



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIHIPERLIPIDEMIA EKSTRAK  
DAUN KEPUH (*Sterculia foetida*): METODE DPPH DAN HAMBATAN  
LIPASE *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh :

**ZULVIYATI  
NIM. 112210101038**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIHIPERLIPIDEMIA EKSTRAK  
DAUN KEPUH (*Sterculia foetida*): METODE DPPH DAN HAMBATAN  
LIPASE *IN VITRO***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Sarjana Farmasi (S1) dan gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

**ZULVIYATI  
NIM. 112210101038**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2015**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang Maha segala-galanya
2. Orang tua tercinta, Ibu Nur Fauziyah dan Bapak Mukhammad Ali atas segala doa, jerih payah, dukungan, pengorbanan, kepercayaan, semangat, motivasi, cinta dan kasih sayang yang telah diberikan selama ini. Semoga Allah selalu melimpahkan ampunan dan pertolongan serta membalas dengan surganya;
3. Adikku Muhammad Mirza Ato'illah yang selalu memberi semangat dan motivasi;
4. Semua guruku di SDN Bajangan, SMPN 1 Gondangwetan, SMA 2 Pasuruan, bapak/ibu dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember, yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan penuh kesabaran;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

### MOTTO

"Hai orang-orang yang beriman, apabila dikatakan kepadamu: "Berlapang-lapanglah dalam majelis", maka lapangkanlah, niscaya Allah akan memberi kelapangan untukmu. Dan apabila dikatakan: "Berdirilah kamu, maka berdirilah, niscaya Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah Maha Mengetahui apa yang kamu kerjakan."

(QS. Al-mujadilah: 11)

Tiada harta yang lebih berharga dari akal, tiada kebijaksanaan yang lebih baik dari pada hidup baik sederhana dan terencana, tiada kemuliaan lebih tinggi daripada ketakwaan, dan tiada harta yang lebih besar daripada ilmu.

(Ali bin Abi Thalib, RA)

Setiap kamu punya mimpi atau keinginan atau cita-cita, kamu taruh di sini, di depan kening kamu jangan menempel, biarkan dia menggantung, mengambang 5 cm di depan kening kamu jadi dia tidak akan pernah lepas dari mata kamu.

([Donny Dhigantoro](#), 5 cm)

### PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zulviyati

NIM : 112210101038

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul *Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Kepuh (Sterculia foetida): Metode DPPH dan Hambatan Lipase In vitro* adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 2015

Yang menyatakan,

Zulviyati

NIM : 112210101038

**SKRIPSI**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIHIPERLIPIDEMIA EKSTRAK  
DAUN KEPUH (*Sterculia foetida*): METODE DPPH DAN HAMBATAN  
LIPASE *IN VITRO***

Oleh

Zulviyati

NIM. 112210101038

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.

Dosen Pembimbing Anggota : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul *Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Kepuh (Sterculia foetida): Metode DPPH dan Hambatan Lipase In Vitro* telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada :

Hari : Selasa  
Tanggal : 8 Desember 2015  
Tempat : Fakultas Farmasi

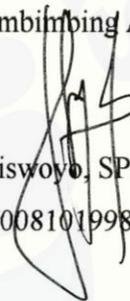
## Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt.  
NIP. 198107232006042002

Dosen Pembimbing Anggota,



Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D  
NIP. 197008101998031001

## Tim Penguji

Dosen Penguji I,



Evi Umayah/Ulfa, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 197807282005012001

Dosen Penguji II,



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm  
NIP. 197604142002122001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm

NIP. 197604142002122001

## RINGKASAN

**Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Kepuh (*Sterculia foetida*): Metode DPPH dan Hambatan Lipase *In Vitro***; Zulviyati, 112210101038; 2015; 122 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Peningkatan trigliserida darah dipengaruhi oleh konsumsi makanan seperti karbohidrat, lemak, alkohol, atau aktifitas enzim lipoprotein lipase (LPL). Untuk menurunkan kadar trigliserida darah maka lemak makanan harus dikurangi dan jumlah karbohidrat juga perlu diperhitungkan. Enzim yang penting untuk pencernaan trigliserida adalah lipase pankreas. Salah satu cara untuk menurunkan kadar trigliserida dalam darah yaitu dengan menghambat aktivitas lipase. Sebagian lipase yang tidak dihambat akan mengubah lemak menjadi asam lemak dan triasilgliserol. Asam lemak dan triasilgliserol akan masuk ke dalam pembuluh darah, jika lemak dalam pembuluh darah berlebih maka akan mudah teroksidasi dan menimbulkan plak sehingga diperlukan antioksidan untuk mengatasinya. Kandungan total fenolik dan flavonoid dalam daun kepuh memiliki aktivitas hambatan lipase dan antioksidan. Banyak penelitian yang sudah dilakukan terhadap aktivitas hambatan lipase dan antioksidan, tetapi penelitian daun kepuh sebagai aktivitas hambatan lipase dan antioksidan masih belum dilakukan.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk melihat perbandingan kandungan total fenolik dan flavonoid terhadap ketiga ekstrak daun kepuh, mengetahui aktivitas antioksidan terhadap peredaman DPPH dan aktivitas hambatan lipase terhadap ketiga ekstrak daun kepuh. Penelitian ini merupakan penelitian *eksperimental laboratoris*. Tahapan penelitian yang dilakukan yaitu mengekstraksi daun kepuh dengan metode ekstraksi bertingkat, penentuan kandungan total fenolik, penentuan kandungan flavonoid, uji aktivitas antioksidan, dan uji aktivitas hambatan lipase *in vitro*.

Penentuan kandungan total fenolik menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dengan standar menggunakan asam galat. Kandungan total fenolik dinyatakan dalam

GAE (*gallic acid equivalent*). Uji kandungan flavonoid berdasarkan reaksi senyawa flavonoid dengan  $\text{AlCl}_3$  membentuk kompleks berwarna kuning dengan penambahan NaOH akan membentuk senyawa berwarna merah muda. Standar yang digunakan untuk kandungan total flavonoid yaitu quersetin dan dinyatakan mg QE/g ekstrak (*Quersetin equivalent*). Aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan kontrol positif asam askorbat. Aktivitas antihiperlipidemia menggunakan metode hambatan lipase pankreas secara kolorimetri dengan kontrol positif orlistat. Nilai  $\text{IC}_{50}$  berdasarkan kandungan total fenolik kemudian dikonversi dalam konsentrasi ekstrak. Semakin kecil nilai  $\text{IC}_{50}$  maka semakin tinggi aktivitas antioksidan dan hambatan lipase.

Kandungan total fenolik pada ekstrak n-heksana sebesar  $7,20 \pm 0,056$ ; ekstrak etil asetat sebesar  $39,90 \pm 0,368$ ; dan ekstrak metanol sebesar  $474,35 \pm 2,846$  mg GAE/g ekstrak. Hasil uji kandungan flavonoid diperoleh ekstrak n-heksana sebesar  $28,36 \pm 0,217$ ; ekstrak etil asetat sebesar  $188,76 \pm 1,231$ ; dan ekstrak metanol sebesar  $338,14 \pm 2,087$  mg GAE/g ekstrak. Ekstrak metanol mempunyai kandungan total fenolik dan flavonoid lebih besar dibandingkan dengan kedua ekstrak. Aktivitas antioksidan DPPH pada asam askorbat sebesar  $2,61 \pm 0,007$   $\mu\text{g/ml}$ , ekstrak n-heksana sebesar  $300,93 \pm 1,13$ ; ekstrak etil asetat sebesar  $57,24 \pm 0,11$ ; dan ekstrak metanol sebesar  $4,56 \pm 0,03$   $\mu\text{g/ml}$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  tiap ekstrak tidak berbeda nyata menunjukkan bahwa jumlah fenolik dalam ekstrak hampir sama dan mempunyai sifat antioksidan yang bagus. Aktivitas hambatan lipase pada orlistat sebesar  $182,47 \pm 0,22$   $\mu\text{g/ml}$ ; ekstrak n-heksana sebesar  $547,55 \pm 0,85$   $\mu\text{g/ml}$ ; ekstrak etil asetat sebesar  $94,23 \pm 0,11$   $\mu\text{g/ml}$ , dan ekstrak metanol sebesar  $14,24 \pm 0,10$   $\mu\text{g/ml}$ .

Kandungan total fenolik dan flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan dan hambatan lipase. Semakin tinggi kandungan total fenolik dan flavonoid ekstrak maka semakin tinggi aktivitas antioksidan dan hambatan lipase. Berdasarkan hasil pengujian maka dapat disimpulkan ekstrak daun kepuh memiliki aktivitas antioksidan dan hambatan lipase. Aktivitas antioksidan dan hambatan lipase yang lebih aktif pada ekstrak metanol.

## PRAKATA

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Kepuh (*Sterculia foetida*): Metode DPPH dan Hambatan Lipase *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini banyak mendapat bantuan dan fasilitas dari berbagai pihak, maka dengan terselesaikannya skripsi ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., Apt., M.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, membantu dan memberikan bimbingan, ide, masukan serta perbaikan dalam penyusunan skripsi ini;
3. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., Apt., M.Si selaku penguji I dan Ibu Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku penguji II yang telah banyak memberikan saran dan kritik membangun dalam penyusunan skripsi ini;
4. Bapak Nuri, S.Si., M.Si., Apt. yang telah meluangkan waktu untuk memberi masukan, perhatian, dan bimbingannya;
5. Ibu Evi Umayah Ulfa, S.Si., Apt., M.Si selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Seluruh Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, berbagi pengalaman dan selalu memotivasi penulis selama masa perkuliahan; staff dan karyawan atas segala bantuan yang diberikan selama penulis menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Jember;

7. Orang tua tercinta Ibu Nur Fauziyah, Bapak Mukhammad Ali dan adik Muhammad Mirza Ato'illah yang senantiasa memberi doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tidak terhingga untuk mengiringi perjalanan hidup penulis;
8. Teman-teman yang telah memberi warna hidupku selama di Jember (Putri Eka, Naning, Nikma) yang membantu, menyemangatiku, menasehati, dan mengajarkan arti persahabatan;
9. Rekan kerja selama penelitian Fitriana dan teman-teman Meru Betiri Group yang telah membantu selama penelitian dan teman-teman CDAST, terima kasih atas saran, kerjasamanya dan bantuannya;
10. Teman-teman seperjuangan Angkatan 2011 Fakultas Farmasi Universitas Jember (*ASMEF*) yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu;
11. Anak-anak kos Mastrip I No.57B (Yeni, Tiwi, Catur, Berta, Elisa, Willi, Orin, Fitria, Mbak Frinda dan Mbak Ken) yang selalu bersama selama beberapa tahun terakhir ini dalam suka maupun duka;
12. Semua pihak yang telah membantu dan tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Hanya doa yang dapat penulis panjatkan semoga segala kebaikan yang diberikan kepada penulis mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa. Penulis juga menerima kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 2015

Penulis

**DAFTAR ISI**

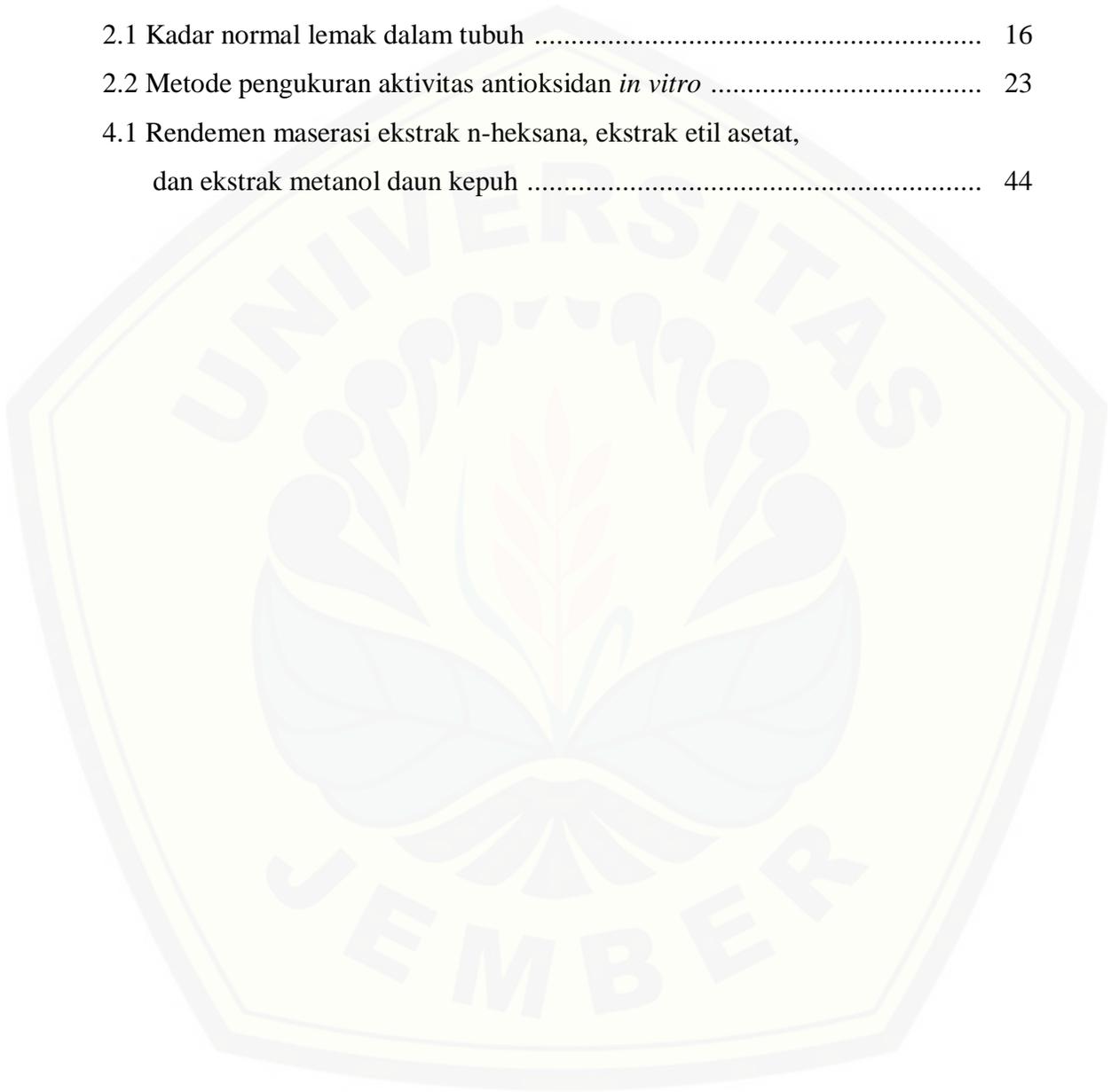
	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>ii</b>
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>HALAMAN MOTTO .....</b>	<b>iv</b>
<b>HALAMAN PERNYATAAN .....</b>	<b>v</b>
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN .....</b>	<b>vi</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN .....</b>	<b>vii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>viii</b>
<b>PRAKATA .....</b>	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>xvii</b>
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Rumusan Masalah .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Tinjauan Tanaman Kepuh .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Klasifikasi .....	6
2.1.2 Morfologi .....	6
2.1.3 Kandungan dan Manfaat .....	8
<b>2.2 Tinjauan Total Fenolik dan Flavonoid .....</b>	<b>10</b>
<b>2.3 Tinjauan Lemak .....</b>	<b>11</b>
<b>2.4 Tinjauan Antihiperlipidemia .....</b>	<b>15</b>
<b>2.5 Tinjauan Radikal Bebas dan Antioksidan .....</b>	<b>20</b>

