktif yang berasal dari tumbuh-tumbuhan berpotensi untuk membentuk aktivitas antidiabetes. Daun teh hijau, kuning dan hitam umumnya kaya akan senyawa fenolik (M. Kopjar, M. Tadic, 2015).



Gambar 1.4 Pelepasan Insulin dari Sel Beta Pankreas

Sumber: <https://dadanghusori.wordpress.com/2009/12/26/pelepasan-insulin-dari-sel-beta-pankreas/>

Diabetes melitus merupakan penyakit yang disebabkan oleh adanya kekurangan insulin secara relatif maupun absolut. Defisiensi insulin dapat terjadi melalui 3 jalan, yaitu: a. Rusaknya sel-sel B pankreas karena pengaruh dari luar (virus, zat kimia, dan lain-lain) b. Desensitasi atau penurunan reseptor glukosa pada kelenjar pankreas c. Desensitasi atau kerusakan reseptor insulin di jaringan perifer.

Pelepasan insulin diregulasi oleh adanya glukosa, keberadaan asam amino dan beberapa hormon gastrointestinal (glukagon, sekretin, gastrin, *glucose-dependent insulin-releasing peptide*/GIP, dan *cholecystinin*/CCK). Secara molekuler prose pelepasan insulin dari sel beta pankreas diawali uptake glukosa oleh sel beta pankreas yang dimediasi oleh glukosa transporter GLUT2. Kemudian glukosa akan mengalami glikolisis dan *citric acid cycle* dengan bantuan enzim glukokinase, sehingga melepaskan NADH dan FADH₂ di dalam mitokondria, yang akan mendonorkan elektronnya pada *mitochondrial electrone-transport chain*.

Tahap selanjutnya akan terjadi pengeluaran proton oleh kompleks I, III, dan IV yang akan menyebabkan perubahan gradien elektrokimia pada sel beta pankreas. Perubahan gradien yang terlalu tinggi akan memicu pemasukan kembali proton ke dalam mitokondria melalui ATP sintetase dan uncoupling protein 2. Jalur ATP sintetase akan menyebabkan diproduksi ATP dengan adanya ADP dan fosfat inorganik, sedangkan jalur *uncoupling* protein 2 akan menghasikan pelepasan energi berupa panas. Peningkatan ATP dan ADP akan menghambat *ATP-sensitive K⁺ channel* sehingga kanal akan tertutup dan terjadi depolarisasi dari membran plasma. Depolarisasi membran mengakibatkan terbukanya kanal Ca²⁺, sehingga terjadi transport Ca²⁺ dari luar sel ke dalam sel (peningkatan kadar Ca²⁺ intraseluler). Pada akhirnya konsentrasi Ca²⁺ intrasel yang tinggi akan memicu *release* insulin dari sel beta pankreas. Golongan obat antidiabetes oral sulfonilurea memiliki mekanisme kerja pada jalur ini, yaitu dengan hambatan secara langsung pada kanal K⁺ sensitif ATP.

BAB 2

TANAMAN CENGKEH

2.1 Diskripsi Tanaman Cengkeh

Nama latin dari cengkeh adalah *Eugenia aromatica* O.K. atau *E. caryophyllata* THUNB, *Caryophyllus aromaticus* L., *Jambosa caryophyllus* SPRENG, *Syzigium aromaticus* (L) MERRIL (Guzman & Siemonsma 1999). Menurut Tjitrosoepomo (1994), klasifikasi tanaman Cengkeh sebagai berikut:

- Kingdom : *Plantae*
- Divisi : *Spermatophyta*
- Subdivisi : *Angiospermae*
- Klas : *Dicotyledoneae*
- Ordo : *Myrtales*
- Familia : *Myrtaceae*
- Genus : *Eugenia*
- Spesies : *Eugenia Aromatica O.K*

Pohon cengkeh mencapai tinggi 20-30 meter dan dapat mencapai umur lebih dari seratus tahun. Daunnya tunggal bangun kerucut

(Gambar 2.1), atau bulat telur atau memanjang dengan pangkal yang tajam, kaku, warna hijau kekuning-kuningan (hijau muda) dengan sisi atas yang mengkilap, berbintik-bintik karena adanya kelenjer-kelenjer minyak. Bunga berbilangan 4, berwarna merah jambu tersusun dalam tandan atau malai rata yang keluar dari ketiak-ketiak daun atau ujung-ujung cabang. Kelopak berbentuk mangkuk yang menyelubungi bakal buah, dengan tajuk-tajuk berbentuk segi tiga atau bulat telur. Mahkota bulat, kemerah-merahan, lekas gugur. Buah berupa buah buni yang memanjang atau bulat telur terbalik (Tjitrosoepomo, 1994).

Kuncup-kuncup bunga dari pohon tersebut diambil sebelum mekar, kemudian dikeringkan. Bahan yang telah kering itulah yang kita kenal sebagai cengkeh. Bahan tersebut mengandung 14-20% minyak atsiri yang terutama terdiri atas suatu derivat fenol yang terdiri atas eugenol ($C_{18}H_{12}O_3$, asetil eugenol, kariofilen, eugenin (isomer eugenol), kariofilin, vanilin, asam galotanin (13%), dan lain-lain (Tjitrosoepomo, 1994).



Gambar 2.1 *Eugenia aromatica* O.K

Dengan penyulingan uap, bahan ini menghasilkan minyak atsiri yang disebut *oleum caryophylli*, yang tidak kurang dari 8% volume persen terdiri atas eugenol, yang digunakan sebagai anestetikum lokal pada sakit gigi, karminatif, germisida, dan pemberi aroma pada makanan (Tjitrosoepomo, 1994).

Bila dilihat dari faktor protektif yang telah diuji, maka cengkeh mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi (Fardiaz *et al.* 1992). Tingginya aktivitas antioksidan cengkeh ini diduga karena cengkeh mempunyai kadar asam lemak yang tidak jenuh yang tinggi sehingga membentuk antioksidan alami untuk melindunginya. Kadar asam lemak linoleat, linolenat, dan eikosa tetraenoat dari cengkeh masing-masing adalah sebesar 6.01%, 8.5%, dan 12.13%. Diperkirakan senyawa yang bertanggung jawab atas besarnya aktivitas antioksidan cengkeh adalah eugenol (Chipault 1966 diacu dalam Fardiaz *et al.*, 1992).

2.2 Kandungan Senyawa Aktif Tanaman Cengkeh

Eugenol adalah salah satu komponen yang terdapat dalam minyak cengkeh yang kadarnya antara 83-95%. Eugenol dapat diisolasi dari minyak cengkeh yang berasal dari bunga, tangkai, dan daun cengkeh. dengan rata-rata hasil sebagai berikut bunga cengkeh 17% (eugenol 93%), tangkai cengkeh 6% minyak (eugenol 83%), dan daun cengkeh menghasilkan minyak 2% (eugenol 70%-80%) (Farrel 1985; Nurdin *et al.* 1997). Berdasarkan data di atas disimpulkan bahwa sumber minyak cengkeh dari daunlah yang paling murah dan ekonomis (Nurjannah *et al.* 1997; Nurdin *et al.* 2001). Komponen utama dari minyak cengkeh adalah eugenol (80-95%), eugenil asetat (1-5%), dan α -kariofilin (4-125). Minyak cengkeh yang berasal dari Indonesia mengandung 79% eugenol, 1,9% humulen, dan 18% kariofilin (Guzman & Siemonsma 1999; Purseglove *et al.* 1981).

Minyak daun cengkeh yang berasal dari cengkeh Zanzibar memiliki kadar eugenol paling tinggi dibandingkan dengan daun yang masih menempel pada pohon. Tipe cengkeh yang lain, seperti tipe cengkeh Ambon, Sikotok, dan Hutan memiliki kadar eugenol yang lebih rendah dibanding tipe Zanzibar walaupun tipe Zanzibar, memiliki kadar eugenol yang tidak berbeda nyata dari Sikotok dan Ambon, yaitu berkisar antara 4.59-4.71% (Nurdjanah & Mariska, 1988).

Eugenol terutama digunakan untuk obat sakit gigi, bahan dasar menambal gigi yang berlubang, pasta gigi, sabun, deterjen, farmasetik, bakterisida, dan nematisida (Nurjannah *et al.* 1997). Eugenol banyak digunakan sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan, dan antikarsinogen. Umumnya minyak cengkeh yang berasal dari daun cengkeh diekstraksi untuk mendapatkan eugenol dan kariofilin, tapi tidak cocok untuk penambah cita rasa pada makanan karena tidak menghasilkan rasa cengkeh yang khas (Teissedre & Waterhouse, 2000; Guzman & Siemonsma, 1999).

Beberapa hasil penelitian telah melaporkan bahwa eugenol dapat berfungsi sebagai antioksidan dalam menghambat lipid peroksidasi pada reaksi inisiasi dan propagasi pada rangkaian rantai radikal bebas yang kerjanya mirip dengan α -tokoferol (Ogata *et al.* 2000). Selain itu juga efek eugenol dan vitamin E sebagai antioksidan mirip dengan antioksidan standar (*butylated toluene*) dalam menghambat oksidasi LDL dan VLDL (Teissedre & Waterhouse 2000; Rajalakshmi *et al.*, 2000).

Eugenol 0.17% dapat menurunkan inflamasi dan berperan penting dalam aktivitas farmasetika yang digunakan untuk aromaterapi (Reddy & Lokesh 1994). Selain itu, eugenol juga dapat menghambat oksidasi LDL secara *in vitro*, dapat menekan kerusakan DNA, dan menurunkan formasi $\bullet\text{O}_2$ dan $\bullet\text{OH}$ dibandingkan teh hitam dan teh hijau (Teissedre & Waterhouse 2000; Feng *et al.*, 2000).

Vitamin E tampaknya merupakan baris pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam fosfolipid membran seluler dan subseluler. Tokoferol bertindak sebagai antioksidan dengan memutuskan berbagai reaksi rantai radikal bebas sebagai akibat dari kemampuannya untuk memindahkan hidrogen fenolat kepada radikal bebas peroksil dari asam lemak tak jenuh ganda yang telah mengalami peroksidasi (Murray *et al.* 1997).

Pemberian eugenol pada usus dengan dosis 1000 mg/kg BB/hari secara oral dapat mempengaruhi kadar lipid peroksida, aktivitas glutathion peroksidase, glutathion reduktase, superoksidase, dan katalase, selain itu eugenol tersebut bersifat antitoksik, protektif, menginduksi glutathion-S-transferase, dan membantu mengeluarkan racun dari usus. Kerja antiaflatoksigenik pada eugenol berkaitan dengan penghambatan biosintesis aflatoksin yang meliputi lipid peroksidasi dan oksigenasi (Vidhya & Devaraj, 1999; Jayashree & Subramanyam, 1999).

2.3 Ekstraksi Daun Cengkeh

Ekstraksi antioksidan alami yang terdapat di dalam cengkeh dilakukan dengan menggunakan metanol yang bertujuan untuk memperoleh komponen-komponen antioksidan yang larut dalam metanol terutama komponen fenol karena diduga komponen fenol yang berfungsi sebagai antioksidan pada cengkeh. Selain itu, antioksidan dari rempah-rempah sebagian besar lebih aktif bila terdapat dalam pelarut metanol dibandingkan dengan pelarut organik lainnya (Fardiaz *et al.* 1992). Metanol merupakan pelarut organik yang bersifat polar. Dengan menggunakan pelarut yang polar diharapkan dapat dihasilkan komponen antioksidan yang lebih banyak.

Antioksidan alami dari rempah-rempah tidak hanya menunjukkan aktivitas di dalam bentuk ekstrak tetapi juga dalam bentuk aslinya. Jenis rempah-rempahan seperti kunyit, bawang putih, jahe, lengkuas, cengkeh dapat menunjukkan aktivitas antioksidan tanpa mengekstraksi komponen aktifnya terlebih dahulu sudah dapat menunjukkan aktivitas antioksidasi. Cengkeh memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (Fardiaz *et al.*, 1992).

2.3.1 Rendemen dan Total Fenol Ekstrak Daun Cengkeh

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik. Senyawa fenolik ini bersifat multifungsi dan berperan sebagai antioksidan karena mempunyai kemampuan sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengikat logam, atau pengubah oksigen singlet menjadi bentuk triplet (Croft 1999; Estiasih & Andiyas, 2006). Senyawa fenol adalah senyawa organik yang memiliki minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenol dapat berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam menstabilkan radikal bebas, yaitu dengan memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal bebas (Kotamballi *et al.* 2002). Berdasarkan hal tersebut, maka kadar total fenol dari ekstrak daun cengkeh pada penelitian ini diukur dan akan dikorelasikan dengan aktivitas antioksidan.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada perbedaan kemampuan masing-masing dari ketiga jenis pelarut dalam mengekstrak fenol daun cengkeh (Tabel 2.1). Kadar total fenol ekstrak daun cengkeh dengan pelarut metanol menunjukkan paling tinggi (63.14 ± 1.86 mg/ml) dibanding dengan pelarut etanol (56.58 ± 3.80 mg/ml) maupun pelarut akuades (32.42 ± 3.86 mg/ml). Hal ini menunjukkan bahwa pelarut metanol memiliki kemampuan untuk melarutkan komponen fenol lebih besar dibanding etanol dan akuades. Demikian pula dari hasil rendemennya yang tersaji pada Tabel 2.1 menunjukkan bahwa pelarut metanol dapat menghasilkan rendemen lebih besar dibanding pelarut akuades dan etanol.

Tingginya total fenol dalam pelarut metanol disebabkan metanol merupakan pelarut polar, sedangkan etanol adalah pelarut semipolar dan akuades adalah pelarut polar dan nonlipofilik. Metanol merupakan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak senyawa fenol (Przybylski *et al.* 2001). Fenol bersifat polar dan memiliki kelarutan paling tinggi

dalam pelarut polar. Pelarut yang bersifat polar mampu melarutkan fenol lebih baik sehingga kadarnya dalam ekstrak menjadi tinggi. Hasil ekstrak senyawa fenol meningkat seiring dengan bertambahnya polaritas pelarut (Trevor, 1995; Widyawati, 2005).

Tabel 2.1 Perolehan Sediaan Rendemen dan Total Fenol pada Daun Cengkeh dengan Menggunakan Pelarut Akuades, Metanol, dan Etanol

Pelarut	Total Fenol (mg/ml)	Rendemen (%)
Akuades	32.42±1.72 ^a	6.22
Metanol	63.14±2.28 ^b	35.35
Etanol	56.58±3.80 ^{ab}	23.48

Keterangan: Huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan nyata (P < 0.05)

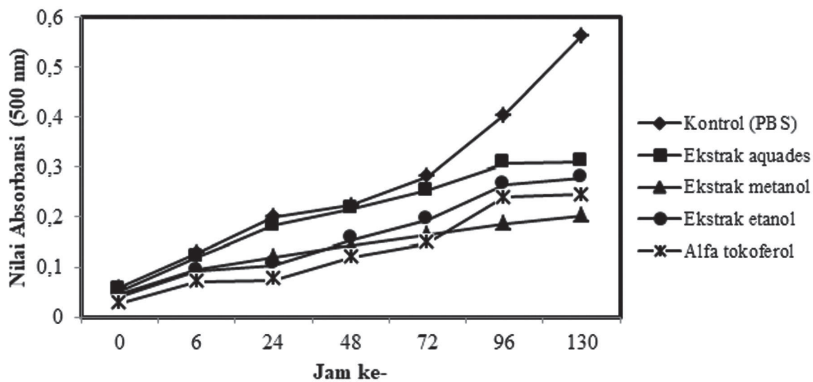
2.3.2 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cengkeh

Pengukuran aktivitas antioksidan pada percobaan ini didasarkan pada metode tiosianat. Metode tiosianat adalah suatu mekanisme pengukuran aktivitas antioksidan dalam menghambat terbentuknya senyawa-senyawa radikal yang bersifat reaktif. Aktivitas antioksidan didasarkan pada kemampuannya dalam menghentikan oksidasi asam linoleat yang akan membentuk radikal peroksida. Selanjutnya, radikal peroksida mengoksidasi Fe²⁺ menjadi Fe³⁺ dan menghasilkan warna merah. Semakin tinggi radikal peroksil semakin banyak terbentuk Fe³⁺ sehingga warna merah yang terbentuk semakin tua dan semakin tinggi nilai absorbansinya. Jika intensitas warna merah rendah, nilai absorbansinya kecil. Nilai absorbansi yang kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi yang besar menunjukkan aktivitas antioksidannya rendah.

Ekstrak metanol daun cengkeh menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi dibanding ekstrak etanol, akuades, α -tokoferol,

dan kontrol. Sebaliknya, aktivitas antioksidan paling rendah adalah kontrol. Nilai absorbansi antioksidan pada jam ke-130 dari ekstrak metanol dan etanol daun cengkeh, serta α -tokoferol belum mencapai 0.30, sedangkan ekstrak akuades daun cengkeh sudah mencapai absorbansi 0.30 dan kontrol (PBS) telah melewati nilai absorbansi 0.30. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol, etanol, dan α -tokoferol menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding ekstrak akuades dan kontrol. Ekstrak akuades menunjukkan aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding kontrol (Gambar 2.2).

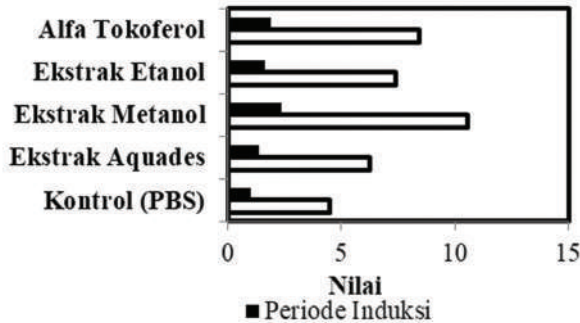
Analisis ragam menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan yang dinyatakan dalam periode induksi dan faktor protektif dari kelima sampel (kontrol, α -tokoferol, ekstrak akuades, metanol, dan etanol daun cengkeh) berbeda nyata ($P < 0.05$). Faktor protektif dalam penelitian ini dinyatakan sebagai perbandingan antara periode induksi sampel (jam) dan periode induksi kontrol (jam).



Gambar 2.2 Nilai absorbansi kontrol (PBS), α -tokoferol, dan ekstrak daun cengkeh dengan pelarut akuades, metanol, dan etanol

Nilai faktor protektif dan periode induksi tersaji pada Gambar 2.3 dan terlihat bahwa nilai faktor protektif dan periode induksi ter-

tinggi pada ekstrak metanol daun cengkeh dibanding α -tokoferol, kontrol (PBS), ekstrak etanol daun cengkeh, dan ekstrak akuades daun cengkeh. Dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun cengkeh paling tinggi dan bahkan lebih tinggi dibandingkan dengan α -tokoferol.



Gambar 2.3 Nilai periode induksi dan faktor protektif antioksidan kontrol (PBS), α -tokoferol, dan daun cengkeh dengan pelarut akuades, metanol, dan etanol

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak metanol daun cengkeh memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi. Aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam menghambat oksidasi asam linoleat sehingga radikal peroksida tidak terbentuk. Diduga senyawa yang berperan dalam kemampuan penghambatan oksidasi asam linoleat dalam ekstrak daun cengkeh adalah senyawa fenol. Kemampuan penghambatan oksidasi asam linoleat dari ekstrak daun cengkeh bergantung pada jenis pelarut yang digunakan. Dalam hal ini daun cengkeh dengan pelarut metanol memiliki kandungan fenol yang paling tinggi sehingga penghambatan oksidasi asam linoleat lebih lama dibanding α -tokoferol, ekstrak etanol, dan aquades daun cengkeh. Kemampuan ekstrak metanol daun cengkeh dalam menghambat oksidasi asam lemak linoleat menunjukkan bahwa kandungan fenol

daun cengkeh dapat berperan sebagai donor proton (H) terhadap radikal peroksida sehingga radikal tersebut tidak bereaksi dengan asam lemak tidak jenuh. Dengan demikian, hambatan ini dapat memperlambat tahap reaksi propogasi pada proses autooksidasi. Proton hidrogen yang didonorkan dipengaruhi oleh jumlah dan posisi gugus OH dalam molekul polifenol sehingga pada konsentrasi fenol yang tinggi aktivitas antioksidatifnya juga semakin besar.

Pengujian secara *in vitro* ekstrak metanol pada beberapa jenis rempah-rempahan di antaranya bunga cengkeh pada *Eugenia caryophyllus* (Spreng), *Piper cubeba* (Linn), *Zingiber officinale* (Roscoe), dan *Piper nigrum* (Linn) menunjukkan adanya aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding dengan asam askorbat. Diduga bahwa dengan keberadaan senyawa alkaloid, glikosida, tannin, dan flavonoid pada ekstrak kasar metanol pada jenis rempah-rempahan lewat pengujian fitokimia organik memiliki kemampuan dalam meningkatkan aktivitas antioksidan (Khalaf *et al.*, 2007).

2.3.3 Komponen Fitokimia Ekstrak Metanol Daun Cengkeh

Pengujian fitokimia secara kualitatif ditujukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol dan simplisia daun cengkeh. Hasil uji yang dilakukan pada ekstrak metanol dan simplisia daun cengkeh dapat terdeteksi adanya golongan senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, dan tannin (Tabel 2.2).

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa komponen utama senyawa penyusun ekstrak metanol dan simplisia daun cengkeh adalah fenol, flavonoid, dan tannin. Keberadaan total fenol ekstrak daun cengkeh yang terdeteksi kuat menunjukkan besarnya kapasitas antioksidan yang dimiliki daun cengkeh. Selain fenol, flavanoid juga merupakan senyawa polifenol yang berkontribusi sebagai senyawa

antioksidan. Laporan penelitian sebelumnya menyatakan bahwa dengan adanya kandungan flavanoid dan fenol pada ekstrak *Mellilotus officinalis* menyebabkan ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibanding dengan BHT secara *in vitro* (Pourmorad *et al.*, 2006).

Tabel 2.2 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak dan Simplisia Daun Cengkeh

Golongan Senyawa	Ekstrak Metanol	Simplisia
Alkaloid	++	++
Fenol Hidroquinon	++++	+++
Flavanoid	+++	++
Steroid	+++	++
Triterpenoid	+	+
Saponin	++	++
Tannin	+++	+++
Flavonoid (MgCl)	+++	++

Keterangan : (+) = Terdeteksi, (-) = Tidak terdeteksi

Hasil analisis kualitatif KLT menunjukkan 2 fraksi dengan spot yang cukup tajam dengan nilai Rf fraksi pertama 0.31 dan fraksi kedua 0.46. Nilai Rf komponen bioaktif pembanding menurut Harborne (1987) adalah eugenol (Rf=0.31), metileugenol (Rf=0.42), dan metiliseugenol (Rf=0.42).

Plat KLT yang digunakan pada permukaannya mengandung adsorben gel silika sebagai fase diamnya. Gel silika ini bersifat polar sehingga akan lebih kuat menyerap molekul polar terlebih dahulu. Selain itu, pelarut heksan dan khloroform sebagai fase gerak bersifat nonpolar sehingga lebih menarik komponen nonpolar ke bagian atas plak dan meninggalkan komponen polar di bagian bawah plak KLT.

Metileugenol dan Metilisoegenol Eugenol

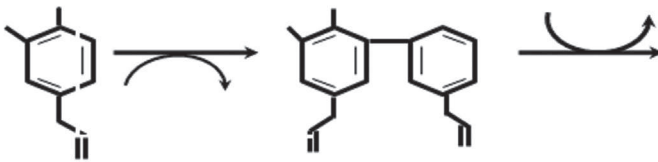


Gambar 2.4 Kromatogram Hasil Fraksinasi Komponen Nonvolatil Ekstrak Metanol Daun Cengkeh dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Hasil tersebut menunjukkan bahwa senyawa eugenol bersifat lebih polar daripada senyawa metileugenol dan metilisoegenol. Ke-polaran ini disebabkan eugenol mempunyai gugus hidroksil yang lebih banyak dibanding keduanya. Keberadaan gugus hidroksil membuat senyawa-senyawa ini memiliki aktivitas antioksidan.

Antioksidan fenolik diklasifikasikan ke dalam 2 kelompok, yaitu kelompok lipofilik, seperti tokoferol dan kelompok hidrofilik, seperti asam fenolik dan flavanoid. Fenolik adalah substansi yang mengandung satu atau lebih golongan hidroksil (OH) yang terikat pada cincin aromatik. Fenolik merupakan metabolik sekunder yang terdistribusi secara luas dalam tanaman dan bersumber dari berbagai jenis buah-buahan, rempah-rempahan, dan herbal. Salah satu jenis fenolik utama pada rempah-rempahan adalah eugenol. Eugenol merupakan antioksidan fenolik dan termasuk kelompok lipofilik.

Menurut Ogata *et al.* (2000), ada 2 langkah mekanisme penghambatan eugenol terhadap peroksidasi lipid. *Pertama*, eugenol dapat memutuskan rantai radikal bebas ($O_2^{\cdot-}$). *Kedua*, eugenol yang telah dimetabolisasi menjadi dimer dan komponen dimerik (dieugenol) dapat menghambat peroksidasi lipid pada tingkat propagasi reaksi rantai radikal bebas seperti α -tokoferol secara *in vitro*. Namun, eugenol memiliki efek perlindungan terhadap organisme yang mengalami *stress* oksidatif, karena adanya mekanisme penghambatan pada tingkat monomerik dan dimerik (Gambar 2.5).



Gambar 2.5 Mekanisme Penghambatan Eugenol terhadap Peroksidasi lipid (Ogata *et al.* 2000)

2.4 Farmakologi Ekstrak Daun Cengkeh

2.4.1 Hiperkolesterolemia (Suatu Tinjauan Gambaran Histologi pada Organ Hati dan Ginjal)

Kolesterol adalah sterol utama dalam tubuh manusia. Kolesterol dibutuhkan oleh tubuh sebagai struktur membran sel dan lipoprotein plasma, dan juga merupakan bahan awal pembentukan asam empedu serta hormon steroid. Kolesterol memiliki sifat yang larut dalam lemak dan mampu membentuk ester dengan asam lemak. Kira-kira 70% kolesterol diangkut dalam bentuk ester kolesterol. Ester kolesterol ini berada dalam massa inti lipid lipoprotein (Montgomery *et al.*, 1993).

Ada 4 kelompok utama lipoprotein yang berperan dalam pengangkutan kolesterol, yaitu (1) kilomikron yang berasal dari penyerapan trigliserida dalam usus; (2) lipoprotein berdensitas sangat

rendah (*Very Low Density Lipoprotein*: disingkat VLDL) yang berasal dari hati untuk mengeluarkan trigliserida; (3) lipoprotein berdensitas sedang (*Low Density Lipoprotein*: disingkat LDL) yang memperlihatkan tahap akhir dalam katabolisme VLDL; dan (4) lipoprotein densitas tinggi (*High Density Lipoprotein*: disingkat HDL) yang terlibat dalam metabolisme VLDL, kilomikron, dan juga kolesterol. Lipoprotein berkepadatan rendah terbentuk dalam plasma selama katabolisme VLDL dan mengandung 65-75% kolesterol dalam bentuk ester kolesterol. Lipoprotein berkepadatan sangat rendah disintesis dalam hati, bertugas mengangkut trigliserida dari hati ke jaringan adiposit dan mengandung 5.1% kolesterol dan 54.8% trigliserida. Lipoprotein berkepadatan tinggi disintesis dalam hati dan usus dan mengandung 25.7 % kolesterol dan 14.3% trigliserida (Stipanuk 2000).

Hiperkolesterolemia adalah suatu keadaan tingginya kadar kolesterol dalam darah. Ada tiga tingkatan kolesterol dalam serum, yaitu kolesterol serum normal dengan kolesterol total < 200 mg/dl, kolesterol serum tinggi yang dapat menyebabkan kondisi hiperkolesterolemia sedang (240-289 mg/dl) dan kolesterol serum sangat tinggi yang dapat menyebabkan hiperkolesterolemia berat (>290 mg/dl) (Grundi 1991). Menurut Montgomery *et al.* (1993), kadar kolesterol normal dalam plasma orang dewasa sebesar 3.1 sampai 5.7 mmol/l atau 120 sampai 220 mg/dl. Keadaan hiperkolesterolemia terjadi bila konsentrasi kolesterol total \geq 240 mg/dl dan LDL \geq 160 mg/dl.

Pada kondisi hiperkolesterolemia, risiko terbentuknya aterosklerosis sangat tinggi dan ini terjadi akibat penurunan laju katabolisme LDL yang mengandung banyak ester kolesterol. Aterosklerosis ditandai dengan penumpukan kolesterol dan ester kolesterol pada jaringan ikat dinding pembuluh arteri sehingga terjadi penyempitan lumen pembuluh tersebut (Murray *et al.*, 1997; Grundy, 1991). Sebenarnya, ada banyak faktor yang dapat menyebabkan timbulnya

aterosklerosis tetapi tingginya kadar kolesterol dalam darah adalah penyebab yang lebih dominan dibanding faktor lain, seperti usia dan kebiasaan merokok (McGilvery & Golstein, 1996).

