

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium*
Walp.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM
GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES**



Diajukan Oleh :

Zainab

20144235A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2018

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium*
Walp.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM
GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
Derajat Sarjana Farmasi (S.Farm.)
Program Studi S1-Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Diajukan Oleh :

Zainab

20144235A

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA**

2018

PENGESAHAN SKRIPSI

berjudul :

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES

Oleh :

Zainab
20144235A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 29 Juni 2018

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi



Dekan,

Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt

Pembimbing,

Tri Wijayanti, S.Farm., MPH., Apt.

Pembimbing Pendamping,

Dr. Titik Sunarni, M.Si., Apt

Penguji :

1. Dr. Wiwin Herdwiani, M.Sc., Apt.
2. Endang Sri Rejeki, M.Si., Apt.
3. Desi Purwaningsih, S.Pd., M.Si.
4. Tri Wijayanti, S.Farm., MPH., Apt.

1.
.....
2.
.....
3.
.....

2.
.....

4.
.....

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah

Kupersembahkan karya ku kepada :

kepada ALLAH SWT. Sujud Syukur atas kasih sayang-MU telah memberikanku kekuatan, membekaliku dengan ilmu. Atas karunia serta kemudahan yang engkau berikan kepada hamba.

Sholawat serta salam selalu terlimpahkan kepada Nabi Muhammad SAW

UMI WA ABI

Kupersembahkan skripsi ini untuk Almarhum ABI semoga beliau bangga dengan perjuangan anaknya
Untuk MAMA yang selama ini selalu memberi dukungan, do'a, nasehat dan kasih sayang.

KAKAK

Kupersembahkan skripsi ini untuk kakak kakak ku Banun, Zainal, Zahirah yang selalu perhatian, memberikan semangat, dan do'a kepada adiknya ini. Tiada yang paling mengharukan selain berkumpul bersama kalian.

SAHABAT

Terima kasih untuk sahabat ku (ica, feбри, kiki, ani, solecha, kiny, farha, desi, hilda), teman teman (venin, bety, fania), teman KKN, dan teman angkatan 2014, FKK 1 atas doa, dukungan & semangat.

“Mukmin yang kuat lebih baik dan lebih dicintai oleh Allah daripada mukmin yang lemah, namun pada masing-masing ada kebaikannya. Bersemangatlah kamu mencapai sesuatu yang bermanfaat bagi kamu, mohonlah pertolongan kepada Allah dan janganlah kamu merasa tak berdaya.”
(HR Muslim)

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan, Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.”
(QS. Al-Insyirah 6-7)

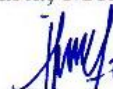
“Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya, Dan bahwasanya usaha itu kelak akan diperlihatkan (kepadanya) Kemudian akan diberi balasan kepadanya dengan balasan yang paling sempurna.”
(QS. An-Najm 38-41)

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diaçu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Mei 2018


Zainab

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **”EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium myrtifolium* Walp.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES”** Skripsi ini disusun sebagai syarat untuk memperoleh derajat sarjana di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

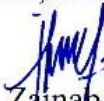
Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari bantuan, dukungan, dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga penulis menyampaikan terimakasih kepada yang terhormat :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA selaku rektor Universitas Setia Budi.
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt, selaku dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.
3. Tri Wijayanti, S.Farm., MPH., Apt, selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, nasehat, dan ilmunya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Dr. Titik Sunarni, S.Si., M.Si., Apt, selaku pembimbing pendamping yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, nasehat, ilmu, dan koreksi pada penulis.
5. Tim penguji yang telah meluangkan waktu serta memberikan kritik dan saran sehingga skripsi ini menjadi lebih baik.
6. Mama (Gamar Ba’agil) kakak (Zahar Banun Ba’agil, Zainal Abidin Ba’agil, Zahirah Ba’agil) dan semua keluarga terima kasih untuk do’a, dukungan dan semangat yang diberikan
7. Pak Yulianto dari PAU UGM yang telah membantu penelitian ini, memberi masukan dan ilmu yang bermanfaat
8. Segenap dosen, staff, laboran, dan asisten laboratorium, perpustakaan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan bantuan selama penelitian.

9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah membantu dalam menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dari pihak terkait maka skripsi ini tidak selesai dengan baik. Penulis juga menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis sangat berharap kritik dan saran. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi seluruh masyarakat dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya di bidang farmasi.

Surakarta, Mei 2018



Zainab

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT	xv
BAB I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang Masalah.....	1
B. Perumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian	4
D. Kegunaan Penelitian.....	4
BAB II. TINJUAN PUSTAKA.....	5
A. Tanaman Daun Pucuk Merah.....	5
1. Sistematika tanaman.....	5
2. Nama lain	5
3. Morfologi tanaman	5
4. Kandungan tanaman.....	6
5. Kegunaan tanaman	6
B. Simplisia.....	6
1. Pengertian simplisia	6
2. Pengumpulan simplisia	6
3. Pencucian	7
4. Pengeringan.....	7
C. Ekstrak.....	7
1. Ekstrak.....	7
2. Metode ekstraksi	7
2.1 Metode maserasi.....	7
2.2 Metode perkolasi.....	8
2.3 Metode infundasi	8
3. Pelarut	8
D. Antioksidan	9
1. Definisi antioksidan	9

2.	Penggolongan antioksidan	9
2.1	Antioksidan primer	9
2.2	Antioksidan sekunder	10
2.3	Antioksidan tersier	10
3.	Jenis jenis antioksidan.....	10
3.1	Antioksidan endogen.....	10
3.2	Antioksidan eksogen	10
4.	Enzim antioksidan.....	10
4.1	Superoksidase Dismutase (SOD)	11
4.2	Sistem glutation.....	11
4.3	Katalase	11
5.	Uji aktivitas antioksidan	12
5.1	Metode DPPH	12
5.2	Aktivitas peredaman radikal superoksida	13
5.3	Aktivitas penghambatan radikal hidroksil	13
5.4	Metode kekuatan pereduksi.....	13
5.5	Metode ADTS	14
5.6	Kapasitas serapan radikal oksigen	14
5.7	Metode FRAP.....	14
5.8	Lipid peroksidasi mikrosomal.....	14
E.	Diabetes Melitus	15
1.	Klasifikasi diabetes melitus.....	15
1.1	Diabetes melitus tipe I.....	15
1.2	Diabetes melitus tipe II	15
1.3	Diabetes melitus gestasional	16
2.	Tanda dan gejala	16
2.1	Gejala akut	16
2.2	Gejala kronik.....	16
3.	Diagnosis diabetes melitus.....	16
4.	Stress oksidatif pada diabetes	17
4.1	Autooksidasi glukosa	17
4.2	Glikasi protein non enzimatik	18
4.3	Jalur poliol-sorbitol	19
F.	Glutation Peroksidase.....	20
G.	Rutin.....	21
H.	Aloksan	22
I.	Glibenklamid.....	23
1.	Indikasi dan kontraindikasi	23
2.	Dosis dan atauran pakai	23
3.	Farmakokinetik	23
4.	Mekanisme kerja	24
5.	Efek samping.....	24
J.	Hewan Uji	24
1.	Sistematika hewan	24
2.	Karakteristik utama tikus putih.....	24
K.	Landasan Teori.....	25

L. Hipotesis.....	26
M. Kerangka Pikiran Penelitian.....	27
BAB III METODE PENELITIAN.....	28
A. Populasi Dan Sampel	28
B. Variabel Penelitian	28
1. Identifikasi variabel utama.....	28
2. Klasifikasi variabel utama.....	28
3. Definisi operasional variabel utama.....	29
C. Bahan, Alat Dan Hewan Uji	29
1. Bahan	29
2. Alat.....	29
3. Hewan uji	30
D. Jalannya Penelitian.....	30
1. Determinasi tanaman pucuk merah.....	30
2. Pembuatan serbuk daun pucuk merah.....	30
2.1 pegumpulan sampel.....	30
2.2 pengeringan daun pucuk merah	30
2.3 pembuatan serbuk.....	31
3. Ekstraksi.....	31
4. Penetapan susut pengeringan	31
5. Penetapan kadar air	31
6. Penetapan bobot jenis ekstrak	31
7. Identifikasi ekstrak	32
7.1 Saponin	32
7.2 Flavonoid	32
7.3 Alkaloid	32
7.4 Tanin	32
7.5 Steroid dan Terpenoid.....	33
8. Aktivitas daun pucuk merah terhadap radikal bebas DPPH	33
8.1 Penyiapan larutan DPPH.....	33
8.2 Penyiapan larutan ekstrak daun pucuk merah.....	33
8.3 Penyiapan larutan rutin	33
8.4 Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH.....	33
8.5 Penetapan <i>operating time</i>	33
8.6 Uji aktivitas antioksidan.....	33
8.7 Analisis data	34
9. Penentuan dosis uji aktivitas enzim GPx	34
9.1 Dosis glibenklamid.....	34
9.2 Dosis sediaan uji	34
9.3 Dosis aloksan monohidrat.....	34
10. Pembuatan larutan uji	34
10.1 Larutan suspensi cmc na 0,5%	34
10.2 Larutan glibenklamid	35
10.3 Larutan garam fisiologis	35
10.4 Larutan aloksan monohidrat.....	35
10.5 Larutan sediaan uji	35

11. Perlakuan hewan uji	35
12. Pengukuran aktivitas GPx	36
12.1 Preparasi sampel.....	36
12.2 Pengukuran aktivitas GPx	36
E. Analisis Data	37
F. Skema Pengujian Antioksidan DPPH.....	38
G. Skema Pengujian Enzim Glutation Peroksidase	39
BAB IV Hasil Penelitian Dan Pembahasan	40
A. Hasil Penelitian	40
1. Determinasi tanaman pucuk merah.....	40
2. Pembuatan serbuk daun pucuk merah.....	40
3. Pembuatan ekstrak etanol daun pucuk merah	41
4. Penetapan susut pengeringan	41
5. Penetapan kadar air serbuk daun pucuk merah.....	42
6. Penetapan berat jenis ekstrak daun pucuk merah.....	42
7. Identifikasi kandungan kimia daun pucuk merah	43
8. Hasil uji aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH.....	44
8.1 Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum	44
8.2 Hasil penetapan <i>operating time</i>	44
8.3 Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap DPPH	44
9. Hasil pengukuran aktivitas enzim GPx	46
BAB V. Kesimpulan Dan Saran	49
A. Kesimpulan	49
B. Saran	49
DAFTAR PUSTAKA	50
LAMPIRAN	59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
1. Mekanisme peredaman radikal bebas oleh DPPH	13
2. Struktur kimia rutin	21
3. Struktur kimia aloksan	22
4. Struktur kimia glibenklamid	23
5. Aktivitas antioksidan larutan uji berdasarkan nilai IC_{50}	45

DAFTAR TABEL

	Halaman
1. Tingkat Kekuatan Antioksidan Dengan Metode DPPH.....	12
2. Rendemen simplisia daun pucuk merah.....	41
3. Rendemen ekstrak daun pucuk merah.....	41
4. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun pucuk merah	42
5. Hasil penetapan susut pengeringan ekstrak daun pucuk merah	42
6. Hasil kadar air serbuk daun pucuk merah	42
7. Hasil penetapan berat jenis ekstrak daun pucuk merah	43
8. Hasil identifikasi serbuk dan ekstrak daun pucuk merah.....	43
9. Rata-rata hasil pengukuran aktivitas enzim GPx	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1. Hasil Determinasi Tanaman.....	60
2. Ethical Clearance	61
3. Tanaman Pucuk Merah	62
4. Alat	63
5. Identifikasi serbuk dan ekstrak.....	64
6. Hasil Perhitungan Rendemen Simplisia Daun Pucuk Merah.....	65
7. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Daun Pucuk Merah	66
8. Hasil Perhitungan Kadar Air Serbuk.....	67
9. Hasil Perhitungan Berat Jenis Ekstrak	68
10. Perhitungan Dosis	70
11. Hasil pengukuran GPx	73
12. Hasil Uji Statistik One Way Anova GPx	74
13. Radikal Bebas DPPH	76
14. Perhitungan Ekstrak Pucuk Merah	77
15. Perhitungan Rutin.....	78
16. Perhitungan IC ₅₀ Ekstrak.....	79
17. Perhitungan IC ₅₀ Rutin	81
18. Panjang Gelombang Maksimum	83
19. <i>Operating Time</i> Ekstrak	84
20. <i>Operating Time</i> Rutin	85

INTISARI

Zainab., 2018, EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH (*Syzygium Myrtifolium* Walp.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) merupakan daun yang berkhasiat sebagai antioksidan dan antidiabetes. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antioksidan dari daun pucuk merah secara *invivo* dan *invitro* serta untuk mengetahui dosis yang efektif dalam meningkatkan enzim glutation peroksidase.

Ekstrak etanol daun pucuk merah diuji aktivitas antioksidannya secara *invitro* menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH dengan parameter nilai IC_{50} . Uji antioksidan secara *invivo* dilakukan pada tikus diabetes yang diinduksi aloksan dengan parameter peningkatan aktivitas enzim glutation peroksidase pada hati tikus. Data aktivitas enzim yang diperoleh dianalisa dengan metode One Way anova ($p < 0,05$) dilanjutkan uji tukey.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun pucuk merah memiliki aktivitas antioksidan. aktivitas antioksidan ekstrak daun pucuk merah pada uji *invitro* memiliki nilai IC_{50} sebesar 53,46 $\mu\text{g/ml}$ hal ini menunjukkan daun pucuk merah memiliki antioksidan kuat. Hasil penelitian secara *invivo* menunjukkan bahwa ekstrak daun pucuk merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutation peroksidase pada dosis ekstrak 150 mg/kg BB dengan kadar enzim glutation peroksidase sebesar 63,28 U/mg dan memiliki berbeda signifikan dengan kontrol diabetes ($p < 0,05$).

Kata kunci : daun pucuk merah, antioksidan, DPPH, glutation peroksidase

ABSTRACT

ZAINAB., 2018, EFFECT OF ETHANOLIC EXTRACT PUCUK MERAH LEAF (*Syzygium myrtifolium*.Walp) AGAINST FREE RADICAL DPPH AND ACTIVITY OF GLUTATHIONE PEROXIDASE ENZYME IN DIABETIC RATS.THESIS, PHARMACY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY SURAKARTA.

Pucuk merah leaf (*Syzygium myrtifolium*.Walp) was the leaf that have an antioxidant and antidiabetic effects.This study aims to knew the antioxidant effect of pucuk merah leaf by in vitro and in vivo as well as to know effective dose in improving glutathione peroxidase enzyme.

Ethanollic extract of pucuk merah leaf was tested due to the antioxidant activity by in vitro use free radical DPPH with IC₅₀ value parameters. Antioxidant tested by in vivo at this study using was performed in alloxan-induced diabetic rats with elevated parameters of glutathione peroxidase enzyme activity in rat liver. The data of enzyme activity obtained were analyzed by One Way Anova ($p < 0,05$) than continued by tukey test.

The result of this study showed that the ethanolic extract of pucuk merah leaf had antioxidant activity. Antioxidant activity ethanolic extract of Pucuk merah leaf by in vitro test have an IC₅₀ as 53, 46 µg/ml, this shows pucuk merah leaf have strong antioxidant. The result at in vivo test had an activity was able to increased level of glutathione peroxidase enzyme in the effective dose at 150 mg/kg BB with glutathione peroxidase enzyme level of 63,28 U / mg and had significantly different with diabetes control ($p < 0.05$).

Keywords : pucuk merah leaf, DPPH, glutathione peroxidase, antioxidant.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Diabetes Melitus adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, dan penurunan sensitivitas insulin atau keduanya (DiPiro *et al.* 2005). Penderita Diabetes Melitus (DM) di dunia sampai saat ini jumlahnya semakin bertambah. Berdasarkan American Diabetes Association (ADA) tahun 2016, pada tahun 2010 sebanyak 25,8 juta penduduk Amerika menderita diabetes melitus dan tahun 2012 jumlahnya meningkat menjadi 29,1 juta penduduk. Peningkatan jumlah penderita diabetes melitus juga terjadi di Indonesia. Menurut Kementrian Kesehatan Republik Indonesia (2009), diperkirakan pada tahun 2030 prevalensi diabetes melitus di Indonesia mencapai 21,3 juta orang. Hasil Riskesdas 2013, prevalensi diabetes melitus berdasarkan wawancara terjadi peningkatan dari 1,1% tahun 2007 menjadi 2,1% tahun 2013 dan yang terdiagnosis oleh dokter sebanyak 1,5%.

Diabetes melitus dibagi menjadi 2 tipe. Diabetes melitus tipe 1, penyebabnya yaitu defisiensi sekresi insulin. Defisiensi sekresi insulin tersebut disebabkan kerusakan sel beta penghasil insulin di dalam pankreas. Sistem imun tubuh menyerang dan merusak sel beta (ADA 2012). Kerusakan pankreas ini dapat disebabkan oleh senyawa radikal bebas yang merusak sel-sel pada pankreas sehingga tidak dapat berfungsi (Studiawan & Santosa 2005). Diabetes melitus tipe 2, penyebabnya yaitu resistensi terhadap insulin dan tidak cukupnya respon sekresi insulin (ADA 2012).

Hiperglikemia menyebabkan stres oksidatif pada diabetes melitus stress oksidatif dalam tubuh akan meningkat sehingga pemakaian enzim intrasel juga meningkat yang menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan endogen (Niture *et al.* 2014; Kumawat *et al.* 2013; Taheri *et al.* 2012; Mohamed *et al.* 2013). Stres oksidatif terjadi karena menurunnya konsentrasi atau aktivitas antioksidan dan meningkatnya produksi radikal bebas *Reactive Oxygen Species* (Taheri *et al.*

2012). Tubuh dalam keadaan normal terlindungi dari stress oksidatif oleh antioksidan seperti SOD, katalase, GPx (Nair *et al.* 2012). Glutation peroksidase (GPx) merupakan antioksidan enzimatis yang mampu mendetoksifikasi hidrogen peroksida dan lipid hidroperoksida dengan mereduksi glutathion (Ozden *et al.* 2002), serta mencegah pembentukan radikal bebas baru, atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif (Chevion *et al.* 2003). Dalam kondisi diabetes status GPx turun (Pasaoglu *et al.* 2004).

Antioksidan merupakan zat yang memiliki aktivitas menangkal radikal bebas (Tursiman *et al.* 2012) yang bertindak sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dan mampu melindungi sel β pankreas dari reaksi peroksidasi berantai yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Patel *et al.* 2012). Pengobatan diabetes menggunakan antioksidan juga dapat mencegah terjadinya komplikasi diabetes (Aslan *et al.* 2007).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo*. Pengujian secara *in vitro* dapat menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) metode ini sederhana dan mudah dikerjakan. Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Pengujian antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan melihat status antioksidan endogen, salah satunya terhadap enzim glutathion peroksidase pada jaringan hepar tikus diabetes yang diinduksi oleh aloksan. Glutation peroksidase sebagai enzim peredam (*quenching*) radikal bebas merupakan enzim yang berperan penting dalam melindungi organisme dari kerusakan oksidatif (Sen *et al.* 2010).

Penyakit DM dan komplikasinya merupakan faktor utama kematian dini yang dapat menjadikan beban ekonomi keluarga karena biaya pengobatan yang cukup tinggi. Penderita diabetes membutuhkan terapi seumur hidup, sehingga bisa menimbulkan kemiskinan dan keterpurukan kualitas manusia (Kostova *et al.* 2012). Penderita diabetes saat ini banyak yang menggunakan obat herbal sebagai pilihan terapinya, karena harganya yang relatif terjangkau, mudah diperoleh, dan memiliki efek samping yang minimal dibandingkan dengan obat sintesis antidiabetes.

Pucuk merah adalah tanaman hias populer dari famili *Myrtaceae*. Daun pucuk merah diketahui banyak memiliki aktivitas, efek antiangiogenik dan antitumor (Aisha *et al.* 2013), antikanker (Memon *et al.* 2014), antihiperuresimia (Juwita *et al.* 2017), antioksidan (Iqbal 2014) dan sebagai antidiabetes (Hasti *et al.* 2016 & Sundhani *et al.* 2016).

Tanaman pucuk merah diketahui mengandung senyawa fenol, antioksidan flavonoid, dan asam batulinic (Aisha *et al.* 2013), alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid (Juwita *et al.* 2017), antosianin (Iqbal 2014), Daun muda tanaman pucuk merah mengandung minyak atsiri lebih banyak dibanding daun tua dengan jumlah rendemen 0.18% sedangkan rendemen daun tua tanaman pucuk merah sebesar 0,118% (Sembiring *et al.* 2015). Selain itu pada buah tanaman pucuk merah mengandung antosianin (Santoni *et al.* 2013).

