



**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOLIK DAUN KEPUH
(*Sterculia foetida*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
SERUM TIKUS YANG DIINDUKSI DIET TINGGI LEMAK**

SKRIPSI

Oleh

Terryda Ayu Permatasari

NIM 132210101059

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017



**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOLIK DAUN KEPUH
(*Sterculia foetida*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
SERUM TIKUS YANG DIINDUKSI DIET TINGGI LEMAK**

SKRIPSI

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

Oleh

Terryda Ayu Permatasari

NIM 132210101059

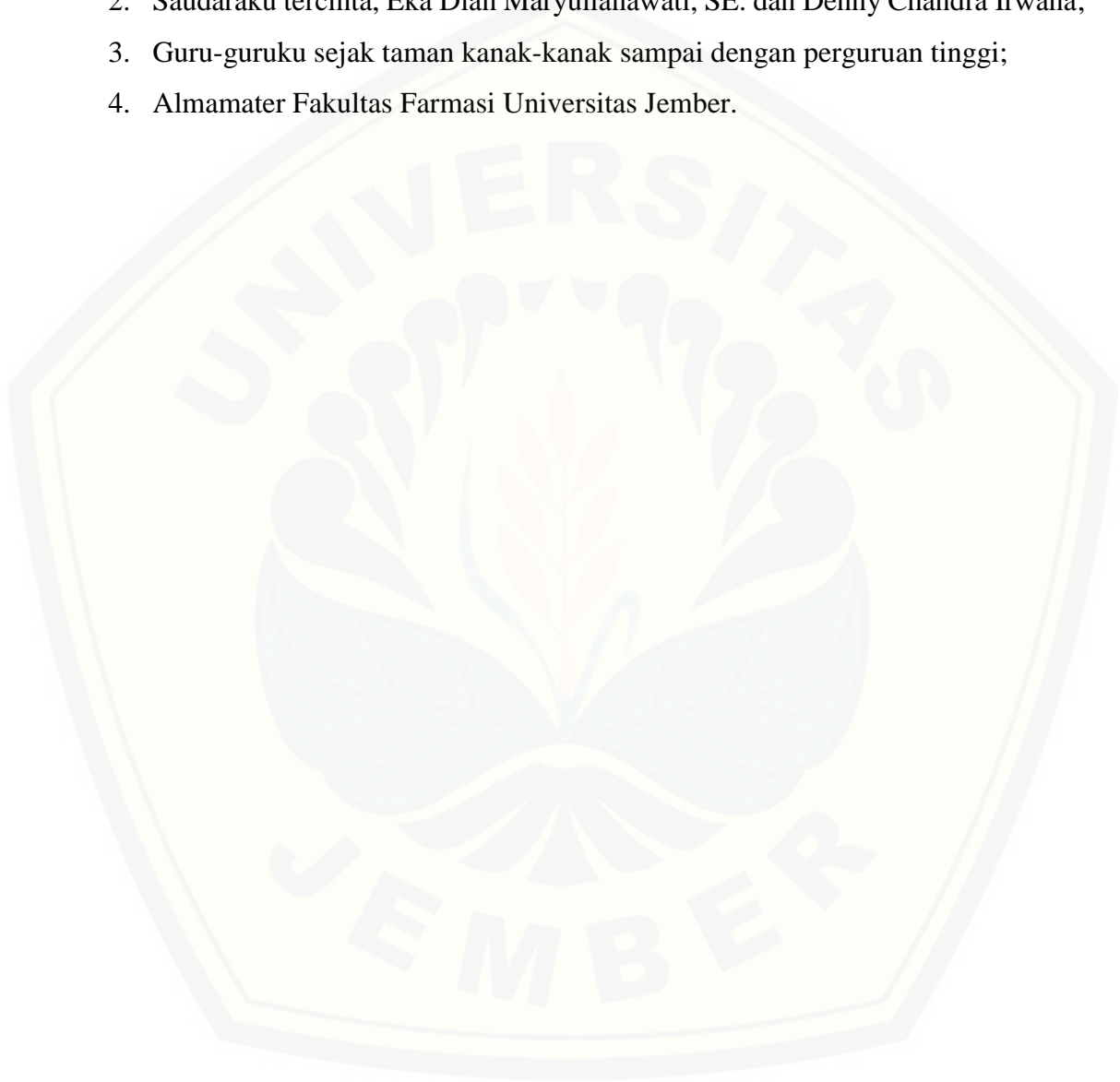
**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Kedua orang tuaku tercinta, Bapak Sumarno dan Ibu Anik Purwati, S.Pd.;
2. Saudaraku tercinta, Eka Dian Maryulianawati, SE. dan Denny Chandra Irwana;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.



MOTO

Fokuslah pada tempat yang anda tuju, bukan pada apa yang anda takuti^{**)}

Saat-saat yang luar biasa sulit dalam perjuangan adalah pertanda bahwa kesuksesan sudah mendekat^{***)}



^{**)} Anthony Robbins

^{***)} Merry Riana

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Terryda Ayu Permatasari

NIM : 132210101059

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanolik Daun Kepuh (*Sterculia Foetida*) terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak” 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 adanya tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 25 Juli 2017

Yang menyatakan,



Terryda Ayu Permatasari

NIM 132210101059

SKRIPSI

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOLIK DAUN KEPUH
(*Sterculia foetida*) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA
SERUM TIKUS YANG DIINDUKSI DIET TINGGI LEMAK**

Oleh

Terryda Ayu Permatasari
NIM 132210101059

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanolik Daun Kepuh (*Sterculia foetida*) terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak” karya Terryda Ayu Permatasari telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 25 Juli 2017

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Tim Pembimbing:

Pembimbing utama,



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

Pembimbing anggota,



dr. Ika Rahmawati Sutejo, M.Biotech.
NIP 198408192009122003

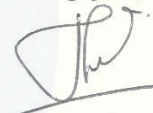
Tim Penguji:

Penguji I,



Indah Yulia Ningsih, S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 19840712 2008122002

Penguji II,



Dewi Dianasari S.Farm., M.Farm., Apt.
NIP 198712082014042002

Mengesahkan
Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

RINGKASAN

Efektivitas Ekstrak Etanolik Daun Kepuh (*Sterculia foetida*) terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak; Terryda Ayu Permatasari, 132210101059; 2017; 61 halaman; Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Makanan tinggi lemak khususnya lemak jenuh yang mengandung radikal bebas dapat memicu terjadinya berbagai sindrom metabolik seperti obesitas, dislipidemia, penyakit jantung, diabetes tipe II, perlemakan hati non alkoholik, steatohepatitis non alkoholik, dan kanker. Salah satu penyakit yang cukup berbahaya namun masih disepelekan oleh banyak orang adalah obesitas. Komplikasi penyakit yang diakibatkan obesitas telah membunuh sekitar 3,4 juta orang dewasa tiap tahunnya. Obesitas dapat meningkatkan proses oksidasi di dalam tubuh. Akibatnya tubuh secara terus menerus akan menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas ini bersifat reaktif dan jika tidak diinaktifkan dapat menyebabkan kerusakan makromolekul pembentuk sel seperti protein, karbohidrat, dan asam lemak.

Radikal bebas oksigen dapat bereaksi dengan lipid dapat memicu terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid ini yang akan menghasilkan metabolit-metabolit sekunder seperti malondialdehida (MDA). Tubuh sebenarnya memiliki antioksidan endogen yang dapat menangkal pengaruh buruk dari radikal bebas seperti glutathion (GSH), superoksida dismutase (SOD), dan katalase (CAT). Namun jika jumlah radikal bebas berlebihan, antioksidan endogen tidak mampu mencegah pengaruh buruk dari radikal bebas. Akhirnya kerusakan oksidatif tidak dapat dihindari. Ketika asupan makanan tinggi lemak meningkat, maka akan terjadi peningkatan jumlah radikal bebas di dalam tubuh. Antioksidan eksogen seperti BHA dan BHT diperlukan untuk menangkal pengaruh buruk radikal bebas yang tidak dapat dicegah oleh antioksidan endogen.

Seiring dengan penggunaan antioksidan eksogen sintetik, ditemukan bahwa beberapa antioksidan eksogen sintetik memiliki risiko ketergantungan dan menyebabkan terjadinya kanker empedu pada hewan uji. Beberapa tahun terakhir mulai diteliti beberapa bahan alam pengganti antioksidan sintetik yang digunakan

untuk menangkal pengaruh buruk dari radikal bebas, salah satunya adalah tanaman kepuh. Tanaman kepuh diketahui memiliki aktivitas antioksidan *in vitro* melalui metode DPPH. Namun metode ini memiliki kekurangan yaitu tidak dapat menggambarkan secara langsung aktivitas antioksidan yang terjadi di dalam tubuh. Oleh karena itu, peneliti melakukan pengujian antioksidan dari ekstrak etanolik daun kepuh *in vivo* melalui pengukuran kadar MDA serum hewan uji. Selain itu, golongan senyawa dari ekstrak etanolik daun kepuh diidentifikasi secara KLT dan *tube test*. Pola kromatogram ekstrak etanolik daun kepuh juga diidentifikasi untuk digunakan sebagai acuan identitas.

Penelitian ini menggunakan jenis desain *true experimental laboratories*. Desain penelitian yang digunakan adalah *Randomized Post Test Only Control Group Design*. Penelitian ini dilakukan pada tikus putih jantan galur Wistar. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor tikus yang dibagi menjadi lima kelompok secara acak dengan metode *Cluster Random Sampling*. Masing-masing kelompok terdiri dari lima tikus. Penelitian ini terdiri atas satu kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan dan empat kelompok perlakuan berupa diet tinggi lemak dan ekstrak daun kepuh dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB. Diet tinggi lemak menggunakan kuning telur bebek 5 g/200g BB. Perlakuan dilakukan selama 21 hari. Pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dapat menurunkan kadar MDA serum tikus yang diinduksi diet tinggi lemak. Ekstrak etanolik daun kepuh positif mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, dan terpenoid berdasarkan metode penapisan fitokimia secara KLT dan positif mengandung saponin dan tanin berdasarkan *tube test*. Pola kromatogram diperiksa secara KLT densitometri dengan menggunakan fase gerak butanol: asam asetat glasial:air (4:1:5) dan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ menghasilkan empat puncak senyawa pada Rf 0,28; 0,48; 0,52; 0,72. Kesimpulan dari penelitian ini adalah: (1) Ekstrak etanolik daun kepuh dapat menurunkan kadar MDA serum tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak secara bermakna, (2) Ekstrak etanolik daun kepuh mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, terpenoid, saponin, dan tanin, dan (3) Pola kromatogram ekstrak etanolik daun kepuh menunjukkan adanya empat puncak senyawa, namun ada dua puncak yang masih belum terpisah.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Ekstrak Etanolik Daun Kepuh (*Sterculia foetida*) terhadap Kadar Malondialdehida Serum Tikus yang Diinduksi Diet Tinggi Lemak”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si, M.Farm., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
2. Ibu Siti Muslichah, S.Si., M.Sc., Apt. dan ibu Ika Puspitasari, S.Farm., M.Biomed., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing selama penulis menjadi mahasiswa;
3. Ibu Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Ika Rahmawati Sutejo, M. Biotech selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah banyak membantu penulisan skripsi ini sejak awal hingga akhir;
4. Ibu Indah Yulia Ningsih., S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji Utama dan Ibu Dewi Dianasari, S.Farm., M.Farm., Apt. selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
5. Almarhum ayahanda Sumarno dan almarhumah Anik Purwati, S.Pd. atas doa, semangat, pengorbanan, perhatian dan kasih sayang yang selalu diberikan selama ini;
6. Kedua saudaraku Eka Dian Maryulianawati, SE. dan Denny Chandra Irwana yang selalu siap membantu;
7. Guru-guru saya sejak Taman Kanak-kanak sampai Perguruan Tinggi, yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran;

8. Bapak Gaguk Jati Sukamto, ST., MT., selaku Dosen Pembimbing Lapangan selama KKN yang telah memberikan semangat dan inspirasi dalam perkuliahan.
9. Teman-teman pecinta tumbuhan terima kasih atas segala bantuan, motivasi dan dorongan untuk menyelesaikan penelitian ini.
10. Teman-teman angkatan 2013 “Farmasetamol” yang sudah menjadi teman seperjuangan selama pendidikan;
11. Sahabat terbaik Cholifatur Rosidah, S.Pd., Ayu Andhira, S.Pd., Herlina Ekawati, Dewi Khuriyatul K, Syahreza Yusvandika yang selalu memberi semangat selama menempuh pendidikan di Jember;
12. Sahabat sekaligus rekan kerja terbaikku Riza Fahmi Qoyum Kurnia, S.Farm., dan Intan Nur Sa’adah, S.Farm., atas segala kerja sama, bantuan, semangat dan doa yang senantiasa diberikan selama menyelesaikan penelitian ini;
13. Teman-teman KKN Kecamatan Tegal Siwalan, Kabupaten Probolinggo periode I tahun 2016/2017, Luki, Halim, Hangga, dan Ainur.
14. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember;
15. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juli 2017