Konsentrasi kolesterol yang diinginkan untuk menurunkan risiko terbentuknya aterosklerosis pada manusia adalah kolesterol total <200 mg/dl, LDL <130 mg/dl, serta HDL 50-60 mg/d. Kisaran konsentrasi kolesterol total 200-239 mg/dl dan LDL 130-159 mg/dl adalah batas antara keadaan berisiko rendah dan tinggi untuk terbentuknya aterosklerosis (Grundy, 1991). Kadar LDL yang tinggi pada hiperkolesterolemia memungkinkan LDL untuk menembus pembuluh darah dan masuk ke bagian intima arteri. Selanjutnya, pada intima, LDL akan terikat dengan makromolekul matriks ekstraseluler terutama proteoglikan dan efeknya adalah LDL akan mengalami oksidasi (Diaz *et al.*, 1997).

Hiperkolesterolemia juga dapat meningkatkan risiko perkembangan penyakit jantung koroner akibat rusaknya reseptor LDL dan akhirnya dapat meningkatkan kerentanan terhadap penyerangan radikal dan oksidasi (Nourooz-Zadeh *et al.*, 2001). Penderita penyakit arteri tersebut dapat mengalami kenaikan kadar VLDL dengan kadar LDL yang normal, kenaikan LDL dengan kadar VLDL yang normal, atau kenaikan kedua fraksi lipoprotein tersebut dengan kadar kolesterol plasma setinggi 800 sampai 900 mg/dl (Montgomery *et al.*, 1993).

Hiperkolesterolemia sendiri diyakini mengganggu fungsi endotel dengan meningkatkan produksi radikal bebas oksigen. Radikal ini menonaktifkan oksida nitrat, yaitu faktor *endothelial-relaxing* utama. Apabila terjadi hiperlipidemia kronis, lipoprotein tertimbun dalam lapisan intima di tempat meningkatnya permeabilitas endotel. Pemaparan terhadap radikal bebas dalam sel endotel dinding arteri menyebabkan terjadinya oksidasi LDL, yang berperan dan mempercepat timbulnya plak aterosklerosis. Oksidasi LDL diperkuat

oleh kadar HDL yang rendah, diabetes mellitus, defisiensi estrogen, hipertensi, dan merokok. Sebaliknya, kadar HDL yang tinggi bersifat protektif terhadap timbulnya keadaan jantung koroner bila sedikitnya mengandung 25% kolesterol total (Price & Wilson 2006).

Hiperkolesterolemia dapat dibuat pada beberapa hewan dengan menambahkan lemak dan kolesterol dalam makanannya yang disebut dengan induksi endogen. Dilaporkan oleh Van Lith & Begnen (1993) bahwa penambahan kolesterol murni 0.1% ke dalam pakan standar telah dapat membuat tikus dewasa mengalami hiperkolesterolemia. Pada kelinci New Zealand, aterosklerosis dapat terjadi dengan penambahan 1% kolesterol murni ke dalam pakan standar (Fani *et al.*, 1988).

Hewan kelinci dipilih sebagai hewan model percobaan dalam studi hiperkolesterolemia karena kadar kolesterol kelinci sangat mudah ditingkatkan, sehingga tidak memerlukan waktu yang cukup lama untuk membuat kelinci mengalami kondisi hiperkolesterolemia (Jokinen *et al.*, 1985). Jenis kelamin juga dipertimbangkan dalam penggunaan hewan coba. Penggunaan kelinci jantan dimaksudkan untuk menghindari pengaruh hormonal (hormon estrogen) pada aktivitas reseptor LDL yang akan berpengaruh pada konsentrasi kolesterol darah (Grundy, 1991).

2.4.2 Uji In Vivo Ekstrak Metanol Daun Cengkeh pada Kelinci

2.4.2.1 Analisis Profil Lipid Serum

Kelompok kelinci kontrol positif pada akhir pengujian menunjukkan kadar kolesterol total dan LDL lebih tinggi secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif, kuratif, dan diberikan secara bersamaan dengan kolesterol serta kontrol negatif (Tabel 5). Di antara kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh, baik secara preventif maupun secara kuratif, kelompok kelinci P30 dan C30 secara nyata ($P < 0.05$)

menunjukkan kadar kolesterol total dan LDL lebih rendah. Demikian pula kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan menunjukkan kadar kolesterol total dan LDL lebih rendah secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci kontrol positif.

Tabel 2.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar Kolesterol Total dan LDL Serum Darah Kelinci

Perlakuan	Lipid darah			
	Kolesterol Total (mg/dl)		LDL (mg/dl)	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
K(-)	60.96±2.26 ^{ab}	62.70±2.59 ^a	10.72±0.22 ^a	8.03±0.40 ^a
K(+)	62.55±2.82 ^{ab}	387.22±11.47 ^f	10.67±0.37 ^a	306.07±12.45 ^e
P10	58.13±2.30 ^a	222.56±7.24 ^{de}	10.63±0.33 ^a	152.73±1.08 ^d
P20	63.26±3.31 ^b	192.92±6.80 ^c	15.80±0.34 ^b	121.49±4.54 ^c
P30	65.37±2.49 ^b	160.63±10.14 ^b	16.83 ±0.33 ^b	87.95±1.95 ^b
C10	58.07±1.37 ^a	215.49±8.23 ^e	11.14±0.76 ^a	173.62±3.79 ^d
C20	65.74±3.81 ^b	205.61±6.01 ^{cd}	16.76±0.37 ^b	130.24±5.73 ^c
C30	64.48±0.51 ^b	168.96±10.72 ^b	10.56±0.71 ^a	97.73±3.11 ^b
EDC+Kolest.	65.33±2.77 ^b	174.79 ±6.01 ^b	11.53±0.28 ^a	91.33±1.37 ^b

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ada uji Duncan dengan taraf 5%. K(-) = kontrol negatif, (+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Awal = pengukuran kadar kolesterol total setelah masa adaptasi, Akhir= pengukuran kadar kolesterol sebelum dibedah.

Kadar kolesterol total serum semua kelinci pada awal pengujian berkisar antara 58.07 ± 1.37 mg/dl hingga 65.74 ± 3.81 mg/dl. Kadar kolesterol total pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh mengalami penurunan sampai akhir pengujian, kecuali kelompok kelinci kontrol positif yang mengalami peningkatan (Table 2.3).

Penambahan kolesterol 1% pada pakan selama 50 hari mampu meningkatkan kadar kolesterol total serum darah kelinci hingga 387.22 mg/dl. Selain dapat meningkatkan kolesterol serum, penambahan kolesterol 1% pada pakan juga dapat meningkatkan kolesterol hati. Kolesterol makanan membutuhkan waktu beberapa hari untuk mengimbangi kolesterol dalam plasma dan beberapa minggu untuk mengimbangi kolesterol dalam jaringan. Pergantian kolesterol dalam hati berlangsung relatif cepat bila dibandingkan waktu paruh-total kolesterol tubuh yang lamanya beberapa minggu. Kolesterol dalam plasma dan hati akan seimbang dalam waktu beberapa jam saja. Kolesterol plasma yang tinggi menunjukkan suatu kelainan metabolisme sebagai hasil dari kegagalan untuk memindahkan lipoprotein dari darah, produksi lipoprotein yang berlebihan, atau kombinasi dari keduanya (Wresdiyati *et al.*, 2006a). Kadar kolesterol yang tinggi tersebut dapat mengawali terjadinya penyakit aterosklerosis yang ditandai dengan adanya plak pada aorta (Thomas *et al.*, 2003).

Mekanisme penurunan kolesterol di antaranya adalah pengikatan asam empedu di dalam usus halus yang menyebabkan meningkatnya ekskresi asam empedu dalam feses, penggunaan kolesterol untuk sintesis senyawa steroid lainnya, seperti hormon atau asam empedu lainnya, penurunan absorpsi lemak dan kolesterol, penurunan laju insulin serum sehingga menurunkan rangsangan sintesis kolesterol dan lipoprotein, dan menghambat sintesis kolesterol oleh asam lemak rantai pendek yang dihasilkan di dalam kolon (Murray, 1997; Astawan *et al.*, 2005). Selain itu, ada dua jenis enzim yang berperan penting dalam

pengaturan metabolisme kolesterol, yaitu HMGR (hidroksil metil glutaryl Koenzim A reduktase) dan ACAT (asil-koenzim A:kolesterol asiltransferase). Hidroksil metil glutaryl koenzim A reduktase adalah enzim yang membatasi biosintesis kolesterol dan ACAT adalah enzim yang mengubah kolesterol menjadi ester kolesterol, absorpsi kolesterol diet, sekresi VLDL hati, dan perkembangan sel busa pada aterosklerosis. Penghambatan HMGR dan peningkatan aktivitas ACAT dapat digunakan untuk hipokolesterolemia dan antiaterogenik (Seon-Min *et al.*, 2007).

Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa kemungkinan polifenol yang terkandung dalam ekstrak daun cengkeh berperan aktif dalam menghambat enzim HMGR dan mengaktifkan ACAT sehingga peningkatan kolesterol dapat dicegah. Telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya bahwa naringenin dan likopen adalah suplemen yang kaya akan polifenol yang dapat mencegah peningkatan kolesterol melalui penghambatan enzim HMGR dan peningkatan aktivitas ACAT (Seon-Min, 2007; Verghese, 2008). Selain itu, penurunan kadar kolesterol serum juga berkaitan dengan salah satu komponen aktif ekstrak daun cengkeh, yaitu saponin. Saponin dapat berikatan dengan kolesterol endogenus di usus yang diekstresikan lewat empedu. Hal ini dapat mencegah reabsorpsi kolesterol dan menghasilkan penurunan kadar kolesterol serum. Saponin sangat potensial untuk digunakan dalam studi hiperkolesterolemia, karena saponin dapat bekerja dalam mencegah absorpsi kolesterol pada usus (Soetan & Aiyellagbe, 2009).

Hasil pengukuran kadar kolesterol total pada kelompok kelinci kuratif juga menunjukkan adanya pengaruh pemberian ekstrak daun cengkeh. Ekstrak daun cengkeh tersebut ternyata dapat menurunkan kadar kolesterol total serum pada kelompok kelinci yang telah mengalami hiperkolesterolemia. Berdasarkan hasil analisis fitokimia menunjukkan bahan aktif ekstrak daun cengkeh berupa komponen

fenolik mampu menurunkan kadar kolesterol total serum. Selain itu, lama pemberian ekstrak daun cengkeh juga sangat memengaruhi penurunan kadar kolesterol total serum. Hal ini terlihat pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari setelah diberi kolesterol dan kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Terdapat kecenderungan yang sinergis antara tingginya kadar kolesterol total dan kadar LDL pada akhir pengujian. Hal ini disebabkan karena sebanyak 65% kolesterol total berada dalam bentuk LDL. Molekul LDL dibuat di hati sebagai konversi dari VLDL (Marinetti, 1990). Molekul ini berperan dalam menyediakan kolesterol jaringan tepi dengan cara mengikatkan kolesterol pada reseptor yang terdapat pada permukaan sel.

Mekanisme penurunan kadar LDL serum pada kelompok kelinci preventif tersebut sangat berkaitan erat dengan mekanisme penurunan kadar kolesterol total serum. Penurunan kadar LDL juga terjadi pada kelompok kelinci yang diberi kolesterol dan ekstrak daun cengkeh secara bersamaan selama 50 hari.

Analisis fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh mengandung bahan aktif, baik senyawa fenol dan non-fenol yang dapat mencegah peningkatan kadar kolesterol total dan LDL. Menurut Naidu & Thippeswamy (2002) senyawa fenol dan non-fenol dari cengkeh selain berperan sebagai antioksidan, juga berperan dalam mencegah terjadinya oksidasi LDL. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Safari *et al.* (2002) bahwa minyak *volatile* mengandung sejumlah senyawa fenol di antaranya eugenol, timol, enetol, geraniol dan linalool. Bahan aktif tersebut meningkatkan pengambilan LDL oleh reseptor sehingga dapat menurunkan modifikasi LDL dan mencegah kejadian aterosklerosis.

Penurunan kadar LDL serum juga terlihat pada kelompok kuratif. Penurunan ini berkaitan erat dengan penurunan kadar kolesterol total serum sehingga mekanisme penurunan kadar kolesterol total serum kelompok kelinci kuratif hampir sama dengan mekanisme penurunan kadar kolesterol total serum kelompok kelinci preventif.

Tabel 2.4 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar Kolesterol HDL dan Trigliserida Serum Darah Kelinci

Perlakuan	Lipid darah			
	HDL (mg/dl)		Trigliserida (mg/dl)	
	Awal	Akhir	Awal	Akhir
K(-)	42.56 ±2.58 ^a	43.51±0.46 ^b	45.89±2.98 ^a	48.32±2.19 ^a
K(+)	44.84 ±0.84 ^a	39.36±0.82 ^a	47.92±2.65 ^a	186.56±17.72 ^c
P10	44.29 ±3.22 ^a	44.17± 2.88 ^{bc}	52.70± 3.38 ^a	129.01±9.44 ^b
P20	41.02±1.97 ^a	46.69±1.18 ^{bc}	45.34 ±8.03 ^a	118.67±7.54 ^b
P30	42.59 ±2.95 ^a	52.76±2.15 ^d	50.79± 2.11 ^a	110.10±3.87 ^b
C10	41.75±0.71 ^a	44.82±2.57 ^{bc}	50.20±8.82 ^a	133.10±5.92 ^b
C20	41.14±1.49 ^a	47.10±0.76 ^c	54.56±4.84 ^a	119.66±1.80 ^b
C30	41.96±1.56 ^a	50.73±1.83 ^d	57.68±3.93 ^a	112.76±5.92 ^b
EDC+Kolest.	43.18 ±0.17 ^a	50.37± 1.01 ^d	48.65± 6.94 ^a	120.41±1.55 ^b

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ada uji Duncan dengan taraf 5%. K(-) = kontrol negatif, (+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol, EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Awal = pengukuran kadar kolesterol total setelah masa adaptasi, Akhir = pengukuran kadar kolesterol sebelum dibedah.

Pada akhir pengujian, di antara kelompok kontrol positif dan negatif menunjukkan kadar HDL yang berbeda secara nyata ($P < 0.05$).

Di antara kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh, baik secara preventif, kuratif, maupun diberi secara bersamaan dengan kolesterol juga menunjukkan kadar HDL yang berbeda secara nyata ($P < 0.05$). Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari secara preventif lebih tinggi ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 dan 20 hari. Demikian pula kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari secara kuratif lebih tinggi ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol negatif (Tabel 2.4).

Kadar trigliserida pada akhir pengujian menunjukkan kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif dan yang diberi kolesterol secara bersamaan berbeda ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif (Tabel 2.4). Kadar trigliserida yang paling tinggi adalah pada kelompok kontrol positif dan paling rendah adalah pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari secara preventif. Di antara kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10, 20, dan 30 hari secara preventif, yang secara nyata menunjukkan kadar trigliserida yang paling tinggi adalah kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 hari. Di antara kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10, 20, dan 30 hari secara kuratif tidak berbeda secara nyata, tapi kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari menunjukkan kadar trigliserida yang paling rendah secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol negatif.

Lipoprotein berkepadatan tinggi berfungsi untuk menstimulasi perpindahan kolesterol membran plasma menuju *pool* intraseluler (Marinetti, 1990). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik sebelum dan selama hiperkolesterolemia memiliki kadar HDL yang tinggi. Hal ini diduga karena pemberian ekstrak daun cengkeh dapat menekan kena-

ikan kolesterol total serum melalui pengikatan asam empedu dan mengeluarkannya melalui feses.

Peningkatan kadar HDL dapat mencegah terjadinya aterosklerosis. Lipoprotein berkepadatan tinggi dengan bantuan beberapa enzim *paraoxanase* (PON-1), *platelet activating factor acetylhydrolase* (PAF-AH) dan *lecitin-cholesterol acyl transferase* (LCAT), masing-masing atau bersama-sama mengubah partikel LDL menjadi pecahan yang tidak bersifat aterogenik. Reaksi ini terjadi karena adanya pengaruh HDL yang mencegah reaksi oksidasi LDL, berperan sebagai reaksi transpor balik (*reversed transpor*) yang mengangkut partikel lipoprotein ke dalam hati kembali dan selanjutnya sebagian lemak diolah menjadi asam empedu dan dikeluarkan ke feses (Abdurahman, 2003) sehingga peningkatan kolesterol dalam darah dan oksidasi LDL dapat dicegah.

Kadar HDL serum pada kelompok kelinci kuratif menunjukkan peningkatan setelah mengalami hiperkolesterolemia. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak daun cengkeh mampu meningkatkan kadar HDL serum. Hal ini terlihat pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik selama 10, 20, dan 30 hari maupun yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari menunjukkan kadar HDL yang tinggi dibanding kontrol negatif.

Triglycerida merupakan salah satu bentuk lemak yang diperoleh dari darah dan juga dibuat di dalam tubuh. Triglycerida di plasma diperoleh dari lemak yang dikonsumsi atau dibuat oleh tubuh. Pada kondisi kadar triglycerida tinggi akan diikuti kadar kolesterol total dan LDL yang tinggi pula, tetapi dengan kadar HDL yang rendah.

Kadar triglycerida dipengaruhi oleh jumlah lemak dan energi yang dikonsumsi. Jika terjadi kelebihan energi, sebagian dari energi

tersebut akan diubah menjadi trigliserida dan selanjutnya disimpan menjadi lemak tubuh di dalam jaringan adiposa. Kondisi hipertrigliserida disebabkan oleh konsumsi lemak yang tinggi (Marinetti, 1990).

Trigliserida dihidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase yang berasal dari kilomikron dan VLDL menjadi asam lemak dan gliserol. Asam lemak selanjutnya diambil sel untuk dioksidasi menjadi energi (Marinetti, 1990). Pemberian ekstrak daun cengkeh dapat menekan peningkatan kadar trigliserida. Hal ini tidak terlepas dari kandungan polifenol yang terdapat dalam ekstrak daun cengkeh yang mungkin dapat meningkatkan aktivitas enzim lipoprotein lipase.

Pemberian ekstrak daun cengkeh dapat memperbaiki kadar kolesterol total, LDL, HDL, dan trigliserida serum darah kelinci. Hal ini terlihat dari kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh menunjukkan penurunan kolesterol total, LDL, trigliserida, dan peningkatan HDL serum. Perubahan profil lipid ini sangat berkaitan erat dengan komponen fitokimia yang terdapat dalam ekstrak daun cengkeh, yaitu adanya komponen fenol yang tinggi. Komponen fenol yang terdapat pada berbagai jenis tanaman lain seperti yang telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya, yaitu pada anggur merah, teh hijau, dan jenis rempah-rempahan lainnya, juga memiliki kemampuan dalam mencegah oksidasi ataupun menurunkan kolesterol serum. Hal yang serupa juga telah dilaporkan pada ekstrak metanol bunga cengkeh yang berperan sebagai antioksidan dan beberapa senyawa di antaranya tannin, saponin, dan triterpenoid diduga banyak berperan dalam menurunkan kolesterol serum kelinci (Robinson, 1995; Khalaf *et al.*, 2007).

2.4.2.2 Indeks Aterogenik

Indeks aterogenik dihitung dengan menggunakan rasio $KT-HDL/HDL$ berdasarkan hasil pengukuran kadar kolesterol total dan

HDL serum darah kelinci (Athanasios *et al.* 2006). Hasil penghitungan indeks aterogenik pada kelompok kelinci perlakuan disajikan pada Tabel 2.5.

Penghitungan indeks aterogenik penting dilakukan untuk mengetahui besarnya resiko terkena aterosklerosis, karena indeks aterogenik merupakan salah satu prediktor terbaik untuk melihat resiko terkena aterosklerosis. Hasil penelitian menunjukkan bahwa indeks aterogenik pada kelompok kelinci yang mengalami hiperkolesterolemia (kontrol positif) secara nyata lebih tinggi ($P < 0.05$) dibanding dengan kontrol negatif yang tidak diberi kolesterol 1% dan ekstrak daun cengkeh (Tabel 2.6).

Tabel 2.5 Indeks Aterogenik pada Kelinci Perlakuan

Perlakuan	Indeks Aterogenik
K(-)	0.44±0.054 ^a
K(+)	8.838±0.190 ^f
P10	3.717±0.417 ^c
P20	3.133±0.150 ^d
P30	2.051±0.297 ^b
C10	4.055±0.276 ^c
C20	2.993±0.610 ^{cd}
C30	2.393±0.231 ^b
EDC+K	2.537±0.068 ^{bc}

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata ada uji Duncan dengan taraf 5%. K(-) = kontrol negatif, (+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Nilai indeks aterogenik tertinggi pada kelompok hiperkolesterolemia adalah 8.838. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok hiperkolesterolemia memiliki resiko terkena aterosklerosis lebih besar dibanding kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif, dan diberi secara bersamaan dengan kolesterol.

Nilai indeks aterogenik pada pria 4.50 dan pada wanita 4.05. Nilai ini dapat dijadikan sebagai acuan untuk melihat resiko aterosklerosis pada kelinci jantan percobaan. Pada Tabel 2.5, nilai di atas 4.50 adalah kelompok hiperkolesterolemia, sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif dan diberi secara bersamaan dengan kolesterol memiliki indeks aterogenik di bawah 4.50. Hal ini menunjukkan bahwa hanya kelompok hiperkolesterolemia yang memiliki potensi paling besar terkena aterosklerosis.

2.4.2.3 Kapasitas Antioksidatif Ekstrak Daun Cengkeh pada Jaringan Hati dan Ginjal Kelinci

Malonaldehid (MDA) merupakan salah satu produk final dari peroksidasi lipid yang terbentuk setelah senyawa radikal menyerang membran lipid yang kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). Malonaldehid dalam bahan biologi telah digunakan secara luas sebagai indikator keberadaan radikal bebas dan terjadinya kerusakan oksidatif, terutama oksidasi pada asam lemak tak jenuh yang memiliki lebih dari satu ikatan rangkap. Analisis kadar radikal bebas dalam penelitian ini dilakukan dengan mengukur kadar MDA hati dan ginjal.

Hasil pengukuran kadar MDA hati dan ginjal pada kelompok kelinci perlakuan disajikan pada Tabel 2.6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok kelinci yang mengalami hiperkolesterolemia (kontrol positif) secara nyata lebih tinggi ($P < 0.05$)

pada jaringan hati maupun pada ginjal dibanding dengan kontrol negatif yang tidak diberi kolesterol 1% dan ekstrak daun cengkeh (Tabel 2.6).

Tabel 2.6 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Kadar MDA Hati dan Ginjal Kelinci

Perlakuan	Rerata kadar MDA ($\mu\text{mol/g}$ protein)	
	Hati	Ginjal
K(-)	936.13 \pm 47.18 ^a	1260.75 \pm 47.02 ^a
K(+)	5724.75 \pm 56.21 ^f	5272.00 \pm 31.11 ^f
P10	2637.00 \pm 25.06 ^e	2743.00 \pm 21.21 ^d
P20	2523.50 \pm 19.05 ^d	2725.50 \pm 7.70 ^d
P30	1679.50 \pm 78.04 ^{bc}	1945.50 \pm 14.84 ^b
C10	2699.33 \pm 16.65 ^e	2866.00 \pm 39.59 ^e
C20	2528.33 \pm 13.15 ^d	2750.50 \pm 6.36 ^d
C30	1634.33 \pm 37.09 ^b	2305.50 \pm 33.23 ^c
EDC+K	1720.25 \pm 3.18 ^c	2360.25 \pm 51.97 ^c

Keterangan Tabel 2.6:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol, EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Hasil analisis MDA ini menunjukkan bahwa pemberian kolesterol 1% selama 50 hari memberi pengaruh negatif pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia dibanding dengan kelompok kelinci kontrol negatif yang tidak diberi kolesterol 1%. Pengaruh negatif tersebut

terlihat dengan meningkatnya kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi merupakan indikator tingginya radikal bebas dalam tubuh.

Pada kondisi hiperkolesterolemia, tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu melibatkan 7α -hidroksilasi, suatu enzim mikrosomal yang memerlukan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450. Semakin banyak empedu yang disintesis, maka semakin tinggi aktivitas sitokrom P-450 dan semakin banyak oksigen yang diperlukan. Peningkatan tersebut akan menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingan sehingga radikal bebas terbentuk secara berlebihan pada kondisi hiperkolesterolemia.

Kadar peroksidasi lipid yang berlebih pada darah maupun organ dapat mengakibatkan berbagai penyakit degeneratif. Bila kadar peroksidasi lipid di hati meningkat, maka peroksidasi lipid ini keluar dari hati menuju pembuluh darah, dan akan merusak organ atau jaringan lain. Pada manusia, peroksidasi lipid akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia, tetapi jumlahnya tidak boleh melebihi kadar normalnya, yaitu 4 nmol/ml (Yagi, 1994).

Kelompok kelinci preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh baik selama 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol secara nyata ($P<0.05$) menurunkan kadar MDA hati dan ginjal. Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif, kuratif, dan diberi secara bersamaan dengan kolesterol selama 50 hari secara nyata ($P<0.05$) dapat menurunkan kadar MDA hati dan ginjal dibanding kelompok kontrol positif.

Di antara kelompok kelinci preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10, 20, dan 30 hari yang menunjukkan kadar MDA hati dan ginjal yang paling rendah adalah kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari (Tabel 2.6). Demikian pula kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari

secara kuratif berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 dan 20 hari baik secara preventif maupun secara kuratif.

Kadar MDA hati dan ginjal untuk kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara bersamaan dengan kolesterol selama 50 hari yaitu masing-masing sebesar $1720.25 \pm 3.18 \mu\text{mol/g}$ protein dan $2360.25 \pm 51.97 \mu\text{mol/g}$ protein tidak berbeda dari kelompok kelinci kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari, namun berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dari kelompok kontrol positif yang tidak diberi ekstrak daun cengkeh (Tabel 2.6).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ada perbedaan antara kadar MDA pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10, 20, dan 30 hari baik pada kelompok kelinci preventif maupun kuratif. Perbedaannya adalah bahwa semakin lama pemberian ekstrak daun cengkeh pada kelinci semakin rendah kadar MDA. Rendahnya kadar MDA juga ditunjukkan pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Hal ini mengindikasikan bahwa kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dalam jangka waktu yang lebih panjang dapat mencegah terjadinya peroksidasi lipid baik pada hati maupun pada ginjal kelinci.

Rendahnya kadar MDA pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik pada organ hati maupun ginjal sangat berkaitan erat dengan komponen aktif dari ekstrak daun cengkeh tersebut. Komponen aktif pada ekstrak daun cengkeh adalah komponen fenol yang terdeteksi kuat pada uji fitokimia. Senyawa-senyawa fenolik mempunyai kemampuan sebagai aktivitas antioksidan primer sehingga dengan kemampuan tersebut proses peroksidasi lipid dan proses lain yang dapat menghasilkan malondialdehida dapat dikurangi.

Aktivitas antioksidan tipe fenol berhubungan dengan keseimbangan reaksi oksidasi-reduksi (redoks), yaitu *electron donating substituent* yang terikat pada cincin aromatik akan memperbesar kecepatan reaksi penghambatan oksidasi oleh antioksidan. Selain itu antioksidan dipercaya mencegah oksidasi rantai radikal bebas dan mendonasikan atom hidrogen dari kelompok hidroksil fenol dan membentuk produk yang stabil (Kotamballi *et al.*, 2002). Salah satu derivat fenol pada tanaman cengkeh adalah eugenol. Telah dilaporkan bahwa senyawa eugenol yang terdapat pada ekstrak metanol cengkeh dapat menghambat peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi atau keduanya dan reaksi penghambatan dari eugenol sama dengan α -tokoferol secara *in vitro* (Ogata *et al.*, 2000; Jirovetz *et al.*, 2006).

Pada kondisi hiperkolesterolemia, tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Sintesis asam empedu melibatkan 7α -hidroksilasi, suatu enzim mikrosomal yang memerlukan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450. Semakin banyak empedu yang disintesis, maka semakin tinggi aktivitas sitokrom P-450 dan semakin banyak oksigen yang diperlukan. Peningkatan tersebut akan menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingan sehingga radikal bebas terbentuk secara berlebihan pada kondisi hiperkolesterolemia.

Kadar peroksidasi lipid yang berlebih pada darah maupun organ dapat mengakibatkan berbagai penyakit degeneratif. Bila kadar peroksidasi lipid di hati meningkat, maka peroksidasi lipid ini keluar dari hati menuju pembuluh darah, dan akan merusak organ atau jaringan lain. Pada manusia, peroksidasi lipid akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia, tetapi jumlahnya tidak boleh melebihi kadar normalnya, yaitu 4 nmol/ml (Yagi, 1994).

