



**POTENSI EKSTRAK DAUN TIMO (*Kleinhovia hospita*) SEBAGAI
ANTIOKSIDAN DAN ANTIHIPERLIPIDEMIA: METODE DPPH
DAN PENGHAMBATAN LIPASE *IN VITRO***

SKIRPSI

Oleh:

Fitriana Yunus Apriliani
NIM 112210101018

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015



**POTENSI EKSTRAK DAUN TIMO (*Kleinhovia hospita*) SEBAGAI
ANTIOKSIDAN DAN ANTIHIPERLIPIDEMIA: METODE DPPH
DAN PENGHAMBATAN LIPASE *IN VITRO***

SKIRPSI

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

Oleh:

Fitriana Yunus Apriliani
NIM 112210101018

FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

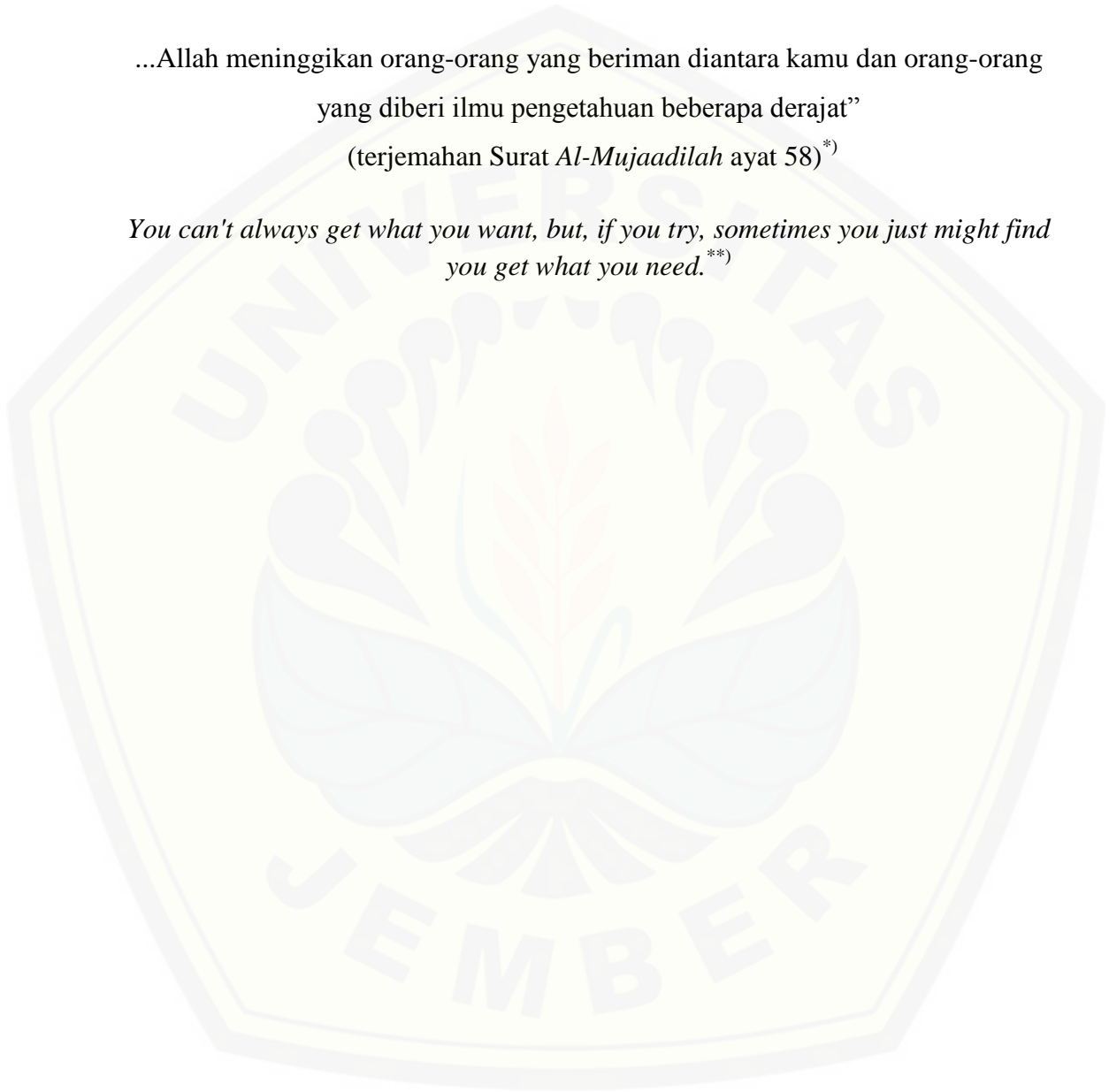
1. Allah SWT yang telah memberikan kesempatan untuk menuntut ilmu dan kekuatan lahir batin untuk menyelesaikan tahap ini beserta Nabi Muhammad yang selalu menjadi syuri tauladan;
2. Ibu Waini dan Bapak Warjito yang selalu mengajarkan arti hidup, kesabaran, keikhlasan dan ketegaran serta atas segala doa yang selalu terpanjatkan untuk diberi selalu kemudahan hingga detik ini;
3. Adikku Cahyo Yunus Rizkianto dan Safira Yunus Saudiana atas doa dan semangat yang diberikan;
4. Guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi atas ilmu pengetahuan dan bimbingan;
5. Almamater tercinta, Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTTO

...Allah meninggikan orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat”

(terjemahan Surat *Al-Mujaadilah* ayat 58)^{*)}

You can't always get what you want, but, if you try, sometimes you just might find you get what you need.^{**)}



^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2006. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Semarang: CV Penerbit Diponegoro.

^{**)} Dika, R. 2011. *Manusia Setengah Salmon*. Jakarta: GagasMedia

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fitriana Yunus Apriliani

NIM : 112210101018

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro***“ adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan 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 mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, November 2015

Yang menyatakan,

Fitriana Yunus Apriliani

NIM 112210101018

SKRIPSI

Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro*

Oleh

Fitriana yunus apriliani

NIM 112210101018

Pembimbing

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

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Farmasi Universitas Jember pada:

Hari : Rabu
Tanggal : 2 Desember 2015
Tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama,



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

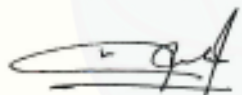
Dosen Pembimbing Anggota,



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

Tim Penguji:

Dosen Penguji I,



Indah Yulia N, S. Farm., M.Farm., Apt.
NIP. 198407122008122002

Dosen Penguji II



Diana Holiday, S.F., M.Farm., Apt.
NIP. 197812212005012002

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



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

NIP. 197604142002122001

RINGKASAN

Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro*; Fitriana Yunus Apriliani, 112210101018; 2015; 45 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Pola konsumsi masyarakat saat ini sudah berubah seiring dengan semakin banyaknya hidangan atau makanan siap saji. Adanya modernisasi dengan gaya hidup *sedentary* (kurang gerak) dan pola makan yang tidak seimbang juga dapat mengarah pada timbulnya obesitas. Obesitas secara langsung dapat menjadi penyebab utama terjadinya hiperlipidemia, karena menghasilkan kolesterol endogen lebih dari orang normal. Lemak yang terdapat di dalam tubuh dihidrolisis pada jaringan pankreas. Aktivitas lipase pankreas harus dihambat agar lemak tidak diserap tubuh sehingga penimbunan lemak tidak terjadi. Manifestasi klinis dari hiperlipidemia adalah terjadinya plak kolesterol pada pembuluh darah akibat oksidasi kolesterol-LDL. Maka proses oksidasi ini harus dihambat dengan antioksidan.

Akhir-akhir ini kecenderungan untuk kembali ke alam semakin meningkat, hal ini didukung dengan banyaknya penelitian-penelitian mengenai tanaman obat antihiperlipidemia, misalnya daun jati belanda, rimpang bangle, teh oolong yang mengandung flavonoid, steroid, tannin, saponin. Zat aktif yang terkandung dalam daun timo (*Kleinhovia hospita*) adalah saponin, cardenolin, bufadienol, antraknon, scopoletin, flavonoid (kuersetin dan rutin), kaemferol, dan alkaloid kuinolin. Berdasarkan kandungan flavonoid dan saponinnya tanaman timo diharapkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antihiperlipidemia.

Sampel daun timo diambil secara acak di kawasan Taman Nasional Meru Betiri (TNMB). Sampel yang telah diambil dikeringkan, diserbuk, kemudian diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil

asetat, dan metanol. Maserasi ini menghasilkan maserat yang kemudian dipekatkan dengan metode evaporasi hingga terbentuk ekstrak kental. Ekstrak diukur total fenolik menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* dengan pembentukan kompleks warna biru. Total flavonoid diukur menggunakan reagen AlCl_3 dengan pembentukan kompleks warna kuning. Aktivitas antioksidan diuji dengan metode peredaman radikal DPPH yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning, dan menggunakan vitamin C sebagai kontrol metode. Penghambatan lipase diuji berdasarkan hidrolisis substrat ρ -NPB dan menggunakan orlistat sebagai kontrol metode.