Iqbal (2014) menyebutkan, antosianin dalam daun pucuk merah didapatkan dengan mengekstraksi menggunakan pelarut etanol yang telah diasamkan dengan asam asetat dan asam sitrat. Aktivitas antioksidan yang didapatkan untuk ekstrak etanol dengan asam asetat memiliki nilai IC_{50} 15,450 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan ekstrak etanol dengan asam sitrat memiliki nilai IC_{50} 29,238 $\mu\text{g/mL}$ kedua ekstrak memiliki nilai IC_{50} yang rendah, hal ini menunjukkan bahwa daun pucuk merah mempunyai aktifitas antioksidan yang sangat kuat karena mempunyai nilai IC_{50} dibawah 50 $\mu\text{g/mL}$. Juwita *et al.* (2017) mengatakan terdapat peneliti lain dimana fraksi etanol-air daun pucuk merah mempunyai antioksidan paling tinggi. Penelitian yang sudah dilakukan digunakan sebagai acuan untuk pengembangan penelitian selanjutnya, maka pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap radikal bebas DPPH dan enzim glutathion peroksidase pada tikus diabetes

B. Perumusan masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

Pertama, apakah ekstrak daun pucuk merah memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas dengan metode DPPH yang dinyatakan dalam nilai IC_{50} ?

Kedua, apakah ekstrak daun pucuk merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus putih jantan yang diinduksi aloksan ?

Ketiga, berapakah dosis ekstrak daun pucuk merah yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan :

Pertama, untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak daun pucuk merah terhadap radikal bebas dengan metode DPPH.

Kedua, untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun pucuk merah terhadap aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus putih jantan yang diinduksi aloksan.

Ketiga, untuk mengetahui dosis ekstrak daun pucuk merah yang paling efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan ilmu pengetahuan kepada masyarakat berkaitan dengan pengembangan obat tradisional mengenai penggunaan daun pucuk merah sebagai antioksidan. Memberikan dasar penelitian selanjutnya khususnya pengembangan penelitian antioksidan dan obat herbal lainnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Daun Pucuk Merah

1. Sistematika tanaman

Menurut taksonominya, daun pucuk merah diklasifikasikan Kingdom : Plantae, Subkingdom : Tracheobiota, Super Divisi : Spermatophyta, Divisio : Magnoliophyta, Sub Divisi : Angiospermae, Kelas : Magnoliopsida, Sub Kelas : Rosidae, Ordo : Myrtales, Famili : Myrtaceae, Sub Famili : Myrtoideae, Genus : *Syzygium*, Spesies : *Syzygium myrtifolium* Walp. (Gilman & Wiltson 2013).

2. Nama lain

Tanaman pucuk merah ini memiliki beberapa nama lokal yaitu Pokok Kelat Paya (Malaysia), Ubah Laut (Malaysia Timur), *Chinese Red-Wood* (Chinese), *Wild Cinnamon*, *Red-lip*, *Australian Brush Cherry* dan *Kelat Oil* (Memon *et al.* 2014).

3. Morfologi tanaman

Daun *Syzygium myrtifolium* Walp. atau pucuk merah merupakan tanaman perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 0,75-3 m yang memiliki daun tunggal berbentuk lancet, bertangkai sangat pendek hampir duduk, tumbuh berhadapan, permukaan daun bagian atas mengkilat; warna daun mengalami perubahan, ketika baru tumbuh berwarna merah menyala, kemudian berubah menjadi coklat, lalu berubah lagi menjadi warna hijau; ukuran daun panjang ± 6 cm dan lebar ± 2 cm, pangkal membulat hingga tumpul, tepi daun rata, ujung meruncing, permukaan gundul dan mengkilat, pertulangan daunnya menyirip, berbintik kelenjar minyak yang sangat halus, daging daun agak kaku. Bunga pucuk merah berupa bunga majemuk tersusun dalam malai berkarang terbatas. Akar pucuk merah berupa akar tunggang, sehingga bisa menahan pohonnya yang tinggi. Reproduksi pucuk merah secara alami adalah dengan biji, namun secara komersial tanaman ini dapat diperbanyak dengan cara cangkok atau stek batang. Manfaat pucuk merah pada umumnya hanya sebagai tanaman hias dan tanaman peneduh (Djamal 1990).

4. Kandungan kimia

Pucuk merah merupakan suatu tanaman perdu yang berdaun selalu hijau, kaya akan fenol, flavonoid antioksidan, dan asam betulinic (Aisha *et al.* 2013) antosianin (Iqbal 2014) alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid (Juwita *et al.* 2017) Buah pucuk merah mengandung antosianin (Santoni *et al.* 2013). Memon *et al.* (2014) juga menyatakan jika diremas, daunnya memproduksi suatu pewangi (*fragrance*) yang seperti dimiliki oleh *cinnamon*.

5. Kegunaan

Tanaman pucuk merah berkembang di Indonesia sebagai tanaman hias. Tanaman ini mempunyai banyak kegunaan, antara lain bagian buah dari tanaman ini berguna sebagai pewarna alami dan antioksidan (Santoni *et al.* 2013). Sedangkan daun hijau memiliki efek antiangiogenik dan antitumor (Aisha *et al.* 2013), antikanker (Memon *et al.* 2014) antihiperuresimia (Juwita *et al.* 2017) antioksidan (Iqbal 2014) dan sebagai antidiabetes (Hasti *et al.* 2016 & Sundhani *et al.* 2016).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan simplisia tidak lebih dari 60°C. Simplisia segar adalah bahan alam yang belum dikeringkan (Kemkes 2013).

Simplisia dibagi menjadi 3 macam yaitu pertama simplisia nabati berupa tanaman utuh, bagaian tanaman atau eksudat tanaman; kedua simplisia hewani adalah hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni; ketiga simplisia pelikan (mineral) yang belum diolah dengan cara-cara yang sederhana dan belum berupa zat-zat kimia murni (Depkes 1979).

2. Pengumpulan simplisia

Simplisia yang digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia nabati dan bagian yang digunakan adalah daun. Kadar senyawa aktif dalam suatu simplisia

berbeda-beda tergantung pada bagian yang digunakan, umur tanaman atau bagian tanaman saat dipanen, waktu panen, dan lingkungan tempat tumbuh (Depkes 1985).

3. Pencucian

Pencucian simplisia bertujuan untuk melepaskan kotoran (tanah, debu dan kotoran lainnya) yang melekat pada tanaman obat sehingga mikroba atau kotoran yang dapat merusak dan mengubah komposisi zat pada tanaman dapat dihilangkan (Dalimarta 2008). Cara pencucian juga sangat mempengaruhi jenis dan jumlah mikroba pada simplisia. Jika air yang digunakan pada simplisia itu kotor maka jumlah mikroba pada permukaan bahan simplisia bertambah dan air pada simplisia tersebut akan mudah mempercepat pertumbuhan mikroba (Depkes 1985).

4. Pengerinan

Pengerinan simplisia bertujuan mengurangi kadar air simplisia, sehingga simplisia tidak mudah rusak, berjamur, atau kandungan bahan aktif berubah jika disimpan dalam waktu cukup lama.

C. Ekstrak

1. Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai. Di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstraksi adalah pemisahan bahan aktif sebagai obat dari jaringan tumbuhan ataupun hewan menggunakan pelarut yang sesuai melalui prosedur yang telah ditetapkan. Selama proses ekstraksi, pelarut akan berdifusi sampai ke material padat dari tumbuhan dan akan melarutkan senyawa dengan polaritas yang sesuai dengan pelarutnya (Tiwari *et al.* 2011).

2. Metode ekstraksi

Beberapa metode ekstraksi yang sering digunakan untuk menarik senyawa aktif dalam simplisia terbagi menjadi 2 cara, yaitu cara dingin dan panas. Cara dingin adalah maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas adalah infundasi

2.1 Metode maserasi. Maserasi adalah proses penyarian serbuk simplisia dengan cara menempatkan dalam wadah tertutup dan direndam dengan pelarut, lalu dibiarkan berada pada suhu kamar selama minimal 3 hari sambil sering diaduk hingga larut. Setelah beberapa waktu yang ditentukan, maserasi disaring (Handa *et al.* 2008). Kelemahan dari proses maserasi adalah tidak dapat menghasilkan penyarian optimal untuk senyawa-senyawa yang kurang larut dalam suhu kamar. Namun karena dilakukan pada suhu kamar, maka hal tersebut menjadi salah satu kelebihan dari maserasi, yakni tidak menyebabkan terjadinya degradasi dari metabolit yang tidak tahan panas (Depkes 2000).

2.2 Metode perkolasi. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap perendaman, tahap perkolasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penampungan ekstrak) secara terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat). Perkolasi adalah prosedur yang paling sering digunakan untuk mengekstrak bahan aktif dalam penyusunan tingture dan ekstrak cairan (Tiwari *et al.* 2011)

2.3 Metode infundasi. Metode infundasi adalah proses penyarian menggunakan pelarut air dan dilakukan pada suhu air mendidih (96-98 °C) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Depkes 2000).

3. Pelarut

Pemilihan cairan pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, dan tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat (Depkes 1986).

Etanol digunakan sebagai cairan penyari karena diketahui dapat melarutkan alkaloid basa, antrakuinon, damar, flavonoid, glikosida, klorofil, kumarin, kurkumin, minyak menguap dan steroid, sedangkan lemak, malam, saponin dan tanin hanya sedikit larut. Etanol lebih selektif, kuman dan kapang sulit tumbuh dalam etanol 20 % ke atas, netral, tidak beracun, absorpsinya baik,

dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Depkes 1986).

Etanol yang digunakan untuk penyarian biasanya etanol 96 % karena tidak menyebabkan pembengkakan membran sel, memperbaiki stabilitas bahan obat terlarut, mampu mengendapkan albumin dan menghambat kerja enzim. Penggunaan etanol 96 % dapat menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana bahan pengotor hanya dalam skala kecil (Voight 1995).

Cairan penyari yang baik harus memenuhi persyaratan yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil dengan cara fisika kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar dan hanya menarik zat yang berkhasiat yang dikehendaki (Depkes 1986).

Sistem pelarut yang digunakan dalam ekstraksi dipilih berdasarkan kesesuaian pelarut dalam melarutkan jumlah maksimum zat aktif yang diharapkan larut dan sedikit mungkin untuk unsur yang tidak diharapkan (Ansel 1989).

D. Antioksidan

1. Definisi antioksidan

Antioksidan adalah suatu zat yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Holistic Health Solution 2011).

2. Penggolongan antioksidan

Antioksidan digolongkan berdasarkan sumbernya dan berdasarkan mekanisme kerjanya. Berdasarkan sumbernya antioksidan dibedakan menjadi antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Berdasarkan mekanisme kerjanya antioksidan primer, antioksidan sekunder dan antioksidan tersier.

2.1. Antioksidan primer. Pembentukan senyawa radikal bebas yang baru dapat dicegah oleh jenis antioksidan primer. Antioksidan tersebut mengubah

radikal bebas menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya, sebelum radikal bebas itu bereaksi.

Antioksidan primer seperti enzim GPx (Glutation peroksidase) yang berfungsi sebagai pelindung hancurnya sel-sel dalam tubuh dan mencegah peradangan karena radikal bebas. Enzim GPx ada di dalam tubuh kita dimana kerjanya membutuhkan bantuan gizi atau mineral lainnya seperti mangan, seng dan tembaga.

2.2. Antioksidan sekunder. Fungsi jenis ini adalah menangkap senyawa serta menghentikan terjadinya reaksi yang berantai dalam pembentukan radikal bebas. Contoh antioksidan sekunder yaitu vitamin E (alfa tokoferol), vitamin C (asam askorbat), betakaroten, kurkuminoid.

2.3. Antioksidan tersier. Radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dan jaringan. Contoh enzim yang memperbaiki DNA pada inti sel adalah metionin sulfoksida reduktase yang dapat mencegah terjadinya penyakit kanker yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi 2007).

3. Jenis-jenis antioksidan

3.1. Antioksidan endogen. Antioksidan endogen yaitu sejumlah komponen protein dan enzim yang disintesis dalam tubuh yang berperan dalam menangkal oksidasi oleh radikal bebas yang terdiri dari katalase, superoksida dismutase, serta protein yang berikatan dengan logam seperti transferin dan seruloplasmin. Antioksidan endogen dibagi menjadi 2 kelompok antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis. Antioksidan enzimatis seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutation peroksidase (GPx). Sedangkan antioksidan non enzimatis dibagi menjadi 2 kelompok lagi yaitu antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, bilirubin dan antioksidan larut air seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

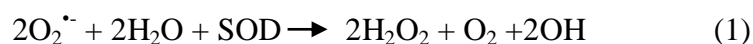
3.2. Antioksidan eksogen. Antioksidan eksogen bersumber dari makanan terdiri atas tokoferol (vitamin E), asam askorbat (vitamin C), karotenoid dan

flavonoid. Antioksidan jenis eksogen ini dapat dimodifikasi dengan makanan dan suplemen (Winarsi 2007).

4. Enzim antioksidan

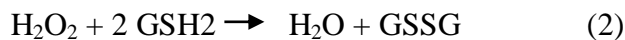
Tubuh dapat menghasilkan antioksidan berupa enzim yang aktif bila didukung oleh nutrisi pendukung atau mineral yang disebut kofaktor, diantaranya tembaga, seng, selenium, mangan, dan besi. Enzim ini memiliki berat molekul 30.000 atau lebih. Antioksidan yang dihasilkan antara lain antioksidan intraselular seperti superoksida dismutase, sistem glutathion, dan katalase (Evans 1991).

4.1 Superoksida Dismutase (SOD). SOD merupakan metaloenzim yang dapat mengandung atom tembaga, seng, atau besi yang dibentuk dalam sitosol atau yang mengandung mangan yang dibentuk di dalam matriks mitokondria (Combs 1992). SOD adalah antioksidan intraselular utama dalam sel aerobik. SOD berada di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas, dan paru-paru. Kerja enzim ini mengkatalisis pemecahan anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida (Evans 1991). Reaksi yang terjadi adalah:



Tingkat aktivitas SOD pada manusia kurang lebih sama, yang berbeda adalah kapasitas induksi SOD, yaitu kemampuan tubuh untuk meningkatkan jumlah SOD ketika harus merespon naiknya jumlah radikal oksigen di dalam tubuh. Makin tua seseorang, makin turun kekuatan SOD. SOD juga dikendalikan oleh gen (Niwa 1997).

4.2 Sistem glutathion. Sistem glutathion terdiri dari glutathion (GSH) dan glutathion peroksidase (GPx). Glutathion merupakan koenzim dan berperan melindungi sel dari radikal oksigen dan senyawa toksik serta terlibat dalam transpor asam amino. Glutathion terdapat dalam sitoplasma dan mitokondria sel mamalia, serta diproduksi di hati. Glutathion peroksidase merupakan tripeptida yang terdiri dari asam amino glisin, asam glutamat, sistein, dan empat selenium. Enzim ini mencegah peroksidasi lipid dengan menggunakan hidrogen peroksida untuk merubah glutathion menjadi glutathion teroksidasi (GSSG). Reaksi yang terjadi:



Glutation melindungi baik sitosol maupun membran, sedangkan glutathione peroksidase terdapat juga dalam plasma (Punchard *et al.* 1996).

4.3 Katalase. Katalase mengandung pusat empat atom besi dalam 500 asam amino dan dibentuk dalam retikulum endoplasma. Katalase banyak terdapat di hati dan eritrosit, namun rendah dalam otak, jantung, dan otot skelet. Kerja enzim ini mengkatalisis pengubahan hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen (Evans 1991 & Combs 1992).



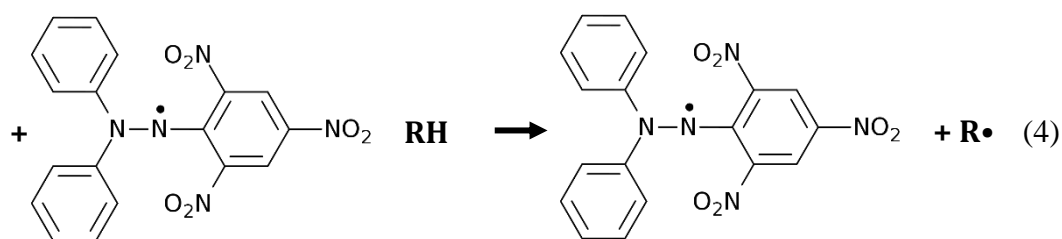
5. Uji aktivitas antioksidan *in vitro*

Terdapat beberapa metode uji aktivitas antioksidan secara *in-vitro* diantaranya metode DPPH, aktivitas peredam radikal superoksida, aktivitas penghambat radikal hidroksil, metode kekuatan pereduksi, metode ABTS, kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC), metode FRAP, lipid peroksidasi mikrosomal atau uji asam tobarbiturat.

5.1 Metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil). Pengukuran ini berprinsip pada reduksi larutan DPPH dalam metanol, suatu radikal bebas berwarna oleh peredam radikal bebas. Mekanisme peredaman radikal bebas DPPH oleh antioksidan terjadi ketika elektron tidak berpasangan menjadi berpasangan dengan adanya sebuah donor hidrogen sehingga DPPH menjadi stabil yang dapat dilihat pada Gambar 2. Uji peredaman radikal DPPH merupakan uji dekolorisasi untuk mengukur kemampuan antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan (meredam) radikal DPPH dengan memantau absorbansinya pada 517 nm dengan spektrofotometer (Antolovich *et al.* 2001 & Shivaprasad 2005). Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC_{50} (*Inhibitor Concentration*). IC_{50} merupakan konsentrasi larutan sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan (Molyneux 2004). Tabel 1 menunjukkan tingkat kekuatan antioksidan dengan nilai IC_{50} .

Tabel 1. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (Armala 2009).

Intensitas	Nilai IC ₅₀
Sangat Kuat	< 50 µg/mL
Kuat	50-100 µg/mL
Sedang	101-150 µg/mL
Lemah	> 150 µg/mL

Gambar 1. Mekanisme peredaman radikal bebas oleh DPPH (Prakash *et al.* 2001)

5.2 Aktivitas peredaman radikal superoksida. Uji peredaman radikal superoksida dikembangkan untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan hidrofilik untuk secara langsung bereaksi dengan radikal ini. Uji ini mengukur kemampuan antioksidan untuk berkompetisi dengan nitroblue tetrazolium (NBT) untuk meredam radikal superoksida. NBT yang berwarna kuning selama proses reduksi membentuk formazan yang berwarna biru yang diukur secara spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm (Shivaprasad 2005).

5.3 Aktivitas penghambatan radikal hidroksil. Kapasitas penghambatan radikal hidroksil suatu ekstrak berhubungan langsung dengan aktivitas antioksidannya. Metode ini melibatkan pembentukan radikal hidroksil secara *in vitro* menggunakan Fe³⁺ /askorbat/EDTA/H₂O₂ dengan menggunakan reaksi Fenton. Penghambatan radikal hidroksil dengan adanya antioksidan diukur. Pada salah satu metode radikal hidroksil yang dibentuk secara oksidasi dibuat untuk bereaksi dengan DMSO (*dimethyl sulphoxyde*), untuk menghasilkan formaldehida. Formaldehida yang terbentuk memberikan warna kuning intensif dengan pereaksi Nash (ammonium asetat 2 M dengan asam asetat 0,02 M dan asetil aseton 0,02 M dalam aquadest). Intensitas warna kuning yang terbentuk

diukur secara spektroskopi pada panjang gelombang 412 nm, dibandingkan dengan blanko negatif. Aktivitas ini dinyatakan dengan penghambatan radikal hidroksil (Shivaprasad 2005).

5.4 Metode kekuatan pereduksi. Metode ini berprinsip pada peningkatan serapan dari reaksi pencampuran. Peningkatan serapan menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan. Pada metode ini campuran antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, trikloroasetat dan besi (III) klorida, yang diukur pada panjang gelombang 700 nm. Peningkatan serapan dari reaksi menunjukkan penurunan kekuatan dari sampel (Shivaprasad 2005).

5.5 Metode ABTS (garam 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6 sulfonikacid) diamonium). Metode peredaman radikal kation $ABTS^{\bullet+}$ merupakan metode uji untuk mengukur kapasitas antioksidan yang secara langsung bereaksi atau meredam radikal kation ABTS yang dihasilkan dari reaksi kimia. $ABTS^{\bullet+}$ merupakan radikal dengan pusat nitrogen dengan karakteristik warna biru kehijauan yang ketika tereduksi oleh antioksidan menjadi bentuk nonradikal yang tidak berwarna. Metode ini berdasarkan penghambatan pembentukan kation radikal ABTS dengan absorpsi maksimum pada panjang gelombang 734 nm pada waktu yang telah ditentukan dengan spektrofotometer (Antolovich *et al.* 2001 & Shivaprasad 2005).