Aktivitas antioksidan tipe fenol berhubungan dengan keseimbangan reaksi oksidasi-reduksi (redoks), yaitu *electron donating substituent* yang terikat pada cincin aromatik akan memperbesar ke-

cepatan reaksi penghambatan oksidasi oleh antioksidan. Selain itu, antioksidan dipercaya mencegah oksidasi rantai radikal bebas dan mendonasikan atom hidrogen dari kelompok hidroksil fenol dan membentuk produk yang stabil (Kotamballi *et al.* 2002). Salah satu derivat fenol pada tanaman cengkeh adalah eugenol. Telah dilaporkan bahwa senyawa eugenol yang terdapat pada ekstrak metanol cengkeh dapat menghambat peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi atau keduanya dan reaksi penghambatan dari eugenol sama dengan α -tokoferol secara *in vitro* (Ogata *et al.*, 2000; Jirovetz *et al.*, 2006).

2.4.2.4 Aktivitas Enzim Antioksidan (*Superoksida Dismutase, Katalase, dan Glutation peroksidase*)

Sistem perlindungan tubuh terhadap radikal bebas meliputi enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase. Superoksida dismutase (SOD) merupakan salah satu enzim antioksidan yang mengkatalisis dismutase radikal superoksida secara spontan, sehingga terbentuk hidrogen peroksida dan oksigen. Katalase adalah enzim antioksidan intrasel yang terutama berlokasi di peroksisom sel, yang mengkatalisis reaksi peroksida hidrogen menjadi air. Glutathion peroksidase (GPx) adalah enzim antioksidan yang mengandung selenium yang secara efektif dapat mengurangi peroksida hidrogen dan peroksida lipid menjadi air.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas enzim antioksidan SOD, katalase, dan GPx pada kelompok kelinci yang mengalami hiperkolesterolemia (kontrol positif) secara nyata lebih rendah ($P < 0.05$) dibanding kontrol negatif. Hal ini terlihat baik pada jaringan hati (Tabel 2.7) maupun pada jaringan ginjal (Tabel 2.8).

Pemberian kolesterol 1% selama 50 hari memberi pengaruh negatif pada kelinci dibanding dengan kelompok kelinci kontrol negatif yang tidak diberi kolesterol 1%. Pengaruh negatif tersebut terlihat dengan menurunnya aktivitas enzim antioksidan pada kontrol

positif (hiperkolesterolemia). Pada kondisi hiperkolesterolemia, tubuh berusaha untuk menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu yang dapat meningkatkan aktivitas sitokrom P-450. Radikal bebas sebagai hasil samping oksidasi tersebut juga akan meningkat.

Tabel 2.7 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Aktivitas Enzim Antioksidan SOD, Katalase, dan GPx pada Hati Kelinci

Perlakuan	Rerata Aktivitas Enzim Antioksidan pada Hati		
	SOD (U/mg)	Katalase (U/mg)	GPx (U/g protein)
K(-)	357.33±43.96 ^b	1.80 ±0.04 ^c	532.42 ±8.74 ^f
K(+)	55.83 ±20.89 ^a	1.56 ±0.09 ^a	82.26 ±4.75 ^a
P10	111.67 ±20.89 ^a	1.65±0.02 ^{ab}	211.95 ±5.09 ^b
P20	307.08 ±28.46 ^b	1.76 ±0.00 ^b	427.92±8.57 ^c
P30	566.25 ±48.44 ^d	1.86±0.02 ^c	586.82 ±9.24 ^h
C10	135.58 ±43.96 ^a	1.62 ±0.33 ^{ab}	237.68±10.51 ^c
C20	145.17±15.79 ^a	1.73 ±0.02 ^b	403.00±8.57 ^d
C30	474.58± 78.96 ^{cd}	1.81±0.004 ^c	567.79±2.73 ^{gh}
EDC+K	502.03 ±32.02 ^d	1.81±0.18 ^c	552.25±10.32 ^{fg}

Keterangan Tabel 2.7:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol, EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Radikal bebas, khususnya superoksida anion, dapat dihasilkan secara alami dalam tubuh. Superoksida anion merupakan hasil reduksi satu elektron oksigen yang dapat terjadi pada hampir semua sel aerobik untuk menjalankan reaksi transfer elektron. Selain itu, superoksida anion tersebut akan dipakai sebagai substrat bagi enzim superoksida

dismutase menghasilkan H₂O₂ dan O₂. Hidrogen peroksida yang dihasilkan tersebut dapat digunakan sebagai substrat oleh enzim glutathion peroksidase dan katalase. Secara alami, tubuh telah dilengkapi dengan berbagai daya tangkal atau sistem pertahanan yang mampu melindungi sel-sel terhadap kerusakan sel ataupun jaringan. Sistem pertahanan tersebut adalah enzim-enzim antioksidan intrasel, yaitu SOD, katalase, dan GPx.

Tabel 2.8 Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Cengkeh Secara Preventif, Kuratif, dan Secara Bersamaan dengan Kolesterol pada Aktivitas Enzim Antioksidan Sod, Katalase, Dan Gpx Pada Ginjal Kelinci

Perlakuan	Rerata Aktivitas Enzim Antioksidan pada Ginjal		
	SOD (U/mg)	Katalase (U/mg)	GPx (U/g protein)
K(-)	368.5 ±5.73 ^c	1.82 ±0.13 ^{bcd}	411.58±1.74 ^c
K(+)	50.25 ±3.67 ^a	1.60 ±0.03 ^a	76.63 ±1.37 ^a
P10	94.92 ±7.89 ^{ab}	1.70±0.02 ^{ab}	204.98±9.12 ^b
P20	189.83±11.58 ^b	1.80±0.004 ^{abc}	360.67±1.00 ^c
P30	530.42 ±19.48 ^d	1.90 ±0.09 ^c	424.12±7.10 ^c
C10	89.33 ±7.89 ^a	1.71 ±0.00 ^{ab}	211.68±7.55 ^b
C20	189.83± 1.78 ^b	1.80 0.004 ^{abc}	376.74±9.96 ^c
C30	362.92 ±19.48 ^c	1.89 ±0.02 ^{de}	540.19±6.85 ^d
EDC+K	390.83 ±19.48 ^c	1.81 ±0.09 ^{bcd}	533.49±14.53 ^d

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+)= kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol, EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Peningkatan radikal bebas pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia diperlihatkan dengan meningkatnya kadar MDA hati dan ginjal (Tabel 2.6). Hal ini menyebabkan pemakaian enzim antioksidan

intrasel pada jaringan hati dan ginjal meningkat sehingga terjadi penurunan aktivitas enzim SOD, katalase, dan GPx pada jaringan hati dan ginjal kelinci pada kelompok tersebut (Tabel 2.7 dan 2.8).

Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif maupun kuratif selama 10, 20, dan 30 hari secara nyata ($P < 0.05$) meningkatkan aktivitas enzim antioksidan SOD, katalase, dan GPx pada jaringan hati dan ginjal. Demikian pula pada hasil uji beda Duncan menunjukkan bahwa kelompok kelinci preventif dan kuratif dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan pada hati dan ginjal dibandingkan dengan kelompok kelinci kontrol positif (hiperkolesterolemia). Hal yang sama juga terlihat pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan menunjukkan adanya perbedaan secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif.

Aktivitas enzim SOD meningkat sebesar 80.95-82.10% pada hati maupun ginjal kelinci dari hari ke-10 sampai hari ke-30 pemberian ekstrak daun cengkeh secara preventif. Pemberian ekstrak daun cengkeh secara kuratif menunjukkan peningkatan aktivitas SOD sekitar 71.43-75.39% dari hari-10 sampai hari ke-30. Dengan demikian, dikatakan pemberian ekstrak daun cengkeh dapat mengurangi tingkat oksidasi dan mencegah terbentuknya radikal superoksida pada jaringan hati dan ginjal.

Aktivitas enzim katalase pada jaringan hati dan ginjal juga mengalami peningkatan sebesar 10.53-11.29% pada kelompok preventif dan 9.52-10.50% pada kelompok kuratif dari hari ke-10 sampai hari ke-30. Aktivitas GPx pada jaringan hati dan ginjal meningkat sebesar 52.69-63.88% pada kelompok preventif dan pada kelompok kuratif mengalami peningkatan sebesar 58.13-60.81% dari hari ke-10 sampai hari ke-30.

Glutation peroksidase merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi sel, tidak hanya dari H_2O_2 , tetapi juga dari peroksidasi organik yang terbentuk pada oksidasi kolesterol dan asam lemak. Aktivitas enzim hati berperan dalam mereduksi 70% peroksidasi organik dan >90% H_2O_2 . Enzim ini dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol, dan fosfolipid teroksidasi pada membran sel darah merah atau lipoprotein. Ditemukan fakta bahwa ekstrak daun cengkeh mempunyai khasiat sebagai antioksidan dan memungkinkan memberi perlindungan pada kelinci terhadap kerusakan akibat radikal bebas yang terbentuk akibat hiperkolesterol. Seperti yang telah dilaporkan oleh Vidhya & Devaraj (1999) bahwa pemberian eugenol juga dapat meningkatkan aktivitas GPx pada usus tikus.

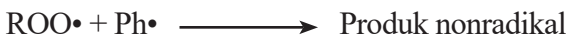
Proses penghambatan atau penghentian reaksi pada radikal bebas dari minyak atau lemak yang teroksidasi disebabkan oleh empat macam mekanisme reaksi, yaitu pelepasan hidrogen dari antioksidan, pelepasan elektron dari antioksidan, adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, dan pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan. Dengan penambahan antioksidan, maka energi dalam persenyawaan aktif ditangkap oleh antioksidan sehingga reaksi oksidasi terhenti (Kotamballi, 2002).

Pemberian ekstrak daun cengkeh pada kelinci ternyata dapat membantu kinerja enzim antioksidan dalam melawan radikal bebas tersebut sehingga aktivitas enzim antioksidan dapat dipertahankan. Tingginya aktivitas antioksidan pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh ada kaitannya dengan kemampuan antioksidatif komponen bioaktif ekstrak daun cengkeh, seperti eugenol. Komponen bioaktif ekstrak daun cengkeh tersebut dapat bekerja secara sinergis bersama dengan enzim antioksidan dalam menetralkan radikal

bebas endogen sehingga aktivitas enzim antioksidan endogen baik pada jaringan hati maupun ginjal kelinci dapat dipertahankan.

Dari hasil pemaparan tersebut di atas dapat dikatakan bahwa kondisi hiperkolesterolemia menyebabkan peningkatan radikal bebas, yang selanjutnya menyebabkan penurunan aktivitas enzim antioksidan intrasel pada kelompok kelinci kontrol positif. Sebaliknya, pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif maupun diberikan secara bersamaan dengan kolesterol dapat meningkatkan aktivitas enzim antioksidan baik SOD, katalase, maupun GPX.

Mekanisme tingginya aktivitas antioksidan baik SOD, katalase, dan GPx pada kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif, kuratif maupun diberikan kolesterol secara bersamaan dapat dijelaskan sebagai berikut: *Pertama*, kandungan fenol pada ekstrak daun cengkeh dapat menekan produksi radikal bebas akibat kondisi hiperkolesterolemia, sehingga aktivitas enzim antioksidan dapat dipertahankan. Menurut Maestri *et al* (2006), antioksidan fenolik (PhH) dapat bereaksi dengan ROO• menghasilkan ROOH dan radikal fenoksil nonreaktif. Selanjutnya, Ph• melalui reaksi rantai terminasi dengan ROO• menghasilkan produk nonradikal (Ph•), sebagaimana terlihat dalam reaksi di bawah ini:



Kedua, senyawa fenol dalam ekstrak daun cengkeh dapat mengurangi oksidasi aktivitas sitokrom P450 (Halliwell dan Gutteridge 1995). Peningkatan aktivitas enzim sitokrom P-450 oksidase akan menghasilkan radikal bebas yang berlebihan. Bila produksi radikal bebas terjadi secara berlebihan maka enzim antioksidan tubuh tidak mampu mengatasinya. Pada akhirnya terjadi kondisi *stress* oksidasi,

yaitu jumlah radikal bebas melebihi jumlah dan kapasitas antioksidan tubuh (Wresdiyati *et al*, 2006a). Oleh karena itu, sangat diperlukan antioksidan eksogen untuk mengurangi produksi radikal bebas yang berlebihan, khususnya pada kondisi hiperkolesterolemia.

Ketiga, senyawa fenol dalam ekstrak daun cengkeh mampu meningkatkan aktivitas enzim antioksidan. Peningkatan aktivitas enzim antioksidan menurut Capeyron (2002) sangat berkaitan dengan modulasi aktivitas faktor transkripsi seperti protein aktivator (AP-1) dan faktor nukleus KB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$). AP-1 dan $\text{NF-}\kappa\text{B}$ yang berlokasi pada daerah regulator gen inflamasi seperti molekul adesi, sitokin, dan enzim antioksidan. Kondisi stress oksidatif seperti hiperkolesterolemia menyebabkan peningkatan aktivitas transkripsi AP-1 dan $\text{NF-}\kappa\text{B}$ sehingga menyebabkan penurunan aktivitas enzim antioksidan. Tapi sebaliknya, bila ada antioksidan eksogen yang dapat mencegah produksi radikal bebas, maka aktivitas transkripsi AP-1 dan $\text{NF-}\kappa\text{B}$ menurun dan meningkatkan aktivitas antioksidan. Peningkatan aktivitas transkripsi tersebut dapat dicegah oleh antioksidan lipofilik seperti tokoferol dan asam fenolik. Senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak daun cengkeh, khususnya eugenol, termasuk dalam kelompok antioksidan lipofilik.

2.4.2.5 *Kandungan Antioksidan Copper, Zinc-Superoxide Dismutase (Cu, Zn-SOD) pada Jaringan Hati dan Ginjal*

Pewarnaan imunohistokimia dilakukan dengan tujuan untuk mendeteksi kandungan atau komponen aktif yang ada dalam jaringan atau sel dengan prinsip ikatan antigen dan antibodi. Pewarnaan imunohistokimia dilakukan untuk mendeteksi kandungan enzim Cu,Zn-SOD imunohistokimia pada inti dan sitoplasma sel hati dan sel tubuli renalis ginjal kelinci menggunakan antibodi monoklonal Cu,Zn-SOD.

Hasil pewarnaan imunohistokimia memperlihatkan sel-sel penghasil Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal memberikan reaksi positif terhadap Cu,Zn-SOD. Hasil reaksi positif terhadap Cu,Zn-SOD memberikan warna cokelat yang terlihat baik pada sitoplasma maupun inti sel hati dan sel tubuli renalis. Pengamatan kuantitatif dilakukan terhadap inti sel hati dan sel tubulus renalis yang memberikan reaksi positif pada berbagai tingkat kandungan Cu,Zn-SOD dan yang memberikan reaksi negatif terhadap antioksidan tersebut. Hasil perhitungan terhadap inti sel hati dan ginjal tiap lapang pandang dengan pembesaran 400x disajikan pada Tabel 2.9 dan Tabel 2.10.

Tabel 2.9 Rataan Jumlah Sel Hati pada Berbagai Tingkat Kandungan Cu,Zn-SOD per lapang pandang (20x)

Perlakuan	Tingkat Kandungan Cu, Zn-SOD			
	-	+	++	+++
K(-)	36.44± 2.54 ^{ab}	17.67± 1.76 ^a	17.11±1.40 ^{abc}	29.33±1.95 ^{ab}
K(+)	127.33± 6.40 ^c	17.00±1.74 ^a	2.00±1.63 ^b	0.00± 0.00 ^a
P10	55.56 ±5.06 ^b	33.11 ±1.05 ^a	11.67 ±3.68 ^{ab}	28.53± 2.92 ^{ab}
P20	47.22± 4.78 ^{ab}	29.56± 1.59 ^a	16.45±10.76 ^{ab}	45.78±2.06 ^{bc}
P30	25.22± 1.89 ^a	22.11± 2.79 ^a	59.11± 3.03 ^c	95.44±4.14 ^{de}
C10	60.00± 5.97 ^b	24.00±2.99 ^a	22.44±1.97 ^{abc}	68.22±3.51 ^{cd}
C20	39.00± 3.38 ^{ab}	27.44± 1.31 ^a	32.33±1.43 ^{bcd}	89.11±5.72 ^{de}
C30	29.44± 1.31 ^a	23.78± 2.33 ^a	56.45± 1.86 ^{de}	103.72±9.40 ^e
EDC+Kolest.	49.11± 3.12 ^{ab}	26.33±2.04 ^a	40.44±1.48 ^{cde}	92.11±2.65 ^{de}

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. +++: positif kuat, ++: positif sedang, +/-: positif lemah, -: negatif.

Hasil analisis sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun cengkeh berpengaruh nyata pada kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal kelinci. Kandungan Cu,Z-SOD pada jaringan hati dan ginjal kelinci hiperkolesterolemia menunjukkan paling rendah secara nyata ($P<0.05$) dibandingkan kelompok perlakuan lainnya. Hal ini terlihat dari paling tingginya jumlah sel-sel hati dan ginjal yang memberikan reaksi negatif dan paling sedikitnya jumlah sel-sel hati dan ginjal yang memberikan reaksi positif pada kelompok kontrol positif dibandingkan kelompok lainnya.

Tabel 2.10 Rataan Jumlah Sel Tubulus Renalis pada Berbagai Tingkat Kandungan Cu, Zn-SOD per Lapang Pandang (20x)

Perlakuan	Tingkat Kandungan Cu, Zn-SOD			
	-	+	++	+++
K(-)	33.22± 1.76 ^{ab}	30.78±1.61 ^a	31.44± 2.60 ^b	27.34±1.38 ^{ab}
K(+)	107.56± 7.48 ^e	21.78± 1.63 ^a	3.89±0.19 ^a	0.00±0.00 ^a
P10	60.78± 1.17 ^{cd}	27.56± 1.84 ^a	30,33±1,41 ^b	18.89±1.17 ^{ab}
P20	59.00± 1.27 ^{bcd}	32.67± 3.59 ^a	34.00±1.86 ^{bc}	35.89±1.93 ^b
P30	36.50± 2.02 ^{abc}	34.22±3.66 ^a	49.67±2.81 ^{cd}	96.67±5.14 ^d
C10	69.44± 4.18 ^d	26.56±1.34 ^a	25.39±1.00 ^b	21.78±1.34 ^{ab}
C20	59.00± 2.23 ^{bcd}	45.00±2.65 ^a	27.11±1.30 ^b	45.45±3.28 ^{bc}
C30	18.22± 1.88 ^a	54.67±3.65 ^a	53.44±3.12 ^d	78.78±1.36 ^d
EDC+Kolest.	33.33± 1.87 ^{ab}	73.22±2.61 ^a	54.56±3.62 ^d	69.11±5.19 ^{cd}

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.+++ : positif kuat, ++: positif sedang, +/-: positif lemah, -: negatif.

Penurunan kandungan Cu,Zn-SOD pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia pada sel hati dan tubuli renalis terlihat dari intensitas warna cokelat yang terbentuk jauh lebih lemah dibanding kelompok kontrol negatif, kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif, kuratif, dan diberi kolesterol secara bersamaan (Gambar 10 dan Gambar 11).

Tabel 2.11 Rataan Jumlah Butiran Lemak pada Jaringan per Lapang Pandang (40x)

Perlakuan	Jumlah butiran lemak pada sel hati
K(-)	0.00±0.00 ^a
K(+)	62.33±3.05 ^f
P10	16.67±0.58 ^d
P20	13.78±1.57 ^c
P30	0.00±0.00 ^a
C10	20.67±0.58 ^c
C20	17.33±0.58 ^d
C30	4.67±0.58 ^b
EDC+Kolest.	4.00±0.00 ^b

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

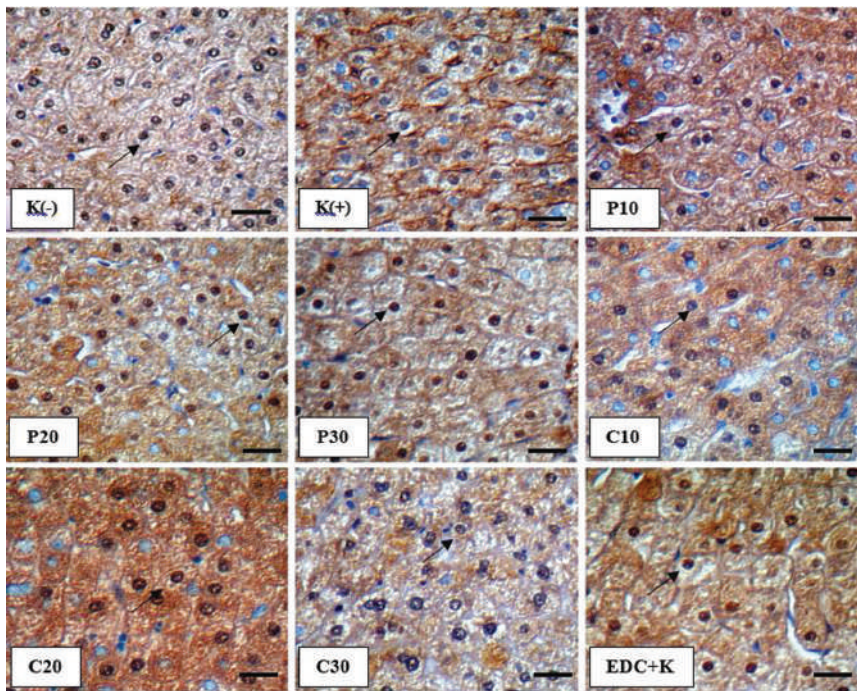
Pemberian ekstrak daun cengkeh secara preventif baik selama 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, hal yang sama juga terlihat pada jaringan ginjal. Bahkan pada kelompok P(20) dan P(30) kandungan Cu,Zn-

SOD jaringan hati lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol negatif. Demikian pula terlihat pada jaringan ginjal. Untuk kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara kuratif baik selama 10, 20, dan 30 hari setelah diberi kolesterol juga menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yang tidak diberi ekstrak daun cengkeh. Kandungan Cu,Zn-SOD jaringan hati dan ginjal paling tinggi di antara kelompok kuratif adalah kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari, bahkan lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif. Demikian pula halnya dengan kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD lebih tinggi secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif.

Penambahan kolesterol 1% pada pakan, selain meningkatkan kadar kolesterol plasma, juga meningkatkan kadar kolesterol hati. Peningkatan kadar kolesterol seiring dengan peningkatan radikal bebas dari hasil pengukuran kadar MDA baik pada hati maupun pada ginjal kelinci (Tabel 2.6). Hal ini disebabkan karena pada kondisi hiperkolesterolemia terjadi peningkatan aktivitas sitokrom P-450 yang mengoksidasi asam lemak pada hati dan ginjal kelinci percobaan. Radikal bebas yang terbentuk dari hasil samping oksidasi tersebut juga akan meningkat sehingga dibutuhkan antioksidan tubuh yang lebih banyak untuk menanggulangi radikal bebas tersebut. Oleh karena itu, antioksidan tubuh, terutama Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal, menurun. Hal inilah yang menyebabkan terjadinya penurunan kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal kelinci kelompok hiperkolesterolemia pada penelitian ini.

Pemberian ekstrak daun cengkeh pada kelompok preventif dan kuratif memperlihatkan peningkatan kandungan Cu,Zn-SOD pada sel hati dan ginjal kelinci. Hal ini menunjukkan bahwa komponen aktif

dari ekstrak daun cengkeh memberi pengaruh langsung pada peningkatan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati kelinci.

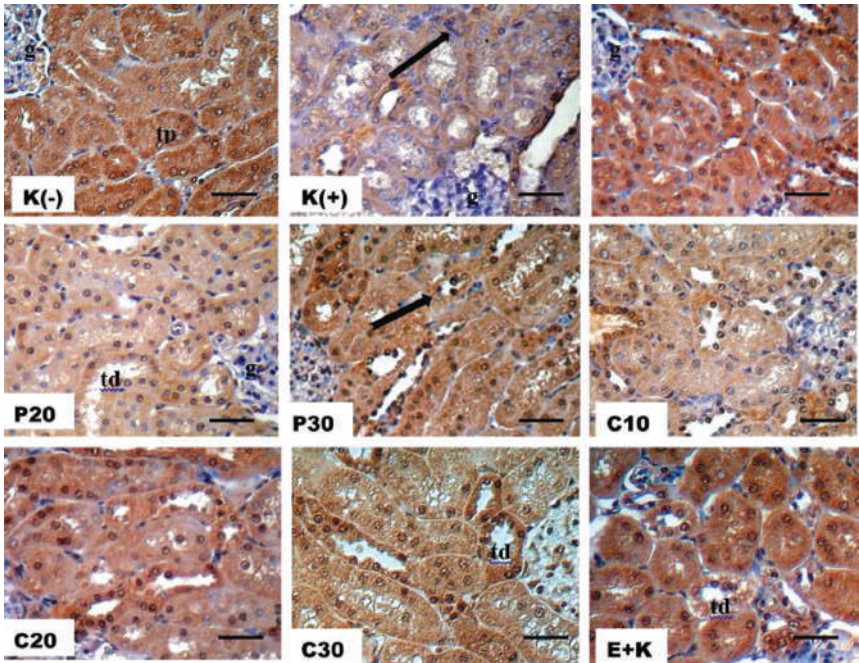


Gambar 2.6 Fotomikrograf Jaringan Hati Kelinci yang Diwarnai Secara Immunohistokimia terhadap Kandungan Cu,Zn-SOD

Keterangan Gambar:

Produk reaksi positif pada kandungan Cu,Zn-SOD terlihat pada inti sel berwarna coklat. Kondisi hiperkolesterolemia menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD paling rendah. Dengan pemberian ekstrak daun cengkeh menunjukkan peningkatan kandungan Cu,Zn-SOD. Kandungan Cu,Zn-SOD paling tinggi pada kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari secara preventif (P10) dan kuratif (C30) dan diberi kolesterol secara bersamaan (EDC+K).

K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Tanda Panah = inti sel, Skala 50 µm.



Gambar 2.7 Fotomikrograf Jaringan Ginjal Kelinci Perlakuan yang Diwarnai Secara Immunohistokimia terhadap Kandungan Cu,Zn-SOD

Keterangan Gambar:

Produk reaksi positif pada kandungan Cu,Zn-SOD terlihat pada inti sel dan sitoplasma pada tubuli renalis ginjal berwarna coklat. Kondisi hiperkolesterolemia menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD paling rendah. Dengan pemberian ekstrak daun cengkeh menunjukkan peningkatan kandungan Cu,Zn-SOD. Kandungan Cu,Zn-SOD paling tinggi pada kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari secara preventif (P10) dan kuratif (C30) dan diberi kolesterol secara bersamaan (EDC+K).

K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Tanda Panah = inti sel, Skala 50 μm . td = tubulus distalis, tp = tubulus proksimalis, g = glomeruli.

Berdasarkan hasil fotomikrografi pada Gambar 2.6 dan Gambar 2.7 dapat diketahui pula bahwa kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan memperlihatkan peningkatan intensitas warna cokelat sitoplasma pada sel hati dan sel tubuli renalis jika dibanding dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif.

Peningkatan aktivitas enzim antioksidan secara *in vivo* telah lama dilakukan dengan memberi hewan coba dengan berbagai ekstrak buah-buahan, sayur-sayuran, atau rempah-rempahan yang mengandung senyawa fenol yang tinggi. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa senyawa fenol mempunyai tingkat penyerapan dan ketersediaan dalam tubuh yang relatif tinggi dan dengan pemberian jangka waktu yang lama dapat memicu peningkatan aktivitas enzim antioksidan di antaranya enzim SOD. Selain itu, komponen fenol juga memiliki daya antioksidatif lebih tinggi dibanding α -tokoferol, seperti pada oleoresin dari jahe (Decorde, 2008; Croft, 1999; Wresdiyati, 2003).

Demikian pula, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kandungan eugenol sebagai salah satu derivat senyawa fenol, dapat mencegah peningkatan radikal bebas sehingga kandungan antioksidan Cu,Zn-SOD baik pada jaringan hati maupun ginjal dapat dipertahankan. Hal ini terlihat pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif dan kuratif selama 10, 20, dan 30 hari maupun yang diberi kolesterol selama 50 hari.

2.4.2.6 *Gambaran Histologi Jaringan Hati dan Ginjal Kelinci*

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa terjadi degenerasi lemak pada jaringan hati pada kelompok kontrol positif yang secara nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun cengkeh. Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif

maupun yang diberi kolesterol secara bersamaan selama 50 hari menunjukkan tingkat degenerasi lemak yang tidak berbeda secara nyata ($P>0.05$) dibanding kelompok kontrol negatif (Tabel 2.12).