Total fenolik ekstrak daun timo untuk ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol adalah $10,05 \pm 0,08$; $15,73 \pm 0,4$; dan $72,32 \pm 0,41$ $\mu\text{g GAE/g}$ ekstrak dan total flavonoid ekstrak daun timo untuk ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol adalah $40,41 \pm 0,29$; $62,62 \pm 0,38$; dan $96,47 \pm 0,48$ $\mu\text{g QE/g}$ ekstrak. Total fenolik dan total flavonoid meningkat seiring dengan peningkatan kepolaran pelarut ekstraksinya. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC_{50} untuk masing-masing ekstrak. Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun timo menunjukkan bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas paling tinggi diikuti oleh ekstrak etil asetat dan n-heksana daun timo dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah $27,49 \pm 0,35$ $\mu\text{g/mL}$; $185,42 \pm 3,83$ $\mu\text{g/mL}$; dan $226,81 \pm 1,25$ $\mu\text{g/mL}$. Aktivitas antihiperlipidemia ditentukan dengan nilai IC_{50} yang menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki aktivitas paling tinggi diikuti oleh ekstrak n-heksana dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah $251,01 \pm 1,87$ $\mu\text{g/mL}$ dan $269,55 \pm 4,33$ $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan nilai IC_{50} penghambatan lipase ekstrak metanol daun timo tidak dapat ditentukan karena aktivitasnya tidak dapat mencapai 50%. Berdasarkan aktivitas penghambatan lipase dan antioksidannya, maka ekstrak yang terbaik sebagai kandidat obat antihiperlipidemia adalah ekstrak etil asetat daun timo.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Ekstrak Daun Timo (*Kleinhovia hospita*) sebagai Antioksidan dan Antihiperlipidemia: Metode DPPH dan Penghambatan Lipase *In Vitro*”. Skripsi ini disusun guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan studi strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Allah SWT, atas izin-Nya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi;
2. Ibu Waini dan Bapak Warjito tercinta, terimakasih atas segala pengorbanan, dukungan, kasih sayang, dan doa yang tiada henti diberikan pada penulis hingga detik ini serta Adikku Cahyo Yunus Rizkianto dan Safira Yunus Saudiana yang telah mendukung, mendoakan, dan memotivasi penulis selama ini;
3. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember atas kesempatan kesempatan yang telah diberikan untuk menyelesaikan tugas akhir;
4. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan Bapak Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota karena telah meluangkan waktu, pikiran, dan perhatian dalam membimbing skripsi ini;
5. Ibu Indah Yulia N, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji I dan Ibu Diana Holidah, S.F., M.Farm., Apt selaku Dosen Penguji II yang telah memberi saran dan penilaian terhadap hasil skripsi;

6. Bapak Drs. Wiratmo, M.Sc., Apt. dan Bapak Dian Agung P., S. Farm., M. Farm., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama menempuh studi;
7. Bapak Nuri, S.Si., M.Si., Apt. yang telah memberikan kesempatan, bantuan, dan bimbingan dalam penyelesaian tugas akhir ini;
8. Bapak/Ibu dosen-dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu pengetahuan;
9. Rekan skripsi “Meru Betiri Grup” atas kerjasama, dukungan dan semangat yang kalian berikan;
10. Sahabatku Radhiyyan, Sriani, Eka, Arda, Ani, Febri, Arum, Husnul, Yazida, Ena, Putri, Yuniar, Naning, Zul, Orin, dan Nikma atas semangat, doa dan bantuannya selama ini;
11. Teman-teman UKM KARISMA atas pengalaman organisasi yang berharga;
12. Keluarga ASMEF (Angkatan Solid Mahasiswa *Eleven* Farmasi) 2011 semuanya atas canda, tawa dan pengalaman selama kuliah ini;
13. Teman-teman seperjuangan di CDAST, terima kasih atas saran, kerjasama dan bantuannya;
14. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuannya dalam menyelesaikan penelitian ini dan mendo’akan kesuksesan ujian skripsi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan rahmat-Nya dan hanya Allah yang dapat membalas semua kebbaikannya. Hanya ucapan terimakasih yang dapat penulis sampaikan. Dan apabila ada saran dan kritik membangun yang ingin disampaikan, penulis akan sangat berterima kasih. Penulis harap penelitian ini bisa bermanfaat.

Jember, November 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBING	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Deskripsi Tanaman Timo	5
2.2 Senyawa Metabolit Sekunder	7
2.3 Antioksidan	8
2.4 Lemak	9
2.5 Metabolisme Lemak	10
2.6 Metabolisme Lipoprotein	12
2.7 Hiperlipidemia	14

2.8 Obat Antihiperlipidemia	16
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian	19
3.3 Variabel Penelitian	19
3.4 Rancangan Penelitian	20
3.4.1 Definisi Operasional	20
3.4.2 Rancangan Percobaan	21
3.4.3 Alur Penelitian	22
3.5 Alat dan Bahan	23
3.5.1 Alat Penelitian	23
3.5.2 Bahan	23
3.6 Prosedur Penelitian	23
3.6.1 Perlakuan Awal Sampel	23
3.6.2 Ekstraksi	23
3.6.3 Analisis Kandungan Total Fenolik dan Flavonoid	24
3.6.4 Analisis Penangkapan Radikal DPPH	25
3.6.5 Pengujian Penghambatan Lipase	25
3.6.6 Analisis Data	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.2 Kandungan Total Fenolik dan Flavonoid	29
4.2.1 Kandungan Total Fenolik	29
4.2.2 Kandungan Total Flavonoid	30
4.3 Aktivitas Peredaman Radikal DPPH Ekstrak Daun Timo	32
4.3 Aktivitas Penghambatan Lipase Ekstrak Daun Timo	35
BAB 5. PENUTUP	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40

DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	46



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi timo	6
2.2 Mekanisme kerja enzim lipase	11
2.3 Jalur metabolisme lemak.....	12
3.1 Diagram rancangan percobaan.....	21
3.2 Alur penelitian.....	22
4.1 Total fenolik ekstrak daun timo	30
4.2 Total flavonoid ekstrak daun timo	31
4.3 Nilai IC_{50} radikal DPPH oleh tanaman timo berdasarkan konsentrasi fenolik	33
4.4 Nilai IC_{50} radikal DPPH oleh tanaman timo berdasarkan konsentrasi ekstrak	33
4.5 Perbandingn aktivitas penghambatan lipase berdasarkan konsentrasi fenolik	36
4.6 Perbandingn aktivitas penghambatan lipase berdasarkan konsentrasi ekstrak	36
4.7 Perbandingn nilai IC_{50} penghambatan lipase ekstrak daun timo.	37
4.8 Perbandingn aktivitas peredaman DPPH dan penghambatan lipase.....	39

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Validasi Tanaman Timo	46
B. Perhitungan Rendemen Maserasi	47
C. Uji Total Fenolik	47
C.1 Standar Asam Galat	47
C.1.1 Preparasi Asam Galat	47
C.1.2 Kurva Standar Asam Galat	47
C.2 Total Fenolik Ekstrak	48
C.2.1 Preparasi Ekstrak Uji	47
C.2.2 Pengujian Total Fenolik Ekstrak	47
C.2.3 Perhitungan Total Fenolik Ekstrak	47
C.3 Uji Statistik Total Fenolik Ekstrak	50
D. Uji Total Flavonoid	47
D.1 Standar Kuersetin	51
D.1.1 Preparasi Kuersetin.....	51
D.1.2 Kurva Standar Kuersetin	52
D.2 Total Flavonoid Ekstrak	52
D.2.1 Preparasi Ekstrak Uji.....	52
D.2.2 Pengujian Total Fenolik Ekstrak	53
D.2.3 Perhitungan Total Fenolik Ekstrak.....	53
D.3 Uji Statistik Total Fenolik Ekstrak	50
E. Uji Peredaman Radikal DPPH.....	55
E.1 Nilai IC ₅₀ Radikal DPPH	55
E.2 Uji Statistik Nilai IC ₅₀ Radikal DPPH.....	55
F. Uji Penghambatan Lipase	59

F.1 Nilai IC ₅₀ Penghambatan Lipase.....	59
F.2 Uji Statistik Nilai IC ₅₀ Penghambatan Lipase.....	62