5.6 Kapasitas serapan radikal oksigen (ORAC). ORAC merupakan metode analisis baru yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan makanan dan senyawa kimia lainnya. Metode ini mengukur kemampuan makanan, vitamin, suplemen nutrisi, atau bahan kimia lainnya untuk melindunginya terhadap radikal bebas, atau bertindak sebagai antioksidan. Uji ini dilakukan dengan menggunakan trolox (analog vitamin E) sebagai standar untuk menentukan trolox ekuivalen (TE). Nilai ORAC kemudian dihitung dari TE dan dinyatakan sebagai satuan atau nilai ORAC. Semakin tinggi nilai ORAC, semakin besar kekuatan nilai antioksidannya. Pengukuran ini berdasarkan pembentukan radikal bebas menggunakan AAPH (*2,2-azobis-2-amido propane dihydrochloride*) dan pengukuran penurunan dari fluoresensi dengan adanya penghambat radikal (Shivaprasad 2005).

5.7 Metode FRAP. FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) merupakan salah satu uji tercepat dan sangat berguna untuk analisis rutin. Aktivitas antioksidan diukur dengan mengukur peningkatan serapan yang disebabkan oleh pembentukan ion Fe^{2+} dari pereaksi FRAP yang berisi TPTZ (2,4,6-tri-(2-pyridyl-s-triazine) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$) serapannya diukur pada 595 nm (Shivaprasad 2005).

5.8 Lipid peroksidasi mikrosomal atau uji asam tobarbiturat. Uji TBA salah satu uji yang sering dilakukan untuk mengukur peroksidasi lipid. Metode ini melibatkan isolasi mikrosom dari hati tikus dan induksi lipid peroksidasi dengan ion Fe^{3+} , menyebabkan produksi sejumlah kecil malonaldehida (MDA). TBA bereaksi dengan MDA membentuk kromagen merah muda, yang dapat dideteksi secara spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm (Shivaprasad 2005).

E. Diabetes Melitus

Diabetes melitus (DM) merupakan kelainan metabolisme yang disebabkan oleh terjadinya kerusakan pada sel-sel β pulau Langerhans dalam kelenjar pankreas, sehingga hormon insulin disekresikan dalam jumlah yang sedikit, bahkan tidak sama sekali (Price & Wilson 2006). Selain itu diabetes melitus juga disebabkan resistensi terhadap insulin dan tidak cukupnya respon sekresi insulin (ADA 2012).

1. Klasifikasi diabetes melitus

Jenis diabetes melitus menurut organisasi kesehatan dunia (WHO) yaitu : diabetes melitus tipe I, diabetes melitus tipe II dan diabetes gestasional.

1.1 Diabetes melitus tipe 1. Diabetes melitus tipe 1 (Diabetes Melitus yang tergantung insulin [Insulin Dependent Diabetes Melitus/ IDDM]) merupakan 5-10 persen dari semua kasus diabetes melitus, biasanya ditemukan pada anak atau orang dewasa dan tidak ada pembentukan insulin sehingga penderita memerlukan suntikan insulin setiap hari. Pada diabetes melitus tipe 1 terjadi pada sel β Langerhans sehingga mengakibatkan produksi insulin berhenti atau sedikit sekali (Nugroho 2006).

1.2 Diabetes melitus tipe 2. Diabetes melitus tipe 2 yaitu adanya resistensi insulin atau gangguan sekresi insulin. Pada tipe 2 ini tidak selalu dibutuhkan insulin, kadang-kadang cukup dengan diet dan antidiabetik oral. Karenanya tipe ini sering disebut dengan *non insulin dependent diabetes melitus* atau NIDDM (Robbins *et al.* 2007). Disebabkan oleh dua hal yaitu respon jaringan terhadap insulin atau sering disebut dengan resistensi insulin dan penurunan produksi insulin akibat regulasi sekresinya terganggu atau terjadi kerusakan fungsional pada sel β Langerhans. Sebagian besar penderita diabetes melitus tipe 2 disebabkan karena kegemukan karena kelebihan makanan (Nugroho 2006).

Patogenesis diabetes melitus tipe II lebih sedikit diketahui, meskipun tipe ini sering ditemukan. Pada diabetes tipe ini dapat terjadi akibat efek genetik dan juga dipengaruhi oleh lingkungan. Dua efek metabolisme yang menandai diabetes melitus tipe II adalah gangguan sekresi insulin pada sel β dan ketidakmampuan jaringan perifer merespon insulin (Robbins *et al.* 2007).

1.3. Diabetes melitus gestasional. Diabetes melitus yang terjadi pada kehamilan toleransi terhadap glukosa secara normal berfluktuasi selama kehamilan. Sebagian besar perempuan dengan diabetes melitus gestasional memperlihatkan pemulihan kadar glukosa normal setelah persalinan (Sacher & Mc Pherson 2004).

2. Tanda dan gejala

2.1 Gejala akut. Gejala penyakit DM dari satu penderita ke penderita lain bervariasi, bahkan mungkin tidak menunjukkan gejala apapun sampai saat tertentu. Pada permulaan gejala yang ditunjukkan meliputi serba banyak (tripoli) yaitu: banyak makan (poliphagia), banyak minum (polidipsia), banyak kencing (poliuria). Bila keadaan tersebut tidak segera diobati, akan timbul gejala nafsu makan mulai berkurang, berat badan turun dengan cepat (turun 5 – 10 kg dalam waktu 2 – 4 minggu), dan mudah lelah. Bila tidak lekas diobati, akan timbul rasa mual, bahkan penderita akan jatuh koma yang disebut dengan koma diabetik (Gunawan & Sulistia 2007).

2.2 Gejala kronik. Gejala kronik yang sering dialami oleh penderita DM adalah kesemutan, kulit terasa panas, atau seperti tertusuk-tusuk jarum, rasa tebal di kulit, kram, mudah mengantuk, mata kabur, gatal di sekitar kemaluan terutama wanita, gigi mudah goyah dan mudah lepas, kemampuan seksual menurun bahkan impotensi (Hingkua 2004).

3. Diagnosis diabetes melitus

Diagnosis DM harus didasarkan atas pemeriksaan konsentrasi glukosa darah. Penentuan diagnosis DM harus memperhatikan asal bahan darah yang diambil dan cara pemeriksaan yang dipakai. Pemeriksaan yang dianjurkan adalah pemeriksaan glukosa dengan cara enzimatis dengan bahan darah plasma vena. Kriteria diagnosis DM meliputi kadar glukosa plasma sewaktu ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L atau kadar glukosa plasma puasa ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L). Kadar glukosa plasma 2 jam pada TTGO ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L) sesudah pemberian glukosa 75 g (Sudoyo *et al.* 2006).

4. Stress oksidatif pada diabetes

Pada DM pertahanan antioksidan dan system perbaikan seluler akan terangsang sebagai respon tantangan oksidatif (Nuttal *et al.* 1999). Sumber stress oksidatif yang terjadi berasal dari peningkatan produksi radikal bebas akibat autooksidasi glukosa, penurunan konsentrasi antioksidan berat molekul rendah di jaringan, dan gangguan aktivitas pertahanan antioksidan enzimatis (Kowluru 2001). Kemaknaan stress oksidatif pada patologi penyakit sering tidak tentu (Halliwell & Gutteridge 1999). Stress oksidatif dan gangguan pertahanan antioksidan merupakan keistimewaan DM yang terjadi sejak awal penyakit. Stress oksidatif juga memiliki kontribusi pada perburukan dan perkembangan kejadian komplikasi. Beberapa studi mengungkapkan penurunan status antioksidan dalam plasma dan serum sampel dibandingkan kontrol berdasarkan usia. Fenomena ini dapat terjadi sejak anak-anak serta berjalan secara progresif dan memburuk sesuai perjalanan waktu dan berkembangnya komplikasi (Nuttal *et al.* 1999).

Diabetes pada anak ditemukan penurunan glutathion eritrosit, glutathion total, α -tokoferol plasma, dan β -karoten plasma secara bermakna. Penurunan berbagai antioksidan tersebut terkait dengan pembentukan senyawa penanda

adanya stress oksidatif, misalnya peningkatan lipid hidroperoksida, diena terkonjugasi, dan protein karbonil secara bermakna (Haffner 1999). Pada diabetes usia 50-60 tahun ditemukan peningkatan peroksidasi lipid sejak onset diabetes.

DM merupakan salah satu kelainan metabolik yang dapat menimbulkan komplikasi vascular dan nonvascular. Salah satu hipotesis penyebab munculnya berbagai komplikasi tersebut adalah stress oksidatif. Pada diabetes terdapat tiga jalur munculnya stress oksidatif, yaitu autooksidasi glukosa, glikasi protein nonenzimatik, dan jalur poliol sorbitol (aldose reduktase).

4.1 Autooksidasi glukosa. Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam dalam jumlah kecil seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen relatif. Autooksidasi glukosa terjadi pada fase I proses glikasi nonenzimatik pada protein yang secara lamiah masih bersifat reversibel. Fase ini merupakan sumber hidrogen peroksida yang mampu menghambat CuZn SOD. Selain hidrogen peroksida, radikal superoksida juga dihasilkan oleh proses autooksidasi glukosa tersebut serta terkait dengan pembentukan protein glikasi dalam plasma penderita diabetes. Akibat yang ditimbulkan berupa peningkatan aktivitas radikal superoksida serta kerusakan enzim superoksida dismutase (Soesilowati 2003 & Droge 2002).

4.2 Glikasi protein non enzimatik. Pada keadaan hiperglikemia, produksi berbagai pereduksi antara lain glukosa, glukosa-6-fosfat, dan fruktosa akan meningkat melalui proses glikolisis dan jalur poliol. Glukosa sebagai gula pereduksi dapat menjadi agen yang bersifat toksik. Sifat toksik tersebut disebabkan oleh kemampuan kimiawi gugus karbonil aldehyd yang dimilikinya. Meskipun sebagian besar keberadaan gula pereduksi dalam larutan sebagai struktur cincin nonaldehyd, glukosa dalam bentuk rantai lurus merupakan aldehyd (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Aldehyd merupakan senyawa yang mampu berikatan secara kovalen sehingga terjadi modifikasi protein. Modifikasi protein dapat dibangkitkan dalam tubuh melalui berbagai mekanisme enzimatik dan nonenzimatik (Anderson *et al.* 1999).

Selain glukosa, semua jenis gula pereduksi juga mampu menyelenggarakan reaksi glikasi pada bermacam protein. Selain protein, target

kerusakan lain adalah lipid-amino seperti *fosfatidiletanolamin*, dan DNA (Rahbani-Nobar *et al.* 1999). Reaksi pengikatan aldehid pada protein dikenal sebagai reaksi glikasi. Hewan dengan diabetes, proses glikasi dapat teramati secara luas pada berbagai organ dan jaringan termasuk ginjal, hati, otak, paru dan saraf (Oldfield *et al.* 2001). Secara keseluruhan, perubahan kimia ini dikenal sebagai reaksi Maillard (Beckman *et al.* 2001).

Reaksi Maillard dapat terjadi pada kondisi penuaan fisiologis *in vivo* sebaik kondisi *in vitro* serta meningkat pada keadaan hiperglikemia (Oldfield *et al.* 2001 & Ueno *et al.* 2002). Selain itu reaksi maillard juga berkaitan dengan komplikasi kronik DM. Reaksi ini secara umum terdiri atas 4 tahap, meliputi kondensasi non enzimatis gula pereduksi, aldehid atau ketosa dengan gugus amino bebas dari protein atau asam nukleat membentuk glikosilamin. Reaksi ini dikenal sebagai fase satu serta secara alamiah bersifat reversibel dan terjadi dalam beberapa jam (kurang dari 24 jam). Selanjutnya pada fase kedua akan terjadi penataan ulang glikosilamin menjadi produk Amadori. Reaksi ini terjadi akibat kadar glukosa yang masih tinggi dalam waktu lebih dari 24 jam. Produk Amadori tersebut bersifat toksik bagi jaringan namun masih reversibel. Kadar produk Amadori pada sejumlah protein meningkat sebanding dengan derajat hiperglikemia pada DM. Kemudian pada fase ketiga, penataan ulang dan dehidrasi berganda produk Amadori menjadi amino atau senyawa karbonil reaktivitas tinggi seperti *3-deoxyglucosane*. Fase terakhir reaksi antara senyawa karbonil dengan gugus amino lain dilanjutkan proses penataan ulang membentuk beragam *advance glycosylation end products* (AGE-product/AGEs) sebagai petunjuk *cross linking* dan *browning* pada protein (Niwa *et al.* 1997; Simanjuntak & Sudaryanti 1998; Carr & Frei 1999; Soesilowati 2003).

AGEs merupakan salah satu produk penanda modifikasi protein sebagai akibat reaksi gula pereduksi terhadap asam amino. Akumulasi AGEs di berbagai jaringan merupakan sumber utama radikal bebas yang mampu berperan dalam peningkatan stress oksidatif, serta terkait dengan patogenesis komplikasi diabetes mirip pada penuaan yang normatif. Pada diabetes, akumulasi AGEs secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta

katarak. Pengikatan AGEs terhadap reseptor makrofag spesifik (RAGE) mengakibatkan sintesis sitokin dan faktor pertumbuhan serta peningkatan stress oksidatif (Shoda *et al.* 1997; Carr & Frei 1999; Droge 2002; Ueno *et al.* 2002; Beckett & Kalsi 2003).

4.3 Jalur poliolsorbitol (aldose reduktase). Pada normoglikemia, sebagian besar glukosa seluler mengalami fosforilasi menjadi glukosa-6-fosfat oleh enzim heksokinase. Bagian kecil dari glukosa yang tidak mengalami fosforilasi memasuki jalur poliolsorbitol, yakni jalur alternatif metabolisme glukosa (Ueno *et al.* 2002). Melalui jalur ini, glukosa dalam sel dapat diubah menjadi sorbitol dengan bantuan enzim aldose reduktase (AR) (Nishimura 1998). Enzim aldose reduktase dapat ditemukan pada sejumlah jaringan mamalia termasuk lensa dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol dan retina. Enzim tersebut mengkonversi glukosa menjadi polialkohol sorbitol melalui reduksi gugus aldehyd glukosa (Rahbani-Nobar *et al.* 1999).

Konsentrasi sorbitol di dalam sel dalam keadaan normal rendah, tetapi apabila terjadi keadaan hiperglikemia konsentrasi sorbitol meningkat. Sorbitol dengan bantuan enzim sorbitol dehydrogenase (SDH), akan diubah menjadi fruktosa. Degradasi sorbitol ini berjalan lambat sehingga sorbitol menumpuk dalam sel, sehingga dapat menyebabkan peningkatan tekanan osmotik dan selanjutnya dapat merusak sel (Nishimura 1998). Masuknya substrat (substrat flux) melalui jalur poliolsorbitol, selain dapat meningkatkan kadar sorbitol dan fruktosa intraseluler, juga menurunkan rasio NADPH terhadap NADP⁺. Selain itu, rasio NADH terhadap NAD⁺ sitosolik juga menurun. Berkurangnya NADPH di dalam sel akibat meningkatnya AR dapat menghambat aktivitas enzim lain yang membutuhkan NADPH.

F. Glutation Peroksidase

Glutation peroksidase (GPx) merupakan salah satu antioksidan enzimatik yang mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dengan mengkatalisis berbagai hiperoksida dan merupakan suatu protein yang memiliki bentuk tetramer. Enzim ini mengandung atom selenium yang terikat sebagai

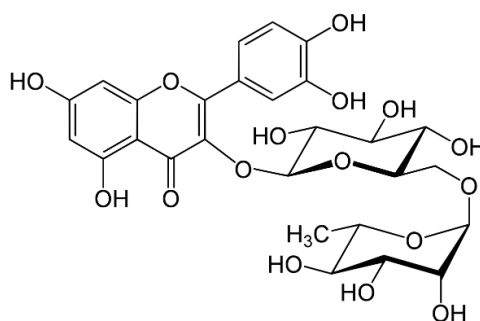
selenocysteine. Pada penderita diabetes menunjukkan penurunan vitamin E dan glutathion. Glutathion dalam bentuk tereduksi (GSH) terdapat dalam plasma manusia, intraseluler, dengan kemampuan sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas dengan fungsi hati secara umum sebagai buffer redoks dan kofaktor enzim glutathion peroksidase (GPx) (Setiawan & Suhartono 2005).

Dalam hepar dan sel darah merah terdapat glutathion peroksidase dengan konsentrasi tinggi, sedangkan jantung, ginjal, paru-paru, adrenal, lambung, dan jaringan adipose mengandung kadar glutathion peroksidase dalam kadar sedang. Glutathion peroksidase kadar rendah sering ditemukan dalam otak, otot, testis, dan lensa mata. Enzim glutathion peroksidase yang ditemukan dalam sitoplasma tersebut merupakan tetramer, dan mengandung selenosistein pada sisi aktifnya. Enzim ini bersifat nukleofilik, yang sangat mudah terionisasi dan mengakibatkan terlepasnya proton. Aktivitas enzim glutathion peroksidase juga ditemukan dalam mitokondria, plasma, dan saluran pencernaan. Dalam sitoplasma, enzim glutathion peroksidase bekerja pada membran fosfolipid yang teroksidasi sehingga dikenal juga sebagai *hydroperoxide glutathione peroxidase*. Enzim glutathion peroksidase juga dapat langsung mereduksi hidroperoksida kolesterol, ester kolesterol, lipoprotein, dan fosfolipid yang teroksidasi dalam membran sel. Aktivitas enzim tersebut dapat juga diinduksi oleh keadaan hiperoksia (Asikin 2001). Pada penderita nekrosis hati dan penyakit degeneratif, aktivitas glutathion peroksidase rendah karena terjadi defisiensi selenium. Aktivitas enzim ini juga dapat diinduksi oleh antioksidan sekunder isoflavon (Rohrdanz *et al.* 2002 & Chen *et al.* 2002).

Metode pemeriksaan yang dilakukan adalah metode enzimatik dengan menggunakan kit *glutathione peroxidase assay*. Glutathion peroksidase (GPx) mengkonversi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion teroksidasi (GSSG) sekaligus mengurangi hidroperoksida lipid ke beberapa koresponden alkohol atau hidrogen peroksida bebas ke air. Beberapa isoenzim telah ditemukan di berbagai lokasi seluler dan spesifitas substrat yang berbeda. Rendahnya GPx telah berkorelasi dengan gangguan terkait radikal bebas. Dalam glutathione peroxidase activity assay, GPx mereduksi cumene hydroperoxide saat terjadi perubahan GSH ke GSSG, selanjutnya GSSG yang dihasilkan direduksi menjadi GSH oleh

GR dengan mengonsumsi NADPH. Penurunan NADPH (biasanya diukur pada panjang gelombang 340 nm) sebanding dengan aktivitas GPx (Biovision 2012).

G. Rutin

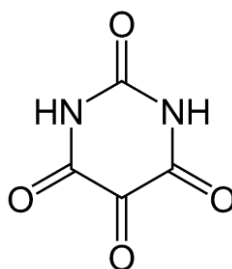


Gambar 2. Struktur kimia rutin

Rutin dan aglikonnya adalah flavonoid yang telah dikenal mempunyai efek antioksidan dan antiinflamasi. Rutin mampu mencegah kerusakan oksidatif dan kematian sel melalui beberapa mekanisme, antara lain menangkap radikal oksigen, perlindungan terhadap peroksidasi lipid dan mengkhelat ion logam (Herowati 2005).

Rutin sering digunakan sebagai pembanding pada uji aktivitas antioksidan karena senyawa ini merupakan antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif guna meredam aksi destruktif radikal bebas. Rutin (*5,7,3,4-tetrahidroksi flafonol 3-0-rutinosida*) yang dapat dilihat pada Gambar 3 merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol, tepatnya merupakan glikosida flavonol yang terdiri atas aglikon kuersetin dan rutinosida (ramnosa dan glukosa) sebagai gulanya (Susilowati 2010).

H. Aloksan

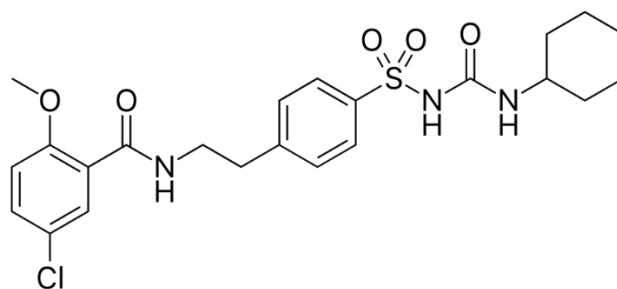


Gambar 3. Struktur kimia aloksan (Yani 2014).

Aloksan adalah suatu substrat yang secara diabetik adalah diabetik pirimidin sederhana yang dapat dilihat pada Gambar 4. Aloksan diperkenalkan sebagai hidrasi aloksan pada larutan encer. Aloksan murni diperoleh dari oksidasi asam urat oleh asam nitrat. Aloksan merupakan bahan kimia yang digunakan untuk menginduksi diabetes pada binatang percobaan. Aloksan monohidrat untuk menginduksi diabetes diabetik dengan mekanisme menghancurkan sebagian (parsial) sel β pulau Langerhans. Pemberian aloksan adalah dengan cara yang tepat menghasilkan kondisi diabetik eksperimental (hiperglikemik) pada binatang percobaan (Yuriska 2009).

