



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT APEL MANALAGI**

**(*Malus sylvestris Mill*) UNTUK MENCEGAH PENINGKATAN KADAR SERUM**

**LDL (*Low Density Lipoprotein*) TIKUS (*Rattus norvegicus*) BUNTING YANG**

**DIPAPAR ASAP ROKOK**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan**



**Oleh:**

**Fathan Hayati**

**NIM.155070601111032**

**PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN**

**JURUSAN KEBIDANAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**



## DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPEL	
SAMPUL DALAM.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
KATA PENGANTAR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ABSTRAK.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
ABSTRACT .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR ISI.....	2
DAFTAR TABEL.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR GAMBAR.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR LAMPIRAN .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
DAFTAR SINGKATAN.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.1 Latar Belakang .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.2 Rumusan Masalah.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3 Tujuan Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.1 Tujuan Umum.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.3.2 Tujuan Khusus .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4 Manfaat Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.1 Manfaat Akademik.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
1.4.2 Manfaat Praktis.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1 ROKOK .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.1 Kandungan Rokok.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



2.1.2 Perokok Pasif .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.1.3 Radikal Bebas .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2 LIPID .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.1 Definisi Lipid Plasma .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.2 Definisi Lipoprotein .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.3 LDL ( <i>Low Density Lipoprotein</i> ).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.4 Peroksidasi Lipid .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.2.5 Oksidasi LDL .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.3 TIKUS ( <i>Rattus norvegicus</i> ) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4 APEL ( <i>Malus sylvestris Mill</i> ).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.1 Definisi Apel .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.2 Karakteristik Apel Manalagi .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.3 Kandungan Antioksidan Apel.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.4 Antioksidan Kuersetin .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.5 Tipe Antioksidan .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
2.4.6 Peran Antioksidan Terhadap Radikal.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

### **BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN****Error! Bookmark not defined.**

3.1 Kerangka Konsep .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 Hipotesis Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

### **BAB 4 METODE PENELITIAN****Error! Bookmark not defined.**

4.1 Desain Penelitian.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2 Subjek Penelitian .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.1 Jumlah Sampel.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4.2.2 Kriteria Inklusi.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>



- 4.2.3 Kriteria Eksklusi..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.2.4 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.3 Variabel Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5 Bahan dan Alat Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.1 Bahan dan alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba ..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.3 Bahan dan Alat untuk Pembedahan Hewan Coba **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.4 Bahan dan Alat untuk Pemeriksaan LDL ..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.5 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.6 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Apel .. **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.7 Alat Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel pada Hewan Coba . **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.8 Alat Pengambilan Sampel Darah dan Pembedahan pada Hewan Coba ..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.5.9 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.6 Definisi Operasional..... **Error! Bookmark not defined.**
- 4.7 Prosedur Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**



4.7.1 Aklimatisasi hewan coba ..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Tikus..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba **Error! Bookmark not defined.**

4.7.4 Prosedur Pembuntingan hewan coba ..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.5 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba ..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi .... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.7 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi ..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.8 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel pada Hewan Coba ...  
..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.9 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah..... **Error! Bookmark not defined.**

4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar LDL ... **Error! Bookmark not defined.**

4.8 Analisis Data ..... **Error! Bookmark not defined.**

4.9 Alur Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**

**BAB V HASIL DAN ANALISIS DATA ..... Error! Bookmark not defined.**

5.1 Hasil Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2 Analisa Data ..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.1 Uji Normalitas ..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.2 Uji Homogenitas ..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.3 Uji *One Way* ANOVA..... **Error! Bookmark not defined.**

5.2.4 Uji *Post Hoc Tukey*..... **Error! Bookmark not defined.**



5.2.5 Uji Korelasi ..... **Error! Bookmark not defined.**

**BAB VI PEMBAHASAN** ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.1 Hasil Penelitian ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.2 Pengaruh Pemberian Asap Rokok terhadap Kadar Serum LDL Tikus  
Bunting ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Apel Manalagi terhadap Kadar  
Serum LDL Tikus Bunting ..... **Error! Bookmark not defined.**

6.4 Keterbatasan Penelitian..... **Error! Bookmark not defined.**

**BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN** ..... **Error! Bookmark not defined.**

7.1 Kesimpulan..... **Error! Bookmark not defined.**

7.2 Saran..... **Error! Bookmark not defined.**

**DAFTAR PUSTAKA**..... **Error! Bookmark not defined.**

TUGAS AKHIR

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK ETANOL KULIT APEL MANALAGI  
(*Malus sylvestris Mill*) UNTUK MENCEGAH PENINGKATAN KADAR SERUM  
LDL (*Low Density Lipoprotein*) TIKUS (*Rattus norvegicus*) BUNTING YANG  
DIPAPAR ASAP ROKOK**

Oleh:

**Fathan Hayati**

**NIM. 155070601111032**

Telah diuji pada  
Hari: Selasa  
Tanggal: 16 April 2019  
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H Sp.MK (K)  
NIK 190148700

Pembimbing-I/Penguji-II

Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes  
NIK. 171152693

Pembimbing-II/Penguji-II

Rahma Dian H, SST, M.Keb  
NIK. 2018028709212001



## ABSTRAK

Hayati, Fathan. 2019. **Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam Mencegah Peningkatan Kadar Serum LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting yang Dipapar Asap Rokok.** Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. dr. Setyawati Soeharto, M.Kes (2) Rahma Dian H.,SST, M.Keb

**Latar Belakang:** jumlah perokok diperkirakan semakin meningkat setiap tahun, rokok mengandung radikal bebas yang berbahaya bagi kesehatan sehingga dapat menyebabkan perubahan pada metabolisme lipid. **Tujuan:** untuk membuktikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dapat mencegah peningkatan kadar LDL tikus bunting yang dipapar asap rokok. **Metode:** penelitian ini menggunakan rancangan *Randomized Post Test Only* dengan membandingkan kadar LDL antar kelompok, dibagi menjadi 5 kelompok yaitu: K(-) tanpa paparan asap rokok dan tanpa ekstrak etanol kulit apel; K(+) paparan asap rokok tanpa ekstrak etanol kulit apel; Perlakuan, yaitu [P1 (7mg/KgBB), P2 (14mg/KgBB), P3 (28mg/KgBB)] dan paparan asap rokok. Paparan asap rokok dan ekstrak etanol kulit apel diberikan pada hari 6-18 kebuntingan. Hari ke-19 dilakukan pengukuran kadar serum LDL. Data dianalisis dengan *ANOVA*, dilanjutkan dengan *Post Hoc Tukey*, dan untuk melihat hubungan maka dilakukan uji korelasi. **Hasil:** hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar serum LDL pada kelompok K(+) lebih besar dari K(-) secara bermakna, sedangkan P1 dan P2 lebih kecil dari K(+) namun tidak berbeda makna, P3 lebih kecil dari K(+) secara bermakna. **Kesimpulan:** dosis efektif pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi yang mampu mencegah peningkatan kadar serum LDL adalah dosis 28 mg/KgBB.

**Kata Kunci:** ekstrak etanol kulit apel, asap rokok, LDL, dan tikus bunting







## ABSTRACT

Hayati, Fathan. 2019. **The Effect of Giving Ethanol Extract of Manalagi Apple Peel (*Malus sylvestris Mill*) in Preventing Increased Serum Levels of LDL (Low Density Lipoprotein) in Pregnant Rat (*Rattus norvegicus*) Exposed to Cigarette Smoke.** Final Assignment, Bachelor of Midwifery Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr.dr.Setyawati Soeharto, M.Kes (2) Rahma Dian H.,SST, M.Keb.

**Background:** the number of smokers is estimated to increase every year, cigarettes contain free radicals which are harmful to health, so it can cause changes in lipid metabolism.

**Objective:** to prove the ethanol extract of Manalagi apple peel can prevent an increase in LDL levels in pregnant rat exposed to cigarette smoke. **Method:** This study used a *randomized post test only* design by comparing LDL levels between groups, divided into 5 groups: K(-) without exposure to cigarette smoke and without ethanol extract of apple peel; K(+) exposure to cigarette smoke without ethanol extract of apple peel; ethanol extract of apple peel [P1 (7mg/KgBB), P2(14mg/KgBB), P3 (28mg/KgBB)] and exposure to cigarette smoke. This Exposure of cigarette smoke and ethanol extract of apple peel is given on 6-18 days of pregnancy, day 19 measured serum levels of LDL. Data were analyzed by ANOVA, followed by *Post Hoc Tukey*, to see the relationship between groups a correlation test was conducted.

**Results:** The results of the study showed that serum LDL levels in the K(+) group were significantly greater than K(-), while P1 and P2 were smaller than K(+) but did not differ in meaning, P3 was smaller than K(+) meaningful. **Conclusion:** the effective dose of ethanol extract of manalagi apple peel which was able to prevent an increase in serum LDL levels was a dose of 28 mg/KgBB.

**Keywords:** cigarette smoke, ethanol extract of apple skin, LDL, pregnant rat



## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Jumlah perokok dunia kini 1,2 milyar jiwa dan 800 juta jiwa di negara berkembang. Tahun 2030 diperkirakan kematian akibat rokok mencapai 10 juta jiwa dan 70% dari negara berkembang (Depkes RI, 2013). Per-tahun sebanyak 25.000 kematian di Indonesia terjadi sebagai akibat asap rokok orang lain. Pada wanita sebanyak 7,02% (967 wanita) meninggal setiap minggu (*The Tobacco Atlas*, 2018). Ibu hamil yang terpapar asap rokok (perokok pasif) setiap hari akan mengalami efek negatif yang hampir sama tingkatannya dengan perokok aktif (Titisari, 2011).

Rokok mengandung radikal bebas yang sangat berbahaya yaitu pada fase gas dan fase tar, dimana fase gas yang bisa terhirup oleh manusia bersifat lebih reaktif daripada fase tar (Pasupathi *et al.*, 2009). Sumber eksogen radikal bebas salah satunya dapat ditemui pada asap rokok, yang dapat merusak seluruh komponen biokimia sel. Radikal bebas bersifat reaktif dan akan bereaksi dengan struktur pertama yang dijumpai, paling sering adalah komponen lipid (Gupta, 2007).

Radikal bebas adalah beberapa senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluar (Bast A., 1993). Elektron ini sangat reaktif, terutama terhadap molekul lipid, protein dan karbohidrat sehingga akan menimbulkan kerusakan. Radikal bebas yang melibatkan oksigen disebut ROS (*Reactive Oxygen Species*), peningkatan jumlah ROS dalam tubuh akan menimbulkan stres

oksidatif (Scheibmeir *et al*, 2005). Stress oksidatif dalam tubuh menyebabkan lipid mudah mengalami peroksidasi.

Peroksidasi lipid adalah proses dimana radikal bebas berikatan dengan lipid yang memiliki ikatan asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel melalui beberapa tahapan sehingga dihasilkan produk sampingan yang bersifat toksin yaitu salah satunya MDA. senyawa MDA dari peroksidasi lipid ini mampu memodifikasi apoprotein B-100 yang terdapat pada LDL sehingga LDL tidak lagi mampu berikatan dengan reseptornya di membran sel. LDL yang tidak berikatan dengan reseptornya tersebut tidak mampu teregulasi kedalam jaringan sehingga LDL dalam serum akan meningkat. (Yuslianti dkk., 2018; Niki, 2011; Sargowo, 2015).

Dalam kehamilan konsentrasi serum total kolesterol, trigliserida HDL dan LDL pada wanita hamil meningkat sesuai dengan meningkatnya usia kehamilan. Peningkatan kadar LDL tersebut normal dalam kehamilan karena akan dibutuhkan selama kehamilan. Peningkatan kadar LDL sebagai akibat dari perubahan normal selama kehamilan dan jika diikuti dengan peningkatan peroksidasi lipid akibat radikal bebas dapat menyebabkan kadar LDL meningkat tajam sehingga akan lebih rentan mengalami oksidasi yang pada akhirnya terjadi peningkatan kerusakan oksidatif (Brizzi *et al.*, 1999). LDL teroksidasi ini nantinya akan ditangkap oleh reseptor makrofag, pada akhirnya makrofag akan berubah menjadi sel busa. Sel busa adalah indikator awal terjadinya penyakit aterosklerosis (Barter *et al.*, 2003), oleh karena itu kadar LDL yang berlebihan akan berbahaya bagi kesehatan (Bartels and O'Donoghue, 2011).

Untuk mengatasi pengaruh radikal bebas terhadap peningkatan LDL maka tubuh memerlukan substansi penting yaitu antioksidan endogen maupun



antioksidan eksogen, untuk mengimbangi ROS akibat radikal bebas sehingga dapat membantu meredakan dampak negatifnya (Kosasih, dkk., 2006). Adapun antioksidan endogen (yang terdapat dalam tubuh) yaitu *glutathione*, asam lipoic, bilirubin, feritin, superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase. ROS yang berlebih dalam tubuh tersebut tidak mampu hanya diatasi oleh antioksidan endogen saja sehingga membutuhkan antioksidan eksogen (Ott M *et al.*, 2007).

Terdapat dua sumber antioksidan yaitu sintetis dan alami. Namun banyak penelitian telah menguji bahwa antioksidan sintetis dapat meracuni binatang percobaan dan bersifat karsinogenik, oleh karena itu saat ini makanan dan obat-obatan beralih mengembangkan antioksidan alami (Takashi dan Takayuni, 1997).