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pola konsumsi masyarakat saat ini sudah berubah seiring dengan semakin banyaknya hidangan atau makanan siap saji. Komposisi dari makanan siap saji ini terlalu tinggi kalori, tinggi lemak, gula dan rendah serat menimbulkan ketidakseimbangan asupan gizi. Adanya modernisasi dengan gaya hidup *sedentary* (kurang gerak) dan pola makan yang tidak seimbang juga dapat mengarah pada timbulnya obesitas (Wiardani & Arsana, 2011)

Obesitas adalah suatu penyakit multifaktorial sebagai akibat dari energi yang masuk ke dalam tubuh lebih banyak daripada energi yang dikeluarkan oleh tubuh (Pradono *et al.*, 2008). Berdasarkan data Riskesdas prevalensi obesitas penduduk laki-laki dewasa pada tahun 2013 sebanyak 19,7%, lebih tinggi dari tahun 2007 (13,9%) dan tahun 2010 (7,8%). Sedangkan prevalensi obesitas perempuan dewasa (>18 tahun) tahun 2013 adalah 32,9%, naik 18,1% dari tahun 2007 (13,9%) dan 17,5% dari tahun 2010 (15,5%) (Riskesdas, 2013). Obesitas secara langsung dapat menjadi penyebab utama terjadinya hiperlipidemia, karena menghasilkan kolesterol endogen lebih dari orang normal (Kamso *et al.*, 2005)

Hiperlipidemia adalah situasi yang menunjukkan peningkatan lipid plasma darah, baik kolesterol atau triasilgliserol atau keduanya. Hiperlipidemia ditandai dengan total kolesterol darah > 240 mg/dL, dan atau tingkat triasilgliserol > 200 mg/dL. Hiperlipidemia dipengaruhi oleh obesitas, genetik, penyakit lain seperti diabetes melitus, usia dan juga asupan gizi yang sebagian besar mengandung asam lemak jenuh dalam jumlah tinggi (Kamso *et al.*, 2005). Lemak yang terdapat di dalam tubuh dihidrolisis pada usus halus. Apabila aktivitas lipase pankreas meningkat, maka akan meningkatkan penyerapan monoasilgliserol dan asam lemak

yang akan menyebabkan penimbunan lemak dalam tubuh. Oleh karena itu, aktivitas lipase pankreas harus dihambat agar penimbunan lemak tidak terjadi (Pradonno *et al.*, 2011)

Manifestasi klinis dari hiperlipidemia adalah terjadinya plak kolesterol pada pembuluh darah. Pada hiperlipidemia, kolesterol-LDL akan mengalami oksidasi dan ditangkap oleh *reseptor scavenger-A* (SRA) di makrofag. Jika penangkapan semakin banyak akan menjadi sel busa (*foam cell*). Sel busa yang menumpuk akan membentuk garis lemak (*fatty streak*) di dalam pembuluh darah sehingga menyebabkan penyumbatan pembuluh darah (Marks *et al.*, 2000). Proses oksidasi ini harus dihambat dengan antioksidan.

Akhir-akhir ini kecenderungan untuk kembali ke alam semakin meningkat termasuk dalam hal obat antihiperlipidemia. Hal ini didukung dengan banyaknya penelitian-penelitian mengenai tanaman obat, misalnya daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) yang masih satu famili dengan timo (famili Sterculiaceae) mengandung flavonoid dan steroid memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia (Darusman *et al.*, 2001). Rimpang bangle (*Zingiber purpureum*) mengandung flavonoid dan tanin memiliki aktivitas antihiperlipid sebagai lipase inhibitor (Iswantini *et al.*, 2003). Tanaman lain yang juga dapat menghambat kerja lipase adalah teh (*Thea sinensis*) diketahui mengandung saponin (Han *et al.*, 2005). Berdasarkan kandungan senyawa pada beberapa tanaman tersebut, maka diperkirakan bahwa tanaman yang mengandung flavonoid, steroid, tanin, atau saponin memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia.

Zat aktif yang terkandung dalam daun timo (*Kleinhovia hospita*) adalah saponin, cardenolin, bufadienol dan antraknon (Raflizar & Marice, 2009) scopoletin (Yuliana, 2013), flavonoid (kuersetin dan rutin), kaemferol, (Khare, 2007), dan alkaloid kuinolin pada kayu akar (Pasaribu *et al.*, 2013). Berdasarkan kandungan flavonoid dan saponinnya tanaman timo diharapkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antihiperlipidemia.

Senyawa kimia pada tanaman timo sangat beragam dan memiliki sifat kepolaran yang berbeda-beda diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Ekstraksi bertingkat dilakukan secara berturut-turut dimulai dengan pelarut nonpolar (n-heksana) dilanjutkan dengan pelarut semipolar (etil asetat) kemudian dilanjutkan dengan pelarut polar (metanol). Pada proses ekstraksi akan diperoleh ekstrak awal yang mengandung berturut-turut senyawa nonpolar, semipolar, dan polar (Hostettmann & Marston, 1995).

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah yang dapat diambil dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Bagaimana kandungan fenolik dan flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo?
3. Bagaimana aktivitas penghambatan lipase ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo?

1.3 Tujuan Penelitian

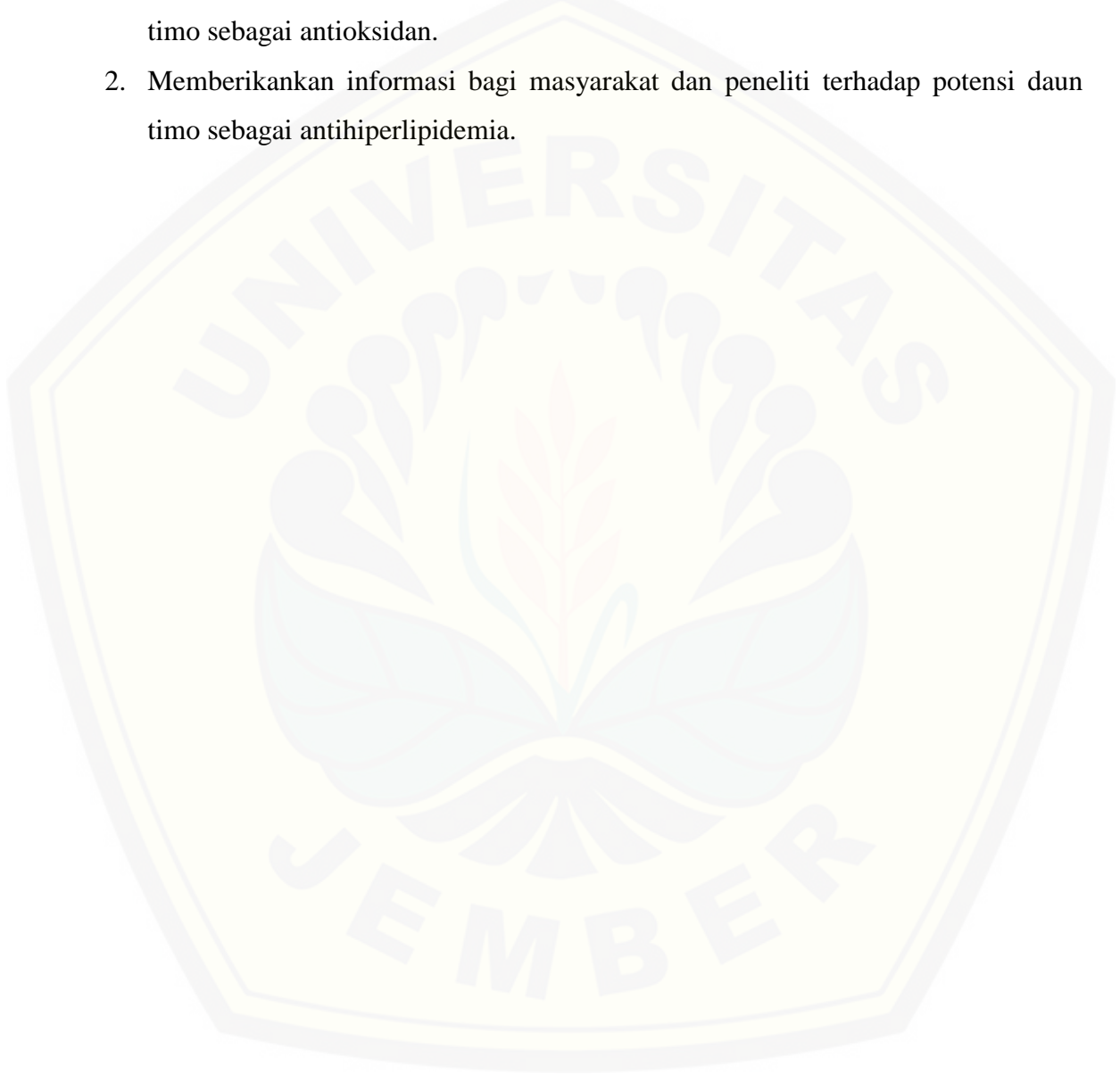
Tujuan dari penelitian yang akan dilakukan adalah untuk:

1. Untuk mengetahui kandungan fenolik dan flavonoid ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo.
2. Untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo.
3. Untuk mengetahui aktivitas penghambatan lipase ekstrak n-heksana, etil asetat, dan metanol daun timo.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi manfaat untuk:

1. Memberikankan informasi bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi daun timo sebagai antioksidan.
2. Memberikankan informasi bagi masyarakat dan peneliti terhadap potensi daun timo sebagai antihiperlipidemia.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Deskripsi Tanaman Timo

Menurut Plantamor (2012), taksonomi timo adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Super Divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub Kelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Kleinhovia</i>
Spesies	: <i>Kleinhovia hospita</i> Linn

Timo dapat tumbuh lebat dan tinggi sampai 20 m, dengan kanopi membulat padat dan bunga merah muda. Daun sederhana dan stipula ensiform linier, sekitar 8 mm; petiola 2,5-30 cm; daun-lancip bulat telur/membentuk jantung, rata di kedua sisi, dengan ujung runcing. Jari-jari tulang daun sekunder 6-8 pasang. Bunga terminal, dalam malai longgar menonjol dari mahkota; lebar bunga sekitar 5 mm, berwarna merah muda pucat, berbunga sepanjang tahun. Tanaman ini mulai berbuah setelah tahun ketiga penanaman. Buah bulat, 5-lobus, berdinding tipis, kapsul membran 2-2.5 cm, masing-masing memiliki 1-2 biji locul. Biji bulat, berwarna keputihan (Hanum, 1997). Morfologi tanaman timo seperti yang terlihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2. 1 Morfologi timo: 1) Daun; 2) Inflorescence; 3) Bunga; 4) Bunga tanpa sepal dan petal; 5) Cabang buah; 6) Biji (Sumber: Hanum,1997)

Zat aktif yang terkandung dalam daun timo adalah saponin, cardenolin, bufadienol dan antraknon (Raflizar *et al.*, 2006) scopoletin (Yuliana, 2013), flavonoid (kuersetin dan rutin), kaemferol, (Khare, 2007), dan alkaloid kuinolin pada kayu akar (Pasaribu *et al.*, 2013).

Kandungan senyawa kimia dalam tanaman timo memiliki persamaan dengan tanaman yang memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia lain misalnya daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia*) yang masih satu famili dengan timo (famili Sterculiaceae) mengandung flavonoid dan steroid (Darusman *et al.*, 2001). Rimpang bangle (*Zingiber purpureum*) mengandung flavonoid dan tanin (Iswantini *et al.*, 2003). Tanaman lain yang juga daun teh oolong (*Thea sinensis*) diketahui mengandung saponin (Han *et al.*, 2005). Berdasarkan kandungan flavonoid dan saponinnya tanaman timo diharapkan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antihiperlipidemia.

2.2 Senyawa Metabolit Sekunder

Setiap tumbuhan diyakini memiliki kemampuan merekayasa beranekaragam senyawa kimia (metabolit sekunder) yang mempunyai berbagai bioaktivitas dan efek terapeutik tertentu. Kemampuan tersebut salah satunya akibat mekanisme pertahanan diri terhadap ancaman lingkungan, baik faktor iklim maupun gangguan herbivora, serangga dan hama penyakit (Achmad & Syamsul, 2004).

Dalam penelitian ini senyawa metabolit sekunder yang diperkirakan memiliki aktivitas sebagai antihiperlipid dengan mekanisme lipase inhibitor adalah senyawa fenolik (terutama flavonoid). Berikut adalah penjelasannya:

1. Senyawa Fenolik

Fenolik merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Fenolik memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksi (OH) dan gugus lain penyertanya. Senyawa ini diberi nama berdasarkan nama senyawa induknya, yakni fenol. Sebagian besar senyawa fenol memiliki gugus hidroksi lebih dari satu sehingga disebut polifenol (Indrawati & Razimin, 2013).

Komponen fenolik merupakan kelompok molekul yang besar dan beragam, terdiri dari golongan aromatik pada metabolit sekunder tumbuh-tumbuhan. Fenolik dapat diklasifikasikan ke dalam komponen yang tidak larut seperti lignin dan komponen yang larut seperti asam fenolik, fenilpropanoid, flavonoid dan kuinon (Indrawati & Razimin, 2013).

Setiap tumbuh-tumbuhan memiliki struktur komponen fenolik yang berbeda. Ada komponen fenolik yang memiliki gugus OH banyak dan ada juga komponen fenolik yang memiliki gugus OH dalam jumlah sedikit. Gugus OH berperan dalam proses transfer elektron, untuk menstabilkan dan meredam radikal bebas. Beberapa penelitian mengatakan bahwa senyawa fenolik telah diketahui memiliki berbagai efek biologi, seperti memiliki aktivitas antioksidan melalui mekanisme mereduksi, menangkap radikal bebas, mengkelat logam, meredam terbentuknya oksigen tunggal, serta mendonor elektron (Indrawati & Razimin, 2013).

2. Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenol alam terbesar yang ditemukan dalam semua tumbuhan berpembuluh (buah dan sayuran). Biasanya, satu jenis tumbuhan mengandung beberapa macam flavonoid dan hampir setiap jenis tumbuhan memiliki profil flavonoid yang khas. Menurut strukturnya, semua flavonoid merupakan turunan senyawa induk flavon yang memiliki sejumlah sifat yang sama. Aglikon flavonoid pada tumbuhan terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semua mengandung atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆, yaitu cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Indrawati & Razimin, 2013).

Dari beberapa penelitian diketahui bahwa senyawa flavonoid memiliki berbagai aktivitas biologi, seperti aktivitas antikanker, antiviral, anti-inflamasi, mengurangi risiko penyakit kardiovaskulas, serta penangkap radikal bebas. Kekuatan aktivitas antioksidan senyawa flavonoid tergantung pada jumlah dan posisi dari gugus OH dalam molekul flavonoid. Semakin banyak gugus OH dalam molekul flavonoid maka aktivitas antiradikalnya semakin tinggi. Gugus orto-katekol (3,4-OH) pada cincin β -flavonoid menjadi faktor penentu tingginya kapasitas antioksidan (Indrawati & Razimin, 2013).

2.3 Antioksidan

Saat ini dunia kesehatan banyak membahas tentang radikal bebas. Radikal bebas merupakan suatu senyawa asing yang masuk ke dalam tubuh dan merusak sistem imunitas tubuh. Radikal bebas tersebut dapat timbul akibat berbagai proses kimia yang kompleks dalam tubuh, polutan lingkungan, radiasi zat-zat kimia, racun, makanan cepat saji, dan makanan yang digoreng pada suhu tinggi. Jika jumlahnya berlebih, radikal bebas akan memicu efek patologis (Selawa *et al.*, 2013).

Radikal bebas atau yang biasa disebut dengan reaksi oksidasi yang berlebih dapat menyerang apa saja terutama yang rentan seperti lipid, protein dan berimplikasi pada timbulnya berbagai penyakit degeneratif (Selawa *et al.*, 2013). Hal ini terjadi karena sebagian besar penyakit diawali oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh (Winarsi, 2007). Oksidasi merupakan proses yang menyebabkan atom mengalami peningkatan jumlah ikatan dengan oksigen atau penurunan jumlah ikatan dengan hydrogen atau kehilangan elektron (Cairns, 2003).

Reaksi oksidasi biasanya menyebabkan kerusakan oksidatif. Akibatnya, terjadi kerusakan atau kematian sel. Hal ini terjadi karena senyawa radikal bebas mengoksidasi dan menyerang komponen lipid membran sel. Jadi, kerusakan oksidatif berkaitan erat dengan reaksi oksidasi lipid membran. Oksidasi lipid terjadi melalui 3 tahapan, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Reaksi inisiasi terjadi diantara asam lemak tidak jenuh misalnya asam linoleat dengan radikan hidroksil (Winarsi, 2007).

Reaksi oksidasi ini terjadi setiap saat. Reaksi ini menyebabkan terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif, yang dapat merusak struktur serta fungsi sel. Namun reaksi radikal bebas ini dapat dihambat oleh system antioksidan yang melengkapi system kekebalan tubuh (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah zat yang dapat menetralsir radikal bebas, sehingga atom dan elektron yang tidak berpasangan mendapat pasangan elektron dan menjadi stabil atau tidak radikal (Tapan, 2005). Tubuh memiliki antioksidan untuk membatasi kerusakan. Contohnya adalah vitamin E, vitamin C, sistein, glutation dan lain-lain (Youngson, 1998).