<b>2.6</b>	<b>Tinjauan Uji Aktivitas Antioksidan .....</b>	<b>23</b>
<b>2.7</b>	<b>Tinjauan Enzim Lipase .....</b>	<b>27</b>
	2.7.1 Enzim .....	27
	2.7.2 Enzim Lipase .....	28
	2.7.4 Aktivitas Lipase .....	29
<b>2.8</b>	<b>Tinjauan Uji Aktivitas Hambatan Lipase .....</b>	<b>31</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Variabel Penelitian .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Rancangan Penelitian .....</b>	<b>35</b>
	3.4.1 Definisi operasional .....	35
	3.4.2 Rancangan percobaan .....	35
	3.4.3 Alur Penelitian .....	37
<b>3.5</b>	<b>Alat dan Bahan .....</b>	<b>38</b>
	3.5.1 Alat .....	38
	3.5.2 Bahan .....	38
<b>3.6</b>	<b>Pengambilan Sampel.....</b>	<b>38</b>
<b>3.7</b>	<b>Pembuatan Ekstrak n-Heksana, Etil asetat, dan Metanol Daun Kepuh .....</b>	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>Analisis Kandungan Total Fenolik .....</b>	<b>39</b>
<b>3.9</b>	<b>Analisis Kandungan Total Flavonoid .....</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Aktivitas Peredaman Antioksidan .....</b>	<b>40</b>
<b>3.11</b>	<b>Aktivitas Hambatan Lipase .....</b>	<b>41</b>
	3.11.1 Preparasi substrat .....	41
	3.11.2 Preparasi buffer asam asetat .....	42
	3.11.3 Prosedur uji .....	42
<b>3.12</b>	<b>Analisis Data .....</b>	<b>43</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>44</b>

4.1	Penetapan Kandungan Total Fenolik .....	45
4.2	Penetapan Kandungan Flavonoid .....	46
4.3	Aktivitas Antioksidan DPPH .....	48
4.4	Aktivitas Hambatan Lipase Pankreas .....	50
4.5	Potensi Aktivitas Antioksidan dan Hambatan Lipase .....	53
<b>BAB 5. PENUTUP .....</b>		<b>59</b>
5.1	Kesimpulan .....	59
5.2	Saran .....	59
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>		<b>61</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>		<b>70</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
2.1 Kadar normal lemak dalam tubuh .....	16
2.2 Metode pengukuran aktivitas antioksidan <i>in vitro</i> .....	23
4.1 Rendemen maserasi ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat, dan ekstrak metanol daun kepuh .....	44



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 <i>Sterculia foetida</i> Linn. ....	7
2.2 Susunan lipoprotein .....	12
2.3 Jalur metabolisme lemak dalam tubuh .....	14
2.4 Jalur penghambatan obat antihiperlipidemia dalam tubuh .....	18
2.5 Senyawa Radikal .....	20
2.6 Pembentukan radikal bebas .....	21
2.7 Reaksi dalam lipase .....	29
3.1 Rancangan Percobaan Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia <i>in vitro</i> .....	36
3.2 Alur penelitian Uji aktivitas antioksidan dan antihiperlipidemia ekstrak daun kepuh .....	37
4.1 Kandungan total fenolik ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol daun kepuh dalam mg GAE/g ekstrak .....	46
4.2 Kandungan total flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, metanol daun kepuh dalam mg QE/g ekstrak .....	47
4.3. Aktivitas peredaman DPPH (%) asam askorbat; ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh .....	49
4.4 Nilai IC <sub>50</sub> peredaman DPPH ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh .....	50
4.5 Hambatan lipase (%) ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh .....	51
4.6 Nilai IC <sub>50</sub> hambatan lipase ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh .....	52
4.7 Perbandingan antara aktivitas peredaman DPPH dengan aktivitas hambatan lipase pada konsentrasi ekstrak yang sama .....	57

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Validasi Tanaman Kepuh .....	70
B. Rendemen Ekstrak yang Diperoleh .....	71
C. Perhitungan Konsentrasi Total Fenolik .....	71
1. Standar Asam Galat .....	71
2. Kurva standar asam galat .....	72
3. Pembuatan $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 2% .....	73
4. Pembuatan <i>folin ciocalteu</i> 50% .....	73
5. Cara kerja .....	73
6. Preparasi sampel .....	73
7. Absorbansi yang diperoleh dari ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol pada panjang gelombang 750,0 nm .....	74
8. Kandungan total fenolik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	74
9. Kandungan akhir (mg GAE/g ekstrak) total fenolik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	75
10. Perhitungan simpangan deviasi (SD) dan RSD (%) .....	76
11. Analisis Data .....	77
D. Perhitungan Konsentrasi Total Flavonoid .....	78
1. Standar Quersetin .....	78
2. Kurva standar quersetin .....	79
3. Pembuatan $\text{NaNO}_2$ 5% .....	79
4. Pembuatan $\text{AlCl}_3$ 10% .....	79
5. Pembuatan $\text{NaOH}$ 1M .....	80
6. Cara kerja .....	80
7. Preparasi sampel .....	80
8. Absorbansi yang diperoleh dari ekstrak n-heksana, etil asetat,	

dan metanol pada panjang gelombang 415,0 nm .....	81
9. Kandungan total flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	81
10. Kandungan akhir (mg QE/g ekstrak) total flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	82
11. Perhitungan simpangan deviasi (SD) dan RSD (%) .....	83
12. Analisis Data .....	84
E. Perhitungan $IC_{50}$ Antioksidan DPPH .....	85
1. Standar asam askorbat .....	85
2. Pembuatan larutan DPPH 90 $\mu$ M .....	88
3. Cara kerja .....	88
4. Preparasi sampel .....	88
5. Perhitungan peredaman DPPH (%) ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	92
6. Perhitungan nilai $IC_{50}$ , SD, dan RSD (%) .....	93
7. Analisis data .....	101
F. Perhitungan $IC_{50}$ Hambatan Lipase .....	102
1. Standar orlistat .....	102
2. Pembuatan buffer asetat pH 5,61 .....	106
3. Pembuatan triton 4% .....	107
4. Melarutkan enzim lipase .....	107
5. Preparasi substrat p-NPB .....	107
6. Cara kerja .....	107
7. Preparasi sampel .....	107
8. Perhitungan hambatan lipase (%) ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol .....	110
9. Perhitungan nilai $IC_{50}$ , SD, dan RSD (%) .....	110
10. Analisis data .....	120

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Hiperlipidemia merupakan suatu keadaan tingginya konsentrasi lemak yang ditandai dengan meningkatnya konsentrasi trigliserida, *low density lipoprotein* (LDL), dan kolesterol darah melebihi batas normal. Kadar kolesterol pada seseorang dikatakan tinggi jika melebihi 200 mg/dl (Ganong, 2005). Hiperlipidemia merupakan penyebab utama dari aterosklerosis dan kondisi aterosklerosis berkaitan dengan terjadinya penyakit jantung koroner, penyakit serebrovaskular iskemik, dan penyakit pembuluh darah perifer (Jain *et al.*, 2007). Menurut *World Health Organization* (2015) kasus penyakit kardiovaskular di seluruh dunia menyebabkan kematian 31% di dunia pada tahun 2012 dan peningkatan kolesterol dapat menyebabkan hampir 2,9 juta kematian. Berdasarkan survei yang dilakukan pada tahun 2008, terdapat 35,1% penduduk Indonesia berusia 25 tahun ke atas yang memiliki nilai kolesterol total 190 mg/dl (WHO, 2011).

Hiperlipidemia adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh obesitas. Obesitas merupakan kondisi kelebihan berat tubuh akibat tertimbunnya lemak, untuk pria dan wanita masing-masing melebihi 15% dan 21% dari berat tubuh (Ganong, 2005). Menurut WHO, berdasarkan survei pada tahun 2008, terdapat 4,8% penduduk Indonesia berusia 20 tahun ke atas mengalami obesitas dan sekitar 2,8 juta orang meninggal setiap tahun akibat dari kelebihan berat badan atau obesitas (WHO, 2014).

Lemak merupakan sumber utama kalori yang tidak diinginkan, sehingga metabolisme lemak sangat penting untuk menjaga keseimbangan energi secara homeostasis. Setelah keseimbangan ini hilang, obesitas atau hiperlipidemia berkembang, diikuti oleh serangkaian penyakit berat termasuk aterosklerosis, hipertensi, diabetes, dan disfungsi organ tertentu (Zheng *et al.*, 2010). Mekanisme

obat antihiperlipidemia salah satunya adalah menghambat penyerapan lemak melalui penghambatan aktivitas lipase pankreas sebagai sumber utama kelebihan kalori (Fitriyani, 2009).

Lipase pankreas merupakan enzim utama dalam penguraian lemak untuk mengabsorpsi asam lemak. Lipase pankreas menghidrolisis trigliserida makanan dalam usus menjadi monogliserida dan asam lemak rantai panjang yang kemudian akan diangkut menuju permukaan mikrovili untuk diserap pembuluh darah (Shin *et al.*, 2003). Apabila aktivitas enzim lipase pankreas meningkat, maka penyerapan monogliserida dan asam lemak juga akan meningkat sehingga menimbulkan penimbunan lemak (Silitonga, 2008). Penghambatan lipase pankreas adalah aksi yang ditargetkan untuk pengobatan hiperlipidemia. Inhibitor lipase pankreas untuk pengobatan jangka panjang memiliki efek samping yang tidak baik bagi kesehatan (Zheng *et al.*, 2010).

Hiperlipidemia juga dapat menyebabkan terjadinya aterosklerosis. Lemak yang ada dalam makanan akan disintesis dalam sebagian besar sel tubuh. Konsentrasi lemak dalam darah yang tinggi, terutama partikel lipoprotein densitas rendah (LDL) berperan menyebabkan terbentuknya plak aterosklerosis. Plak-plak tersebut berkaitan dengan terjadinya penyakit jantung dan *stroke*. Proses aterosklerosis awalnya ditandai dengan adanya kelainan pada lapisan endotel, pembentukan sel busa (*foam cell*) dan kerak lemak (*fatty streaks*), pembentukan lesi pada jaringan ikat (*fibrous cap*) dan proses ruptur plak aterosklerosis yang tidak stabil (Marks *et al.*, 2000).

Saat ini masyarakat cenderung lebih menyukai pengobatan menggunakan bahan alam karena bahan alam memiliki efek samping yang relatif sedikit dibandingkan dengan obat modern (Sari, 2006). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa terong pipit (*Solanum stramonifolium*) mampu menghambat lipase (Chanmee *et al.*, 2013) dan campuran ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar*), jati belanda (*Guazuma ulmifolia*), dan kemuning (*Murraya paniculata*) mampu menghambat aktivitas pankreas lipase *in vitro* (Iswantini *et al.*, 2011).

Penelitian yang dilakukan yaitu uji aktivitas antioksidan dan antihiperlipidemia pada daun kepuh (*Sterculia foetida*). Kandungan kimia dari tanaman kepuh sendiri adalah saponin, flavonoid, polifenol, tanin dan triterpenoid (Asih *et al.*, 2010). Antioksidan adalah senyawa yang bertindak sebagai inhibitor dari proses oksidasi dan dapat menghambat reaksi berantai oksida pada konsentrasi kecil dan menghilangkan bahaya proses patologis. Senyawa fenolik dalam tanaman obat telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan kuat. Flavonoid adalah golongan utama dari senyawa fenolik yang ada dalam tanaman obat dan memiliki peran penting dalam pencegahan berbagai penyakit melalui aktivitas antioksidan (Rajani & Punima, 2009). Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan uji kandungan total fenolik dan flavonoid.

