

PENGARUH PEMBERIAN INFUSA DAUN KEROKOT TERHADAP KADAR MALONDIALDEHIDA PADA HEWAN COBA

Devitamara Ayu, Lizma Febrina, Welinda Dyah, Hadi Kuncoro

Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email: devitamaraayu5@gmail.com

ABSTRACT

Kerokot (*Lygodium microphyllum*) showed antioxidant activity with an IC₅₀ value of 65 μ .g/ml. The aim of this study is to know secondary metabolites contained in kerokot leaves and determine the infusion of kerokot leaves against malondialdehyde (MDA) in model animals exposed to cigarette smoke. The TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) method used by Spectrophotometer UV-Vis to examine MDA levels. There were 4 groups: the normal group, the smoking exposed group for 7 days, the smoking exposed group for 14 days and the smoking exposed group with kerokot leaf infusion. Results Phytochemical tests showed that kerokot leaves infusion contained flavonoid and tannins. Testing of MDA levels showed a decrease in MDA levels after be given of kerokot infusion dose of 600 mg/kg BB.

Keywords: Infusion of kerokot leaves, Cigarette smoke, Malondialdehida

ABSTRAK

Tanaman kerokot (*Lygodium microphyllum*) menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 65 μ .g/ml. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun kerokot dan mengetahui pengaruh pemberian infusa daun kerokot terhadap malondialdehida (MDA) pada hewan coba yang telah dipaparkan asap rokok. Digunakan metode TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) yang diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis untuk menganalisis kadar MDA. Hewan coba sebanyak 20 ekor dibagi 4 kelompok yaitu kelompok kontrol normal, paparan asap rokok selama 7 hari, kelompok paparan asap rokok 14 hari serta kelompok infusa daun kerokot. Hasil fitokimia menunjukkan bahwa infusa daun kerokot mengandung flavonoid dan tanin. Pengujian kadar MDA menunjukkan hasil penurunan kadar MDA setelah pemberian infusa daun kerokot dosis 600 mg/kg BB.

Kata Kunci: Infusa daun kerokot, Asap rokok, Malondialdehida

DOI: <https://doi.org/10.25026/mpc.v9i1.339>

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu atom yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Senyawa radikal bebas timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, berupa hasil samping dari proses oksidasi atau pembakaran sel. Radikal bebas menjadi faktor penyebab terjadinya penyakit seperti kanker, jantung koroner, dan penuaan dini [1].

Salah satu pemicu radikal bebas adalah asap rokok yang dapat menyebabkan peroksidasi dari asam lemak tak jenuh membran sel yang memperkuat stres oksidatif selama menghirup asap rokok. Stres oksidatif adalah suatu keadaan yang jumlah senyawa radikal di dalam tubuh melebihi kapasitas kemampuan netralisasi antioksidan didalam tubuh. Kadar radikal bebas dapat diukur dengan Malondialdehid (MDA) yang merupakan hasil peroksida lipid akibat radikal bebas. MDA digunakan sebagai marker atau penanda radikal bebas dalam tubuh, jika jumlah radikal bebas meningkat maka jumlah kadar MDA meningkat sehingga dibutuhkan antioksidan [2].

Kerokot (*Lygodium micropylum*) adalah salah satu bahan alam yang telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan dan juga pada masyarakat dimanfaatkan rebusan daun untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti disentri, demam, nyeri otot, dan kanker[3]. Kerokot yang berperan sebagai antioksidan yaitu senyawa flavonoid. Mekanisme kerjanya dengan menagkal radikal bebas. Ekstrak antioksidan kerokot secara *in vitro* menunjukkan bahwa kerokot memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} 65 μ .g/ml [4]. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian infusa daun kerokot terhadap kadar malondialdehida (MDA) pada hewan coba yang telah dipaparkan asap rokok