Jumlah butiran lemak pada jaringan hati pada kelompok kontrol positif paling banyak (45.67 ± 14.82) secara nyata ($P<0.05$) dibandingkan kelompok kontrol negatif (0.00 ± 0.00). Hal ini juga terlihat pada Gambar 12, hati pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia menunjukkan butiran lemak paling banyak dibanding kelompok kontrol negatif. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ada korelasi positif antara terjadinya hiperkolesterolemia dan kejadian perlemakan hati. Terjadinya perlemakan dalam sel hati memperlihatkan adanya ketidakseimbangan proses metabolisme normal yang mempengaruhi kadar lemak di dalam hati dan di luar jaringan hati. Keadaan perlemakan tidak merusak sel hati dan umumnya tidak memperlihatkan gejala kelainan. Namun, jika berlangsung lama, hati akan mengalami gangguan fungsional, bahkan dapat menjadi fibrotik serta sirosis. Pemberian ekstrak daun cengkeh dapat mengatasi superoksida dismutase pada jaringan hati kelinci dalam kondisi hiperkolesterolemia. Ekstrak daun cengkeh secara preventif mempertahankan aktivitas SOD dan kandungan Cu, Zn-SOD. Ekstrak metanol daun cengkeh secara simultan selama 50 hari meningkatkan SOD keduanya aktivitas (8,992 kali) dan kandungan Cu, Zn-SOD (Mu'nisa, A. *et al.*, 2013).

Terhambatnya oksidasi asam lemak mengakibatkan akumulasi asam lemak yang selanjutnya diubah menjadi trigliserida. Hal ini meningkatkan kadar trigliserida dalam hati dan menginduksi hati untuk memperbanyak produksi VLDL. Jika laju sintesis trigliserida melebihi kapasitas hati untuk mengubahnya menjadi VLDL, butiran trigliserida terakumulasi di dalam hati dan menghasilkan perlemakan hati (Marinetti, 1990).

Pemberian ekstrak daun cengkeh secara preventif baik selama 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif yang tidak diberi ekstrak daun cengkeh. Kelompok preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 hari menunjukkan jumlah butiran lemak yang paling banyak, namun tidak berbeda secara nyata ($P > 0.05$) dengan kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 20 dan 30 hari sebelum diberi kolesterol (Tabel 2.11).

Kelompok kelinci kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama baik 10, 20, dan 30 hari menunjukkan jumlah butiran lemak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif. Kelompok kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari menunjukkan jumlah butiran lemak paling sedikit secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif, tapi tidak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 dan 20 hari setelah diberi kolesterol (Tabel 2.12).

Pengobatan menggunakan ekstrak daun cengkeh pada kelinci dapat membantu kinerja enzim antioksidan terhadap radikal bebas sehingga aktivitas enzim antioksidan dapat dipertahankan. Tingginya aktivitas antioksidan pada kelinci yang diberi pakan kelompok ekstrak daun cengkeh berhubungan dengan kemampuan antioksidan komponen bioaktif ekstrak daun cengkeh, seperti eugenol. Daun cengkeh ekstrak komponen bioaktif dapat bekerja secara sinergis dengan enzim antioksidan di dalamnya menetralkan radikal bebas sehingga aktivitas endogen antioksidan endogen enzim pada jaringan hati kelinci dapat dipertahankan (Mu'nisa, A. *et al.*, 2013).

Hasil pengamatan pada organ ginjal semua kelompok kelinci dengan pembesaran 400 kali disajikan pada Gambar 2.7. Dari gambar tersebut dapat dilihat bahwa pada corpusculus renalis kelompok kelinci kontrol positif terjadi pengendapan protein dalam jumlah besar.

Hal ini sejalan dengan hasil statistik yang menunjukkan bahwa jumlah corpusculus renalis dengan endapan protein pada jaringan ginjal pada kelompok kontrol positif secara nyata ($P < 0.05$) lebih tinggi dibanding kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun cengkeh. Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif maupun yang diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari menunjukkan jumlah corpusculus renalis dengan endapan protein tidak berbeda secara nyata ($P > 0.05$) dibanding kelompok kontrol negatif (Tabel 2.12).

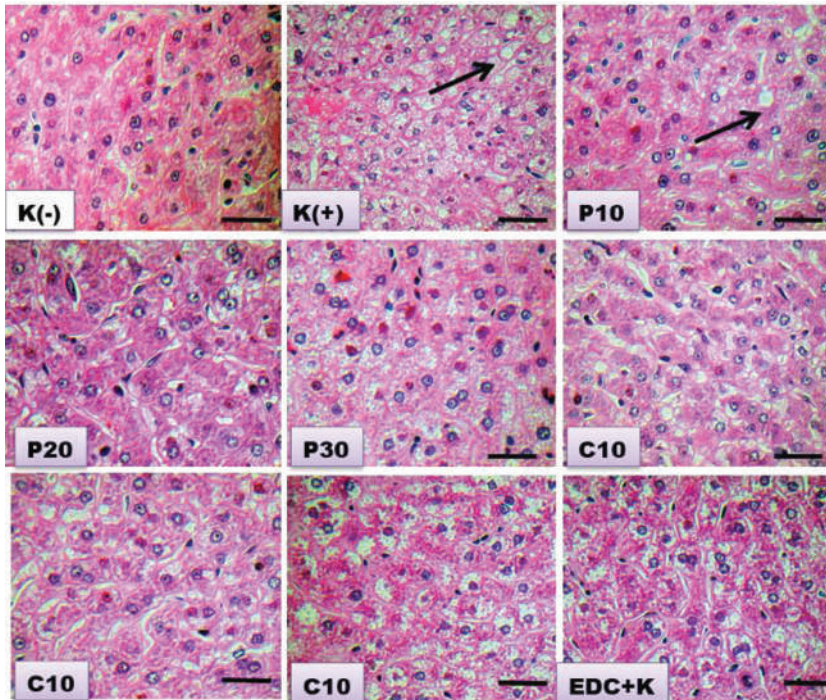
Tabel 2.12 Rataan Jumlah Corpusculus Renalis dengan Pengendapan Protein pada Jaringan Ginjal per Lapang Pandang (40x)

Perlakuan	Jumlah corpusculus renalis dengan endapan protein
K(-)	0.00± 0.00 ^a
K(+)	25.67± 1.15 ^e
P10	12.50± 0.71 ^d
P20	8.67±0.58 ^c
P30	0.00± 0.00 ^a
C10	12.33±1.15 ^d
C20	11.33± 0.58 ^d
C30	1.67± 0.58 ^b
EDC+Kolest.	1.33± 0.58 ^a

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Pada penelitian ini, kelompok kelinci kontrol positif mengalami hiperkolesterolemia. Salah satu sindrom yang terlihat pada keadaan ini adalah mikroalbuminuria. Mikroalbuminuria tersebut berkaitan dengan disfungsi endotel, *stress* oksidatif, diabetes mellitus, dislipidemia, dan juga meningkatkan kejadian aterosklerosis. Hal ini mengindikasikan terjadinya gangguan ginjal dan mempengaruhi perkembangan penyakit arteri koroner (Mann, 2008). Protein albumin merupakan endapan protein yang terdapat pada glomerulus dan keluar dari membran dasar glomerulus. Protein albumin yang ada dalam darah mengalami sirkulasi ke dalam ginjal, tetapi sebagian tidak dapat direabsorpsi kembali dan mengendap karena adanya gangguan pada membran dasar tubuli renalis.



Gambar 2.8 Fotomikrograf Jaringan Hati Kelinci yang Diwarnai dengan Hematoksilin Eosin

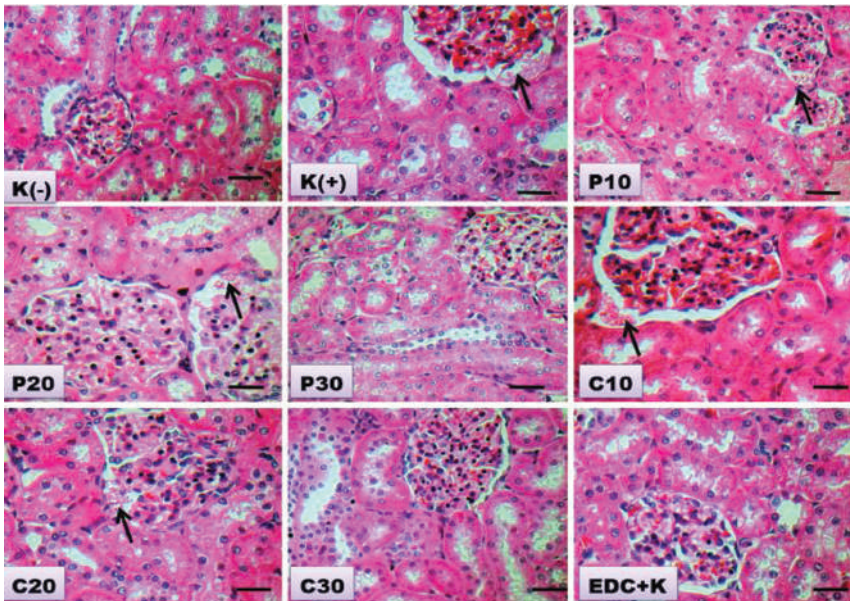
Glomerulus merupakan filter dalam nefron sebagai penyaring cairan yang masuk ke dalam ginjal. Kerusakan glomerulus sering kali terjadi sebagai akibat pengendapan kompleks imun, trombosis, emboli, atau infeksi langsung oleh virus dan bakteri. Dalam kondisi normal, glomerulus menyaring darah dan memisahkan sel serta komponen protein dari air, elektrolit dan molekul dengan bobot molekul rendah lainnya. Membran dasar glomerulus mempunyai muatan negatif sehingga menurunkan filtrasi protein karena protein merupakan molekul anionik yang sangat negatif. Sejumlah kecil protein akan tersaring, tetapi direabsorpsi kembali oleh tubula. Sebagai akibatnya, pada kondisi normal urin mengandung protein setidaknya kurang dari 150 mg/hari.

Namun adanya sejumlah kecil protein dalam urin, khususnya albumin, merupakan indikator penyakit dan menggambarkan perkembangan penyakit ginjal lanjut atau perkembangan vaskular pada bagian lain dari tubuh (Weiner, 2003).

Pemberian ekstrak daun cengkeh secara preventif baik selama 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol tidak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol negatif. Kelompok preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 hari menunjukkan jumlah corpusculus renalis pada jaringan ginjal yang paling banyak namun tidak berbeda secara nyata dengan kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 20 hari. Kelompok kelinci preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari sebelum diberi kolesterol tidak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 20 hari sebelum diberi kolesterol dan menunjukkan jumlah corpusculus renalis yang paling rendah secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kontrol positif dan kelompok preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 hari sebelum diberi kolesterol (Tabel 2.12).

Kelompok hiperkolesterolemia (K+) terlihat paling banyak jumlah butiran lemak dibanding kelompok lainnya. Kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif, kuratif, dan diberi kolesterol secara bersamaan terlihat jumlah butiran lemak mengalami penurunan. Kelompok preventif (P30) dan kuratif (C30) yang diberi ekstrak daun cengkeh dan diberi kolesterol secara bersamaan tidak menunjukkan adanya butiran lemak kontrol negatif.

K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Tanda panah: butiran lemak. Skala 50 μ m.



Gambar 2.9 Fotomikrograf Jaringan Ginjal Kelinci yang Diwarnai Hematoksilin Eosin

Kelompok kelinci kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama baik 10, 20, dan 30 hari setelah diberi kolesterol berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif. Kelompok kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari menunjukkan jumlah korpus renalis paling sedikit secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif dan tidak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 20 dan 30 hari setelah diberi kolesterol.

Adanya pengaruh pencegahan dan perbaikan massa protein pada glomerulus dari ekstrak daun cengkeh tentu memberikan pengaruh yang menguntungkan bagi tubuh dan akan memberi manfaat lain dari kelompok senyawa penyusun daun cengkeh bagi kesehatan ginjal.

Kelompok kontrol positif (K+) terlihat adanya endapan protein. Dengan pemberian ekstrak daun cengkeh selama 30 hari baik secara preventif maupun kuratif serta diberi kolesterol secara bersamaan tidak menunjukkan adanya endapan protein.

K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari. Tanda panah: endapan protein. Skala 50 μm .

2.4.2.7 Kejadian Aterosklerosis pada Aorta Kelinci Percobaan

Telah dilaporkan bahwa penambahan kolesterol 1% pada kelinci dapat meningkatkan kadar kolesterol serum dan terbentuknya plak pada aorta kelinci. Kelinci strain *New Zealand* merupakan salah satu hewan model untuk melihat kejadian aterosklerosis karena ada kesamaan dengan manusia, yaitu mempunyai protein transfer ester

kolesteril yang penting dalam proses aterosklerosis (Weisbroth *et al.* 1974).

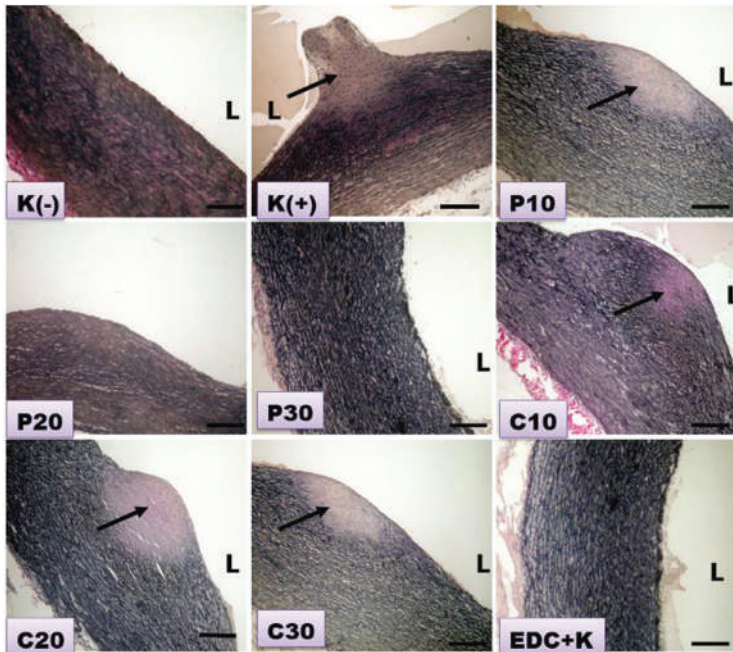
Tabel 2.13 Rataan Pembentukan Lesi Aorta per Lapangan Pandang (20x)

Perlakuan	Tebal Plak Aorta (μm)
K(-)	0.000 \pm 0.00 ^a
K(+)	0.517 \pm 0.057 ^c
P10	0.063 \pm 0.049 ^b
P20	0.030 \pm 0.008 ^a
P30	0.000 \pm 0.000 ^a
C10	0.089 \pm 0.017 ^b
C20	0.066 \pm 0.025 ^b
C30	0.024 \pm 0.016 ^a
EDC+Kolest.	0.000 \pm 0.000 ^a

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%. Keterangan: K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

Pemberian ekstrak daun cengkeh kepada kelinci dimaksudkan untuk melihat pengaruh secara langsung pada pembentukan plak yang merupakan indikator terjadinya aterosklerosis. Hasil penelitian memperlihatkan bahwa lesi yang terbentuk pada kelompok kelinci kontrol positif termasuk pada lesi tahap awal, yaitu adanya garit lemak pada dinding aorta. Hasil analisis sidik ragam terhadap pembentukan plak pada aorta menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun cengkeh berpengaruh secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kontrol positif. Hasil pengamatan pembentukan lesi aorta pada kelompok kelinci perlakuan tersaji pada Tabel 2.13.



Gambar 2.10 Fotomikrograf Aorta Kelinci yang Verhoeff–van Gieson

Keterangan Gambar:

Pada kelompok hiperkolesterolemia (K+) menunjukkan terbentuknya plak aorta yang paling besar dibanding kelompok lainnya. Pada kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif selama 30 hari (P30) dan pemberian secara bersamaan dengan kolesterol (EDC+K) menunjukkan tidak adanya plak aorta. K(-) = kontrol negatif, K(+) = kontrol positif (hiperkolesterolemia), P10, P20, P30 = Preventif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol), C10, C20, C30 = kuratif (diberi ekstrak daun cengkeh 10, 20, dan 30 hari sesudah diberi kolesterol), EDC+Kolest.= diberi ekstrak daun cengkeh dan kolesterol secara bersamaan selama 50 hari.

L=lumen. Skala 100 μ m.

Tanda Panah : Plak aorta

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kelinci kontrol negatif tetap memiliki dinding aorta yang normal dan berbeda nyata dibanding kelompok kelinci kontrol positif. Kelompok kontrol positif

(hiperkolesterolemia) menunjukkan adanya pembentukan lesi (plak) setelah mendapat kolesterol sebesar 1% selama 50 hari (Gambar 2.10).

Berdasarkan hasil penghitungan nilai indeks aterogenik pada Tabel 2.5 menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif memiliki resiko paling besar terkena aterosklerosis dibanding kelompok perlakuan lainnya. Adapun nilai indeks aterogenik pada kelompok kontrol positif adalah 8.838, sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok yang diberi ekstrak daun cengkeh baik secara preventif, kuratif, dan diberi kolesterol secara bersamaan memiliki nilai indeks aterogenik di bawah 4.50. Hal ini menunjukkan bahwa kelompok perlakuan tersebut memiliki resiko terkena aterosklerosis sangat kecil dibandingkan kelompok kontrol positif.

Hiperkolesterolemia biasanya diikuti dengan tingginya kadar LDL, yang membawa sekitar 60% kolesterol dari hati ke jaringan perifer. Metabolisme LDL diawali dengan terikatnya partikel LDL pada reseptor spesifik apo B-100/E, yang terletak pada permukaan sel. Reseptor LDL bereaksi dengan ligan pada LDL dan LDL diambil dalam keadaan utuh melalui endositosis. Setelah melepaskan LDL, reseptor kembali ke permukaan sel. Lipoprotein berkepadatan rendah tersebut yang terpisah masuk ke dalam lisosom. Di dalam lisosom komponen protein LDL dihidrolisis oleh protease lisosom menjadi asam amino dan komponen ester kolesterol dihidrolisis oleh kolesterol esterase menjadi kolesterol bebas dan asam lemak.

Asam lemak dioksidasi menjadi asetil Co-A atau disintesis dari asetil Co-A. Di semua sel tubuh, asam lemak akan dioksidasi oleh β -oksidasi di mitokondria dan peroksisom. Pada kondisi normal, β -oksidasi di peroksisom hanya merupakan jalur minor untuk mengoksidasi asam lemak. Namun, pada kondisi kelaparan, diabetes, dan diet tinggi lemak, jalur ini meningkat (Orellana *et al.*, 1992).

Meningkatnya β -oksidasi akan meningkatkan jumlah radikal bebas sebagai hasil sampingnya. Kolesterol bebas yang dihasilkan dari proses hidrolisis ester kolesterol komponen LDL, mempunyai fungsi regulator, yaitu menurunkan jumlah m-RNA sehingga menekan reseptor LDL dan mencegah masuknya LDL ke dalam sel dan mengatur aktivitas HMG-KoA reduktase dan ACAT. Selain itu, kolesterol bebas digunakan untuk membentuk asam kolat yang merupakan dasar dari asam empedu yang disintesis dalam hati. Reaksi 7α -hidroksilasi terhadap kolesterol merupakan tahap pertama dalam biosintesis asam empedu. Reaksi tersebut dikatalisis oleh 7α -hidroksilase, suatu enzim mikrosomal yang memerlukan oksigen, NADPH, dan sitokrom P-450 oksidase. Dengan meningkatnya konsentrasi kolesterol plasma dalam tubuh pada kondisi hiperkolesterolemia maka semakin banyak asam empedu yang disintesa dan terjadi pemakaian lebih banyak oksigen dan NADPH, serta peningkatan aktivitas sitokrom P-450 oksidase (Mayes, 1997). Peningkatan aktivitas P-450 oksidase akan menghasilkan radikal bebas yang berlebihan. Bila produksi radikal bebas terjadi secara berlebihan maka enzim antioksidan tubuh tidak mampu mengatasinya. Akhirnya dapat terjadi *stress* oksidatif yaitu jumlah radikal bebas melebihi jumlah dan kapasitas antioksidan tubuh. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya berbagai penyakit degeneratif karena radikal bebas tersebut cenderung menyerang biomakromolekul penyusun sel atau jaringan sehingga sel atau jaringan dapat mengalami kerusakan.

Hasil analisis profil lipid darah pada akhir percobaan menunjukkan adanya peningkatan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida serum darah pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia. Peningkatan tersebut berbeda sangat nyata ($P < 0.05$) dibanding dengan kelompok kelinci kontrol negatif. Sebaliknya, kadar HDL mengalami penurunan secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci kontrol negatif pada akhir percobaan.

Kondisi hiperkolesterolemia dapat meningkatkan β -oksidase dan sitokrom P-450 oksidase dan mengakibatkan terjadinya peningkatan radikal bebas sebagai produk sampingnya. Hal ini terlihat dari hasil pengukuran kadar MDA pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia. Tingginya kadar MDA tersebut mengindikasikan adanya peningkatan radikal bebas dalam tubuh kelinci. Jumlah radikal bebas yang meningkat, memerlukan jumlah antioksidan yang tinggi pula untuk mengatasi radikal bebas tersebut. Keadaan ini menyebabkan terjadinya penurunan aktivitas antioksidan endogen, seperti superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase, dan kandungan enzim antioksidan Cu, Zn-SOD. Penurunan aktivitas enzim ini terlihat pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia baik pada aktivitas enzim SOD, katalase, dan GPx serta kandungan Cu, Zn-SOD, baik pada jaringan hati maupun ginjal.

Kondisi hiperkolesterolemia menurunkan level kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal tikus. Penurunan level kandungan antioksidan Cu, Zn-SOD tersebut menunjukkan tingkat produksi radikal bebas yang tinggi pada jaringan hati dan ginjal tikus hiperkolesterolemia (Wresdiyati *et al.* 2006a; 2006b). Menurut Lee *et al.* (2008) dan Pandya *et al.* (2006), kondisi hiperkolesterolemia meningkatkan produksi radikal bebas oksigen dan menaikkan kadar malondialdehid (MDA) dan XO, serta menekan sistem antioksidan seperti SOD, katalase, dan GPx pada jaringan hati tikus.

Kadar LDL serum yang tinggi merupakan penyebab utama penyakit aterosklerosis. Hal ini terlihat pada kelompok kelinci hiperkolesterolemia yang menunjukkan penebalan plak yang lebih besar dibanding kelompok kontrol negatif. Plak yang terbentuk masih pada tahap pembentukan garis lemak (*fatty streak*), yang secara makroskopis terlihat dinding arteri sedikit menonjol ke dalam lumen membentuk geligir.

Kondisi hiperkolesterolemia dapat mengganggu fungsi endotel dengan meningkatnya produksi radikal bebas oksigen. Radikal ini menonaktifkan oksida nitrat, yaitu faktor *endothelial-relaxing* utama. Bila keadaan ini berlanjut terus, akan terjadi penimbunan lipoprotein dalam lapisan intima di tempat meningkatnya permeabilitas endotel. Pemaparan terhadap radikal bebas dalam sel endotel dinding arteri menyebabkan terjadinya oksidasi LDL, yang berperan dan mempercepat timbulnya plak aterosklerosis (Price & Wilson, 2006).

Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara preventif selama 10 dan 20 hari sebelum diberi kolesterol memiliki aorta yang relatif normal, hanya mempunyai sedikit penebalan pada dinding aortanya. Hal ini sejalan dengan hasil uji Duncan yang menunjukkan kelompok kelinci preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 dan 20 hari sebelum diberi kolesterol tidak berbeda secara nyata dengan kelompok kontrol negatif. Kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 30 hari sebelum diberi kolesterol tetap memiliki dinding aorta yang normal. Hal ini serupa dengan kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh yang diberi secara kuratif selama 30 hari tidak berbeda secara nyata ($P < 0.05$) dengan kelompok kontrol negatif, kelompok kelinci preventif, dan kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh secara bersamaan dengan kolesterol selama 50 hari.

Kejadian aterosklerosis pada kelompok preventif dapat dicegah. Hal ini disebabkan kadar LDL serum lebih rendah secara nyata ($P < 0.05$) dibanding kelompok kelinci kontrol positif (hiperkolesterolemia). Adanya fenomena terbentuknya lesi pada kelompok kelinci preventif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10 dan 20 hari menunjukkan bahwa pembentukan lesi aterosklerosis bergantung pada lamanya pemberian ekstrak daun cengkeh. Hal ini disebabkan karena untuk pemberian ekstrak daun cengkeh selama 30 hari sebelum

diberi kolesterol tidak terbentuk adanya lesi aterosklerosis pada aorta kelinci.

Perkembangan aterosklerosis sangat dipengaruhi oleh konsentrasi kolesterol total, tekanan darah, oksidasi LDL, merokok, dan penambahan usia. Mekanisme terjadinya aterosklerosis didasarkan pada hipotesis “respons terhadap luka” (*response to injury hipotesis*), yang diinisiasi oleh luka terhadap sel endotel. Dalam hipotesis ini, peranan endotel dianggap penting, yaitu sebagai pembatas dan pelindung dinding arteri. Dengan demikian, bila endotel luka akan merusak fungsinya sehingga akan menginisiasi proses aterosklerosis (Cotran *et al.*, 1995).

Aterosklerosis adalah penyakit kronis yang melibatkan deposit kolesterol dan lemak di dalam dinding arteri. Terdapat korelasi positif antara trigliserida, kolesterol plasma, dan produk peroksidasi lipid pada penderita aterosklerosis tersebut (Ledwozyw *et al.* 1986). Hal ini terlihat pada kelompok preventif memiliki kadar kolesterol total, LDL, trigliserida, dan MDA yang rendah dibanding kelompok kontrol positif.

Ekstrak daun cengkeh mengandung komponen bioaktif yang dapat berperan sebagai antioksidan, di antaranya komponen fenol, flavanoid, dan eugenol sebagai salah satu derivat fenol. Eugenol memiliki aktivitas antioksidan yang sama dengan alfa-tokoferol dan antioksidan standar (butylated toluene) dalam menghambat peroksidasi lipid dan oksidasi LDL (Rajalakshmi *et al.*, 2000).

Penambahan kolesterol 1% pada pakan selama 50 hari mampu meningkatkan kadar kolesterol total serum darah kelinci. Setelah mengalami hiperkolesterolemia, kelompok kelinci kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh selama 10, 20, dan 30 hari menunjukkan penurunan kadar kolesterol serum. Hal ini disebabkan karena salah

satu komponen aktif, yaitu eugenol dapat mencegah peningkatan kadar LDL serum dengan cara meningkatkan pengambilan LDL oleh reseptornya, baik pada jaringan hati maupun pada jaringan perifer lainnya.

Pada kondisi hiperkolesterolemia, eugenol memiliki efek pada peningkatan afinitas LDL terhadap reseptornya. Peningkatan afinitas tersebut dapat menghambat oksidasi LDL dan menurunkan modifikasi LDL, sehingga dapat mencegah terbentuknya sel busa oleh makrofag, menghambat deposisi lipid untuk mempertahankan integritas sel endotel, menghambat pelekatan monosit, menghambat pelekatan dan agregasi platelet, serta menghambat proliferasi sel-sel otot polos (Safari *et al.*, 2002).

Hasil pengukuran penebalan plak pada kelompok kelinci kuratif yang diberi ekstrak daun cengkeh setelah diberi kolesterol merupakan fenomena yang masih perlu diteliti lebih lanjut. Hal ini disebabkan karena terbentuknya lesi aterosklerosis baik pada pemberian ekstrak daun cengkeh secara kuratif selama 10, 20, maupun 30 hari. Namun, terdapat kemungkinan bahwa sudah ada terbentuk lesi aterosklerosis tersebut sebelum diberi ekstrak daun cengkeh. Kadar LDL yang terdapat dalam jumlah tinggi pada kelinci tersebut lebih mudah teroksidasi, dan pada akhirnya menimbulkan lesi aterosklerosis pada aorta kelinci. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pemberian ekstrak daun cengkeh menghambat pembentukan lesi aterosklerosis, selanjutnya karena peningkatan afinitas LDL pada reseptornya dan juga sekaligus memperbaiki kerusakan lesi yang telah terbentuk dengan adanya peningkatan aktivitas antioksidan.

Kejadian aterosklerosis dapat dicegah dengan adanya peranan antioksidan yang dapat melindungi jaringan dari oksidasi LDL. Antioksidan dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL sehingga dapat

mengurangi adesi monosit, formasi sel busa, sitotoksitas sel pembuluh darah, dan memperbaiki fungsi pembuluh darah.

Pemberian ekstrak daun cengkeh selama 50 hari mengindikasikan bahwa lamanya waktu pemberian sangat mempengaruhi penurunan kadar kolesterol serum dan peningkatan aktivitas antioksidan, walaupun pemberian ekstrak daun cengkeh tersebut bersamaan dengan pemberian kolesterol selama 50 hari. Hal ini juga diduga ikut membantu pencegahan terbentuknya lesi aterosklerosis pada aorta, perlemakan pada hati, dan pengendapan protein pada ginjal. Selain eugenol yang terdapat dalam ekstrak daun cengkeh, terdapat juga komponen lainnya seperti saponin. Walaupun tidak terdeteksi kuat seperti fenol dan flavanoid pada uji fitokimia, dapat memberi pengaruh dalam mencegah peningkatan kadar kolesterol serum.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun cengkeh mempunyai peranan sebagai senyawa antioksidan dan antihiperkolesterolemia. Pengujian ekstrak daun cengkeh secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun cengkeh memiliki rendemen, total fenol, dan aktivitas antioksidan yang tertinggi dibanding α -to-koferol dan kedua jenis pelarut lainnya, yaitu ekstrak aquades dan etanol daun cengkeh. Adapun komponen fitokimia yang terdeteksi pada simplisia dan ekstrak metanol daun cengkeh adalah fenol, flavonoid, tannin, dan eugenol.