Dilihat dari kandungan kimia tanaman kepuh, perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan dan hambatan lipase. Penelitian dari Yoganandam *et al.* (2010) menunjukkan bahwa biji tanaman kepuh dapat mengurangi lemak perut dan masalah obesitas. Kandungan asam lemak minyak *sterculia* dapat menghambat aksi enzim yang berhubungan dengan resistensi insulin yang secara tidak langsung dapat mengurangi lemak di perut.

Dalam penelitian ini tanaman kepuh diekstraksi bertingkat sesuai perbedaan kelarutan. Pelarut yang digunakan dalam metode ekstraksi bertingkat ini, adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol. Proses ekstraksi bertingkat dilakukan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam tanaman kepuh berdasarkan sifat kepolarannya (Harborne, 1996). Adanya golongan senyawa tertentu pada ekstrak tanaman kepuh ditentukan melalui uji total fenolik, flavonoid, antioksidan, dan hambatan lipase.

## 1.2 Rumusan Masalah

Dari latar belakang yang ada, maka diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana perbandingan kandungan total fenolik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh?
2. Bagaimana perbandingan kandungan flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh?
3. Bagaimana perbandingan aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh?
4. Bagaimana perbandingan aktivitas inhibisi enzim lipase ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Untuk mengetahui kandungan total fenolik ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh
2. Untuk mengetahui kandungan flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh
3. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh
4. Untuk mengetahui aktivitas inhibisi enzim lipase ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun kepuh

## 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian yang dilakukan adalah:

1. Mengetahui potensi dari Kawasan Taman Nasional Meru Betiri dari flora yang ada di kawasan tersebut

2. Mengetahui kegunaan dari daun kepuh sebagai antioksidan dan antihiperlipidemia dilihat dari aktivitas inhibisi enzim lipase
3. Hasil dari penelitian dapat digunakan sebagai acuan untuk penelitian yang selanjutnya.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Tanaman Kepuh

#### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi ilmiah atau taksonomi dari kepuh sebagai berikut:

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Malvales
Famili	: Malvaceae
Genus	: Sterculia
Nama binomial	: <i>Sterculia foetida</i> L
Sinonim	: <i>Clompanus foetida</i> Kuntze (ITIS, 2011)

#### 2.1.2 Morfologi

Tumbuhan kepuh dapat dilihat pada gambar 2.1. Kepuh merupakan famili dari Malvaceae yang tumbuh di daerah tropis. Tumbuhan kepuh merupakan tanaman dengan ketinggian sekitar 40 m. Tumbuhan kepuh berupa pohon yang tinggi dan lurus, bercabang dengan bentuk percabangan simpodial. Percabangan tumbuh mendatar dan berkumpul pada ketinggian yang hampir sama dan bertingkat-tingkat (Orwa *et al.*, 2009).

Daun tumbuhan kepuh berbentuk majemuk menjari, dengan tangkai 12,5-23 cm yang berkumpul pada ujung ranting. Anak daun berjumlah 7-9 berbentuk jorong lonjong dengan ujung dan pangkal yang meruncing panjangnya sekitar 10-17 cm,

bertangkai pendek dan tidak berbulu. Bunga berkelamin satu, berumah satu kadang pada ketiak daun yang masih muda dan mengeluarkan bau busuk (Orwa *et al.*, 2009).



Gambar 2.1. *Sterculia foetida* Linn. (Yoganandam *et al.*, 2012)

Bunga berbentuk majemuk yang tersusun dalam malai dekat ujung ranting dengan panjang 10-15 cm berwarna hijau atau ungu pudar. Kelopak bunga berbagi lima laksana mahkota. Tajuk hingga 1,3 cm berwarna jingga (Orwa *et al.*, 2009).

Buah kepuh berukuran besar, buah muda berwarna hijau dan setelah matang berwarna merah dan kadang-kadang menjadi hitam dan membuka, ukuran buahnya dapat mencapai 7 mm atau lebih, mempunyai pericarp yang tebal (7-8 mm), berkayu dan folikelnya berbentuk orbicular. Pengumpulan buah kepuh dilakukan dengan pengunduhan terhadap buah yang sudah masak fisiologis yang ditandai dengan warna buah coklat tua dan belum merekah. Tingkat kematangan buah tergantung spesiesnya, tetapi biasanya memerlukan waktu 4-6 bulan. Bijinya berbentuk elipsoid atau elipsoid-oblong, dengan ukuran panjang  $\pm 2$  cm, berwarna hitam, licin dan mengkilat dengan hilum yang berwarna putih serta karpelnya berwarna merah atau merah tua

Kepuh disebut juga sebagai "Java zaitun" dalam bahasa Inggris dan "Jangli badam atau Pinari" dalam bahasa Hindi (Shamsundar & Paramjyothi, 2010). Kepuh lebih banyak tumbuh di Wilayah Asia Tenggara. Kepuh terdapat di beberapa Negara diantaranya Australia, India, Bangladesh, Pakistan, Sri Lanka, Myanmar, Indonesia,

Kenya, Malaysia, Thailand, Filipina, Somalia, Tanzania, Zanzibar, Uganda, Yaman, Republik Djibouti, Eritrea, Ethiopia di benua Afrika dan Ghana, Puerto Rico (Raja *et al.*, 2014).

### 2.1.3 Kandungan dan Manfaat

Tumbuhan kepuh memiliki beberapa kandungan kimia. Tumbuhan kepuh mempunyai beberapa kandungan kimia diantaranya saponin, flavonoid, polifenol, tannin, triterpenoid, alkaloid, kalsium (BPOM dalam Asih *et al.*, 2010), Protein, glikosida, dan fitosterol (Hussain *et al.*, 2014). Menurut Asih *et al.* (2010) ekstrak n-heksana daun kepuh telah diketahui mengandung triterpenoid, sedangkan pada bijinya mengandung 34% asam lemak (olein dan laurin). Di dalam biji kepuh diketahui mengandung banyak senyawa polar. Berdasarkan hasil skrining fitokimia pada bagian biji mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan konstituen lainnya seperti glikosida, saponin, dan steroid (Shamsundar & Paramjyothi, 2010).

Kegunaan dari tanaman kepuh sendiri sangat banyak sekali mulai dari daun, biji sampai kayunya. Ekstrak daun kepuh dapat digunakan sebagai antiinflamasi atau *CNS depressant* dilihat dari penurunan aktivitas pada tikus dan potensi dari pentobarbiton menunjukkan waktu tidur pada keadaan tikus normal dan kronis serta menunjukkan aktivitas anti inflamasi yang signifikan saat diinduksi dengan karagenan pada kaki tikus edema akut (Mujumdar *et al.*, 2011). Kandungan asam sterkulari yang diisolasi dari minyak kepuh menunjukkan aktivitas mitogenik (Scarpelli, 1974). Kandungan tanin dalam tumbuhan kepuh memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat *S. aureus* dan *E. coli* serta antiprotozoa dengan menghambat pertumbuhan *E. histolytica* (Vital *et al.* 2011). Selain itu tumbuhan kepuh juga memiliki aktivitas *antifeedant* dan insektisida (Usharani & Rajasekharreddy, 2009). Minyak dari ekstrak biji kepuh dapat digunakan sebagai antiobesitas dengan mengurangi lemak pada perut. Kandungan asam lemak dari minyak Sterkulari dapat menghambat enzim yang berhubungan dengan resistensi

insulin secara tidak langsung dapat mengurangi lemak perut (Sheehan & Vavich, 1965), selain itu kandungan minyak dalam tumbuhan kepuh juga memiliki aktivitas antifertilitas (Maurya & Dongarwar, 2012). Aktivitas antioksidan ditunjukkan pada ekstrak metanol kepuh dengan metode analisis penghambatan radikal oksida nitrat, penghambatan radikal anion superoksida, penghambatan aktivitas oksidase *xanthine* dan penghambatan oksidasi beta-karoten. Kandungan flavonoid dalam tumbuhan kepuh kemungkinan memiliki aktivitas antioksidan (Manivannan, *et al.* 2011).

Kandungan lain dari daun kepuh yaitu saponin. Saponin adalah glikosida yang setelah dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan sapogenin (aglikon). Sebagian besar saponin mudah bergabung dengan kolesterol yang menyebabkan rendahnya aktifitas saponin, rasa pahit dan memiliki sifat yang berbusa. Saponin dapat terikat dengan garam-garam empedu yang diperlukan untuk proses absorpsi kolesterol atau karena permukaan golongannya menjadi aktif, dapat juga menyebabkan garam-garam empedu menjadi terhimpit yang akhirnya menjadi polisakarida dalam otot. Pengaruh saponin terhadap rendahnya kolesterol darah akan menghalangi penyerapan kolesterol kembali setelah dikeluarkan dari empedu sehingga meningkatkan asam empedu dan sterol netral pada feses (Widodo & Rahayu, 2010). Hasil penelitian Ruiz *et al.* (2006), alkaloid mampu menginhibisi atau menghambat aktivitas enzim lipase pada konsentrasi rendah. Alkaloid yang mengandung unsur nitrogen mempunyai struktur kimia yang mirip dengan orlistat, (obat antiobesitas sintesis yang bekerja menghambat aktivitas enzim lipase) sehingga dimungkinkan memiliki efek menghambat aktivitas enzim lipase (Rahardjo *et al.*, 2005). Daun kepuh juga memiliki kandungan alkaloid sehingga diduga alkaloid dalam daun kepuh juga memiliki efek menghambat aktivitas enzim lipase, sehingga dapat menghambat pemecahan lemak menjadi molekul-molekul lemak yang lebih kecil. Hal ini mengakibatkan terjadinya pengurangan jumlah lemak yang dapat diabsorpsi.

Pada buah daun kepuh mengandung minyak kernel yang bisa dimakan dan dapat digunakan sebagai pencahar. Kernel juga digunakan untuk memalsukan kakao.

Minyaknya dapat digunakan untuk kuliner seperti minyak zaitun. Selain itu tumbuhan kepuh dapat digunakan sebagai pengendali erosi, penghijauan daerah perkotaan dan lain sebagainya (Orwa *et al.*, 2011).

## 2.2 Tinjauan Total Fenolik dan Flavonoid

Fenolik termasuk dalam golongan utama dari antioksidan yang berada didalam tumbuh-tumbuhan. Senyawa ini diklasifikasikan dalam dua bagian yaitu fenol sederhana dan polifenol (Marinova *et al.*, 2005). Senyawa fenol sendiri terdiri dari aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenol yang ada umumnya mudah larut dalam air karena dapat berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Contohnya katekol dengan 2 gugus OH, pirogallol dengan 3 gugus OH, dan asam galat, sedangkan senyawa polifenol contohnya fenil propanoid, tanin, flavonoid, dan beberapa terpenoid (Harborne, 1996). Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi ortho dan para terhadap gugus -OH dan -OR (Okawa *et al.*, 2001).

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Golongan flavonoid dapat digambarkan sebagai deretan senyawa  $C_6-C_3-C_6$ , artinya kerangka dari cincin benzena yang disambungkan oleh rantai alifatik 3 karbon (Harborne, 1996). Flavonoid adalah senyawa polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar (Markham, 1988).

Penyebaran flavonoid dalam tumbuhan dengan taksonomi yang berkaitan akan menghasilkan flavonoid yang serupa. Penyebaran flavonoid pada tumbuhan terbesar yaitu angiospermae. Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan yaitu daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, buah dan biji (Markham, 1988). Dalam tumbuhan, flavonoid terikat gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mungkin terdapat dalam satu tumbuhan dalam bentuk kombinasi glikosida (Harborne,

1996). Aglikon flavonoid adalah polifenol sehingga mempunyai sifat seperti fenol yaitu agak asam sehingga dapat larut dalam basa (Markham, 1988).

Aktivitas dari flavonoid bermacam-macam terhadap organisme, flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik bagi radikal hidroksil dan superoksida dengan demikian melindungi lemak membran terhadap reaksi yang merusak (Robinson, 1991). Flavonoid mengandung sistem aromatis yang terkonjugasi dan karena itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum UV sinar tampak (Harborne, 1996).

Daun kepuh dalam penelitian ini digunakan sebagai antihiperlipidemia yang menghambat enzim pankreas lipase. Kandungan dari daun kepuh sendiri salah satunya yaitu flavonoid dimana flavonoid sendiri termasuk dalam golongan fenolik. Pada kondisi tertentu tubuh mengalami stres oksidatif, dimana radikal bebas di dalam tubuh dalam jumlah yang berlebihan, sehingga pada kondisi tersebut diperlukan antioksidan untuk meredam radikal bebas. Kemampuan flavonoid sebagai antioksidan tergantung pada struktur molekulnya. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Cuppett *et al.*, 1954). Flavonoid dapat menangkap radikal bebas dan dapat mencegah proses peroksidasi lemak di mikrosom dan liposom (Peng & Kuo, 2003). Polifenol juga memiliki fungsi sebagai inhibitor lipase pankreas dengan mengikat enzim pada ikatan polivalen (Lunagariya *et al.*, 2014).

### 2.3 Tinjauan Lemak

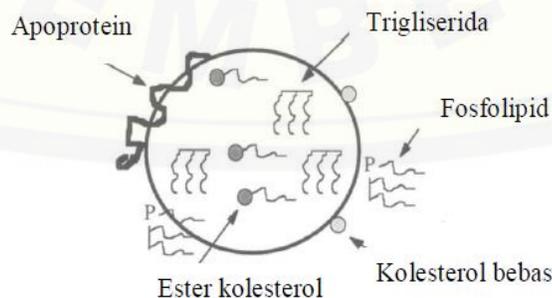
Lemak merupakan senyawa berisi karbon dan hidrogen yang susah larut air tetapi larut dalam pelarut organik. Lemak juga sebagai zat yang kaya akan energi, sehingga berfungsi sebagai sumber energi utama untuk metabolisme tubuh. Lemak

diklasifikasikan menjadi lemak netral (trigliserida), fosfolipid, kolesterol, dan lainnya. Secara kimia, lemak dasar dari trigliserida dan fosfolemak adalah asam lemak yang merupakan asam organik hidrokarbon sederhana berantai panjang (Guyton & Hall, 2007).