2.4 Lemak

Lemak merupakan salah satu sumber energi. Lemak digunakan untuk mengangkut vitamin, memproduksi hormon, menyusun dinding sel, melindungi organ tubuh dan melumasi organ tubuh yang bergerak. Sebagian besar lemak dalam tubuh berbentuk trigliserida atau triasilgliserol.

Triasilgliserol adalah bentuk utama dari lemak makanan yang kita konsumsi. Sebuah molekul triasilgliserol terdiri dari tiga asam lemak yang mengalami esterifikasi pada sebuah gugus gliserol. Triasilgliserol dalam tubuh disimpan dalam jaringan adipose dan nantinya akan diubah menjadi energi yang mengandung kalori lebih banyak daripada karbohidrat atau protein, yaitu 9 kkal/gram (Marks *et al.*, 2000)

2.5 Metabolisme Lemak

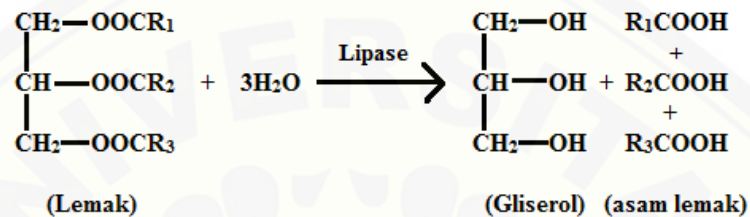
Lemak makanan meninggalkan lambung dan masuk ke dalam usus halus, untuk menjalani emulsifikasi oleh garam-garam empedu yang disekresikan ke dalam lumen usus. Kontraksi kandung empedu dan sekresi enzim pankreas dirangsang oleh hormon usus kolesistokinin. Garam empedu berfungsi sebagai surfaktan yang mengikat butiran-butiran lemak makanan pada saat terjadi pemecahan oleh kerja peristaltik. Lemak yang mengalami emulsifikasi ini diserang oleh enzim pencernaan dari pankreas (Marks *et al.*, 2000)

Metabolisme lemak terjadi di dalam usus halus dengan bantuan enzim hidrolitik, yaitu lipase yang mencerna triasilgliserol dan fosfolipase yang mencerna fosfolipid. Ikatan ester antara asam lemak dan gliserol dihidrolisis dan akhirnya akan menghasilkan 2-monoasilgliserol dan 2 macam asam lemak. Fosfolipase menghidrolisis satu ikatan ester antara asam lemak dan gliserol. Fosfolipase A₁ pada posisi 1 rantai karbon gliserol dan Fosfolipase A₂ pada posisi 2 rantai karbon gliserol (Kuchel & Gregory, 2006).

Enzim lipase dihasilkan oleh kelenjar pankreas dan didistribusikan ke usus dua belas jari (*duodenum*). Enzim lipase juga dihasilkan oleh lambung, tetapi jumlahnya sangat sedikit. Mekanisme kerja enzim lipase dapat dilihat pada Gambar 2.2.

Enzim lipase memecah molekul lipid menjadi asam lemak dan gliserol yang memiliki molekul lebih sederhana dan lebih kecil. Asam lemak dan gliserol tidak

larut dalam air, sehingga pengangkutannya dilakukan oleh cairan getah bening (Nigam & Archana, 2008). Semakin tinggi aktivitas lipase maka akan semakin banyak pula asam lemak dan gliserol yang dapat diserap. Sehingga akan menyebabkan penimbunan lemak di dalam tubuh. Oleh karena itu aktivitas lipase pankreas harus dihambat agar tidak terjadi penimbunan lemak (Pradono *et al.*, 2011).



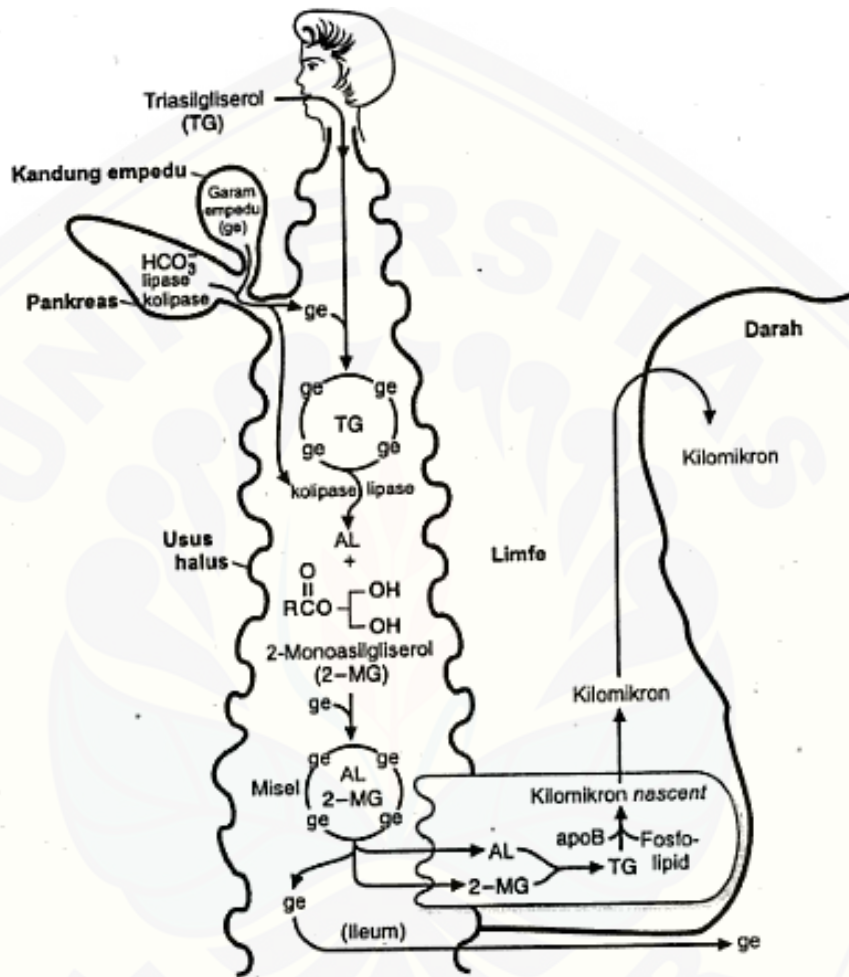
Gambar 2. 2 Mekanisme kerja enzim lipase (Sumber: Nigam & Archana, 2008)

Enzim lipase pencernaan disekresikan ke dalam lumen usus halus dan bercampur dengan permukaan butiran-butiran lemak yang besar, menghasilkan produk awal yaitu asam lemak dan lisofosfoliserida. Dua senyawa ini akan mempercepat proses pencernaan karena dapat mendispersikan butiran-butiran lemak besar menjadi lebih kecil dalam jumlah yang banyak. Dengan meningkatnya konsentrasi asam lemak dan dengan dihasilkannya 2-monoasilgliserol, senyawa ini dimasukkan ke dalam misel pada garam empedu (Kuchel & Gregory, 2006).

Asam lemak yang mempunyai panjang karbon sama dengan atau lebih dari 14 berdifusi secara pasif ke dalam sel epitel usus. Masuknya asam lemak ke dalam sel segera diikuti dengan pengikatan asam lemak ke protein pengikat, yang mempunyai afinitas tinggi terhadap asam lemak rantai panjang. Secara bersamaan 2-monoasilgliserol dan asam lemak berdifusi secara pasif ke dalam sel epitel, kemudian dengan cepat diubah menjadi triasilgliserol (Kuchel & Gregory, 2006).

Triasilgliserol yang baru disintesis tersusun menjadi kilomikron (lipoprotein utama dalam sirkulasi darah), yang disekresikan oleh sel epitel ke dalam pembuluh darah limfa kecil di dalam usus halus. Kemudian, kilomikron melewati pembuluh limfe yang selanjutnya masuk ke dalam darah dan membantu pengangkutan lipid ke

berbagai jaringan tubuh (Kuchel & Gregory, 2006). Metabolism lemak dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Jalur metabolisme lemak (Sumber: Marks *et al.*, 2000)

2.6 Metabolisme Lipoprotein

Metabolisme lipoprotein dibagi atas tiga jalur yaitu jalur metabolisme eksogen, endogen, dan jalur *reverse cholesterol transport*. Berikut adalah penjelasannya:

1. Jalur Metabolisme Eksogen.

Makanan yang kita konsumsi biasanya mengandung triasilgliserol dan kolesterol. Selain itu, kolesterol juga dapat berasal dari hati yang diekskresikan bersama empedu ke usus halus. Baik lemak yang berasal dari makanan maupun yang berasal dari hati disebut lemak eksogen (Adam, 2005).