Penulis

DAFTAR ISI

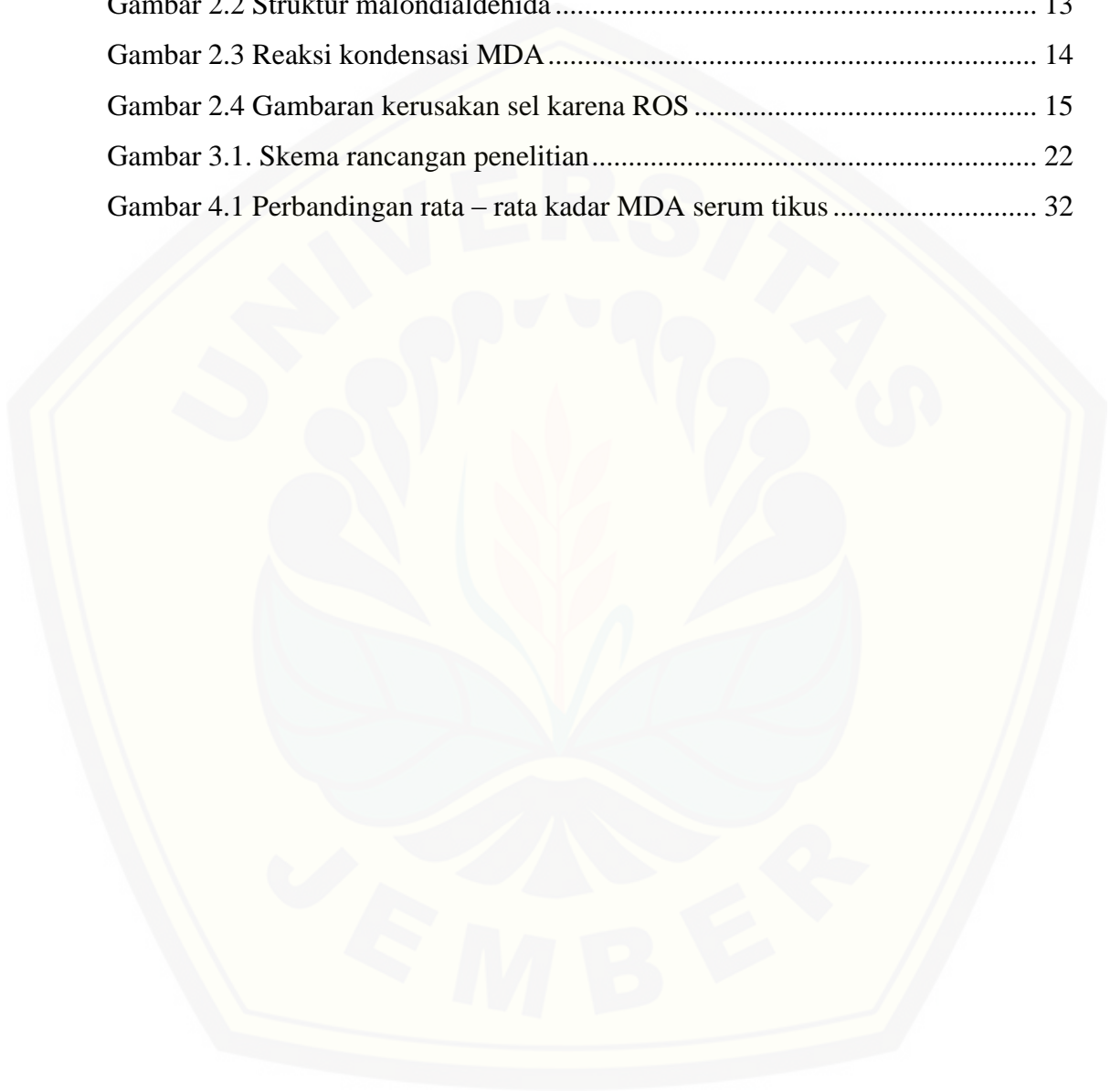
	<i>Halaman</i>
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL.....	iv
DAFTAR GAMBAR	v
PERSEMBAHAN.....	iii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tanaman Kepuh (<i>Sterculia foetida</i> L.).....	5
2.1.1 Klasifikasi Ilmiah	5
2.1.2 Morfologi	5
2.1.3 Kandungan Tanaman Kepuh.....	6
2.1.4 Manfaat Tanaman Kepuh.....	7
2.1.5 Penelitian Terdahulu Mengenai Kepuh.....	8
2.2 Radikal Bebas	9
2.2.1 Oksidan	9
2.2.2 Definisi Radikal Bebas.....	9
2.2.3 Jenis Radikal Bebas	9
2.2.4 Sumber Radikal Bebas	10
2.3 Antioksidan	11
2.3.1 Definisi Antioksidan	11
2.3.2 Macam Antioksidan	11
2.3.3 Metode Pengujian Antioksidan	12
2.4 MDA untuk Pengukuran Radikal Bebas.....	12

2.4.1 Pengertian MDA	12
2.4.2 Pengukuran Kadar MDA.....	13
2.5 Hubungan antara Diet Tinggi Lemak dengan MDA	14
2.6 Kerangka Teori Penelitian.....	18
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian.....	19
3.3 Populasi dan Sampel Penelitian	19
3.3.1 Populasi.....	19
3.3.2 Sampel.....	19
3.3.3 Besar Sampel Penelitian.....	20
3.4 Variabel Penelitian	20
3.4.1 Variabel Bebas	20
3.4.2 Variabel Terikat	20
3.4.3 Variabel Terkendali.....	21
3.5 Definisi Operasional	21
3.6 Rancangan Penelitian.....	21
3.7 Alat dan Bahan	22
3.7.1 Alat.....	22
3.7.2 Bahan	23
3.8 Prosedur Penelitian	23
3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus	23
3.8.2 Persiapan Sampel Tikus	23
3.8.3 Determinasi Tanaman	23
3.8.4 Pembuatan Simplisia Daun Kepuh.....	23
3.8.5 Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Kepuh.....	24
3.8.6 Penginduksian Ekstrak Etanolik Daun Kepuh.....	24
3.8.7 Penginduksian Diet Tinggi Lemak.....	24
3.8.8 Terminasi Hewan Coba.....	25
3.8.9 Pengukuran Kadar MDA.....	25
3.8.10 Penapisan Fitokimia dengan Metode KLT dan <i>Tube Test</i>	26
3.8.11 Pembuatan Pola Kromatogram	28

3.9 Analisis Data	28
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1 Hasil Penelitian	30
4.1.1 Determinasi Tanaman	30
4.1.2 Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Kepuh.....	30
4.1.3 Kadar MDA Serum Tikus	30
4.1.4 Penapisan Fitokimia Ekstrak Etanolik Daun Kepuh.....	32
4.1.5 Pola Kromatogram Ekstrak Etanolik Daun Kepuh	34
4.2 Pembahasan	34
BAB 5. PENUTUP.....	40
5.1 Kesimpulan.....	40
5.2 Saran.....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	46

DAFTAR GAMBAR

	<i>Halaman</i>
Gambar 2.1 Daun kepuh dan pohon kepuh.....	6
Gambar 2.2 Struktur malondialdehida.....	13
Gambar 2.3 Reaksi kondensasi MDA.....	14
Gambar 2.4 Gambaran kerusakan sel karena ROS.....	15
Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian.....	22
Gambar 4.1 Perbandingan rata – rata kadar MDA serum tikus.....	32



DAFTAR LAMPIRAN

	<i>Halaman</i>
Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman	45
Lampiran 2. Perhitungan.....	46
Lampiran 3. Dosis dan Volume Pemberian Diet Tinggi Lemak	48
Lampiran 4. Dosis dan Volume Pemberian Ekstrak Kepuh	50
Lampiran 5. Tabel Kadar MDA Serum Tikus	52
Lampiran 6. Hasil Uji Normalitas MDA	53
Lampiran 7. Hasil Uji Homogenitas Varian MDA	53
Lampiran 8. Hasil Uji Kruskal Wallis.....	54
Lampiran 9. Hasil Uji Mann-Whitney U	54

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kebiasaan masyarakat dalam mengonsumsi makanan yang tinggi kalori dan lemak akan meningkatkan prevalensi obesitas yang dapat memicu timbulnya berbagai penyakit. Makanan tinggi lemak khususnya lemak jenuh mengandung banyak radikal bebas yang dapat memicu terjadinya berbagai sindrom metabolik seperti obesitas, dislipidemia, penyakit jantung, diabetes tipe II, perlemakan hati non alkoholik, steatohepatitis non alkoholik, dan kanker (Behera *et al.*, 2004). Masyarakat di Indonesia banyak yang mengalami obesitas. Hal ini dapat dibuktikan berdasarkan data yang diperoleh dari Riset Kesehatan Dasar tahun 2013 yaitu penduduk Indonesia usia produktif di atas usia 18 tahun sekitar 26,3 % mengalami berat badan berlebih dan 14,8 % diantaranya mengalami obesitas (Balitbangkes, 2013).

Obesitas masih dianggap masalah sepele karena konsekuensi dari maraknya konsumsi makanan tinggi kalori dan lemak di dunia yang memicu terjadinya penyakit tersebut. Salah satu risiko yang dihadapi oleh orang yang terkena obesitas adalah penyakit diabetes tipe 2. Semakin banyak asupan makanan tinggi kalori, lemak, gula, dan garam yang dikonsumsi masyarakat, semakin meningkat pula prevalensi diabetes di Indonesia (Weyer, 2001). Pada penderita diabetes tipe 2 dengan komplikasi obesitas, insulin tidak dapat bekerja maksimal membantu sel-sel tubuh menyerap glukosa karena terganggu oleh kadar lemak darah yang tinggi. Komplikasi penyakit yang diakibatkan obesitas telah membunuh sekitar 3,4 juta orang dewasa tiap tahunnya (WHO, 2015).

Obesitas akan meningkatkan proses oksidasi di dalam tubuh. Akibatnya tubuh secara terus-menerus menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas bersifat reaktif dan jika tidak diinaktifkan akan merusak makromolekul pembentuk sel termasuk protein, karbohidrat, lemak, dan asam nukleat, sehingga dapat menyebabkan penyakit (Langseth, 1995). Radikal bebas terutama radikal bebas oksigen jika bereaksi dengan lipid pada membran sel akan menginisiasi terjadinya

peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid akan menghasilkan metabolit-metabolit seperti malondialdehida (MDA) yang dapat menyebabkan kerusakan oksidatif (Swastika, 2013).

Kerusakan oksidatif atau kerusakan akibat radikal bebas dalam tubuh dapat diatasi oleh antioksidan. Antioksidan dapat secara langsung bereaksi dengan radikal bebas dengan cara menerima atau mendonorkan elektron untuk mengeliminasi radikal bebas yang memiliki elektron tidak berpasangan. Mekanisme lain yaitu mekanisme tidak langsung dengan menurunkan pembentukan radikal bebas (menghambat aktivitas enzim pembentuk radikal bebas atau meningkatkan aktivitas maupun ekspresi antioksidan endogen) (Lu *et al.*, 2010). Antioksidan endogen seperti glutathion peroksidase, katalase, superoksida dismutase, asam askorbat, α -tokoferol, vitamin C dan E, serta kelompok sulfidril sebenarnya dapat mencegah kerusakan oksidatif (Biri *et al.*, 2006). Namun jika senyawa radikal bebas terdapat berlebih dalam tubuh atau melebihi batas kemampuan proteksi antioksidan seluler, maka dibutuhkan antioksidan tambahan dari luar (antioksidan eksogen) untuk menetralkan radikal bebas yang terbentuk (Reynertson, 2007).

Beberapa antioksidan sintetik yang populer digunakan sebagai antioksidan eksogen adalah senyawa fenolik seperti hidroksi anisol terbutilasi (BHA), hidroksi toluene terbutilasi (BHT), butilhidrokuinon tersier (TBHQ), dan ester dari asam galat, misalnya propil galat (PG). Beberapa antioksidan seperti BHT dapat meningkatkan risiko ketergantungan dosis dan kanker empedu pada tikus (Maeura *et al.*, 1984). BHA sebesar 2% dan 0,5% pada tikus dapat menginisiasi terbentuknya tumor pada bagian perut (Ito *et al.*, 1986). Penggunaan bahan alami seperti antioksidan alami lebih sehat dan lebih aman daripada antioksidan sintesis (Sayuti & Yenrina, 2015).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zulviyati (2015), tanaman kepuh memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC50 sebesar $300,93 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak n-heksana, $57,24 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak etil asetat, dan $4,56 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ untuk ekstrak metanol berdasarkan metode DPPH. Metode ini adalah metode yang umum digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari suatu tanaman karena mudah dan sederhana. Namun metode yang

dilakukan *in vitro* ini memiliki kekurangan, yaitu tidak menggambarkan secara langsung aktivitas antioksidan yang terjadi dalam tubuh (Utomo *et al.*, 2013).

Oleh karena itu, peneliti menguji aktivitas antioksidan daun kepuh *in vivo* dengan menggunakan parameter malondialdehida (MDA) agar diperoleh keadaan yang sebenarnya jika berada di dalam tubuh. MDA merupakan metabolit sekunder dari peroksidasi lipid (Swastika, 2013). Selain itu untuk mendukung data aktivitas antioksidan ekstrak etanolik daun kepuh, dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui kelompok senyawa yang ada di dalam ekstrak dan dilakukan penetapan pola kromatogram sebagai acuan identitas ekstrak etanolik daun kepuh yang memiliki aktivitas antioksidan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut, rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Apakah ekstrak etanolik daun kepuh dapat menurunkan kadar MDA tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak?
- b. Senyawa apa saja yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun kepuh?
- c. Bagaimana pola kromatogram ekstrak etanolik daun kepuh?