Lemak diklasifikasikan menjadi lemak sederhana atau kompleks:

- Lemak sederhana yaitu ester asam lemak dengan berbagai alkohol. Seperti lemak (fat), minyak (oil), wax (malam);
- Lemak kompleks yaitu ester asam lemak yang mengandung gugus-gugus selain alkohol dan asam lemak. Seperti fosfolipid, glikolipid, dan lemak kompleks lainnya;
- Prekursor dan lemak turunan yang mencakup asam lemak, gliserol, steroid, alkohol lain, aldehida lemak, badan keton, hidrokarbon, vitamin larut lemak, dan hormon (Murray *et al.*, 2009).

Lemak adalah zat yang kaya energi, yang berfungsi sebagai sumber energi utama untuk proses metabolisme tubuh. Lemak yang beredar di dalam tubuh diperoleh dari dua sumber yaitu dari makanan (eksogen) dan hasil produksi organ hati (endogen). Agar lemak plasma dapat diangkut dalam sirkulasi, maka susunan molekul lemak tersebut perlu dimodifikasi dalam bentuk lipoprotein yang bersifat larut dalam air. Berikut skema dari lipoprotein (Gambar 2.2) yang menunjukkan bahwa pada inti terdapat ester kolesterol dan trigliserida yang dikelilingi oleh fosfolemak, kolesterol non ester, dan apoprotein (Superko, 2000).

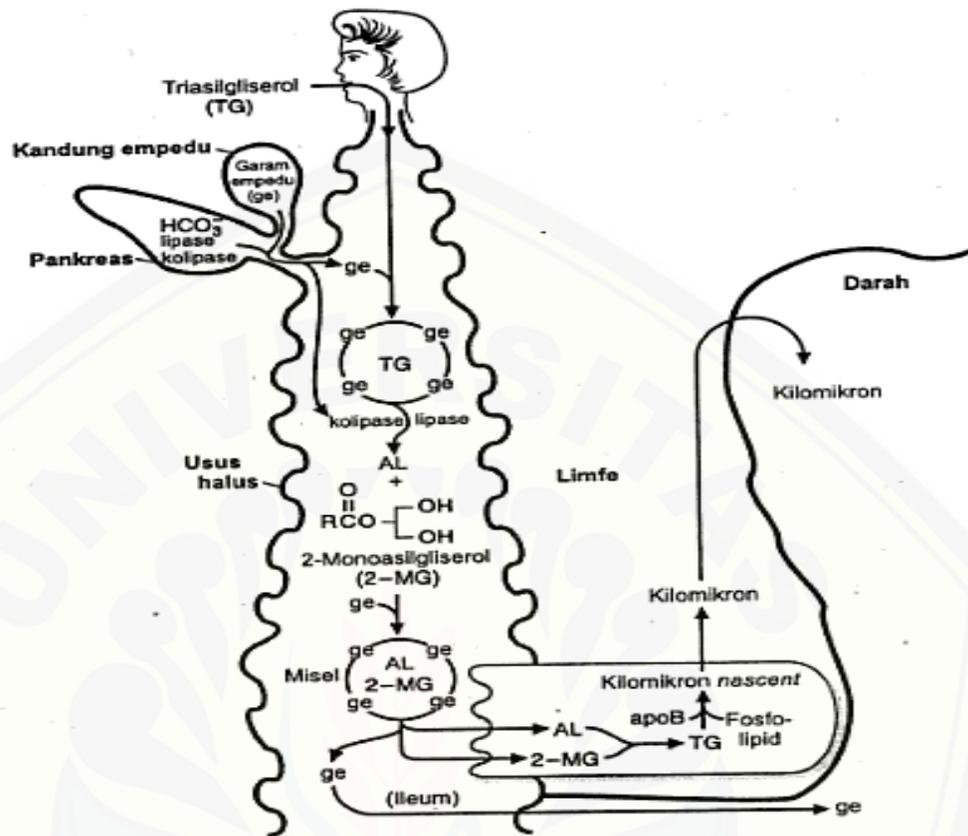


Gambar 2.2 Susunan lipoprotein (Superko, 2000)

Lemak plasma yang utama yaitu kolesterol, trigliserida, fosfolemak, dan asam lemak bebas tidak larut dalam cairan plasma (Suyatna, 2007):

- a. Trigliserida merupakan tempat penyimpanan dan transportasi yang penting untuk asam lemak (*fatty acid*) (Superko, 2000). Trigliserida dapat disintesis dari karbohidrat maupun protein. Trigliserida adalah ester trihidrat alkohol gliserol dan asam lemak (Guyton & Hall, 2007).
- b. Asam lemak adalah asam organik rantai karbon terbuka dengan radikal alkil yang terikat pada gugus karboksil. Kerentanan oksidatif lipoprotein sebagian ditentukan oleh jenis asam lemak berada pada lipoprotein. Beberapa penyebab kerusakan oksidatif mungkin karena masalah lingkungan dan gaya hidup, terutama pola makan (Superko, 2000).
- c. Fosfolipid atau fosfolgliserida memiliki struktur terdiri dari ikatan karbon dengan satu asam fosfat dan dua asam lemak yang berikatan. Fosfolipid merupakan komponen penting dari membran sel dan merupakan golongan lemak yang bersifat polar (Superko, 2000).
- d. Kolesterol adalah salah satu lemak tubuh yang berada dalam bentuk bebas dan ester dengan asam lemak, merupakan komponen utama selaput sel otak dan saraf (Murray *et al.*, 2009). Kolesterol adalah suatu substansi yang berasal dari lemak, ditemukan pada otak, hati, darah dan empedu. Kolesterol diproduksi terutama di hati (Goldman & Klatz, 2007). Lebih dari separuh jumlah kolesterol tubuh berasal dari sintesis dan sisanya berasal dari makanan sehari-hari.

Metabolisme lemak dalam tubuh lebih rumit. Metabolisme lemak dapat dilihat pada gambar 2.3. Lemak utama dalam makanan yaitu trigliserida yang tersusun dari sebuah inti gliserol dan tiga rantai panjang asam lemak (Guyton & Hall, 2007). Lemak akan dimetabolisme menjadi asam lemak dan 2-monogliserida, yang akan disintesis ulang menjadi trigliserida di dalam sel epitel usus, kemudian akan diubah menjadi kilomikron dan disekresi melalui limfe ke dalam darah. Kilomikron dapat mengalami oksidasi untuk membentuk energi pada jaringan, namun sebagian besar akan disimpan sebagai trigliserida dalam sel adipose (Marks *et al.*, 2000).



Gambar 2.3 Jalur metabolisme lemak dalam tubuh (Marks *et al.*, 2000)

Sejumlah kecil trigliserida dicerna dalam lambung oleh lipase lingual yang disekresi oleh kelenjar lingual dan ditelan bersama dengan saliva. Jumlah pencernaan ini kurang dari 10%. Sedangkan sejumlah besar lemak akan dicerna di dalam usus halus. Tahap awal metabolisme lemak adalah emulsifikasi lemak, yaitu memecah gumpalan lemak menjadi ukuran yang sangat kecil sehingga enzim pencernaan yang larut air dapat bekerja pada permukaan gumpalan lemak. Emulsifikasi tersebut terjadi dalam duodenum dengan pengaruh empedu yang mengandung garam empedu dan lesitin (Guyton & Hall, 2007).

Enzim yang paling penting untuk pencernaan trigliserida adalah lipase pankreas. Enzim ini merupakan senyawa yang larut air dan memecah gumpalan lemak hanya pada permukaannya, sehingga emulsifikasi lemak sangat penting. Lipase

pankreas mengkatalis hidrolisis ikatan ester (pada C-1 dan C-3) trigliserida sehingga terbentuk asam lemak dan 2-monogliserol (Horton *et al.*, 2002).

Hasil pencernaan trigliserida yang berupa asam lemak dan monogliserida akan diserap sel mukosa intestinal dengan cara difusi pasif masuk ke bagian dalam sel epitel (Linder, 1992). Setelah memasuki sel epitel, asam lemak dan monogliserida diambil oleh retikulum endoplasma halus, yang selanjutnya digunakan untuk membentuk trigliserida baru kemudian dilepaskan dalam bentuk kilomikron melalui bagian basal sel epitel mengalir ke atas melalui duktus limfe torasikus dan menuju aliran darah (Guyton & Hall, 2007).

#### **2.4 Tinjauan Antihiperlipidemia**

Hiperlipidemia merupakan keadaan patologis yang diakibatkan oleh adanya kelainan metabolisme lemak dalam darah ditandai dengan meningkatnya konsentrasi kolesterol darah (hiperkolesterolemia), triasilgliserida (hipertrigliseridemia) atau kombinasi keduanya (Kamaluddin, 1993). Peningkatan kadar kolesterol total dan LDL darah dapat disebabkan oleh peningkatan konsumsi lemak jenuh dan kolesterol yang tinggi dalam makanan, sedangkan peningkatan trigliserida darah atau hipertrigliserida dapat dipengaruhi oleh konsumsi makanan seperti karbohidrat, lemak, dan alkohol. Oleh karena itu untuk menurunkan kadar trigliserida darah maka lemak makanan harus dikurangi, karbohidrat juga perlu diperhitungkan. Selain itu, kadar trigliserida darah juga dipengaruhi oleh aktifitas enzim lipoprotein lipase (LPL) yang berfungsi untuk menghidrolisis trigliserida menjadi asam lemak dan gliserol. Rendahnya aktifitas LPL dapat meningkatkan kadar trigliserida darah (Murray *et al.*, 2009).

Hiperlipidemia bisa ditemukan dengan adanya kenaikan kolesterol total atau trigliserida atau rendahnya kadar kolesterol HDL, kadar normal lemak dalam tubuh dapat dilihat pada Tabel 2.1. Mekanisme dari lipoprotein dapat mempengaruhi aterosklerosis. Pada orang dewasa, LDL sangat erat kaitannya dengan risiko yang

lebih tinggi sementara HDL dengan resiko lebih rendah seseorang untuk mengalami penyakit jantung koroner (PJK) (Syamsudin, 2011).

Tabel 2.1 Kadar normal lemak dalam tubuh (Suyatna, 2007)

	Kadar normal	Kadar dapat diterima	Kadar tinggi
Kolesterol total	<200	200-239	>240
LDL	<130	130-159	>160
HDL			
Pria	<40	>60	
Wanita	<50		
Trigliserida	<150	150-199	>200

Hiperlipidemia merupakan penyakit yang dapat bersifat primer atau sekunder. Hiperlipidemia primer berasal dari kelainan gen tunggal yang diwarisi atau lebih sering disebabkan kombinasi faktor genetik dan lingkungan (Mycek *et al.*, 2001). Sedangkan hiperlipidemia sekunder merupakan penyakit metabolik yang lebih umum seperti diabetes mellitus, asupan alkohol yang berlebih, hipotiroidisme, atau sirosis biliar primer (Mycek *et al.*, 2001) atau dapat disebabkan oleh pemberian kortikosteroid, estrogen, androgen, diuretic atau penghambatan adrenoseptor beta (Suyatna, 2007).

Manifestasi dari hiperlipidemia yaitu aterosklerosis. Aterosklerosis adalah lemak yang masuk dalam tubuh dapat menyebabkan penebalan dinding arteri, sehingga lumen dari daerah tersebut menyempit. Bila sel-sel otot arteri tertimbun lemak maka elastisitasnya akan menghilang dan kurang dapat mengatur tekanan darah. Proses aterosklerosis awalnya ditandai dengan adanya kelainan dini pada lapisan endotel, pembentukan *foam cell* (sel busa) dan *fatty streaks* (kerak lemak), pembentukan *fibrous cap* (lesi jaringan ikat) dan proses ruptur plak aterosklerotik yang tidak stabil (Marks *et al.*, 2000).

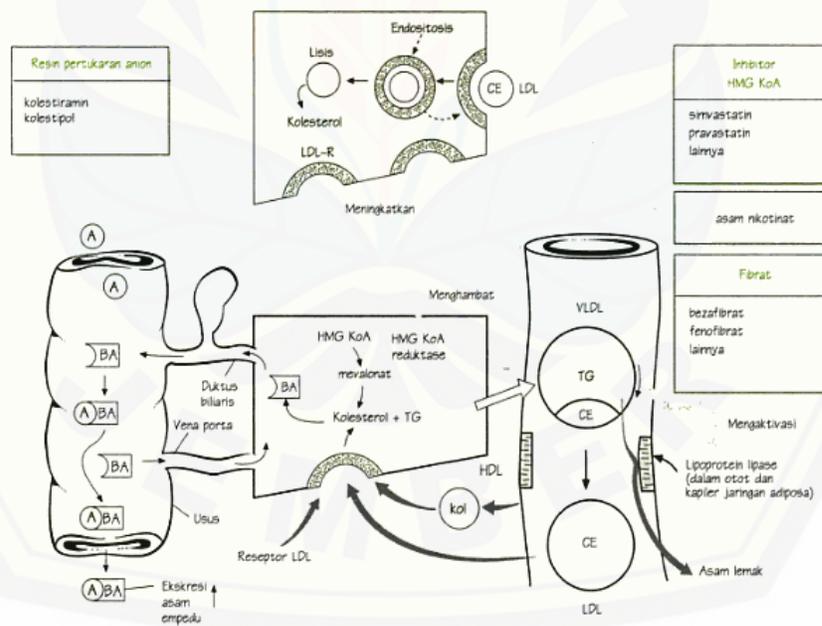
Pembentukan aterosklerosis terdiri dari beberapa fase yang saling berhubungan. Fase awal terjadi akumulasi dan modifikasi lipid (oksidasi, agregasi

dan proteolisis) dalam dinding arteri yang selanjutnya mengakibatkan aktivasi inflamasi endotel (Packard & Libby, 2008).