Salah satu antioksidan alami dapat ditemukan pada buah apel manalagi. Dari semua varietas, apel manalagi memiliki kadar antioksidan tertinggi setelah apel *red delicious*. Apel manalagi juga mudah didapatkan dipasaran karena merupakan varietas lokal kota batu jawa timur. Banyak penelitian telah membuktikan bahwa aktivitas antioksidan pada kulit apel lebih potensial dari pada daging buahnya karena jumlah senyawa fitokimia yang lebih banyak (Liu, 2007).

Kulit apel dan daging buah apel dapat mengurangi oksidasi LDL masing-masing sebanyak 38%, dan 21% (Pearson *et al.*, 1999). Pada kulit apel juga memiliki jumlah flavonoid lain yaitu kuersetin yang kadarnya lebih besar daripada daging buah. Kuersetin adalah salah satu bioflavonoid penting yang ditemukan pada lebih dari 20 jenis tanaman dan telah diketahui mampu mencegah terjadinya inflamasi, hipertensi, obesitas, hiperkolesterolemia, aterosklerosis, efek vasodilator (Sultana and Anwar, 2008).

Namun belum jelas apakah kulit apel manalagi mampu mengatasi peningkatan kadar LDL yang tinggi pada kehamilan yang disertai peningkatan





radikal bebas akibat asap rokok. Berdasarkan permasalahan tersebut, maka dirasa perlu untuk melakukan penelitian mengenai bagaimana antioksidan dalam kulit apel dapat mencegah peningkatan kadar LDL melalui penurunan radikal bebas. Mengingat belum ada penelitian sebelumnya yang membahas mengenai pengaruh antioksidan pada kulit apel terhadap penurunan kadar LDL pada tikus model bunting yang dipapar asap rokok, maka perlu dilakukan penelitian dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) untuk Mencegah Peningkatan Kadar Serum LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada Tikus Bunting (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar Asap Rokok”.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dapat mencegah peningkatan kadar serum LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang Dipapar asap rokok?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak etanol kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) dalam mencegah peningkatan kadar serum LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Menetapkan dosis efektif pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam mencegah peningkatan kadar serum LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok.



## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan serta pengetahuan para pembaca sebagai dasar untuk pengembangan manfaat ekstrak kulit apel dalam dunia kebidanan.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar penggunaan kulit apel sebagai antioksidan dalam mencegah berbagai penyakit yang ditimbulkan oleh radikal bebas.





## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 ROKOK

Jumlah perokok dunia kini 1,2 milyar jiwa dan 800 juta jiwa di negara berkembang. Tahun 2030 diperkirakan kematian akibat rokok mencapai 10 juta jiwa dan 70% dari negara berkembang (Depkes RI, 2013). *The Tobacco Atlas* menyatakan bahwa indonesia merupakan negara dengan produksi rokok terbesar kelima dan merupakan negara dengan jumlah konsumsi rokok terbesar keempat di dunia. Pada tahun 2009 jumlah produksi rokok yang dihasilkan oleh indonesia sebesar 180,5 milyar batang rokok, sedangkan jumlah rokok yang dikonsumsi di indonesia mencapai 260.800 juta batang. Sedikitnya 25.000 kematian di indonesia yang terjadi sebagai akibat asap rokok orang lain. Wanita yang meninggal sebanyak 7,02% dimana 967 wanita meninggal setiap minggu (*The Tobacco Atlas*, 2018).

Survei yang dilakukan oleh *Global Adult Tobacco Survey* (GATS) pada tahun 2011 prevalensi merokok orang dewasa di indonesia adalah 34,8% terbagi atas laki-laki (67,4%) dan perempuan (4,5%). Pada tahun 2004, WHO memperkirakan 603.000 kematian akibat perokok pasif dan sebanyak 1,0% kematian di seluruh dunia (Kemenkes RI, 2013). Jumlah perokok di wilayah rural 37,7% lebih besar dibandingkan wilayah urban 31,9%. Pada semua jenis rokok, kretek adalah yang paling populer sebanyak 31,5%, rokok linting 4,7% dan rokok putih 2,2% (Depkes RI, 2011). Rokok kretek memiliki kemampuan memicu radikal





bebas yang lebih kompleks daripada rokok putih, hal ini terbukti dari tingkat peroksidasi lipid akibat rokok putih (Yuningtyaswari, 2001).

Diperkirakan perokok pasif menyumbang kematian sebanyak 600.000 kematian dini setiap tahunnya di dunia. Sementara pengaruh asap rokok terhadap bayi baik yang masih didalam kandungan atau yang sudah dilahirkan dapat meningkatkan resiko berat bayi lahir rendah dan sindrom kematian bayi mendadak. Merokok merupakan masalah kesehatan serius dan penyebab kematian yang perlu di hindari. (Kemenkes RI, 2013).

#### 2.1.1 Kandungan Rokok

Pada rokok telah ditemukan sekitar 4.000 jenis bahan kimia beracun diantaranya nikotin, tar dan karbon monoksida. Nikotin yang terkandung dalam asap rokok dapat meningkatkan lipolisis dan konsentrasi asam lemak bebas yang mempengaruhi profil lemak darah. Rokok juga mengandung banyak sekali senyawa yang berbahaya seperti Aluminium, Arsenic, barium, berilium, cadmium, kromium, tembaga, mangan, besi, lead, merkuri, nikel, cobalt, silikon (Pappas RS, 2011). Beberapa komponen dalam rokok yaitu golongan alkaloid piridina seperti nikotin, amonia, akrolein, fenol, asetaldehid, N-nitrosamin; golongan polisiklik aromatik hidrokarbon seperti benzopirin; gas pembakaran seperti karbon monoksida, nitrogen oksida, hidrogen sianida; *trace metal*, elemen radioaktif emitter seperti polonium, radium, dan torium. Kandungan rokok yang menjadi sumber karsinogen seperti nitrosamin spesifik, *N-Nitrosomorpholine* *N'*-*Nitrosornicotine* (NNN), 4-(*Methylnitros-amino*)-1- (3-pyridyl)-1-butanone (NNK), *N'*-*Nitrosoanatabine* (NAT) and *N'*-*Nitrosoanabasine* (NAB) (Pasupathi *et al.*, 2009).



Rokok kretek adalah rokok yang terbuat dari daun tembakau dan cengkeh.

Cengkeh digunakan untuk mendapatkan efek rasa dan aroma tertentu. Rokok kretek sangat populer karena memiliki kandungan tar dan nikotin yang cukup tinggi dibandingkan dengan produk rokok yang lain (Pappas RS, 2011). Pembuatan rokok kretek di Indonesia menggunakan daun tembakau 60-65% dengan kandungan tar 41-113 mg dan nikotin  $\pm$  1.2-4.5 mg (WHO, 2008). Rokok yang didagang di masyarakat mengandung sekitar 15 mg nikotin dan tar dengan jumlah yang sebanding. Perokok yang menghabiskan satu batang rokok pada kondisi standar, kadar nikotin dalam plasma para perokok tersebut dapat mencapai 25 ng/ml (Mendelson JH *et al.*, 2003). Perokok yang menghabiskan lebih dari satu batang rokok dalam satu hari maka kadar nikotin dalam plasma mencapai > 50 ng/ml. Selain nikotin, dalam darah juga terdapat senyawa metabolit dari nikotin yaitu *cotinine* 200–800 ng/ml dan *3-OH cotinine* 100-500 ng/ml (Zevin S *et al.*, 1998).

Akrolein merupakan salah satu kandungan dalam rokok yang termasuk golongan aldehid. Sementara itu efek akrolein pada LDL yaitu menghambat ikatan LDL dengan reseptornya yaitu apoprotein B-100 (Conklin, *et al.*, 2010). Secara umum bahan-bahan yang terkandung dalam rokok dapat dibagi menjadi dua golongan, yaitu komponen pada fase tar dan komponen pada fase gas. kedua fase tersebut kaya akan oksigen, karbon dan nitrogen yang berperan sebagai oksidan non radikal. Dari analisis setiap fase, diperkirakan satu batang rokok mengandung sekitar 10 radikal bebas di fase tar, dan 10 radikal bebas pada fase gas. Pada fase tar, radikal yang dominan adalah kompleks *quinone-hydroquinone* yang sifatnya kurang reaktif. Namun, kompleks *quinone-hydroquinone* adalah radikal yang dapat bertahan lama di udara selama berjam-jam atau mungkin



berhari-hari dan berpotensi menimbulkan kerusakan pada perokok pasif. Radikal pada fase ini pun mampu menangkap atau mengikat DNA, menyebabkan kerusakan DNA dan pada akhirnya menyebabkan kanker. Diameter komponen fase tar sekitar  $<0,1 \mu\text{g}$  sampai  $1 \mu\text{g}$ . Beberapa senyawa dalam bentuk partikel pada fase tar adalah nikotin, nitrosamin dan *N-nitosonornicotine*, logam berat (kadmium, nikel, seng, dan polonium-210), polisiklik aromatik hidrokarbon, *benzoapyren* dan karsinogenik *amin (4-aminobiphenyl)* (Pasupathi *et al.*, 2009).

Radikal pada fase gas lebih reaktif, namun memiliki waktu yang sangat singkat (Pasupathi *et al.*, 2009) sedangkan senyawa yang ada dalam fase gas antara lain karbon dioksida, karbon monoksida, benzen, amonia, formaldehid, hidrogen sianida, *N-trosodiomethylamine*, *N-nitrosodiethylamine* dan lain-lain (Eriksen & Ross, 2012). Radikal bebas dalam asap rokok diantaranya adalah peroksinitrit, hidrogen peroksida dan superoksid (WHO, 2008). Banyak penelitian juga telah menunjukkan bahwa kandungan yang terdapat dalam asap rokok dapat merusak fungsi mitokondria dan menghasilkan stress oksidatif oleh mitokondria pada sel-sel lainnya (Ballinger SW *et al.*, 1996).

### 2.1.2 Perokok Pasif

Perokok pasif (*Involuntary Smoking*) adalah istilah yang diberikan pada individu yang tidak merokok (Rufaridah, 2012). Tidak ada level yang aman bagi para perokok pasif, mereka dapat menderita berbagai penyakit seperti persalinan prematur, kanker pada anak, leukimia, limfoma, tumor otak, asma pada anak, efusi telinga tengah, kanker payudara, kanker nasal, stroke, aterosklerosis, alergi nasal, gejala pernafasan akut, gejala pernafasan kronik, penurunan fungsi paru pada penderita asma, penurunan fungsi paru-paru pada individu yang sehat, memburuknya asma pada dewasa, penyakit paru obstruktif kronik (Sebbie &



Glantz, 2007). Ibu hamil yang terpapar asap rokok (perokok pasif) setiap hari akan mengalami efek negatif yang hampir sama tingkatannya dengan perokok aktif (Titisari, 2011). Untuk mengurangi keterpaparan terhadap asap rokok, maka strategi seperti pemisahan antara perokok aktif dan perokok pasif, sistem ventilasi, pembersihan udara, dan filtrasi merupakan strategi yang ternyata tidak efektif dan tetap memiliki dampak berbahaya (Benowitz, *et al.*, 2009). Pada pembakaran rokok, akan dihasilkan suatu zat yang memiliki sifat beracun dan akan didominasi oleh radikal bebas. Seorang perokok aktif hanya akan menghirup 15% asap, sedangkan sebanyak 85% asap akan dihirup bebas oleh orang-orang disekitarnya atau perokok pasif. Para perokok pasif ini akan menghisap asap *side cigarette stream* (asap arus samping) (Goette *et al.*, 2007) dan asap utama (Rufaridah, 2012).

Asap arus samping ini tentunya akan lebih berbahaya daripada arus utama karena tidak melalui penyaringan. Tanpa proses penyaringan, maka asap arus samping memiliki jumlah senyawa kimia berbahaya dan racun yang lebih banyak yaitu sekitar lima kali lipat dari arus utama (Rufaridah, 2012). Perokok (pria dan wanita) memiliki kadar HDL secara signifikan rendah sementara memiliki kadar VLDL, trigliserida dan LDL yang tinggi (Pasupathi *et al.*, 2009).

### 2.1.3 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah senyawa apapun yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, elektron ini hanya sendiri dalam orbital. Radikal bebas paling sederhana adalah atom unsur hidrogen. Atom hidrogen mengandung satu proton dan satu elektron tidak berpasangan yang dapat berubah menjadi radikal bebas (Bast, A., 1993). Secara umum sumber radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua, yaitu eksogen dan endogen. Radikal bebas eksogen



berasal dari luar tubuh, misalnya radiasi, sinar UV, aktifitas lingkungan, zat-zat polusi, ozon, pestisida, asap rokok, alkohol, logam berat, logam transisi, zat farmasi/agen farmakologi (Valko *et al.*, 2007; Gupta 2007 ). Sebagai sumber endogen, radikal bebas dapat dihasilkan dari reaksi enzimatik seperti fagositosis dan non enzimatik seperti oksigen. Sumber endogen lain meliputi aktivasi sel imun, inflamasi, stress mental, olahraga berlebihan, infeksi, kanker, penuaan. Karena sangat reaktif, radikal bebas umumnya bereaksi dengan struktur pertama yang dijumpai, yang paling sering adalah komponen lipid membran sel atau organela. Radikal bebas dapat merusak semua komponen biokimia sel (Gupta, 2007).