Sebagai diabetogenik, aloksan dapat digunakan secara intravena, intraperitoneal dan subkutan menggunakan 2-3 kali dosis intravena (Nugroho 2006). Berdasarkan penelitian Zada (2009) dosis 125 mg/kg BB secara intraperitoneal dapat mengakibatkan hiperglikemik. Yuriska (2009) dengan dosis 125 mg/kg BB secara intraperitoneal dapat mengakibatkan diabetes pada tikus galur wistar.

I. Glibenklamid



Gambar 4. Struktur kimia glibenklamid (Jayanti *et al.* 2015)

1. Indikasi dan kontraindikasi

Glibenklamid diindikasikan pada pengobatan diabetes melitus tipe 2 onset maturitas stabil dan tidak terkomplikasi ringan atau tidak parah, yang tidak dapat diobati hanya dengan diet saja. Glibenklamid mengkontraindikasikan pada wanita hamil dan menyusui, porfiria, dan ketoasidosis. Tidak boleh diberikan sebagai obat tunggal pada penderita yang kebutuhan insulinnya tidak stabil, dan diabetes melitus berat (Depkes 2005).

2. Dosis dan aturan pakai

Pengobatan dengan glibenklamid dimulai dari dosis rendah (2,5 mg) diberikan pada pagi hari, sedangkan profil mingguan glukosa serum dipantau. Dosis permulaan 1 kali sehari 2,5-5 mg, bila perlu dinaikkan setiap minggu sampai maksimal 2 kali sehari 10 mg (Tjay & Raharja 2002).

3. Farmakokinetika

Diberikan peroral, obat-obatan ini terikat pada protein serum di metabolisme di hati dan di eksresikan di hati atau ginjal (Myeck *et al.* 2001). Metabolismenya di hepar, pada pemberian dosis tunggal hanya 25% metabolitnya di eksresikan melalui urin (Gunawan 2009).

4. Mekanisme kerja

Glibenklamid bekerja dengan menghambat *ATP-Sensitive pottaasium channel* di sel β pankreas, sehingga memantau untuk mengurangi jumlah gula dalam darah orang dengan diabetes tipe 2. Mengurangi kadar glukagon dalam serum, dan meningkatkan pengikatan insulin pada jaringan target dan reseptor (Myeck *et al.* 2001).

5. Efek samping

Glibenklamid mempunyai efek samping antara lain : gejala saluran cerna berupa mual, diare, sakit perut, hiper sekresi asam lambung, di daerah jamtung. Gejala susunan saraf pusat berupa vertigo, menimbulkan gejala hipertiroidisme dan ikterus obstruktif. Hipoglikemia dapat terjadi pada penderita yang tidak mendapat dosis tepat, tidak makan cukup, atau dengan gangguan fungsi hati atau ginjal (Sukandar *et al.* 2008).

J. Hewan Uji

Hewan uji adalah setiap hewan yang dipergunakan pada sebuah penelitian biologis dan biomedis yang dipilih berdasarkan syarat atau standar dasar yang diperlukan dalam penelitian tersebut. Dalam memperlakukan hewan uji untuk penelitian diperlukan pengetahuan yang cukup mengenai berbagai aspek tentang sarana biologis, dalam hal penggunaan hewan percobaan laboratorium.

1. Sistematika hewan uji

Sistematika tikus menurut Depkes (2009), sebagai berikut : Dunia : Animalia, Filum : Chordata, Sub Filum : Vertebrata, Classis : Mamalia, Sub classis : Plasentalia, Order : Rodentia, Familia : Muridae, Genus : Rattus, Species : *Rattus norvegicus*.

2. Karakteristik utama tikus putih

Tikus putih suhu tubuh normal 37,5 ° C dan aktivitasnya nokturnal (pada malam hari). Jika dipegang dengan cara yang benar tikus tenang dan mudah ditangani. Tikus yang dibiakkan di laboratorium lebih cepat dewasa dan lebih mudah berkembang biak, berat badan mempengaruhi antara tikus biakkan dan tikus liar (Smith & Mangoenwidjojo 1988).

K. Landasan Teori

Antioksidan adalah suatu zat yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif.

Diabetes melitus adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan abnormalitas metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang disebabkan oleh penurunan sekresi insulin, penurunan sensitivitas insulin atau keduanya. Peningkatan kadar glukosa dalam darah disebabkan oleh kerusakan pankreas sehingga tidak dapat menghasilkan insulin. Pengobatan diabetes saat ini dilakukan dengan mengkombinasikan antara antidiabetes dan antioksidan. Hal ini disebabkan obat antidiabetes tidak bekerja memperbaiki sel β pankreas yang rusak akibat radikal bebas, tetapi hanya menstimulasi pelepasan insulin dari sel β pankreas. Selain itu pengobatan diabetes menggunakan antioksidan juga dapat mencegah terjadinya komplikasi diabetes. Dalam tubuh kita sel normal yang mempunyai sejumlah enzim pertahanan yang bereaksi sebagai antioksidan endogen seperti katalase dan glutathion peroksidase yang berperan dalam mendetoksifikasi radikal bebas dan mencegah kerusakan sel. Kerentanan suatu jaringan terhadap kerusakan oksidatif tergantung pada mekanisme pertahanan oksidatifnya, antara lain oleh aktivitas dan kandungan enzim antioksidan endogen.

Pada keadaan patologik seperti diabetes melitus terjadi peningkatan stress oksidatif dalam tubuh yang akan meningkatkan pemakaian enzim intrasel sehingga menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan endogen dalam tubuh.

Pucuk merah banyak memiliki aktivitas yaitu efek antiangiogenik dan antitumor (Aisha *et al.* 2013), antikanker (Memon *et al.* 2014) antihiperuresimia (Juwita *et al.* 2017) antioksidan (Iqbal 2014) dan sebagai antidiabetes (Hasti *et al.* 2016 dan Sundhani *et al.* 2016). Senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenolat dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan polifenolat bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik dan antiinflamasi. Pucuk merah merupakan suatu tanaman perdu yang berdaun selalu hijau, kaya akan fenol, flavonoid antioksidan, asam betulinic (Aisha *et al.* 2013), alkaloid, saponin, triterpenoid, steroid (Juwita *et al.* 2017), antosianin (Iqbal 2014).

Iqbal (2014) menyebutkan, antosianin dalam daun pucuk merah didapatkan dengan mengekstraksi menggunakan pelarut etanol yang telah diasamkan dengan asam asetat dan asam sitrat. Aktivitas antioksidan yang didapatkan untuk ekstrak etanol dengan asam asetat memiliki nilai IC_{50} 15,450 $\mu\text{g/mL}$ sedangkan ekstrak etanol dengan asam sitrat memiliki nilai IC_{50} 29,238 $\mu\text{g/mL}$ kedua ekstrak memiliki nilai IC_{50} yang rendah, hal ini menunjukkan bahwa daun pucuk merah mempunyai aktifitas antioksidan yang sangat kuat karena mempunyai nilai IC_{50} dibawah 50 $\mu\text{g/mL}$. Juwita *et al.* (2017) mengatakan terdapat peneliti lain dimana fraksi etanol-air daun pucuk merah mempunyai antioksidan paling tinggi. Penelitian yang sudah dilakukan digunakan sebagai acuan untuk pengembangan penelitian selanjutnya, maka pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap radikal bebas DPPH dan enzim glutation peroksidase pada tikus diabetes. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dengan pelarut etanol 96% yaitu dengan cara merendam serbuk dalam etanol 96% selama 5 hari. Hewan uji yang digunakan adalah tikus. Tikus yang digunakan yaitu berjenis kelamin jantan kecepatan metabolisme obat lebih cepat dibandingkan dengan tikus betina. Pengujian antioksidan dilakukan secara *in vitro* dengan metode DPPH dengan

parameter IC_{50} dan secara *in vivo* melihat aktivitas enzim glutathion sebagai antioksidan endogen pada tikus diabetes.

L. Hipotesis

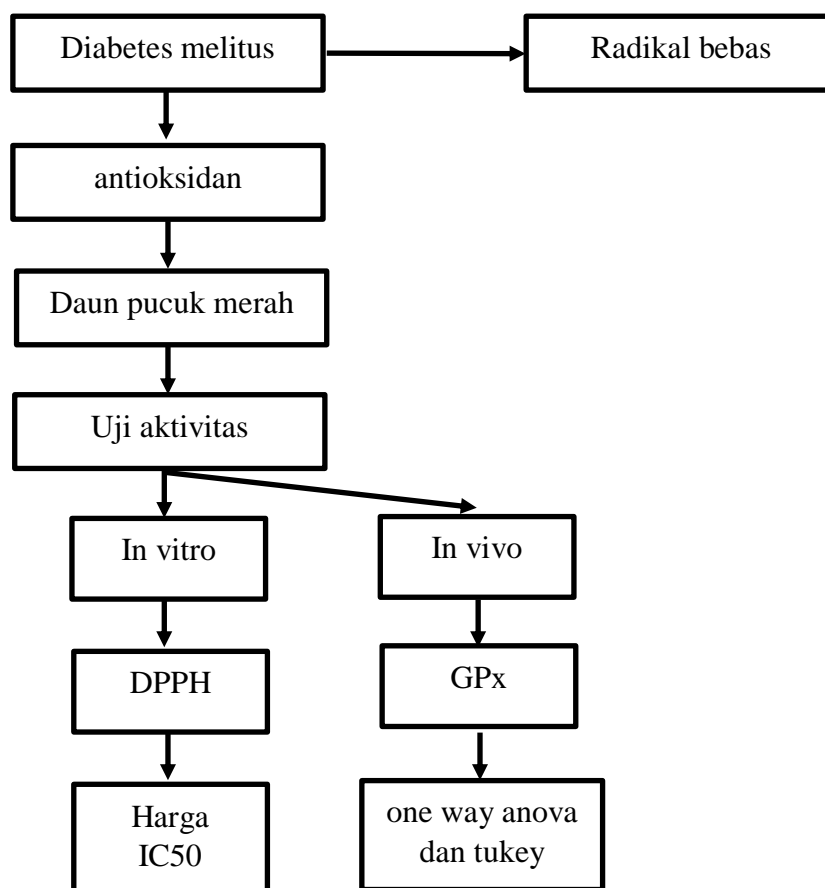
Berdasarkan uraian diatas dapat disusun hipotesis bahwa :

Pertama, ekstrak etanol daun pucuk merah memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat terhadap radikal bebas dengan metode DPPH

Kedua, ekstrak etanol daun pucuk merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus putih jantan yang diinduksi aloksan.

Ketiga, ekstrak etanol daun pucuk merah dengan dosis 150 mg/kg BB efektif dalam meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

M. Kerangka pikir penelitian



BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun dari tanaman pucuk merah yang tumbuh di Desa Padan, Kelurahan Kauman, Kecamatan Polanharjo Klaten, Jawa Tengah

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pucuk merah yang berwarna hijau, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar dan tidak busuk yang dipanen pada bulan Desember 2017.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama pada penelitian ini adalah aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun pucuk merah terhadap radikal bebas DPPH.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah aktivitas ekstrak etanol daun pucuk merah dalam berbagai variasi dosis terhadap aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus jantan putih diabetes.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu diklasifikasikan ke dalam berbagai variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah dosis ekstrak etanol daun pucuk merah pada uji antioksidan DPPH dan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai IC_{50} ekstrak daun pucuk merah dan penurunan atau peningkatan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus diabetes.

Variabel kendali dalam penelitian ini adalah peneliti, kondisi laboratorium, kondisi fisik hewan uji yang meliputi berat badan, usia, jenis kelamin, galur, glutathion peroksidase

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pucuk merah 28 daun dari tanaman pucuk merah yang di peroleh di daerah Desa Padan, Kauman, Kecamatan Polanharjo Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun pucuk merah adalah ekstrak kental hasil ekstraksi dari serbuk daun pucuk merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dipekatkan dengan evaporator.

Ketiga, aktivitas antioksidan adalah aktivitas yang ditetapkan secara in vitro melalui metode DPPH dan didasarkan dari nilai IC_{50} .

Keempat, rutin adalah bahan yang digunakan sebagai pembanding antioksidan secara in vitro.

Kelima, aktivitas glutathione peroksidase adalah aktivitas yang ditetapkan dari supernatan hati menggunakan *glutathione peroxidase assay kit* dengan metode spektrofotometri pada hari ke -15.

Keenam, tikus diabetes adalah tikus jantan yang berumur 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 g yang mengalami diabetes akibat induksi aloksan.

C. Bahan, Alat dan Hewan Uji

1. Bahan

Bahan yang digunakan adalah daun pucuk merah, Etanol 96%, aquadestilata, glibenklamid (Indofarma), aloksan (aldrich), NaCl 0,9 %, DPPH (*1,1 difenil-2-pikrilhidrazil*) dan rutin.

2. Alat

Alat untuk membuat simplisia seperti blender, ayakan nomor mesh 40. Alat penyari untuk daun pucuk merah antara lain alat-alat gelas, peralatan maserasi, *vacuum evaporator* (Heidolph laborata 400). Alat yang digunakan untuk mengukur kadar air adalah *sterling-bidwell* (Ohaus), alat yang digunakan untuk susut pengeringan *moisture balance* (Ohaus-MB 23), timbangan elektrik (Ohaus-PA 214), mortir dan stamfer. Alat untuk perlakuan hewan uji yaitu timbangan tikus, spuit oral, jarum suntik dan kandang tikus. Alat untuk pengujian antioksidan

DPPH antara lain Spektrofotometri UV Vis (Shimadzu-1201), kuvet, labu takar 50 mL; 100 mL, pipet ukur, *beaker glass*.

3. Hewan uji

Hewan uji dalam penelitian ini adalah tikus putih galur wistar berjenis kelamin jantan yang diinduksi aloksan, usianya 2-3 bulan dengan berat badan 150-200 g sebanyak 25 ekor.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi tanaman pucuk merah. Determinasi ini dimaksudkan untuk menetapkan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian ini, selain determinasi harus diperhatikan pula ciri ciri morfologi tanaman terhadap kepastiaan dan dibuktikan di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret, Surakarta, Jawa Tengah.

2. Pembuatan serbuk daun pucuk merah

2.1 pengumpulan sampel. Pengumpulan sampel daun pucuk merah dilakukan dengan mengambil daun pucuk merah yang berwarna hijau, tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, segar dan tidak busuk yang dipanen pada bulan Desember 2017.

2.2 pengeringan daun pucuk merah. Daun pucuk merah dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, yang bertujuan untuk menghilangkan tanaman yang busuk dan kotoran yang masih menempel pada daun. Daun yang telah bersih dikeringkan dengan alat pengering (oven) pada suhu 50⁰C selama 5 hari. Suhu yang terlalu rendah tidak akan mengeringkan dengan sempurna, akibatnya sampel akan cepat membusuk. Sedangkan suhu yang terlalu tinggi akan merusak senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut.

2.3 Pembuatan serbuk. Daun pucuk merah yang telah kering dibuat serbuk menggunakan alat penggilingan dan diayak dengan ayakan nomor 40.

3. Ekstraksi

Serbuk kering sebanyak 700 g dimasukkan ke dalam botol maserasi ditambah etanol 96% sebanyak 5250 mL, ditutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari, terlindungi dari cahaya, sambil sesekali digojok. Ampas kemudian dimaserasi dengan cairan penyari 1750 mL dengan cara yang sama dan dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali digojok. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel, sehingga diperoleh sari sebanyak 100 bagian. Kemudian filtrat dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator* serta disempurnakan pengeringannya di dalam oven suhu 50°C sehingga didapat ekstrak etanol daun pucuk merah (Depkes 1986).

4. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk dan ekstrak daun pucuk merah menggunakan alat *moisture balance*. Suhu atau temperatur diatur yaitu sebesar 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah masing-masing dimasukkan sebanyak 2 g pada neraca timbang. Ditunggu sampai alat berbunyi, menandakan hasil analisa telah selesai. Susut pengeringan memenuhi syarat dimana tidak boleh lebih dari 10%. (Depkes 1986).

5. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air serbuk daun pucuk merah digunakan menggunakan alat *sterling-bidwell*. Caranya dengan menimbang serbuk daun pucuk merah sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan pelarut *xylene* sebanyak 100 mL sampai serbuk terendam, kemudian memasang alat *sterling-bidwell*, tahap selanjutnya dipanaskan dengan api kecil. Pemanas dihentikan bila air pada penampung tidak menetes lagi, kemudian mengukur kadar airnya dengan melihat volume pada skala alat tersebut dan dihitung persen kadar airnya (Sudarmaji *et al.* 2010)

6. Penetapan bobot jenis ekstrak

Bobot jenis ekstrak daun pucuk merah ditetapkan terhadap larutan ekstrak 1% dalam etanol 96%. Prosedur penetapan bobot jenis menggunakan piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan menetapkan bobot piknometer dan

bobot air yang baru dididihkan, pada suhu 25 °C. Mengatur suhu zat uji lebih kurang 20°C, masukkan ke dalam piknometer. Mengatur suhu piknometer yang telah diisi hingga suhu 25°C, dan ditimbang. Menghitung dengan mengurangi bobot piknometer kosong dari bobot piknometer yang telah diisi.

Bobot jenis satu zat adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot zat dengan bobot air, dalam piknometer. Kecuali dinyatakan lain dalam monografi keduanya ditetapkan pada suhu 25 °C (Depkes 1995)

7. Identifikasi serbuk dan ekstrak

Berdasarkan penelitian, kandungan kimia yang terkandung dalam daun pucuk merah adalah saponin, flavonoid, alkaloid, tanin :

7.1 Saponin. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah masing-masing masukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air panas sama banyak, didinginkan, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Adawiah 2016).

7.2 Flavonoid. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah masing-masing, ditambahkan 5 mL aquadest selama satu menit. Kemudian ke dalam larutan dimasukkan 0,1 g serbuk magnesium dan ditambahkan 2 mL larutan alkohol 70% : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran larutan ini digosok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Adawiah 2016).

7.3 Alkaloid. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah sebanyak 500 mg dilarutkan dalam 100 mL air panas, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat sebanyak 5 mL dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan dengan 1,5 mL HCl 2% kemudian dilanjutkan dengan penambahan 2 sampai 4 tetes reagen Dragendroff. Alkaloid positif terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Harbone 1987). Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah secukupnya, dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah 2 tetes pereaksi Mayer. Hasilnya positif apabila terbentuk endapan dan kekeruhan berwarna putih (Depkes 1977).

7.4 Tanin. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah masing ditambah 10 mL air panas, kemudian dipanaskan selama 15 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 mL larutan B ditambah FeCl_3 1%. Reaksi positif jika terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan (Adawiah 2016).

7.5 Steroid atau terpenoid. Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah ditambahkan dengan satu tetes liebermann burchard dan asam sulfat pekat 1 tetes. Terpenoid menunjukkan reaksi positif dengan adanya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan, sedangkan steroid menunjukkan reaksi positif apabila muncul cincin biru kehijauan (Sarker 2006).

8. Aktivitas daun pucuk merah terhadap radikal bebas DPPH

8.1 Penyiapan larutan DPPH 80 ppm. Serbuk DPPH ditimbang dengan seksama sebanyak 8 mg dan dilarutkan dengan etanol 96 % sampai tanda batas labu takar 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi 80 ppm.

8.2 Penyiapan larutan ekstrak daun pucuk merah. Ekstrak etanol daun pucuk merah ditimbang dengan seksama sebanyak 100 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambah etanol 96 % sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 1000 ppm setelah itu dibuat 5 larutan seri konsentrasi yaitu 100, 80, 60, 40, 20 ppm.

8.3 Penyiapan larutan pembanding rutin. Larutan stok rutin dibuat dengan cara menimbang 5 mg rutin kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, selanjutnya ditambah etanol 96 % sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 50 ppm setelah itu dibuat 5 larutan seri konsentrasi yaitu 10, 8, 6, 4, 2 ppm.

8.4 Penetapan panjang gelombang maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak daun pucuk merah dilakukan dengan 2 mL larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 mL etanol 96 % dikocok sampai homogen dan diamati serapan pada rentang 450-530 nm dengan menggunakan blanko etanol 96 %.

8.5 Penentuan *operating time*. Penentuan *operating time* dilakukan dengan 2 mL larutan DPPH 80 ppm ditambah 2 mL larutan uji dikocok homogen dan

diamati serapannya pada panjang gelombang maksimum, dibaca mulai dari menit 0 sampai menit dimana nilai absorbansi stabil.

8.6 Uji aktivitas antioksidan. Setiap konsentrasi larutan pembanding dan larutan uji dipipet sebanyak 2 mL, kemudian ditambahkan dengan 2 mL larutan pereaksi DPPH 80 ppm dalam vial, kocok, biarkan ditempat gelap selama waktu *operating time* dan kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Percobaan dilakukan 3 kali pengulangan. Pengamatan terhadap larutan kontrol (blangko) dari 2 mL etanol 96 % ditambah 2 mL DPPH 80 ppm.