Pada fase selanjutnya terjadi rekrutmen elemen-elemen inflamasi seperti monosit ke dalam tunika intima. Awalnya monosit menempel pada endotel, penempelan endotel ini diperantarai oleh beberapa molekul adhesi pada permukaan sel endotel. Molekul adhesi ini diatur oleh sejumlah faktor yaitu produk bakteri lipopolisakarida, prostaglandin dan sitokin. Setelah berikatan dengan endotel kemudian monosit berpenetrasi ke lapisan lebih dalam dibawah lapisan intima. Monosit-monosit yang telah memasuki dinding arteri ini akan berubah menjadi makrofag dan "memakan" LDL yang telah dioksidasi melalui reseptor scavenger. Hasil fagositosis ini akan membentuk sel busa atau "*foam cell*" dan selanjutnya akan menjadi "*fatty streaks*". Aktivasi ini menghasilkan sitokin dan faktor-faktor pertumbuhan yang akan merangsang proliferasi dan migrasi sel-sel otot polos dari tunika media ke tunika intima dan penumpukan molekul *matriks ekstraselular* seperti *elastin* dan *kolagen*, yang mengakibatkan pembesaran plak dan terbentuk *fibrous cap*. Pada tahap ini proses aterosklerosis sudah sampai pada tahap lanjut dan disebut sebagai plak aterosklerotik. Pembentukan plak aterosklerotik akan menyebabkan penyempitan lumen arteri, akibatnya terjadi berkurangnya aliran darah. Trombosis sering terjadi setelah rupturnya plak aterosklerosis, terjadi pengaktifan platelet dan jalur koagulasi. Apabila plak pecah, robek atau terjadi perdarahan subendotel, mulailah proses trombogenik, yang menyumbat sebagian atau keseluruhan suatu arteri koroner. Pada saat inilah muncul berbagai presentasi klinik seperti angina atau infark miokard. Proses aterosklerosis ini dapat stabil, tetapi dapat juga tidak stabil atau progresif. Konsekuensi yang dapat menyebabkan kematian adalah proses aterosklerosis yang bersifat tidak stabil/progresif yang dikenal juga dengan sindroma koroner akut (Hansson, 2005).

Prinsip utama dari pengobatan antihiperlipidemia yaitu dengan mengatur diet yang mempertahankan berat badan normal dan mengurangi kadar lemak plasma. Seseorang dengan berat badan yang berlebih sebaiknya melakukan diet penurunan berat badan dengan makan makanan rendah kolesterol. Pasien dengan kekurangan lipoprotein lipase jarang memerlukan diet dengan total lemak yang rendah. Pasien dianjurkan untuk mengubah gaya hidup seperti diet, latihan fisik dan penurunan berat badan. Pengobatan pasien hiperlipidemia sekunder dengan menghilangkan penyakit pengikutnya terlebih dahulu (Suyatna, 2007).

Obat-obat antihiperlipidemia ditujukan untuk masalah kenaikan lemak serum. Beberapa obat dapat menurunkan produksi lipoprotein karier kolesterol dan triasilgliserol, sedangkan lainnya meningkatkan pemecahan lipoprotein, meningkatkan bersihan kolesterol dalam tubuh, inhibisi lipase pankreas, dan lain sebagainya (Suyatna, 2007)



Gambar 2.4 Jalur penghambatan obat antihiperlipidemia dalam tubuh (Aaronson *et al.*, 2007)

Jalur penghambatan hyperlipidemia dalam tubuh dapat dilihat pada Gambar 2.4. Berikut adalah obat-obat yang digunakan sebagai antihyperlipidemia dan inhibitor lipase di antaranya:

a. Niasin

Dengan menghambat lipolisis secara kuat dalam jaringan lemak penghasil utama asam lemak bebas yang beredar. Niasin menyebabkan penurunan sintesis trigliserida yang diperlukan untuk penurunan VLDL. LDL berasal dari VLDL dalam plasma sehingga reduksi VLDL mengakibatkan penurunan LDL dalam plasma dan meningkatkan kadar HDL. Niasin juga mengubah disfungsi sel endotel penyebab thrombosis (Mycek *et al.*, 2001).

b. Fibrat

Fibrat menyebabkan penurunan trigliserida plasma dengan memacu aktivitas dari lipase lipoproteinsehingga menghidrolisis trigliserida pada kilomikron dan VLDL dan kadar HDL meningkat (Mycek *et al.*, 2001).

c. Resin

Berkurangnya konsentrasi asam empedu menyebabkan hepatosit meningkatkan konversi kolesterol kedalam asam empedu, menyebabkan suplai senyawa kembali sebagai komponen empedu mengakibatkan konsentrasi kolesterol intraseluler menurun dan meningkatkan ambilan kembali LDL sehingga LDL dalam plasma turun (Mycek *et al.*, 2001).

d. Probukol

Menghambat oksidasi kolesterol sehingga terjadi peruraian LDL yang teroksidasi oleh makrofag. Makrofag menjadi sel busa yang menempel pada endotel vaskuler dan membentuk plak (Mycek *et al.*, 2001).

e. Inhibitor HMG CoA

Menghambat HMG-CoA reduktase dengan menghambat sintesis kolesterol de-novo sehingga akan menghabiskan simpanan kolesterol intraselular (Mycek *et al.*, 2001).

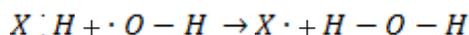
## f. Orlistat

Orlistat disebut juga hidroplastin merupakan inhibitor pankreas lipase yang poten, spesifik, dan ireversibel. Orlistat mampu mengurangi jumlah lemak ~30% dan hampir seluruhnya di ekskresikan dalam feses. Orlistat membentuk ikatan kovalen dengan serin aktif lipase lambung dan pankreas dalam lumen saluran pencernaan untuk mencegah hidrolisis lemak makanan menjadi asam lemak bebas dan monoasilgliserida. Inaktivasi lipase terjadi pada permukaan minyak dalam air dan dipercepat oleh garam empedu. Pada pasien orlistat diobati, tingkat kolesterol dan LDL berkurang. Selain orlistat, obat yang dapat digunakan sebagai inhibitor lipase yaitu *ebelacton A* yang dihasilkan dari *Streptomyces aburaviensis* (Shi & Burn, 2004).

## 2.5 Tinjauan Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas adalah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di kulit atom atau orbital molekul terluarnya (Sen *et al.* 2010). Radikal bebas dapat menginduksi penyakit kanker, arteriosklerosis dan penuaan dini yang disebabkan kerusakan jaringan karena oksidasi sehingga diperlukan antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas (Kikuzaki & Nakatani, 1993).

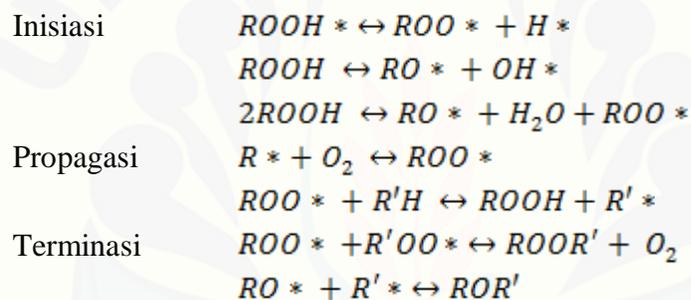
Dalam proses metabolisme dalam tubuh seringkali terbentuk radikal bebas seperti anion superoksida, hidroksil, peroksida, dan lain-lain disebut dengan Senyawa Oksigen Reaktif (SOR) atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Winarsi, 2007). Elektron yang tidak berpasangan dalam senyawa radikal cenderung untuk mencari pasangan dengan menarik atau menyerang elektron senyawa lain sehingga terbentuk senyawa radikal baru (Gambar 2. 5)



Gambar 2.5 Senyawa Radikal (Winarsi, 2007)

Target utama dari radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, DNA, dan karbohidrat. Jaringan lemak dapat dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida yang menyebabkan penyakit degeneratif salah satunya aterosklerosis (Winarsi, 2007).

Menurut Gordon (1990) tahap dari pembentukan radikal bebas terdapat 3 tahap (Gambar 2. 6) yaitu reaksi inisiasi dimulai dengan pembentukan radikal bebas oleh suatu energi kuantum akibat terlepasnya hidrogen dari karbon alfa metilen dekat ikatan rangkap gugus asam lemak tidak jenuh dari molekul lemak. Inisiasi rantai dapat terjadi dengan reaksi langsung antara katalis logam dan molekul lemak.



Gambar 2.6 Pembentukan radikal bebas (Gordon, 1990)

Tahap propagasi radikal lemak ( $R^*$ ) yang dihasilkan dari tahap inisiasi akan bereaksi dengan oksigen menghasilkan hidroperoksida ( $ROO^*$ ) yang bersifat tidak stabil. hidroperoksida selain terbentuk dari tahap propagasi juga dapat terbentuk dari reaksi molekul lemak dengan molekul oksigen singlet atau reaksi yang dikatalis dengan enzim. Ikatan O-O yang ada pada hidroperoksida bersifat relatif lemah, sehingga hidroperoksida mudah terurai kembali. Dekomposisi hidroperoksida terutama terjadi dengan katalis logam seperti besi dan tembaga baik pada tingkat oksidasi tinggi maupun rendah. Tahap propagasi berlangsung sangat cepat, dimana reaksi oksigenisasi memiliki energi aktivisasi hampir sama dengan nol (Gordon, 1990).

Tahap terminasi meliputi pembentukan produk non radikal yang stabil, hasil interaksi antara radikal  $R^*$  dan radikal  $ROO^*$ . Reaksi radikal akan berlanjut terus dan akan berhenti saat diredam dengan senyawa yang bersifat antioksidan (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam. Antioksidan dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas atau *reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk sebagai hasil dari metabolisme oksidatif yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi dalam tubuh (Goldberg, 2003).

Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya dibagi menjadi dua jenis yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer atau antioksidan pemutus rantai merupakan antioksidan yang dapat bereaksi dengan radikal lemak dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan primer yang biasa digunakan pada industri pangan adalah senyawa fenol seperti BHA, BHT, propil galat, dan TBHQ. BHA, BHT, PG, dan TBHQ adalah senyawa antioksidan sintetis yang sudah dipergunakan secara luas oleh masyarakat dunia, tetapi hasil penelitian Amarowicz *et al.* (2000) menyatakan bahwa penggunaan bahan sintetis ini dapat meningkatkan resiko penyakit karsinogenesis. Komponen-komponen tersebut merupakan antioksidan yang dapat kehilangan kemampuannya pada temperatur tinggi. Salah satu senyawa antioksidan primer yang terbaik adalah senyawa fenolik. Fenol sendiri tidak aktif sebagai antioksidan, tetapi jika disubsitusi dengan gugus alkil pada posisi orto atau para akan meningkatkan kerapatan elektron pada gugus hidroksilnya sehingga reaktivitasnya terhadap radikal lemak meningkat. Radikal yang dibentuk antioksidan fenol relatif stabil untuk delokalisasi resonansi dan tidak ada posisi yang cocok untuk serangan oksigen molekular. Antioksidan sekunder atau antioksidan pencegah merupakan antioksidan yang dapat mengurangi kecepatan rangkaian reaksi pada tahap inisiasi dari reaksi oksidasi (Gordon, 1990).

## 2.6 Tinjauan Uji Aktivitas Antioksidan

Metode analisis untuk mengukur aktivitas radikal antioksidan terhadap radikal bebas seperti radikal *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), anion superoksida radikal ( $O_2^-$ ), radikal hidroksil ( $OH^\cdot$ ), atau radikal peroksil ( $ROO^\cdot$ ). Berbagai metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan dari produk makanan dapat memberikan hasil yang berbeda-beda tergantung pada keberadaan radikal bebas yang spesifik digunakan sebagai reaktan (Prakash, 2001). Metode pengukuran aktivitas antioksidan *in vitro* dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Metode pengukuran aktivitas antioksidan *in vitro*

Metode atom hidrogen transferase (HAT) $ROO^* + LH \rightarrow ROOH + L^*$ $ROO^* + AH \rightarrow ROOH + A^*$	Kapasitas radikal oksigen absorban (ORAC) Total parameter antioksidan menjebak radikal (TRAP) Menghambat aktivitas radikal nitrit oksida Peredaman radikal hidroksil Peredaman radikal $H_2O_2$ Peredaman radikal ABTS
Metode transfer electron $M(n) + e (AH) \rightarrow AH^{*+} + M(n-1)$	Dekolorisasi <i>trolox equivalent antioxidant capacity</i> (TEAC) <i>Ferric reducing antioxidant power</i> (FRAP) Peredaman radikal bebas DPPH Pengurangan jumlah ion <i>Cupri</i> (II) (OPRAC)
Metode lain	Peredaman jumlah ion oksida (TOSC) <i>Enhanced chemiluminescence</i> (ECL) Aktivitas antioksidan seluler (CAA) <i>Dye-substrate oxidation</i>

Uji aktivitas antioksidan yang dapat menggunakan beberapa metode diantaranya :

### 1. Kapasitas radikal oksigen absorban (ORAC)

Uji ORAC adalah satu lagi uji antioksidan diterapkan berdasarkan kemampuan untuk menghambat oksidasi *B-phycoerythrin* oleh spesies oksigen reaktif, relatif terhadap Trolox. Protein mengganggu analisis, sebagian melindungi R-PE ketika semua antioksidan plasma berkurang. Keuntungan metode ini yaitu dapat

digunakan dalam industri dengan mengukur nilai AUC, namun metode ini perlu pengontrol suhu dan membutuhkan fluorometer (Badarinath *et al.*, 2010).