1.3 Tujuan Penelitian

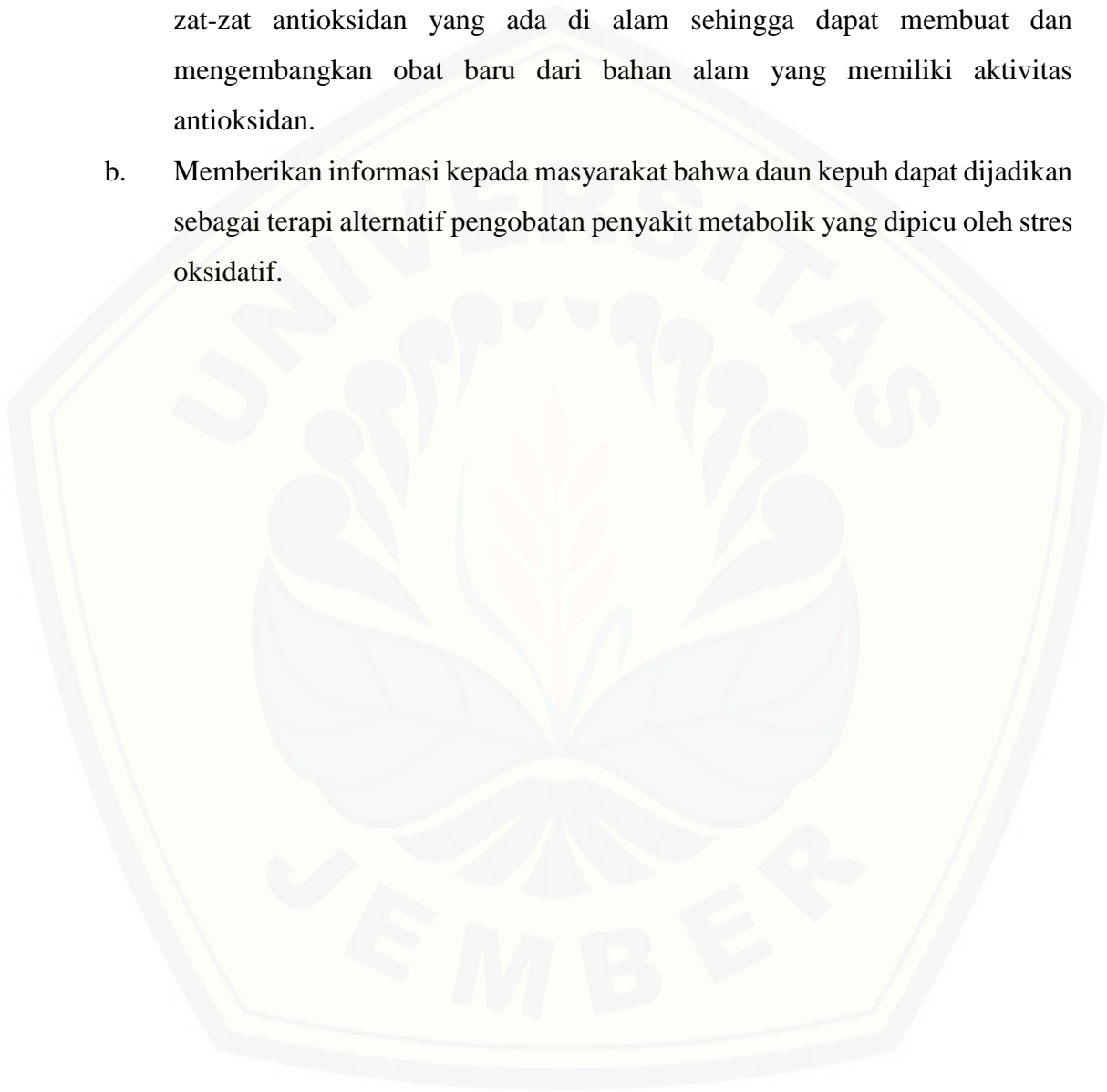
Berdasarkan rumusan masalah tersebut, tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Untuk mengetahui kemampuan ekstrak etanolik daun kepuh dalam menurunkan kadar MDA tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi diet tinggi lemak.
- b. Untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanolik daun kepuh.
- c. Untuk mengetahui pola kromatogram ekstrak etanolik daun kepuh.

1.4 Manfaat Penelitian

Berdasarkan uraian tersebut, manfaat penelitian yang diharapkan sebagai berikut:

- a. Meningkatkan pengetahuan bagi peneliti khususnya mahasiswa mengenai zat-zat antioksidan yang ada di alam sehingga dapat membuat dan mengembangkan obat baru dari bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Memberikan informasi kepada masyarakat bahwa daun kepuh dapat dijadikan sebagai terapi alternatif pengobatan penyakit metabolik yang dipicu oleh stres oksidatif.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kepuh (*Sterculia foetida* L.)

2.1.1 Klasifikasi Ilmiah

Klasifikasi ilmiah tanaman kepuh berdasarkan (<http://www.itis.gov>) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infrakingdom	: Streptophyta
Superdivision	: Embriophyta
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophyta
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Rosanae
Order	: Malvales
Family	: Malvaceae
Genus	: <i>Sterculia</i>
Species	: <i>Sterculia foetida</i> L.

2.1.2 Morfologi

Tanaman kepuh yang ditunjukkan pada Gambar 2.1 merupakan tumbuhan berupa pohon dengan tinggi mencapai 40 m dan diameter antara 90-120 cm. Tanaman ini memiliki bentuk pohon yang tinggi dan lurus, bercabang banyak, dan bentuk percabangannya simpodial seperti halnya karakter dari genus-genus pohon tropis lainnya. Susunan percabangan kepuh mempunyai kemiripan dengan percabangan terminalia bertingkat. Cabang-cabang tumbuh mendatar dan berkumpul pada ketinggian yang kurang lebih sama, bertingkat-tingkat (Orwa *et al.*, 2009).



Gambar 2.1 Daun kepuh dan pohon kepuh (dokumentasi pribadi).

Daun-daunnya berbentuk majemuk menjari, mempunyai tangkai 12,5–23 cm, terkumpul di ujung ranting. Anak daun berjumlah tujuh hingga sembilan, berbentuk jorong lonjong dengan ujung dan pangkal meruncing, panjang 10–17 cm. Bunganya berkelamin satu, berumah satu biasanya terdapat pada ketiak daun yang masih muda dan mengeluarkan bau busuk. Bunganya berbentuk agak besar dan berwarna hijau atau ungu kusam, uniseksual dengan bunga jantan dan betina di pohon yang terpisah (Orwa *et al.*, 2009).

2.1.3 Kandungan Tanaman Kepuh

Berdasarkan penelitian terdahulu, ekstrak kulit batang kepuh diketahui mengandung alkaloid, flavonoid, steroid, karbohidrat, tanin, dan protein (Mari *et al.*, 2016). Biji kepuh mengandung minyak nabati yang terdiri atas asam lemak yaitu asam sterculat yang berumus molekul $C_{19}H_{34}O_2$ (Yuniastuti *et al.*, 2009). Daun kepuh mengandung kelompok senyawa flavonoid yaitu diantaranya adalah apigenin, apigenin 7-O- β -D-glukoronida 6'' etil ester, 6-hidroksiapigenin (scutellarein), scutellarain 6-O- β -glukoronida, isoscutellarein 8-O- β -D-glukosida, luteolin, luteolin 7-O- β -D-glukosida, luteolin 7-O- β -D-glukoronida, luteolin 7-O- β -D-glukoronida 6''- metil ester, luteolin 7-O- β -D-glukoronida 6'' etil ester, luteolin 3'-metil eter (chrysoeriol), 6-hidroksiluteolin 6-O- β -D-glukuronida, 8-hidroksiluteolin 8-O- β -D-glukuronida (hypolaetin 8-O- β -glukuronida), dan 5,7,8,3'-tetrahidroksi 4'-metoksiflavon. Daun kepuh juga mengandung flavonol yaitu kuersetin dan kuersetin 3-O- β -D-glukosida, isoflavon yaitu puerarin, dan antosianin yaitu sianidin 3-O-glukosida dan prosianidin- β -D-glukoronida (El Sherei *et al.*, 2016).

Penelitian yang dilakukan oleh Zulviyati (2015) memperoleh hasil kandungan total fenolik ekstrak n-heksana daun kepuh sebesar $7,20 \pm 0,056$ mg GAE/g ekstrak; ekstrak etil asetat daun kepuh sebesar $39,90 \pm 0,368$ mg GAE/g ekstrak; dan ekstrak metanolik daun kepuh sebesar $474,35 \pm 2,846$ mg GAE/g ekstrak. Sedangkan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak n-heksana daun kepuh sebesar $28,36 \pm 0,217$ mg GAE/g ekstrak; ekstrak etil asetat daun kepuh sebesar $188,76 \pm 1,231$ mg GAE/g ekstrak; dan ekstrak metanolik daun kepuh sebesar $338,14 \pm 2,087$ mg GAE/g ekstrak.

2.1.4 Manfaat Tanaman Kepuh

Asam sterkulat yang terkandung dalam biji kepuh dapat digunakan sebagai ramuan berbagai produk industri seperti kosmetik, sabun, shampoo, pelembut kain, cat, dan plastik, Asam lemak minyak kepuh juga dapat digunakan sebagai zat adaptif biodiesel yang memiliki titik tuang $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ menjadi $11,25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Yuniastuti *et al.*, 2009). Kulit pohon dan daun dapat digunakan sebagai obat untuk beberapa penyakit antara lain reumatik, diuretik, dan diaforetik. Kulit buah kepuh juga dimanfaatkan sebagai bahan ramuan untuk membuat kue, sementara bijinya dapat dimakan dengan rasa gurih. Biji kepuh mengandung minyak nabati yang terdiri atas asam lemak yaitu asam sterkulat. Kayunya dapat digunakan sebagai konstruksi bangunan rumah, bahan pembuat kapal, kotak kontainer, dan kertas pulp. Sementara di Bali kayu kepuh dimanfaatkan sebagai kerajinan dan di Jawa Barat digunakan untuk membuat wayang golek (Maryanti, 2014).

Secara ekologis, tanaman kepuh juga berfungsi sebagai mikro habitat hewan tertentu. Tanaman di Taman Nasional Komodo (Pulau Komodo) dilaporkan bahwa populasi burung kakak tua jambul kuning (*Cacatua subphurea parvula*) yang dilindungi menggunakan dan memanfaatkan pohon kepuh sebagai sarangnya. Selain itu karena pohon kepuh memiliki tajuk dan perakaran yang cukup besar, maka dapat berfungsi sebagai pengatur siklus hidrologi karena akarnya dapat menahan air tanah dengan kapasitas yang cukup besar (Maryanti, 2014).

2.1.5 Penelitian Terdahulu Mengenai Kepuh

Penelitian yang dilakukan oleh Zulviyati (2015) menemukan bahwa daun kepuh terbukti memiliki aktivitas antioksidan berdasarkan metode DPPH, nilai IC_{50} ekstrak n-heksana daun kepuh sebesar $300,93 \pm 1,13 \mu\text{g/mL}$; nilai IC_{50} ekstrak etil asetat daun kepuh sebesar $57,24 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$; dan nilai IC_{50} ekstrak metanolik daun kepuh sebesar $4,56 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ (Zulviyati, 2015). Nilai IC_{50} dalam penelitian ini adalah kadar total fenolik yang dibutuhkan untuk menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH. Ekstrak n-heksana daun kepuh memiliki nilai IC_{50} yang lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak etil asetat daun kepuh dan ekstrak metanolik daun kepuh (Zulviyati, 2015).

Penelitian yang dilakukan oleh Asih (2010) menemukan bahwa ekstrak n-heksana daun kepuh mengandung triterpenoid dan terbukti memiliki aktivitas antiradikal bebas dengan persentase peredaman DPPH pada menit ke-5 sebesar 85,33 % dan pada menit ke-60 persentase peredamannya naik sebesar 88,52% (Asih *et al.*, 2010). Suatu bahan dikatakan aktif sebagai peredam radikal bebas jika memiliki persentase peredaman lebih besar atau sama dengan 50% (Rahmawati, 2004). Oleh karena itu ekstrak n-heksana daun kepuh aktif digunakan sebagai peredam radikal bebas.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, kepuh memiliki aktivitas antioksidan untuk dapat meredam radikal bebas *in vitro* dengan metode DPPH. Namun metode ini hanya dapat memberikan informasi mengenai aktivitas senyawa yang diuji dan hanya dapat mengukur senyawa antiradikal yang terlarut dalam pelarut organik khususnya alkohol (Utomo *et al.*, 2013). Penelitian *in vivo* diperlukan untuk mengetahui gambaran langsung mekanisme peredaman radikal bebas pada hewan coba. Penelitian *in vivo* yang dipilih adalah TBARS-MDA karena MDA menunjukkan proses oksidasi asam lemak tidak jenuh oleh radikal bebas. Peningkatan radikal bebas akan menyebabkan stres oksidatif. Peningkatan stres oksidatif sesuai dengan peningkatan pembentukan MDA (Swastika, 2013).

2.2 Radikal Bebas

2.2.1 Oksidan

Oksidan adalah senyawa yang dapat menarik elektron seperti Fe, Cu, Mo. Sifat kecenderungan untuk menarik elektron sama dengan sifat radikal bebas. Oleh karena itu radikal bebas digolongkan ke dalam oksidan, namun setiap oksidan bukan radikal bebas (Suryohudoyo, 1993). Ketika ada organisme patogen yang masuk menyerang ke dalam tubuh, terdapat sel-sel khusus yaitu sel-sel radang seperti granulosit, monosit dan makrofag. Sel radang ini dapat menghasilkan beberapa oksidan yaitu H_2O_2 , $O_2\bullet^-$, $\bullet OH$, ClO^- , dan $\bullet O_2$. Oksidan tersebut selain dapat menghancurkan organisme patogen yang masuk ke dalam tubuh juga dapat merusak sel-sel jaringan tubuh sehingga apabila terjadi inflamasi hebat yang melibatkan banyak sel radang, kerusakan jaringan tidak dapat dihindari (Suryohudoyo, 1993).

2.2.2 Definisi Radikal Bebas

Radikal bebas adalah setiap unsur yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit yang paling luar. Radikal bebas mempunyai sifat sangat reaktif dan dapat mengubah molekul menjadi radikal (Jauniaux *et al.*, 2004). Radikal bebas akan merebut elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri. Radikal bebas berkaitan dengan kerusakan sel, jaringan, dan proses penuaan. Selain dari pengaruh luar, radikal bebas dibentuk juga dalam tubuh yaitu pada membran plasma, mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasma, dan sitosol melalui reaksi-reaksi enzimatik yang berlangsung dalam proses metabolisme yang terjadi di dalam tubuh (Winarsi, 2007).

2.2.3 Jenis Radikal Bebas

Radikal bebas berdasarkan atom atau unsur yang dikandungnya ada beberapa jenis. Radikal bebas yang mengandung karbon (CCl_3) berasal dari oksidasi radikal molekul organik. Radikal yang mengandung hidrogen merupakan hasil penyerangan atom H (H^\bullet). Radikal yang mengandung sulfur diproduksi pada glutathion dan menghasilkan radikal tiol ($R-S^\bullet$). Radikal yang mengandung nitrogen

yaitu radikal fenildiazin. Sedangkan radikal bebas yang berperan dalam patofisiologi beberapa penyakit adalah radikal bebas oksigen atau yang lebih dikenal sebagai spesies oksigen reaktif (Arief, 2010).

Spesies oksigen reaktif meliputi tunggal atau singlet (O_2), triplet ($3O_2$), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^\bullet), nitrit oksida (NO^\bullet), peroksinitrit ($OONO^\bullet$), asam hipoklorat ($HOCl$), hidrogen peroksida (H_2O_2), radikal alkoksil (LO^\bullet), dan radikal peroksil (LOO^\bullet) (Arief, 2010). Spesies oksigen reaktif ini dapat diperoleh dari reaksi Fenton dan Haber-Weiss melalui pembentukan radikal hidroksil (OH^\bullet). Radikal hidroksil ini dihasilkan dari hidrogen peroksida (H_2O_2) yang bertemu dengan Fe^{2+} atau logam transisi lainnya seperti Cu^+ melalui reaksi Fenton. Radikal bebas dapat juga terbentuk pada reaksi antara O_2^- dengan H_2O_2 yang akan menghasilkan radikal hidroksil dan hidroperoksi melalui reaksi Haber-Weiss (Marks *et al.*, 1996).