Radikal bebas seperti ROS (Spesies oksigen reaktif) yang paling dominan adalah *superoxida anion* ( $O_2^-$ ), *hydroxyl radicals* ( $OH^\cdot$ ), dan *peroxyl radicals* ( $RO_2^\cdot$ ). Radikal hidroksil dapat merusak tiga jenis senyawa penting yaitu: 1) *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA) yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel. 2) DNA yang merupakan genetik sel. 3) protein yang memiliki berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi, pembentuk matriks, dan sitoskeleton, 4) fosfolipid 5) glikolipid 6) kolesterol ester dan kolesterol. Semua molekul lipid dengan ikatan ganda dapat mengalami reaksi peroksidasi (Kusuma, Jaya. 2010; Halliwell and Gutteridge, 1994). ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang terakumulasi dalam tubuh akan menimbulkan stress oksidatif, kemudian stress oksidatif ini akan menimbulkan kerusakan pada lipid, protein termasuk enzim dan DNA (Halliwell and Gutteridge, 1994).

ROS secara fisiologis terlibat dalam berbagai proses seluler penting termasuk pensinyalan, pengaturan homeostasis, atau induksi kematian sel (Cieřlar-Pobuda *et al.*, 2017). ROS khususnya radikal hidroksil dan peroksil ketika bergabung dengan bisallik hidrogen PUFA akan memulai peroksidasi lipid melalui reaksi



*autocatalytic* berantai sehingga terbentuk lipid hidroperoksida sebagai ujung primer produk (Sies H, 1986). Stres oksidatif telah didefinisikan oleh Helmut Sies sebagai suatu kondisi di mana terjadinya gangguan keseimbangan prooksidan atau antioksidan yang menyebabkan kerusakan biologis (Pasupathi *et al.*, 2009). Stres oksidatif dihasilkan dari peningkatan produksi ROS dan dapat menyebabkan kerusakan parah pada makromolekul biologis serta penuaan sel (Ciešlar-Pobuda *et al.*, 2017). Gangguan stress oksidatif atau perubahan status antioksidan telah di akui sebagai kunci terjadinya penyakit kronik tertentu (Pérez-Matute P *et al.*, 2009). Untuk mengatasi pengaruh radikal bebas tersebut terhadap peningkatan LDL maka tubuh memerlukan substansi penting yaitu antioksidan baik endogen maupun eksogen untuk mengimbangi produksi ROS atau radikal bebas sehingga dapat membantu meredam dampak negatifnya (Kosasih, dkk., 2006).

## 2.2 LIPID

### 2.2.1 Definisi Lipid Plasma

Salah satu kelompok senyawa organik yang terdapat dalam tumbuhan, hewan, dan manusia yang sangat berguna bagi kehidupan adalah lipid. Para ahli biokimia sepakat bahwa lemak maupun senyawa organik yang memiliki sifat seperti lemak akan dimasukkan kedalam kelompok lipid. Sifat fisika yang dimaksud yaitu tidak larut air namun larut pada pelarut organik seperti eter, aseton, kloroform, dan benzena (Pudjadi, 1994). Dalam tubuh lipid berfungsi sebagai pelindung organ tubuh, membentuk sel, penghasil panas dalam tubuh, pemberi rasa kenyang dan kelezatan. Lipid juga adalah struktur penting dari membran sel, saraf dan merupakan komponen getah empedu. Lipid yang diperlukan oleh tubuh berasal dari luar dan dalam tubuh itu sendiri. Dari luar, lipid dapat diperoleh dari makanan sedangkan dari dalam dapat di peroleh dari hepar (Almatsier, 2002).



Lipid diklasifikasikan menjadi lipid sederhana dan lipid kompleks. Lipid sederhana adalah ester asam lemak dengan berbagai alkohol misalnya lemak, minyak, dan wax (lilin). Lipid kompleks adalah ester asam lemak yang mengandung gugus selain alkohol dan asam lemak. Contoh lipid kompleks adalah fosfolipid, glikolipid, dan lipid kompleks lain termasuk lipoprotein. Lipid plasma terdiri dari triasilgliserol (16%), fosfolipid (30%), kolesterol (14%), ester kolesteril(36%), asam lemak bebas (FFA) (4%) (Robert K *et al.*,2009).

Lipid dalam tubuh dimana HDL rendah, LDL tinggi serta trigliserida yang setara dengan kadar HDL akan mengakibatkan resiko tinggi mengalami diabetes tipe 2, sindrom metabolik dan penyakit kardiovaskuler (Ngelsson E *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Definisi Lipoprotein

Lipoprotein adalah kombinasi lipid dan protein yang merupakan konstituen penting bagi sel. Lipoprotein memiliki fungsi penting yaitu sebagai alat pengangkut lipid darah. Lipoprotein dibagi menjadi beberapa jenis berdasarkan berat jenisnya, diantaranya adalah kilomikron yang berasal dari penyerapan triasilgliserol dan lipid lain di usus, VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) berasal dari hati untuk ekspor triasilgliserol, IDL (*Intermediet Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*) menggambarkan tahap akhir metabolisme VLDL, HDL (*High Density Lipoprotein*) sebagai transpor kolesterol dalam sel menuju hepar (Robert K *et al.*,2009).

Lipoprotein (khususnya bagian luar) maupun membran sel memiliki konstituen utama yaitu kolesterol. Kolesterol terdapat dalam jaringan dan plasma darah sebagai kolesterol bebas ataupun tersimpan (Robert K *et al.*,2009). Kolesterol disintesis dibanyak jaringan dari asetil KoA dan merupakan prekursor semua steroid. Lipoprotein berdensitas rendah (LDL) plasma adalah alat utama



untuk membawa kolesterol dalam jumlah besar dan ester kolesterol ke banyak jaringan. Pengurangan 100 mg kolesterol dalam makanan menyebabkan penurunan 0,13 mmol/L kolesterol serum. Peningkatan kolesterol sel terjadi karena penyerapan lipoprotein yang membawa banyak kolesterol oleh reseptor LDL atau *scavenger reseptor*. Lipoprotein memiliki gugus protein yang disebut apoprotein atau apoprotein. Pada tiap lipoprotein terdapat satu atau lebih apoprotein, pada HDL apoprotein utamanya adalah A I, A II, A IV, C I; pada LDL dan VLDL adalah apoprotein B-100; kilomikron adalah apoprotein B-48 (Robert K *et al.*,2009).

Apoprotein memiliki 3 peran penting dalam tubuh, yaitu membentuk sebagian struktur lipoprotein, sebagai kofaktor enzim, sebagai ligan untuk interaksi dengan reseptor lipoprotein di jaringan seperti apo B-100 dan apo E untuk reseptor LDL. Hati dan banyak organ diluar hati akan membentuk reseptor LDL (Apo B-100 dan Apo E). Dalam keadaan *hiperkolesterolemia familial*, reseptor ini terganggu. Reseptor LDL yaitu apo B-100 dan apo E terdapat pada permukaan sel atau membran sel. Setelah terjadi pengikatan dengan reseptor LDL maka LDL akan diserap secara utuh melalui proses endositosis (Robert K *et al.*,2009).

### 2.2.3 LDL (*Low Density Lipoprotein*)

Besar partikel LDL adalah 22 nm, diameter 18-30 nm, memiliki densitas 1,029 sampai 2,063 g/ml. LDL mengandung 35-45% kolesterol, 4% trigliserida, 22%-26% fosfolipid, 22%-26% protein, inti yang bersifat hidrofobik (kolesterol ester dan 20% triasilgliserol). LDL adalah lipoprotein yang paling banyak mengandung kolesterol. (Driscoll DM *et al.*, 1986).





Permukaan pada Inti LDL dikelilingi oleh Apoprotein B (apoB) tunggal, lapisan *monolayer* polar, *posfatidilkolin*, *spingomielin* dan salah satu protein terbesar yaitu 550-kDa glikosilat (Goldstein JL *et al.*, 1985). Terdapat pula LDL non aterogenik yang merupakan LDL yang bisa di serap oleh sel untuk mengurangi kadarnya. LDL atau lipoprotein berdensitas rendah memiliki perbandingan protein yang lebih sedikit dan kolesterol yang lebih banyak. Pembentukan kolesterol berlangsung di hepatosit, lalu disebarkan oleh kolesterol LDL dalam darah ke jaringan seluruh tubuh (Goldstein and Brown MS, 2009).

Fungsi utama LDL adalah mengangkut kolesterol ke jaringan tubuh untuk pembentukan membran sel dan sintesis metabolit (Barasi, 2007). LDL memiliki apoprotein spesifik yang akan berikatan dengan reseptornya yaitu apo B-100 dan apo E, produksi reseptor LDL ini diatur oleh konsentrasi kolesterol interseluler (Bartels and O'Donoghue, 2011). Dalam hal aktivitas, sebanyak 2/3 Reseptor LDL berperan dalam mengurangi kadar LDL tubuh (Twisk J *et al.*, 2000). Penurunan jumlah reseptor LDL akan mengakibatkan terjadinya penurunan penyerapan kolesterol yang pada akhirnya menyebabkan kolesterol tetap berada dalam sirkulasi pada kadar yang tinggi ( Merchant *et al.*, 2008).

Berdasarkan *Irish Heart Foundation*, pada orang dewasa kadar kolesterol total plasma tidak lebih dari 5 mmol/L, *high-density lipoprotein* (HDL) tidak lebih dari 1 mmol/L, *low-density lipoprotein* (LDL) tidak lebih dari 3 mmol/L dan trigliserida tidak lebih dari 2 mmol/L. *The American Heart Association* merekomendasikan total kolesterol <200 mg/dL (5.2 mmol/L), HDL > 60 mg/dL (1.6 mmol/L), LDL < 100 mg/dL (2.6 mmol/L) and trigliserida < 150 mg/dL (1.7 mmol/L) (Brizzi *et al.*, 1999). Sebagai salah satu sumber radikal, rokok sangat erat kaitannya dengan peningkatan secara signifikan konsentrasi kolesterol total,



trigliserida, VLDL, dan LDL. Kondisi tersebut menyebabkan kadar HDL dan apoprotein dalam plasma rendah oleh karena LDL juga terbentuk dari partikel VLDL. Jadi peningkatan VLDL diikuti oleh LDL dalam plasma (Amit *et al.*, 2017).

Tingginya kadar LDL dalam kehamilan sebagai akibat dari radikal bebas dan perubahan fisiologis selama kehamilan membuat rentannya terjadi oksidasi LDL dan meningkatnya kerusakan oksidatif (Brizzi *et al.*, 1999).

Kadar LDL pada wanita hamil maupun tidak yang berlebihan akan bersifat aterogenik. Kolesterol juga berperan sebagai prekursor terbentuknya hormon steroid seperti kortikosteroid, androgen, estrogen, progesteron dan vitamin D (Brizzi *et al.*, 1999). Peningkatan kadar esterogen dalam kehamilan menyebabkan total kolesterol, LDL, dan trigliserida juga meningkat (Bartels and O'Donoghue, 2011).

Banyak penelitian yang belum mengukur secara pasti parameter lipid selama kehamilan, sehingga parameter lipid menurut (Bartels *et al.*) dimana total kolesterol, HDL, LDL, dan trigliserida akan meningkat selama kehamilan terutama pada trimester dua dan tiga. Kadar LDL yaitu 1.3-6.1 mmol/L, dan >3.0 mmol/L pada 60% wanita. 72 jam setelah persalinan, kadar kolesterol akan turun dengan cepat dan kadarnya hampir sama seperti saat kehamilan trimester pertama. Peningkatan LDL selama kehamilan juga sebagai akibat peningkatan apo B, aktivitas lipase di hati meningkat yang menyebabkan lonjakan sintesis trigliserida di hati dan dikaitkan dengan peningkatan kadar LDL (Bartels and O'Donoghue, 2011).



#### 2.2.4 Peroksidasi Lipid

Mekanisme normal pengiriman kolesterol menuju seluruh jaringan dalam tubuh yaitu melalui proses endositosis, LDL mentransfer kolesterol pada setiap sel tubuh dengan cara menempel pada reseptor LDL yang terletak pada membran sel. Pada LDL terdapat apoprotein B-100 yang berfungsi untuk memberikan sinyal pengenalan pada reseptor Apo B-100 atau Apo E pada membran sel agar LDL dapat berikatan dengan sel (Barter P *et al.*, 2003). Lipoprotein yang mengandung Apo B dan apo E sebagian besar adalah LDL dan *very low-density lipoprotein* (VLDL), keduanya mengalami endositosis oleh reseptor tersebut untuk diberikan kepada sel (Varsha Shete *et al.*, 2016).

Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan pada kulit terluar. Elektron ini sangat reaktif, salah satunya terhadap molekul lipid. Radikal bebas yang melibatkan oksigen disebut ROS, peningkatan jumlah ROS dalam tubuh akan menimbulkan stres oksidatif (Scheibmeir *et al.*, 2005). Peroksidasi lipid merupakan suatu proses dimana radikal bebas yang paling sering yaitu radikal hidroksil ( $\text{OH}^\cdot$ ) akan mengekstraksi hidrogen dari gugus metilen sehingga terbentuk radikal lipid ( $\text{L}^\cdot$ ). Reaksi berantai radikal bebas akan mengalami penambahan  $\text{O}_2$  sehingga terbentuklah radikal lipid peroksil ( $\text{L}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}^\cdot$ ). Apabila radikal lipid peroksil berikatan dengan lipid yang memiliki ikatan asam lemak tak jenuh ganda akan menghasilkan radikal lipid hidroperoksid (Yuslianti dkk., 2018). Lipid hidroperoksid ini sangat tidak stabil dan mudah terurai menjadi produk sampingan yaitu berbagai Aldehid seperti MDA, *9-Hidroksi-nonenal*, etena dan peritane, HNE, kerusakan protein dan DNA. Senyawa toksik hasil peroksidasi tersebut mampu memodifikasi residu lisin apoprotein B-100 (apo B-100) yang terdapat pada LDL. Modifikasi tersebut menyebabkan apo B-100 tidak



lagi dapat di kenali oleh reseptornya serta akan kehilangan fungsi. Peroksidasi lipid ini juga dapat menyebabkan terganggunya fungsi membran seperti menurunnya fluiditas, ikatan antara membran dengan enzim maupun reseptor akan terganggu (Sargowo, 2015). Peristiwa tersebut menyebabkan kolesterol LDL tidak dapat teregulasi dengan normal keseluruhan tubuh, sehingga akan tetap berada dalam sirkulasi darah (Niki, 2011). Peroksidasi lipid lebih lanjut juga dapat menyebabkan oksidasi pada kolesterol dan lipoprotein, integritas sel membran menurun sehingga terjadi kerusakan struktur pada membran sel (Yuslianti dkk., 2018).

#### 2.2.5 Oksidasi LDL

Kadar total kolesterol, HDL, LDL, dan trigliserida secara normal akan meningkat selama kehamilan terutama pada trimester dua dan tiga (Bartels and O'Donoghue, 2011). Peningkatan berlebihan pada kadar kolesterol LDL akan menyebabkan LDL mudah melekat pada dinding sebelah dalam pembuluh darah. LDL yang mudah menyusup ke dalam pembuluh darah ini berukuran kecil dan padat. Setelah masuk pembuluh darah LDL tersebut akan mengalami oksidasi tahap 1 menjadi LDL teroksidasi. LDL teroksidasi ini akan teroksidasi lagi secara sempurna sehingga akan ditangkap oleh reseptor makrofag, kemudian makrofag akan menjadi sel busa. LDL kecil dan padat tersebut jumlahnya meningkat selama kehamilan karena dalam kehamilan terjadi peningkatan Apo B dan trigliserida (Sargowo, 2015).

Beberapa keadaan yang mempengaruhi tingkat oksidasi seperti semakin banyaknya kadar kolesterol LDL dalam plasma (Adam J, 2006). Oksidasi LDL ini juga akan meningkat karena terjadinya inflamasi, meningkatnya jumlah LDL kecil padat (*small dense* LDL) (Adam J, 2006), Selain itu dalam kehamilan terdapat jumlah PUFA yang semakin meningkat, maka akan sangat rentan juga mengalami



oksidasi oleh radikal bebas, meningkatnya tingkat stress oksidatif selama kehamilan bisa juga karena kebutuhan yang tinggi akan energi dan peningkatan asupan oksigen (Desai *et al.*, 2003). Peningkatan kadar LDL pada kehamilan akibat peroksidasi lipid dan perubahan fisiologis selama kehamilan menyebabkan LDL lebih rentan mengalami oksidasi sehingga terjadi peningkatan kerusakan oksidatif (Brizzi *et al.*, 1999). LDL teroksidasi ini akan di tangkap oleh reseptor makrofag, pada akhirnya makrofag akan berubah menjadi sel busa. Sel busa adalah indikator awal terjadinya penyakit aterosklerosis (Barter *et al.*, 2003). Pada wanita hamil dengan konsentrasi LDL teroksidasi yang tinggi ( $\geq 50$  U/l) mempunyai hampir tiga kali lipat resiko terkena preeklamsia (Qiu, C. *et al.*, 2005).

### 2.3 TIKUS (*Rattus norvegicus*)

Makhluk hidup seperti jamur, lalat, ikan dan tikus memiliki banyak gen yang sama seperti manusia. Oleh karena itu banyak digunakan dalam penelitian untuk mempelajari gen dan penyakit pada manusia. Namun yang membuat tikus banyak digunakan dalam penelitian adalah kemiripan genom mereka dengan manusia sebesar 99%, ukuran binatang kecil, dapat digunakan dalam skala besar sehingga biaya yang digunakan lebih efisien, waktu reproduksi yang pendek, memelihara dan menjaga tikus relatif sederhana dan murah, gen pada tikus dapat dimodifikasi seperti penyakit spesifik yang terdapat pada manusia. Tikus juga telah berhasil digunakan untuk memvalidasi obat-obatan dan untuk mengetahui dosis yang berkhasiat dan aman untuk perawatan yang bersifat kombinasi pada manusia (European Commission, 2010).

Tikus termasuk ke dalam kelompok hewan pengerat yang sangat merugikan yaitu dapat membawa penyakit dan di masyarakat kerap kali menjadi hama. Tikus hidup secara bergerombol dalam sebuah lubang, dalam satu



gerombol tikus bisa mencapai 200 ekor. Tikus juga memiliki indra penciuman yang sangat tajam. Tikus dapat melahirkan anak sebanyak 15 ekor namun rata-rata hanya 9 ekor (Akbar 2010; Pallav Sengupta, 2010). Rata-rata berat tikus saat dilahirkan sekitar 5-6 gram (Yudi dan Parakkasi, 2005). Taksonomi tikus putih menurut (Krinke 2010) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mammalia

Subordo : Rodentia

Familia : Muridae

Genus : Rattus

Spesies : *norvegicus*



Gambar 1. *Rattus norvegicus* (ww.jax.org/jaxmice)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) betina adalah mamalia yang termasuk ovulator spontan, dimana ovulasi akan terjadi pada pertengahan siklus estrus dan di pengaruhi oleh peningkatan LH (*Luteinizing Hormone*). Tikus putih juga memiliki siklus reproduksi yang sangat singkat, tiap siklus hanya berlangsung 4-5 hari. Ovulasi akan dimulai 8-11 jam sesudah tahap estrus dimulai. Seperti halnya manusia, folikel yang sudah melepaskan telur melalui proses ovulasi akan mengalami perubahan menjadi korpus luteum. Korpus luteum ini akan sekresi hormon progesteron atas rangsangan LH. Progesteron ini akan berperan dalam persiapan endometrium di uterus agar siap melakukan implantasi embrio (Pallav Sengupta, 2010).

Lama kehamilan tikus sekitar 21-23 hari dan biasanya melahirkan anak rata-rata sebanyak 6-12 ekor. Terdapat empat fase dalam siklus reproduksi tikus



yaitu proestrus, estrus, metestrus, dan diestrus (Pallav Sengupta, 2010). Setiap fasenya dapat diamati membuat preparat sel epitel pada vagina kemudian melihat gambaran sel, karena sel akan mengalami perubahan pada tiap stadium. Perubahan sel tiap stadium ini dapat dengan mudah dilihat pada tikus betina yang berumur 35 dan 90 hari (Malole dan Pramono 1989). Menurut Smith dan Mangkoewidjojo (1988) kisaran umur tikus betina apabila akan kawin yaitu 56-63 hari. Tikus betina akan siap melakukan kopulasi dengan pejantan apabila perkawinan dilakukan pada fase estrus. Dan kemungkinan untuk hamil pada fase ini sangat besar.

Tabel 1. Kadar kolesterol normal pada tikus (Iswari, 2009)

No	Kolesterol	Kadar kolesterol
1.	LDL	$\leq 66$ mg/dl
2.	HDL	$\geq 25$ mg/dl
3.	TG	$\leq 130$ mg/dl
4.	Total	$\leq 200$ mg/dl

## 2.4 APEL (*Malus sylvestris Mill*)



Gambar 2. Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*)

### 2.4.1 Definisi Apel

Data dari Biro Pusat Statistik menyatakan bahwa konsumsi apel masyarakat Indonesia sekitar 0,6 kg perkapita/tahun. Mengalami peningkatan rata-



rata 0,02% tiap tahun sejak 1985 sampai 1987 (Bastian, 2004). Apel (*Malus sylvestris Mill*) adalah buah tahunan yang berasal dari daerah Asia Barat dengan iklim yang sub tropis (Agustina, 2008). Buah apel memiliki banyak karakteristik sesuai dengan varietas masing-masing. Menurut departemen pertanian Amerika, terdapat sekitar 7.000 varietas apel di seluruh dunia. Terdapat tiga jenis apel lokal yang sering dijual di pasar yaitu manalagi, anna dan Rome Beauty (Adrianto dkk, 2011). Berbagai warna yang terdapat pada buah apel menurut (Patrick Barry, 2011) yaitu berasal dari senyawa polifenol di dalamnya. Semakin cerah buah apel tersebut maka kadar polifenol di dalamnya akan semakin tinggi.

Apel adalah diet yang sangat bagus untuk manusia karena kaya akan komponen fenolik dan flavonoid (Boyer J and Liu RH, 2004). Berdasarkan penelitian (Gonzalez *et al.*, 2015) pemberian ekstrak kulit apel pada mencit dengan model sinrom metabolit menunjukkan bahwa kulit apel mampu menurunkan kadar kolesterol LDL. Saat ini, belum banyak daerah di Indonesia yang mengembangkan tanaman ini. Salah satu daerah di Indonesia yang paling banyak mengembangkan adalah kota Batu, Jawa Timur. Jenis apel yang banyak di kembangkan di kota batu adalah apel manalagi (Yulianti, 2007).

#### 2.4.2 Karakteristik Apel Manalagi

Tanaman apel dapat tumbuh pada ketinggian 700-1.200 m dpl namun ketinggian yang optimal untuk tumbuh yaitu 1000-1.2000 m dpl dengan suhu sekitar 16 – 27 C. Tanaman ini membutuhkan sinar matahari pada masa pembungaan sekitar 50%-60% setiap hari. Curah hujan yang dibutuhkan apel untuk tumbuh optimal adalah 1.000-2.600 mm/tahun dengan hari hujan 110-150 hari/tahun, apabila curah hujan terlalu tinggi maka bunga akan gugur dan tidak dapat berkembang menjadi buah (Warintek, 2010).





Berdasarkan taksonomi menurut (Warintek, 2010), tanaman apel termasuk

ke dalam:

Divisio	:	Spermatophyta
Subdivisio	:	Angiospermae
Kelas	:	Dicotyledonae
Ordo	:	Rosales
Famili	:	Rosaceae
Genus	:	Malus
Spesies	:	<i>Malus sylvestris</i> Mill

Apel manalagi berbentuk bulat dengan diameter sekitar 4-7 cm dan berat 75-160 gram per buah. Apel manalagi berwarna hijau muda serta sedikit kekuningan dan pori-pori kulit yang jarang. Apel manalagi juga memiliki rasa yang manis meskipun di konsumsi dalam kondisi yang belum matang. Daging buah berwarna putih dengan kandungan air yang sedikit dan liat. Apel manalagi adalah salah satu varietas yang banyak dikembangkan di kota Batu, Jawa Timur (Yulianti, 2007).

#### 2.4.3 Kandungan Antioksidan Apel

Kulit apel memiliki antioksidan dan antiproliferatif lebih kuat daripada daging buah, juga kulit apel mengandung sebagian besar senyawa *phytochemical* bioaktif. Kandungan fenolik yang tinggi, tinggi aktivitas antioksidan, dan aktivitas antiproliferatif yang tinggi dari kulit apel menunjukkan bahwa kulit apel ini dapat memberikan manfaat kesehatan saat dikonsumsi (Wolfe, K *et al.*, 2003).

Daging buah apel mengandung *catekin*, *procyanidins*, *phloridzin*, *phloretin glyco-sisi*, *asam caffeic*, dan *asam klorogenik*. Kulit apel memiliki semua



komponen yang terdapat dalam daging buah dan memiliki flavonoid tambahan yang kadarnya sedikit pada daging buah, seperti kuersetin glikosida (Burda S *et al.*, 1990). Jumlah senyawa kuersetin glikosida sebanyak 400-700 mg/100 g dan 250-5550 mg/100 g pada kulit apel jenis Granny Smith dan Splendour (Lister CE *et al.*, 1994). Apel memiliki kadar kuersetin dalam jumlah tinggi, dimana dalam 100 gram buah apel terkandung 4,42 mg kuersetin aglikon dan 13,2 mg kuersetin glikosida. Perbedaan kandungan kuersetin bervariasi pada setiap buah apel akibat perbedaan varietas, nutrisi tanaman, kondisi pertumbuhan, proses pengolahan dan penyimpanan (Boyer and Liu, 2004). Apel jenis *Rome Beauty* memiliki kandungan kuersetin lebih tinggi jika dibandingkan dengan apel jenis *Cortland* yang memiliki sangat sedikit kuersetin (Boyer & Liu, 2004).

Kandungan antioksidan dalam satu buah kulit apel ukuran sedang memiliki antioksidan yang sebanding dengan 820 mg vitamin C. Ekstrak apel dapat berikatan dengan LDL dan VLDL serta menghambat oksidasinya (Vinson, J *et al.*, 2002). Total jumlah senyawa fenol yaitu sekitar 110-357 mg/100 g apel segar (Eberhardt MV *et al.*, 2000).