2. Total parameter antioksidan menjebak radikal (TRAP)

Tingkat peroksidasi disebabkan oleh *AAPH* (*2'-azobis (2-amidinopropane) hidroklorida*) yang dapat dilihat melalui hilangnya *fluoresensi protein R-phycoerythrin* (R-PE). Keuntungan metode ini yaitu dapat digunakan untuk uji secara *in vivo*, namun kekurangannya yaitu relatif sulit, waktu lama, dan butuh keahlian (Badarinath *et al.*, 2010).

3. Menghambat aktivitas radikal nitrit oksida

oksida nitrat dan peroksida bereaksi dibawah tingkat kontrol difusi untuk membentuk peroksi nitrit. Radikal oksida dan nitrit oksida merupakan antioksidan yang ampuh. Dalam kondisi fisiologis, peroksi nitrit juga membentuk campuran dengan karbon dioksida terlarut dalam cairan tubuh. Campuran tersebut bertanggung jawab atas kerusakan oksidatif protein atik (Huang *et al.*, 2005).

4. Peredaman radikal hidroksil

Radikal hidroksil dihasilkan oleh hidrogen peroksida yang bereaksi dengan Fe (II). Namun Fe(II) atau campuran  $H_2O_2$  memiliki kelemahan dalam uji peredaman karena banyak antioksidan sebagai pengkelat logam. Metode ini dapat mengukur kapasitas fitokimia dalam mencegah pembentukan radikal hidroksil *in vitro* akan lebih relevan dan panduan berharga untuk antioksidan (Huang *et al.*, 2005).

5. Peredaman radikal  $H_2O_2$

$H_2O_2$  agak inert pada konsentrasi rendah. Antioksidan dapat menghambat reaksi dengan bereaksi langsung dengan  $H_2O_2$  kemudian akan bereaksi dengan zat antara yang terbentuk dari enzim dan  $H_2O_2$  atau menghambat peroksidase (Huang *et al.*, 2005).

6. Peredaman radikal ABTS

2,2'-azinobis-(asam 3-etil-benzotiazolin-6-sulfonat) ABTS diinkubasi dengan peroksidase (metmioglobin dan  $H_2O_2$ , kation radikal relatif stabil,  $ABTS^+$ ,

terbentuk). pembentukan ABTS<sup>+</sup> terjadi dari interaksi dengan *Ferryl myoglobin* menghasilkan warna biru-hijau yang relatif stabil, Diukur pada 600nm (Badarinath *et al.*, 2010).

7. Dekolorisasi *trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC)

Pengujian ini didasarkan pada kemampuan molekul untuk mengubah radikal bebas dari 2,2'-azinobis (asam 3-ethylbenzothiozoline-6-sulfonat) menjadi stabil dibandingkan dengan *Trolox*, analog larut air vitamin E. Aktivitas senyawa dinyatakan sebagai TEAC. Kekurangan metode ini yaitu karena masih jarang diterapkan maka diperlukan pembandingan hasil dari studi yang berbeda (Badarinath *et al.*, 2010).

8. *Ferric reducing antioxidant power* (FRAP)

FRAP merupakan uji kolorimetri yang mengukur kemampuan plasma dengan mengurangi warna intens biru besi kompleks *tripyridyltriazine* ke bentuk besi sehingga diperoleh nilai absorbansi. Keuntungan metode ini yaitu sederhana, cepat dan murah. Kekurangan dari metode ini yaitu tidak dapat mendeteksi spesies yang bertindak sebagai *quenching radical* (transfer H) (Badarinath *et al.*, 2010).

9. Peredaman radikal bebas DPPH

Metode DPPH memiliki Prinsip kerja yaitu pengukuran penangkapan radikal bebas sintetik DPPH dalam pelarut organik polar pada suhu kamar oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan. Beberapa molekul dapat memberikan elektron atau hidrogen ketika beraksi DPPH, sehingga akan memudarkan warna DPPH, melalui reaksi reduksi dengan perubahan warna ungu menjadi kekuningan oleh elektron dari senyawa antioksidan. Reaksi DPPH dengan gugus hidroksil menyebabkan substitusi homolitik dari satu cincin fenil DPPH menghasilkan 2-(4-hidroksifenil)-2-fenil-1-pikrilhidrazin sebagai produk mayor yang juga dibentuk melalui proses sekunder (Pokorny & Gordon, 2001). Kelebihan dari metode DPPH yaitu hasil terbukti akurat, reliabel dan praktis,

selain itu sederhana, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel (Huang *et al.*, 2005).

10. Pengurangan jumlah ion *Cupri* (II) (CUPRAC)

Metode ini digunakan untuk peredaman aktivitas antioksidan yang larut dalam air, Spesies oksigen aktif (ROS) dapat menyerang makromolekul biologi sehingga dapat menimbulkan stress oksidatif. Keuntungan dari metode ini yaitu instrument yang digunakan lebih canggih, nyaman, lebih murah, dan lebih spesifik, namun kekurangannya yaitu instrument lebih mahal (Badarinath *et al.*, 2010).

11. Peredaman jumlah ion oksida (TOSC)

Uji aktivitas SOD menggunakan persaingan pengurangan kinetika  $O_2^-$  pada sitokrom c dan sampel. Metode ini telah disesuaikan dengan lempeng. Sitokrom c dapat dikurangi secara langsung oleh antioksidan dan dapat menghambat xantin oksidase. Metode ini tidak cocok untuk mengukur antioksidan nonenzimatik (Huang *et al.*, 2005)

12. *Enhanced chemiluminescence* (ECL)

ECL digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan dalam cairan biologis. Pengujian ini melibatkan *luminal chemiluminescent*. Cahaya emisi terjadi ketika lumen yang teroksidasi oleh hidrogen peroksida yang dihasilkan dalam reaksi dikatalisis oleh *horseradish peroksidase* (cairan reaksi HRP). Kelebihan metode ini yaitu lebih sensitive terhadap radikal antioksidan, namun kekurangannya yaitu lebih rumit, membutuhkan waktu yang lama, dan lebih mahal (Badarinath *et al.*, 2010).

13. TLC bioautografi

Skrining antiradikal dengan KLT dapat digunakan untuk mengetahui profil ekstrak. Analisis kualitatif, kuantitatif, dan semi kuantitatif dapat dilakukan dengan metode ini. Untuk mendeteksi senyawa antioksidan, metode ini berdasarkan pengurangan dari DPPH. Pada KLT autobiografi dapat digunakan lempeng silica gel dan mengembangkan kromatogram dalam pelarut yang memadai. Penyemprot yang digunakan biasanya DPPH 0,2%. Keuntungan dari

metode ini yaitu mudah, efektif, cepat, tidak butuh pemisahan sampel, dan potensi sampel dapat diketahui. Kekurangan dari metode ini diperlukan fase gerak yang sesuai agar senyawa dalam sampel dapat bergerak melalui fase diam (Badarinath *et al.*, 2010).

#### 14. Aktivitas antioksidan seluler (CAA)

CAA memiliki prinsip dengan menguji aktivitas senyawa antioksidan didalam sel. Pada metode ini dapat diketahui penyumbang aktivitas, metabolisme yang terjadi, distribusi antioksidan dan aktivitas antioksidan didalam sel. Keuntungan dari metode ini yaitu lebih akurat, namun kekurangannya yaitu waktu yang dibutuhkannya lama dan harganya mahal (Badarinath *et al.*, 2010).

## 2.7 Tinjauan Enzim Lipase

### 2.7.1 Enzim

Enzim adalah polimer biologis yang mengkatalisis reaksi kimia untuk berlangsungnya kehidupan (Murray *et al.*, 2009). Enzim sendiri diumpakan seperti kunci dan gembok (*lock and key*) karena hanya enzim yang cocok saja untuk reaksi kimia tertentu (Winarno, 1995)

Enzim merupakan katalis yang sangat selektif yang bersifat spesifik untuk reaksi-reaksi yang di katalisis atau substratnya. Enzim juga katalis stereospesifik yang mengkatalisis reaksi dari hanya satu stereoisomer suatu senyawa (Murray *et al.*, 2009). Berdasarkan international Units of Biochemists (IUB) enzim dikelompokkan menjadi 6 kelas, di antaranya:

- a. Oksidoreduktase merupakan enzim yang mengkatalisis oksidasi dan reduksi
- b. Transferase merupakan enzim yang mengkatalisis pemindahan gugus seperti gugus glikosil, metil, dan fosforil
- c. Hidrolase merupakan enzim yang mengkatalisis terjadinya pemutusan ikatan C-C, C-O, C-N, dan ikatan lainnya

- d. Liase merupakan enzim yang mengkatalisis pemutusan ikatan yang diikuti dengan eliminasi atom sehingga menghasilkan ikatan rangkap
- e. Isomerase merupakan enzim yang mengkatalisis perubahan geometrik atau struktur dalam satu molekul
- f. Ligase merupakan enzim yang mengkatalisis penyatuan dua molekul yang dihidrolisis ATP

Aktivitas enzim biasanya membutuhkan kofaktor berupa senyawa organik atau logam. Senyawa organik terikat pada bagian protein enzim. Bila ikatan itu lemah maka kofaktor disebut *co-enzim* dan jika terikat erat melalui ikatan kovalen dinamakan gugus prostetis. Pada umumnya dua kofaktor itu tidak dibedakan disebut *co-enzim*. fungsi logam pada umumnya adalah untuk memantapkan ikatan substrat pada enzim atau mentransfer elektron yang timbul selama proses katalisis (Murray *et al.*, 2009).

Aktivitas dari enzim di pengaruhi oleh suhu, pH, dan konsentrasi dari substrat. Peningkatan suhu dapat meningkatkan aktivitas dari enzim. Enzim tidak stabil dan mudah terdenaturasi, sehingga aktivitas enzimnya hilang. Selain itu aktivitas enzim juga dipengaruhi oleh pH. Sebagian besar enzim intrasel mempunyai aktivitas optimal pada pH 5-9 (Murray *et al.*, 2009).

### 2.7.2 Enzim Lipase

Tatanama enzim berdasarkan IUB (International Unit of Biochemistry) dibagi menjadi enam golongan yaitu golongan enzim oksidoreduktase, transferase, hidrolase, liase, isomerase dan ligase. Enzim lipase termasuk dalam golongan hidrolase (3.1). Golongan hidrolase dibagi lagi menjadi beberapa golongan dimana enzim lipase termasuk dalam golongan karbosiklik ester hidrolase (3.1.1). Lipase lebih jauh diklasifikasikan menurut substrat yang digunakan. Kebanyakan lipase bekerja dengan ester atau gliserida, yang merupakan sumber dari sebagian besar material lemak di alam. Reaksi dalam lipase pada Gambar 2.7.

### 3 Triglicerida + H<sub>2</sub>O → digliserida + karboksilat

Gambar 2.7 Reaksi dalam lipase

Lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis lemak, mono-, di-, dan trigliserida untuk menghasilkan asam lemak bebas dan gliserol. Enzim ini juga digunakan untuk hidrolisis triasilgliserol menjadi diasilgliserol dan asam lemak bebas. Diasilgliserol adalah ester gliserol digunakan sebagai bahan pengemulsi dan penstabil produk makanan, kosmetika dan farmasetika. (Dali *et al.*, 2011).

Enzim lipase merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan ester terutama lemak netral seperti trigliserida (Sana *et al.*, 2004). Enzim lipase merupakan kelompok enzim yang secara umum berfungsi dalam hidrolisis triasilgliserol (trigliserida) untuk menghasilkan asam lemak rantai panjang dan gliserol (Yu *et al.*, 2007).

Enzim lipase secara luas dapat ditemukan pada hewan, tanaman dan mikroorganisme (Damaso *et al.*, 2008). Lipase di produksi oleh mikroba seperti bakteri, jamur, yeast, dan aktinomises (Sharma *et al.*, 2001) baik sendiri maupun bersama-sama dengan jenis lain dari famili hidrolase, seperti esterase (Pera *et al.*, 2006). Berdasarkan penelitian, lipase yang diperoleh dari mikroorganisme selain lebih murah juga lebih stabil terhadap lingkungan dengan demikian mempunyai spektrum yang luas untuk diaplikasikan di industri, di antaranya industri lemak, minyak, susu dan obat-obatan (Ellaiah *et al.*, 2011).

#### 2.7.3 Aktivitas Lipase

Enzim lipase memiliki daya kerja dengan mengkatalisis hidrolisis ester dan karbohidrat. Lipase menghidrolisis digliserida menjadi monogliserida dan yang heterogen. Lipase aktif dalam emulsi minyak dalam air dibandingkan pada larutan

lemak dalam air. Keaktifan enzim lipase secara optimum tergantung dari pH, suhu, senyawa pengemulsi dan ada tidaknya garam dalam substrat (Winarno, 1995).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode kolorimetri. Mekanisme kerja inhibitor lipase adalah mengikat secara kovalen bagian aktif dari lipase pankreas dan membentuk kompleks yang stabil. Kompleks tersebut menginduksi perubahan pada lipase sehingga menjadi inaktif. Lipase inaktif ini tidak mampu menghidrolisis lemak menjadi asam lemak dan monogliserid, sehingga akhirnya terbuang melalui feses (Al-Suwailem *et al.*, 2006). Hal ini menyebabkan absorpsi lemak berkurang sehingga menurunkan berat badan.