2.2.4 Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat dibentuk dari dalam sel oleh absorpsi tenaga radiasi (misalnya sinar ultra violet, sinar X) atau dalam reaksi reduksi oksidasi yang selama proses fisiologi normal atau mungkin berasal dari metabolisme enzimatik bahan-bahan kimia eksogen. Tenaga radiasi dapat melisiskan air dan melepaskan radikal seperti ion hidroksil dan H^\bullet . Radikal bebas lain ialah superoksida yang berasal dari reduksi molekul oksigen. Oksigen secara normal direduksi menjadi air, tetapi pada beberapa reaksi terutama yang menyangkut xantin oksidase, O_2^- dapat terbentuk. Sumber radikal bebas dapat dibagi menjadi 3, yaitu (Kumar, 2011):

- a. Sumber internal: berasal dari reaksi enzimatik yang menghasilkan suatu radikal bebas seperti pada reaksi pernafasan, fagositosis, sintesis prostaglandin, serta dalam sistem sitokrom P450.
- b. Sumber eksternal: asap rokok, polutan lingkungan, radiasi, sinar UV, ozon, obat-obatan, anestesi, pestisida, dan pelarut industri.
- c. Faktor fisiologis: status mental seperti stres, emosi dan kondisi penyakit yang dapat memicu terbentuknya radikal bebas.

2.3 Antioksidan

2.3.1 Definisi Antioksidan

Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron atau donor elektron. Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.3.2 Macam Antioksidan

Berdasarkan fungsi dan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi menjadi tiga kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier. Antioksidan primer bekerja untuk mencegah pembentukan senyawa radikal baru, yaitu mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum senyawa radikal bebas bereaksi. Antioksidan primer mengikuti mekanisme pemutusan rantai reaksi radikal dengan mendonorkan atom hidrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal, produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk awal. Contoh antioksidan primer adalah superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), katalase dan protein pengikat logam. SOD dan GPx digolongkan ke dalam antioksidan endogen yang melindungi jaringan dari kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif tersebut disebabkan oleh radikal bebas oksigen seperti anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil (OH^{\cdot}), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (Sayuti & Yenrina, 2015).

Antioksidan sekunder bekerja dengan cara mengkelat logam yang bertindak sebagai pro-oksidan, menangkap radikal, dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan sekunder berperan sebagai pengikat ion-ion logam, penangkap oksigen, pengurai hidroperoksida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi singlet oksigen. Contoh antioksidan sekunder adalah vitamin E, vitamin C, β -caroten, isoflavon, bilirubin, dan albumin. Antioksidan tersier bekerja memperbaiki kerusakan biomolekul yang disebabkan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfida reduktase (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.3.3 Metode Pengujian Antioksidan

Metode pengujian aktivitas antioksidan dikelompokkan menjadi tiga golongan. Golongan pertama adalah metode transfer atom hidrogen, misalnya metode kapasitas absorbansi radikal oksigen dan pengujian kapasitas penghambatan peroksidasi lipid. Golongan kedua adalah metode transfer elektron, misalnya kemampuan antioksidan dalam menurunkan Fe^{3+} dan pengujian paparan radikal bebas dengan menggunakan *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH). Golongan ketiga adalah metode lain seperti kapasitas paparan oksidan total dan *chemiluminescence* (Badarinath *et al.*, 2010).

Pengujian kapasitas antioksidan suatu senyawa dilakukan secara bertahap sebagai berikut:

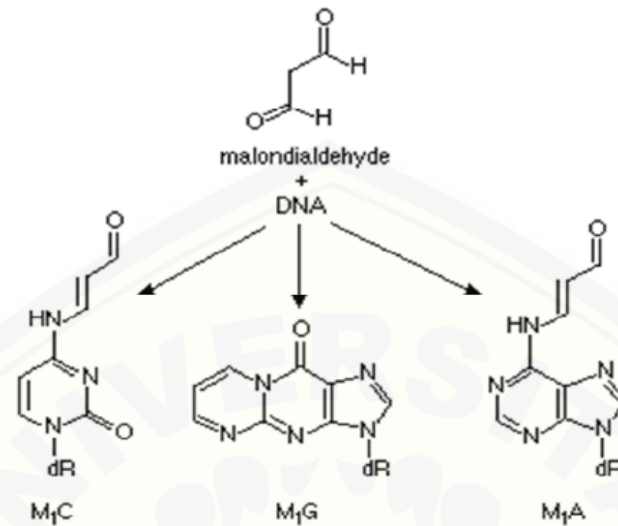
- a. Uji *in vitro* menggunakan reaksi kimia, misalnya metillinoleat, DPPH.
- b. Uji *in vitro* menggunakan materi biologis, misalnya mengukur viabilitas sel (teknik kultur sel), pembentukan diena terkonjugasi dan kadar TBARS dari isolat LDL, dan lain-lain.
- c. Uji *in vivo* pada model hewan percobaan, misalnya aktivitas enzim antioksidan dilihat berdasarkan kadar TBARS.
- d. Uji *in vivo* pada manusia (Sayuti & Yenrina, 2015).

2.4 MDA untuk Pengukuran Radikal Bebas

2.4.1 Pengertian MDA

Peroksidasi lipid ditentukan secara tidak langsung melalui pengukuran produk sekunder, seperti MDA. MDA adalah aldehida dengan tiga atom karbon yang memiliki bobot molekul yang rendah dan merupakan produk pemutusan spontan peroksida yang diproduksi dari serangan radikal bebas terhadap asam lemak tak jenuh (Tukozkan *et al.*, 2006). MDA merupakan produk peroksidasi lipid yang merupakan aldehida reaktif dan salah satu dari banyak elektrofil reaktif yang dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel dan membentuk protein kovalen yang dikenal sebagai *advance lipoxidation end products* (ALE). MDA dapat bereaksi dengan deoksiganosin dan deoksiadenosin pada DNA dan membentuk substansi M1G yang bersifat mutagenik seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2

(Eberhardt, 2001).



Gambar 2.2 Struktur Malondialdehida (Eberhardt, 2001)

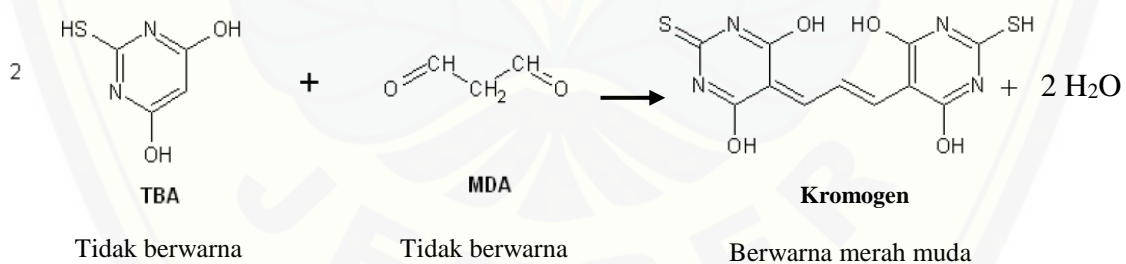
2.4.2 Pengukuran Kadar MDA

Pengukuran kadar MDA serum dapat dilakukan melalui dua macam cara yaitu melalui tes *thiobarbituric acid-reactive substance* (TBARS) dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Pada penelitian ini dilakukan tes TBARS dengan metode pengukuran reaksi TBA menggunakan kolorimetri. Dasar pemeriksaan metode TBARS adalah reaksi spektrofotometrik sederhana, terjadi ketika satu molekul MDA akan terpecah menjadi 2 molekul 2-asam thiobarbiturat. Reaksi ini berjalan pada pH 2-3. Asam Thiobarbiturat (TBA) akan memberikan kromogen berwarna merah muda yang dapat diperiksa secara spektrofotometrik. Tes TBARS selain mengukur kadar MDA yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid juga mengukur produk aldehyd lainnya termasuk produk non-volatil yang terjadi akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran kadar MDA serum yang sebenarnya. Kadar MDA dapat diperiksa baik di plasma, jaringan maupun urin (Sochor *et al.*, 2012).

TBARS adalah metode yang secara luas digunakan untuk menentukan peroksidasi lipid. Prinsip dasar metode ini adalah dilihat dari kemampuan MDA yang merupakan salah satu produk sekunder peroksidasi lipid, untuk bereaksi

dengan TBA. Pada reaksi ini MDA dengan TBA berada dalam suasana asam dan suhu yang tinggi untuk dapat membentuk kompleks MDA-(TBA)₂ yang berwarna merah muda dan dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 532 nm. Untuk mencegah dekomposisi peroksidasi lipid selama analisis, ditambahkan BHT ke dalam sampel untuk menghambat peroksidasi lipid (Sochor *et al.*, 2012).

Jika ekstrak etanolik daun kepuh memiliki aktivitas antioksidan yang mampu menghambat radikal bebas di dalam tubuh maka peroksidasi lipid akan menurun. Menurunnya peroksidasi lipid ini akan menurunkan kadar MDA di dalam tubuh. Akibatnya hanya sedikit MDA yang bereaksi dengan TBA membentuk kompleks kromogen yang berwarna merah muda cerah. Namun jika ekstrak etanolik daun kepuh tidak mampu menghambat peroksidasi lipid yang terjadi di dalam tubuh maka kadar MDA akan tetap tinggi. Semakin tinggi kadar MDA yang bereaksi dengan TBA akan membentuk kompleks kromogen berwarna merah muda pekat. Reaksi pembentukan kompleks kromogen oleh TBA dan MDA terdapat pada Gambar 2.3 (Sochor *et al.*, 2012).

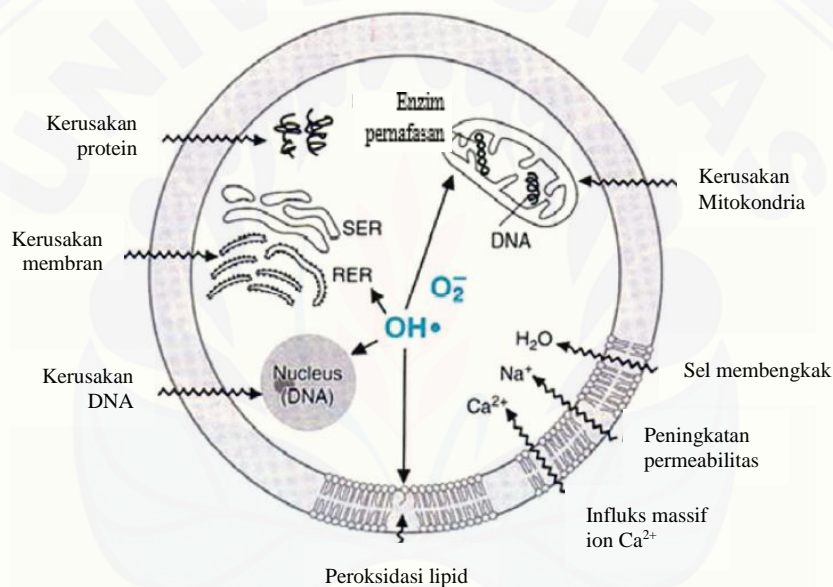


Gambar 2.3 Kromofor berwarna merah muda yang dihasilkan oleh reaksi kondensasi MDA dengan TBA (Sochor *et al.*, 2012)

2.5 Hubungan antara Diet Tinggi Lemak dengan MDA

Radikal bebas dapat menyerang banyak biomolekul dari suatu organisme yang dapat menginisiasi terjadinya stres oksidatif dan menjadi penyebab dari berbagai proses patologi dalam organisme. Stres oksidatif terjadi ketika ada ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan keefektifan sistem

pertahanan antioksidan yang terjadi dalam organisme sehat (Sochor *et al.*, 2012). Radikal bebas oksigen, seperti superoksida, radikal hidroksil dan radikal peroksil dengan tambahan senyawa non radikal, seperti hydrogen peroksida, asam hipoklorat dan ozon dikenal sebagai *reactive oxygen species* (ROS) yang terbentuk selama proses metabolisme oksigen. ROS pada Gambar 2.4 dapat menginisiasi terjadinya peroksidasi lipid yang dapat menyebabkan pemutusan rantai DNA dan mengoksidasi semua molekul dalam membran biologis dan jaringan yang menyebabkan perlukaan (Li *et al.*, 2015).



Gambar 2.4 Gambaran kerusakan sel karena ROS (Miles, 2003)

Radikal bebas yang bereaksi dengan struktur lipid membran sel membentuk radikal lipid peroksida (LO₂). Diet tinggi lemak dapat meningkatkan kadar lemak di dalam darah seperti kolesterol dan trigliserida (Ayala *et al.*, 2014). Diet tinggi lemak seperti kuning telur ayam dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam darah sebesar 266 mg/dL, sedangkan kuning telur bebek dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam darah sebesar 619 mg/dL (Gunawan, 2007). Peningkatan asupan energi ataupun lemak dari makanan pada kelompok diet tinggi lemak akan menyebabkan peningkatan aktifitas lipogenesis dan asam lemak bebas yang

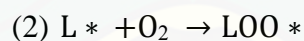
terbentuk juga semakin banyak. Selanjutnya terjadilah mobilisasi asam lemak bebas dari jaringan lemak menuju ke hepar dan berikatan dengan gliserol membentuk Triasilgliserol (TG). Sehingga semakin tinggi konsumsi lemak maka semakin tinggi pula pembentukan TG di hepar dan semakin tinggi kadar trigliserida dalam darah (Tsalissavrina *et al.*, 2006). Kolesterol akan dibawa oleh *low density lipoprotein* (LDL) dari hepar ke jaringan yang memiliki afinitas tinggi terhadap reseptor ke membran sel. ROS bersama dengan enzim myeloperoksidase dan lipoksigenase dapat menyebabkan molekul LDL teroksidasi (Glass & Witztum, 2001).