Tubuh perlu untuk mengonsumsi flavonoid yang didalamnya mengandung kuersetin, sebanyak 50-800 mg/hari, agar mampu menjaga sistem pertahanan antioksidan dalam tubuh (Preedy, 2014). Kuersetin adalah senyawa fitokimia yang termasuk ke dalam kelompok flavonol terbesar serta memiliki antioksidan yang lebih besar daripada vitamin A dan E. Kuersetin juga diyakini mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid serta mencegah terjadinya oksidasi LDL dengan cara menangkap radikal bebas. Kadar Kuersetin dalam makanan bervariasi bergantung pada preparasi, penyimpanan dan proses memasak makanan dalam air mendidih (Waji dan Sugrani, 2009). Dalam 100 gram buah apel, terdapat kuersetin aglikon



sebanyak 4,42 mg dan kuersetin glikosida sebanyak 13,2 mg (Boyer & Liu, 2004).

Selain sebagai antioksidan tentunya kuersetin juga berfungsi untuk mencegah kanker, inflamasi, agregasi, hipertensi, dan efek saraf (Rupasinghe *et al*, 2011).

Konsumsi berbagai jenis apel dapat mengurangi oksidasi LDL sebanyak 9-34%, selain itu konsumsi ekstrak dari seluruh bagian apel, kulit apel, daging buah apel dapat mengurangi oksidasi LDL masing-masing sebanyak 34%, 38%, 21%. konsumsi makanan dan sayuran yang mengandung senyawa fenol dan flavonoid yang tinggi mampu mengurangi oksidasi LDL (Pearson *et al.*, 1999).

2.2.4 Antioksidan adalah senyawa kimia yang struktur molekulnya mampu memberikan elektron pada radikal bebas yang elektronnya tidak berpasangan tanpa merusak fungsi dan struktur molekul asalnya sehingga mampu memutus reaksi berantai yang ditimbulkan oleh radikal bebas. Dalam tubuh, antioksidan dapat menghambat terjadinya ROS (*reactive oxygen species*). Antioksidan yang berperan sebagai mekanisme pertahanan tubuh dibedakan menjadi antioksidan non enzimatis seperti vitamin C, vitamin A, Vitamin E, piruvat, *taurine*, *hypotaurine* dan *glutathione* dimana antioksidan ini lebih berperan melawan reaktif oksigen spesi (ROS) yang bersumber dari luar. Cara kerja antioksidan dilakukan dengan dua cara yaitu: 1) mencegah terjadinya dan tertimbunnya senyawa oksidan secara berlebihan, 2) mencegah terjadinya reaksi rantai yang berkelanjutan, oleh karena itu antioksidan digolongkan menjadi antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus reaksi rantai. Isoflavon memiliki gugus golongan flavonoid, sebagai antioksidan isoflavon dapat memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas dengan cara menangkap radikal bebas (Scavenger free radical) yaitu dengan



menjadi donor elektron, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler (Kohen dan Nyska, 2002). Antioksidan Kuersetin

Kuersetin merupakan salah satu flavonoid yang sangat penting, karena mampu mencegah berbagai penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lipid. Kuersetin mampu mencegah terjadinya oksidasi LDL dengan cara menangkap radikal bebas (Waji RA dan Sugrani A, 2009). Pemberian kuersetin selama 7 hari berturut-turut dan diketahui mampu melindungi jaringan miokardium dan memperbaiki perfusi jaringan pada pembuluh darah jantung (Ikizler M *et al.*, 2007).

Rata-rata kadar kuersetin dalam (Ikizler M *et al.*, 2007) pada berbagai bentuk pengolahan pada berbagai varietas apel.

Tabel 2. Kadar Kuersetin (Ikizler M *et al.*, 2007)

Jenis Pengolahan	Varian Apel	Rata-rata Kadar Quercetin
Apel Segar	Red delicious	477.96
	Manalagi	406.57
	Fuji	272.89
Jus Apel ( <i>juicer</i> )	Rome beauty	206.54
	Red delicious	242.96
	Manalagi	185.22
Smoothie Apel ( <i>blending</i> )	Fuji	133.90
	Rome beauty	98.85
	Red delicious	136.66
	Manalagi	118.12
	Fuji	86.12
	Rome beauty	55.80



Kuersetin adalah salah satu bioflavonoid penting yang di temukan pada lebih dari 20 jenis tanaman dan telah di ketahui mampu mencegah terjadinya inflamasi, hipertensi, obesitas, hiperkolesterolemia, aterosklerosis, efek vasodilator ( Sultana and Anwar, 2008).

Kuersetin berasal dari bahasa latin yaitu "*Quercetum*" yang berarti "hutan oak". Kuersetin tidak mampu di produksi dalam tubuh manusia. Ciri-ciri kuersetin yaitu memiliki warna kuning, kurang larut dalam air panas, larut dalam alkohol maupun lipid, dan tidak larut dalam air dingin. Kuersetin telah banyak digunakan untuk suplemen nutrisi dan bermanfaat dalam melawan berbagai penyakit. Beberapa manfaat kuersetin yaitu melindungi kardiovaskular, anti-kanker, anti-tumor, anti-ulkus, anti-alergi, anti-virus, anti-inflamasi, anti-diabetes, anti-hipertensi, anti-infeksi (Anand *et al.*, 2016).

Pada tikus, kuersetin (dosis 80 mg) dapat menghambat inflamasi akut dan kronik, juga terbukti mampu mencegah secara signifikan artritis . Kuersetin dengan dosis 500 mg yang di berikan selama 2 bulan pada pria yang bukan atlet menunjukkan kuersetin mampu menurunkan tingkat CRP. Kuersetin mampu mencegah kanker sebagai akibat dari stress oksidatif. kuersetin dapat menghambat agregasi trombosit dan meningkatkan kualitas endotelium. Selain itu, kuersetin juga mampu mencegah CHD (*Congenital Heart Disease*) dan mengurangi risiko kematian yang disebabkan oleh LDL karena kuersetin memiliki sifat vasorelaksan pada arteri terisolasi yang dapat membantu dalam menurunkan tekanan darah dan mencegah perkembangan hipertrofi jantung. Kuersetin mampu mencegah kerusakan kolesterol LDL dimana individu yang mengkonsumsi kuersetin 150 mg/ hari mampu menurunkan tekanan darah sistol dan mengurangi jumlah LDL yang teroksidasi dalam 6 minggu percobaan secara klinis. Dosis



kuersetin yang aman adalah 945 mg/m<sup>2</sup>. Pada dosis toksik, kuersetin dapat menimbulkan emesis, hipertensi, nefrotoksis. Kadar kuersetin 500 mg/hari mampu mengurangi tekanan darah sistolik pada wanita yang menderita diabetes tipe 2 (Anand *et al.*, 2016).

#### 2.4.5 Tipe Antioksidan

Berdasarkan fungsinya, antioksidan dibedakan menjadi 3 jenis yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier (Rajalakshmi and Narisimhan 1985).

##### A. Antioksidan Primer

Senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan primer mampu memutuskan rantai reaksi pembentukan radikal bebas dengan memberikan ion hidrogen atau elektron pada radikal bebas sehingga menjadi produk yang stabil. Senyawa yang digolongkan sebagai antioksidan primer adalah kelompok senyawa polifenol, asam askorbat, asam galat, *Butylated Hhydroxyl-Toluene* (BHT), *Butylated Hhydroxyl-Anisole* (BHA), *Tert-Butil Hidroquinon* (TBHQ), *Propil Galat* (PG), dan tokoferol. Antioksidan primer yang ada dalam tubuh manusia yaitu: 1) Enzim *Super Okside Dismutase* (SOD), 2) *Gluthatione Peroksidase* (GPx), 3) catalase (CAT).

##### B. Antioksidan Sekunder

Antioksidan ini berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas, menginaktifkan singlet oksigen, menyerap radiasi ultraviolet dan bekerja sinergis dengan antioksidan primer. Antioksidan ini merupakan senyawa yang berfungsi membersihkan radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar. Antioksidan sekunder adalah vitamin E, vitamin C dan betakaroten yang



dapat diperoleh dengan cara mengkonsumsi buah-buahan dan sayuran hijau. Beberapa tipe antioksidan sekunder adalah sebagai berikut:

- 1). Oxygen scavenger: mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi. Asam askorbat, ascorbil plamitat, asam eritorbik, sodium eritorbat dan sulfat dapat mencegah dengan cara membersihkan oksigen dan bertindak sebagai konduktor
- 2). Chelators: beberapa logam berat dengan dua atau lebih tingkat valensi (Fe, Cu, Mn, Cr, Ni, Zn, Al) dapat meningkatkan oksidasi dengan bertindak sebagai klinis yang mentransfer elektron tunggal pada radikal bebas
- 3). Quencher Oksigen singlet: molekul berenergi tinggi yang bertanggung jawab untuk foto oksidasi lemak tak jenuh dan turunan berikutnya dari hidroperoksida. Quencher oksigen singlet mampu mengosongkan oksigen singlet dari kelebihan energi dan menghilangkan energi tersebut dalam bentuk panas

#### C. Antioksidan Tersier

Senyawa yang berfungsi memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak akibat serangan radikal bebas. Kelompok antioksidan tersier adalah enzim metionin, sulfoksi dan reduktase yang memperbaiki DNA dalam inti sel (Kumalaningsih, 2006) Kekurangan antioksidan menyebabkan kondisi stress oksidatif yang berakibat pada kerusakan jaringan (Winarsi, 2007).

#### 2.4.6 Peran Antioksidan Terhadap Radikal

Kerusakan sel dipicu oleh reaktif oksigen spesies (ROS), mengakibatkan perubahan makro molekul seperti asam lemak pada membran lipid, protein esensial, DNA, peroksidasi lipid dan oksidasi protein. Kerusakan jaringan akibat serangan ROS dikenal dengan stress oksidatif, sedangkan faktor yang dapat



melindungi jaringan terhadap ROS adalah antioksidan (Halliwell and Gutteridge, 1994).

Tingginya reaktivitas senyawa radikal bebas menyebabkan terbentuknya reaksi radikal yang baru apabila bertemu dengan molekul lain, sehingga akan terjadi pembentukan reaksi berantai (*chain reaction*). Reaksi ini akan terus berlanjut dan akan berhenti apabila reaktivitasnya diredam oleh senyawa yang memiliki sifat sebagai antioksidan. Apabila elektron yang terikat oleh radikal bebas bersifat ionik, dampak yang mungkin timbul tidak terlalu berbahaya, namun jika elektron yang terikat radikal bebas berasal dari senyawa yang berikatan kovalen, akan sangat berbahaya karena ikatan digunakan secara bersama-sama pada orbital luarnya. Umumnya senyawa yang memiliki ikatan kovalen antara lain adalah molekul-molekul beserta seperti lipid, protein, maupun DNA. Semakin besar ukuran molekul yang berikatan dengan radikal bebas maka akan mengalami kerusakan yang semakin parah, akibat yang ditimbulkannya. Kerusakan akan berdampak negatif pada struktur dan fungsinya (Winarsi, 2007).

Antioksidan terbagi menjadi dua kelas yaitu antioksidan preventif yang bekerja mengurangi laju inisiasi reaksi berantai; antioksidan pemutus rantai yang mengganggu propagasi reaksi berantai di atas (Robert K *et al.*, 2009). Dalam tubuh terdapat antioksidan endogen yaitu *glutathione*, asam lipoic, bilirubin, ferritin, superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase. ROS atau radikal bebas yang berlebih dalam tubuh tersebut tidak mampu hanya diatasi oleh antioksidan endogen saja sehingga membutuhkan antioksidan eksogen (Ott M *et al.*, 2007).