Pemberian 1 g/kg/bb/hari ekstrak metanol daun cengkeh pada kelinci yang diberikan selama 10, 20, dan 30 hari sebelum diberi kolesterol (preventif), sesudah diberi kolesterol (kuratif), dan selama 50 hari secara bersamaan dengan kolesterol, menunjukkan ada interaksi dengan profil lipid darah, aktivitas enzim antioksidan intrasel, kadar MDA, kejadian aterosklerosis, perlemakan hati, dan pengendapan protein pada ginjal. Pemberian ekstrak daun cengkeh selama 30 hari

baik secara preventif maupun kuratif, serta diberikan bersamaan dengan kolesterol selama 50 hari menunjukkan hasil yang lebih baik dibanding dengan pemberian ekstrak daun cengkeh secara preventif dan kuratif selama 10 dan 20 hari.

Kelompok kelinci hiperkolesterolemia mengalami peningkatan produksi radikal bebas dengan tingginya kadar MDA. Tetapi, kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh dapat menekan produksi radikal bebas dan meningkatkan aktivitas antioksidan intrasel dan kandungan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati dan ginjal, baik sebelum, selama, dan sesudah mengalami kondisi hiperkolesterolemia. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun cengkeh dapat berperan sebagai antioksidan.

Adapun peranan ekstrak daun cengkeh sebagai antihiperkolesterolemia ditunjukkan dengan rendahnya kadar LDL dan tingginya kadar HDL pada kelompok kelinci yang diberi ekstrak daun cengkeh. Dengan demikian, dapat dikatakan bahwa aktivitas antioksidan dan antihiperkolesterolemia ekstrak daun cengkeh dapat memodulasi kadar HDL dan LDL, serta sistem antioksidan pada kelinci. Selain itu, ekstrak daun cengkeh berpengaruh positif pada kejadian aterosklerosis, perlemakan hati, dan pengendapan protein pada ginjal.

BAB 3

TANAMAN SUKUN

3.1 Diskripsi Umum Tanaman Sukun

Sukun (*Artocarpus altilis*) merupakan genus *Artocarpus*. Tanaman sukun mampu beradaptasi dengan lingkungan dan dapat tumbuh dengan subur di daerah yang memiliki ketinggian tempat antara 0-1100 meter dari permukaan laut (Adrian, 1990). Sukun (*Artocarpus altilis*) adalah tanaman yang berasal dari daerah New Guinea Pasifik. Tumbuhan yang berasal dari genus *Artocarpus* dalam famili *Moraceae* ini kemudian dikembangkan di daerah Malaysia sampai ke Indonesia (Adinugraha, 2011). Sukun dapat tumbuh pada ketinggian hingga 900 meter di atas permukaan laut, suhu 15°C - 40°C, dan curah hujan setiap tahun 2.000 – 3.000 mm.

Tanaman sukun terdiri atas akar, batang, daun, bunga dan biji dengan tinggi pohon mencapai 10 meter. Tanaman sukun berjenis akar adventif, karena sebagian besar menyebar di atas permukaan tanah. Daun tanaman sukun kaku, tebal, besar dan memiliki ukuran sekitar 20-40 cm, permukaan bagian atas daun berwarna hijau mengkilap, sedangkan permukaan bagian bawah daun berwarna hijau

muda dan kasar. Daun tanaman sukun diselubungi dengan bulu-bulu halus. Daun memiliki tangkai daun yang kokoh berukuran panjang 3 cm - 5 cm, tulang daun menonjol. Tepi daun berlekuk membentuk 7-9 cangap yang berujung runcing. Pada umumnya daun melekat pada bagian ujung cabang atau ranting (Endang, *et al.*, 2013). Tanaman sukun (*Artocarpus altilis*, Fosberg) dapat digolongkan menjadi sukun yang berbiji (*breadnut*) dan yang tanpa biji (*breadfruit*).



Gambar 3.1 Tanaman Sukun

Sumber: <https://news.unair.ac.id>

Dalam taksonomi tumbuh-tumbuhan, tanaman sukun diklasifikasikan sebagai berikut (Utami, 2015) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermathophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Urticales
Familia	: Moraceae
Genus	: <i>Artocarpus</i>
Spesies	: <i>Artocarpus altilis</i> , fosberg

Sukun termasuk tanaman tropis sejati, tumbuh paling baik pada daratan rendah yang panas. Tanaman ini tumbuh baik di daerah basah, juga bisa tumbuh di daerah yang sangat kering asalkan terdapat air tanah yang cukup. Tanaman sukun termasuk dalam family Moraceae dikenal sebagai tanaman yang kaya akan pati, sekitar 50 spesies tersebar luas di daerah tropis dan subtropis. Tanaman sukun bahkan bisa tumbuh baik di pantai. Melihat penyebaran tanaman sukun yang terdapat di sebagian besar kepulauan Indonesia, serta jarang terserang hama dan penyakit membahayakan, maka hal ini memungkinkan tanaman sukun untuk dikembangkan. Di musim kering, di saat tanaman lain tidak dapat tumbuh atau merosot produksinya, justru tanaman sukun dapat tumbuh dan berbuah. Sukun tersebar di seluruh daerah di Indonesia, yaitu di Sumatra, Jawa, Bali, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Sulawesi, Maluku dan Papua (Adinugraha, 2011).

3.2 Kandungan Kimia Daun Sukun

Daun sukun mengandung senyawa kimia yang berkhasiat, seperti flavonoid, fitosterol, polifenol, dan riboflavin. Senyawa turunan flavonoidnya adalah artoindonesianin dan quersetin (Utami, *et al*, 2015). Selain itu juga, daun sukun kaya akan senyawa fenolik, flavonoid, tannin dan lignan. Dosis yang biasa digunakan sebagai antidiabetik adalah 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB (Tandi *et al*, 2017).

Ekstrak daun sukun juga mengandung kalium. Kalium merupakan kation penting dalam cairan intraselular yang berperan dalam keseimbangan pH dan osmolaritas. Tubuh mengandung kalium 2,6 mg/kg berat badan bebas lemak. Kekurangan kalium umumnya disebabkan karena ekskresi yang berlebihan melalui ginjal dan muntah-muntah yang berlebihan atau diare yang hebat (Suhardjo dan Clara, 1992). Kebutuhan kalium di dalam tubuh dapat diperoleh melalui makanan, minuman, obat dan bahan alami lainnya, seperti daun sukun.

Fungsi kalium adalah memelihara keseimbangan osmotik dalam sel, meregulasi aktifitas otot, enzim dan keseimbangan asam basa.

Ekstrak daun sukun mengandung senyawa yang berpotensi menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat (Leng *et al*, 2018). Ekstrak fenolik dari daun sukun memiliki aktivitas antiradikal bebas dan mengandung antioksidan yang tinggi dan memiliki flavonoid yang terkandung pada daun sukun umumnya bersifat sebagai anti-karsinogenik dan antioksidan (Suryanto dan Wehantouw, 2009)

Selain itu, *Artocarpus altilis* juga memiliki potensi efek anti-aterosklerotik. Sesuai dengan dengan hasil yang diperoleh, β -sitosterol sebelumnya dilaporkan menurunkan total kolesterol plasma dan mengurangi pengembangan sel busa aterosklerotik in vivo (Su *et al.*, 2004). Penelitian lain secara in vitro dilakukan pada melanosit B16F1 sel melanoma menunjukkan bahwa ekstrak *Artocarpus altilis* dalam sel-sel ini dengan menghambat sintesis melanin. Sebaliknya dalam penelitian lain, ditemukan bahwa ketika ekstrak kayu dari *Artocarpus altilis* diterapkan di bagian belakang kelinci percobaan, melanin biosintesis dihambat tanpa menyebabkan iritasi kulit.

Artocarpus altilis (Parkinson) Fosberg (Moraceae) dikenal sebagai sukun tersebar luas di daerah tropis dan daerah subtropis, termasuk Indonesia. Ramuan daun telah digunakan secara tradisional di Indonesia untuk pengobatan sirosis hati, hipertensi, dan diabetes (Kasahara dan Hemmi, 1986). Flavonoid dari jenis ini dan spesies *Artocarpus* lain juga telah terbukti memiliki anti-inflamasi (Lu *et al*, 2002; Wei *et al*, 2005), antikanker (Hari *et al*, 2014) dan agregasi antiplatelet (Lin *et al*, 1996).

Penelitian lain mengatakan bahwa flavonoid yang terkandung pada daun sukun umumnya bersifat sebagai antikarsinogenik dan antioksidan (Surh, 2003). Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun sukun terhadap peningkatan kadar MDA hati pada tikus putih yang diinduksi aloksan.

Tikus yang diinduksi dietilnitrosamin akan mengalami fibrosis pada hepar dengan derajat yang bervariasi, dan kelompok yang diberi ekstrak daun sukun memiliki derajat fibrosis hepar yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok yang diinduksi dietilnitrosamin (Frizani N A dan Ika P M., 2018).

Hasil penelitian Fakhruddin, *et al.* (2015) menyatakan daun sukun memiliki banyak kandungan antioksidan seperti flavonoid, *xanthone*, triterpenoid, dan *stilbene*. Dari beberapa antioksidan di atas, antioksidan yang paling banyak diteliti adalah flavonoid yang mempunyai aktivitas anti inflamasi (Lan WC., *et al.*, 2013). Selain aktivitas anti inflamasi, efek lain yang ditemukan yaitu efek antikanker, antiplatelet, dan antisklerotik (Fakhruddin, *et al.* 2015).

Ekstrak daun sukun juga ditemukan dapat mencegah proses pembentukan lipid peroksidase, yang dapat merusak membran sel yang mengandung polyunsaturated fatty acid. Ekstrak daun sukun juga memiliki aktivitas penangkap radikal OH yang memiliki efek yang berbahaya bagi sel, yang memiliki efek karsinogenesis, mutagenesis, dan sitoksisitas

3.2.1 Kandungan Flavanoid Ekstrak Metanol Daun Sukun

Flavanoid telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan memberi efek yang sangat besar bagi kesehatan dan nutrisi manusia. Mekanisme kerja flavanoid adalah sebagai proses *scavenger* dan selasi (Kessles et al., 2003, Cook and Samman, 1996). Kandungan Flavanoid pada ekstrak metanol daun sukun muda, tua, dan gugur adalah 87,03 mg/g, 100,68 mg/g dan 42,89 g/mg (Tabel 1). Hasil pengukuran kandungan flavanoid menunjukkan bahwa daun sukun tua memiliki kadar flavanoid yang paling tinggi, kemudian diikuti dengan daun sukun muda dan gugur.

Tabel 3.1 Kandungan Flavanoid Daun Sukun Muda, Tua, dan Gugur

Daun Sukun	Rata-rata (mg/g)
Daun muda	87,03
Daun tua	100,68
Daun gugur	42,89

Komponen seperti flavanoid yang mengandung gugus hidroksil dapat bertanggung jawab dalam menangkal radikal bebas (Das dan Pereira, 1990). Sehingga dapat dikatakan bahwa kandungan fitokimia pada ekstrak daun sukun memiliki aktivitas yang sangat tinggi dalam menangkal radikal bebas.

Kandungan flavanoid banyak terdapat pada daun sukun yang tua. Hal ini dipengaruhi oleh kandungan klorofil dan faktor proses fotosintesis, karena pada daun tua dimungkinkan memiliki kandungan klorofil yang tinggi sehingga mampu melakukan proses fotosintesis dengan baik. Sedangkan pada daun muda dan gugur memiliki kandungan flavanoid yang lebih rendah dibanding daun tua. Bila dikaitkan dengan kandungan klorofil, maka terlihat pada warna daun yang masih hijau muda pada daun muda dan daun gugur yang telah berwarna kuning.

Flavanoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder. Bila proses fotosintesis berjalan dengan baik, maka produksi senyawa metabolit juga meningkat. Senyawa metabolit pada tanaman digunakan untuk sebagai zat warna, racun, aroma makanan, obat-obatan dan sebagainya. Demikian pula flavanoid pada tanaman, juga digunakan sebagai penangkal radikal bebas pada tanaman tersebut.

3.3 Aktivitas Antioksidan Daun Sukun

Elektron yang tidak berpasangan pada DPPH memiliki kemampuan penyerapan yang kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna ungu. Perubahan warna ungu menjadi kuning terjadi karena perubahan DPPH menjadi DPPH-H (Xu dan Hu, 2004). Antioksidan mendonorkan atom H sehingga terbentuk DPPH-H tereduksi. Kapasitas penangkapan radikal bebas ditunjukkan dengan persentase berkurangnya warna ungu dari DPPH (Kim, 2005). Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini menunjukkan kapasitas ekstrak daun sukun dengan menggunakan 3 jenis pelarut (aquades, metanol, dan heksan) sebagai antioksidan primer.

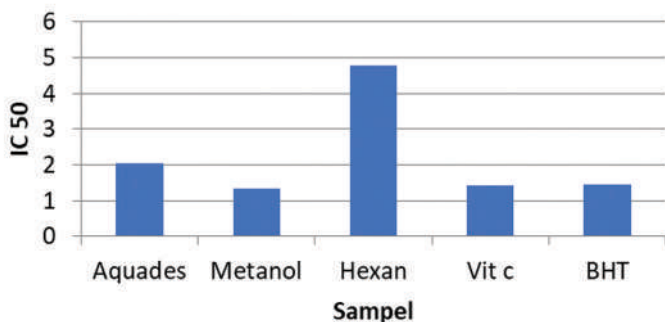
Ekstrak daun sukun dengan pelarut yang berbeda menunjukkan kapasitas penangkapan radikal bebas yang berbeda seperti yang ditunjukkan Tabel 3.2 Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diuji kapasitas penangkapan radikal bebas semakin meningkat yang menunjukkan senyawa antioksidan dalam ekstrak daun sukun sebagai antioksidan primer.

Tabel 3.2 Persentase Penghambatan Ekstrak Daun Sukun dengan Pelarut Aquades, Metanol, dan Heksan dengan Perbandingan Vitamin C dan BHT

Pelarut	Konsentrasi (mg/g)	Penghambatan (%)
Aquades	0,13	94.77
Metanol	0,13	95.14
Heksan	0,13	55.59
Vitamin C	0,012	95.00
BHT	0,4	93.00

Kapasitas penangkapan radikal bebas vitamin C lebih tinggi dibandingkan ekstrak daun sukun untuk semua konsentrasi yang diuji.

Menurut Wijoyo (1999), senyawa flavanoid dapat berperan sebagai penangkap anion superoksida dan radikal hidroksi. Kandaswami dan Middleton (1996) menyebutkan bahwa flavanoid bereaksi dengan radikal peroksil dengan cara mendonorkan atom hidrogen menyebabkan terminasi reaksi radikal berantai.



Gambar 3.2 Nilai IC₅₀ (mg/ml) Ekstrak Daun Sukun dengan Menggunakan Pelarut Aquades, Metanol, dan Heksan, dan Pembandingan Menggunakan Vitamin dan BHT. Nilai IC₅₀ Mengindikasikan Tingginya Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai IC₅₀ (Inhibitor konsentrasi 50%) yaitu besarnya nilai konsentrasi antioksidan yang dibutuhkan untuk penghambatan radikal DPPH sebesar 50%. Dan diperoleh dengan cara membuat kurva log konsentrasi yang diplotkan dengan nilai prosentasi probit (persen aktivitas antioksidan) untuk setiap sampel yang diuji dan dibuat persamaan garis lurus dari kurva tersebut. Dengan memasukkan nilai probit yang menunjukkan nilai Y dan nilai X menunjukkan log konsentrasi sampel. Pada kurva tersebut terbentuk persamaan garis lurus yang dibutuhkan untuk menetralkan 50% radikal bebas yang terdapat dalam larutan uji dan merupakan nilai IC₅₀.

Nilai IC50 ekstrak methanol daun sukun paling rendah di antara ekstrak lainnya (Gambar 2) yang menunjukkan bahwa kemampuan menangkap radikal bebas ekstrak methanol paling tinggi. Kadar flavanoid pada daun sukun diduga berperan terhadap kemampuan penangkapan radikal bebas dan masing-masing ekstrak kemungkinan mempunyai jenis senyawa flavanoid yang berbeda dan kapasitas antioksidan juga berbeda. Efektivitas senyawa antioksidan dipengaruhi oleh banyak faktor terutama energi aktivasi, konstanta kecepatan reaksi, potensi oksida-reduksi, stabilitas terhadap radikal intermediate, dan kelarutannya (Su *et al.*, 2004).

3.4 Ekstraksi Daun Sukun

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia tumbuhan atau simplisia hewan menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian pelarut diuapkan dan serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000). Menurut Voight (1995), ekstrak dikelompokkan atas dasar sifatnya, yaitu: *pertama*, ekstrak kental adalah sediaan yang dilihat dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang. Kandungan airnya antara 5-30%. Tingginya kandungan air dapat menyebabkan ketidakstabilan sediaan obat karena cemaran bakteri. *Kedua*, ekstrak kering adalah sediaan yang memiliki konsistensi kering dan mudah dituang, sebaiknya memiliki kandungan lembab tidak lebih dari 5%, (Saifudin, 2011). *Ketiga*, ekstrak cair, ekstrak yang dibuat sedemikian rupa, sehingga 1 bagian simplisia sesuai dengan 2 bagian ekstrak cair, sediaan simplisia nabati dapat mengandung etanol sebagai pelarut atau sebagai pengawet. Jika tidak dinyatakan lain pada masing-masing monografi tiap ml ekstrak mengandung senyawa aktif dari 1 gram simplisia yang memenuhi syarat. Ekstrak cair jika hasil ekstraksi masih bisa dituang, biasanya kadar air lebih 30%.

Ekstraksi adalah penarikan zat aktif yang diinginkan dari bahan mentah dengan menggunakan pelarut tertentu yang dipilih di mana zat yang diinginkan dapat larut. Bahan mentah berasal dari tumbuhan atau hewan yang dikumpulkan, dibersihkan, dicuci, dikeringkan, dan dijadikan serbuk. Hasil dari ekstraksi disebut ekstrak. Ekstrak tidak hanya mengandung satu unsur saja, tetapi berbagai macam unsur, tergantung pada bahan mentah apa yang diekstrak dan kondisi dari ekstraksi (Mycek dan Harvey, 2001).

Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid, flavonoid dan lain-lain. Diketuainya senyawa aktif yang dikandung oleh simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat. Simplisia yang lunak seperti rimpang dan daun mudah diserap oleh pelarut, karena itu pada proses ekstraksi tidak perlu serbuk sampai halus. Simplisia yang keras seperti biji, kulit kayu dan kulit akar susah diserap oleh pelarut, karena itu perlu diserbuk sampai halus (Depkes RI, 2000).

Beberapa macam metode ekstraksi di antaranya: *pertama*, maserasi adalah proses penyarian simplisia dengan perendaman menggunakan pelarut pada suhu kamar. Maserasi dilakukan dengan pengadukan secara terus menerus dan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyarian terhadap maserat pertama dan selanjutnya adalah remaserasi. *Kedua*, soxhletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan sehingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon. *Ketiga*, perkolasi adalah cara penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. *Keempat*,

destilasi uap adalah metode yang populer untuk ekstraksi minyak-minyak menguap (esensial) dari sampel tanaman. Metode destilasi uap air diperuntukkan untuk menyari simplisia yang mengandung minyak menguap atau mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal.

Metode dasar dari ekstraksi obat adalah maserasi dan perkolasi, tetapi kebanyakan ekstraksi obat dikerjakan dengan cara perkolasi. Dalam pabrik ekstrak umumnya, perkolasi digunakan untuk melepaskan zat aktif dari obat (Mycek dan Harvey, 2001). Maserasi sampel digunakan dengan pelarut etanol 95% karena sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat baik itu yang bersifat polar, semi polar dan non polar (Arifin, *et al*, 2006). Pada penelitian ini ekstrak daun sukun menggunakan metode maserasi.

3.5 Efek Farmakologi Ekstrak Daun Sukun

Daun sukun efektif dalam mengobati penyakit seperti liver, hepatitis, pembesaran limpa, jantung, ginjal, tekanan darah tinggi, kencing manis, dan penyembuh kulit yang bengkak atau gatal-gatal. Daun sukun dilaporkan tidak menimbulkan efek samping terhadap organ di dalam tubuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun sukun yang terdiri dari kandungan senyawa flavonoid sebanyak 30% tidak menyebabkan keracunan dalam tubuh. Bagian tanaman sukun yang biasa dimanfaatkan sebagai pengobatan adalah bagian buah dan daunnya. Tetapi yang paling sering digunakan sebagai obat herbal adalah daunnya (Utami, 2015).

Berdasarkan penelitian Juliastuti H., *et al.*, 2017, menyatakan bahwa ekstrak etanol sukun berpengaruh pada penurunan kadar MDA dan kadar SGPT pada tikus Wistar jantan putih setelah diinduksi CCl_4 dan dosis efektif berbasis etanol ekstrak daun sukun dalam menurunkan kadar SGPT adalah $500 \text{ mg kg}^{-1}\text{b.wt}$. Penelitian ini menunjukkan

bahwa daun sukun ekstrak efektif dalam melindungi hati dari cedera CCl_4 berdasarkan pengukuran tingkat MDA dan SGPT. Selanjutnya studi kami akan memeriksa jumlah sel inflamasi dicedera hati, melakukan analisis histopatologi dan analisis imunohistokimia sel hepatosit sebagai kemungkinan indikator penting dari perbaikan cedera hati.

Suplementasi sukun (*Artocarpus altilis*) dapat meningkatkan jumlah sel darah merah, sel darah putih, kadar HDL dan LDL darah tetapi menurunkan kolesterol darah dan trigliserida darah itik jantan berumur sepuluh minggu. Kolesterol daging dipengaruhi oleh kolesterol darah dengan koefisien regresi (r) sebesar 0,780941 tetapi tidak terpengaruh negatif oleh HDL ($r=-0,47022$) dan sedikit dipengaruhi secara positif oleh LDL ($r = 0,407849$) (Tugiyanti E. dan Emmy S., 2017).

Hasil pengukuran kadar glukosa disajikan pada Tabel 3.3. Kadar glukosa awal pada mencit tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara satu perlakuan dengan perlakuan lainnya, sedangkan kadar glukosa pada kondisi hiperglikemia atau setelah mencit diinduksi aloksan menunjukkan adanya peningkatan kadar glukosa, kecuali pada kontrol negatif yang tidak diinduksi aloksan tidak mengalami peningkatan kadar glukosa. Kadar glukosa akhir pada mencit menunjukkan adanya perbedaan yang sangat signifikan ($P<0,05$). Kelompok perlakuan ekstrak daun sukun dan metformin menunjukkan penurunan kadar glukosa yang sangat nyata ($P<0,05$) dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Akan tetapi, pada kelompok ekstrak daun cengkeh tidak berbeda nyata ($P<0,05$) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, sedangkan kelompok metformin menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok kontrol negatif.

Malonaldehid (MDA) merupakan salah satu produk final dari peroksidasi lipid yang terbentuk setelah senyawa radikal menyerang

membran lipid yang kaya akan asam lemak tak jenuh ganda (PUFA). Malonaldehida dalam bahan biologi telah digunakan secara luas sebagai indikator keberadaan radikal bebas dan terjadinya kerusakan oksidatif, terutama oksidasi pada asam lemak tak jenuh yang memiliki lebih dari satu ikatan rangkap. Analisis kadar radikal bebas dalam penelitian ini dilakukan dengan mengukur kadar MDA hati.

Tabel 3.3 Rata-rata Kadar Glukosa Awal, Setelah Diinduksi Alokasan (Kondisi Hiperglikemia), dan Glukosa Akhir pada Mencit

Perlakuan	Rata-Rata Kadar Glukosa (mg/dl)		
	Awal	Setelah Diinduksi Alokasan	Akhir
Kontrol Negatif	81,600 ^a	79,000 ^a	80,600 ^a
Kontrol Positif	84,000 ^a	196,600 ^b	342,800 ^c
Ekstrak daun Sukun	82,000 ^a	194,600 ^b	104,400 ^a
Metformin	82,800 ^a	202,600 ^b	186,800 ^b

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyataada uji Duncan dengan taraf 5%.

Hasil pengukuran kadar MDA hati mencit disajikan pada Tabel 2. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar MDA pada kelompok mencit yang mengalami hiperglikemia (kontrol positif) secara nyata lebih tinggi ($P < 0.05$) pada jaringan hati dibanding dengan kontrol negatif yang tidak diberi kolesterol 1% dan ekstrak daun cengkeh (Tabel 2).

Hasil analisis MDA ini menunjukkan bahwa pemberian Alokasan memberi pengaruh negatif pada kelompok kelinci hiperglikemia dibanding dengan kelompok kelinci kontrol negatif yang tidak diinduksi Alokasan. Pengaruh negatif tersebut terlihat dengan meningkatnya kadar MDA. Kadar MDA yang tinggi merupakan indikator tingginya radikal bebas dalam tubuh.

Kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sukun dan metformin secara nyata ($P < 0,05$) menurunkan kadar MDA hati. Namun demikian, kadar MDA hati pada kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sukun lebih rendah dibanding kelompok mencit yang diberi metformin.

Tabel 3.4 Kadar MDA Hati Mencit

Perlakuan	Kadar MDA Hati Umol/g protein
Kontrol Negatif	267,802 ^a
Kontrol Positif	2112,345 ^d
Ekstrak Daun Sukun	1126,419 ^b
Metformin	1535,567 ^c

Keterangan:

Angka yang diikuti huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan beda nyata pada uji Duncan dengan taraf 5%.

Diabetes mellitus dapat mengakibatkan yang bersifat ireversibel dari sel-sel beta pankreas sehingga dapat menyebabkan terjadinya degranulasi dan pengurangan sekresi insulin. Diabetes mellitus adalah gangguan metabolisme yang mengancam kehidupan dan diperkirakan bahwa tingkat kejadian tahunan akan terus meningkat di seluruh dunia di masa depan.

Aloksan menginduksi kerusakan dan kematian sel-sel pulau pankreas pada hewan percobaan beberapa hewan model, sehingga menyebabkan diabetes mellitus dan penurunan sekresi insulin. Tindakan sitotoksik ini *Agen diabetogenic* dimediasi oleh oksigen reaktif spesies. Aloksan dan produk pengurangan asam urat, dapat membangun siklus redoks dengan pembentukan super oksida radikal. Radikal tersebut menjalani dismutasi untuk hidrogen peroksida. Oleh karena itu, radikal hidroksil yang sangat reaktif tersebut dibentuk dari reaksi Fenton. Reaksi aloksan yang menghasilkan ion beracun

secara *in vivo* mengakibatkan penurunan aktivitas enzimatis sistem antioksidan disertai dengan peningkatan lipid peroksidasi, penurunan aktivitas SOD dan CAT dalam eritrosit tikus diabetes aloksan diinduksi. Penurunan enzim antioksidan merupakan indikasi bahwa mungkin ada generasi faktor radikal yang sangat reaktif yang merupakan kunci untuk perubahan enzim antioksidan di dalam tubuh (Manonmani, *et al.*, 2002).

Pemberian aloksan pada hewan uji, selain dapat memicu peningkatan radikal bebas dalam tubuh, juga dapat meningkatkan kadar glukosa darah. Peningkatan kadar glukosa darah dapat meningkatkan stres oksidatif. Beberapa jalur mekanisme peningkatan stres oksidatif akibat kadar gula yang meningkat yaitu jalur poliol pada saraf perifer, jalur peningkatan produksi *Advanced Glycation End products* (AGEs), jalur aktivasi protein kinase C (PKC), jalur *hexosamine pathway flux* akibat modifikasi berlebihan dari protein oleh Nasetilglukosamin, autooksidasi glukosa pada diabetes melitus, dan fosforilasi oksidatif. Semua jalur tersebut dapat memicu peningkatan radikal bebas di dalam tubuh (Droge 2002). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sukun memiliki aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan yang tinggi disebabkan karena adanya kandungan senyawa aktif berupa senyawa flavonoid pada ekstrak daun sukun (Mu'nisa *et al.*, 2011). Adanya kandungan bahan aktif flavanoid sebagai senyawa antioksidan pada ekstrak daun sukun dapat berperan sebagai antihiperглиkemia pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan yang diberikan secara oral. Hal ini terlihat pada hasil penelitian yang menunjukkan bahwa kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sukun memiliki kadar glukosa yang lebih rendah dibanding kelompok mencit hiperglikemia (kontrol positif).