Substrat enzim lipase pankreas yang berasal dari makanan dalam bentuk trigliserida akan dihidrolisis menjadi monogliserida dan asam lemak bebas rantai panjang. Enzim lipase sendiri akan menghidrolisis asam lemak dari makanan sebesar 50-70% (Birari & Bhutani, 2007). Enzim lipase pankreas akan memecahkan lemak dengan memutuskan ikatan ester yang merupakan ikatan induk gliserida pada substrat. Monogliserida yang dihasilkan dapat digunakan kerja dalam otot atau disimpan dalam adipose (Santoso, 2001). Lipase pankreas bekerja pada daerah permukaan minyak air dan titik-titik lemak yang teremulsi secara halus dibentuk oleh gerakan mekanis dalam usus dengan adanya garam empedu. Semakin aktif aktivitas enzim tersebut, maka lemak dan minyak yang dihidrolisis akan semakin banyak sehingga asam lemak bebas yang dihasilkan akan semakin banyak pula (Rahardjo *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai daya inhibisi beberapa tanaman obat dalam menghambat aktivitas lipase pankreas sebagai salah satu metode untuk antiobesitas telah dilakukan. Han *et al.* (1999) menyatakan bahwa ekstrak tanaman teh oolong dapat menghambat aktivitas lipase pankreas. Yamamoto *et al.* (2000) menyatakan bahwa ekstrak etanol CT II herba *Cassia nomame* mampu menghambat aktivitas lipase karena efektif untuk mengatasi kegemukan, lemak hati, dan hipertrigliseridemia pada mencit yang mempunyai lemak yang tinggi. Pengaruh antiobesitas senyawa *teasaponin* dalam tikus diet lemak tinggi dimediasi sebagian

lewat absorpsi lemak pada usus dalam menghambat aktivitas lipase pankreas (Han *et al.*, 2001). Lee *et al.* (2005) menyatakan bahwa senyawa krosin pada tanaman *Gardenia jasminoides* mampu menghambat aktivitas lipase pankreas pada tikus yang mempunyai kolesterol tinggi secara *in vivo*. Penelitian lain menunjukkan bahwa senyawa aktif yang berpotensi sebagai antiobesitas dalam menghambat aktivitas lipase pankreas adalah saponin yang terdapat pada tanaman *Platycodi radix* (Xu *et al.*, 2005) dan *Panax japonicus* (Han *et al.*, 2005).

## 2.8 Tinjauan Uji Aktivitas Lipase

Metoda yang digunakan untuk kuantitatif adalah metoda titrimetri, *interfacial tensiometry*, *Spectroscopy* (*photometry*, *fluorimetry*, *infrared* dan *turbidimetri*), *kromatografi*, *immunochemistry* dan *konduktometri*. Sebagian besar metoda tersebut didesain untuk memperkirakan produk hasil reaksi hidrolisis dan dibawah ini adalah beberapa metode penghambatan lipase:

### 1. Titrimetri

Metoda titrimetri pada prinsipnya pembuatan substrat dalam bentuk emulsi kemudian diberi enzim lipase yang belum diketahui keaktifannya dan diinkubasi pada pH optimumnya. Selama inkubasi, proses bebas dilepaskan. Hal ini akan menurunkan pH. Titrasi yang dilakukan menggunakan larutan alkali akan menghasilkan jumlah titer persatua waktu yang menunjukkan jumlah asam lemak yang dihasilkan. Jumlah asam lemak tersebut menunjukkan harga aktivitas lipase. Emulsi yang stabil dan peningkatan sensitifitas pengujian dapat dilakukan dengan menambahkan gum arabik, hidroksimetilselulosa atau natrium oleat (Winarno, 1986).

### 2. Nephelometri dan turbidimetri

Metode ini didasarkan pada perbandingan intensitas cahaya yang tersebar oleh sampel dalam kondisi dengan intensitas cahaya yang tersebar oleh suspensi standar referensi. Semakin tinggi intensitas cahaya yang tersebar, semakin tinggi

kekeruhan yang dihasilkan. Metode ini, melibatkan penggunaan indikator berwarna pada lempeng agar bersama-sama dengan ester karboksilat sebagai substrat lipase dengan menentukan diameter daerah difusi produk. Jenis teknik juga dapat diterapkan untuk memantau hidrolisis tween oleh beberapa lipase dan penurunan absorbansi emulsi TAG dengan waktu. Dalam nefelometri, triolein (asam lemak rantai panjang) yang terdegradasi ke digliserida. Degradasi hasil triolein penurunan kekeruhan (Fariha *et al.*, 2009).

### 3. Elektrik konduktivitas

Konduktivitas listrik meningkatkan media selama reaksi hidrolisis lipase karena pengembangan muatan listrik yang dibawa oleh FFA dirilis. Teknik ini memiliki banyak kelemahan: pengukuran sangat bergantung pada temperatur, dan sensitivitas tergantung dari triacetin yang digunakan sebagai substrat. Namun, triacetin bukan substrat yang cocok untuk lipase (Fariha *et al.*, 2009).

### 4. Kolorimetri

Kecepatan dan sensitivitas uji untuk FFA dapat ditingkatkan dengan penggunaan metode kolorimetri. Metode ini melibatkan kompleksasi dari FFA dalam pelarut organik dengan logam bervalensi dua (biasanya tembaga) diikuti dengan analisis spektrofotometri logam dalam fase organik (Fariha *et al.*, 2009).

### 5. Fluorometri

uji fluoresensi lipase kuantitatif berdasarkan pada interaksi rhodamine B dengan asam lemak yang dilepaskan selama hidrolisis enzimatis trigliserida. Metode dari fluorometri yaitu Rhodamine-trigliserida-Agarose, memungkinkan fleksibilitas dalam pilihan substrat dan sejumlah besar sampel dapat diuji secara bersamaan, sehingga praktis untuk pengujian aktivitas enzim lipase di fraksi kolom selama pemurnian (Fariha *et al.*, 2009).

### 6. Kromatografi

Pada kromatografi dapat digunakan metode HPLC atau GC. Metode HPLC digunakan untuk menentukan aktivitas lipase menggunakan  $\beta$ -naphthyl laurat, palmitat dan ester laurat dari p-nitrofenol sebagai substrat.  $\beta$ -naphthyl laurat

diinkubasi dengan enzim dan pembentukan naftol yang diukur dengan HPLC fase terbalik. GC dapat digunakan untuk memisahkan dan mengukur produk hidrolitik dari lipase Metode ini umumnya lebih baik dari HPLC, terutama karena HPLC mempunyai sensitivitas rendah pada detektor (Fariha *et al.*, 2009).

#### 7. *Interfacial tensiometry*

Sebagian lipase yang aktif pada antarmuka untuk melihat aktivitas enzim dengan mengikuti perubahan tekanan permukaan. Pembelahan film substrat *monomolecular* pada antarmuka udara-air menyebabkan substrat untuk meninggalkan antarmuka, yang mengarah ke pengurangan kepadatan permukaan dan mengurangi tekanan permukaan (Fariha *et al.*, 2009).

#### 8. *Immunochemistry*

Metode ini banyak digunakan untuk uji secara kuantitatif pada media biologis, secara independen dari aktivitas lipolitik lipase. *Immunochemistry* dikombinasikan dengan analisis Western blot untuk mendeteksi lipoprotein lipase (LPL) (Fariha *et al.*, 2009).

Keuntungan dan kerugian dari metode lipase yang ada yaitu

1. Trigliserida alami digunakan dalam kromatografi dan titrimetri, tetapi sensitivitas yang lebih tinggi diperoleh daripada fluorometri dengan substrat sintetik.
2. Titrimetri yang dilakukan terus menerus memiliki sensitivitas yang rendah dan dapat mengubah ion hidrogen yang bebas.
3. Kolorimetri lebih sensitif dan mudah dilakukan (Fariha *et al.*, 2009).

## BAB 3. METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experiments laboratories*. Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui total fenolik, flavonoid, dan antioksidan dari daun kepuh, selanjutnya dapat dilakukan uji aktivitas antihiperlipidemia hambatan lipase *in vitro*.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Oktober 2014 sampai Oktober 2015 bertempat di CDAST (*Center for Development of Advanced Science and Technology*) Universitas Jember.

### 3.3 Variabel Penelitian

- Variabel bebas

Variabel bebas yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis ekstrak dan konsentrasi ekstrak daun kepuh yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri.

- Variabel terikat

Variabel terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah total fenolik, total flavonoid, aktivitas antioksidan DPPH, dan aktivitas inhibisi enzim pankreas lipase oleh daun kepuh.

- Variabel terkontrol

Variabel terkontrol yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kepuh, cara ekstraksi, waktu ekstraksi, pelarut untuk ekstraksi, cara penentuan total fenolik, cara penentuan total flavonoid, cara pengujian aktivitas antioksidan, dan cara inhibisi enzim pankreas lipase.

### 3.4 Rancangan Penelitian

#### 3.4.1 Definisi operasional

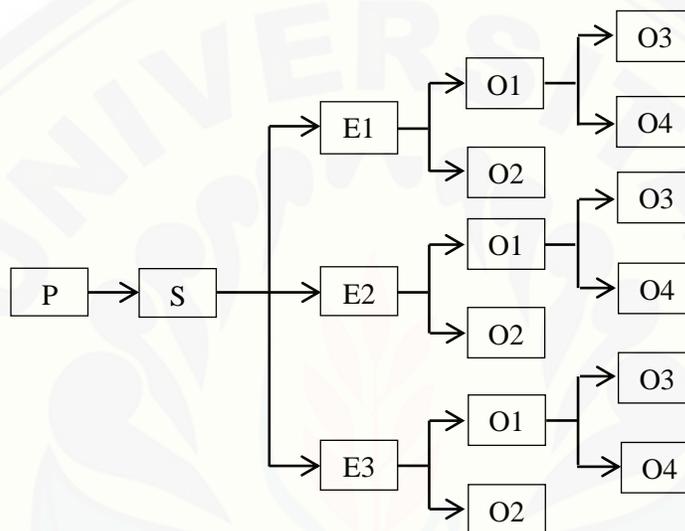
Definisi operasional pada penelitian ini yaitu:

1. Daun kepuh (*Sterculia foetida*) yang digunakan berasal dari Taman Nasional Meru Betiri Jember. Daun kepuh yang digunakan secara acak. Daun kepuh yang digunakan berasal dari tumbuhan kepuh yang sudah dewasa yang ditandai dengan tumbuhan sudah pernah berbunga dan berbuah, batang berkayu, dan akar yang sudah besar.
2. Analisis kandungan total fenolik menggunakan *folin ceacetiu* 50% dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dengan standar asam galat. Kadar total polifenol yang diukur setara dengan asam galat atau mg asam galat ekuivalen (GAE)/g ekstrak.
3. Analisis kandungan total flavonoid menggunakan  $\text{NaNO}_2$  dan  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  serta standar kuersetin dan kadar total flavonoid yang diukur setara dengan kuersetin atau mg kuersetin ekuivalen/g ekstrak.
4. Konsentrasi uji aktivitas antioksidan berdasarkan rentang konsentrasi total fenolik. Analisis aktivitas antioksidan menggunakan peredaman DPPH dengan pembanding asam askorbat
5. Uji inhibisi enzim lipase menggunakan enzim lipase dengan substrat p-NPB dengan kontrol positif orlistat.
6. Blanko yaitu suatu pelarut ekstrak ditambahkan dengan reagen-reagen uji yang digunakan.
7. Sampel blanko yang digunakan merupakan sampel ekstrak daun kepuh yang direaksikan menggunakan akuades.

#### 3.4.2 Rancangan percobaan

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas inhibitor enzim pankreas lipase pada tumbuhan kepuh. Pada tahap awal penelitian dilakukan uji analisis kandungan total fenolik dengan standar asam galat untuk mengetahui kandungan kimia total

fenol dalam tumbuhan. Selanjutnya dilakukan analisis kandungan flavonoid dengan standar kuersetin yang bertujuan untuk mengetahui kandungan total flavonoid dalam tanaman. Tahap selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan menggunakan DPPH dan inhibisi enzim lipase, konsentrasi yang digunakan sesuai rentang konsentrasi kandungan fenolik sampel. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.