METODE PENELITIAN

Alat

Batang Pengaduk ,Botol coklat, Corong kaca , Gelas kimia (Pyrex) , Gunting bedah, *Hot plate*, Kuvet, Labu ukur, Mikropipet(Dragon Med) , Penjepit tabung , Propipet , Pipet tetes, Sendok tanduk, Sentrifuge (Gemmy PLC-03), Sonde, Spektrofotometer UV-Visible (Halo DB 207), *Smoking chamber*, Timbangan analitik (Precisa), Timbangan hewan

Bahan

Aquadest, Asam Tiobarbiturat (TBA), Asam Trikoloro Asetat (TCA), Etanol 70%, Etilen diamin tetra asetat (EDTA),Kapas, Rokok , infusa daun kerokot Tetrametoksipropana (TMP)

Prosedur

Persiapan Hewan Coba

Hewan coba berupa tikus putih wistar dengan anggota tubuh yang normal dan lengkap. Dikelompokkan menjadi 4 kelompok yaitu kelompok 1 yaitu kontrol, kelompok 2 yaitu kelompok yang dipaparkan asap rokok selama 7 hari, kelompok 3 yaitu kelompok yang dipaparkan asap rokok selama 14 hari dan kelompok 4 yaitu kelompok yang 7 hari diberi paparan asap rokok lalu diberi seduhan daun kerokot. Setiap kelompok berisikan 5 ekor hewan coba. Diberikan makanan minuman standar setiap hari dan dijaga kebersihan kandang.

Persiapan Bahan uji

Bahan uji berupa asap rokok dari rokok berfilter

Pemaparan Asap Rokok

Hewan coba diletakkan dalam chamber smoking lengkap dengan ventilasi udara, dialirkan asap yang telah dikumpulkan dalam chamber pengumpul asap hingga asap habis. Proses pemaparan dilakukan setiap pagi dan sore

hari dengan menggunakan asap dari 3 batang rokok selama 7 hari dan 14 hari.

Pembuatan Kurva Baku Tetrametoksipropin (TMP)

Pipet TMP pekat (6M) sebanyak 25 µg, sebagai standar dalam pengujian kadar MDA sampel diencerkan dengan aquades hingga 100 mL, lalu pipet 1 mL dan diencerkan kembali menggunakan aquades hingga 50 mL dan diperoleh larutan stok TMP 20 nmol/mL. Buat larutan TMP dengan konsentrasi 20 nmol/mL sebagai standar dalam pengujian kadar MDA sampel. Ambil dari larutan stok tersebut sebanyak 0,65; 1,25; 2,5; 5 dan 10 ppm. Lalu masukkan 0,5 mL ke dalam 5 buah tabung reaksi yang berbeda. Tambahkan Asam Trikloroasetat (TCA) 20% sebanyak 1 mL ke dalam setiap tabung reaksi, lalu kocok hingga homogen. Tambahkan Aquadest ke dalam setiap tabung reaksi hingga volumenya mencapai 2 mL. Tambahkan reagen Asam Tiobarbiturat (TBA) 1% dalam asam asetat glasial 50% sebanyak 1 mL ke dalam setiap tabung reaksi, kocok kembali hingga homogen. Gunakan larutan yang sama tanpa TMP sebagai blanko. Masukkan semua tabung reaksi ke dalam pemanas air pada suhu 100 °C selama 45 menit, lalu dinginkan. Ukur absorbansi pada $\lambda = 531$ nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dan buat kurva kalibrasi.

Pembuatan Infusa

Timbang 20 gram daun kerokot segar, lalu ekstraksi menggunakan metode infus yaitu dengan cara merebus seluruh bagian daun dengan 100 ml pelarut air dalam panci dalam suhu 90°C selama 15 menit.

Pemberian Infusa Daun Kerokot

Pemberian infusa daun kerokot pada kelompok 4 yang dilakukan secara oral (intubasi oesophagus) sehari sekali selama 7 hari dengan konsentrasi 5%.

Identifikasi Metabolit Sekunder

Alkaloid

2 ml infusa daun kerokot ditambahkan 5 mL HCl 2 M, kemudian larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai blanko, ditambahkan dengan 3 tetes HCl 2 M. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Meyer. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna jingga sedangkan pereaksi Mayer dengan terbentuknya endapan berwarna putih.