Yang *et al.* (2014) menyebutkan bahwa yang mengalami peroksidasi lipid adalah LDL yang teroksidasi (oxLDL). Reaksi peroksidasi lipid ini merupakan reaksi berantai karena dapat bereaksi dengan struktur lipid, protein, dan asam nukleat organel sel. Molekul protein sel, secara struktural maupun bentuk enzim sangat rentan terhadap proses denaturasi oleh reaksi yang dimediasi radikal bebas. Selain itu radikal bebas dapat juga secara langsung menyerang asam nukleat sehingga mengakibatkan terpotongnya rantai DNA yang mengakibatkan mutasi genetik sampai dengan kematian sel (Swastika, 2013). Produksi yang berlebihan dari ROS menyebabkan suatu ketidakseimbangan di dalam sistem pro-oksidan atau antioksidan dan banyak ketidakseimbangan di dalam komponen pro-oksidan yang berpotensi mengawali terjadinya kerusakan yang dikenal sebagai stres oksidatif (Aluwong *et al.*, 2013). Peningkatan stres oksidatif sesuai dengan peningkatan pembentukan MDA (Swastika, 2013).

ROS dapat bereaksi dan menyebabkan kerusakan pada banyak molekul di dalam sel. Fosfolipid yang menjadi unsur utama dalam membran plasma dan membran organela sel seringkali menjadi subjek dari peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid adalah suatu reaksi rantai radikal bebas yang diawali dengan terbebasnya hidrogen dari suatu asam lemak tak jenuh ganda oleh radikal bebas. Radikal lipid yang terbentuk akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi-lipid dan lipid peroksida serta MDA yang larut dalam air dan dapat dideteksi dalam darah. Konsekuensi penting dari peroksidasi lipid adalah meningkatnya permeabilitas membran dan mengganggu distribusi ion-ion yang mengakibatkan kerusakan fungsi sel dan organela (Devlin, 2002).

Peroksidasi lipid oleh radikal bebas terjadi dalam tiga tahapan yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Reaksi inisiasi terjadi saat molekul asam lemak dari lipid diserang oleh radikal bebas yang mengawali terjadinya pelepasan atom hydrogen pada proses pembentukan radikal asam bebas. Dalam struktur ini, terjadi penataan ulang dari ikatan rangkap untuk membentuk diena terkonjugasi. Struktur diena ini bereaksi dengan molekul oksigen untuk membentuk sebuah radikal lipoperoksil yang menyebabkan terjadinya inisiasi fase kedua yang disebut propagasi (Sochor *et al.*, 2012).

Reaksi propagasi dimulai ketika radikal lipoperoksil bereaksi dengan molekul lain dari asam lemak yang berasal dari atom hidrogen yang terlepas ketika terjadi pembentukan hidroperoksida lemak dari molekul aslinya. Kemudian reaksi terminasi terjadi setelah pemasangan semua radikal bebas. Pada reaksi ini peroksidasi lipid enzimatik yang dikatalisasi oleh enzim siklooksigenase dan lipoksigenase turut mengambil bagian. Kedua enzim ini diturunkan dari asam lemak tak jenuh yang mengandung 20 atom karbon. Gambar 2.5 menunjukkan tahap peroksidasi lipid dimulai dari reaksi inisiasi, propagasi dan diakhiri dengan reaksi terminasi (Sochor *et al.*, 2012).

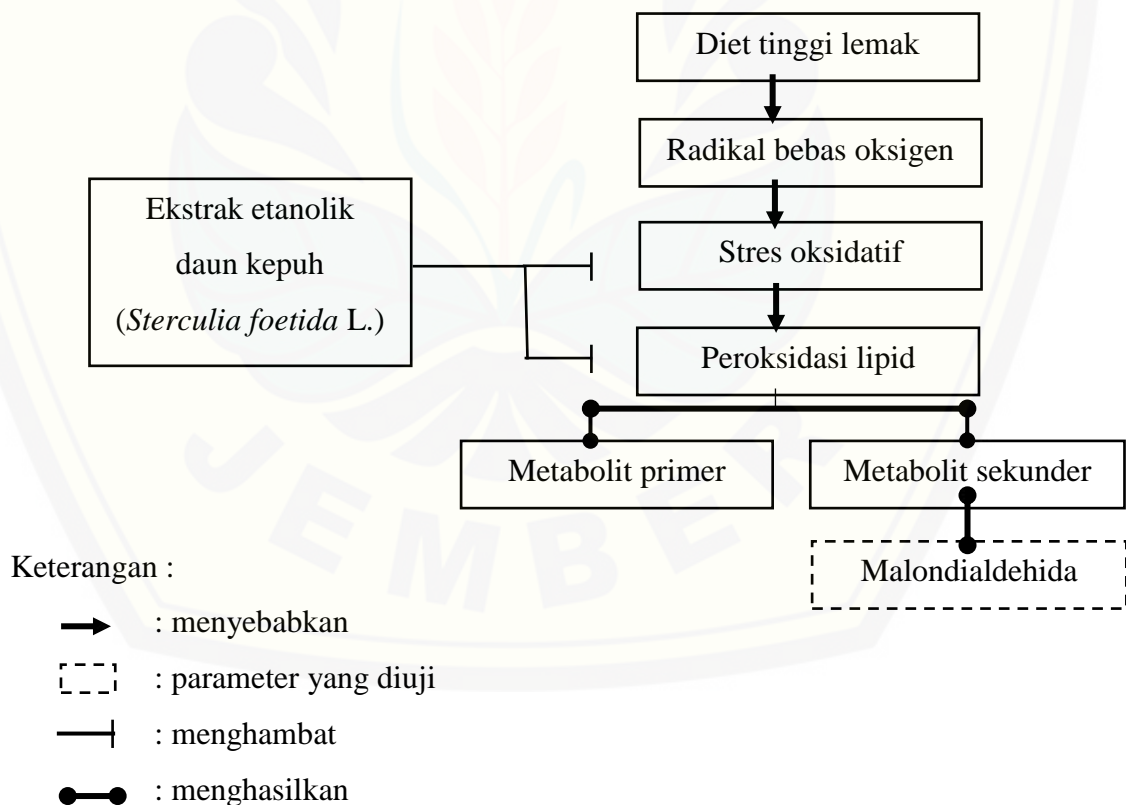


Gambar 2.5 Tahap peroksidasi lipid

Peroksidasi lipid menyebabkan kerusakan membran sel baik secara langsung dan tidak langsung. Efek langsung menyebabkan kerusakan pada struktur membran sel sedangkan efek secara tidak langsung melalui produk-produk metabolit dari peroksidasi lipid (Swastika, 2013). Efek secara langsung pada membran endotel adalah peroksidasi lipid yang memudahkan terjadinya ikatan silang rantai lemak pada membran endotel dan akan menyebabkan perubahan kandungan cairan (*fluiditas*) membran dan mobilisasi enzim-enzim pada membran.

Hal ini akan menyebabkan membran endotel menjadi bocor dan molekul-molekul hingga seukuran enzim dapat keluar melewati membran yang rusak tersebut. Sebagai tambahan terhadap rusaknya fungsi membran sebagai barier tersebut, peroksidasi lipid juga mengakibatkan hilangnya homeostasis ion yang menyebabkan terjadinya gangguan kompartemen dan kekacauan ion utamanya ion Ca^{2+} . Hilangnya homeostasis Ca^{2+} menyebabkan hilangnya kontrol metabolik sel endotel (Eberhardt, 2001). Untuk memonitoring peroksidasi lipid, dapat digunakan metode spektrofotometri, kromatografi dan imunokimiawi. Analisisnya sendiri didasarkan pada analisis produk primer dari peroksidasi lipid sebagai diena terkonjugasi dan lipid hidroperoksida, atau produk sekundernya seperti MDA, alkana atau isoprostana (Sochor *et al.*, 2012).

2.6 Kerangka Teori Penelitian



BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah *true experimental laboratories* dengan rancangan *post test only randomized control group*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilakukan di beberapa tempat. Pertama, pembuatan ekstrak etanolik daun kepuh dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Jember. Kedua, pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Ketiga, pengukuran kadar MDA serum tikus putih jantan galur wistar dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini dimulai pada bulan September 2016 hingga selesai.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan populasi tikus (*Rattus norvegicus*) putih jantan dengan galur Wistar.

3.3.2 Sampel

Sampel dikelompokkan menggunakan metode *cluster random sampling*. Adapun kriteria inklusi pada sampel adalah sehat (tidak terdapat penampakan rambut kusam, rontok atau botak, dan bergerak aktif, berjenis kelamin jantan, berusia sekitar 3-4 bulan dan memiliki berat badan sekitar 100-200 gram. Sedangkan kriteria eksklusi pada sampel yaitu terdapat penurunan berat badan lebih dari 10% setelah masa adaptasi di dalam laboratorium, tikus putih selama penelitian tidak mau makan, sakit (terdapat penampakan rambut kusam, rontok atau botak, aktivitas kurang atau tidak aktif, keluarnya eksudat atau cairan yang tidak normal dari mata, mulut, anus atau genital, dan mati.

3.3.3 Besar Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah 25 ekor tikus putih jantan galur Wistar yang dipilih dengan menggunakan metode *cluster random sampling*. Sampel dikelompokkan atas 5 kelompok, yakni kelompok I sebagai kontrol negatif, kelompok II kontrol positif dengan induksi diet tinggi lemak, sedangkan kelompok III sampai V adalah kelompok perlakuan yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak etanolik daun kepuh.

Banyaknya pengulangan yang perlu dilakukan dalam penelitian ini dihitung berdasarkan rumus Federer:

$(n-1)(p-1) \geq 15$ (p = jumlah perlakuan, n = jumlah ulangan, $p=5$), sehingga:

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

Setelah dihitung dengan rumus Federer, didapatkan pengulangan harus dilakukan lebih dari atau sama dengan 4,75. Sehingga penelitian ini menggunakan pengulangan sebanyak 5 kali. Berdasarkan perhitungan tersebut, dalam penelitian ini terdapat lima perlakuan dengan empat replikasi pada setiap kelompok sehingga dibutuhkan sampel sebanyak 25 ekor.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanolik daun kepuh yang diberikan pada hewan coba, pemilihan fase gerak dan fase diam yang digunakan untuk penapisan fitokimia secara KLT, serta identifikasi pola kromatogram.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar MDA serum tikus putih jantan albino galur Wistar, kelompok senyawa yang terdeteksi pada lempeng KLT, dan pola kromatogram yang dimiliki oleh ekstrak etanolik daun kepuh.

3.4.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pemilihan jenis dan pemeliharaan hewan coba, pembuatan ekstrak kepuh, lama perlakuan, volume penotolan sampel, prosedur kerja penapisan fitokimia, dan pola kromatogram.

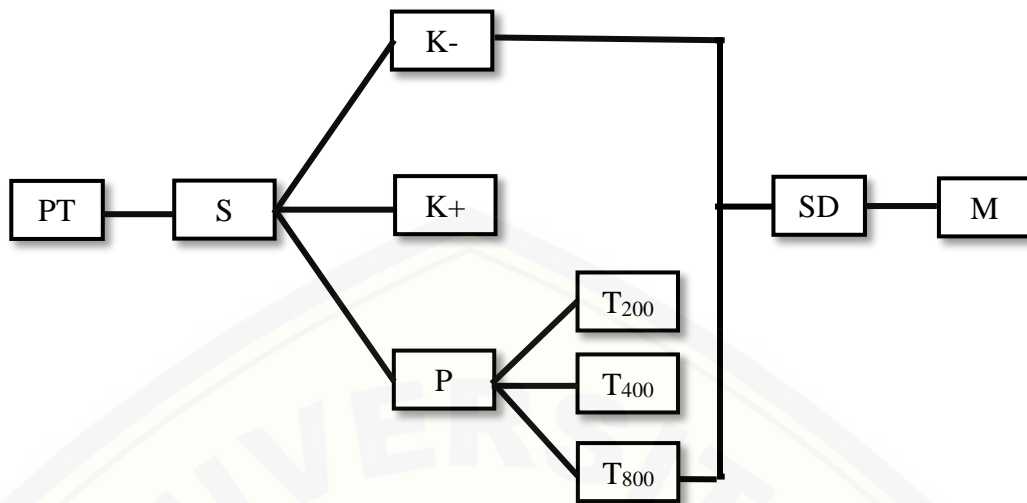
3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Daun kepuh (*Sterculia foetida L.*) diambil dari pohon yang sudah berbunga penuh. Daun yang dipetik adalah daun ketiga dari ujung hingga ke pangkal batang. Daun kepuh dipetik pada bulan September 2016 di Taman Nasional Meru Betiri.
- b. Diet tinggi lemak yang diinduksikan secara oral ke tikus putih jantan galur wistar menggunakan kuning telur bebek. Induksi kuning telur bebek dilakukan sekali sehari selama 21 hari pada masing-masing kelompok perlakuan kecuali kelompok kontrol negatif. Satu butir telur bebek yang memiliki berat 80g mengandung kolesterol sebanyak 619 mg/dL lebih tinggi bila dibandingkan dengan kuning telur ayam sebesar 266 mg/dL (Gunawan, 2007). Kuning telur bebek dipilih karena pada penelitian sebelumnya pemberian kuning telur bebek ini dapat meningkatkan kadar kolesterol dalam darah (Witosari, 2014).
- c. MDA adalah metabolit sekunder hasil peroksidasi lipid yang dapat diukur untuk menentukan radikal bebas secara tidak langsung di hati. Semakin meningkat radikal bebas di dalam tubuh akan memicu terjadinya stres oksidatif dan sekaligus meningkatkan peristiwa peroksidasi lipid di dalam tubuh. Akibatnya produk metabolisme sekunder hasil peroksidasi lipid yaitu MDA akan meningkat pula (Swastika, 2013).