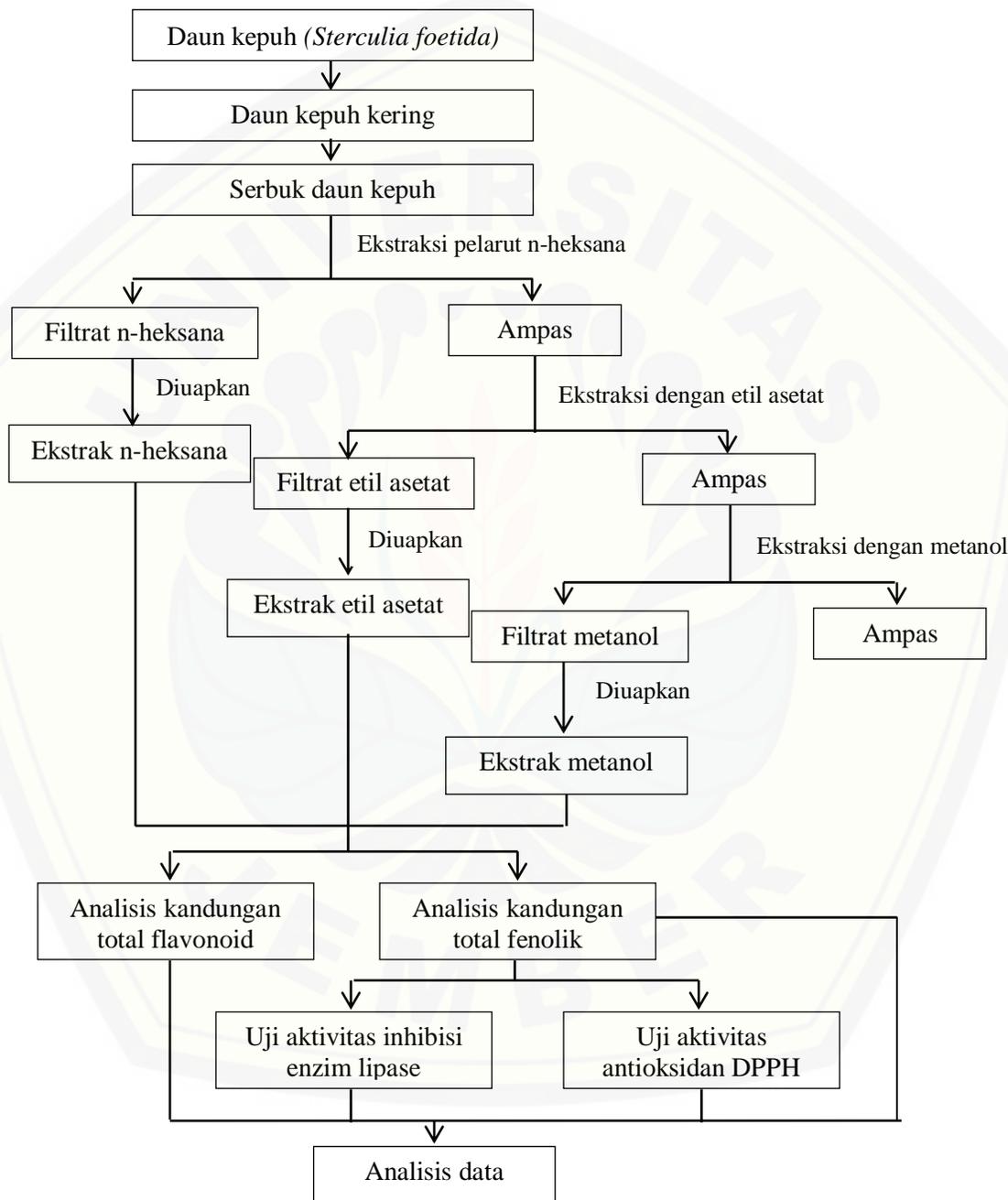
Gambar 3.1 Rancangan Percobaan Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia *in vitro*

Keterangan :

- P : Populasi daun kepuh
- S : Sampel daun kepuh
- E1 : Ekstrak daun kepuh pelarut n-heksana
- E2 : Ekstrak daun kepuh pelarut etil asetat
- E3 : Ekstrak daun kepuh pelarut metanol
- O1 : Kandungan total fenolik
- O2 : Kandungan total flavonoid
- O3 : Uji aktivitas antioksidan DPPH
- O4 : Uji aktivitas inhibisi enzim lipase

## 3.4.3 Alur penelitian

Gambar 3.2 menunjukkan alur penelitian yang dilakukan pada Uji aktivitas antioksidan dan antihiperlipidemia ekstrak daun kepuh.



Gambar 3.2 Alur penelitian Uji aktivitas antioksidan dan antihiperlipidemia ekstrak daun kepuh.

### 3.5 Alat dan Bahan

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, *shaker* (*Stuart Orbital Shaker SSL 1*), *Rotary evaporator* (*Strike 300*), *spektrofotometri* (*Hitachi U-2900 double beam*), corong *Buchner*, timbangan analitik digital, kuvet, *micropipet*, *microplate reader*, inkubator (*Hitachi CF15RX II*), *waterbath*, *stopwatch*, alat-alat gelas.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman kepuh bagian daun, n-heksana p.a (Merck), etil asetat p.a (Merck), metanol p.a (Merck), dimetilsulfoksida (DMSO) (Sigma-Aldrich), akuades, asam galat (Sigma-Aldrich), *folin Ciocalteau* (Merck), natrium karbonat (Brataco), kuersetin (Nacalai Tasque), natrium nitrit (Brataco), alumunium (III) klorida (Merck), natrium hidoksida (Merck), *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* (DPPH) (Nacalai Tasque), asam askorbat (Nacalai Tasque), *p-nitrophenyl butyrate* (p-NPB) (Sigma-Aldrich), triton x-100 (Sigma-Aldrich), Na asetat (Merck), asam asetat (Merck), enzim pankreas lipase (Sigma-Aldrich), aseton (Merck), orlistat (Xenical<sup>®</sup>), mikrotube, kertas saring, dan kertas label dan alumunium foil.

### 3.6 Pengambilan Sampel

Sampel bahan ekstrak daun kepuh (*Sterculia foetida*) diperoleh dari Kawasan Taman Nasional Meru Betiri Jember, Jawa Timur yang sudah divalidasi berdasarkan surat No: BA.1271/BTNMB-1/2015. Bagian tumbuhan kepuh yang digunakan adalah daun yang diambil secara acak.

### 3.7 Pembuatan Ekstrak n-Heksana, Etil asetat, dan Metanol Daun Kepuh

Proses ekstraksi dengan ekstraksi bertingkat secara maserasi. Pada awalnya dilakukan sortasi basah daun kepuh. Setelah itu dilakukan pengeringan pada suhu ruang kemudian dilakukan perajangan daun kepuh dan yang terakhir dilakukan proses penghalusan sampel daun kepuh menjadi serbuk. Serbuk daun kepuh diekstraksi secara bertingkat menggunakan 3 pelarut yang berbeda berdasarkan kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Serbuk daun kepuh ditimbang sebesar 50 gram. Maserasi pertama menggunakan pelarut n-heksana dengan perbandingan 1:5 dalam erlenmeyer kemudian ekstrak digojog dengan shaker pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah 3 hari, Ekstrak cair disaring menggunakan corong buchner dimasukkan kedalam botol. Selanjutnya serbuk dikeringkan dan ditimbang menggunakan timbangan analitik digital. Serbuk yang sudah ditimbang dilakukan maserasi menggunakan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:5 dan digojog dengan menggunakan shaker pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah 3 hari, ekstrak cair disaring menggunakan corong buchner. Serbuk daun kepuh dikeringkan didalam lemari asam dan ditimbang dengan timbangan analitik digital untuk mengetahui serbuk sisa yang ada. Serbuk dimaserasi menggunakan metanol dengan perbandingan 1:5 dan digojog dengan shaker pada suhu ruang selama 3 hari. Setelah 3 hari, ekstrak cair metanol daun kepuh disaring menggunakan corong buchner.

Ekstrak cair yang diperoleh dari setiap ekstraksi dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak dimasukkan dalam botol ekstrak berwarna coklat yang sebelumnya ditimbang terlebih dahulu. Selanjutnya dihitung rendemen ekstrak pekat yang diperoleh.

### 3.8 Analisis Kandungan Total Fenolik

Analisis kandungan total fenolik ekstrak daun kepuh ditentukan berdasarkan metode Taga *et al.* (1984) dan menggunakan standar asam galat. Ekstraks n-heksana, etil asetat, dan metanol diencerkan dalam pelarut metanol. Lima puluh mikroliter

ekstrak n-heksana, etil asetat, dan methanol ditambah 1,0 ml  $\text{NaCO}_3$  2% dan didiamkan selama 2 menit. Ditambahkan 50,0  $\mu\text{L}$  reagen *folin ciocalteu* 50% dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya diukur absorbansi larutan dengan menggunakan *spektrofotometer* UV-Vis pada panjang gelombang 750,0 nm. Total fenolik masing-masing ekstrak ditentukan dalam *mg gallic acid equivalent* (GAE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar asam galat.

### 3.9 Analisis Kandungan Total Flavonoid

Analisis kandungan total flavonoid ditentukan berdasarkan metode kolorimetri berdasarkan Choi *et al.* (2002). Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol diencerkan dalam metanol. Diambil 150,0  $\mu\text{l}$  dilarutkan ke dalam 400,0  $\mu\text{l}$  aquadest. Selanjutnya ditambahkan 30,0  $\mu\text{l}$   $\text{NaNO}_2$  5% dan 30,0  $\mu\text{l}$   $\text{AlCl}_3$  10%. Setelah 6 menit, ditambahkan 200,0  $\mu\text{l}$   $\text{NaOH}$  1M dan 240,0  $\mu\text{l}$  akuades. Absorbansi diukur menggunakan *spektrofotometri* UV-Vis pada panjang gelombang 415,0 nm. Total flavonoid masing-masing ekstrak ditentukan dalam *mg quercetin equivalent* (QE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar kuersetin.

### 3.10 Aktivitas Peredaman Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH. Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak fenolik daun kepuh terhadap radikal berdasarkan Goncalves *et al.* (2015) yang dimodifikasi. Ekstrak kental n-heksana, etil asetat, dan metanol diencerkan dalam metanol. Membuat 90  $\mu\text{M}$  larutan DPPH dalam metanol p.a sebagai larutan persediaan. Dipipet 250,0  $\mu\text{l}$  larutan DPPH dalam metanol dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 50,0  $\mu\text{l}$  larutan ekstrak daun kepuh dengan range konsentrasi total fenolik tertentu secara terpisah. Untuk menyamakan konsentrasi ekstrak maka ekstrak diencerkan dengan pelarut metanol p.a. Larutan ekstrak di *vortex* dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan ditentukan pada

panjang gelombang 515 nm menggunakan *spektrofotometer* UV-Vis. Prosentase penangkapan radikal DPPH dihitung sesuai Persamaan 3.1.

$$\text{Persen penangkapan radikal DPPH} = \left( 1 - \left( \frac{A_1}{A_0} \right) \right) \times 100\% \quad \dots\dots \text{Persamaan 3.1}$$

Keterangan :

$A_1$  = Nilai absorbansi sampel

$A_0$  = Nilai absorbansi kontrol

Nilai persen penangkapan radikal DPPH yang diperoleh untuk semua konsentrasi digunakan untuk membuat kurva. Prosentase penangkapan radikal DPPH sebagai sumbu y dan konsentrasi sebagai sumbu x. kemampuan ekstrak total fenolik dalam menangkap radikal DPPH sebagai  $IC_{50}$ , yaitu kadar total fenolik yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH menggunakan Persamaan 3.2.

$$IC_{50} = 50 - \frac{a}{b} \quad \dots\dots\dots \text{Persamaan 3.2}$$

Keterangan :

a dan b diperoleh dari persamaan  $y=bx+a$

Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif

### 3.11 Aktivitas Hambatan Lipase

#### 3.11.1 Preparasi substrat

Substrat yang digunakan pada inhibisi enzim lipase yaitu p-NPB. Sebanyak 16,10 mg p-NPB dimasukkan kedalam erlenmeyer 100,0 mL. Sebanyak 10,0 mL Triton-x 4% ditambahkan dalam buffer, kemudian dihangatkan pada suhu 55-60°C sampai jernih selama  $\pm 2$  menit.

### 3.11.2 Preparasi buffer asam asetat

Buffer asam asetat yang digunakan dalam inhibisi enzim lipase pada pH 5,61. Bahan yang digunakan dalam pembuatan buffer asam asetat yaitu  $\text{CH}_3\text{COOH}$  dan  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Asam asetat ditimbang 16,406 gram dimasukkan kedalam labu ukur kemudian ditambah aquadest hingga volume 200,0 mL. Sebanyak 12,01 gram natrium asetat ditimbang dimasukkan dalam labu ukur 200,0 mL ditambahkan akuades hingga volume 200,0 mL. Asam asetat 1,90 mL dan 18,10 mL natrium asetat dicampur hingga tercapai pH 5,61.

### 3.11.3 Prosedur uji

Substrat diambil sebanyak 950,0  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 5 menit. Sampel atau blanko ditambahkan kedalam substrat. Selanjutnya 75,0  $\mu\text{L}$  enzim ditambahkan dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 60 menit. Aseton ditambahkan sebanyak 2,0 mL untuk menghentikan reaksi. Diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 412,0 nm. Proses penghambatan dapat dihitung berdasarkan Persamaan 3. 4.

$$\text{Persen Penghambatan Lipase (\%)} = \frac{(A_{\text{blanko}} - A_{\text{uji}})}{A_{\text{blanko}}} \times 100\% \dots\dots\dots \text{Persamaan 3.4}$$

Nilai persen penghambatan lipase yang diperoleh untuk semua konsentrasi digunakan untuk membuat kurva. Persentase penghambatan lipase sebagai sumbu y dan konsentrasi sebagai sumbu x. kemampuan ekstrak total fenolik dalam menghambat lipase sebagai  $\text{IC}_{50}$ , yaitu kadar total fenolik yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas lipase menggunakan Persamaan 3.5.

$$\text{IC}_{50} = 50 - \frac{a}{b} \dots\dots\dots \text{Persamaan 3.5}$$

Keterangan :

a dan b diperoleh dari persamaan  $y=bx+a$

### 3.12 Analisis Data

Data hasil analisis total fenolik, flavonoid, aktivitas antioksidan, dan inhibisi enzim pankreas lipase diuji normalitas dan homogenitasnya. Bila kedua uji ini dipenuhi maka selanjutnya dilakukan uji ANOVA untuk menentukan perbedaan rata-rata aktivitas dan dapat dilanjutkan menggunakan uji LSD (*least significant different*) untuk mengetahui variabel mana yang memiliki perbedaan, berdasarkan nilai signifikansi  $p < 0,05$  dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ).