Mekanisme kerja senyawa flavonoid dalam menurunkan kolesterol LDL darah yaitu melalui penghambatan *HMG-CoA Reduktase*. Terhambatnya *HMG-CoA*





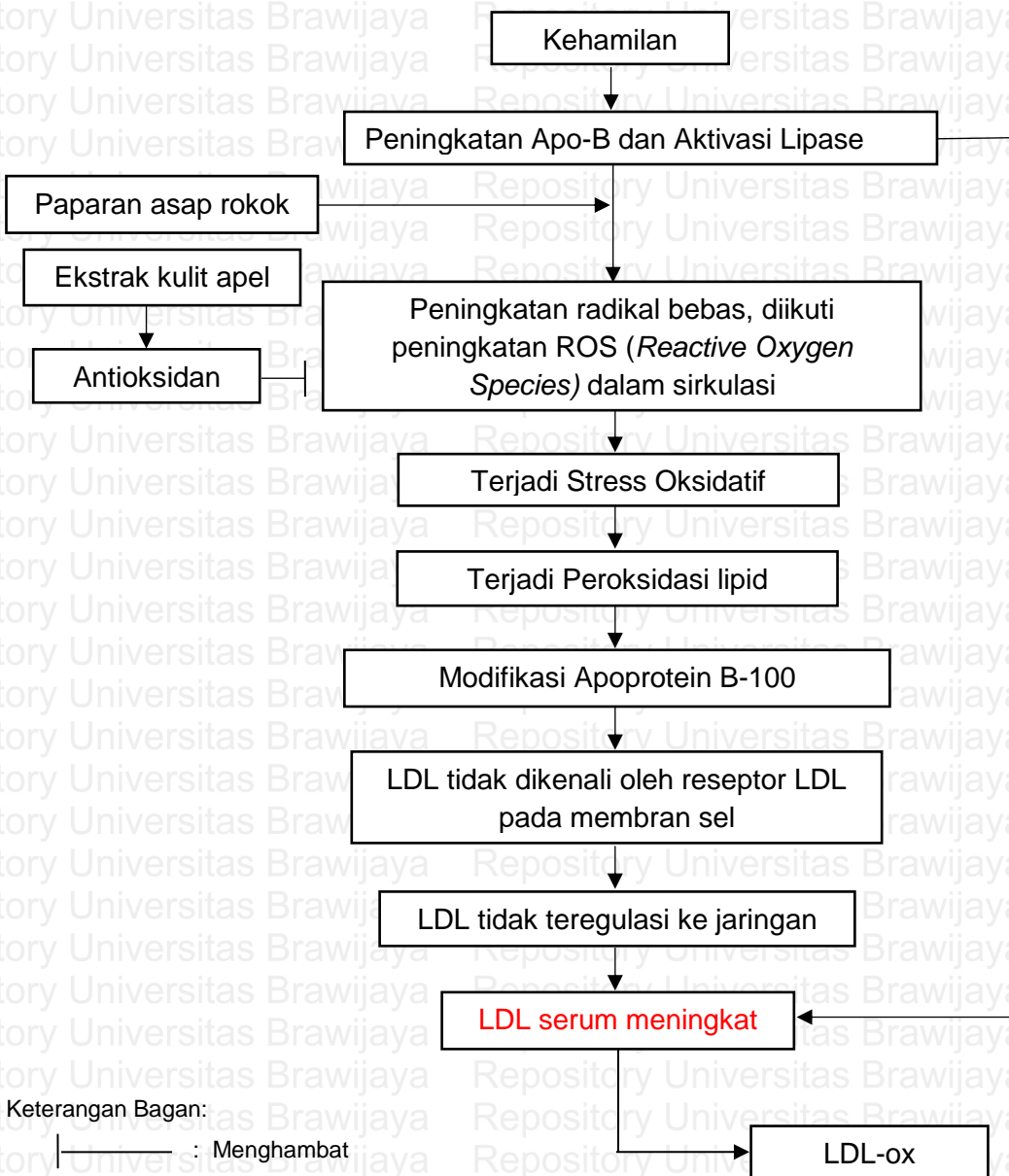
Reduktase menyebabkan terjadinya penurunan sintesis kolesterol dan meningkatnya jumlah reseptor LDL yang terdapat di dalam membran sel hepar maupun pada jaringan ekstrahepatik sehingga kadar kolesterol total dalam darah akan turun. Penurunan kadar kolesterol total darah tersebut akan berdampak pula terhadap menurunnya LDL yang bekerja sebagai pengangkut kolesterol dalam darah (Carjavall-Zarrabal, 2005). Flavonoid juga mampu mencegah kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas dengan menangkap ROS, mengaktifkan enzim antioksidan, menghelat logam, mengurangi radikal  $\alpha$ -tokoferol, mencegah oksidasi, dan mengurangi stress oksidatif yang di sebabkan oleh NO. Flavonoid mampu bekerja sebagai anti-alergi, anti-virus, anti-inflamasi, dan vasodilatasi (Procházková *et al.*,2011). Terdapat juga polifenol, yang mampu menurunkan kadar kolesterol dengan cara menurunkan sekresi apoB yang menyebabkan terjadinya penurunan produksi lipoprotein (Sukma, 2011).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan Bagan:

- : Menghambat
- x : Variabel yang diukur
- LDL : Low Density Lipoprotein
- LDL-ox : LDL teroksidasi

### Keterangan:

Pada ibu hamil, secara normal akan terjadi perubahan metabolisme lipid yaitu kadar LDL akan meningkat karena akan dibutuhkan selama proses kehamilan. Ketika Ibu hamil menghirup asap rokok maka akan menjadi perokok pasif. Perokok pasif akan menerima senyawa toksik yang ada dalam rokok sama seperti yang dihirup perokok aktif, bahkan perokok pasif akan menghirup asap arus samping yang sangat berbahaya yang tidak dihirup oleh perokok aktif. Dalam rokok mengandung banyak sekali senyawa berbahaya yang akan menimbulkan radikal bebas. Radikal bebas yang terhirup akan memasuki sirkulasi dan akan meningkatkan ROS dalam sirkulasi. Penumpukan ROS akan mengarah pada keadaan stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan dimana kadar antioksidan tidak mencukupi untuk menetralkan radikal bebas yang ada dalam tubuh. Kurangnya antioksidan dalam tubuh menyebabkan radikal bebas akan berikatan dengan senyawa lain, salah satunya adalah senyawa lipid. Ikatan tersebut menimbulkan peroksidasi lipid oleh radikal bebas. Terjadinya peroksidasi lipid menghasilkan senyawa toksin seperti MDA. Senyawa MDA ini akan memodifikasi Apoprotein B-100 (Apo B-100) yang terdapat pada LDL. Apoprotein B-100 ini berfungsi sebagai pemberi sinyal terhadap reseptor Apo B-100 yang terdapat pada membran sel agar LDL mampu ter-endositosis ke dalam sel-sel tubuh. Karena modifikasi tersebut maka LDL tidak dapat berikatan lagi dengan reseptor Apo B-100 pada membran sel, sehingga LDL tidak dapat memasuki sel, melainkan akan menetap dalam plasma/sirkulasi darah. Peningkatan kadar LDL yang terjadi secara normal dalam kehamilan ditambah dengan peningkatan kadar LDL akibat paparan radikal bebas menyebabkan kadar LDL pada ibu hamil meningkat tajam, sehingga LDL yang kadarnya sangat tinggi tersebut akan lebih mudah teroksidasi





menjadi LDL-ox. LDL teroksidasi ini selanjutnya akan menimbulkan banyak permasalahan dalam tubuh.

Untuk meredam radikal bebas dalam tubuh, maka diperlukan antioksidan dari luar tubuh yang salah satunya dapat diperoleh dari kulit apel manalagi. Pada kulit apel manalagi terdapat senyawa antioksidan yang kadarnya sangat tinggi apabila dibandingkan dengan bagian apel lainnya. Antioksidan ini mampu menghambat oksidasi LDL dengan dua cara yaitu pertama berikatan langsung dengan senyawa radikal untuk menyumbangkan elektronnya sehingga radikal menjadi netral kembali. Kedua dengan menghentikan reaksi rantai peroksidasi lipid. Dengan diberikannya ekstrak etanol kulit apel manalagi pada tikus bunting yang dipapar asap rokok ini diduga mampu mencegah peningkatan kadar LDL dalam plasma darah dengan cara menurunkan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam tubuh.

### 3.1 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris mill*) dapat mencegah peningkatan kadar LDL pada tikus (*Rattus novergicus*) bunting yang dipapar asap rokok.





## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah “Experimental Murni (*True Experimental Design*)” dengan rancangan penelitian secara acak tersamar tunggal (*Randomized Post Test Only-Controlled Group Design*), yaitu dilakukan penelitian setelah hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar diberi perlakuan antara kelompok kontrol dan perlakuan. Tikus betina bunting dalam penelitian ini akan di berikan paparan asap rokok jenis kretek. Penelitian ini akan menggunakan 5 kelompok hewan coba, yaitu satu kontrol negatif (K-), 4 perlakuan (K+, P1, P2, P3). Setiap kelompok akan terdiri dari 5 tikus betina.

#### 4.2 Subjek Penelitian

Subjek dalam penelitian ini adalah tikus putih betina (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diambil secara random. Subjek akan dibagi menjadi 3 (tiga) kelompok perlakuan dan 2 (dua) kelompok kontrol, yaitu sebagai berikut:

- a. Kontrol negatif (-): tikus bunting tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak kulit apel manalagi
- b. Kontrol positif (+) : tikus bunting yang hanya dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi
- c. Perlakuan 1 : tikus bunting yang dipapar asap dan diberi ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 7 mg/KgBB
- d. Perlakuan 2 : tikus bunting yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosisi 14 mg/KgBB



- e. Perlakuan 3 : tikus bunting yang dipapar asap rokok dan diberi ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 28 mg/KgBB

#### 4.2.1 Jumlah Sampel

Tikus diperoleh dan dipelihara di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Estimasi jumlah sampel dalam penelitian ini adalah jumlah pengulangan (n) pada setiap perlakuan (p) akan dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001) : Nilai  $P=5$

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

P : Jumlah kelompok perlakuan

n : Jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan dan n harus bilangan bulat

Sehingga :

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan hasil perhitungan tersebut maka minimal akan dilakukan 4 kali pengulangan untuk masing-masing kelompok. Maka dalam penelitian ini sampel diperbesar menjadi 5 ekor tikus untuk setiap kelompoknya, sehingga keseluruhan



jumlah tikus dalam penelitian ini adalah 5 kelompok  $\times$  5 ekor tiap kelompok = 25 ekor.

#### 4.2.2 Kriteria Inklusi

- a. Berat badan antara 150-200 gram
- b. Usia tikus 8 -12 minggu
- c. Tikus dalam keadaan sehat ditandai dengan pergerakan aktif, nafsu makan baik
- d. Tikus betina spesies *Rattus Norvegicus* galur wistar bunting.

#### 4.2.3 Kriteria Eksklusi

- a. Tikus yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
- b. Terlalu cepat melahirkan atau prematur

#### 4.2.4 Prosedur dan Teknik Pengambilan Sampel

Untuk menentukan subjek dalam penelitian ini maka digunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan teknik randomisasi sederhana dalam pengelompokan dan pemberian perlakuan. Mengingat bahwa hewan coba, bahan pakan, serta bahan penelitian yang lain adalah homogen maka setiap hewan coba memiliki peluang yang sama untuk dijadikan sebagai sampel pada kelompok kontrol dan kelompok perlakuan.

### 4.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- a. Variabel tergantung
- b. Variabel tergantung yang digunakan dalam penelitian ini adalah kadar serum LDL pada tikus bunting Variabel bebas





Variabel bebas dalam penelitian ini adalah kandungan dalam paparan asap rokok dan ekstrak etanol kulit apel manalagi dalam 3 dosis

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilakukan kurang lebih selama 2 bulan dengan minimal 7 hari sebagai aklimatisasi.

#### 4.5 Bahan dan Alat Penelitian

##### 4.5.1 Bahan dan alat untuk Pemeliharaan Hewan Coba

Bahan untuk meliharaan tikus berupa makanan tikus yaitu makanan ternak berupa pelet BR 1 dan minuman yang diberikan adalah air keran. Alat untuk memelihara hewan coba adalah kandang tikus berupa *box plastic* sebanyak 5 buah diisi dengan sekam sebagai alas dan ditutup dengan kawat berjaring dengan ukuran 45 x 35 x 12 cm. Pada tiap kandang tikus diberikan tempat untuk makan dan minum tikus. Masing-masing kandang akan ditempati 5 ekor tikus bunting

##### 4.5.2 Bahan untuk Perlakuan Hewan Coba

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rokok jenis rokok kretek yang di beli dari daerah pasar kota malang dan ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*), dimana kulit apel didapat dari Bumiaji kota Batu Malang.

##### 4.5.3 Bahan dan Alat untuk Pembedahan Hewan Coba

- a. Bahan untuk pembedahan hewan coba adalah ketamin 0,1 cc
- b. Alat yang digunakan adalah kapas, gunting, pinset, scalpes, alas kayu, sarung tangan, jarum pentul.



#### 4.5.4 Bahan dan Alat untuk Pemeriksaan LDL

- a. Bahan yang digunakan dalam pembuatan serum darah adalah darah tikus sebanyak 2 ml. Bahan yang digunakan dalam pemeriksaan LDL adalah sampel serum dan reagen
- b. Alat yang digunakan dalam pembuatan serum darah adalah tabung, pipet, dan alat *centrifuge*. Alat yang digunakan dalam pengukuran LDL adalah rak tabung, *cup*, alat Cobas Miras, tabung reaksi, pipet volumetrik, fotometer, pipet mikro, tabung mikro dan rak, rak sampel

#### 4.5.5 Alat untuk Penimbangan Berat Badan Hewan Coba

Alat untuk penimbangan berat badan hewan coba adalah neraca Digital Analitik dalam satuan gram

#### 4.5.6 Alat Pembuatan Ekstrak Kulit Apel

Alat pembuatan ekstrak kulit apel adalah pisau, wadah plastik, *oven*, *blender*, kertas saring, *rotary evaporator*, timbangan, botol kaca atau plastik, *freezer*

#### 4.5.7 Alat Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel pada Hewan Coba

Alat pemberian ekstrak kulit apel pada tikus yaitu secara peroral dengan *sprit* 3 ml tanpa jarum dan sonde

#### 4.5.8 Alat Pengambilan Sampel Darah dan Pembedahan pada Hewan Coba

Kapas, scalpel, gunting, pinset, jarum pentul, alas kayu, sarung tangan. Sementara alat pengambilan sampel darah pada hewan coba adalah *sprit* 3 ml, tabung container dan darah hewan coba yang diambil sebanyak 2 ml. Alat yang digunakan untuk mengukur kadar serum LDL adalah cobas miras



#### 4.5.9 Alat untuk Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

*Smooking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, alat ini berbentuk kotak yang dibuat dari *fiberglass*, terdapat tiga ruangan yang masing-masing berukuran 26 x 12 x 12 cm<sup>2</sup> dan terdapat pipa untuk mengalihkan asap rokok. Ketiga pipa keluar kemudian menyatu dengan pipa yang dipasang rokok. Dalam pipa ini juga terdapat pompa yang berfungsi menghisap asap rokok dan bekerja dibantu dengan adaptor. Kemudian terdapat dua klep yang dapat terbuka dan tertutup secara otomatis saat penghisapan dan penutupan asap rokok keluar atau masuk kotak