8.7 Analisis data. Hasil pengukuran absorbansi DPPH yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung prosentase aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara konsentrasi dengan % peredaman. Rumus presentase peredaman sebagai berikut :

$$peredaman = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (5)$$

9. Penentuan dosis uji aktivitas enzim glutation peroksidase.

9.1 Dosis glibenklamid. Dosis glibenklamid dihitung dari dosis lazim. Faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat badan 200 g adalah 0,018. Dosis terapi glibenklamid untuk manusia 70 kg adalah 5 mg. Dosis untuk tikus (sekitar 200 g) adalah 5 mg dikali 0,018 sehingga didapatkan 0,09 mg.

9.2 Dosis sediaan uji. Dosis sediaan diberikan berdasarkan dosis efektif dari penelitian Sundhani *et al.* (2016) pada dosis 300 mg/kg BB dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus yang diberi pembebanan glukosa berlebih. Dibuat tiga variasi perbandingan dosis ekstrak etanol daun pucuk merah yaitu 150 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 600 mg/kg BB.

9.3 Dosis aloksan monohidrat. Dosis aloksan yang digunakan untuk membuat tikus diabetes adalah 150 mg /kg BB secara intraperitoneal (Sujono & Sutrisna 2010). Tikus yang digunakan adalah tikus yang memiliki berat sekitar

200 g, sehingga didapatkan dosis aloksan yang digunakan pada penelitian ini adalah 30 mg/200 g berat badan tikus.

10. Pembuatan larutan uji

10.1 Larutan suspensi CMC Na 0,5%. CMC Na konsentrasi 0,5% adalah larutan yang digunakan sebagai kontrol negatif, dibuat dengan cara menimbang serbuk CMC Na sebanyak 500 mg kemudian dimasukkan ke dalam mortir dan ditambah aqudest panas. Selanjutnya digerus sampai mengembang dan menambahkan sedikit demi sedikit aquadest panas hingga 100 mL, diaduk hingga homogen.

10.2 Larutan glibenklamid. Suspensi glibenklamid 0,09 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan serbuk glibenklamid sebanyak 9 mg dalam CMC Na 0,5% sampai volume 100 mL.

10.3 Larutan garam fisiologis. Larutan fisiologis 0,9% dibuat dengan cara melarutkan 0,9 g NaCl dalam air suling pada volume 100 mL.

10.4 Larutan aloksan monohidrat. Larutan aloksan monohidrat adalah larutan yang digunakan sebagai penginduksi diabetes. Dibuat dengan cara melarutkan aloksan monohidrat 1,5 g dalam larutan garam fisiologis 0,9% pada volume 100 mL.

10.5 Larutan sediaan uji. Banyaknya ekstrak daun pucuk merah yang akan digunakan dihitung berdasarkan berat dari masing-masing tikus, kemudian mengembangkan CMC Na dalam mortir yang berisi air panas ditaburkan CMC Na diaduk hingga homogen ditambahkan ekstrak daun pucuk merah diaduk hingga homogen.

11. Perlakuan hewan uji.

Pengujian aktivitas glutathion peroksidase dilakukan terhadap 30 ekor tikus yang terdiri dari 25 ekor tikus diabetes karena induksi aloksan 150 mg/kg BB (IP) dengan kadar glukosa > 200 mg/dL dan 5 ekor tikus normal (tanpa induksi aloksan) sebagai kelompok normal, dengan pengelompokan sebagai berikut :

Kelompok I = Kontrol normal (hanya diberi makan dan minum)

Kelompok II = Kontrol positif (glibenklamid)

Kelompok III = Kontrol negatif (CMC)

Kelompok IV = Ekstrak etanol dosis 150 mg/kg BB

Kelompok V = Ekstrak etanol dosis 300 mg/kg BB

Kelompok VI = Ekstrak etanol dosis 600 mg/kg BB

Tikus dikorbankan dengan cara dislokasi leher dimana ekor tikus dipegang kemudian ditempatkan pada suatu permukaan dan dibiarkan meregangkan badannya. Tengkuik tikus ditempatkan dengan suatu penahan (pensil atau batang logam) yang dipegang dengan tangan kiri, ekornya ditarik dengan tangan kanan dengan keras, sehingga lehernya akan terdislokasi dan tikus akan terbunuh. Tikus kemudian dibedah mulai dari bagian perut ataupun uterus menggunakan gunting bengkok. Organ hati kemudian diambil untuk dilakukan pengamatan enzim glutathion peroksidase dengan gunting lurus.

Tikus kemudian disanitasikan dengan memasukkan semua sisa organ tikus yang tidak terpakai ke dalam kantong plastik. Kantong plastik ditutup dan pastikan tidak ada bau yang keluar dari plastik. Kantong plastik berisi sisa organ diserahkan ke kandang tikus bagian Farmakologi dan Toksikologi untuk dilakukan insinerasi.

12. Pemeriksaan enzim glutathion peroksidase

Pemeriksaan kadar GPx supernatan jernih hati dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan Dan Gizi Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

12.1 Preparasi sampel. Hati segar tikus 1,25 g di homogenat dalam kondisi dingin dalam 5 mL larutan phosphate buffer saline (PBS) yang mengandung 11,5 g/L KCL. Homogenat disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit sebanyak 2 kali sehingga diperoleh supernatan jernih. Supernatan diambil untuk pengujian sedangkan sedimennya dibuang.

12.2 Pengukuran aktivitas GPx. Pengukuran menggunakan metode Lawrence dan Burk (1976) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 μ L supernatan hati ditambahkan 200 μ L buffer fosfat 0,1 M pH 7,0 yang mengandung 0,1 mM EDTA, 200 μ L glutathion tereduksi (GSH) 10 mM dan 200 μ L enzim glutathion reduktase (2,4 unit). Kemudian diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 200 μ L NADPH 1,5 mM dan diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu yang sama dan dilanjutkan dengan penambahan 200 μ L H₂O₂ 1,5 mM. Laju

perubahan serapan selama konversi NADPH menjadi NADP⁺ diukur secara spektrofotometri λ 340 nm selama 3 menit. Aktivitas GPx dinyatakan sebagai $\mu\text{mol NADPH}$ yang dioksidasi menjadi NADP⁺ $\text{menit}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein dengan koefisien ekstrinsik ($6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) untuk NADPH. Perhitungannya adalah sebagai berikut:

$$M \text{ unit GPx} = \frac{\text{abs} \times Vt \times 2 \times 1000 \times 1 / \text{mgprotein}}{6,22 \times Vs} \quad (6)$$

Keterangan :

Abs = perubahan absorbansi

Vt = volume total

6,22 = koefisien ekstrinsik dari NADPH

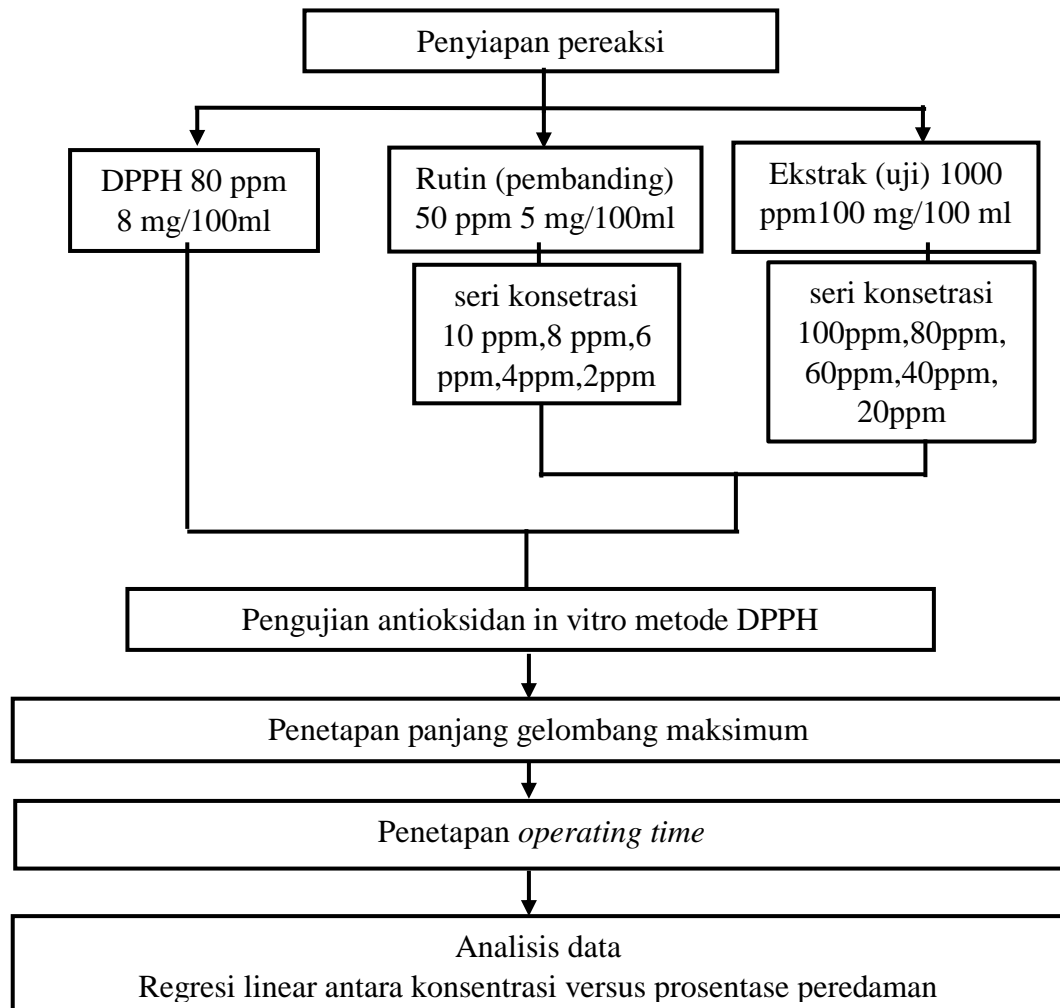
2 = 2 mol GSH yang setara dengan 1 mol NADPH

1000 = perubahan mili unit

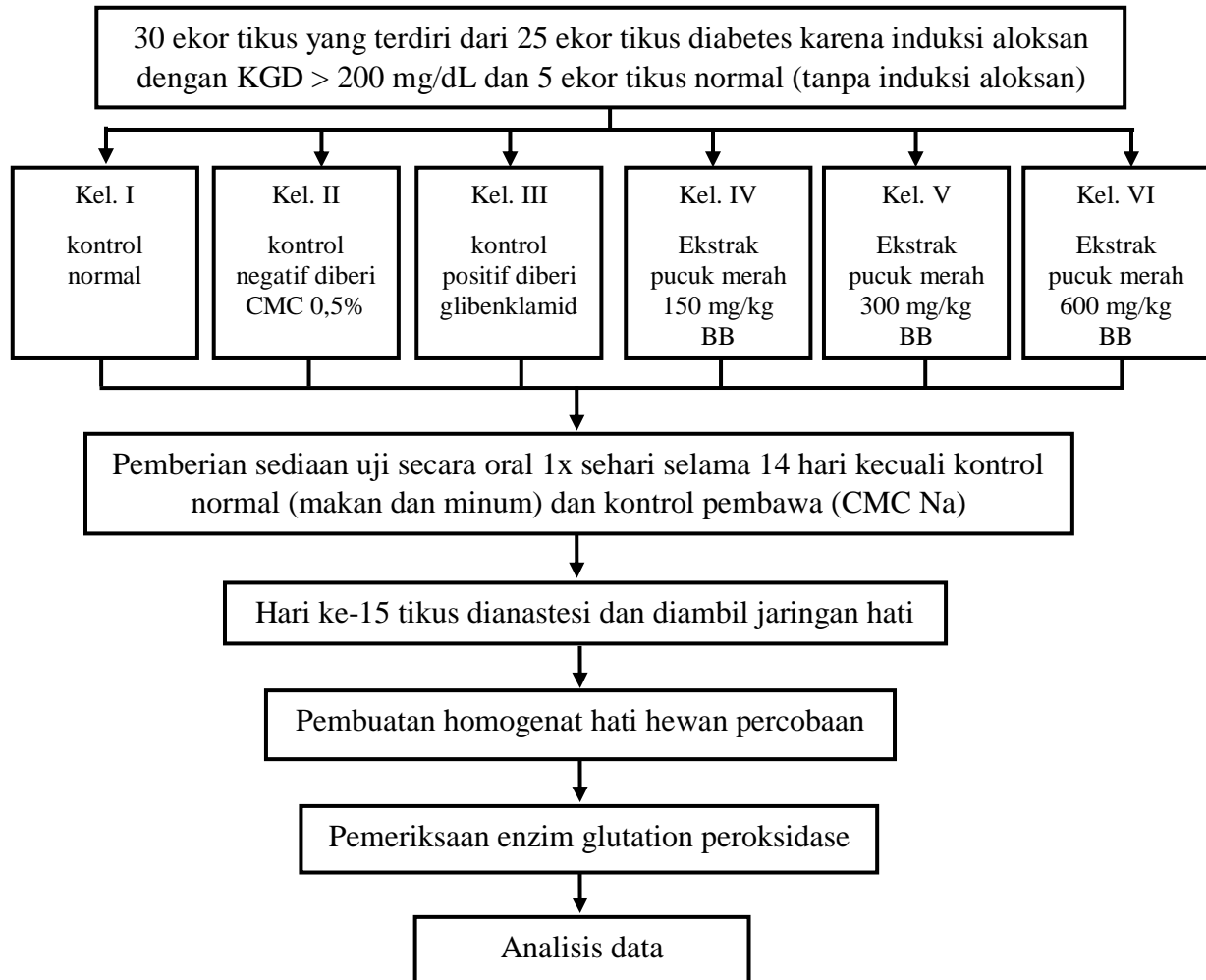
Vs = volume sampel

E. Analisis Data

Analisa statistik yang pertama digunakan dalam penelitian ini untuk melihat apakah data tersebut terdistribusi normal atau tidak yaitu dengan menggunakan uji distribusi normal (*Saphiro Wilk*). Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$), analisis data dilanjutkan dengan uji parametrik (*One Way ANOVA*) untuk mengetahui perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Jika hasil uji *One Way ANOVA* dan *uji Levene Statistic* menunjukkan hasil normal ($p > 0,05$), selanjutnya dilakukan uji *Post Hoc* untuk melihat aktivitas glutation peroksidase yang efektif diantara kelompok perlakuan. Namun, jika hasilnya tidak normal ($p < 0,05$), maka dilakukan uji non parametrik menggunakan uji *Mann-Whitney*.

F. Skema Pengujian Antioksidan DPPH

G. Skema Pengujian Enzim Glutation Peroksidase



BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Determinasi tanaman pucuk merah

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman pucuk merah *Syzygium myrtifolium* Walp. yang telah dideterminasi di Laboratorium Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret, Surakarta Jawa Tengah hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1. Tanaman pucuk merah merupakan tanaman perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 0,75-3 m yang memiliki daun tunggal, berhadapan, helaian daun berbentuk lanset sempit atau lanset bulat telur panjang 4-7 cm lebar 0,75-3 cm, pangkal membulat hingga tumpul, tepi daun rata, ujung meruncing, permukaan gundul dan mengkilat, tulang daun menyirip, berbintik kelenjar minyak yang sangat halus, daging daun agak kaku, permukaan atas hijau tua, permukaan bawah hijau muda ketika dewasa, ketika muda berwarna merah hingga merah tua, dan berbau harum. Gambar tanaman dapat dilihat pada lampiran 3.

2. Pembuatan serbuk daun pucuk merah

Daun pucuk merah dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Padan, Kelurahan Kauman, Kecamatan Polanharjo Klaten, Jawa Tengah pada bulan Desember 2017. Daun pucuk merah yang berwarna hijau dengan berat 8 Kg dibersihkan menggunakan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel serta disortir dan setelah ditimbang kembali berat daun pucuk merah menjadi 4,8 Kg. Daun pucuk merah kemudian dioven pada suhu 50° C. Pengeringan dimaksudkan untuk mengurangi kadar air yang dapat menyebabkan jamur. Proses pengeringan didapatkan berat kering sebesar 3,1 Kg. Daun pucuk merah yang telah mengering dilakukan penyerbukan dengan alat penggiling, setelah dilakukan penyerbukan serbuk diayak dengan menggunakan ayakan mesh 40 untuk mendapatkan serbuk halus yang bertujuan untuk memperluas ukuran partikel simplisia yang kontak dengan pelarut sehingga penyaringan berlangsung efektif. Penentuan presentase simplisia dilakukan

dengan cara berat basah daun pucuk merah dibandingkan dengan berat kering daun pucuk merah. Tabel 2 menunjukkan hasil presentase rendemen simplisia (lampiran 6).

Tabel 2. Rendemen simplisia daun pucuk merah

Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (%)
4,80	3,10	64,58

3. Pembuatan ekstrak etanol daun pucuk merah

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi, metode ini bertujuan untuk penyarian yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam larutan penyari, menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan dan paling sederhana serta cepat dilakukan. Etanol 96% digunakan sebagai cairan penyari karena sifat etanol yang tidak beracun dan mudah menarik keluar senyawa aktif dari dalam sel dan dapat bercampur dengan air sebagai perbandingan, disamping itu etanol memiliki titik didih rendah sehingga mudah dan cepat diuapkan (Depkes 1986).

Serbuk kering sebanyak 700 g dalam botol maserasi ditambah etanol 96% sebanyak 5250 mL, ditutup dan dibiarkan pada suhu kamar selama 5 hari, terlindungi dari cahaya, sambil sesekali digojok. Ampas kemudian dimaserasi dengan cairan penyari 1750 mL dibiarkan selama 2 hari sambil sesekali digojok. Cairan hasil ekstraksi disaring dengan kain flanel, sehingga diperoleh sari sebanyak 100 bagian. Pelarut yang ada pada filtrat diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* dengan suhu 40°C sampai diperoleh ekstrak kental. Tabel 3 menunjukkan data hasil pembuatan ekstrak daun pucuk merah (lampiran 7).

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
700	296,94	42,42

Tabel 3. Rendemen ekstrak daun pucuk merah

4. Penetapan susut pengeringan

Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah yang diperoleh dilakukan penetapan susut pengeringan dengan menggunakan alat *Moisture Balance* yang bertujuan

untuk mengetahui kadar lembab dalam simplisia. Kadar lembab simplisia yang kurang dari 10 % dapat menghentikan reaksi enzimatik dan mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia (Depkes 1985). Persyaratan kadar lembab untuk ekstrak etanol tidak boleh lebih dari 30% (Voigt 1994). Tabel 4 dan 5 menunjukkan data hasil penetapan susut pengerigan serbuk dan ekstrak daun pucuk merah.

Tabel 4. Hasil penetapan susut pengerigan serbuk daun pucuk merah

Replikasi	Berat serbuk (g)	Susut pengerigan (%)
1	2	8,60
2	2	8,90
3	2	9,20
Rata rata \pm SD		8,90 \pm 0,30

Tabel 5. Hasil penetapan susut pengerigan ekstrak daun pucuk merah

Replikasi	Berat ekstrak (g)	Susut pengerigan (%)
1	2	27,68
2	2	26,98
3	2	27,45
Rata rata \pm SD		27,37 \pm 0,36

5. Penetapan Kadar Air Serbuk Daun Pucuk Merah

Serbuk daun pucuk merah dilakukan pengukuran kadar air dengan cara destilasi menggunakan alat *Sterling Bidwell*. Penetapan kadar air serbuk dilakukan agar mutu dan khasiat tetap terjaga. Persyaratan kadar air serbuk simplisia yaitu kurang dari 10 % (Depkes 1986). Pelarut yang digunakan yaitu *xylene*, karena *xylene* mempunyai titik didih yang lebih tinggi dan berat jenis yang lebih rendah dari air, selain itu *xylene* tidak bercampur dengan air. Tabel 6 menunjukkan hasil penetapan kadar air (lampiran 8)

Berat basah (gram)	Kadar (%)
20	6
20	6
20	5,50
Rata rata \pm SD	5,83 \pm 0,29

Tabel 6. Hasil kadar air serbuk daun pucuk merah

Penetapan kadar air dilakukan dengan tiga kali replikasi, kadar air serbuk daun pucuk merah yang ditetapkan yaitu 5,83 % hasil tersebut memenuhi syarat

yaitu tidak lebih dari 10 % sehingga dalam penyimpanan tidak ditumbuhi mikroba.

6. Penetapan Berat Jenis Ekstrak Daun Pucuk Merah

Ekstrak daun pucuk merah dilakukan penetapan berat jenis dengan menggunakan piknometer, pengukuran ini menggambarkan besarnya massa persatuan volume untuk memberikan batasan antara ekstrak cair dan ekstrak kental, berat jenis juga terkait dengan kemurnian dari ekstrak dan kontaminasi. Tabel 7 menunjukkan hasil berat jenis ekstrak (lampiran 9)

Replikasi	Berat bahan (g)	Berat jenis (g/ml)
1	0,1	0,81
2	0,1	0,82
3	0,1	0,78
Rata- rata \pm SD		0,81 \pm 0,02

7. Identifikasi kandungan kimia daun pucuk merah

Serbuk dan ekstrak daun pucuk merah yang diperoleh dilakukan identifikasi kimia. Tabel 8 menunjukkan hasil identifikasi kimia.