3.6 Rancangan Penelitian

Jenis rancangan penelitian yang digunakan adalah *post test only randomized control group*. Secara skematis rancangan penelitian dapat digambarkan pada Gambar 3.1



Gambar 3.1. Skema rancangan penelitian

- PT : Populasi tikus putih jantan galur Wistar.
 S : Sampel yang digunakan dalam penelitian sebanyak 25 ekor tikus yang dihitung berdasarkan rumus Federer.
 K- : Kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan.
 K+ : Kelompok tikus yang diinduksi diet tinggi lemak saja.
 P : Kelompok tikus yang diberi perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok.
 T₂₀₀ : Kelompok tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak etanolik daun kepuh secara peroral dengan dosis 200 mg/kg BB.
 T₄₀₀ : Kelompok tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak etanolik daun kepuh secara peroral dengan dosis 400 mg/kg BB.
 T₈₀₀ : Kelompok tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan diberi ekstrak etanolik daun kepuh secara peroral dengan dosis 800 mg/kg BB.
 SD : Serum darah tikus yang diambil dari jantung setelah dilakukan terminasi pada hari ke-22 perlakuan
 M : Pengukuran kadar MDA plasma darah yang telah diberi reagen dengan metode kolorimetri

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, *rotary evaporator*, neraca, blender, kandang, tempat makan dan minum tikus, spektrofotometer Genesys 20, vortex mixer model (VM-300 Gemmy *Industrial Corp*), densitometer (CAMAG), mikropipet, sentrifuge (Gyrozen).

3.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kepuh yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri pada bulan September 2016, etanol teknis 70%, kuning telur bebek, NaCMC, akuades, kloroform 10% stock kit MDA, TCA 100%, HCL 1 N, Natrium tiosulfat 1%, kapas, masker, sarung tangan, spuit 5 mL, mikrotube, dan kertas saring.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus

Hewan coba berupa tikus (*Rattus norvegicus*) jenis Wistar putih jantan yang sehat dengan usia 3-4 bulan dan berat badan antara 100-200 gram sebanyak dua puluh lima ekor terbagi dalam lima kelompok. Masing-masing kelompok terdiri atas lima ekor hewan coba. Tikus yang dipilih harus memiliki tubuh yang sehat dan normal.

3.8.2 Persiapan Sampel Tikus

Tikus diadaptasi di dalam laboratorium selama satu minggu sebelum diberi perlakuan. Satu kandang diisi tiga tikus dan diletakkan di dalam ruangan dengan suhu 20 °C (± 3 °C). Tikus diberi pakan standar dan diberi air minum *ad libitum*. Kandang, tempat pakan dan minum, sisa pakan dan kotoran tikus setiap tiga hari sekali dibersihkan untuk menghindari timbulnya penyakit pada tikus.

3.8.3 Determinasi Tanaman

Determinasi daun kepuh dilakukan di Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Jember.

3.8.4 Pembuatan Simplisia Daun Kepuh

Pembuatan simplisia meliputi beberapa tahapan. Adapun tahapan tersebut dimulai dari pengumpulan bahan baku, sortasi basah, pencucian, pengubahan bentuk, pengeringan, sortasi kering, pengepakan, dan penyimpanan (Didik Gunawan, Sri

Mulyani, 2004). Daun kepuh dikeringkan dengan diletakkan pada ruangan tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Selanjutnya daun kepuh dikeringkan di dalam oven dengan suhu maksimal 70 °C. Setelah kering, simplisia diblender dan diayak dengan ayakan ukuran B40 agar diperoleh ukuran serbuk yang homogen.

3.8.5 Pembuatan Ekstrak Etanolik Daun Kepuh

Penyarian dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 70% (1:10) v/v dengan dua kali maserasi. Maserasi pertama dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam etanol 70% selama 5 hari. Kemudian filtrat I yang diperoleh dikumpulkan dan residu dimaserasi kembali dengan sisa pelarut selama 3 hari dengan sesekali diaduk. Filtrat II yang diperoleh dicampur dengan filtrat I, kemudian dievaporasi dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60 °C, kecepatan 90 rpm, dan tekanan *vacuum* 0,4-0,5 kPa, sehingga diperoleh ekstrak kental daun kepuh hingga beratnya konstan.

3.8.6 Penginduksian Ekstrak Etanolik Daun Kepuh

Pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB secara per oral pada tikus jantan galur wistar dilakukan sebanyak satu kali sehari selama 21 hari. Langkah pertama dimulai dengan pengenceran ekstrak menggunakan CMC Na 0,5%. Selanjutnya, ekstrak etanolik daun kepuh yang telah diencerkan dimasukkan ke dalam mulut tikus hingga perlahan sampai ke lambung melalui sonde. Pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dilakukan satu kali sehari selama 21 hari pada di malam hari pada jam yang sama.

3.8.7 Penginduksian Diet Tinggi Lemak

Pemberian diet tinggi lemak dilakukan selama 21 hari. Diet tinggi lemak yang diberikan merupakan kuning telur bebek yang disondekan sekali sehari pada sore hari sebanyak 5 g/200 g BB pada setiap kelompok tikus kecuali kelompok kontrol. Kuning telur dapat meningkatkan kadar kolesterol total tikus dengan dosis 5 g/200 g berat badan tikus (Lamanepa, 2005). Pemberian diet tinggi lemak ini bertujuan untuk membuat tikus yang diinduksi mengalami perlemakan hati sebagai

akibat dari hiperlipidemia (Winarsi *et al.*, 2016).

3.8.8 Terminasi Hewan Coba

Hewan coba diterminasi pada hari ke-22 dengan menggunakan zat anestetik secara inhalasi yaitu kloroform. Tikus dimasukkan ke dalam toples yang telah diberi kapas yang dibasahi kloroform. Toples kemudian ditutup dan ditunggu hingga tikus benar-benar tidak sadar atau pingsan.

3.8.9 Pengukuran Kadar MDA

Pertama dibuat 100 μL stok kit MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 $\mu\text{g/mL}$. Selanjutnya, stok kit MDA dengan berbagai konsentrasi yang telah dibuat sebelumnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Kemudian ditambahkan 550 μL akuades dan ditambahkan 100 μL TCA 100% hingga homogen. Setelah campuran homogen, campuran ditambahkan dengan 250 μL HCl 1 N dan dihomogenkan kembali. Selanjutnya ditambahkan 100 μL natrium tiosulfat 1% ke dalam campuran dan dihomogenkan kembali. Kemudian campuran yang diperoleh disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 500 rpm. Setelah itu, campuran diinkubasi di dalam penangas air dengan suhu 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit. Kemudian didinginkan dalam suhu ruang. Setelah itu, campuran diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV Vis dengan panjang gelombang maksimal 533 nm. Kemudian dari hasil absorbansi, dibuat kurva standar MDA dengan konsentrasi sebagai nilai x dan kadar MDA sebagai nilai y.

Sampel darah diambil dari jantung sebanyak 3 mL. Darah diambil dari jantung menggunakan spuit kemudian ditampung dalam tabung. Sampel darah kemudian disentrifuse dan diambil supernatannya. Selanjutnya diambil 100 μL supernatan sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kecil. Selanjutnya, ditambahkan 550 μL akuades dan ditambahkan 100 μL TCA 100% lalu dihomogenkan dengan vortex. Setelah homogen, ditambahkan 250 μL HCL 1N dan dihomogenkan dengan vortex. Kemudian ditambahkan 100 μL Na-Thiosulfat 1% ke dalam campuran dan dihomogenkan dengan vortex kembali. Selanjutnya, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit. Kemudian,

campuran diinkubasi di dalam penangas air dengan suhu 100 °C selama 30 menit. Setelah diinkubasi, campuran didinginkan pada suhu ruang dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV Vis dengan panjang gelombang maksimal 533 nm. Hasil absorbansi kemudian dimasukkan ke dalam persamaan regresi kurva standar MDA sebagai nilai y. Kadar MDA dapat dicari melalui persamaan sebagai nilai x.

3.8.10 Penapisan Fitokimia dengan Metode KLT dan *Tube Test*

a. Penapisan Fitokimia dengan Metode KLT

Penapisan fitokimia dengan metode KLT dilakukan untuk mengidentifikasi adanya kelompok senyawa alkaloid, flavonoid, saponin atau steroid, terpenoid atau steroid bebas, dan polifenol. Fase gerak yang dipilih adalah butanol: asam asetat glasial: air (4:1:5). Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄. Noda dieluasi dengan jarak rambat 8 cm dan disemprot dengan penampak noda yang berbeda-beda.

1) Uji Alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan 0,3 gram ekstrak ke dalam 5 mL HCl 2 N lalu dipanaskan selama 2-3 menit sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,3 gram NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat ditambah dengan 5 mL HCl 2 N. Selanjutnya larutan ditambah dengan NH₄OH 28% hingga larutan menjadi basa. Setelah larutan basa, dilakukan ekstraksi dengan 5 mL kloroform bebas air dan disaring. Filtrat diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dalam metanol dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT. Setelah eluasi selesai dan lempeng dikeringkan, lempeng KLT disemprot dengan penampak noda dragendorf. Jika timbul warna jingga menunjukkan adanya alkaloid dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

2) Uji Flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara mengocok 0,3 gram ekstrak dengan 3 mL n-heksana berkali-kali hingga ekstrak n-heksana tidak berwarna. Selanjutnya residu yang diperoleh dilarutkan ke dalam etanol dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT. Setelah eluasi selesai dan lempeng dikeringkan, lempeng KLT

disemprot dengan penampak noda sitroborat. Jika timbul noda berwarna kuning intensif menunjukkan adanya flavonoid dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

3) Uji Sapogenin/ Steroid

Uji sapogenin dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram ekstrak ke dalam 5 mL HCl 2 N lalu dididihkan dan ditutup dengan corong berisi kapas basah selama 2 jam untuk menghidrolisis saponin. Setelah dingin, ditambahkan amonia sedikit demi sedikit hingga netral. Kemudian dilakukan ekstraksi dengan 3 mL n-heksana. Selanjutnya diuapkan hingga tersisa 0,5 mL dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT. Setelah eluasi selesai dan lempeng dikeringkan, lempeng KLT disemprot dengan penampak noda anisaldehida asam sulfat kemudian lempeng dipanaskan. Jika timbul noda berwarna merah ungu atau ungu menunjukkan adanya sapogenin atau steroid dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

4) Uji Terpenoid/ Steroid Bebas

Uji terpenoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,3 gram ekstrak ke dalam etanol. Setelah eluasi selesai dan lempeng dikeringkan, lempeng KLT disemprot dengan penampak noda anisaldehida asam sulfat kemudian lempeng dipanaskan. Jika timbul noda berwarna merah ungu atau ungu menunjukkan adanya terpenoid atau steroid bebas dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

5) Uji Polifenol

Uji polifenol dilakukan dengan melarutkan 0,3 gram ekstrak ke dalam 10 mL akuades panas, diaduk dan dibiarkan hingga temperatur kamar. Selanjutnya larutan ditambah dengan tiga hingga empat tetes NaCl 10%, diaduk, disaring, dan diambil filtratnya. Setelah eluasi selesai dan lempeng dikeringkan, lempeng KLT disemprot dengan penampak noda FeCl_3 . Jika timbul noda berwarna hitam menunjukkan adanya polifenol dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

b. Penapisan Fitokimia dengan *Tube Test*

1) Uji Buih

Uji buih dilakukan untuk mengidentifikasi adanya saponin dalam ekstrak etanolik daun kepuh. Uji buih dilakukan dengan memasukkan 0,3 gram ekstrak ke

dalam 10 mL akuades. Selanjutnya campuran tersebut dikocok dengan kuat selama ± 30 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama lebih dari 30 menit dengan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan menunjukkan adanya saponin dalam ekstrak etanolik daun kepuh (Stahl, 1973).

2) Uji Tanin

Uji tanin dilakukan dengan melarutkan 0,3 g ekstrak ke dalam 10 mL akuades panas. Selanjutnya ditambahkan 3-4 tetes 10% NaCl ke dalam campuran, lalu diaduk dan disaring. Kemudian ditambahkan gelatin 1% ke dalam campuran. Adanya tanin akan mengendapkan protein pada gelatin. Tanin bereaksi dengan membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Harborne, 1996)

3.8.11 Pembuatan Pola Kromatogram dengan Metode KLT-Densitometri

Pola kromatogram dilakukan dengan metode KLT-densitometri. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄. Fase gerak yang digunakan adalah campuran antara etil asetat: metanol: air (9:2:2), n-heksana: etil asetat (4:1), butanol: asam asetat glasial: air (4:1:5), dan kloroform:etil asetat (1:9). Namun dipilih fase gerak yang mampu memisahkan noda-noda dalam sistem KLT dengan baik (Stahl, 1973). Setelah dieluasi, lempeng KLT dipindai dengan densitometer pada panjang gelombang 254 nm.