#### 4.6 Definisi Operasional

##### a. Hewan coba

Hewan coba adalah tikus (*Rattus Norvegicus*) galur wistar betina usia 8-12 minggu, mempunyai berat badan sekitar 150-200 gram dan sedang bunting

##### b. Tikus bunting

Tikus bunting adalah tikus betina yang sudah dikawinkan dengan tikus jantan dan memperlihatkan tanda-tanda kehamilan berupa *vaginal plaque*, palpasi abdomen pada hari ke-12 kebuntingan

##### c. Usia kebuntingan tikus

Usia kebuntingan tikus terhitung sejak pertama kali munculnya sumbatan vagina (*vaginal plaque*) sampai hari ke-18, pengecekan dilakukan dengan *vaginal plaque* dan vaginal swab

##### d. Asap Rokok Kretek

Asap rokok tanpa filter yang mulai dipaparkan pada hari ke-6 kehamilan sampai hari ke-18, dipaparkan dengan alat *smooking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



Malang. Paparan asap rokok diberikan 1 batang dalam sehari selama 7,5 menit dalam waktu 13 hari

e. Ekstrak Etanol Kulit Apel

Kulit apel yang digunakan adalah kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) yang mudah dijumpai khususnya di daerah kota Batu Malang. Kulit apel diproses lebih dulu dengan dicuci, dioven, dan diberi bahan lainnya

f. Kadar LDL

Jumlah kolesterol LDL yang ada dalam serum darah dan akan diuji dengan metode direk dan reagen Cobas Miras, dimana darah yang akan digunakan sebanyak 2 ml.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

##### 4.7.1 Aklimatisasi hewan coba

Aklimatisasi dilakukan selama minimal 7 hari, diberikan pakan dan minum yang telah sesuai dengan tikus agar dapat menyesuaikan diri dengan lingkungannya

##### 4.7.2 Prosedur Pemeliharaan Tikus

Hewan coba dipelihara dan di aklimatisasi dalam laboratorium selama minimal 7 hari pada suhu ruangan. Untuk tempat hewan coba digunakan kandang yang masing-masing berisi 5 tikus, ditutup dengan kawat dan diberi alas sekam yang diganti 2 kali dalam seminggu. Porsi makan tikus adalah 40 gr/hari/kandang

##### 4.7.3 Pembagian Kelompok Hewan Coba

1. 25 ekor sampel hewan coba akan dibagi menjadi 5 kelompok secara randomisasi yang masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus dengan rincian sebagai berikut: Kelompok kontrol negatif (K-)



Tikus bunting tanpa dipapar asap rokok dan tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi

2. Kelompok kontrol positif (K+)

Tikus bunting hanya dipapar asap rokok tanpa diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi

3. Kelompok perlakuan 1 (P1)

Tikus bunting dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 7 mg/KgBB

4. Kelompok perlakuan 2 (P2)

Tikus bunting dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 14 mg/KgBB

5. Kelompok perlakuan 3 (P3)

Tikus bunting dipapar asap rokok dan diberikan ekstrak etanol kulit apel manalagi dengan dosis 28 mg/KgBB

4.7.4 Prosedur Pembuntingan hewan coba

Waktu pengawinan tikus dilakukan pada masa estrus. Prosedur pengawinan dimulai dengan pencampuran hewan jantan dan betina dengan perbandingan 1:1 dalam satu kandang. Tikus jantan akan dimasukkan dalam kandang betina pada siang hari pukul 16.00 WIB dan akan dipisahkan kembali pagi harinya. Keesokan harinya bila ditemukan *vaginal plaque* maka hari tersebut ditandai sebagai hari pertama kebuntingan. Tikus yang belum bunting dilakukan pengawinan kembali dengan tikus jantan



#### 4.7.5 Prosedur Pemaparan Asap Rokok pada Hewan Coba

Pemaparan tikus dilakukan pada hari ke-6 hingga hari ke-18 kebuntingan.

Pemaparan menggunakan asap rokok sebanyak 1 batang per hari selama

7,5 menit untuk 3 ekor tikus bunting dalam satu kali pemaparan dengan

bantuan alat *smooking pump* buatan Laboratorium Farmakologi Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya. Prosedur pemaparan asap rokok pada

tikus adalah sebagai berikut (standar pemaparan asap rokok FKUB):

- a. Tikus ditimbang berat badannya dengan Neraca Digital Analitik sebelum dipapar asap rokok
- b. Tempat pemaparan dibersihkan dari kotoran dan sisa asap
- c. Nikotin yang melekat di smoking pump dibersihkan terlebih dahulu
- d. Power dan *self voltage* diperiksa
- e. Rokok dipasang pada pipa sampai batas merah
- f. Tiga ekor tikus bunting dimasukkan kedalam kotak dan segera ditutup, karena pada smoking pump hanya tersedia tiga ruangan. Setiap pemaparan asap rokok dilakukan selama 7,5 menit untuk 1 batang rokok, kemudian alat dimatikan, tutup dibuka dan selanjutnya tikus segera dipindahkan ke kandang semula
- g. Setiap pemaparan berikutnya kotak selalu dibersihkan dahulu dari sisa asap rokok perlakuan sebelumnya
- h. Pompa tetap dijalankan tanpa rokok untuk mengeluarkan sisa asap
- i. Tahap-tahap diatas diulangi untuk kelompok tikus berikutnya



#### 4.7.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

- a. Cuci bersih kulit apel dan potong kecil-kecil Oven kulit apel pada suhu  $40^{\circ}$  -  $60^{\circ}$  C atau dikeringkan dengan panas matahari hingga diperoleh kulit apel manalagi kering
- b. Kulit apel yang sudah kering kemudian diblender dan diayak sampai menjadi bubuk halus
- c. Bubuk halus ditimbang sebanyak 100 g, tersebut selanjutnya direndam dengan etanol sampai dengan 1000 ml.
- d. Selanjutnya kocok selama 30 menit dan rendam satu malam sampai mengendap
- e. Ambil lapisan paling atas yang merupakan campuran antara etanol dan zat aktif
- f. Lakukan langkah e dan f sebanyak tiga kali
- g. Masukkan campuran tersebut kedalam labu evaporasi satu liter yang sudah dipasang ke labu evaporator
- h. Isi Water bath dengan air sampai penuh dan suhu diatur sampai  $90^{\circ}$  C atau sesuai dengan titik didih pelarut
- i. Semua alat dipasang dan disambungkan ke listrik
- j. Pelarut dibiarkan saja terpisah dengan zat aktifnya
- k. Pelarut dibiarkan sampai berhenti menetes pada labu penampung selam  $\pm$  1,5-2 jam
- l. Setelah itu akan didapat hasil ekstraksi kira-kira 1/5 bagian dari bahan kering
- m. Hasil ekstraksi dimasukkan ke botol plastik/kaca kemudian simpan dalam freezer



#### 4.7.7 Penentuan Dosis Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Suparmi dkk, 2014 tentang uji aktivitas ekstrak etanol kulit buah apel (*Pyrus malus* L) terhadap penurunan permeabilitas vaskuler pada mencit putih jantan strain balb/c telah terbukti bahwa ekstrak etanol kulit apel mampu menurunkan permeabilitas vaskuler. Dalam penelitian tersebut, dosis yang digunakan adalah 0,2 mg/20gBB; 0,4 mg/20gBB; 0,8 mg/20gBB. Oleh karena itu peneliti melakukan konversi ke tikus putih dengan berat 200 gram. Berdasarkan tabel konversi oleh (Laurence & Bacharach, 1964) untuk melakukan konversi mencit ke tikus seberat 200 gram yaitu dengan dikali 7, maka dapat dilakukan perhitungan sebagai berikut:  $0,2 \text{ mg}/20 \text{ gBB} \times 7 = 1,4 \text{ mg}/200\text{gBB}$  atau  $7 \text{ mg}/\text{KgBB}$ ;  $0,4 \text{ mg}/20 \text{ gBB} \times 7 = 2,8 \text{ mg}/200\text{gBB}$  atau  $14 \text{ mg}/\text{KgBB}$ ;  $0,8 \text{ mg}/20 \text{ gBB} \times 7 = 5,6 \text{ mg}/200\text{gBB}$  atau  $28 \text{ mg}/\text{KgBB}$ .

#### 4.7.8 Prosedur Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel pada Hewan Coba

Ekstrak etanol kulit apel manalagi yang sudah diencerkan dengan aquades di berikan secara peroral dengan menggunakan sonde dan spuit 3 ml tanpa jarum yang di lakukan pada hari ke-6 sampai ke-18 kebuntingan. Pemberian ekstrak etanol kulit apel manalagi diberikan setelah paparan asap rokok pada tikus di hari yang sama

#### 4.7.9 Prosedur Pembedahan dan Pengambilan Sampel Darah

Pengambilan sampel darah hewan coba dari vena jantung. Pada hari ke-19 setelah di beri perlakuan, tikus dibedah untuk di lakukan pengambilan darah pada jantung. Sebelum pembedahan, tikus akan diberi suntikan ketamin sebanyak 0,1 cc terlebih dahulu sebagai bius secara IM pada paha. Setelah tikus tidak sadar, tikus dibedah kemudian ambil darah dari





jantung menggunakan spuit 3 ml dan ambil darah sebanyak 2 ml dan di masukkan kedalam tabung *container*. Sedangkan bangkai induk tikus yang sudah tidak digunakan akan dikubur oleh petugas laboratorium dengan kedalaman tanah minimal 50 cm. Sampel darah kemudian dikirim ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya untuk dilakukan pemeriksaan LDL direk

#### 4.7.10 Prosedur Pengukuran Kadar LDL

##### 1. Pembuatan Sampel Serum

- a. masukkan 2 ml darah kedalam tabung *container* tanpa antikoagulan
- b. *centrifuge* darah selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm
- c. lapisan berwarna kuning muda pada bagian atas adalah serum, ambil segera dengan pipet tetes kemudian masukkan kedalam tabung lain

##### 2. Pengukuran Kadar LDL Direk

Pengukuran kadar LDL dilakukan di laboratorium PK (Patologi Klinik Universitas Brawijaya). Pemeriksaan kadar LDL-Kolesterol menggunakan metode *direk* dan alat *Cobas Miras*. Dalam pengukuran kadar LDL ini membutuhkan sampel serum darah sebanyak 0,2 ml.

Langkah-langkah dalam melakukan pengukuran kadar LDL dengan alat Cobas Miras adalah:

1. hidupkan alat dengan menekan tombol stop kontak
2. tunggu 15 menit sampai suhu dalam alat mencapai 37° C
3. siapkan alat dan bahan sesuai yang dibutuhkan
4. untuk menggunakan mesin, maka dilakukan langkah sebagai berikut:
  - a. lakukan pencucian alat.



- b. Tekan tombol INFO, tombol 6 (*wash*), tombol 1 (*down*), tombol F1 (*start*)
  - c. Tunggu sekitar 2 menit sampai alat tercuci sebanyak 3 kali
  - d. Hentikan mencuci dengan menekan tombol F1 (*stop*), kemudian tekan tombol status agar kembali pada menu awal
  - e. alat siap di gunakan
5. Masukkan reagen ke dalam *cup* dan letakkan reagen tersebut pada rak yang telah disediakan
  6. Masukkan serum darah ke dalam *cup* sampel dan letakkan pada rak sampel sesuai dengan nomer urutnya
  7. Letakkan masing-masing rak pada alat cobas miras
  8. Alat siap digunakan
  9. pemeriksaan sampel
    - a. Tekan tombol *routine, No.Sample, enter*
    - b. Masukkan kode sampel kemudian tekan *enter* kembali
    - c. Tekan tombol test/parameter yang akan diukur yaitu LDL, *enter* dan *start*
    - d. Tunggu alat hingga memproses
    - e. Untuk mengetahui hasil pengukuran maka tekan tombol info dan

2

#### 4.8 Analisis Data

1. Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 23,0 *Windows 7* dengan tingkat signifikansi 0.5 ( $p < 0.05$ ). berikut langkah uji data yaitu: Uji normalitas data



Untuk mengetahui apakah data memiliki distribusi normal atau tidak. Untuk uji hipotesis, karena pemilihan penyajian data dan uji hipotesis tergantung pada normal tidaknya distribusi data maka apabila distribusi data normal menggunakan uji parametrik.

2. Uji homogenitas varian

Apabila varian dalam kelompok homogen, maka asumsi untuk menggunakan Anova terpenuhi.

3. Uji *one way* Anova

Analisis data yang dilakukan secara serentak pada semua kelompok untuk mengetahui adakah kelompok yang memiliki perbedaan secara signifikan.