Senyawa	Pereaksi	Pustaka	Hasil
Saponin	Air panas + serbuk/ekstrak kocok kuat	Terbentuknya buih, penambahan HCl 2N buih tidak hilang	Terbentuk buih dipermukaan
Flavonoid	0,1 g magnesium + alkohol: asam klorida (1:1) dan amil alkohol	Adanya warna merah / jingga /kuning pada lapisan amil alkohol	Adanya warna jingga merah pada amil alkohol
Alkaloid	HCl 2% + reagen dragendroff.	Terjadi kekeruhan atau endapan coklat (Harbone 1987).	Terjadi kekeruhan atau endapan warna coklat

	Reagen mayer	Terbentuk endapan dan kekeruhan putih	Terbentuk endapan dan kekeruhan warna putih
Tanin	FeCl ₃	Terbentuknya warna biru tua atau hitam kehijauan	Terbentuk warna hitam kehijauan
Steroid / Terpenoid	Liebermann burchard dan asam sulfat pekat	Terdapat cincin biru kehijauan	Terbentuk warna coklat

Hasil identifikasi serbuk dan ekstrak daun pucuk merah (lampiran 5), diketahui bahwa serbuk dan ekstrak mengandung saponin, flavonoid, tanin, alkaloid (Juwita *et al.* 2017).

8. Hasil uji Aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH

8.1 Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum merupakan panjang gelombang optimum yang mampu memberikan serapan absorbansi yang paling tinggi. Panjang gelombang maksimum ditentukan untuk meminimalkan kesalahan pada saat pengukuran dan meningkatkan kepekaan karena terjadi perubahan absorbansi yang paling besar.

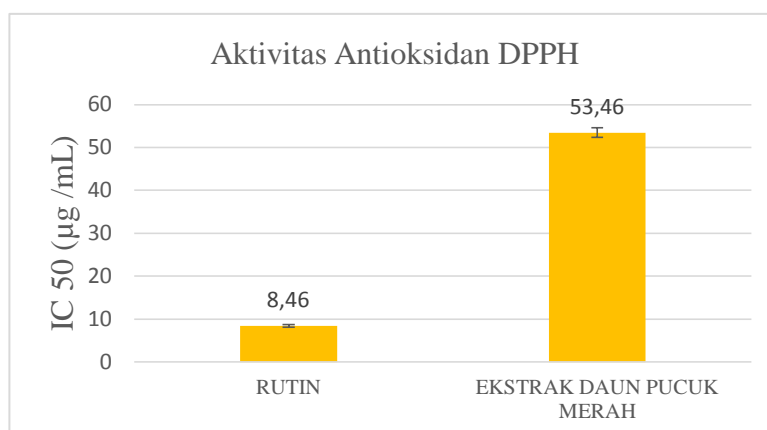
Pengukuran panjang gelombang maksimum menggunakan larutan stok DPPH 80 ppm diambil 2 mL dan ditambahkan etanol 96% 2 mL (1:1) dikocok dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 450-530 nm menggunakan blangko etanol 96%. Hasil panjang gelombang maksimum didapatkan 519 nm dengan nilai absorbansi 0,8476. Hasil penetapan panjang gelombang maksimum DPPH dapat dilihat pada lampiran 18.

8.2 Hasil penetapan *operating time*. *Operating time* digunakan untuk menentukan kestabilan DPPH saat di reaksikan dengan ekstrak dan pembanding (rutin) dengan menggunakan panjang gelombang maksimum yang telah diketahui. Hasil *operating time* ekstrak didapatkan pada menit ke-27 sampai menit ke-30 *Operating time* rutin dimulai pada menit ke-26 sampai menit ke-30. Hasil selengkapnyadapat dilihat pada lampiran 19 dan 20

8.3 Hasil pengujian aktivitas antioksidan terhadap DPPH. Pengujian antioksidan ekstrak daun pucuk merah metode DPPH dilakukan 3 kali replikasi,

pembandingan yang digunakan adalah rutin karena rutin merupakan suatu senyawa antioksidan dari golongan flavonoid yang cukup efektif guna meredam radikal bebas. Penambahan larutan uji yang mengandung antioksidan mampu meredam radikal bebas sehingga menurunkan konsentrasi DPPH, diikuti menurunnya serapan dari DPPH, karena senyawa yang mengandung antioksidan akan memberikan atom hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H dengan ditandai perubahan warna violet menjadi warna kuning.

Parameter dalam mengukur kekuatan antioksidan digambarkan dengan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi larutan uji mampu menangkal 50% radikal bebas DPPH. IC_{50} didapatkan dari memplotkan konsentrasi dengan % peredaman melalui persamaan regresi linear. Berdasarkan hasil pengujian didapatkan nilai rata-rata IC_{50} ekstrak sebesar 53,46 $\mu\text{g/mL}$ dapat dilihat pada lampiran 16 yang artinya mempunyai antioksidan kuat (50-100 $\mu\text{g/mL}$) hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun pucuk merah mengandung flavonoid sehingga mampu meredam radikal bebas, pada penelitian Iqbal (2014) melakukan uji antioksidan terhadap ekstrak etanol daun pucuk merah yang diasamkan dengan asam asetat dan asam sitrat bertujuan untuk mendapatkan senyawa antosianin yang terkandung dalam daun pucuk merah, didapatkan nilai IC_{50} sangat kuat yaitu ekstrak etanol dengan asam asetat sebesar 15,450 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak etanol dengan asam sitrat sebesar 29,238 $\mu\text{g/mL}$ berbeda dengan hasil yang telah dilakukan karena pada penelitian Iqbal (2014) spesifik untuk senyawa antosianin yang terkandung dalam daun pucuk merah yang berwarna merah.



Gambar 5. Aktivitas Antioksidan Larutan Uji Berdasarkan Nilai IC_{50}

Nilai rata-rata IC₅₀ rutin sebesar 8,46 µg/mL dapat dilihat pada lampiran 17 yang termasuk antioksidan yang sangat kuat (< 50 µg/mL) dapat dilihat pada gambar 6. Pada penelitian lain yang menguji rutin dalam metode DPPH didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 7,909 µg/mL (Dos Santos *et al.* 2008) yang mempunyai antioksidan sangat kuat.

9. Hasil Pengukuran Aktivitas Enzim GPx

Pengukuran antioksidan enzim glutation peroksidase dilakukan secara *invivo* dilihat dari organ hati tikus pada keadaan normal, diabetes (kontrol negatif), pemberian obat glibenklamid (kontrol positif), serta pada ekstrak daun pucuk merah dengan dosis 150, 300, 600 mg/kg BB yang sebelumnya diinduksi aloksan kecuali kelompok normal.

Prinsip mekanisme kerja antioksidan enzim glutation peroksidase yaitu saat GSH menjadi GSSG enzim GPx mereduksi *cumene hydropperoxide* yang kemudian GSSH berubah menjadi GSH dengan bantuan GR (glutation reduktase) sebagai katalisis dengan mengkonsumsi NADPH (Biovision 2012).



Pengukuran kadar enzim GPx dilakukan pada homogenat hati karena pada hati terdapat glutation dengan konsentrasi tinggi, glutation akan menurun karena adanya radikal bebas seperti pada penderita diabetes. Nilai GPx pada kelompok sehat digunakan sebagai pembanding untuk melihat adanya perubahan aktivitas enzim GPx. Tabel 9 menunjukkan hasil pengukuran rata rata enzim GPx (lampiran 11).

Tabel 9. Rata- rata hasil pengukuran aktivitas enzim GPx

Kelompok	N	Rata-rata GPx (U/mg) ± SD
kelompok normal	5	76,71 ± 3,64 ^{bc}
kelompok diabetes	5	23,92 ± 1,22 ^{ac}
Kelompok glibenklamid 0,09 mg/kgBB	5	69,30 ± 1,48 ^{ab}
ekstrak daun pucuk merah 150 mg/kg BB	5	43,06 ± 2,14 ^{abc}
ekstrak daun pucuk merah 300 mg/kg BB	5	55,56 ± 2,44 ^{abc}

ekstrak daun pucuk merah 600 mg/kg BB	5	63,28 ± 1,97 ^{abc}
---------------------------------------	---	-----------------------------

Keterangan :

a : berbeda signifikan terhadap kelompok normal

b : berbeda signifikan terhadap kelompok negatif (diabetes)

c : berbeda signifikan terhadap kelompok positif

Hasil pengukuran rata-rata pada tabel 9 dapat dilihat bahwa rata rata terendah 23,92 U/mg yaitu pada kontrol diabetes yang hanya diberi CMC 0,5% dikarenakan CMC tidak memiliki efek untuk meningkatkan aktivitas enzim GPx, selain itu aloksan yang diinduksi memiliki mekanisme kerja merusak sel β pankreas sehingga menimbulkan hiperglikemik yang merupakan pembentukan radikal bebas yaitu stress oksidatif, berbeda dengan kontrol normal memiliki kadar enzim GPx yang paling tinggi 76,71 U/mg karena tidak diinduksi dengan aloksan sehingga tidak terjadi kerusakan oksidatif.

Rata rata pengukuran kadar enzim GPx pada kontrol positif glibenklamid memiliki kadar 69,30 U/mg tidak lebih tinggi dengan kontrol normal, jika dibandingkan dengan kontrol diabetes menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) berdasarkan analisis statistik. Penelitian Anggung Praing (2017) glibenklamid juga meningkatkan kadar enzim GPx sebesar 62,83 U/mg menunjukkan bahwa glibenklamid yang diberikan pada tikus diabetes selama 14 hari dapat meningkatkan kadar enzim glutathion peroksidase. Glibenklamid dengan mekanisme kerja mengurangi gula darah dengan menstimulasi pelepasan insulin dari pankreas, mengurangi produksi glukosa hati dan meningkatkan respon insulin. Secara umum glibenklamid menstimulasi sel-sel β pankreas dari pulau langerhans, sehingga sekresi insulin ditingkatkan (Tan & Raharja 2002). Glibenklamid dapat meningkatkan enzim endogen GPx dengan mekanisme menyebabkan homeostasis pada pankreas berjalan baik yang mengakibatkan enzim pertahanan endogen dapat bekerja menetralsir atau menangkap radikal bebas (Shakya *et al.* 2012).

Hasil rata rata pengukuran kadar enzim GPx pada ekstrak daun pucuk merah dosis 150, 300, 600mg/kg BB berturut turut adalah 43,06 ; 55,56 ; 63,28 U/mg yang artinya ekstrak daun pucuk merah memiliki kemampuan untuk

meningkatkan enzim GPx. Berdasarkan analisis statistik dapat dilihat pada lampiran 12 dibandingkan kontrol diabetes dan pembanding glibenklamid semua dosis menunjukkan berbeda signifikan ($P > 0,05$) karena tidak dalam satu subset. Pengolahan data dilakukan dengan statistik untuk membuktikan hipotesa yang ada. Uji statistik diawali dengan uji kolmogorov smirnov untuk menguji distribusi normal (shapiro wilk) dengan syarat ($P > 0,05$) hasil yang didapatkan semua data $> 0,05$ dapat dilihat pada lampiran 12 yang artinya H_0 diterima semua data terdistribusi normal, selanjutnya *test of homogeneity* dengan syarat ($P > 0,05$) hasil yang didapatkan adalah 0,452 ($p > 0,05$) H_0 diterima artinya semua kelompok memiliki varians yang sama, dilanjutkan dengan uji ANOVA yaitu dengan *one way anova* untuk melihat perbedaan makna. Hasil *one way anova* 0,000 ($p < 0,05$) H_0 ditolak H_1 diterima artinya terjadi perbedaan makna, kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc (tukey) untuk melihat perbedaan makna setiap perlakuan, didapatkan hasil kelompok normal berbeda signifikan terhadap kelompok diabetes artinya pada kelompok diabetes terjadi peningkatan kadar gula darah, dosis 150 mg, dosis 300 mg, dan dosis 600 mg memiliki perbedaan signifikan dengan kelompok normal dan diabetes hasil ini menunjukkan bahwa semua dosis ekstrak pucuk merah sudah dapat meningkatkan kadar enzim glutathion peroksidase, dosis efektif yang mampu meningkatkan aktivitas glutathion peroksidase adalah dosis 150 mg/ kg BB karena dengan dosis terkecil sudah dapat meningkatkan kadar glutathion peroksidase, meskipun dalam statistik memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil SPSS dapat dilihat pada lampiran 14.

Ekstrak daun pucuk merah semua dosis mempunyai potensi meningkatkan kadar enzim GPx. Peningkatan kadar enzim GPx ini disebabkan adanya kandungan alkaloid, saponin, flavonoid pada daun pucuk merah yang memiliki fungsi sebagai antidiabetes dan antioksidan dimana dapat membantu penyembuhan diabetes dengan meningkatkan kadar enzim antioksidan dalam tubuh. Flavonoid, saponin dan alkaloid dapat bersifat antidiabetes dengan mekanisme yang berbeda-beda (Bhusnan et al. 2010). Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan pada jaringan tumbuhan dengan sifat antioksidan, flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang

baik menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim (Sjahid 2008, Redha 2010).

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol daun pucuk merah memiliki aktivitas antioksidan yang tergolong kuat dalam menangkal radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} 53,46 $\mu\text{g/ml}$

Kedua, ekstrak etanol daun pucuk merah mampu meningkatkan aktivitas enzim glutathion peroksidase pada tikus yang diinduksi aloksan sebesar 63,28 U/mg

Ketiga, dosis efektif ekstrak etanol daun pucuk merah yang mampu meningkatkan kadar glutathion peroksidase adalah 150 mg/kg BB

B. Saran

Dalam penelitian ini masih banyak kekurangan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai :

Pertama, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk melihat senyawa apa saja yang berperan dalam menghambat radikal bebas DPPH dan aktivitas enzim glutathion peroksidase.

Kedua, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode dan parameter yang lain terkait efek antioksidan pada ekstrak etanol daun pucuk merah.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiah. 2016. Kandungan Fitokimia Dan Bioaktivitas Ekstrak Metanol Biji Palem Putri (*Veitchia merillii*). *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, (2)1, 63-70.
- Aisha AFA, Ismail Z, Salah KMA, Shiddiqui JM, Ghafar G, Majid AMSA. 2013. *SyzygiumCampanulatum* Korth Methanolic Extract Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Nude Mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* Vol. 13 : 168
- American Diabetes Association (ADA). 2012. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care*. vol 35 Supplement 1 : 64-71.
- American Diabetes Association (ADA). 2016. *Statistics About Diabetes* <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/statistics/?loc=db-slabnav>., December, 2017.
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW.1999. The Myeloperoksidase Of Human Phagocytes Generates N-carboxynethyl Lysine On Proteins: A Mechanism For Producing Advance Glycation And Products At Sites Of Inflammation. *J Clin Invest* ;104:103-13
- Anggung Praing RK. 2017. Efek ekstrak etanol batang falok (*Sterculia quadrifida* R.Br) terhadap radikal bebas DPPH dan aktivitas enzim glutation peroksidase pada tikus diabetes. [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. 2001. Methods For Testing Antioxidant Activity. *Analist*. Hlm 127 dan 183-198
- Ansel HC. 1989. *Penghantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ed ke-4. Jakarta: Indonesia University Press hlm 605-606.
- Armala MM. 2009. Daya antioksidan fraksi air ekstrak herba kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan profil KLT [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Islam Indonesia
- Asikin N. 2001. *Antioksidan endogen dan penilaian status oksidan. Kursus penyegaran dan pelatihan radikal bebas dan antioksidan* : Dasar, aplikasi dan pemanfaatan bahan alam. Bagian biokimia, fakultas kedokteran, universitas indonesia. Hlm 1-5.
- Aslan M, DD Orhan, E Sezik, E Yesilada. 2007. In vivo antidiabetic and antioxidant potential of *Helichrysum plicatum* ssp. *Plicatum capitulkumus* in streptozotocin induced diabetic rats. *Jurnal Ethnopharmacol.*, 109: 54-59

- Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI, 2013. *Riset kesehatan dasar*. <http://www.depkes.go.id/resources/downloads/general/hasil%20risikesdas%201013.pdf>, Desember, 2017.
- Beckett AH, Kalsi VS. 2003. *Compelling need for supplementation: How specific nutrients help retard the complication of diabetes melitus*. Disampaikan dalam Symposium “Compeling Need For Nutrient Therapy in The Treatment of Diabetes Melitus and The Associ- ated Complication”, Surabaya.
- Beckman Ja, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA. 2001. *Ascorbate Restores Endothelium- Dependent Vasodilatation Impaired By Acute Hyperglycemia In Humans*. *Circulation* ;103:1618-23.
- Bhusnan MS, Rao CHV, Ojha SK, Vijayakumar M, Verma A. 2010. Analytical Review Of Plants For Antidiabetic Activity With Their Phytoconsistuent & Mecanism Of Action. *IJPSR* :29 :46.
- Biovision. 2012. *Glutathione Peroxidase Activity Assay Kit*. [Catalog #K762-100]. <http://www.biovision.com> [November 2017]
- Carr A, Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C base antioxidant and healt effects in humans. *Am J Clin Nutr*;69:1086-107.
- Chen CY, Holtzman GI, Bakhit RM. 2002. High-Genistin Isoflavone Supplementation Modulated erythrocyte Antioxidant Enzymes and Increased Running Endurance in Rats Undergoing one Session of Exhausting Exercise-a pilot study. *Pakistan journal of Nutrition* 1 :1-7
- Chevion S, Moran DS, Heled Y, Shani Y, Regev G, Abbou B, Berenshtein E, Stadtman ER, Epstein Y. 2003. Plasma Antioxidant Status And Cell Injury After Severe Physical Exercise. *Proc Natl Acad Sci USA*, 5119-23
- Combs Jr, GF. 1992. The Vitamins. *Fundamental aspects in Nutrition and Health*. 1 Academic Press, Inc., San diego, 528ppe
- Dalimartha S. 2008. *1001 Resep Herbal*. Jakarta: Penebar Swadaya. 11-12
- Departemen kesehatan. 1977. *Materia Medika. Jilid I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 1979. *Farmakope Indonesia. Edisi ke-3*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 1985. *Sediaan Galenik. Edisi I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 1986. *Sediaan Galenik. Jilid III*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.

- Departemen Kesehatan. 1995. *Farmakope Indonesia*. Edisi ke-4. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Jakarta.
- Departemen Kesehatan. 2005. *Pharmaceutical care untuk penyakit diabetes melitus*. Jakarta: Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik. Direktorat Jendral Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Departemen kesehatan RI. Hlm 15.
- DiPiro, Joseph T, Robert LT, Gary C Yee, Gary RM, Barbara G. Wells, and L.Michael Posey. 2005. *Pharmacotherapy a pathophysiologic approach*. New York: McGraw-Hill Companies, Inc, 1333-1352.
- Djamil R. 1990. *Kimia Bahan Alam*. Padang : Universitas Andalas.
- Dos Santos SX, Mazo LH, dan Cavalheiro ET. 2008. The Use Of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in The Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation, *J. Braz, Chem, Soc.*, 19-8.
- Droge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82:47-95.
- Evans CAR, Diplock AT, and MCR Simons, 1991. Techniques in Free Radical Research, *Elsevier Science Publisher BV*, Amsterdam, 125-149.
- Galau Menanti EBPM. 2015. Identifikasi senyawa kimia dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji jintan hitam dengan metode DPPH [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Gilman EF, Wiltson DG. 2013. *Syzygium oleana*. Forest Service Departement of Agriculture, 1-3
- Gunawan, Sulistia. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5. Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Gunawan SG. 2009. *Farmakologi dan terapi*. Edisi ke-5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan FKUI. Hlm 489-493
- Halliwel B, Gutteridge JMC. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. New York.
- Haffner SM. 1999. The importance of hyperglycemia in the non fasting state to the development cardiovascular state. *Endocrine Review*;19(5):583-92.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Ed ke-2. Diterjemahkan Ibrahim F. Bandung: ITB Bandung Press
- Hasti S, Emrizal Susilawati F. 2016. *Uji aktivitas Antidiabetes Ekstrak N-Heksan Daun Pucuk Merah (Syzygium myrtifolium Walp.) terhadap Mencit Putih Diabetes*. Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau.