Flavonoid

2 mL infusa daun kerokot ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

Saponin

10 ml infusa daun kerokot dikocok selama 30 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa.

Tanin

1 mL ekstrak ditambahkan dengan beberapa tetes FeCl₃ 10%. Jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin

Polifenol

Infusa daun kerokot sebanyak 3 ml ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Uji positif ditunjukkan adanya perubahan warna hijau, merah, ungu, biru atau kehitaman.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Perlakuan Hewan coba

Hewan coba dibagi 4 kelompok perlakuan. Kelompok pertama yaitu tanpa paparan asap rokok dan perlakuan.

Kelompok 2 adalah kelompok yang telah diberikan asap rokok setiap pagi dan sore dengan 3 batang rokok selama 7 hari. Kelompok 3 diberi paparan selama 14 hari, dan kelompok 4 yaitu diberi paparan selama 7 hari dan 7 hari diberi infusa daun kerokot

Pengambilan Serum Darah

Hewan coba diletakkan dalam holder untuk mempermudah proses pengambilan darah melalui ekor. Usap ekor tikus dengan kapas yang diberi etanol 70% lalu potong sedikit ujung ekor tikus. Usap perlahan dari pangkal hingga ujung ekor, tampung 1 mL darah didalam microtube. Sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Ambil supernatan untuk pengujian tahap selanjutnya. Pengambilan dilakukan sebelum dan sesudah pemaparan (Febrina, 2016)

Pengukuran Kadar MDA

Pipet 1 mL supernatan (plasma) dari semua kelompok, baik kelompok uji maupun kontrol ke dalam tabung reaksi. Tambahkan TCA 20% sebanyak 1 mL. Sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Pipet 1 mL supernatan dan tambahkan dengan 1 mL TBA 1 % dalam asetat glasial 50% dan inkubasi pada suhu 100°C selama 45 menit, lalu dinginkan. Ukur absorbansi dari warna yang terbentuk pada $\lambda = 531$ nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Hitung kadar MDA sampel dengan menggunakan kurva kalibrasi dari TMP (Arganta, 2016).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas, asap rokok yang digunakan berasal dari asap rokok berfilter. Hewan coba yang dipaparkan asap rokok dikondisikan sebagai perokok pasif. Perokok pasif lebih berbahaya dibandingkan perokok aktif karena kandungan asap yang dilepaskan keudara

memiliki kandungan nikotin lebih tinggi daripada yang dihisap.

Senyawa radikal bebas bereaksi dengan senyawa PUFA (*Polyunsaturated Fatty Acid*) yang mengakibatkan kerusakan oksidatif pada senyawa lipid. Pada saat mekanisme pertahanan tubuh tidak mampu meredam, ROS akan berlebih. *L. micropyllum* adalah salah satu bahan alam yang telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan dan juga pada masyarakat dimanfaatkan rebusan daun untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti disentri, demam, nyeri otot, dan kanker. Dilakukan uji analisis fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder pada daun kerokot yang telah diinfusa. Hasil analisis fitokimia pada infusa daun kerokot dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji Fitokimia Daun Kerokot

No	Identifikasi Senyawa	Hasil
1	Alkaloid	-
2	Flavonoid	+
3	Tanin	+
4	Saponin	-
5	Polifenolik	-