2. Jalur Metabolisme Endogen

Triasilgliserol dan kolesterol yang disintesis di hati dan disekresi ke dalam sirkulasi sebagai lipoprotein yaitu *very low density lipoprotein* (VLDL). Triasilgliserol dalam VLDL akan mengalami hidrolisis oleh enzim *lipoprotein lipase* (LPL), dan VLDL berubah menjadi *intermediate density lipoprotein* (IDL) yang juga akan mengalami hidrolisis dan berubah menjadi *low density lipoprotein* (LDL). Sebagian dari VLDL, IDL, dan LDL akan mengangkut kolesterol ester kembali ke hati. LDL adalah lipoprotein yang paling banyak mengandung kolesterol.

Sebagian dari kolesterol dalam LDL akan dibawa ke hati dan jaringan steroidogenik lainnya seperti kelenjar adrenal, testis, dan ovarium yang mempunyai reseptor untuk kolesterol-LDL. Sebagian lagi dari kolesterol-LDL akan mengalami oksidasi dan ditangkap oleh *reseptor scavenger* di makrofag fagositik. Keberadaan *reseptor scavenger* secara terus menerus di membran sel memungkinkan sel menyerap LDL yang mengalami kerusakan oksidatif. Makin banyak kadar kolesterol-LDL dalam plasma makin banyak yang akan mengalami oksidasi dan ditangkap oleh sel makrofag. Apabila timbunan lemak telah memenuhi makrofag maka akan menjadi sel busa (*foam cell*). Penimbunan sel busa pada pembuluh darah merupakan awal adanya pertumbuhan plak aterosklerosis yang dikenal sebagai garis lemak (*fatty streak*). Proses oksidasi LDL dapat dihambat dengan antioksidan, misalnya vitamin C, vitamin E, karotenoid yang mungkin berperan melindungi LDL dari oksidasi (Marks *et al.*, 2000). Jumlah kolesterol yang akan teroksidasi tergantung dari kadar kolesterol yang terikat pada LDL. Keadaan yang mempengaruhi tingkat oksidasi diantaranya:

- a. Meningkatnya jumlah LDL kecil padat (*small dense LDL*) seperti pada sindrom metabolik dan diabetes mellitus
 - b. kadar kolesterol-HDL, makin tinggi kadar kolesterol-HDL akan bersifat protektif terhadap oksidasi LDL (Adam, 2005).
3. Jalur *reverse cholesterol transport*

HDL berasal dari usus halus dan hati, berbentuk gepeng dan memiliki sedikit sekali kolesterol. HDL ini disebut dengan HDL *Nascent* (HDL muda). HDL *Nascent* akan mendekati makrofag untuk mengambil kolesterol yang ada dalam makrofag. Setelah itu, HDL *Nascent* akan berkembang dan berbentuk bulat menjadi HDL dewasa. Kolesterol bebas yang diambil dari makrofag akan diesterifikasi oleh *enzim lecithin cholesterol acyltransferase* (LCAT) menjadi kolesterol ester. HDL yang membawa kolesterol ester tersebut mengambil dua jalur. Jalur pertama langsung masuk ke hepar, sedangkan jalur kedua, kolesterol ester yang dibawa oleh HDL ditukar dengan trigliserid dari VLDL dan IDL dengan bantuan *cholesterol ester transfer protein* (CETP), lalu trigliserid tersebut masuk ke hepar. Secara keseluruhan, fungsi dari HDL adalah menyerap kolesterol dari makrofag untuk dikembalikan ke hepar (Adam, 2006).

2.7 Hiperlipidemia

Hiperlipidemia adalah suatu kondisi dimana kadar lipid darah melebihi jumlah normal. Hiperlipidemia disebut juga peningkatan lemak dalam darah dan karena sering disertai beberapa fraksi lipoprotein, sehingga disebut juga hiperlipoprotein. Hiperlipidemia dibagi menjadi dua yaitu: hiperkolesterolemia dan hipertriasilgliserol (Samitra *et al.*, 2013).

Menurut penyebabnya, hiperlipidemia diklasifikasikan menjadi dua yaitu:

1. Hiperlipidemia primer adalah hiperlipidemia yang disebabkan oleh kelainan genetik. Biasanya kelainan ini tidak memberikan gejala atau keluhan.

Berdasarkan fenotip lipoproteinnya, hiperlipidemia primer dibedakan menjadi beberapa tipe, yaitu:

a. Monogenik, meliputi:

- 1) Mutasi apolipoprotein
 - a) Defisiensi apoprotein C-II
 - b) Disbetalipoproteinemia
- 2) Mutasi reseptor, bersifat dominan
 - a) Hiperkolesterolemia familial
- 3) Mutasi enzim, bersifat resesif
 - a) Defisiensi lipoprotein lipase
 - b) Defisiensi '*lecitine-kolesterol asiltransferase (LCAT)*'

b. Kemungkinan monogenik, meliputi:

- 1) Hipertrigliseridemia
- 2) Hiperlipoproteinemia multiple familial

c. Poligenik atau sporadik

- 1) Hiperkolesterolemia
- 2) Hipertrigliseridemia

2. Hiperlipidemia sekunder adalah peningkatan kadar lipid darah yang disebabkan oleh penyakit tertentu. Misalnya diabetes melitus, gangguan tiroid, penyakit hepar dan penyakit ginjal. Kelainan ini bersifat reversibel, jika penyakit primer sembuh. Hiperlipidemia sekunder juga dapat disebabkan oleh obat-obatan seperti β -blocker, diuretik, estrogen dan gestagen. (Rahardjo, 2009)

2.8 Obat Antihiperlipidemia

Obat antihiperlipid menurut Rifkind (1991), Aschenbrenner & Samantha (2009) yaitu:

1. Azetimibe

Diberikan pada pasien dengan kadar LDL > 190 mg/dL. Merupakan pilihan pertama untuk terapi hiperlipidemia. Bekerja dengan menghambat absorpsi kolesterol dalam *brush border* usus halus, sehingga kolesterol yang masuk ke hepar menurun, cadangan kolesterol hepar turun dan klirens plasmanya meningkat.

2. Statin

Diberikan pada pasien dengan kadar LDL > 190 mg/dL. Bekerja dengan menghambat kerja dari HMG CoA Reduktase sehingga menurunkan sintesis triasilgliserol dan VLDL. Memiliki efek samping hepatotoksik dan miopati. Obat ini tidak boleh diberikan kepada ibu hamil dan menyusui
Contoh obat: simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, dan lovastatin.

3. Resin

Diberikan pada pasien dengan kadar LDL > 190 mg/dL. Bekerja dengan mengikat asam empedu sehingga sintesis kolesterol dapat menurun. Memiliki efek samping terdapat saluran pencernaan (mual dan muntah), menurunkan absorpsi vitamin larut lemak, asam folat, dan asam askorbat. Tidak boleh diberikan pada pasien trigliceremia.

Contoh obat: kolestiramin, kolestipol, dan kolesevelam.

4. Fibrat

Diberikan pada pasien dengan kadar LDL > 190 mg/dL. Bekerja dengan meningkatkan aktivitas lipoprotein lipase sehingga menurunkan kadar triasilgliserol plasma dan VLDL. Memiliki efek samping mual dan diare. Tidak boleh diberikan pada pasien disfungsi hepar, pasien gagal ginjal, anak-anak dan ibu hamil.

Contoh obat: gemfibrozil, benzafibrat, klofibrat, dan fenofibrat.

5. Niasin

Diberikan pada pasien dengan kadar LDL > 190 mg/dL. Bekerja dengan menurunkan sintesis triasilgliserol dan VLDL hepar, sehingga klirens LDL meningkat dan kadar LDL menurun. Memiliki efek samping menurunkan tekanan darah, dyspepsia, pruritus, hiperglikemia, hiperurisemia, dan hepatotoksik. Tidak boleh diberikan pada pasien diabetes mellitus yang memburuk, *peptic ulcer*, gout dan ibu hamil.