- Herowati R. 2005. Aktivitas antiinflamasi rutin dan kuersetin setelah pemakaian per oral terhadap radang kaki tikus yang diinduksi karagen. *Jurnal farmasi Indonesia* 2:35-37
- Hingkua, Selly. 2004. *Penelusuran Senyawa Antidiabetes Dari Biji Alpukat(Persea americana MILL)*. Manado: Universitas Negeri Manado
- Holistic Health Solution. (2011). *Diabetes Di Usia Muda*. Jakarta : Widiasarana Indonesia.
- Iqbal M. 2014. Identifikasi Antosianin Dari Daun Pucuk Merah (*Syzygium campanolatum* Korth.) [Skripsi]. Padang: Universitas Andalas.
- Jayanti R, Hilda A, Yani L. 2015. *Analisis kualitatif bahan kimia obat (BKO) Glibenklamid dalam Sediaan Jamu Diabetes Yang Beredar Dipasaran*. Presding Penelitian SPESIA Unisba. Bandung: Prodi Farmasi, Fakultas MIPA Unisba. Hlm 649-653.
- Juwita R, Saleh C, Sitorus S. 2017. *Uji Aktivitas Antihiperurisemia dari Daun Hijau Tanaman Pucuk Merah (Syzygium myrtifolium Walp.) terhadap Mencit Jantan Mus Musculus*. Universitas Mulawarman Samarinda.
- Kementrian Kesehatan RI, 2009. *Prevalensi DM di Indonesia*. <http://www.depkes.go.id/article/view/414/tahun-2030-prevalensi-diabetesmelitus-di-indonesia-mencapai-213-juta-orang.html>., Desember, 2017.
- Kemenkes, 2013, *Riset Kesehatan Dasar*, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan RI, Jakarta.
- Kostova V, Antonova N, Velcheva I, Ivanov I. 2012. Comparative Analysis of the Rheological Properties of Blood in Patients with Type 2 Diabetes. *Ser. Biomecha*. 27 :80-85.
- Kowluru RA, Tang I, Kern TS. 2001. *Abnormalities Of Retinal Metabolism In Diabetes And Experiment Galactosemia*.50:1938-42
- Kumawat M, Sharma TK, Singh I, Singh N, Ghalaut VS, Vardey SK, Shankar V. 2013. Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Type 2 Diabetes Melitus Patients with and without Nephropathy. *North Am. J. Med. Sci*. 5: 213- 219.
- Lawrence dan Burk. 1976. Glutathione Peroxidase Activity In Selenium Deficient Rat Liver. *Biochem Biophys Res Commum* 71: 952-958.
- Loven D, Schedl H, Wilson H. 1986. *Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes*. 35: 503-507.
- Memon AH, Ismail Z, Aisha AFA, Al-Suede FSR, Hamil MSR, Hashim S, Saeed MAA, Laghari M, dan Majid AMSA. 2014. Isolation, characterization, crystal structure elucidation and anticancer study of dimethyl

- cardamonin, isolated from *Syzygium campanulatum* Korth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014:1-11.
- Mohamed J, Shing SW, Idris MHM, Budin SB, Zainal AS. 2013. The Protective Effect of Aqueous Extracts of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L. UKMR-2) Against Red Blood Cell Membrane Oxidative Stress in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *Clinics*. 68(10):1358-1363.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable free radicals diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J.Sci. Technol* 26(2):211-219
- Myeck MJ, Richard AH, Chmpe PC, Fisher BD. 2001. *Farmakologi Ulasan Bergambar*. Edisi ke 2. Jakarta: Widya medika. Hlm 260-261.
- Nair SP, Shah NC, and Shah RM. 2012. Alteration in enzymatic antioxidant defense in diabetes melitus. *Biomedical research*, 23(3):402-404
- Nishimura CY. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential targets for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological reviews*. 50(1):21-33.
- Niture NT, Ansari AA, Naik SR. 2014. Anti-hyperglycemic Activity of Rutin in Streptozotocin-induced Diabetic Rats: An Effect Mediated through Cytokines, Antioxidants and Lipid Biomarkers. *Ind. J. Exp. Biol.* 52:720-727.
- Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S. 1997. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advance glycation end product, in kidney and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest*;99(6):1272-80.
- Nugroho AE. 2006. Review hewan percobaan diabetes melitus : patologi dan mekanisme aksi diabetogenik, animal models of diabetes melitus: pathology and mechanism of some diabetogenics. *Biodiversitas* 7:378-382.
- Nuttal SL, Dunne F, Kendal MJ, Martin U. 1999. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin dependent diabetes melitus. *Q J Med*; 92:33-8
- Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM. 2001. Advance Glycation End Products Cause Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation Via The Receptor For Advance Glycation End Products (RAGE). *J Clin Invest*; 108:1853-63.
- Ozden M, Maral H, Akydin D, Cetnalp P, and Kalender B. 2002. Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Plasma Malondialdehyde And Erythrocyte Glutathione Levels In Hemodialysis And CAPD Patients. *Clinical biochemistry*, 35:269-273

- Pasaoglu H, Banu S, Neslihan B. 2004. Lipid Peroxidation And Resistance To Oxidation In Patiens With Type 2 Diabetes Melitus. *Tohoku journal experimental medicine*, 203:211-218.
- Patel DK, Prasad SK, Sairam K, Hermalatha S. 2012. Aldose Reductase Inhibitory Principles From The Whole Plant Of Hybanthus Enneaspermus (Linn) F. Muell. *Asian Pasific Journal of Tropical Biomedicine*. S165-S169.
- Prakash A, Rigelhof F, Miller E. 2001. *Antioxidant Activity, Medalliaon Laboratories Analitycal Progress*, Vol 10.
- Price dan Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. Edisi Ke- 6. Jakarta: EGC
- Punchard NA and FJ Kelly. 1996. *Free Radicals: A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, 1-6, 110-120, 125-126.
- Purwanto A. 2010. Optimasi formula gel ekstrak daun teh hijau sebagai antioksidan dengan kombinasi carbopol 940 dan metal selulosa secara metode desain factorial [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Rahbani-Nobar ME, Rahimi-Pour A, Adi-Beig F, Mirhashemi SM. 1999. Total antioxidant capacity, superoxide dismute and glutathione peroxidase in diabetic patients. *Medical journal of Islamic Academy of Sciences*; 12(4):109-14.
- Redha A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian* Vol. 9 : 196 – 202
- Robbins, Vinay K, Ramzi S, Cotran, Stanley. 2007. *Buku Ajar Patologi* Edisi 7. Jakarta:EGC Hlm. 723-725.
- Rohdrdanz E, Sandra O, Quynh-Hoa T, Regine K. 2002. The Phytoestrogen Daidzen Effects The Antioxidant Enzyme System Rat Hepatoma H4HE Cells. *Journal Of Nutrition* . 132:370-375
- Sagar B, Kedare S. 2011. *J Food Sci Technol* 48 : 412-422
- Sacher RA, Mc Pherson RA. 2004. *Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Jakarta: EGC. Hlm. 518-526.
- Santoni A, Darwis D, dan Syahri S. 2013. *Isolasi antosianin dari buah pucuk merah (Syzygium campanulatum Korth) serta pengujian antioksidan dan aplikasi sebagai pewarna alami*. Prosiding Semirata FMIPA Universitas Lampung.
- Sarker, Satyajit D, Zahid L, Alexander I, Gray. 2006. *Natural Product Isolation Second Edition*. Human Press, New Jersey.

- Sembiring FR, Sulaiman R, Sribudiani E. 2015. Karakteristik Minyak Atsiri Daun Tanaman Pucuk Merah (*Syzygium campanulatum* Korth). Universitas Riau.
- Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy R, Biplab D. 2010. Free Radicals Antioxidants, Diseases And Phytomedicines : Current Status And Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Rivew and Research* 3(1): 021.
- Setiawan B. dan Suhartono E. 2005. Stres oksidatif dan peran antioksidan pada diabetes melitus. *Majalah kedokteran Indonesia* 55(2): 86-91.
- Shakya G, Goud C, Pajaniradje S, Rajagopalan R. 2012. Protective Role of Wheatgrass on Oxidative stress In Streptozotocin Induce Type 2 Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. ISSN-0975-1491. Vol 4, Issue 3.
- Shivaprasad HN, Mohan S, Kharya MD. 2005. In-vitro model for antioxidant activity evaluation. a review. <http://www.pharmainfo.net>.
- Shoda H, Miyata S, Liu HF. 1997. Inhibitory effect of tenilsetain on the Maillard reaction. *Endocrinology*. 138(5): 1886-92.
- Simanjuntak D, Sudaryati E. 1998. Aspek pencegahan radikal bebas melalui antioksidan. *Majalah kedokteran Indonesia*;48(1):50-4.
- Sjahid, L.R. 2008. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.). [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Smith JB, Mangkoewidjojo S. 1988. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan di Daerah Tropis*. Jakarta: UI Press. hlm 37-38.
- Soesilowati S. 2013. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *Acta Medica Indonesia* 35(1):27-34.
- Studiawan H. dan MH Santosa. 2005. *Uji Aktivitas Penurun Kadar Glukosa Darah Ekstrak Daun Eugenia polyantha pada Mencit yang Diinduksi Aloksan*. J. Media Kedokteran Hewan. 21(2): 62-65.
- Sudarmaji S, Haryono B, Suhardi. 2010. *Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan Dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.
- Sudoyo AW, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, Setiadi S, editor. 2006. *Buku Ajar Penyakit Dalam*. Jilid 3 Edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam FKUI. Hlm 1852-1893
- Sukandar EY, Andrajati R, Sigit JI, Adnyana IK, Setiadi AAP, Kusnandar. 2008 *ISO Farmakoterapi*. PT. ISFI : Jakarta. Hlm 26-36
- Sundhani E, Syarifah DCN, Zumrohmi LR, Nurulita NA. 2016. *Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Adam Hawa (Rhoeo discolor) dan Daun Pucuk*

Merah (Syzygium campanulatum korth.) dalam Menurunkan Kadar Gula Darah. Universitas Muhammadiyah Purwokerto.

- Susilowati N. 2010. Aktivitas antioksidan fraksi-fraksi ekstrak metanolik daun seligi (*phyllanthus buxifolius*. Muell, Arg) terhadap radikal bebas DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) [Skripsi]. Surakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Taheri E, Djalali M, Saedisomeolia A, Moghadam AM, Djazayeri A, Qorbani M. 2012. The Relationship between the Activates of Antioxidant Enzymes in Red blood Cells and Body Mass Index in Iranian Type 2 Diabetes and Healthy Subjects. *J. Diab. Metab. Disord.* 11(3):1-5.
- Tan TH, Rahardja K. 2002. *Obat-obat penting. Khasiat. Penggunaan dan efek-efek sampingnya.* Edisi IV, 567-584. Jakarta : Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G and Kaur H. 2011. *Phytochemical Screening And Extraction: A Review*, *International Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 98-106.
- Tjay H dan Rahardja K. 2002. *Obat-obat Penting, Khasiat Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya.* Edisi ke-5 Jakarta : PT Alex Media Komputindo hlm 690-713.
- Tursiman, Ardiningsih P, dan Nofiani R. 2012. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dionica* Blume), *JKK*, 1(1), 45-48
- Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. 2002. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J Nutr*, 132:897-900.
- Voight R. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Edisi ke-5. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada. Hlm 4-10, 560-564, 568, 570.
- Voight R. 1995. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.* Edisi V. Soendani NS, penerjemah. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press. Terjemahan dari *Lehburch der Pharmazeutischen Technology.* Hlm 561-567
- WHO. 2016. Diabetes. www.who.int/topics/diabetes_melitus/en/. Diakses 10 Desember 2017
- Widowati L, Sadikin M, Wahjoedi B. 2004. Aktivitas antioksidan ekstrak biji klabet (*trigonella foenum-graecum* L.): pengukuran kadar glutathion tikus diabetes. *Media litbang kesehatan.*
- Winarsi H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas.* Yogyakarta: Kanisius. Hlm 18-20.
- Yani W. 2014. Pengaruh ekstrak daun *Thespesia populnea* (L.) *Solan Ex Correa* terhadap kadar glukosa darah mencit terinduksi aloksan dan profil klt

fraksi aktif [Skrpisi]. Bengkulu: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Bengkulu.

Yuriska F, Anindhita 2009. *Efek Aloksan Terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar. Undergraduate thesis*, Fakultas kedokteran. Universitas Diponegoro.

Zada A. 2009. *Pengaruh diet rumput laut eucheuma sp. terhadap jumlah eritrosit tikus wistar dengan diabetes aloksan*. Semarang: Fakultas Kedokteran, Universitas Diponegoro.

L

A

M

P

I

R

A

N

Lampiran 1. Hasil Determinasi Tanaman



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS SEBELAS MARET
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375
<http://www.biology.mipa.uns.ac.id>, E-mail biologi@mipa.uns.ac.id

Nomor : 237/UN27.9.6.4/Lab/2017
Hal : Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran : -
Nama Pemesan : Zainab
NIM : 20144235A
Alamat : Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta

HASIL DETERMINASI TUMBUHAN

Nama Sampel : *Syzygium myrtifolium* Walp.
Synonym : *Eugenia oleina* Wight
Eugenia myrtifolia Roxb.
Familia : Myrtaceae

Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) :
1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76b-333b-334b-335b-336b-345b-346b-348b-349a-350b-351a-352a _____ 84. Myrtaceae
1a-2b-3b-7b-8b-9b-10b _____ 9. *Syzygium*
1b-7b-8b-11b-13b-14b-15a-16b-18b-20a _____ *Syzygium myrtifolium* Walp.

Deskripsi Tumbuhan :

Habitus : perdu, menahun, tumbuh tegak, tinggi 0.75-3 m. Akar : tunggang, bercabang, putih kotor atau putih kekuningan atau coklat muda. Batang : bentuk bulat ketika dewasa, ketika muda segi empat, berkayu, bercabang, kulit batang berwarna coklat abu-abu, permukaan licin tapi pecah-pecah. Daun : tunggal, letak berhadapan; helaian daun berbentuk lanset sempit atau lanset-bulat telur, panjang 4-7 cm, lebar 0.75-3 cm, pangkal membulat hingga tumpul, tepi daun rata, ujung meruncing, permukaan gundul dan mengkilat, tulang daun menyirip, berbintik kelenjar minyak yang sangat halus, daging daun agak kaku, permukaan atas hijau tua dan permukaan bawah hijau muda ketika dewasa, ketika muda berwarna merah hingga merah tua, berbau harum; tangkai daun gundul, panjang 3 mm. Bunga : majemuk malai dengan banyak kuntum bunga, muncul di ujung batang atau ketiak daun paling atas, bunga kecil-kecil, duduk, berbau harum, bagian-bagian bunga berbilangan-4-5, bunga berkelamin banci; kelopak bunga berbentuk seperti mangkuk, panjangnya sekitar 4-5 mm, warna hijau-merah muda; daun mahkota bunga berlepasan, berwarna putih-merah muda; benang sari banyak, berwarna putih-merah muda, lekas rontok; tangkai putik merah hingga merah muda, panjang putik 5-6 mm; piringan di tengah agak persegi, merah muda hingga merah. Buah : buni membulat, diameter 8 mm, berwarna hijau-merah muda ketika muda dan hitam apabila masak. Biji : 1-2 biji per buah, warna coklat kehitaman.

Surakarta, 12 Desember 2017

Kepala Lab, Program Studi Biologi

Dr. Tetri Widiyanti, M.Si.
NIP. 19711224 200003 2 001

Penanggungjawab
Determinasi Tumbuhan

Suratman, S.Si., M.Si.
NIP. 19800705 200212 1 002

Mengetahui
Kepala Program Studi Biologi FMIPA UNS

Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.
NIP. 19660714 199903 2 001

Lampiran 2. Ethical Clearance

2/26/2018

Form A2



HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
Dr. Moewardi General Hospital
RSUD Dr. Moewardi



School of Medicine Sebelas Maret University
Fakultas Kedokteran Universitas sebelas Maret

ETHICAL CLEARANCE
KELAIKAN ETIK

Nomor : 237 / II / HREC / 2018

The Health Research Ethics Committee Dr. Moewardi General Hospital / School of Medicine Sebelas
 Komisi Etik Penelitian Kesehatan RSUD Dr. Moewardi / Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret

Maret University Of Surakarta, after reviewing the proposal design, herewith to certify
 Surakarta, setelah menilai rancangan penelitian yang diusulkan, dengan ini menyatakan

That the research proposal with topic :
 Bahwa usulan penelitian dengan judul

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN PUCUK MERAH TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH DAN AKTIVITAS ENZIM
 GLUTATION PEROKSIDASE PADA TIKUS DIABETES**

Principal investigator : Zainab
 Peneliti Utama : 20144235A

Location of research : Lab Gizi Universitas Gajah Mada
 Lokasi Tempat Penelitian

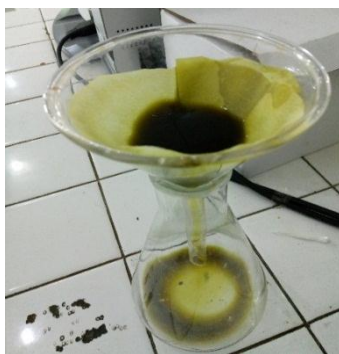
Is ethically approved
 Dinyatakan layak etik



Issued on : 26 Feb 2018

Chairman
 Ketua

Dr. Hari Wujose, dr, Sp.F.MM
 NIP. 19621022 199503 1 001

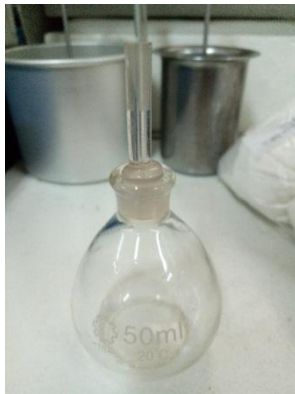
Lampiran 3. Tanaman pucuk merah**Daun pucuk merah****Tanaman pucuk merah****Daun Basah****Daun Kering****Saring****Ekstrak**

Lampiran 4. Alat

Mo
ust
ure
bal
anc
e



Timbangan elektrik


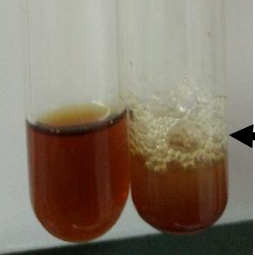
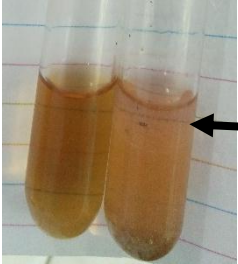
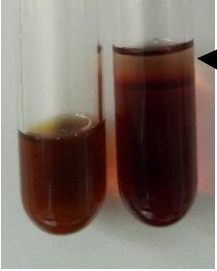

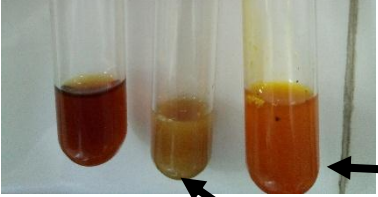
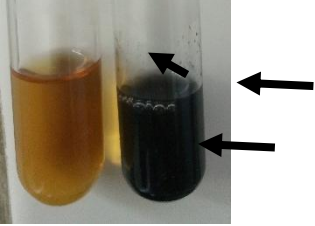
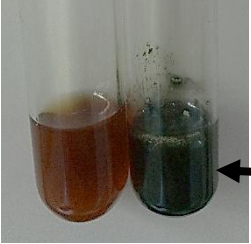

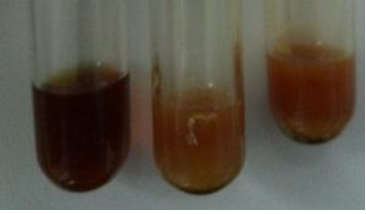


piknomete



Timbangan

Lampiran 5. Identifikasi serbuk dan ekstrak

Identifikasi	Serbuk	Ekstrak
saponin	 <p data-bbox="646 694 778 719">+ timbul buih</p>	 <p data-bbox="1093 712 1225 736">+ timbul buih</p>
Flavonoid	 <p data-bbox="515 1025 906 1055">+ warna jingga pada lapisan amil</p>	 <p data-bbox="962 1048 1358 1077">+ warna merah pada lapisan amil</p>
Alkaloid (dragendorf dan mayer)	 <p data-bbox="533 1317 890 1346">+keruh endapan putih / coklat</p>	 <p data-bbox="979 1305 1337 1335">+keruh endapan putih / coklat</p>
Tanin	 <p data-bbox="584 1630 836 1659">+ berwarna hitam</p>	 <p data-bbox="1027 1630 1283 1659">+ berwarna hitam</p>
Steroid/ terpenoid		