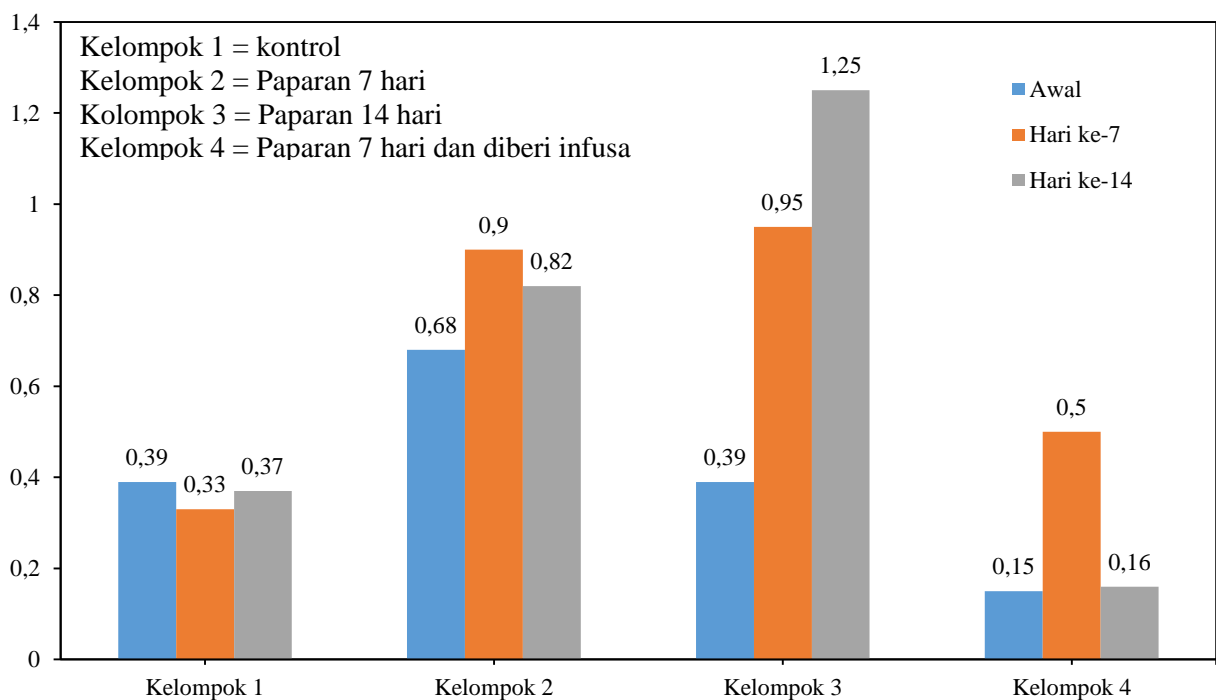
Keterangan :

+ = Mengandung senyawa metabolite sekunder
 - = Tidak mengandung senyawa metabolite sekunder

Analisis kadar MDA dilakukan dengan menggunakan serum darah yang diukur menggunakan spektrofotometer. Digunakan serum karena MDA pada darah terdapat didalam serum dan juga mencegah tercemarnya specimen oleh koagulasi. Kemudian serum yang diperoleh ditambahkan TCA 20% dan TBA 0,01 %. Tujuan ditambahkan TCA untuk mengendapkan protein yang terdapat pada serum yang akan mengganggu analisi sampel, sedangkan penambahan TBA digunakan untuk

reagen pengkompleks malondialdehid agar dapat bereaksi sempurna dengan MDA. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan TBA adalah asam asetat glasial 50 % , lebih dipilih karena sebagai pemberi suasana asam yang diperlukan untuk memprotonasi dan mengoksidasi TBA sehingga dapat bereaksi membentuk senyawa kompleks. Hasil pengukuran ditunjukkan pada Tabel 2

Rerata kadar MDA digambarkan dalam grafik kadar MDA dengan persamaan kurva baku yang diperoleh dari kurva baku kalibrasi TMP dengan larutan standar 1,1,3,3-tetrametoksipropana. TMP adalah prekursor dari MDA, karena sifatnya tidak stabil maka dijadikan sebagai standar MDA. Persamaan kurva baku yang diperoleh adalah $y = 0,115 + 0,045x$. Hasil kadar MDA ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kadar MDA