Selain dapat menurunkan kadar glukosa, ekstrak daun sukun juga mencegah terjadinya peroksidasi lipid pada jaringan hati, hal ter-

sebut terlihat pada kelompok mencit yang diberi ekstrak daun sukun memiliki kadar MDA yang lebih rendah dibanding kelompok mencit hiperglikemia (kontrol positif). Diabetes meningkatkan aktivitas enzim lemak asil koenzim A oksidase yang memulai beta oksidasi asam lemak, sehingga terjadi lipid peroxidation (Horie *et al*, 1981). Peningkatan peroksidasi lipid merusak fungsi membran dengan penurunan fluiditas membran dan mengubah aktivitas enzim membran dan reseptor yang terikat pada membran (Acworth *et al*, 1997).

Aktivitas antioksidan tipe fenol berhubungan dengan keseimbangan reaksi oksidasi-reduksi (redoks), yaitu *electron donating substituent* yang terikat pada cincin aromatik akan memperbesar kecepatan reaksi penghambatan oksidasi oleh antioksidan. Selain itu antioksidan dipercaya mencegah oksidasi rantai radikal bebas dan mendonasikan atom hidrogen dari kelompok hidroksil fenol dan membentuk produk yang stabil (Kotamballi *et al.*, 2002). Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik. Senyawa fenolik ini bersifat multifungsi dan berperan sebagai antioksidan karena mempunyai kemampuan sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengikat logam, atau pengubah oksigen singlet menjadi bentuk triplet (Croft, 1999; Estiasih & Andiyas, 2006). Oleh karena itu, dapat kita katakan bahwa ekstrak daun sukun dapat berperan sebagai senyawa antioksidan dalam mengatasi peningkatan radikal bebas akibat induksi aloksan.

BAB 4

TANAMAN KAYU JAWA

4.1 Diskripsi Tanaman Kayu Jawa (*Lannea cormendalica*. Houtt)

Menurut Tjitrosoepomo (1994), klasifikasi tanaman Kayu Jawa sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Phylum	: Mannoliophyta
Class	: Magnoliatae
Order	: Sapindales
Family	: Anacardiaceae
Genus	: <i>Lannea</i>
Species	: <i>Lannea coromandelica</i> (Houtt.) Merr.

Tanaman kayu tammate merupakan tanaman habitus, biasanya tinggi pohonnya mencapai 6-8 meter, berakar tunggang, batang bercabang. Daun majemuk gasal (ganjil), bentuk anak daun bulat memanjang, ada bekas ibu tangkai daun pada cabang/ ranting, pertulangan daun menyirip. Berwarna hijau pucat. Di lingkungan yang lebih

lembab pohon ini tumbuh lebih besar hingga menjadi 20 meter. Di Sri Lanka *Lannea coromandelica* sering tumbuh di singkapan batu.



Gambar 4.1 Tanaman Kayu Jawa

Sumber: <https://decyra.com/jenis-kayu/>

Kayu tammate (*Lannea cormendalica* (Houtt.) Merr.) adalah tumbuhan dari keluarga Anacardiaceae, yang merupakan salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia khususnya di Sulawesi. Masyarakat Makassar mengenal tanaman ini dengan nama kayu tammate dan di daerah Kabupaten Luwu Sulawesi Selatan disebut Kayu Jawa. Tanaman ini sering digunakan masyarakat Sulawesi Selatan untuk mengobati berbagai jenis penyakit, misalnya untuk pengobatan luka bakar, dan penyakit lainnya. Berdasarkan penelitian (Indrayangingsih *et al.*, 2015) kulit batang *Lannea* digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan muntah darah dan perawatan pasca melahirkan.

Kayu Jawa merupakan *deciduous tree* atau pohon gugur yang dapat tumbuh hingga mencapai 25 m (umumnya 10-15 m). Permukaan batang berwarna abu-abu sampai coklat tua, kasar, ada pengelupasan serpihan kecil yang tidak teratur, batang dalam berserat berwarna merah atau merah muda gelap, dan memiliki eksudat yang bergetah. Daun imparipinnate, meruncing, dan berjumlah 7-11. Bunga

berkelamin tunggal berwarna hijau kekuningan. Buah berbiji dengan panjang 12 mm, bulat telur, kemerahan, dan agak keras. Tanaman ini berbunga dan berbuah dari bulan Januari hingga Mei.

Nama daerah asal tanaman *Lannea coromandelica* ini memiliki beragam nama daerah yakni dalam bahasa Jawa dinamakan *Kayu Jaran*, dalam bahasa Makassar dinamakan *Tammate*, dan dalam bahasa Bugisnya dinamakan *Aju Jawa* (Archive, 2021).

4.2 Kandungan Senyawa Aktif Tanaman Kayu Jawa

Kandungan senyawa yang terdapat di dalam tanaman kayu tammate (*Lannea coromandelica*) yaitu tannin, saponin, flavonoid, alkaloid, quinon, glikosida, terpenoid, fenol, komarin, steroid, plobatanins, antarquinon, glikosida jantung dan lain sebagainya (Jacques Britto & Durairaj, 2020).

Tanaman kayu tammate (*Lannea coromandelica*) merupakan salah satu tanaman obat tradisional yang masih sering digunakan masyarakat karena memiliki berbagai khasiat antara lain digunakan untuk mengobati luka dalam maupun luar seperti diare, mual dan muntah (Rahayu *et al.*, 2006). Berdasarkan skrining fitokimia (Manik *et al.*, 2013) kulit batang tanaman kayu tammate (*Lannea coromandelica*) dilaporkan mengandung senyawa golongan karbohidrat, steroid, alkaloid, terpenoid, saponin, tannin, dan flavonoid (Yumita *et al.*, 2019).

Hasil penapisan fitokimia ekstrak etanol kulit batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) yang dilakukan oleh Stalin, Babu, & Kumar, (2013), menyatakan bahwa ekstrak etanol kulit batang Kayu Jawa mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, *carbohidrates*, *gums dan mucilages* dan tanin. Menurut Soni & Singhai (2012) senyawa tanin dapat berperan sebagai astringent pada luka sedangkan sapo-

nin bekerja meningkatkan kecepatan *epitelisasi*. Senyawa flavonoid juga berperan dalam penyembuhan luka dengan menghentikan perdarahan yaitu melalui mekanisme vasokonstriksi pada pembuluh darah, penangkal radikal bebas, penghambat hidrolisis dan oksidasi enzim, serta antiinflamasi.

4.3 Efek Farmakologis Tanaman Kayu Jawa

Anacardiaceae dan termasuk pohon gugur tropis tersebar luas di India, Bangladesh, dan negara tropis lainnya. Secara tradisional, berbagai bagian dari tanaman telah digunakan sebagai obat untuk berbagai penyakit. Kulit batangnya digunakan oleh orang Garo, Komunitas suku Pahan, dan Teli di Bangladesh untuk mengobati hepatitis, diabetes, maag, penyakit jantung, dan disentri (Rahmatullah, M., *et al.*, 2012).

Jus daunnya diminum untuk meredakan bisul dan nyeri (Zheng, X.L., *et al.*, 2009), sedangkan getah buahnya digunakan untuk mengobati pilek dan batuk (Mulaudzi, R.B., *et al.*, 2012). Kulit batangnya digunakan untuk asam urat, dispepsia, disentri (Kadir, M.F. *et al.*, 2013), erupsi kulit, maag, dan sakit gigi (Imam, M. Z. *et al.*, 2014). Berdasarkan aplikasi tradisional ini, para peneliti telah melakukan penelitian ilmiah studi untuk memvalidasi penggunaan *Lannea* spp. terhadap berbagai penyakit. Telah terbukti bahwa ranting menginduksi apoptosis sel kanker hati manusia ((Weerapreeyakul *et al.*, 2017) dan daun memiliki antinosisseptif (Egbe, E.O., *et al.*, 2016, antioksidan (Kumar, T., *et al.*, 2015), dan aktivitas antidiare (Kaur, R., *et al.*, 2015). Kulit kayu ditemukan memiliki antiinflamasi (Singh, S., *et al.*, 1994), hipotensi (Singh, S.; *et al.*, 1996], antihiperqlikemik (Rahmatullah, M., *et al.*, 2012), antimikroba, antijamur (Kumar, V., *et al.*, 2013), analgesik, dan efek antioksidan (Alam, B., *et al.*, 2012), dan kulit kayu menunjukkan aktivitas zoosporisidal (Islam, M.T., *et al.*, 2002).

Leucas aspera (Willd.) Link (Keluarga: Lamiaceae, nama lokal: drona) dan *Lannea coromandelica* (Houtt.) (Famili: Anacardiaceae, nama lokal: zika) adalah dua tanaman yang umum ditemukan di alam liar dan di pinggir jalan dan tanah terlantar Bangladesh. Keduanya dianggap sebagai tanaman obat oleh para praktisi pengobatan tradisional di Bangladesh. *Leucas aspera* digunakan untuk pengobatan gangguan saluran pernafasan, edema, gangguan gastrointestinal, sakit, dan sebagai penawar racun. *Lannea coromandelica* digunakan untuk pengobatan gangguan pencernaan, penyakit kuning, nyeri, dan gangguan jantung oleh praktisi obat tradisional. Dalam pengobatan tradisional India, jus dari Daun *Leucas aspera* digunakan untuk mengobati psoriasis, erupsi kulit kronis, dan rematik kronis (Kirtikar dan Basu, 1991).

Penggunaan lain tanaman Kayu Jawa adalah sebagai analgesik, anti ulkus, dan aphrodisiac, getahnya sebagai penyembuhan luka, daunnya mengobati pembengkakan akibat keseleo, dan korteks kayu jawa sebagai antiinflamasi, antimitosis dan antioksidan (Ismail *et al.*, 2016).

Berdasarkan penelitian Haruna *et al.* (2018) menyatakan bahwa efek ekstrak metanol dan partisi kulit batang kayu jawa dalam menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dan sel kanker MCF-7. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol, partisi tidak larut heksan dan partisi larut heksan dapat menghambat pertumbuhan sel kanker HeLa dengan nilai indeks selektivitas, berturut-turut, 2,04; 1,85 dan 4,19. Sedangkan untuk sel MCF-7, indeks selektivitas, berturut-turut, 1,91; 1,44 dan 2,13. Partisi larut heksan dapat memiliki potensi sebagai antikanker dengan selektivitas yang baik (Haruna *et al.*, 2018).

Hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan menunjukkan nilai AAI (Antioxidant activity index) ekstrak etanol 70%, ekstrak air,

dan vitamin C berturut-turut 5,5679 (sangat kuat); 0,0667 (lemah); dan 9,6254 (sangat kuat). Pengujian toksisitas juga dilakukan terhadap ekstrak etanol 70% dan ekstrak air menggunakan metode BSLT (*Brine shrimp lethality test*). Hasil uji toksisitas yang dihitung menggunakan metode probit menunjukkan ekstrak air tidak memiliki aktivitas toksik dengan nilai LC50 3.171 ppm, sedangkan ekstrak etanol 70% menunjukkan aktivitas toksik dengan nilai LC50 23,774 ppm. Berdasarkan penelitian ini, ekstrak etanol 70% kulit batang kayu jawa (*Lannea coromandelica*) diduga memiliki potensi antikanker (Prawirodihardjo, 2014).

Ekstrak kulit batang kayu jawa (*Lannea coromandelica* Houtt. Merr.) memiliki aktivitas penyembuhan luka sayat pada tikus putih, dimana ekstrak dengan dosis 500 mg/KgBB memiliki efek lebih cepat terhadap penyembuhan luka sayat pada tikus putih dibandingkan dengan kelompok yang lain (Calsum U. *et al.*, 2018).

Hasil penelitian pada ekstrak n-heksana kulit batang kayu jawa (*Lannea coromandelica* Houtt. Merr.) diperoleh senyawa metabolit sekunder berupa kristal putih berbentuk jarum dengan titik leleh 114-116 yang merupakan senyawa golongan steroid. Dugaan ini diperkuat dengan uji golongan terhadap pereaksi *Lieberman-Buchard* yang memberikan hasil positif steroid serta analisis dengan spektrofotometer FTIR dan GC-MS yang menunjukkan bahwa isolat merupakan senyawa steroid (Paramudita, *et al.*, 2017).

Temuan itu semua tergantung dosis dan signifikan secara statistik. Berdasarkan evaluasi analisis saat ini, ekstrak *L. coromandelica* memiliki sifat neuro-modulator yang signifikan. Ekstrak daun tidak memiliki efek yang signifikan pada kadar gula darah normal, tetapi mereka secara efektif memperbaiki perubahan yang diinduksi aloksan pada gula darah dan populasi sel beta pankreas. Ini juga memiliki peran pencegahan ketika diberikan sebelum pemberian aloksan. Aktivitas

ekstrak daun pada sel beta pankreas, serta kurangnya toksisitas akut, dapat memberikan harapan tambahan bagi penderita diabetes untuk masa depan. Untuk menemukan fitokonstituen yang tepat bertanggung jawab untuk aktivitas antidiabetes, penelitian lebih lanjut diperlukan (Islam A., *et al.*, 2022).

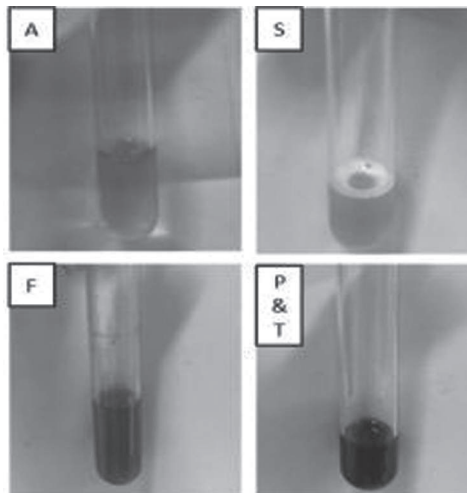
Ekstrak kulit kayu *Lannea coromandelica*, ketika diberikan pada tikus yang dibebani glukosa juga menunjukkan pengurangan yang bergantung pada dosis dan signifikan dalam serum kadar glukosa. Pada dosis tertinggi yang diuji dari 400 mg ekstrak per kg berat badan, ekstrak menyebabkan 29,80% penurunan kadar glukosa serum. Kesimpulannya, daun dan batang *Leucas aspera* dan kulit kayu *Lannea coromandelica* dapat menjadi subjek studi ilmiah lebih lanjut dalam pencarian obat antidiabetes yang lebih baik (Mannan A., *et al.*, 20).

Ekstrak etanol daun dan kulit batang *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr memiliki aktivitas analgesik yang signifikan dan suasana hati tindakan mungkin melibatkan mekanisme perifer. Hasil merasionalisasi penggunaannya dalam pengobatan folklorik terutama terhadap rasa sakit dan peradangan (Rahman, M., *et al.*, 2016).

Ekstrak etanol dari ranting DC dan LC menginduksi apoptosis pada garis sel HepG2. Pyrogallol dan lupeol di DC (ranting) mungkin bertanggung jawab atas sitotoksitas terhadap sel kanker HepG2 (Weerapreeyakul *et al.*, 2017).

Senyawa alkaloid ditandai dengan munculnya endapan setelah diberikan air rebusan daun Kayu jawa 4 ml dan reagen wagner 4 tetes, tetapi pada uji yang telah dilakukan hasilnya negatif karena tidak terdapat endapan. Pada senyawa saponin hasilnya positif, ditandai dengan munculnya buih setelah diberikan air rebusan daun Kayu Jawa 4 ml dan dipanaskan selama 2 menit lalu dinginkan dan dikocok

lalu diamati selama 30 detik, diamati perubahan yang terjadi dan buih tersebut tidak hilang, jadi menunjukkan adanya senyawa saponin. Senyawa Flavonoid juga menunjukkan hasil yang positif pada daun Kayu Jawa setelah diberi 5 ml air rebusan daun Kayu Jawa yang dipanaskan selama 5 menit dan ditambahkan HCl pekat 2-4 tetes dan 0,2 gram bubuk mg, warnanya berubah menjadi merah tua, kemudian uji polifenol dan tanin yang diberi 2 ml air rebusan daun Kayu Jawa dan 2-3 tetes FeCl_3 1% warnanya berubah menjadi biru kehitaman (Fadliah, S. *et al.*, 2018).



Gambar 4.2 Uji Fitokimia Air Rebusan Daun Kayu Jawa

Keterangan: (A) Uji Alkaloid, (S) Uji Saponin, (F) Uji Flavonoid, (P&T) Uji Polifenol dan Tanin

Hasil yang didapatkan dari uji fitokimia air rebusan, daun Kayu Jawa mengandung senyawa saponin, flavonoid, polifenol, dan tanin. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan Kayu Jawa merupakan zat bioaktif yang berkaitan dengan kandungan kimia

berfungsi sebagai pelindung tumbuhan dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan tersebut atau lingkungan dan dijadikan obat tradisional (Paramudita *et al.*, 2017).

Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I⁻ dari kalium iodide menghasilkan ion I₃⁻ yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K⁺ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Marliana *et al.*, 2005).

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan Uji Fitokimia Air Rebusan Daun Kayu Jawa

Senyawa Aktif	Warna	Hasil Pengamatan
Alkaloid	Kuning, tidak terdapat endapan	-
Saponin	Kuning, berbuih	+++
Flavonoid	Merah tua	++
Polifenol	Biru kehitaman	+++
Tanin	Biru kehitaman	+++

Keterangan: (+) Menunjukkan positif, (-) Menunjukkan negatif.

Pada air rebusan daun Kayu Jawa tidak terdapat endapan berwarna kuning yang menandakan air rebusan daun Kayu Jawa negatif mengandung alkaloid. Saponin merupakan senyawa yang mempunyai gugus hidrofilik dan hidrofob. Saponin pada saat dikocok terbentuk buih karena adanya gugus hidrofil yang berikatan dengan air sedangkan hidrofob akan berikatan dengan udara. Pada struktur misel, gugus polar menghadap ke luar sedangkan gugus non-polar menghadap ke dalam (Simaremare, 2014). Keadaan ini yang membentuk busa, hasil

yang diperoleh dari uji saponin menunjukkan hasil yang positif karena terdapat buih pada air rebusan daun Kayu Jawa dan tidak hilang selama 30 detik.

Pada hasil uji flavonoid, air rebusan daun Kayu Jawa menunjukkan hasil yang positif yakni mengalami perubahan warna menjadi kemerahan. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil. Penambahan HCl pekat berfungsi untuk protonasi flavonoid hingga terbentuk garam flavonoid. Setelah penambahan bubuk magnesium, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi kemerahan atau hitam kemerahan. Warna hitam yang dihasilkan menandakan adanya flavonoid akibat dari reduksi oleh HCl pekat dan magnesium (Harborne, 1996).

Uji Polifenol dan tanin dilakukan dengan melakukan penambahan $FeCl_3$ 1% diperkirakan akan menimbulkan warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan. Perubahan warna terjadi dengan penambahan $FeCl_3$ 1%, menandakan adanya gugus hidroksil yang ada pada senyawa polifenol dan tanin (Simaremare, 2014). Hasil menunjukkan reaksi positif pada daun Kayu Jawa karena menimbulkan perubahan warna menjadi biru kehitaman.

Penelitian yang dilakukan oleh Mu'nisa, A., *et al.*, 2017 menguji rebusan Kayu Jawa dengan mengukur kandungan total fenol dan flavonoid, metode DPPH, dan IC_{50} . Hasil analisis kualitatif ekstrak fenol dan flavonoid infusa kayu jawa pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil Analisis Kualitatif Ekstrak Fenol dan Flavonoid Infusa Kayu Secang

Analisis kualitatif	Reagen	Hasil Pengamatan
Ekstrak fenol total	2 tetes $FeCl_3$	+
Ekstrak flavonoid ekstrak	- Bubuk Mg^{+} - Konsentrat HCl 10 tetes	+ +

Pada Tabel 4.2 menunjukkan pemberian infusa kayu secang total kandungan fenol replikasi awal pertama 54 153 mk/L dan berturut-turut replika 2 dan 3 adalah 54 613 dan 57 692 mg/L.

Tabel 4.3 Hasil Analisis Kuantitatif Ekstrak Fenolik Infusa Kayu Jawa

Ekstrak	Replikasi	Absorbansi (y)	Kandungan Total Fenol Awal (mg/mL)	Kandungan Total Fenol (mgGAE/ml)	Rata-rata Kandungan Total Fenol (μ GAE/mL)
Infusa Kayu Jawa	I	0,524	54,153	41,530	554,860
	II	0,530	54,613	546,130	
	III	0,570	57,692	572,920	

Tabel 4.3 memperlihatkan kayu secang yang diinfuskan kandungan flavonoid total replikasi pertama awal 10 016 mk/L dan berturut-turut replika 2 dan 3 adalah 10 416 dan 10,7 mg/L.

Tabel 4.4 Hasil Analisis Kuantitatif Flavonoid pada Ekstrak Kayu Jawa

Ekstrak	Replikasi	Absorbansi (y)	Kandungan Total Flavonoid		Rerata Kandungan Total Flavonoid
			Awal	Akhir	
Infusa Kayu Jawa	I	0,535	10,016	1,0016	1,1037
	II	0,559	10,416	1,0416	
	III	0,576	10,700	1,0700	

Tabel 4.5 Persentase Quercetin dan DPPH dengan Panjang Gelombang 515 nm

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Inhibisi %	IC50 (μ g/mL)	Keterangan
4	0,865	4,419	5,054	Sangat Kuat
6	0,756	16,464		
8	0,664	26,629		
10	0,569	37,127		
12	0,451	50,165		
Rata-rata	0,661	26,961		

Pada Tabel 4.5 menunjukkan persentase hambatan quercetin dan DPPH pada panjang gelombang 515 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi persentase resistensi. Nilai IC 50 sama dengan 5,054 pg/ml.

Tabel 4.6 Persentase Hambatan Kayu Secang dengan Panjang Gelombang 513,08 nm

Konsentrasi (%)	Absorbansi	Inhibisi %	IC50 (µg/mL)	Keterangan
1	0,831	-0,241	0,047	Sangat Kuat
2	0,845	-1,930		
3	0,686	17,249		
4	0,481	55,609		
5	0,368	55,609		
6	0,250	69,843		
Rata-rata	0,576	30518		

Pada Tabel 4.6 menunjukkan semakin besar persentase kayu secang pada panjang gelombang 513,08 nm maka semakin tinggi persentase cawan kayu dengan nilai IC 50 sebesar 0,047 ug/ml. Kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) merupakan tanaman yang biasa tumbuh di tempat terbuka hingga ketinggian 1000 m dpl seperti di daerah pegunungan berbatu, memiliki batang berkayu, terbentuk bulat dan berwarna hijau kecoklatan. Tumbuhan kayu secang mengandung asam galat, brasilin, delta-a phellandrene, oscimene, resin, resorsin, minyak atsiri dan tanin. 0,16-0,20% sedangkan daunnya mengandung minyak atsiri yang berbau tidak sedap dan tidak berwarna.

Aktivitas antioksidan kayu secang dinyatakan sebagai persentase penghambatan terhadap radikal DPPH. UV-Vis spektrofotometer mengukur persentase inhibisi yang diperoleh dari selisih absorbansi antara DPPH absorbansi dengan absorbansi sampel. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan IC50 yaitu konsentrasi larutan sampel diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Hasil

pengujian menunjukkan cawan kayu aktif sebagai antioksidan dengan IC₅₀ 0,047 ug/ml. Isolat nilai IC₅₀ lebih kecil dari quercetin yang memiliki nilai IC₅₀ sebesar 5,04 ug/ml. Hal ini menunjukkan bahwa secang dan quercetin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat karena memiliki IC₅₀ kurang dari 200 pg/ml (M.S. Blois, 1958). Pengujian aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi ternyata paling tinggi konsentrasi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi, tetapi jika dibandingkan dengan quercetin, maka quercetin memiliki antioksidan yang lebih rendah aktivitas.

Kayu secang merupakan sumber antioksidan alami. Sudah banyak penelitian tentang khasiat kayu jawa, baik sebagai antimikroba, antioksidan, dan pewarna alami. Komponen senyawa bioaktif yang terkandung dalam kayu yaitu brazilin, brazilein, 3'-O-metilbrazilin, sappanone, chalcone, sapan calchone dan komponen standar lainnya, seperti asam amino, karbohidrat dan asam palmitat yang relatif sangat kecil. Bagian khusus Brasil adalah kayu yang dapat memberikan warna merah kecoklatan ketika dioksidasi atau dalam kondisi basa. Selain itu, brazilin ini disinyalir juga dapat melindungi tubuh dari gangguan diracuni oleh radikal kimia (O. Rina, 2012).

BAB 5

TANAMAN TOMAT

5.1 Diskripsi Tanaman Tomat

Dalam taksonomi tumbuh-tumbuhan, tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) diklasifikasikan sebagai berikut (Tjitrosoepomo, 1994):

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Sub divisio	: Angiospermae
Class	: Monocotyledonae
Ordo	: Solanales/Tubiflorae
Family	: Solanaceae
Genus	: Lycopersicum
Species	: <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.

Tomat terutama mengandung 94-96% kandungan air dan 4,5 hingga 9,5% adalah zat padat, dan zat padat lainnya 1% berupa kulit dan biji. Persentase zat padat pada tomat tergantung dari perbedaan keadaan karakteristik tanah, properti irigasi, dan lain-lain. Dalam jus tomat ada padatan tak larut hadir yang berkisar antara 16-21% dari

total padatan yang dikomposisikan dari pektin dan selulosa. Di dalam tomat ada kandungan berbagai asam dalam agregat kecil, berupa asam sitrat yang bertindak sebagai sitrat monohidrat sebagai asam utama (Pathak S. S., *et al.*, 2020).

Tanaman tomat diduga berasal dari Amerika Tengah dan Amerika Selatan. Pengembangan budidayanya semakin meluas di berbagai negara di dunia, termasuk kawasan Asia. Di Filipina, tanaman tomat diperkenalkan pada tahun 1571, kemudian ditanam di negara lainnya di Asia. Masuknya tanaman tomat ke Indonesia diduga pada tahun 1811.

Tomat memiliki akar tunggang, akar cabang, serta akar serabut yang berwarna keputih-putihan yang menyebar ke semua arah hingga kedalaman 30-40 cm. Batang berbentuk bulat, bercabang mulai dari ketiak daun yang berada dekat dengan tanah. Kulit batang berwarna hijau dan berbulu. Daun tomat berwarna hijau dan berbulu, mempunyai panjang sekitar 20-30 cm dan lebar 15-20 cm. Daun tomat tumbuh di dekat ujung dahan atau cabang. Tangkai daun berbentuk bulat memanjang. Bunga tomat merupakan bunga majemuk, terletak dalam rangkaian bunga yang terdiri atas 4-14 kuntum bunga yang menggantung pada rangkaian bunga. Buah berbentuk bulat, bulat lonjong, bulat pipih atau oval. Buah yang masih muda berwarna hijau muda sampai hijau tua. Buah yang sudah tua berwarna merah cerah atau merah kekuningan. Biji tomat berbentuk pipih, berbulu dan diselimuti daging. Batang tomat walaupun tidak sekeras tanaman tahunan, tetapi cukup kuat. Warna batang hijau dan berbentuk persegi empat sampai bulat. Pada permukaan batangnya banyak ditumbuhi rambut halus terutama dibagian berwarna hijau. Di antara rambut-rambut tersebut terdapat rambut kelenjar. Pada bagian buku-bukunya terjadi penebalan dan kadang-kadang pada buku bagian bawah terdapat akar-akar pendek. Jika dibiarkan (tidak dipangkas) tanaman tomat

akan mempunyai banyak cabang yang menyebar rata. Sebagaimana tanaman dikotil lainnya, tanaman tomat berakar samping yang menjalar ke tanah.



Gambar 5.1 Tanaman tomat ceri dan buah

Sumber: <https://lifestyle.haluan.co/2022/06/20/3>

Daun tanaman tomat mudah dikenali karena mempunyai bentuk yang khas, yaitu berbentuk oval, bergerigi, dan mempunyai celah yang menyirip. Di bagian bawah terdapat 5 buah kelopak bunga yang berwarna hijau. Buah tomat yang masih muda biasanya terasa getir dan berbau tidak enak karena mengandung lycopersicin yang berupa lendir dan dikeluarkan 2-9 kantong lendir. Ketika buahnya semakin matang, lycopersicin lambat laun hilang sendiri sehingga baunya hilang dan rasanya pun jadi enak, asam-asam manis (Trisnawaty dan Setiawan, 2005).

5.2 Ekstraksi Buah Tomat

Adanya kandungan likopen pada tomat, maka perlu dilakukan suatu teknik ekstraksi dengan menggunakan pelarut seperti heksana, etil asetat, benzena, etil eter, aseton, etanol, dan petroleum eter dan lain-lain dalam mengekstrak likopen dari sumber alami. Selain itu, banyak cara ditempuh dalam hal membuat berbagai konsentrasi pelarut dan penyatuan dengan pelarut satu dengan yang lainnya. Pelarut ini sendiri atau dalam agregasi tidak efektif dalam mengekstraksi likopen

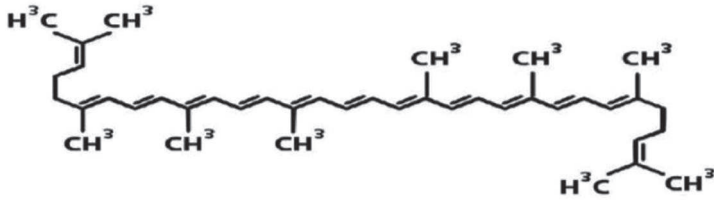
dalam jumlah, karena mereka tidak memiliki kemampuan untuk melarutkan konstituen dinding sel yang kaya akan selulosa dan pektin, sebagian besar bertanggung jawab untuk pengikatan likopen (Pathak S.S., *et al.*, 2020).