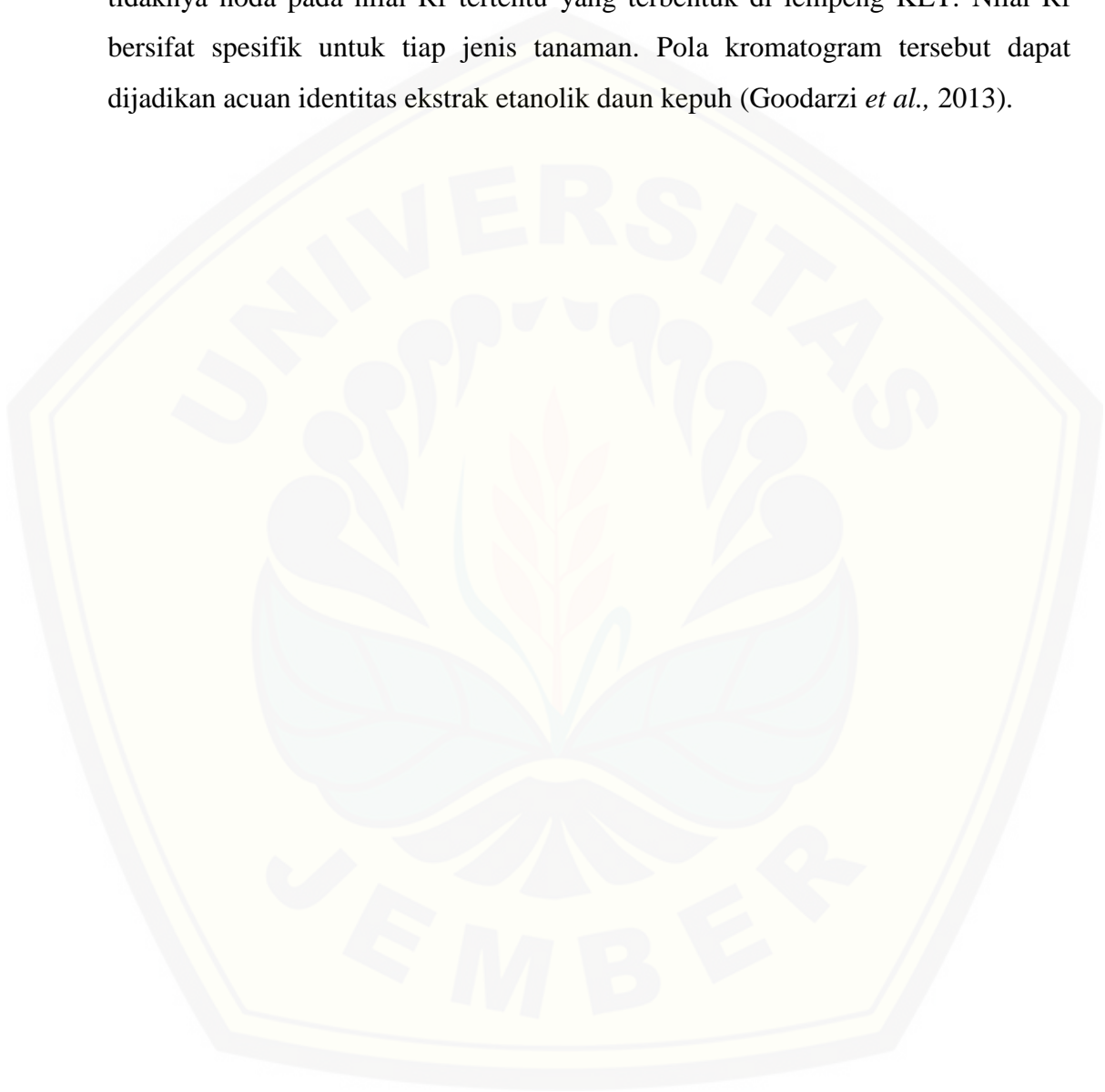
3.9 Analisis Data

Kadar MDA yang diperoleh selanjutnya dicari nilai rata-rata berikut standar deviasinya dan dibuat dalam bentuk grafik. Karena distribusi data normal namun tidak homogen, analisis dapat dilanjutkan dengan metode Kruskal Wallis. Jika nilai signifikansinya $< 0,05$ atau terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilanjutkan uji *Mann-Whitney* dengan taraf kepercayaan sebesar 95%.

Penapisan fitokimia menghasilkan data deskriptif, yaitu positif atau negatif mengandung kelompok senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid dan polifenol berdasarkan metode KLT. Positif atau tidaknya kelompok senyawa tersebut ditentukan dari terbentuknya warna pada lempeng KLT setelah disemprot dengan reagen spesifik pada kelompok senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, dan

polifenol (Stahl, 1973); ada tidaknya buih yang terbentuk saat uji saponin; serta adanya endapan setelah ditambah gelatin pada uji tanin (Harborne, 1987).

Pola kromatogram yang diperoleh menghasilkan data deskriptif berupa ada tidaknya noda pada nilai Rf tertentu yang terbentuk di lempeng KLT. Nilai Rf bersifat spesifik untuk tiap jenis tanaman. Pola kromatogram tersebut dapat dijadikan acuan identitas ekstrak etanolik daun kepuh (Goodarzi *et al.*, 2013).



BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanolik daun kepuh (*Sterculia foetida*) dosis 200, 400, dan 800 mg/kg BB dapat menurunkan kadar MDA tikus putih jantan galur *Wistar* yang diinduksi diet tinggi lemak.
2. Ekstrak etanolik daun kepuh positif mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, dan triterpenoid berdasarkan penapisan fitokimia secara KLT dan positif mengandung saponin dan tanin berdasarkan metode penapisan fitokimia secara *tube test*.
3. Pola kromatogram ekstrak etanolik daun kepuh dengan metode KLT densitometri menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak butanol: asam asetat glasial:air (4:1:5) dengan panjang gelombang 254 nm menghasilkan empat puncak dengan dua puncak yang masih belum dapat terpisahkan dengan baik.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai identifikasi senyawa identitas yang terdapat pada tanaman kepuh.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas ekstrak etanolik daun kepuh sehingga diketahui batas aman penggunaannya.
3. Perlu dilakukan optimasi pemilihan fase gerak pada identifikasi pola kromatogram secara KLT agar diperoleh puncak senyawa yang dapat terpisahkan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Aluwong, T., Kawu, M., Raji, M., Dzenda, T., Govwang, F., Sinkalu, V., Ayo, J. 2013. Effect of Yeast Probiotic on Growth, Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Concentration of Broiler Chickens. *Antioxidants*. Issue 2. pp. 326-339.
- Asih, A., Gunawan, I. W. G. & Ariani, N. M. D. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Triterpenoid dari Ekstrak n-Heksana Daun Kepuh (*Sterculia foetida* L.) serta Uji Aktivitas Antiradikal Bebas. *Jurnal Kimia*. Juli. 4(2). pp. 135-140.
- Ayala, A., Munoz, M. F. & Arguellez, S. 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, pp. 1-31.
- Balitbangkes, Kemenkes. 2013. Riset Kesehatan Dasar: Riskesdas 2013. Jakarta: Kemenkes RI.
- Berkowitz, A. 2013. *Lecture Notes Patofisiologi Klinik*. Tangerang: Binarupa Aksara.
- DEPKES. 2007. Pharmaceutical Care untuk Penyakit Hati.
- Devlin, M. T. 2002. Bioenergetics and Oxidative Metabolism In : Biochemistry with Clinical Correlations. In: 5th ed. Canada: Wiley-liss, pp. 590-592.
- Eberhardt. 2001. *Reactive Oxygen Metabolites*. 2nd ed. Washington DC: CRC Press.
- El-Sherei, M., Ragheb, A. Y., Kassem, M., Saleh, N. 2016. Phytochemistry, Biological Activities and Economical Uses of The Genus *Sterculia* and The Related Genera : A Review. *Asian Pac J Trop Dis* 6(6), pp. 492-501
- Fajrilah, B. R. 2013. Pengaruh Pemberian Madu Terhadap Kadar Malondialdehyde (MDA) Plasma Darah pada Tikus yang Diinduksi Alloxan. *Sains Medika*, 5(2), pp. 98-100.
- Gunawan, L. 2007. *Hipertensi Tekanan Darah Tinggi*. 8th ed. Yogyakarta: Penerbit Kanisius.
- Hamidu, A. A. 2012. Phytochemical Constituents of The Leaves of *Sterculia setigera*. *IOSR Journal of Pharmacy*, Jan-Feb, 2(1), pp. 62-64.
- itis, n.d. *ITIS report*. [Online] Available at: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search topic=TSN&search value=506110#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search%20topic=TSN&search%20value=506110#null) [Accessed 15 April 2017].
- Jauniaux, E., T.Cindrova-Davies., J.Johns.,C. Dunster., J. Hempstock., FJ, Kelly., Burton. 2004. Distribution and Transfer Pathways of Antioxidant Molecules Inside The First Trimester Human Gestasional. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(3), pp. 1452-1458.

- Lamanepa. 2005. Perkembangan Profil Lipid dan Perkembangan Lesi Atherosklerosis pada Tikus Wistar yang diberi Diet Perasan Pare dengan Diet Perasan Pare dan Statin. *Tesis*.
- Langseth, L. 1995. *Oxidants, Antioksidants and Disease Prevention*. Belgium:ILSI Europe.
- Lesmana, L. A. 2012. Penyakit Perlemakan Hati Nonalkoholik (Non-alcoholic Fatty Liver Disease). In: *Buku Ajar Ilmu Penyakit Hati*. Jakarta: CV Sagung Seto, pp. 313-314.
- Li, S. *et al.* 2015. Review : The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, Issue 16, p. 26087–26124.
- Lu, J.-M., Lin, P. H., Yao, Q. & Chen, C. 2010. Chemical and Molecular Mechanisms of Antioxidants: Experimental Approaches and Model Systems. *J. Cell. Mol. Med.*, 14(4), pp. 840-860.
- Mari, K., Vadivu, R. & Radha, R. 2016. Phytochemical Screening on The Successive Extracts of Bark of Sterculia Foetida Linn.. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*, 2(4), pp. 288-294.
- Maryanti, A. 2014. *Budidaya Kepuh (Sterculia foetida Linn) untuk Antisipasi Kondisi Kering*. Bogor: PT Penerbit IPB Press.
- Metananda, A. A. 2016. Konservasi Kepuh (Sterculia foetida L.) di Kabupaten Sumbawa Nusa Tenggara Barat. *Tesis*, p. 1.
- Miles, B. 2003. Oxygen Metabolism and Oxygen Toxicity. In: *Basic Medical Biochemistry*. s.l.:Williams and Wilkins, pp. 327-328.
- Orisakeye, O. & Olugbade, T. 2012. Studies on Antimicrobial Activities and Phytochemical Analysis of the Plant Sterculia tragacantha lindl. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7(11), pp. 924-927.
- Orwa, C, A Mutua, Kindt R , Jamnadass R, Anthony. 2009 Agroforestry Database:a tree reference and selection guide version 4.0 (<http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>)
- Raaman, N. 2006. *Phytochemical Techniques*. New Delhi: New India Publishing Agency.
- Rahmawati, D. 2004. Uji Antiradikal Bebas Senyawa Golongan Flavonoid pada Ekstrak Metanol Buah Mengkudu (*Morinda Citrifolia* L.) secara Spektroskopi. *Skripsi*. Jurusan Kimia, FMIPA. Denpasar: Universitas Udayana
- Riley, P., O'Donohue, J. & Crook, M. 2007. A Growing Burden: The Pathogenesis, Investigation and Management of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Pathol*, Issue 60, pp. 1384-1391.
- Sayuti, K. & Yenrina, R. 2015. *Antioksidan, Alami dan Sintetik*. I ed. Padang: Andalas University Press.

- Singh, K. & Singh, S. 2015. Impact of Obesity on Malondialdehyde and Certain Antioxidants in North Indian Obese Punjabi Population. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, July-August, 6(4), pp. 1383-1389.
- Sochor, J. *et al.* 2012. Automation of Methods for Determination of Lipid Peroxidation. In: s.l.:s.n., pp. 132-154.
- Soemarto, W. 1996. Perlemakan Hati. In: *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I Edisi Ketiga*. Jakarta: Balai Penerbit FKUI, p. 333.
- Suryohudoyo, P. 1993. *Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas*. Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Surabaya.
- Swastika, A. P. A. 2013. Kadar Malondialdehyde (MDA) Pada Abortus Inkomplit Lebih Tinggi Dibandingkan dengan Kehamilan Normal. *Tesis*.
- Syafitri, V., A. & E. 2015. Gambaran Profil Lipid Pasien Perlemakan Hati Non-Alkoholik. *Jurnal Kesehatan Andalas*, 4(1), pp. 274-278.
- Tsalissavrina, I., Wahono, D. & Handayani, D. 2006. Pengaruh Pemberian Diet Tinggi Karbohidrat Dibandingkan dengan Diet Tinggi Lemak terhadap Kadar Trigliserida dan HDL Darah pada *Rattus novergicus* Galur Wistar. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, XXII(2), pp. 80-89.
- Tukozkan, N., Erdamar, H. & Seven, I. 2006. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat Tip Dergisi*, 11(2), pp. 88-92.
- Utomo, A. R., Retnowati, R. & Juswono, U. P. 2013. Pengaruh Konsentrasi Minyak Kenanga (*Cananga odorata*) terhadap Aktivasnya sebagai Antiradikal Bebas. *Kimia Student Journal*, 1(2), p. 265.
- Weyer, C *et al.* 2001. Hypoadiponectinemia in Obesity and Type 2 Diabetes: Close Association With Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(5), pp 1930-1935
- World Health Organization. Obesity and Overweight [Online] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> diakses pada tanggal 15 April 2017 pukul 11.23 WIB
- Winarsi, H., Yuniaty, A. & Nuraeni, I. 2016. Improvement of Antioxidant and Immune Status of Atherosclerotic Rats Adrenaline and Egg Yolks Induced using Cardamom-Rhizome-Ethanollic-Extract: An Initial Study of Functional Food. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, Issue 9, pp. 264-270.
- Yuniastuti, E., Handayani, T. & Djoar, D. W. 2009. Identifikasi Dan Seleksi Keragaman Tanaman Pranajaya (*Sterculia Foetida* Linn.) Serta Teknologi Perbanyakkan Tanaman Secara In Vitro Untuk Penyediaan Bahan Baku Biofuel.

Zulviyati, 2015. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antihiperlipidemia Ekstrak Daun Kepuh (*Sterculia foetida*) : Metode DPPH dan Hambatan Lipase In Vitro. *Skripsi*. Universitas Jember



Lampiran 1 HASIL DETERMINASI TANAMAN



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jl. Kalimantan 37 Jember Jawa Timur
Telp 0331-330225

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 1022/UN25.1.9/TU/2016

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama : Endah Puspitasari, S. Farm., M.Sc. Apt.
NIP : 198107232006042002
Jur./Fak./PT : F. Farmasi / Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :

Sterculia foetida L. {Syn. *Clompanis foetidus* (L.) Kuntze.; *Clompanis moluccanus* Raf.;
Sterculia mexicana var. *guianensis* Sagot; Family – Malvaceae; Vernacular name – Kepuh,
Kalupat, Kabu-Kabu (Ind.); Kepoh (Jav.)}

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 14 April 2016

Mengetahui,
Pembantu Dekan I,



Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D.
NIP. 195910091986021001

a.n Ketua Laboratorium
Sekretaris Jurusan

Eva Tyas Utami, S.Si., M.Si.
NIP. 197306012000032001

Determined by Fuad Bahrul Ulum, S.Si, M.Sc.