6. Minyak ikan

Diberikan sebagai suplemen pasien hipertriasilgliserol. Bekerja dengan menghambat lipogenesis, meningkatkan oksidasi asam lemak sehingga menurunkan jumlah triasilgliserol

7. Sibutramine

Bekerja dengan menghambat ambilan kembali norepinefrin, serotonin dan dopamine. Sehingga menimbulkan rasa kenyang dan meningkatkan kecepatan metabolisme (angka metabolisme basal). Memiliki efek samping menyebabkan mulut kering, anoreksia, insomnia, konstipasi, serta menyebabkan tekanan darah dan denyut nadi sedikit meningkat. Sibutramine tidak boleh diberikan pada pasien hipertensi, gagal jantung kronik, stroke, aritmia, *psikiatri illness* (karena adanya penurunan dopamine)

8. Orlistat

Digunakan pada pasien dengan BMI lebih dari 30 kg/m² atau pada pasien dengan BMI lebih dari 27 kg/m² yang memiliki resiko penyakit jantung. Bekerja dengan menghambat aktivitas lipase baik yang berasal dari lambung maupun pankreas. Orlistat diberikan dengan dosis 120 mg sebanyak tiga kali sehari, dan dapat menghambat absorpsi lemak hingga 30%. Memiliki efek samping ringan dan sementara terhadap saluran cerna, dan penurunan absorpsi vitamin larut lemak. Efek lainnya adalah flatus disertai dengan feses, feses berlemak atau

berminyak. Tidak boleh digunakan pada pasien kolestasis (sindrom malabsorpsi kronis).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental laboratories*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan fenolik, flavonoid, aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH, dan aktivitas antihiperlipidemia dengan metode penghambatan lipase *in vitro* dari ekstrak daun timo.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Oktober 2014 sampai Oktober 2015 di CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember.

3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

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

2. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini antara lain: metode ekstraksi, waktu ekstraksi, jenis pelarut, metode penentuan total fenolik, metode penentuan total flavonoid, metode uji aktivitas antioksidan, dan metode uji aktivitas inhibisi lipase.

3. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah total fenolik, total flavonoid, aktivitas antioksidan, dan aktivitas penghambatan lipase.

3.4 Rancangan Penelitian

3.4.1 Definisi Operasional

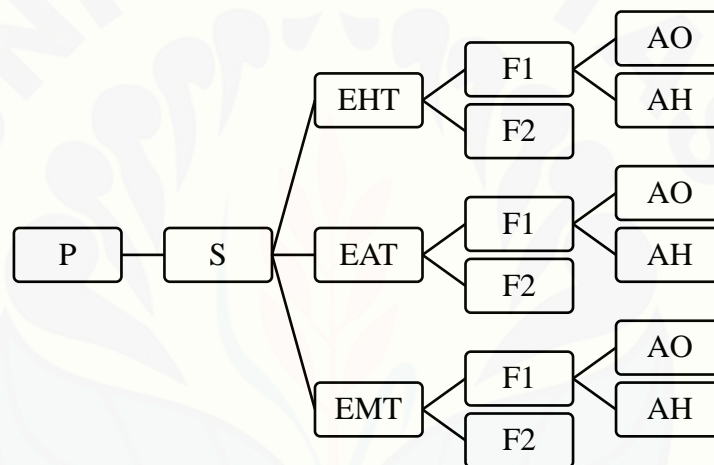
Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu:

1. Daun timo yang digunakan berasal dari Taman Nasional Meru Betiri dan dipanen pada bulan Oktober 2014 dan sudah divalidasi oleh Balai Taman Nasional Meru Betiri dengan surat Nomor: BA.1271/BTNMB-1/2015
2. Tumbuhan timo dipilih yang sudah besar dan berbunga, kemudian daun timo yang digunakan diambil secara acak tanpa membedakan daun muda dan daun tua.
3. Ekstraksi menggunakan metode maserasi bertingkat dengan perbedaan kepolaran pelarut.
4. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah n-heksana, etil asetat, dan metanol.
5. Analisis kadar fenolik menggunakan *Folin-Ciocalteu* 50% dan Na_2CO_3 dengan standar asam galat.
6. Kadar fenolik diukur dalam mg *Galic Acid Equivalent* (GAE) per gram ekstrak.
7. Analisis kadar flavonoid menggunakan Na_2NO_2 dan Na_2CO_3 dengan standar kuersetin.
8. Kadar flavonoid diukur dalam mg *Quercetin Equivalent* (QE) per gram ekstrak.
9. Konsentrasi uji untuk uji aktivitas antioksidan berdasarkan kadar fenoliknya.
10. Uji aktivitas antoksidan menggunakan metode DPPH dengan kontrol positif asam askorbat
11. Uji inhibisi lipase menggunakan enzim lipase dari bakteri, substrat ρ -NPB (ρ -nitrofenil butirat) dengan kontrol positif orlistat.
12. Blangko uji adalah semua bahan uji tanpa sampel, keberadaan sampel diganti dengan pelarutnya.
13. Blangko sampel adalah sampel uji ditambah dengan pelarut hingga sama dengan volume pengujian.

3.4.2 Rancangan Percobaan

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas inhibisi enzim lipase pada tanaman timo. Tahap awal penelitian dilakukan ekstraksi menggunakan tiga pelarut yang berbeda kepolarannya yaitu n-heksana, etil asetat, dan metanol. Kemudian dilakukan pengukuran kadar fenolik dan flavonoid. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode peredaman DPPH dan uji aktivitas antihiperlipidemia dengan metode penghambatan lipase *in vitro*.

Diagram rancangan percobaan dapat dilihat pada Gambar 3.1.



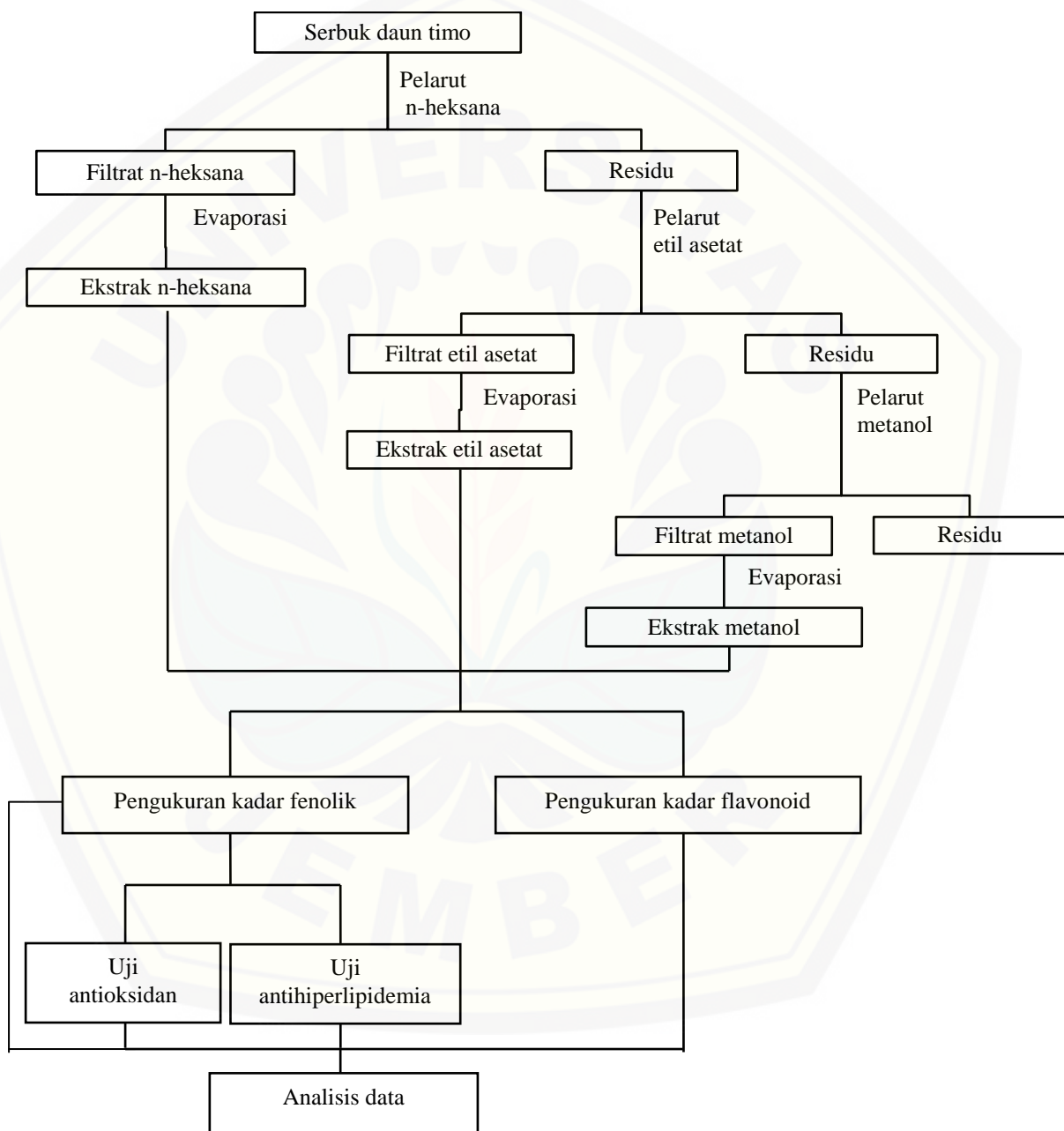
Gambar 3. 1 Diagram rancangan percobaan

Keterangan:

- P : Populasi tumbuhan timo
- S : Sampel daun timo
- EHT : Ekstrak n-heksana daun timo
- EAT : Ekstrak etilasetat daun timo
- EMT : Ekstrak metanol daun timo
- F1 : Uji kadar fenolik
- F2 : Uji kadar flavonoid
- AO : Uji aktivitas antioksidan
- AH : Uji aktivitas antihiperlipidemia

3.4.3 Alur Penelitian

Alur penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.2.