5.3 Kandungan Kimia Buah Tomat

Konsumsi tomat dalam diet dapat melindungi dan mempertahankan diri dari kanker dan menurunkan glukosa darah pada pasien diabetes. Tomat memiliki senyawa bioaktif yang dengan sifat fisiologis yang besar. Dengan adanya kandungan senyawa fenolik karotenoid dan vitamin, buah tomat diyakini memiliki efek besar terhadap kemajuan pada dunia kesehatan. Selain itu, tomat memiliki nilai ekonomi serta nutrisi yang sangat penting. Tomat juga banyak mengandung polifenol dan karotenoid yang dapat memulihkan beberapa kualitas sensorik, misalnya karotenoid seperti pada likopen berpigmen merah, karoten, fitofluen senyawa provit A, dan phytoene. Adanya 98% flavonol adalah sebagian besar dari total flavonol terkandung dalam kulit seperti dalam asimilasi bentuk quercetin dan kaempferol (Pathak S.S., *et al.*, 2020).

Tomat (*Lycopersicon esculentum*) merupakan sumber makanan penting antioksidan seperti tokoferol dan karotenoid: beta karoten, fitoena, dan fitofluena. Tomat juga merupakan makanan utama sumber likopen, antioksidan *in vitro* yang paling kuat di antara karotenoid lainnya (Gerster H., 1997).

Likopen adalah pigmen alami terutama bertanggung jawab atas warna merah tua tomat. Likopen dapat ditemukan di berbagai produk alami seperti tomat, cabai merah, semangka, dan pepaya. Karena sifat fisikokimia dan sifat biologisnya menarik banyak perhatian ke arah likopen. Likopen hanya disintesis oleh tanaman. Likopen berperan sangat penting dalam mencegah berbagai penyakit terutama penyakit degeneratif (Pathak S.S., *et al.*, 2020).



Gambar 5.2 Struktur Kimia Likopen

Sumber: Sharma dan Le Maguer, 1996

Likopen adalah asiklik tak jenuh hidrokarbon. Ini berisi 13 ikatan rangkap, di mana 11 terkonjugasi. Bahan kimia nama likopen adalah 2,6,10,14,19,23,27,31-octamethy 12,6,8,10,12,14,16,18,20,22,24, 26,30-dotriacontatridecaene. Nama umum termasuk-karoten, all-trans-lycopene, dan (semua-E)-likopen. Rumus kimia adalah $C_{40}H_{56}$.

Likopen adalah simetris tetraterpene dirakit dari 8 isoprena unit. Ini adalah asosiasi karotenoid keluarga senyawa, dan karena itu terdiri atas karbon dan hidrogen, disebut sebagai karoten. Bentuk *all-trans*, molekul panjang, dan lurus, dibatasi oleh sistem sebelas ikatan rangkap terkonjugasi. Setiap ikatan rangkap dalam yang diperpanjang ini sistem elektron menurunkan energi esensial untuk elektron untuk transisi ke keadaan tinggi, memungkinkan molekul untuk menyerap jelas cahaya dengan panjang gelombang evolusioner yang lebih panjang.

Buah-buahan dan sayuran adalah komponen sumber antioksidan alami. Antioksidan menawarkan keamanan dalam menangkal radikal bebas yang berbahaya dan mengurangi tingkat kanker dan penyakit jantung. Antioksidan karotenoid terbesar yang memenuhi syarat adalah likopen. Potensi antioksidan likopen untuk mendelokalisasi spesies radikal bebas yang terlokalisasi pada karbon-karbon terkonjugasi ikatan rangkap, yang membantu membuatnya cukup menguntungkan

bagi manusia. Tomat dan produknya seperti pasta dan pulp diperkirakan sebagai salah satu sumber kaya likopen. Jumlah likopen dalam tomat berfluktuasi antara 90 hingga 190 kg/g berat segar. Pasta tomat adalah konvergen padat yang dibuat dari tomat matang dengan kulit dan bijinya dibuang (Pathak S. S., *et al.*, 2020).

Di Provinsi Sulawesi Selatan terdapat 2 jenis tomat yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat yaitu tomat yang berasal dari Kabupaten Toraja dan Kabupaten Gowa, yaitu di daerah Malino. Tomat yang berasal dari Kabupaten Toraja berupa tomat Chery, dan yang berasal dari daerah Malino berupa tomat keriting. Kandungan dan aktivitas antioksidan kedua jenis tomat tersebut belum ada yang melaporkan, sehingga perlu kiranya dilakukan penelitian mengenai kedua jenis tomat yang berasal dari Provinsi Sulawesi Selatan.

Hasil pengukuran absorban dan kadar likopen pada tomat lokal daerah Toraja dan Malino dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 472 nm dapat dilihat pada Tabel 5.1. Berdasarkan data pada Tabel 5.1 diketahui bahwa besarnya kandungan likopen pada tomat lokal daerah Toraja dan Malino berturut-turut adalah 1478 mg/kg sampel segar dan 857 mg/kg sampel segar. Hal ini mengindikasikan bahwa tomat lokal daerah Malino mempunyai kandungan likopen yang lebih tinggi daripada tomat Toraja. Pemeriksaan aktivitas antiradikal bebas DPPH secara spektrofotometri dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan larutan DPPH pada panjang gelombang 515 nm. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka, serta hanya memerlukan sedikit sampel. Aktivitas diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul Difenil Pikril Hidrazil dengan atom hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa Difenil Pikril

Hidrazin dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning. Ekstraksi buah tomat menggunakan pelarut metanol dan aquades dengan beberapa konsentrasi yaitu 100 mg/ml, 150 mg/ml, 200 mg/ml, dan 250 mg/ml, sebagai pembanding digunakan asam askorbat (vitamin C) dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, dan 40 mg/ml. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa perlakuan pada ekstrak aquades tomat asal Toraja (81,30%), lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol (80,49%). Sedangkan pada ekstrak aquades tomat asal Malino (84,28%), lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol (82,73%). Hal ini karena pelarut aquades dapat melarutkan senyawa bioaktif lebih banyak pada tomat dibanding pelarut metanol.

Tabel 5.1 Pengukuran Absorban dan Kadar Likopen pada Tomat Lokal Daerah Toraja dan Malino dengan Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis pada Panjang Gelombang 472 nm

Perlakuan	\bar{A} (Absorbansi rata-rata)	Kandungan Likopen (mg/kg sampel segar)
Tomat Toraja	0,5311	1478
Tomat Malino	0,3199	857

Nilai persentase aktivitas antioksidan yang diperoleh dapat digunakan untuk menghitung besarnya nilai IC50 yang diperoleh dari analisis probit dan log konsentrasi sampel. Nilai IC50 yang merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% radikal bebas. Hasil uji aktivitas antioksidan penangkapan radikal bebas DPPH menunjukkan bahwa ekstrak tomat asal Toraja dengan menggunakan pelarut metanol dan aquades menunjukkan nilai IC50 sebesar 2,31 mg/ml dan 2,35 mg/ml. Sedangkan ekstrak tomat dengan menggunakan

pelarut metanol dan aquades menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 2,89 mg/ml dan 2,66 mg/ml. Pelarut aquades dan metanol merupakan pelarut yang bersifat polar sehingga dapat mengekstraksi senyawa polar dan nonpolar, senyawa-senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar yang terkandung dalam tomat. Senyawa-senyawa tersebut antara lain adalah likopen yang banyak terdapat di dalam buah tomat.

Tabel 5.2 Aktivitas Antioksidan dan Nilai IC₅₀ Ekstrak Aquades dan Metanol Tomat Asal Daerah Toraja dan Malino, serta Vitamin C sebagai Pembanding

Perlakuan	Konsentrasi (mg/ml)	Probit	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ mg/ml
Ekstrak Aquades Tomat Toraja	100	5,71	75,71	2,35
	150	5,74	77,15	
	200	5,84	79,54	
	250	5,88	81,30	
Ekstrak Metanol Tomat Toraja	100	5,67	74,65	2,31
	150	5,67	75,46	
	200	5,74	77,47	
	250	5,84	80,49	
Ekstrak Aquades Tomat Malino	100	5,84	79,54	2,66
	150	5,84	80,45	
	200	5,92	82,37	
	250	5,99	84,28	
Ekstrak Metanol Tomat Malino	100	5,74	77,24	2,89
	150	5,77	78,26	
	200	5,84	80,18	
	250	9,95	82,73	
Vitamin C	10	5,71	75,95	2,92
	20	5,77	78,37	
	30	5,88	81,30	
	40	9,95	83,13	

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar likopen pada buah tomat semakin tinggi pula aktivitas antioksidan. Kadar likopen pada buah tomat asal Toraja juga menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi pula. Namun sebaliknya, pada buah tomat asal Malino menunjukkan kadar likopen yang lebih rendah dibanding buah tomat asal Toraja. Demikian pula aktivitas antioksidan bu-

ah tomat asal Malino lebih rendah dibanding buah tomat asal daerah Toraja. Pangan nabati merupakan bahan pangan yang penting untuk memperoleh fitonutrient, salah satunya adalah tomat. Tomat merupakan sayuran yang kaya akan berbagai senyawa antioksidan seperti likopen, alfa-karoten, betakaroten, lutein, vitamin C, flavonoid, dan vitamin E (Willcox, *et al.*, 2003). Senyawa karotenoid tersebut memiliki keefektifan yang berbeda-beda dalam menjalankan fungsinya sebagai pelindung fotokimia (Sies, 1992). Dari semua senyawa karotenoid tersebut, ternyata likopen relatif lebih efisien sebagai penangkap singlet oksigen daripada karotenoid lainnya (lebih tinggi daripada A-karoten dan Btokoferol).

Likopen mempunyai kemampuan dalam menangkap singlet oksigen (ROS nonradikal) sebesar dua kali lipat dari kemampuan α -karoten (Bohm *et al.*, 2002). Menurut Di Mascio *et al* (1989), lycopene atau yang sering disebut sebagai *α -carotene* adalah suatu karotenoid pigmen merah terang, suatu fitokimia yang banyak ditemukan dalam buah tomat dan buah-buahan lain yang berwarna. Pada penelitian makanan dan phytonutrien yang terbaru, likopen merupakan objek paling populer. Karotenoid ini telah dipelajari secara ekstensif dan ternyata merupakan sebuah antioksidan yang sangat kuat dan memiliki kemampuan anti-kanker. Beberapa penelitian telah menunjukkan manfaat likopen bagi kesehatan. Pada kesehatan wanita, likopen bermanfaat dalam penyembuhan kanker payudara serta osteoporosis. Peng *et al.* (1998) menyebutkan bahwa penelitian-penelitian terbaru mengindikasikan wanita yang memiliki kandungan likopen rendah lebih rentan terkena kanker serviks dan kanker ovarium dibandingkan yang memiliki kandungan likopen tinggi. Berbagai karotenoid, termasuk likopen, telah diteliti untuk melihat hubungannya dengan kanker serviks. Hanya likopen yang menunjukkan adanya efek protektif.

5.4 Efek Farmakologi Buah Tomat

Ekstrak tomat ketika ditambahkan penghambatan ACE (*converting enzyme inhibitors*) dosis rendah diberikan ke pasien yang dirawat, penghambat saluran kalsium atau kombinasinya dengan diuretik dosis rendah, memiliki efek klinis signifikan menurunkan tekanan darah lebih dari 10 mmHg sistolik dan tekanan diastolik lebih dari 5 mmHg. Tidak ada efek samping pengobatan yang dicatat dan kepatuhan terhadap pengobatannya tinggi. Korelasi yang signifikan antara nilai tekanan darah sistolik dan tingkat likopen memiliki hubungan sebab-akibat (Paran, E., *et al.*, 2008)

Pada subjek diabetes tipe 2 konsumsi jus tomat menyebabkan peningkatan yang signifikan likopen plasma serta peningkatan resistensi *low density lipoprotein* (LDL) terhadap oksidasi (Upritchard JE., *et al.*, 2000). Dalam penelitian sebelumnya telah ditunjukkan penurunan tekanan darah properti kapsul ekstrak tomat di kelas I yang tidak pernah dirawat hipertensi (Engelhard Y.N., *et al.*, 2006).

DAFTAR PUSTAKA

- Abdurahman N. 2003. Peran lipoprotein pada aterosklerosis. Di dalam: Makmun LH, I Alwi dan A Mansjoer (ed). Prosiding Simposium Pendekatan Holistik Penyakit Kardivaskuler II. Pusat Informasi dan Penerbitan Bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta
- Adinugraha, H.A. 2011. Pengaruh Umur Induk, Umur Tunas dan Jenis Media Terhadap Pertumbuhan Stek Pucuk Sukun. *Jurnal Pemuliaan Tanaman*. 5 (1): 31-40
- Aditama, C.Y. 2013. *Manajemen Administrasi Rumah Sakit*. Jakarta. UI Press.
- Adrian, 1990. *Hari Depan Komunitas Sukun Cilacap*. Dinas Pertanian Cilacap.
- Alam, B.; Hossain, S.; Habib, R.; Rea, J.; Islam, A. 1996. Antioxidant and analgesic activities of *Lannea coromandelica* Linn. bark extract. *Int. J. Pharmacol.* Vol. 8: 224–233.
- Al-Dabbas, M. M., Al-Ismail, K., Kitahara, K., Chishaki, N., Hashinaga, F., Suganuma, T., & Tadera, K. (2007). The effects of different inorganic salts, buffer systems, and desalting of *Varthemia* crude water extract on DPPH radical scavenging activity. *Food Chemistry*. 104(2): 734–739.
- Amstrong ML dan DD Heistad, 1990. Atherosclerosis: Animal Models of Atherosclerosis: *Elsevier Science Ireland* 7(2):15-21
- Archive, B. S. 2021. *Lannea coromandelica : An Overview* J. N. Gunjal , Prof . Mrs . M . S . Patil, Prof. Dr. K. P. Chittam Department of Pharmacognosy , DCS ' s A . R . A . College of Pharmacy ,Mumbai -Agra Highway, Genus : *Lannea* Spe. 102–107.

- Arifin, H., Anggraini, N., Handayani, D., Rasyid, R. 2006. Standarisasi Ekstrak Etanol Daun *Eugenia Cumini* Merr. *J. Sains Tek. Far.* Vol 11(2):45-54
- Astawan M, T Wresdiyati, dan AB Hatana. 2005. Pemanfaatan rumput laut sebagai sumber serat pangan untuk menurunkan kolesterol darah tikus. *Jurnal Hayati* 12: 23-27
- Athanasions NG et al. 2006. Atherogenic lipid prolifera is a feature characteristic of patients with early rheumatoid arthritis: effect of early treatment-a prospective, controlled study. *Arthristis research & Therapy* (8):1-7
- Badarinath, A.V., K. Mallkarjuna Rao, C. Mandhu Sudhana Chetty, S. Ramkanth, T.V.S Rajan, K. Gnanaprakash. (2010). A Review on In-vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *International Journal of PharmTech Research.* 2(2): 1276-1285.
- Badarinath A, Rao K, Chetty CS, Ramkanth S, Rajan T, & Gnanaprakash K. 2010. A Review on In-vitro Antioxidant Methods : Comparisons, Correlations, and Considerations. *International Journal of PharmTech Research:* 1276-1285
- Belitz HD dan W Grosch. 1999. *Food Chemistry*. Ed ke-4. New York: Springer
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Benzie, Iris F.F; Strain, J.J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15–27.
- Berliner, JA et al. 1995. Atherosclerosis basic mechanism oxidation, inflammation, and genetic. *Circulation* 91: 2488-2496
- Bohm V, Puspitasari-Nienaber NL, Ferruzi MG & Schwart SJ. 2002. Trolox equivalent antioxidant capacity of different geometrical isomer of B carotene, A-carotene, lycopene and zeaxanthin. *J Agric. Food Chem* 50: 221-226

- Boligon, Aline Augusti, Michel Mansur Machado, & Margareth Linda Athayde. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med Chem.* 4(7): 517-522
- Calsum U., Akhmad K., Khildah K. 2018. Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) terhadap Penyembuhan Luka Sayat pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus* L.). *Jurnal Farmasi Galenika* 4 (2): 113 – 118
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5); 749–760
- Cook NC, Samman, S. 1996 Flavanoids chemistry metabolism, cardioprotective effects, and dietary source. *Nutritional Biochemistry* Vol. 7:66-76
- Croft KD. 1999. *Antioxidant Effects of Plant Phenolic Compounds*. In Antioxidant in Human and Disease by TK Basu. Australia. Cabi Publishing
- Cotran RS, V Kumar, dan SL Robbins. 1995. *Buku Ajar I dan II*. Ed ke-4. Terjemahan Staf Pengajar Laboratorium Patologi Anatomi FK Unair. Jakarta: Buku Kedokteran EGC
- Das NP, Pereira TA. 1990. Effects of flavanoids on thermal autooxidation of Palm oil: structure-activity relationship. *J. American Oil Chemists Society* 67: 255-258
- Decorde K, PL Teissedre, C Auger, JP Cristol, dan JM Rouanet. 2008. Phenolics from purple grape, apple, purple grape juice and apple juice prevent early atherosclerosis induced by an atherogenic diet in hamsters. *Mol Nutr Food Res.* 4:400-407.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan
- Dhaunsi GS *et al.* 1992. Demonstration of Cu,Zn-SOD superoxide dismutase in rat liver peroxisome. *J. Biol Chem* 267:6870-6875
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H., 1989. Lycopene as The Most Efficient Biological Carotenoid Singlet Oxygen Quencher. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 274 920: 532-538

- Diaz MN, F Balz, AV Joseph, dan FK John. 1997. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *The New England Journal of Medicine* 337: 408-415
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95
- Egbe, E.O.; Akumka, D.D.; Adamu, M.; Mikail, H.G. 2016. Phytochemistry, antinociceptive and anti-inflammatory activities of methanolic leaves extract of *Lannea schimperi* (Hoschst. Ex Rich) ENG. *Recent Pat. Biotechnol.* 9: 145–152.
- Embuscado, M. E. (2015). Spices and herbs: Natural sources of antioxidants - A mini review. *Journal of Functional Foods*, 18, 811–819
- Endang, T.W., Arnemia., Helmi, A. 2013. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Sukun Kering (*Artocarpus altilis*). Jurnal Analisis Kesehatan. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Engelhard YN, Gazer B, Paran E. 2006. Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension: a double-blind, placebo-controlled pilot study. *Am Heart J*;1(51):100-120
- Estebauer H, J Gebicki, H Puhl, dan G Jurgens. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL [Review]. *Free Radic Biol Med* 13: 341-390
- Estiasih T dan DK Andiyas . 2006. Aktivitas antioksidan ekstrak umbi akar ginseng Jawa (*Talinum triangulase* Wild.). *Jurnal Teknol dan Industri Pangan* Vol. 17: 166-175
- Evans CR dan B Richard. 1992 Free radicals, lipoprotein, and cardiovascular dysfunction. *Molec Aspect Med* 13:1-11
- Fadliah, S., A. Mu'nisa, dan Rachmawaty. 2018. Analisis Fitokimia Air Rebusan Daun Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*). *Jurnal Bionature* Vol. 19 (1): 73-77
- Fakhrudin N, Hastuti S, Andriani A, Widyarini S,. 2015. Nurrochmad A. Study on the Elsevier inflammatory activity of *Artocarpus*

- altilis* leaves extract in mice. *Int J Pharmacogn Phytochem Res.* 7(6):1080–5.
- Fani K, AF Debons, Jimenez, dan EL Hoover. 1988. Cholesterol induced atherosclerosis in the rabbit: effect of dimethyl sulfoxide on existing lesions. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 3: 1145-1149
- Fardiaz D, Effionora A, Ni Luh P, Wijaya CH, dan Sassy S. 1992. *Laporan Penelitian Kajian Karakteristik Komponen Aktif Bahan Pangan, Antioxidant Rempah-Rempah*. Pusat Antar Universitas. Institut Pertanian Bogor
- Farrel KT. 1985. *Spices Condiments and Seasonings*. New York. Van Nostrand Reinhold Company
- Feng R, He W, dan Hiroto O. 2000. Experimental studies on antioxidation of extracts from several plants used as both medicines and food in vitro. *Zhong Yao Cai* 23:690-698
- Fitriana, W. D., Fatmawati, S., & Ersam, T. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*). SNIP Bandung, 2015(Snips), 657–660
- Frizani' NA., Ika PM. 2018. Pengaruh Ekstrak Daun Sukun (*Artocarpus altilis*) Terhadap Gambaran Fibrosis Hepar Tikus Wistar yang Diinduksi Dietilnitrosamin. *Jurnal Kedokteran Diponegoro.* 7(2): 1072-1080
- Ganong WF. 1998. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Gerster H. 1997. The potential role of lycopene for human health. *J Am Coll Nutr.*:16:109–26. 8.
- Girotti AW. 1998. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *The Journal of Lipid Research* 39:1529-1542
- Grundt SM. 1991. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia. *Atherosclerosis and thrombosis* 11: 1619-1635

- Gutteridge JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41:1819-1829
- Guzman CCD dan JS Siemonsma. 1999. *Plant Resources of South-East Asia Spices*. Prosea Bogor Indonesia
- Halliwell B dan JMC Gutteridge. 1999. *Free Radicals In Biology And Medicine*. Oxford University Press. Pp 225-230
- Harborne, J. (1996). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Cetakan Kedua. Penerjemah: Padmawinata, K. dan I. Soediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Haruna, N., Hamzah, Z. A., Syakri, S., Ismail, I., & Hamzah, N. (2018). Efek Ekstrak Metanol dan Partisi dari Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica* Houtt. Merr.) terhadap Pertumbuhan Sel HeLa dan MCF-7. *Ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(2):113-118
- Horie, S., Ishii, H., Suga, T., 1981. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in diabetic rat liver. *Journal of Biochemistry* 90:1691–1696.
- Imam, M. Z.; Moniruzzaman, M. 2014. Antinociceptive effect of ethanol extract of leaves of *Lannea coromandelica*. *J. Ethnopharmacol* 154: 109–115.
- Indrayangingsih, W. O. I., Ibrahim, N., & Anam, S. 2015. Studi Etnofarmasi Tumbuhan Berkhasiat Obat Pada Suku Buton Di Kecamatan Binongko, Kabupaten Wakatobi, Sulawesi Tenggara. *Jurnal Farmasi Galenika* 2: 79–84.
- Islam, Ahadul, Saikat Mitra, Mohamed H. Nafady, Mohammad Tauhidur Rahman, Vineet Tirth, Aklima Akter, **Talha Bin Emran**, Amany Abdel-Rahman Mohamed, Ali Algahtani, dan Sanad S. El-Kholy. 2022. Neuropharmacological and Antidiabetic Potential of *Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr. Leaves Extract: An Experimental Analysis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 56: 1-10
- Islam, M.T.; Ito, T.; Sakasai, M.; Tahara, S. 2002. Zoosporicidal activity of polyflavonoid tannin identified in *Lannea coromandelica*

- stem bark against phytopathogenic oomycete *Aphanomyces cochlioides*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6697–6703.
- Ismail, I., Armisman Edy Paturusi, A., & Aridani, I. (2016). Aktivitas Antimikroba Hasil Fraksinasi Korteks Kayu Jawa (*Lannea coromandelica* (Houtt.) Merr.). *Biogenesis: Jurnal Ilmiah Biologi* 4(1): 122–130.
- Jacques Britto, N., & Durairaj, K. (2020). Phytochemical profile and medicinal potentials of *lannea coromandelica* stem. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* 11(3), 3465–3472.
- Jayashree T dan C Subramanyan. 1999. Antiaflatoxic activity of eugenol is due to inhibition of lipid peroxidation. *Lett Appl Microbiol* 28:79-83
- Jirovetz L *et al.* 2006. Chemical composition and antioxidant properties of clove leaf essential Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 17: 6303-6307
- Jokinen MP, TB Clarkson, dan RW Prichard. 1985. Recent advances in molecular pathology: animal models in atherosclerosis research. *Experimental and Molecular Pathology* 42:1-28
- Jones TC dan RD Hunt. 1983. *Veterinary Pathology*. 5th Ed. Philadelphia. Lea & Febiger
- Juliastuti, H., Ardela TN., Bayan AF., dan Euis R Y. 2017. Ethanol-based Breadfruit Leaf (*Artocarpus altilis*) Extract as Hepatoprotective in Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury. *Journal of Pharmacology and Toxicology* 12 (3): 136-141
- Kadir, M.F.; Sayeed, M.S.B.; Mia, M.M.K. 2013. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol* 147: 148–156.
- Kameswara Rao B, Kesavulu MM, Apparao C,. 2003. Evaluation of hypoglycemic effect of *Momordica cymbalaria* fruit in alloxandiabetic rats. *Fitoterapia*, 74: 7-13

- Lopez-Alarcon, Camilo & Ana Denicola. 2012. Evaluating the Antioxidant Capacity of Natural Products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta* 2(1); 1-7
- Kanchana, S., Arumugam, M., Giji, S., & Balasubramanian, T. 2013. Isolation, characterization and antioxidant activity of hyaluronic acid from marine bivalve mollusc *Amussium pleuronectus* (Linnaeus, 1758). *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 291): 1-7
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1): 41–60
- Kaur, R.; Jaiswal, M.L.; Jain, V. 2013. Protective effect of *Lanea coromandelica* Houltt. Merrill. against three common pathogens. *J. Ayurveda Integr. Med.* 4: 224–228.
- Kedare, Sagar B. & R. P. Singh. (2011). Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *Journal Food Science Technology.* 48(4): 412-422
- Kessler M, Ubeaud G, Jung L. 2003. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J. Pharm and Pharmacol.* 55: 131-142
- Khalaf NA, KS Ashok, AO Atif, EA Zaha, dan F Husni. 2007. Antioxidant activities of some common plants. *Turk J Biol* 31:1-5
- Kirtikar, K.R. and B.D. Basu, 1991. *In: Indian Medicinal Plants, Vol. III, Deharadun: Lalit Mohan Basu, pp: 2019.*
- Kotamballi N *et al.* 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinivera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50: 5909-5914
- Kumar, T.; Jain, V. 2015. Appraisal of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant potential of folkloric *Lanea coromandelica* using in vitro and in vivo assays. *Scientifica* 20: 36-49.
- Kumar, S., A.K. Pandey. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *Sci. World J.*, 16 (2): 7-5

- Kumar, V.; Lemos, M.; Sharma, M.; Shriram, V. 2013. Antioxidant and DNA damage protecting activities of *Eulophia nuda* Lindl. *Free Radic. Antiox.* 3: 55–60.
- Lan WC, Tzeng CW, Lin CC, Yen FL, Ko HH. 2013. Prenylated flavonoids from *Artocarpus altilis*: Antioxidant activities and inhibitory effects on melanin production. *Phytochemistry* 89 :78–88.
- Lee YS *et al.* 2008. Antioxidant and anti hypercholesterolemic activities of *Wasabia japonica*. *ECAM* 10:1093-1097
- Lopez-Alarcon, Camilo & Ana Denicola. (2012). Evaluating the Antioxidant Capacity of Natural Products: A review on chemical and cellular-based assays. *Analytica Chimica Acta*, 45(3): 34-45
- Leng, Lee Yit Nuramira binti Nadzri, Khor Chu Yee, Norawanis binti Abdul Razak, dan Abdul Razak Shaari. 2018. Antioxidant and Total Phenolic Content of Breadfruit (*Artocarpus altilis*) Leaves. *MATEC Web of Conferences* 150, 06007
- M. S. Blois. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, (4617): 1199–1200
- M. Kopjar, M. Tadic. 2015. Phenolic content and antioxidant activity of green, yellow, and black tea leaves, *Chem. Biol. Techn. Agric.*, 2(1): 1-6
- Manik, M. K., Wahid, M. A., Islam, S. M. A., Pal, A., & Ahmed, K. T. (2013). A comparative study of the antioxidant, antimicrobial and thrombolytic activity of the bark and leaves of *Lanea Coromandelica*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(7): 2609–2614.
- Mannan, A., Hirak Das, Mohibur Rahman, Jerin Jesmin, Aziza Siddika, Mahabuba Rahman, Shahnaz Rahman, Majeedul H. Chowdhury, dan Mohammed Rahmatullah. 2010. Antihyperglycemic Activity Evaluation of *Leucas Aspera* (Willd.) Link Leaf and Stem and *Lanea Coromandelica* (Houtt.) Merr. Bark Extract in Mice. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 4(3): 385-388