Lampiran 6. Hasil perhitungan rendemen simplisia daun pucuk merah

Berat basah (Kg)	Berat kering (Kg)	Rendemen (%)
4,80	3,10	64,58

perhitungan rendemen :

$$\text{rendemen} = \frac{\text{berat kering daun}}{\text{berat basah daun}} \times 100 \%$$

$$\text{rendemen} = \frac{3,10}{4,80} \times 100 \% = 64,58\%$$

Lampiran 7. Hasil perhitungan rendemen ekstrak daun pucuk merah

Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (%)
700	296,94	42,42%

Berat gelas 1

: 158,1737

g

Berat gelas 1 + ekstrak

: 280 g

Berat ekstrak

: 121,8263

Berat gelas 2

: 164,8815

g

Berat gelas 2 + ekstrak

: 340 g

Berat ekstrak

: 175,1185

g

Berat ekstrak total

: 121,8263

+ 175,1185 = 296,94 g

perhitungan rendemen :

$$\text{rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100 \%$$

$$\text{rendemen} = \frac{296,94}{700} \times 100 \% = 42,42\%$$

Lampiran 8. Hasil perhitungan kadar air serbuk

Berat serbuk (gram)	Kadar (%)
20	6
20	6
20	5,50
Rata rata ± SD	5,83 ± 0,29

perhitungan kadar air :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{air (ml)}}{\text{berat serbuk}} \times 100 \%$$

Replikasi 1 :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{1,2}{20} \times 100 \% = 6 \%$$

Replikasi 2 :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{1,2}{20} \times 100 \% = 6 \%$$

Replikasi 3 :

$$\% \text{ kadar air} = \frac{1,1}{20} \times 100 \% = 5,50 \%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{6 + 6 + 5,5}{3} = 5,83\%$$

Lampiran 9. Perhitungan Berat jenis ekstrak Replikasi 1

$$\text{Berat Piknometer kosong} = 27,6677 \text{ g}$$

$$\text{Berat Piknometer + aquades} = 77,4045 \text{ g}$$

$$\text{Aquades} = 77,4045 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 49,7368 \text{ ml}$$

$$\text{Bj air} = \frac{49,7368}{1} = 49,7368$$

$$\text{Berat Piknometer + ekstrak} = 67,802 \text{ g}$$

$$\text{Ekstrak} = 67,802 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 40,1343$$

$$\text{Bj ekstrak} = \frac{40,1343}{49,7368} = 0,81 \text{ g/ml}$$

Replikasi 2

$$\text{Berat Piknometer kosong} = 27,6677 \text{ g}$$

$$\text{Berat Piknometer + aquades} = 78,6435 \text{ g}$$

$$\text{Aquades} = 78,6435 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 50,9758 \text{ ml}$$

$$\text{Bj air} = \frac{50,9758}{1} = 50,9758$$

$$\text{Berat Piknometer + ekstrak} = 69,215 \text{ g}$$

$$\text{Ekstrak} = 69,215 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 41,5473$$

$$\text{Bj ekstrak} = \frac{41,5473}{50,9758} = 0,82 \text{ g/ml}$$

Replikasi 3

$$\text{Berat Piknometer kosong} = 27,6677 \text{ g}$$

$$\text{Berat Piknometer + aquades} = 81,2526 \text{ g}$$

$$\text{Aquades} = 81,2526 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 53,5849 \text{ ml}$$

$$\text{Bj air} = \frac{53,5849}{1} = 53,5849$$

$$\text{Berat Piknometer + ekstrak} = 69,289 \text{ g}$$

$$\text{Ekstrak} = 69,289 \text{ g} - 27,6677 \text{ g} = 41,6213$$

$$\text{Bj ekstrak} = \frac{41,6213}{53,5849} = 0,78 \text{ g/ml}$$

$$\text{Rata rata} = \frac{0,8069 + 0,8150 + 0,7767}{3} = 0,81$$

Lampiran 10. Perhitungan dosis

1. Aloksan

Pembuatan aloksan dibuat dengan konsentrasi 1,5% dengan cara menimbang sebanyak 1,5 g kemudian dilarutkan 100 ml larutan NaCl

Konsentrasi aloksan = 1,5 g/100 mL

$$= 1500 \text{ mg}/100 \text{ mL}$$

$$= 15 \text{ mg}/\text{mL}$$

Dosis aloksan yang digunakan 150 mg/kg BB secara intra peritoneal.

$$150 \text{ mg}/\text{kg BB} = \frac{200 \text{ g}}{1000 \text{ g}} \times 150 \text{ mg} = 30 \text{ mg}/200 \text{ g BB tikus}$$

Maka, volume pemberian untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah

$$\text{Volume pemberian aloksan} = \frac{30 \text{ mg}}{15 \text{ mg}} \times 1 \text{ mL} = 2 \text{ mL untuk } 200 \text{ g BB tikus}$$

2. Suspensi CMC Na 0,5%

Serbuk CMC Na 0,5 g kemudian disuspensikan dengan aquades panas ad 100 mL sampai homogen. Suspensi ini digunakan sebagai kontrol dan suspending agent.

$$\text{Konsentrasi CMC Na } 0,5\% = 0,5 \text{ g}/100 \text{ mL} = 500 \text{ mg}/100 \text{ mL} = 5 \text{ mg}/\text{mL}$$

3. Glibenklamid

Dosis terapi glibenklamid sekali pemakaian untuk manusia 70 kg adalah 5 mg. Faktor konversi dari manusia 70 kg ke tikus 200 g adalah 0,018

$$\text{Dosis glibenklamid untuk tikus } 200 \text{ g} = 5 \text{ mg} \times 0,018 = 0,09 \text{ mg}/200 \text{ g}$$

$$\text{BB} = 0,45 \text{ mg}/\text{kg BB}$$

$$\text{Berat tablet glibenklamid} = 0,2 \text{ g} = 200 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis glibenklamid tablet untuk tikus } 200 \text{ g} = \frac{0,09 \text{ mg}}{5 \text{ mg}} \times 200 \text{ mg} =$$

$$3,6 \text{ mg}/200 \text{ g BB}$$

Suspensi glibenklamid dibuat dalam konsentrasi 0,18% dengan menimbang 180 mg glibenklamid kemudian disuspensikan dengan CMC 0,5% hingga volume 100 ml sampai homogen.

$$\text{Konsentrasi glibenklamid} = 0,18 \text{ g}/100 \text{ mL}$$

$$= 180 \text{ mg}/100 \text{ mL}$$

$$= 1,8 \text{ mg/mL}$$

Maka, volume pemberian untuk tikus dengan berat badan 200 g adalah

$$\text{Volume pemberian glibenklamid} = \frac{3,6 \text{ mg}}{1,8 \text{ mg}} \times 1 \text{ mL} = 2 \text{ mL untuk } 200 \text{ g BB}$$

tikus

Pembuatan larutan stok dan volume pemberian

1. Ekstrak daun pucuk merah 150 mg/kg BB

Menimbang ekstrak daun pucuk merah 1,5 gram disuspensikan dengan CMC 0,5% hingga homogen kemudian ditambahkan ad 100 ml

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi larutan stok ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{1,5 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 1,5 \% \\ &= \frac{1500 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 15 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\text{Ekstrak daun pucuk merah } 150 \text{ mg/kg BB} = 30 \text{ mg/200 g BB}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{30 \text{ mg}}{15 \text{ mg}} \times 1 \text{ mL} \\ &= 2 \text{ mL/200 g BB tikus} \end{aligned}$$

2. Ekstrak daun pucuk merah 300 mg/kg BB

Menimbang ekstrak daun pucuk merah 3 gram disuspensikan dengan CMC 0,5% hingga homogen kemudian ditambahkan ad 100 ml

$$\begin{aligned} \text{Konsentrasi larutan stok ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{3 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 3 \% \\ &= \frac{3000 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = 30 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\text{Ekstrak daun pucuk merah } 300 \text{ mg/kg BB} = 60 \text{ mg/200 g BB}$$

$$\begin{aligned} \text{Volume pemberian ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{60 \text{ mg}}{30 \text{ mg}} \times 1 \text{ mL} \\ &= 2 \text{ mL/200 g BB tikus} \end{aligned}$$

3. Ekstrak daun pucuk merah 600 mg/kg BB

Menimbang ekstrak daun pucuk merah 6 gram disuspensikan dengan CMC 0,5% hingga homogen kemudian ditambahkan ad 100 ml

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi larutan stok ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{6 \text{ g}}{100 \text{ mL}} = 6 \% \\ &= \frac{6000 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} \\ &= 60 \text{ mg/mL}\end{aligned}$$

$$\text{Ekstrak daun pucuk merah } 600 \text{ mg/kg BB} = 120 \text{ mg/200 g BB}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume pemberian ekstrak daun pucuk merah} &= \frac{120 \text{ mg}}{60 \text{ mg}} \times 1 \text{ mL} \\ &= 2 \text{ mL/200 g BB tikus}\end{aligned}$$

Lampiran 11. Hasil pengukuran GPx

kelompok	kode hewan	absorbansi	kadar (U/mg)	rata rata \pm SD
	1	0,099	76,399	
	1	0,100	77,170	
1	1	0,107	82,572	76,71 \pm 3,64
	1	0,096	74,084	
	1	0,095	73,312	
	2	0,032	24,695	
	2	0,029	22,379	
2	2	0,030	23,151	23,92 \pm 1,22
	2	0,031	23,923	
	2	0,033	25,466	
	3	0,090	69,453	
	3	0,087	67,138	
3	3	0,091	70,225	69,30 \pm 1,48
	3	0,089	68,682	
	3	0,092	70,997	
	4	0,054	41,672	
	4	0,057	43,987	
4	4	0,060	46,302	43,06 \pm 2,14
	4	0,055	42,444	
	4	0,053	40,900	
	5	0,071	54,791	
	5	0,069	53,248	
5	5	0,073	56,334	55,56 \pm 2,44
	5	0,077	59,421	
	5	0,070	54,019	
	6	0,082	63,280	
	6	0,080	61,736	
6	6	0,084	64,823	63,28 \pm 1,97
	6	0,079	60,965	
	6	0,085	65,595	

$$\text{rumus perhitungan GPx} = \frac{\text{absorbansi} \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1}{6,22 \times 0,2 \times 10}$$

$$\text{contoh perhitungan GPx} = \frac{0,099 \times 1,2 \times 2 \times 1000 \times 1}{6,22 \times 0,2 \times 10} = 76,399$$

Lampiran 12. Hasil uji statistik one way anova GPx

Tests of Normality

kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a	Shapiro-Wilk		
	Sig.	Statistic	df	Sig.
GPx kontrol sehat	.200 [*]	.896	5	.390
kontrol negatif (Cmc Na)	.200 [*]	.987	5	.968
kontrol positif (glibenklamid)	.200 [*]	.979	5	.929
ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	.200 [*]	.938	5	.655
ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	.200 [*]	.912	5	.480
ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	.200 [*]	.944	5	.695

a. Lilliefors Significance Correction

*. This is a lower bound of the true significance.

Test of Homogeneity of Variances

GPx			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.976	5	24	.452

ANOVA

GPx					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9261.652	5	1852.330	354.200	.000
Within Groups	125.511	24	5.230		
Total	9387.162	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

GPx Tukey HSD						
(I) kelompok	(J) kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol sehat	kontrol negatif (Cmc Na)	52.78400 [*]	1.44632	.000	48.3121	57.2559
	kontrol positif (glibenklamid)	7.40600 [*]	1.44632	.000	2.9341	11.8779
	ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	33.64600 [*]	1.44632	.000	29.1741	38.1179
	ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	21.14400 [*]	1.44632	.000	16.6721	25.6159
	ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	13.42800 [*]	1.44632	.000	8.9561	17.8999
kontrol negatif (Cmc Na)	kontrol sehat	-52.78400 [*]	1.44632	.000	-57.2559	-48.3121
	kontrol positif (glibenklamid)	-45.37800 [*]	1.44632	.000	-49.8499	-40.9061
	ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	-19.13800 [*]	1.44632	.000	-23.6099	-14.6661
	ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	-31.64000 [*]	1.44632	.000	-36.1119	-27.1681
	ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	-39.35600 [*]	1.44632	.000	-43.8279	-34.8841
kontrol positif (glibenklamid)	kontrol sehat	-7.40600 [*]	1.44632	.000	-11.8779	-2.9341
	kontrol negatif (Cmc Na)	45.37800 [*]	1.44632	.000	40.9061	49.8499
	ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	26.24000 [*]	1.44632	.000	21.7681	30.7119
	ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	13.73800 [*]	1.44632	.000	9.2661	18.2099
	ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	6.02200 [*]	1.44632	.004	1.5501	10.4939

ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	kontrol sehat	-33.64600 ^a	1.44632	.000	-38.1179	-29.1741
	kontrol negatif (Cmc Na)	19.13800 ^a	1.44632	.000	14.6661	23.6099
	kontrol positif (glibenklamid)	-26.24000 ^a	1.44632	.000	-30.7119	-21.7681
	ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	-12.50200 ^a	1.44632	.000	-16.9739	-8.0301
	ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	-20.21800 ^a	1.44632	.000	-24.6899	-15.7461
ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	kontrol sehat	-21.14400 ^a	1.44632	.000	-25.6159	-16.6721
	kontrol negatif (Cmc Na)	31.64000 ^a	1.44632	.000	27.1681	36.1119
	kontrol positif (glibenklamid)	-13.73800 ^a	1.44632	.000	-18.2099	-9.2661
	ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	12.50200 ^a	1.44632	.000	8.0301	16.9739
	ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	-7.71600 ^a	1.44632	.000	-12.1879	-3.2441
ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	kontrol sehat	-13.42800 ^a	1.44632	.000	-17.8999	-8.9561
	kontrol negatif (Cmc Na)	39.35600 ^a	1.44632	.000	34.8841	43.8279
	kontrol positif (glibenklamid)	-6.02200 ^a	1.44632	.004	-10.4939	-1.5501
	ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	20.21800 ^a	1.44632	.000	15.7461	24.6899
	ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	7.71600 ^a	1.44632	.000	3.2441	12.1879

^a. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Homogeneous Subsets

GPx

Tukey HSD^a

kelompok	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
kontrol negatif (Cmc Na)	5	23.9220					
ekstrak pucuk merah 150 mg/kg bb	5		43.0600				
ekstrak pucuk merah 300 mg/kg bb	5			55.5620			
ekstrak pucuk merah 600 mg/kg bb	5				63.2780		
kontrol positif (glibenklamid)	5					69.3000	
kontrol sehat	5						76.7060
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.

Lampiran 13. Radikal bebas DPPH**Penimbangan DPPH**

$$80 \text{ ppm} = \frac{80 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{8 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan DPPH 80 ppm ditimbang DPPH 8 mg dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml yang telah ditutup dengan aluminium foil

Lampiran 14. Perhitungan ekstrak Pucuk merah

1. Penimbangan ekstrak

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{100 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk ekstrak 1000 ppm ditimbang ekstrak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml

2. Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
20	0,2	10
40	0,4	10
60	0,6	10
80	0,8	10
100	1	10

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 20 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm} \times V_1 = 20 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,2$$

Larutan induk ekstrak 1000 ppm dipipet sebanyak 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1 ml kemudian masing masing ditambahkan etanol samai tanda batas dalam labu takar 10 ml

Lampiran 15. Perhitungan rutin

1. Penimbangan rutin

$$50 \text{ ppm} = \frac{50 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} = \frac{5 \text{ mg}}{100 \text{ ml}}$$

Untuk membuat larutan induk rutin 50 ppm ditimbang rutin 5 mg dan dilarutkan dengan etanol sampai tanda batas dalam labu takar 100 ml

3. Pembuatan seri konsentrasi

Larutan induk rutin 50 ppm dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm

Konsentrasi (ppm)	Pengenceran (ml)	Volume yang dibuat (ml)
2	0,4	10
4	0,8	10
6	1,2	10
8	1,6	10
10	2	10

Contoh perhitungan pembuatan konsentrasi 2 ppm

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$50 \text{ ppm} \times V_1 = 2 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,4 \text{ ml}$$

Larutan induk rutin 50 ppm dipipet sebanyak 0,4 ml, 0,8 ml, 1,2 ml, 1,6 ml, 2 ml kemudian masing masing ditambahkan etanol samai tanda batas dalam labu takar 10 ml

Lampiran 16. Perhitungan IC50 ekstrak

Replikasi	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC50 (µg/mL)
1	20	0.502	42.759	54.18
	40	0.477	45.610	
	60	0.431	50.855	
	80	0.389	55.644	
	100	0.331	62.258	
2	20	0.505	42.417	52.22
	40	0.464	47.092	
	60	0.427	51.311	
	80	0.384	56.214	
	100	0.328	62.600	
3	20	0.499	43.101	53.98
	40	0.473	46.066	
	60	0.434	50.513	
	80	0.379	56.784	
	100	0.348	60.319	
Rata-rata ± SD				53,46 ± 1,08

ABSORBANSI BLANGKO 0,877

Contoh perhitungan % inhibisi :

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi blangko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blangko}} \times 100\%$$

$$\%inhibisi = \frac{0,877 - 0,502}{0,877} \times 100 = 42.759\%$$

Perhitungan IC50 :

Hasil regresi linear replikasi 1

$$a : 36,716$$

$$b : 0,2452$$

$$r : 0,992$$

$$y = a + bX \text{ (X = IC50)}$$

$$50 = 36,716 + 0,2452X$$

$$X = \frac{50 - 36,716}{0,2452}$$

$$X = 54,18$$

Hasil regresi linear replikasi 2 :

$$a : 37,081$$

$$b : 0,2474$$

$$r : 0,996$$

$$y = a + bX \text{ (X = IC50)}$$

$$50 = 37,081 + 0,2474X$$

$$X = \frac{50 - 37,081}{0,2474}$$

$$X = 52,22$$

Hasil regresi linear replikasi 3 :

$$a : 37,811$$

$$b : 0,2258$$

$$r : 0,993$$

$$y = a + bX \text{ (X = IC50)}$$

$$50 = 37,811 + 0,2258X$$

$$X = \frac{50 - 37,811}{0,2258}$$

$$X = 53,98$$

$$\text{Rata- rata nilai IC50} = \frac{54,176 + 52,219 + 53,981}{3} = 53,46 \mu\text{g/mL}$$

Lampiran 17. Perhitungan IC50 rutin

Replikasi	Konsentrasi	Absorbansi	% Inhibisi	IC50 (µg/mL)
1	2	0.671	23.227	8.69
	4	0.594	32.037	
	6	0.537	38.558	
	8	0.451	48.398	
	10	0.397	54.577	
2	2	0.674	22.883	8.06
	4	0.609	30.320	
	6	0.545	37.643	
	8	0.422	51.716	
	10	0.357	59.153	
3	2	0.664	24.027	8.64
	4	0.591	32.380	
	6	0.539	38.330	
	8	0.46	47.368	
	10	0.385	55.950	
Rata-rata ± SD				8,46 ± 0,35

ABSORBANSI BLANGKO 0,874

Contoh perhitungan % inhibisi :

$$\%inhibisi = \frac{\text{absorbansi blangko} - \text{absorbansi samPel}}{\text{absorbansi blangko}} \times 100\%$$

$$\%inhibisi = \frac{0,874 - 0,671}{0,874} \times 100 = 23,227 \%$$

Perhitungan IC50

Hasil regresi linear replikasi 1

a : 15,641

b : 3,9531

r : 0,992

$$y = a + bX \quad (X=IC50)$$

$$50 = 15,641 + 3,9531X$$

$$X = \frac{50 - 15,641}{3,9531}$$

$$X = 8,69$$

Hasil Regresi Linear Replikasi 2

$$a : 12,162$$

$$b : 4,6968$$

$$r : 0,992$$

$$y = a + bX \text{ (X=IC50)}$$

$$50 = 12,162 + 4,6968X$$

$$X = \frac{50 - 12,162}{4,6968}$$

$$X = 8,06$$

Hasil regresi linear replikasi 3

$$a : 15,961$$

$$b : 3,9416$$

$$r : 0,998$$

$$y = a + bX \text{ (X=IC50)}$$

$$50 = 15,961 + 3,9416X$$

$$X = \frac{50 - 15,961}{3,9416}$$

$$X = 8,64$$

$$\text{Rata-rata IC50} = \frac{8,692 + 8,056 + 8,636}{3} = 8,46$$

Lampiran 18. Panjang gelombang maksimum

Wavelength	Abs
519.00	0.8476

Lampiran 19. *Operating time* ekstrak

Waktu	Absorbansi
0	0.6076
1	0.6063
2	0.6045
3	0.6049
4	0.6034
5	0.6026
6	0.6012
7	0.6003
8	0.5988
9	0.5980
10	0.5967
11	0.5955
12	0.5946
13	0.5935
14	0.5921
15	0.5919
16	0.5913
17	0.5900
18	0.5893
19	0.5883
20	0.5874
21	0.5866
22	0.5858
23	0.5854
24	0.5843
25	0.5833
26	0.5829
27	0.5807
28	0.5807
29	0.5807
30	0.5807

Lampiran 20. *Operating time* rutin

Waktu	Absorbansi
0	0.5468
1	0.5484
2	0.5374
3	0.5363
4	0.5234
5	0.5232
6	0.5171
7	0.5189
8	0.5161
9	0.5135
10	0.5134
11	0.5107
12	0.5078
13	0.5049
14	0.5013
15	0.4983
16	0.4947
17	0.4911
18	0.4884
19	0.4847
20	0.4830
21	0.4800
22	0.4783
23	0.4765
24	0.4754
25	0.4748
26	0.4724
27	0.4724
28	0.4724
29	0.4724
30	0.4724