Gambar 3. 2 Alur penelitian

3.5 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah alat-alat gelas, timbangan analitik, *vacuum evaporator* (Steroglass Strike300), mikro pipet, inkubator (Stuart SBS40), satu set alat spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-2900), *shaker* (Stuart SSL1), dan sentrifugator (Hitachi CF15RXII).

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: daun timo (*Kleinhovia hospita*); n-heksana (Merck); etil asetat (Merck); metanol (Merck); reagen *Folin-Ciocalteu* (Merck); natrium karbonat (Brataco); asam galat (Sigma-Aldrich); natrium nitrit (Brataco); Aluminium (III) klorida (Merck); natrium hidroksida (Merck); *quercetin* (nacalai tasque); *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) (nacalai tasque); etanol (Merck); asam askorbat (nacalai tasque); ρ -NPB (Sigma-Aldrich), natrium asetat (Merck); Triton X-100 (Merck); asam asetat (Merck); aseton (Merck); orlistat (Roche S. p. A. Milan), *lipase porcine pancreas* (Sigma-Aldrich).

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Perlakuan Awal Sampel

Sampel daun timo yang diambil dari Taman Nasional Meru Betiri disortir dan dibersihkan dari kotoran-kotoran. Kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena sinar matahari langsung hingga diperoleh dalam bentuk simplisia kering. Simplisia daun timo diserbuk dan diayak.

3.6.2 Ekstraksi

Ekstraksi daun timo dilakukan dengan metode maserasi bertingkat. Ekstraksi dilakukan menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu heksana, etil asetat, dan metanol. Serbuk daun timo sebanyak 50 gram dimasukkan

ke dalam erlenmeyer 500 mL. Ditambahkan 250 mL pelarut ke dalam erlenmeyer dan digojog menggunakan *shaker* selama 3 x 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu difiltrasi dengan corong *buchner* dan dilanjutkan dengan evaporasi dengan evaporator vakum pada suhu 40° C. Pelarut yang digunakan berturut-turut adalah n-heksana, etil asetat, metanol. Ekstrak yang didapat disimpan dalam lemari pendingin untuk keperluan berikutnya.

3.6.3 Analisis Kandungan Total Fenolik dan Flavonoid

Konsentrasi total senyawa fenolik ditentukan berdasarkan metode Taga *et al.* (1984) dan dihitung berdasarkan standar asam galat. Sampel ekstrak sebanyak 50 mg dilarutkan dalam metanol p.a sampai 10 mL. Larutan ekstrak sebanyak 50 µL ditambahkan ke dalam 1 mL Na₂CO₃ 2% (b/v). Setelah didiamkan selama 2 menit, ditambahkan 50 µL reagen *Folin-Ciocalteu* 50% (v/v) ke dalam campuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Diukur absorbansi larutan dengan spektrofotometer UV-Vis pada 750 nm. Total fenolik masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg *gallic acid equivalent* (GAE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar *gallic acid*. Pengujian dilakukan dengan replikasi 3 kali.

Kandungan total flavonoid ditentukan berdasarkan metode kolorimetri yang mengacu pada Chang *et al.* (2002). Larutan ekstrak sebanyak 150 µL dilarutkan dalam 400 µL aquades. Larutan ini ditambahkan dengan 30 µL NaNO₂ 5% (b/v) dan 30 µL AlCl₃ 10% (v/v). Setelah 6 menit, 200 µL NaOH 1 M dan 240 µL aquades ditambahkan ke dalam campuran. Ditentukan absorbansinya pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Total flavonoid masing-masing ekstrak ditentukan dalam mg *quercetin equivalent* (QE) per gram ekstrak menggunakan persamaan dari kurva standar kuersetin. Pengujian dilakukan dengan replikasi 3 kali.

3.6.4 Analisis Penangkapan Radikal DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak timo terhadap radikal *1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil* (DPPH) mengacu pada Goncalves *et al.* (2014). Larutan DPPH 90 μM dalam metanol sebagai larutan persediaan. Larutan DPPH 250 μL , ditambahkan dengan 50 μL larutan ekstrak dengan rentang konsentrasi berdasarkan total fenolik tertentu. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap. Absorbansi larutan diukur pada 515 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Persentase penangkapan radikal DPPH dihitung menggunakan Persamaan 3.1.

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = \left[1 - \frac{A1}{A0} \right] \times 100\% \quad (3.1)$$

A0 adalah nilai absorbansi kontrol dan A1 adalah nilai absorbansi sampel. Nilai prosentase penangkapan radikal DPPH yang diperoleh untuk semua konsentrasi digunakan untuk membuat kurva. Prosentase penangkapan radikal DPPH sebagai sumbu y dan konsentrasinya sebagai sumbu x. Kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal DPPH dinyatakan dalam IC_{50} , yaitu konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH dengan Persamaan 3.2.

$$\text{IC}_{50} = 10^{\left(\frac{y-a}{b}\right)} \quad (3.2)$$

Nilai a dan b diperoleh dari persamaan kurva, $y = bx + a$. Asam askorbat digunakan sebagai kontrol positif metode. Pengujian dilakukan dengan replikasi 3 kali.

3.6.5 Pengujian Penghambatan Lipase

Pengujian penghambatan lipase mengacu pada Nakaku (2002) meliputi beberapa tahap mulai dari preparasi substrat hingga perhitung presentase hambatan. Preparasi substrat dimulai dengan ditimbang 1,61 mg ρ -NPB, dimasukkan dalam erlenmeyer 100 mL. Kemudian ditambahkan 10 mL Triton X-100 4% (dalam buffer), dihangatkan pada suhu 60 $^{\circ}\text{C}$ sampai jernih (± 2 menit). Selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer asam asetat 1M (pH 5,61), diinkubasi pada suhu ruang

selama 5 menit. Ditambahkan 8 mL akuades. Substrat ini dapat disimpan pada suhu 20-30 °C.

Pengujian inhibisi lipase selanjutnya diambil 425 µL substrat, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 5 menit. Ditambahkan 50 µL sampel uji berdasarkan total fenolik atau blanko (buffer) dan sebagai kontrol positif digunakan orlistat. Ditambahkan 100 µL enzim, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Ditambahkan 1 mL aseton untuk menghentikan reaksi. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 412 nm. Pengujian dilakukan dengan replikasi 3 kali.

Persentase penghambatan lipase dapat dihitung dengan Persamaan 3.3.

$$\text{Penghambatan lipase (\%)} = \frac{(A_{\text{blanko}} - A_{\text{uji}})}{A_{\text{blanko}}} \times 100\% \quad (3.3)$$

Keterangan:

A blanko = absorbansi pengujian tanpa sampel uji

A uji = absorbansi pengujian dengan sampel uji

Kemampuan ekstrak total fenolik dalam menghambat aktivitas lipase dinyatakan dalam IC₅₀, yaitu konsentrasi ekstrak total fenolik yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas lipase dengan Persamaan 3.4.

$$IC_{50} = \frac{50-a}{b} \quad (3.4)$$

Nilai a dan b diperoleh dari persamaan kurva, $y = bx + a$. Orlistat digunakan sebagai kontrol positif metode.

3.6.6 Analisis Data

Semua data hasil analisis diuji normalitas dan homogenitasnya. Hasil pengujian menunjukkan sebaran data normal dan homogen ($p > 0,05$). Selanjutnya diuji dengan *One Way ANOVA* untuk menentukan perbedaan rata-rata aktivitas dan untuk mengetahui variabel mana yang memiliki perbedaan, dapat dilanjutkan menggunakan uji LSD (*least significant different*) berdasarkan nilai signifikansi $p <$

0,05 dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Untuk menentukan perbedaan rata-rata aktivitas uji penghambatan lipase dilanjutkan dengan uji T.