- Mann J et al, 2008. Chronic kidney disease and the cardiovascular system. *Internist Berl.* 4:413-4,
- Manonmani, G., Anbarasi, K., Balakrishna, K., Veluchamy, G., Shyamala Devi, C.S., 2002. Effect of Terminalia arjuna on the antioxidant defence system in alloxan induced diabetes in rats. *Biomedicine* 22: 52–61.
- Marinetti GV. 1990. *Disorders of Lipid Metabolism*. New York and London: Plenum Press
- Marliana D.S., Venty S., & Suyono. (2005). Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sebelas Maret (UNS) Surakarta. *Jurnal Biofarmasi*. 3 (1): 26-31
- Mayes PA.1997. *Pengangkutan dan penyimpanan lipid*. Di dalam: Murray RK et al. *Biokimia Harper*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Pp 260
- MacDonald-Wicks, Lesley K, Lisa G Wood & Manohar L Garg. (2006). Review Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86: 2046-2056.
- McGilvery RW dan GW Golstein. 1996. *Biokimia suatu Pendekatan Fungsional*, Ed-3. Jakarta: Airlangga University Press.
- Mishra, Krishnanad, Himanshu Ojha & Nabo Kumar Chaudhury. (2011). Estimation of Antiradical Properties od Antioxidants using DPPH assay: A Critical Review and Results. *Food Chemistry*. 130: 1036-1043.
- Montgomery R, LD Robert, WC Thomas, dan AS Arthur. 1993. *Biokimia suatu Pendekatan Berorientasi Kasus*, Ed ke-4. M. Ismadi, penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Mulaudzi, R.B.; Ndhala, A.R.; Kulkarni, M.G.; van Staden, J. 2012. Pharmacological properties and protein binding capacity of

- phenolic extracts of some Venda medicinal plants used against cough and fever. *J. Ethnopharmacol* 143: 185–193.
- Mu'nisa, A., Yusminah Hala, dan A. Muflihunna. 2017. Analysis of Phenols and Antioxidants Infused Sappan Wood (*Caesalpiniasappan* L.). *International Journal of Scientific Development and Research (IJS DR)* 2 (9): 89-93
- Mu'nisa, Halifa P., dan A. Muflihunna, 2011, Uji Kapasitas Antioksidan Ekstrak Daun Sukun dan Flavanoid. *Prosiding Seminar Sains IV FMIPA IPB, Bogor*.
- Murray RK, KM Daryl, AM Peter, dan WR Victor. 1997. *Biokimia Harper*. Ed ke-22. Andry Hartono, penerjemah. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC
- Mycek, M. J., Harvey R. A., Champe, P. C. 2001. *Insulin dan Obat-Obat Hipoglikemik Oral*. Edisi 2. Penerjemah: Azwar Agoes. Jakarta. Widya Medika
- Naidu KA dan NB Thippeswamy. 2002. Inhibition of human low density lipoprotein oxidation by active principles from spice. *Mol Cell Biochem* 229:19-23
- Noguchi N dan E Niki. 1999. *Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants*. Di dalam Papas, AM. London: Antioxidant Status, Diet, Nutrition, and Health. CRC Press. Pp 3-20
- Nurdin A, Achmad M, dan Hadi Suratno. 2001. Isolasi eugenol dari minyak daun cengkeh skala pilot plant. *Jurnal Saint dan Teknologi* 3: 58-62
- Nurjanah, N., Izzati, L., & Abdullah, A. (2011). Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (*Solen* spp). *Ilmu Kelautan: Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(3): 119–124
- Nurdjannah N dan Mariska I. 1988. Pengaruh tipe tanaman dan ketuaan daun cengkeh terhadap kandungan minyak dan eugenolnya. *Bul Litro* 2: 93-97

- Nurdjannah N, Sri Y, dan Linda Y. 1997. *Pengolahan dan diversifikasi Hasil Cengkeh*. Di dalam Monograf Tanaman Cengkeh. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
- O. Rina, 2012. Efektifitas Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L.) Sebagai Bahan Pengawet Daging Effectiveness of Extract Wood of Secang (*Caesalpinia Sappan*. L) as Meat Preservative,” *J. Pertan. Terap* Vol 5 (2): 12-19
- Pathak S. S., Om P.A., Kanak G.B., Mayur D.S., Pavan F., K.R. Biyani. 2020.
- A Review on Recent Techniques of Extraction and Isolation of Lycopene from Tomato. *International Journal of Research and Review* Vol.7 (4): 487-490
- Paran, E., Victor N., dan Yechiel N.E., & Inbal H. H. 2008. The Effects of Natural Antioxidants from Tomato Extract in Treated but Uncontrolled Hypertensive Patients. *Cardiovasc Drugs Ther* 23:145–151
- Paramudita, E., Ramdani., & Iwan, D. (2017). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak n-Heksana Kulit Batang Kayu Jawa *Lannea coromandelica* (Houtt) Merr. *Jurnal Chemica*. 18 (1): 64-75
- Peng, Y. M., Y. S. Peng, J. M. Childers, K. D. Hatch and D. J. Roe. 1998. Concentrations of Carotenoids, Tocopherols, and Retinol in Paired Plasma and Cervical Tissue of Patients with Cervical Cancer, Precancer and Noncancerous. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7(4); 347-350
- Prawirodihardjo, E. (2014). *Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol 70% dan Ekstrak Air Laut Batang Kayu Jawa (Lannea coromandelica)*. Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan Uin Syarif Hidayatullah Jakarta, 39.
- Rahayu, M., Sunarti, S., Sulistiarini, D., & Prawiroatmodjo, S. 2006. Traditonal Use Of Medicinal Herbs By Local Community Of Wawonii Island, Southeast Sulawesi. *Biodiversitas Journal Of Biological Diversity* 7(3): 245–250

- Rahman, M., Khatun, A. Uddin, S.J., Shilpi, J.A. 2016. Comparative Effect of *Lannea coromandelica* (HOUTT.) MERR. Leaves and Steam Barks on Acetic Acid Induced Pain Model in Mice and Chromogenic Reagents: Exploring the Analgesic Potential and Phytochemical Groups. *Archives* 6: 46-152
- Orellana M, O Fuentes, H Rosenbluth, M Lara, dan E Valdes. 1992. Modulation of rats liver peroxisomal and microsomal fatty acids oxidation by starvation. *FEBS* 3(1): 193-196
- Ogata M, Hoshin M, S Rano, dan T Endo. 2000. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. *Chem Pharm Bull* 48: 147-149
- Pandya N, D. Santani, dan S. Jain. 2006. Antioxidant activity of Ezetimibe in hypercholesterolemic rats. *Indian J Pharmacol* 38:205-208
- Patil, Priti S., Pratima A. Tatke, & Satish Y. Gabhe. (2015). In vitro Antioxidant and Free Radical Scavenging Activity of Extracts of Rosa damascene Flower Petals. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 3(9): 589-601
- Pourmorad F, SJ Hosseinimehr, dan N Shahabimajd. 2006. Antioxidant activity, phenol, and flavonoid content of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 5:1142-1145
- Price SA dan LM Wilson. 2006. *Patofisiologi. Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Jakarta. Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Przybylski R, Y Lee dan N Eskin. 2001. *Antioxidant and radical scavenging activities of buckwheat seed components*. In Pkorny, Yanishlieva and M. Gordon (eds). *Antioxidant in Food*. Woodhead Publishing Ltd. England
- Purseglove JW, EG Brown, CK Green, dan SRJ Robbins. 1981. *Spice*. London: Longman
- Przynska, Krystyna & Anna Pekal. (2013). Application of Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to Estimate the Antioxidant

- Capacity of Food Samples. *Journal Analysis Methods*. 5: 4288-4295.
- Rahmatullah, M.; Azam, M.N.; Khatun, Z.; Seraj, S.; Islam, F.; Rahman, M.A.; Jahan, S.; Aziz, M.S. 2012. Medicinal plants used for treatment of diabetes by the Marakh sect of the Garo tribe living in Mymensingh district, Bangladesh. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.* 9: 380–385.
- Rajalakshmi K, P Gurumurthi, dan SN Devaraj. 2000. Effect of eugenol and tincture of craraegus (tcr) on in vitro oxidation of LDL + VLDL isolated from plasma of non insulin dependent diabetic patients. *Indiana J Exp Biol* 38: 509-511
- Rasti, H., Parivar, K., Baharara, J., Iranshahi, M., & Namvar, F. 2017. Chitin from the mollusc chiton: Extraction, characterization and chitosan preparation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16(1), 366–379.
- Rice-Evans C dan TD Anthony. 1991. *Techniques In Free Radical Research*. Elsevier. Pp 146,202
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Padmawinata K. Penerjemah. Bandung. Penerbit ITB
- Safari MR, T Heshmatollah, A Mohsen, N Gholam-Ali, dan A Sedige. 2002. The effects of lipophilic antioxidants on the affinity of LDL to its receptor: model for prevention of atherogenesis. *Iranian Biomedical Journal* 6:111-115
- Saifudin, A. B., 2011. *Buku Acuan Nasional Pelayanan Kesehatan Maternal Dan Neonatal*. Jakarta. YBP-SP
- Shekhar, Tailor Chandru & Goyal Anju. 2014. Antioxidant Activity by DPPH Radical Scavenging Method of *Ageratum conyzoides* Linn. Leaves. *American Journal of Ethnomedicine*. 1(4): 244-249
- Siahpoosh, A., & Alikhani, K. (2016). Evaluation of antioxidant capacity and free radical scavenging activities of pepsin extract of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) from persian gulf. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 15(4): 604–610.

- Sies H. 1992. Antioxidant Functions of Vitamin: vitamins E and C, A-carotene and other carotenoids. *Ann NY Acad. Ci.* 69: 7-20.
- Simaremare, E.S. 2014. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Gatal (*Laportea decumana* Roxb Wedd). Program Studi Farmasi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Cenderawasih, Jayapura. *Jurnal Pharmacy.* 11 (1): 98-107.
- Singh, S.; Singh, G. 1994. Anti-inflammatory activity of *Lannea coromandelica* bark extract in rats. *Phytother. Res.* 8: 311–313.
- Singh, S.; Singh, G. Hypotensive activity of *Lannea coromandelica* bark extract. *Phytother. Res.*, 10, 429–430.
- Soni, H., & Singhai, A. K. 2012. A Recent Update of Botanicals For Wound Healing Activity. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(7): 1–7.
- Stalin, J. D., Babu, D. T., & Kumar, S. S. 2013. A Study on the Antioxidant and Free Radical Scavenging Property of *Lannea Coromandelica* Bark Extract. *International Journal of Universal Pharmacy and Life Sciences*, 3(5): 2249-6793.
- Seon-Min Jeon *et al.* 2007. Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats [Disertation]. Daejon And Daegu. Pp 125
- Soetan KO and OO Aiyellagbe. 2009. The need for bioactivity safety evaluation and conservation of medicinal plants [A Review]. *J. Medicinal* 3:324-328
- Suhardjo dan Clara M.K. 1992. *Prinsip-prinsip Ilmu Gizi*. Yogyakarta. Kanisius
- Suryanto, E dan F. Wehantouw. 2009. Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis* F.). *Jurnal Chemistry Progress* 2(1): 1-10
- St. Angelo. 1992. *Lipid Oxidation in Food*. New York: American Chemical Society
- Stipanuk MH. 2000. *Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition*. WB Saunders Company. Pp354

- Szzechowska ZE, W Grzeszczak, dan B Lacka, 1998. The role of antioxidative stress in development of diabetic angiopathies. *Wiad Lek* 51: 35-9
- Teissedre PL dan AL Waterhouse. 2000. inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substance in different essential oils varieties. *J Agric Food Chem* 48:3801-3809
- Thomas J *et al.* 2003. Modifications of the cholesterol-fed rabbit model of atherosclerosis using diets with different level of cholesterol supplementation, *Preclinica* 56: 60-69
- Tjitrosoepomo G. 1994. *Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan*, DI Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Hlm 221-225
- Torres, P., Santos, J. P., Chow, F., Pena Ferreira, M. J., & dos Santos, D. Y. A. C. 2018. Comparative analysis of in vitro antioxidant capacities of mycosporine-like amino acids (MAAs). *Algal Research*, 34: 57–67
- Trevor DSC. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung. ITB Press
- Tugiyanti E. dan Emmy Susanti . 2017. Effect of Breadfruit Leaf Powder (*Artocarpus altilis*) on Number of Blood Cells and Correlation Between Cholesterol Blood and Meat of Tegal Ducks 10 Weeks Age. *Animal Production*. 19(3):179-188,
- Upritchard JE, Sutherland WH, Mann JI. 2000. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 23:733–748.
- Utami, R. D., Kiki, M.Y., Livia, S. 2015. *Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Daun Sukun (Artocarpus altilis, Fosberg)*. Prodi Farmasi Fakultas MIPA UNISBA: Bandung. ISSN 2460-6472.
- Van Goethem, G., Zurita, A., Martin Bermejo, J., Lemaî, P., & Bischoff, H. (2001). Main achievements of FP-4 research in reactor safety. *Nuclear Engineering and Design*, 209(1–3): 29–37.

- Vidhya N dan SN Devaraj. 1999. Antioxidant effect of eugenol in rat intestine. *Indian J Exp Biol* 37: 1192-1195
- Vate, N., & Benjakul, S. (2013). Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (*Loligo formosana*). *International Aquatic Research*, 5(1): 9.
- Voigt, R. 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soendani N. S. Yogyakarta. UGM Press
- Watanabe S, R Yaginuma, K Ikejima, dan A Miyazaki. 2008. Liver diseases and metabolic syndrome. *J Gastroenterol* 43:509-18
- Weerapreeyakul, N.; Junhom, C.; Barusrux, S.; Thitimetharoch, T. 2016. Induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by extracts of *Lansea coromandelica* (Houtt.) Merr. and *Diospyros castanea* (Craib) Fletcher. *Chin. Med.* Vol. 11: 1-10
- Weiner D. 2003. Introduction to clinical medicine glomerulus disorder. *J am Soc Neprology* 34: 234-237
- Weisbroth SH, EF Ronald, dan LK Alan. 1974. *The Biology of The Laboratory Rabbit*. New York. Academic Press
- Widyawati. 2005. Potensi daun kemangi (*Ocimum basilicum* Linn) sebagai penangkap radikal bebas DPPH. *Agritech* (25): 137-142
- Willcox JK, Catignani GL & Lazarus S. 2003. Tomatoes and cardiovascular Health. *Critical Rev. in Food Sci and Nut*, 43 (1):1-18
- Wresdiyati T, Made A, dan Lusia YH. 2006a. Profil imunohistokimia superoksida dismutase (SOD) pada jaringan hati tikus dengan kondisi hiperkolesterolemia. *Jurnal Hayati* 13: 85-89
- Wresdiyati T, Made A, dan Vera DM. 2006b. Level antioksidan superoksida dismutase (SOD) menurun pada jaringan ginjal tikus hiperkolesterolemia: suatu kajian imunohistokimia. *J. Sain Vet.* 24: 168-176
- Xie, J. & K. M. Schaich. (2014). Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 62: 4251-4260.

- Yagi K. 1994. *Lipid Peroxides in Hepatic, Gastrointestinal, and Pancreatic Disease. Free Radicals in Diagnostic Medicine*. New York: Plenum Press.
- Yuan XM. dan UT Brunk. 1998. Iron and LDL-oxidation in atherogenesis. *APMIS* 106:825-8830
- Yudiati, E., Sedjati, S., Surnarsih, & Agustian, R. (2011). Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol dan Pigmen Kasar Spirulina sp. *Indonesian Journal of Marine Sciences*, 16(4): 187–192.
- Yumita, Y., Razak, A. R., Indriani, & Bahri, S. (2019). Analisis Klt Bioautografi Ekstrak Kulit Batang Tanaman Kayu Jawa (*Lannea Coromandelica*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* Dan *Shigella Dysentriae*. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia* 5(2): 191–196.
- Zheng, X.L.; Xing, F.W. 2009. Ethnobotanical study on medicinal plants around Mt. Yinggeling, Hainan Island. *China. J. Ethnopharmacol*, 124: 197–210.
- Zhouyong, D., Gang, T., Zhaogang, X., Mingyue, L., Min, X., & Yajun Zhou and Hui, R. (2017). Antioxidant activities of peptida fractions derived from freshwater mussel protein using ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Czech Journal of Food Sciences*, 35(4): 328–338
- Zou, T. Bin, He, T. P., Li, H. Bin, Tang, H. W., & Xia, E. Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptidas from natural proteins. *Molecules*, 21(1): 1–14.

GLOSARIUM

- Aktivitas antioksidan : Suatu aktivitas yang didasarkan pada kemampuannya dalam menghentikan oksidasi asam linoleat yang akan membentuk radikal peroksida
- Albumin : Protein yang banyak ditemukan pada plasma darah dan diproduksi oleh hati dan dialirkan ke aliran darah.
- Aloksan : Suatu substrat yang secara struktural adalah derivat pirimidin sederhana dan mempunyai kemampuan untuk merusak sel beta pancreas
- Analisis ABTS : Analisis untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mendonorkan radikal proton, sehingga tercapai kestabilan
- Antioksidan : Sistem perlindungan untuk mencegah pembentukan oksidan dan peroksida lipid
- Antioksidan endogen : Antioksidan berupa enzim-enzim dan berbagai senyawa yang disintesis tubuh
- Antioksidan eksogen : Antioksidan yang diperoleh dari makanan
- Artocarpus altilis : Nama sejenis pohon yang berbuah yang tidak berbiji dan dikenal dengan nama sukun
- Aterosklerosis : Suatu penyakit yang ditandai dengan hilangnya elastisitas akibat penebalan dan pengerasan pembuluh darah, terutama arteri, sehingga terjadi penyempitan lumen pembuluh darah dan terbatasnya aliran darah ke seluruh tubuh
- Beta karoten : Salah satu jenis karotenoid yang merupakan zat pigmen pada sayur dan buah berwarna merah, kuning, dan oranye.
- Bilirubin : Suatu pigmen berwarna kuning yang berasal dari perombakan heme dari hemoglobin dalam proses pemecahan eritrosit
- Diabetes Mellitus : Penyakit kronis yang kompleks ditandai kadar glukosa darah yang tinggi dan disebabkan karena defisiensi sekresi insulin atau aktivitasnya atau kedua-duanya.
- Diabetes tipe 1 : Kondisi ketika kadar gula atau glukosa dalam darah naik melebihi batas normal akibat tubuh tidak menghasilkan cukup insulin
- Diabetes tipe 2 : Kondisi ketika kadar gula darah melebihi nilai normal akibat resistensi insulin

- Eugenia aromatica O.K : Tanaman asli Indonesia, banyak digunakan sebagai rempah dan sebagai bahan utama rokok kretek khas Indonesia.
- Eugenol (C₁₈H₁₂O₃) : Suatu derivat fenol yang terdapat pada tanaman cengkeh yang berfungsi sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan, dan antikarsinogen
- Fenolik : Substansi yang mengandung satu atau lebih golongan hidroksil (OH) yang terikat pada cincin aromatik
- Ferric Reducing Ability of Plasma: Metode analisis yang biasa digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru
- Flavonoid : Senyawa alami yang banyak ditemukan pada buah dan sayuran dan berfungsi untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik
- Glutation peroksidase (GPX) : Enzim yang mengubah hidrogen peroksida dan peroksida lemak menjadi molekul yang tidak berbahaya sebelum menjadi radikal bebas
- Hiperkolesterolemia : Suatu keadaan tingginya kadar kolesterol dalam darah dan mengganggu fungsi endotel dengan meningkatkan produksi radikal bebas oksigen
- Hydrogen Atom Transfer : Metode mengukur kemampuan antioksidan yang digunakan dalam menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom H
- Hidroksil metil glutaryl koenzim A reduktase (HMGR) : Enzim yang membatasi biosintesis kolesterol dan ACAT adalah enzim yang mengubah kolesterol menjadi ester kolesterol, absorbsi kolesterol diet, sekresi VLDL hati, dan perkembangan sel busa pada aterosklerosis
- High Density Lipoprotein (HDL) : Lipoprotein yang membersihkan kelebihan kolesterol yang berbahaya di dalam darah dan membawanya kembali ke hati
- Immunohistokimia : Metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup
- Inisiasi : Tahap pembentukan awal radikal-radikal bebas
- Indeks aterogenik : Dihitung dengan menggunakan rasio KT-HDL/HDL berdasarkan hasil pengukuran kadar kolesterol total dan HDL dan dilakukan untuk mengetahui besarnya resiko terkena aterosklerosis,

karena merupakan salah satu prediktor terbaik untuk melihat resiko terkena aterosklerosis

Katalase : Enzim yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air

Koenzim Q : Senyawa alami yang memiliki fungsi mirip dengan antioksidan, yakni membantu memperbaiki kerusakan sel akibat paparan radikal bebas

Kolesterol : Sterol utama dalam tubuh manusia sebagai struktur membran sel dan lipoprotein plasma, dan bahan awal pembentukan asam empedu serta hormon steroid.

Kuratif : Pengobatan dari suatu penyakit

Low Density Lipoprotein (LDL) : Lipoprotein yang akan membawa kolesterol ke pembuluh darah.

Lannea coromandelica (Hout.) Merr : Tumbuhan dari keluarga Anacardiaceae, yang merupakan salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia

Lycopersicon esculentum Mill : Tanaman herba semusim dari keluarga Solanaceae. Batang tanaman tomat bervariasi ada yang tegak atau menjalar, padat dan merambat, berwarna hijau, berbentuk silinder dan ditumbuhi rambut-rambut halus terutama dibagian yang berwarna hijau.

Licopen : Pigmen alami terutama bertanggung jawab atas warna merah tua tomat dengan asiklik tak jenuh hidrokarbon

Metode DPPH (α,α -diphenyl- β picrylhydrazyl) : Metode yang digunakan untuk mengevaluasi potensi antioksidan dalam meredam radikal bebas

Metode Hydroxyl Radical Activities (ORACOH* atau HORAC) : Metode dengan menggunakan pengukuran reaksi antioksidan dengan senyawa radikal bebas AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane), dan antioksidan akan transfer atom hydrogen untuk mereduksi radikal bebas

metode TBARS : Metode yang berdasarkan reaksi asam tiobarbiturat (TBA) dengan malondialdehid (MDA) sebagai produknya

Nilai IC 50 : Konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH

Peroksidasi lipid : Suatu reaksi rusaknya proses oksidasi akibat adanya radikal bebas dan di bawah kondisi stres oksidatif pada membran sel, lipoprotein, dan struktur sel lainnya yang mengandung lipid

Preventif : Pencegahan dari suatu penyakit

- Propagasi : Tahap perkembangbiakan radikal bebas baru dalam suatu reaksi rantai
- Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$) : Radikal dihasilkan dari hasil reaksi Fe^{2+} dan Cu^{+} dengan H_2O_2 dan merupakan jenis yang paling reaktif
- radikal superoksida ($\text{O}_2\cdot^-$) : Radikal yang terbentuk akibat reaksi yang dikatalisis oleh NADH/NADPH oksidase dan enzim xantin oksidase.
- Radikal oksida nitrit ($\text{NO}\cdot$) : Nitrit oksida atau nitrogen monoksida adalah senyawa kimia dengan rumus kimia NO .
- Radikal lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$) : Radikal yang dapat bereaksi dengan asam lemak di sekitarnya sehingga memicu reaksi berantai lipid hidroperoksidase
- Radikal hidrogen peroksida (H_2O_2) : Radikal yang dihasilkan dalam reaksi berenzim
- Radikal asam hipoklorit (HOCl) : Suatu asam lemah yang terbentuk ketika klorin dilarutkan dalam air, dan ia terdisosiasi sebagian, membentuk hipoklorit, ClO^-
- Radikal ozon (O_3) : Senyawa kimia yang berperan penting dalam reaksi kimia ozon di stratosfer dan troposfer.
- Radikal bebas : Atom yang memiliki elektron bebas atau elektron yang tidak berpasangan
- Superoksida dismutase (SOD) : Enzim yang mengubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida
- Senyawa fenol : Senyawa organik yang memiliki minimal satu cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil
- Terminasi : Tahap reaksi yang dapat mengubah radikal bebas menjadi senyawa stabil dan tidak reaktif sehingga dapat mengakhiri reaksi propagasi radikal bebas
- Trigliserida : Salah satu bentuk lemak yang diperoleh dari darah dan juga dibuat di dalam tubuh
- Vitamin E (alfa-tokoferol) : Baris pertahanan terhadap proses peroksidasi asam lemak tak jenuh ganda yang terdapat dalam fosfolipid membran seluler dan subseluler
- Vitamin C (asam askorbat) : Kandungan yang terdapat di dalam vitamin C yang umumnya digunakan untuk mengatasi atau mencegah rendahnya kadar vitamin C pada orang yang tidak mendapatkan cukup vitamin dari makanan yang ia konsumsi sehari-hari.

INDEKS

A

Aktivitas antioksidan: 4-12, 31, 33-40, 57, 58, 63-65, 74, 84, 86-88, 94, 95, 97, 98, 105, 106, 111, 118, 119, 126-128

Albumin: 1, 24, 76, 77

Aloksan: 94, 102-106, 112

Analisis ABTS: 6

Antioksidan: 1-12, 14, 20, 21, 25, 31-40, 48, 52, 57-66, 69, 72, 74, 83, 84, 86-89, 94, 95, 97-99, 105, 106, 110, 111, 118, 119, 124-129

Antioksidan endogen: 1, 20, 64, 74, 84

Antioksidan eksogen: 1, 65

Artocarpus altilis: 91, 92, 94, 102

Aterosklerosis: 20-24, 42-44, 46-48, 51, 53, 54, 76, 79, 79, 80, 82, 84-89

B

Beta karoten: 1, 124

Bilirubin: 1, 6

C

D

Diabetes Mellitus: 23-25, 44, 76, 104

Diabetes tipe 1: 24

Diabetes tipe 2: 25, 130

E

Eugenia aromatica O.K: 29, 30

Eugenol: 30-33, 39-41, 48, 58, 59, 63, 65, 72, 74, 86-88

F

Fenolik: 4, 11, 25, 26, 34, 40, 48, 57, 64, 65, 93, 94, 106, 117, 124

Ferric Reducing Ability of Plasma: 5

Flavonoid: 38, 39, 88, 93-95, 100, 101, 105, 109, 110, 114-117, 129

G

Glutation peroksidase: 1-3, 33, 59, 61, 63, 84

H

Hiperkolesterolemia: 13, 17, 22, 41-45, 47, 49-51, 53-56, 58-62, 64-71, 73, 75, 76, 78-87, 89

Hydrogen Atom Transfer: 4

Hidroksil metil glutaril koenzim A reduktase (HMGR): 47

High Density Lipoprotein (HDL): 42-44, 49-53, 83, 89, 102

I

Inisiasi: 13, 14, 32, 58, 59, 86

Indeks aterogenik: 52-54, 82

J

K

Katalase: 1-4, 33, 59-62, 64, 84

Koenzim Q: 1

Kolesterol: 13, 16-18, 20, 22, 41-89, 94, 102, 103

Kuratif: 44, 45, 47, 49, 50, 51, 53-57, 60-62, 64, 66-72, 74, 75, 78-82, 85-89

L

Low Density Lipoprotein (LDL) : 15, 17, 18, 21, 22, 32, 42-45, 47-49, 51, 52, 73, 82-87, 89, 102, 130

Lanea coromandelica (Houtt.) Merr: 107-109, 111-113

Lycopersicum esculentum Mill: 121

Licopen: 124

M

Metode DPPH (α, α -diphenyl- β picrylhydrazyl): 7, 12, 116, 126

Metode Hydroxyl Radical Activities (ORACOH* atau HORAC): 5, 8, 12

metode TBARS: 15

N

Nilai IC 50: 98, 118

O

P

Peroksidasi lipid: 13-16, 20, 41, 54, 56-59, 86, 102, 105, 106

Preventif: 44, 45, 48-50, 53-57, 60-62, 64, 66-75, 77-82, 85, 86, 88, 89

Propagasi: 13, 14, 32, 41, 58, 59

Q

R

Radikal hidroksil ($\text{OH}\cdot$): 12, 13, 19, 104

radikal superoksida ($\text{O}_2\cdot$): 2, 19, 59, 62

Radikal oksida nitrit ($\text{NO}\cdot$): 19

Radikal lipid peroksil ($\text{LOO}\cdot$): 19

Radikal hidrogen peroksida (H_2O_2): 19

Radikal asam hipoklorit (HOCl): 19

Radikal ozon (O_3): 19

Radikal bebas: 1-5, 7, 8, 11, 13, 14, 17-20, 24, 32, 34, 41, 43, 54, 56, 58-61,
63-65, 69, 72, 74, 83-85, 89, 94, 96-99, 103, 105, 106, 110, 118, 125-
127

S

Superoksida dismutase (SOD): 1, 2, 59-62, 64-73, 84, 89, 105

Senyawa fenol: 11, 25, 26, 34

T

Terminasi: 13, 14, 64, 98

Trigiserida: 51

U

V

Vitamin E (alfa-tokoferol): 1, 8, 32, 129

Vitamin C (asam askorbat): 1, 97, 112, 127-129