Tabel 2 Rata rata absorbansi kadar MDA

No	Kelompok Perlakuan	Rata-rata ± SD		
		Awal	Hari ke-7	Hari ke-14
1	Kontrol	0,132 ± 0,05	0,126 ± 0,047	0,130 ± 0,041
2.	Paparasi 7 hari	0,166 ± 0,035	0,191 ± 0,009	0,182 ± 0,017
3.	Paparasi 14 hari	0,132 ± 0,091	0,197 ± 0,084	0,231 ± 0,084
4	Kerokot	0,105 ± 0,033	0,145 ± 0,022	0,106 ± 0,019

Dari hasil gambar 1 menunjukkan gambar pada kelompok paparan 7 hari mengalami kenaikan pada hari ke 7 yakni dari 0,68 nmol/mL ke 0,9 nmol/mL dimana awal reaksi radikal bebas dengan tubuh menyerang asam lemak hingga dihasilkan hasil samping. Tahapan ini termasuk dalam tahapan inisiasi dan propagasi. Kemudian pada hari ke 14 terjadi penurunan dari 0,9 nmol/mL menjadi 0,82 nmol/mL disebabkan karena adanya antioksidan endogen didalam tubuh terjadinya tahapan terminasi dimana terhentinya pembentukan hidroperoksida lipid. Pada kelompok paparan 14 hari mengalami peningkatan namun peningkatan yang terjadi di hari 14 tidak sebanyak terjadi peningkatan di hari ke 7 yaitu 0,95 nmol/mL dengan 1,25 nmol/mL. Peranan antioksidan endogen yang berperan pada hari 7 berikutnya untuk mempertahankan kondisi yang stabil hanya saja ketika tubuh terpapar radikal endogen dan eksogen berlebih, tubuh akan lebih memacu keras dirinya melakukan mekanisme internal untuk mencegah kerusakan yang akan terjadi akibat adanya radikal bebas tetapi justru mengakibatkan tubuh cepat mengalami kerusakan, sehingga diperlukan antioksidan eksogen yang dapat membantu kinerja tubuh dalam mengatasi kondisi tersebut. Salah satu sumber antioksidan alami adalah kerokot. Pada kelompok 4 yaitu tikus dipaparkan asap rokok selama 7 hari dan diberi infusa daun kerokot 600 mg memberikan efek penurunan kadar MDA dari 0,5 nmol/mL menjadi 0,16 nmol/mol berbeda sedikit dengan kadar MDA awal yakni 0,15 nmol/mL dengan 0,16 nmol maka infusa daun kerokot terbukti mempunyai senyawa antioksidan yang mampu menurunkan kadar MDA.

KESIMPULAN

Uji fitokimia menunjukkan bahwa infusa daun kerokot mengandung flavonoid dan tannin. Infusa daun kerokot dapat mempengaruhi kadar MDA pada hewan coba yang telah dipaparkan asap rokok. Dosis 600 mg infusa daun kerokot, dosis efektif untuk menurunkan kadar MDA.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dewi, T. d. 2013. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih dengan Metode DPPH. *UIN*, 7.
- [2] Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas : Potensi dan Aplikasinya*. Penerbit Kanisius: Yogyakarta .
- [3] Hasanah, S. 2015. Toksisitas *Lygodium Microphyllum*, *Premna Serratifolia* L. dan *Vitex Pinnata* Asal Desa Kuala Mandor B. *JKK*, 4.
- [4] Gnanaraj, Charles dkk. 2017. Hepatoprotective mechanism of *lygodium microphyllum* through ultrastructural signaling prevention against carbon tetrachloride (CCl_4)-mediated oxidative stress
- [5] Arganta, Kiki dkk. 2016. Pengaruh Pemberian Infusa Daun Kerokot (*lygodium microphyllum*) terhadap Perubahan Kadar Malondialdehid (MDA) Pada Tikus Yang Dipaparkan Asap Rokok. Prosiding SEMNAS Kefarmasian. Samarinda
- [6] Febrina, L. 2016. Profil Kadar Malondialdehid, Glukosa, dan Kolesterol Pada Tikus Putih yang Terpapar Asap Rokok. *J. Trop. Pharm. Chem*, Vol 1 No 3.