Lampiran 2. PERHITUNGAN

a. Perhitungan Rendemen

Bobot serbuk kepuh = 600 g

Perbandingan bobot serbuk kepuh dengan pelarut yaitu 1:10

$$\begin{aligned} \text{Sehingga volume pelarut yang dibutuhkan adalah} &= \frac{10}{1} \times 600 \text{ g} \\ &= 6000 \text{ mL (6 L)} \end{aligned}$$

Pelarut 70% dibuat dengan mengencerkan etanol 96%, maka:

$$70\% \times 6000 \text{ mL} = 96\% \times X \text{ mL}$$

$$X = \frac{70\%}{96\%} \times 6000 \text{ mL}$$

$$X = 4375 \text{ mL (etanol 96\%)}$$

$$\text{Akuades} = 6000 \text{ mL} - 4375 \text{ mL} = 1625 \text{ mL}$$

Setelah diuapkan dengan rotavapor diperoleh ekstrak etanol kental daun kepuh = 69,6031 gram

$$\text{Rendemen yang diperoleh yaitu} = \frac{69,6031 \text{ g}}{600 \text{ g}} \times 100\% = 11,6\%$$

Jadi rendemen yang diperoleh adalah 11,6 g.

b. Perhitungan Pembuatan Larutan Stok

1. Ekstrak Etanol Daun Kepuh Dosis 200 mg/kg BB

Jumlah ekstrak etanol daun kepuh yang dibutuhkan (jika bobot tikus 125 g)

$$= 200 \text{ mg/kg BB} \times 0,125 = 25 \text{ mg/125g BB}$$

Ekstrak yang dibutuhkan dalam 21 hari = 25 mg/125g BB x 5 x 21 = 2,625 g

Bila sediaan ekstrak yang diberikan pada setiap tikus adalah 2 mL maka:

$$\text{Konsentrasi sediaan ekstrak etanol daun kepuh} = 25 \text{ mg/2 mL}$$

$$= 12,5 \text{ mg/mL}$$

$$= 0,0125 \text{ g/100 mL} =$$

$$0,0125\%$$

2. Ekstrak Etanol Daun Kepuh Dosis 400 mg/kg BB

Jumlah ekstrak etanol daun kepuh yang dibutuhkan (jika bobot tikus 125 g)
 $= 400 \text{ mg/kg BB} \times 0,125 = 50 \text{ mg/125g BB}$

Ekstrak yang dibutuhkan dalam 21 hari $= 50 \text{ mg/125g BB} \times 5 \times 21 = 5,250$
 g

Bila sediaan ekstrak yang diberikan pada setiap tikus adalah 2 mL maka:

Konsentrasi sediaan ekstrak etanol daun kepuh $= 50 \text{ mg/2 mL}$
 $= 25 \text{ mg/mL}$
 $= 0,25 \text{ g/100 mL} = 0,25\%$

3. Ekstrak Etanol Daun Kepuh Dosis 800 mg/kg BB

Jumlah ekstrak etanol daun kepuh yang dibutuhkan (jika bobot tikus 125 g)
 $= 800 \text{ mg/kg BB} \times 0,125 = 100 \text{ mg/200g BB}$

Ekstrak yang dibutuhkan dalam 21 hari $= 100 \text{ mg/200g BB} \times 5 \times 21 = 10,5$
 g

Bila sediaan ekstrak yang diberikan pada setiap tikus adalah 2 mL maka:

Konsentrasi sediaan ekstrak etanol daun kepuh $= 100 \text{ mg/2 mL}$
 $= 50 \text{ mg/mL}$
 $= 0,5 \text{ g/100 mL} = 0,5\%$

c. Perhitungan Dosis Diet Tinggi Lemak

Berat telur bebek = 67 gram

Berat kuning telur bebek = $67 \text{ g} \times 32\% = 21,44 \text{ gram}$

Dosis kuning telur bebek untuk tikus dengan berat 125 g

Dosis efektif = 5 g/200 g

$$\frac{125 \text{ g}}{200 \text{ g}} \times 5 \text{ g} = 3,125 \text{ g}$$

Jadi 1 kuning telur bebek dapat digunakan untuk $21,44 \text{ g} / 3,125 \text{ g} = 6,8 = 6$ ekor tikus

Volume kuning telur bebek = 18 mL

Volume kuning telur bebek yang dibutuhkan = $\frac{18 \text{ mL}}{6 \text{ ekor}} = 3 \text{ mL/ekor}$

Lampiran 3. DOSIS dan VOLUME PEMBERIAN DIET TINGGI LEMAK (5 g/200 mg BB)

a. Pemberian Diet Tinggi Lemak Hari Pertama Perlakuan

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis diet tinggi lemak (g)	Volume yang disondekan (mL)
K (-)	1	99,31	-	-
	2	107,20	-	-
	3	110,76	-	-
	4	124,00	-	-
	5	143,34	-	-
K (+)	1	105,68	2,64	2,64
	2	109,72	2,74	2,74
	3	115,37	2,88	2,88
	4	125,77	3,14	3,14
	5	140,22	3,50	3,50
T ₂₀₀	1	108,65	2,71	2,71
	2	109,32	2,73	2,73
	3	94,25	2,36	2,36
	4	124,50	3,11	3,11
	5	138,00	3,45	3,45
T ₄₀₀	1	109,00	2,73	2,73
	2	116,10	2,90	2,90
	3	115,00	2,88	2,88
	4	123,48	3,09	3,09
	5	136,65	3,41	3,41
T ₈₀₀	1	113,21	2,83	2,83
	2	112,02	2,80	2,80
	3	116,19	2,90	2,90
	4	120,48	3,01	3,01
	5	130,28	3,26	3,26

b. Pemberian Diet Tinggi Lemak Hari ke-16 Perlakuan

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis diet tinggi lemak (g)	Volume yang disondekan (mL)
K (-)	1	131,14	-	-
	2	121,42	-	-
	3	140,71	-	-
	4	142,01	-	-
	5	147,61	-	-
K (+)	1	148,95	3,72	3,72
	2	160,18	4,00	4,00
	3	165,48	4,14	4,14
	4	146,86	3,67	3,67
	5	145,30	3,63	3,63
T ₂₀₀	1	120,28	3,00	3,00
	2	133,96	3,35	3,35
	3	155,23	3,88	3,88
	4	152,26	3,81	3,81
	5	145,73	3,64	3,64
T ₄₀₀	1	121,43	3,04	3,04
	2	116,01	2,90	2,90
	3	143,29	3,58	3,58
	4	145,44	3,64	3,64
	5	142,09	3,55	3,55
T ₈₀₀	1	131,40	3,28	3,28
	2	144,06	3,60	3,60
	3	141,00	3,53	3,53
	4	138,01	3,45	3,45
	5	152,29	3,81	3,81

Lampiran 4. DOSIS dan VOLUME PEMBERIAN EKSTRAK KEPUH**a. Pemberian Ekstrak Kepuh Hari Pertama Perlakuan**

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis ekstrak etanol daun kepuh	Volume yang disondekan dalam CMC Na1% (mL)
K (+)	1	99,31	-	-
	2	107,20	-	-
	3	110,76	-	-
	4	124,00	-	-
	5	143,34	-	-
K (-)	1	105,68	-	-
	2	109,72	-	-
	3	115,37	-	-
	4	125,77	-	-
	5	140,22	-	-
T ₂₀₀	1	108,65	200 mg/kg BB	1,74
	2	109,32	200 mg/kg BB	1,75
	3	94,25	200 mg/kg BB	1,51
	4	124,50	200 mg/kg BB	1,99
	5	138,00	200 mg/kg BB	2,21
T ₄₀₀	1	109,00	400 mg/kg BB	1,74
	2	116,10	400 mg/kg BB	1,86
	3	115,00	400 mg/kg BB	1,84
	4	123,48	400 mg/kg BB	1,98
	5	136,65	400 mg/kg BB	2,19
T ₈₀₀	1	113,21	800 mg/kg BB	1,81
	2	112,02	800 mg/kg BB	1,79
	3	116,19	800 mg/kg BB	1,86
	4	120,48	800 mg/kg BB	1,93
	5	130,28	800 mg/kg BB	2,08

b. Pemberian Ekstrak Kepuh Hari ke-16 Perlakuan

Kelompok	Nomor perlakuan	Berat badan (g)	Dosis ekstrak etanol dauh kepuh	Volume yang disondekan dalam CMC Na1% (mL)
K (+)	1	131,14	-	-
	2	121,42	-	-
	3	140,71	-	-
	4	142,01	-	-
	5	147,61	-	-
K (-)	1	148,95	-	-
	2	160,18	-	-
	3	165,48	-	-
	4	246,86	-	-
	5	145,30	-	-
T ₂₀₀	1	120,28	200 mg/kg BB	1,92
	2	133,96	200 mg/kg BB	2,14
	3	155,23	200 mg/kg BB	2,48
	4	152,26	200 mg/kg BB	2,44
	5	145,73	200 mg/kg BB	2,33
	6	182,03	200 mg/kg BB	2,91
T ₄₀₀	1	121,43	400 mg/kg BB	1,94
	2	116,01	400 mg/kg BB	1,86
	3	143,29	400 mg/kg BB	2,29
	4	145,44	400 mg/kg BB	2,33
	5	142,09	400 mg/kg BB	2,27
T ₈₀₀	1	131,40	800 mg/kg BB	2,10
	2	144,06	800 mg/kg BB	2,30
	3	141,00	800 mg/kg BB	2,26
	4	138,01	800 mg/kg BB	2,21
	5	152,29	800 mg/kg BB	2,43

Lampiran 5. TABEL KADAR MDA SERUM TIKUS

KELOMPOK	ABSORBANSI	KADAR MDA	RATA-RATA	SD	CV
K(-)	1,80	25,19			
K(-)	2,23	31,37			
K(-)	0,84	11,40	23,86	7,53	3,76
K(-)	1,96	27,49			
K(-)	1,71	23,86			
K(+)	5,91	84,29			
K(+)	4,06	57,63			
K(+)	5,45	77,62	65,96	15,89	7,95
K(+)	3,13	44,31			
K(+)	4,64	65,96			
T200	3,29	46,60			
T200	2,99	42,22			
T200	3,57	50,55	45,24	3,62	1,81
T200	2,94	41,60			
T200	3,20	45,24			
T400	3,19	45,14			
T400	3,26	46,18			
T400	3,07	43,47	44,20	1,59	0,80
T400	2,97	42,00			
T400	3,12	44,20			
T800	2,54	35,77			
T800	2,46	34,73			
T800	2,70	38,06	37,16	2,99	1,49
T800	2,97	42,00			
T800	2,50	35,25			

Lampiran 6. HASIL UJI NORMALITAS MDA

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar MDA	Kontrol negatif	.300	5	.161	.883	5	.325
	Kontrol positif	.168	5	.200*	.976	5	.912
	Dosis 200 mg/kgBB	.198	5	.200*	.936	5	.640
	Dosis 400 mg/kgBB	.124	5	.200*	.994	5	.993
	Dosis 800 mg/kgBB	.279	5	.200*	.850	5	.194

*. This is a lower bound of the true significance

a. Lilliefors Significance Correction

Berdasarkan hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* diperoleh nilai signifikansi lebih besar dari 0,05 yang dapat diinterpretasikan distribusi data adalah normal.

Lampiran 7. HASIL UJI HOMOGENITAS VARIAN MDA

Test of Homogeneity of Variances			
Kadar MDA			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.474	4	20	.010

Berdasarkan hasil uji homogenitas, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,01 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti distribusi data kadar MDA tidak homogen.

Lampiran 8. HASIL UJI KRUSKAL WALLIS**Test Statistics^{a,b}**

Kadar MDA	
Chi-Square	20.310
df	4
Asymp. Sig.	.000

Distribusi data yang diperoleh normal namun tidak homogen, sehingga dilakukan uji non parametrik yaitu *Kruskall Wallis*. Nilai signifikansi yang diperoleh sebesar 0,000 atau lebih kecil dari 0,05. Interpretasi dari nilai signifikansi tersebut adalah terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok diet tinggi lemak yang diberi ekstrak etanolik daun kepuh dengan yang tidak diberi ekstrak etanolik daun kepuh.

Lampiran 9. HASIL UJI MANN-WHITNEY U

a. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok yang diberi ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB.

1. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok kontrol positif

Test Statistics^a

Kadar MDA	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol negatif yang tidak diberi diet tinggi lemak dengan kelompok kontrol positif yang diberi diet tinggi lemak.

2. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 200 mg/kgBB

Test Statistics^a

	Kadar MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol negatif yang tidak diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 200 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

3. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 400 mg/kgBB

Test Statistics^a

	Kadar MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol negatif yang tidak diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 400 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

4. Perbandingan antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 800 mg/kgBB

Test Statistics^a

	Kadar MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 800

mg/kgBB sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol negatif yang tidak diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 800 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

b. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok yang diberi ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB, 400 mg/kgBB, dan 800 mg/kgBB.

1. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 200 mg/kgBB

Test Statistics ^a	
	Kadar MDA
Mann-Whitney U	3.000
Wilcoxon W	18.000
Z	-1.984
Asymp. Sig. (2-tailed)	.047
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.056 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB sebesar 0,047 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol positif yang hanya diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 200 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

2. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 400 mg/kgBB

Test Statistics^a

	Kadar MDA
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-2.193
Asymp. Sig. (2-tailed)	.028
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.032 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB sebesar 0,028 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol positif yang hanya diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 400 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

3. Perbandingan antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 800 mg/kgBB

Test Statistics^a

	Kadar MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol positif dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada kelompok kontrol positif yang hanya diberi diet tinggi lemak dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dengan dosis 800 mg/kgBB dan diinduksi diet tinggi lemak.

c. Perbandingan antar kelompok dosis

1. Perbandingan antara kelompok dosis 200 mg/kgBB dengan 400 mg/kgBB

Test Statistics ^a	
	Kadar MDA
Mann-Whitney U	10.000
Wilcoxon W	25.000
Z	-.522
Asymp. Sig. (2-tailed)	.602
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.690 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB sebesar 0,602 atau lebih besar dari 0,05. Hal ini berarti tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB.

2. Perbandingan antara kelompok dosis 200 mg/kgBB dengan 800 mg/kgBB

Test Statistics ^a	
	Kadar MDA
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-2.402
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.016 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 800 mg/kgBB sebesar 0,016 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 800 mg/kgBB.

3. Perbandingan antara kelompok dosis 400 mg/kgBB dengan 800 mg/kgBB

Test Statistics ^a	
	Kadar MDA
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	15.000
Z	-2.611
Asymp. Sig. (2-tailed)	.009
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.008 ^b

Nilai signifikansi yang diperoleh dari uji Mann-Whitney antara kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 800 mg/kgBB sebesar 0,009 atau lebih kecil dari 0,05. Hal ini berarti terdapat perbedaan yang bermakna antara kadar MDA pada pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 400 mg/kgBB dengan kelompok pemberian ekstrak etanolik daun kepuh dosis 800 mg/kgBB.