4. *Post Hoc Tukey test*

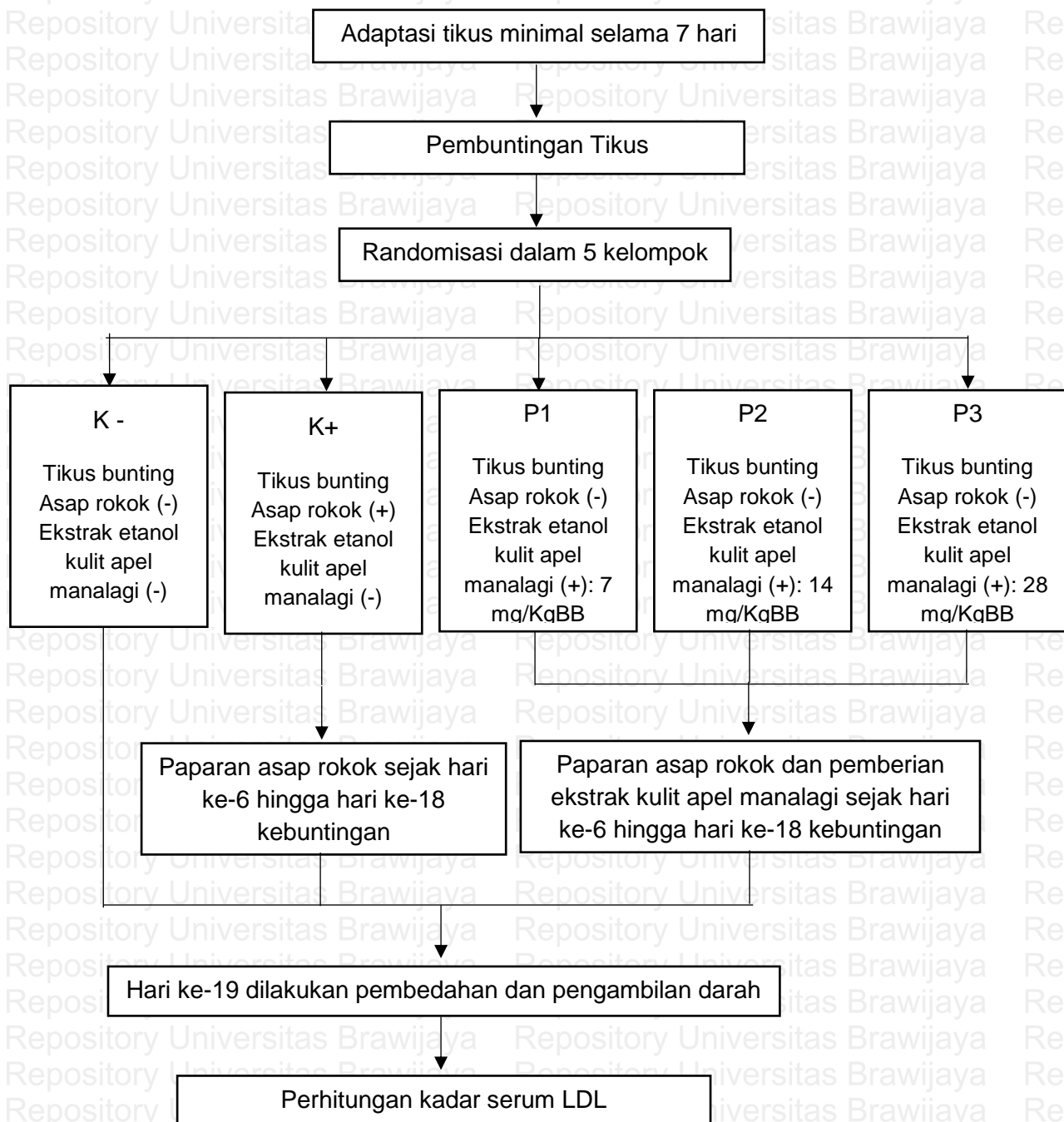
Bertujuan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan dari uji Anova. Uji *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD* dengan tingkat signifikansi 95% ( $p < 0.05$ )

5. Uji Korelasi *Pearson*

Bertujuan untuk mengetahui adakah hubungan antara besarnya dosis ekstrak dengan kadar serum LDL.



#### 4.9 Alur Penelitian







## BAB V

### HASIL DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemaparan ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) terhadap penurunan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) bunting yang dipapar asap rokok. Penelitian ini menggunakan desain *true experimental* pada 25 ekor tikus yang dibagi menjadi 5 kelompok yaitu 1 kontrol negatif (-), 1 kontrol positif (+), dan 3 kelompok dipapar ekstrak (P1, P2, P3). Kelompok perlakuan yang dipapar ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris Mill*) masing-masing sebanyak 7 mg/KgBB, 14 mg/KgBB, 28 mg/KgBB per hari selama 13 hari. Paparan asap rokok diberikan pada kelompok K+, P1, P2, P3, dengan durasi pemberian dan jenis rokok kretek yang sama. Selanjutnya setelah hari ke-19 kebuntingan, tikus dibedah kemudian dilakukan pemeriksaan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*).

Hasil rata-rata pemeriksaan kadar LDL dan standar deviasi dapat dilihat pada tabel

5.1 berikut:

Tabel 1. Perbandingan Kadar LDL Antar Kelompok

Kelompok	(n)	Rerata Kadar LDL (mg/dl) $\pm$ Std.Deviasi
K-	5	10,78 $\pm$ 1,871
K+	5	20,42 $\pm$ 7,334
P1	5	14,1 $\pm$ 2,713
P2	5	13,34 $\pm$ 2,259
P3	5	10,72 $\pm$ 1,094

**Keterangan:**

- Kontrol Negatif (-), yaitu kelompok yang tidak diberikan paparan asap rokok dan tidak diberikan paparan ekstrak etanol kulit apel
- Kontrol Positif (+), yaitu kelompok yang diberikan paparan asap rokok dan tidak diberikan paparan ekstrak kulit apel
- Perlakuan Dosis 1 (P1), yaitu kelompok yang diberikan paparan asap rokok dan diberikan paparan ekstrak kulit apel dengan dosis 7 mg/kgBB
- Perlakuan Dosis 2 (P2), yaitu kelompok yang diberikan paparan asap rokok dan diberikan paparan ekstrak kulit apel dengan dosis 14 mg/kgBB
- Perlakuan Dosis 3 (P3), yaitu kelompok yang diberikan paparan asap rokok dan diberikan paparan ekstrak kulit apel dengan dosis 28 mg/kgBB.



## 5.2 Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 23,0 for Windows 7 dengan tingkat signifikansi 0.5 ( $p < 0.05$ ). Metode analisis data yang digunakan adalah *One Way ANOVA*. Sebelum melakukan *ANOVA* maka sebaran data harus normal dan harus menguji homogenitasnya.

### 5.2.1 Uji Normalitas

Dalam penelitian ini jumlah sampel tikus yang digunakan sebanyak kurang dari 50 ekor, sehingga akan digunakan uji Saphiro Wilk. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan nilai  $p = 0,4799$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti bahwa hasil analisis data signifikan sehingga dapat disimpulkan sebaran data normal. syarat uji *ANOVA* dapat terpenuhi dan bisa dilanjutkan untuk analisis data selanjutnya.

### 5.2.2 Uji Homogenitas

Untuk mengetahui apakah ada dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama, digunakan uji *Levene (Levene Statistic Test Homogeneity of Variances)*. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan hasil signifikan yaitu  $p = 0,221$  ( $p > 0,05$ ) artinya populasi mempunyai keindentikan atau homogen sehingga syarat uji *ANOVA* dapat terpenuhi dan analisis data dapat dilanjutkan.

### 5.2.3 Uji *One Way ANOVA*

Uji ini untuk mengetahui apakah terdapat minimal dua kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan rata rata kadar LDL yang bermakna. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan nilai  $p = 0,004$  ( $p < 0,05$ ) berarti bahwa

Analisa Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis secara statistik dengan menggunakan program SPSS 23,0 for Windows 7 dengan tingkat signifikansi 0.5 ( $p < 0.05$ ). Metode analisis data yang digunakan adalah *One Way ANOVA*.

Sebelum melakukan ANOVA maka sebaran data harus normal dan harus menguji homogenitasnya.

#### 5.2.4 Uji Normalitas

Dalam penelitian ini jumlah sampel tikus yang digunakan sebanyak kurang dari 50 ekor, sehingga akan digunakan uji Saphiro Wilk. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan nilai  $p = 0,4799$  ( $p > 0,05$ ) yang berarti bahwa hasil analisis data signifikan sehingga dapat disimpulkan sebaran data normal. syarat uji ANOVA dapat terpenuhi dan bisa dilanjutkan untuk analisis data selanjutnya.

#### 5.2.5 Uji Homogenitas

Untuk mengetahui apakah ada dua atau lebih kelompok data mempunyai varians yang sama, digunakan uji *Levene (Levene Statistic Test Homogeneity of Variances)*. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan hasil signifikan yaitu  $p = 0,221$  ( $p > 0,05$ ) artinya populasi mempunyai keindentikan atau homogen sehingga syarat uji ANOVA dapat terpenuhi dan analisis data dapat dilanjutkan.

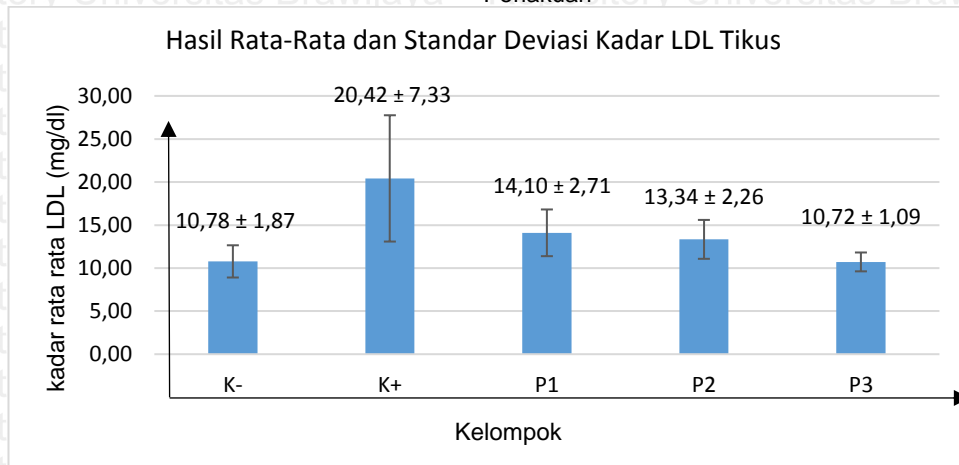
#### 5.2.6 Uji *One Way ANOVA*

Uji ini untuk mengetahui apakah terdapat minimal dua kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan rata rata kadar LDL yang bermakna. Berdasarkan hasil analisis data (Lampiran 2) didapatkan nilai  $p = 0,004$  ( $p < 0,05$ ) berarti bahwa terdapat paling tidak dua kelompok yang mempunyai rerata kadar LDL yang berbeda makna.





Gambar 1. Grafik Rerata dan Standar Deviasi Kadar LDL Darah pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan



Selanjutnya untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan maka dilakukan uji lanjutan yaitu *Post Hoc Tukey HSD*.

#### 5.2.7 Uji *Post Hoc Tukey*

Uji ini digunakan untuk membandingkan antarkelompok mana yang memiliki perbedaan signifikan. Berikut kesimpulan hasil uji *Tukey* terhadap kadar LDL

Tabel 2. Uji Tukey pada kadar serum LDL Tikus bunting yang Dipapar Asap Rokok dan Diberi Ekstrak Kulit Apel

Kelompok	K (-)	K (+)	P1	P2	P3
K (-)		0,005*	0,639	0,817	1,000
K (+)			0,098	0,052	0,005*
P1				0,998	0,623
P2					0,805
P3					

Keterangan: (\*) menunjukkan tingkat signifikansi yang bermakna ( $p < 0,05$ )

Apabila K+ dibandingkan dengan K- terlihat bahwa terdapat perbedaan kadar serum LDL yang bermakna yaitu  $p = 0,005$  ( $p < 0,05$ ) berarti bahwa asap rokok menyebabkan naiknya kadar serum LDL, selanjutnya K+ dibandingkan dengan P1 dan P2 juga tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Oleh karenanya dosis P1 dan P2 belum cukup efektif untuk mencegah peningkatan kadar serum LDL pada tikus yang sudah terpapar asap rokok. K+ yang

dibandingkan dengan P3 terdapat perbedaan yang bermakna yaitu  $p = 0,005$  ( $P < 0,05$ ) jadi dapat disimpulkan bahwa hanya dosis P3 (28 mg/KgBB) yang secara signifikan mampu mencegah peningkatan kadar serum LDL dengan efektif.

#### 5.2.8 Uji Korelasi

Untuk mengetahui kekuatan hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak kulit apel manalagi dengan kadar serum LDL maka akan dilakukan uji korelasi *Pearson* (Lampiran 2). Berdasarkan hasil analisis data dapat disimpulkan bahwa:

1. Nilai korelasi sebesar ( $r = -0,623$ ), artinya terdapat korelasi yang kuat antara pemberian ekstrak kulit apel terhadap penurunan kadar LDL.
2. Arah korelasi adalah negatif, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak kulit apel maka semakin rendah kadar LDL.
3. Nilai  $p = 0,03$  ( $p < 0,05$ ) yaitu korelasi antara pemberian ekstrak kulit apel dengan kadar LDL signifikan.
4. Dari analisis data, didapatkan nilai ( $R^2$ ) sebesar 0,388 yang berarti bahwa pemberian ekstrak etanol kulit apel dapat berpengaruh dalam mencegah peningkatan kadar serum LDL sebesar 38,8%. Sisanya dipengaruhi oleh faktor lain.





## BAB VI PEMBAHASAN

### 6.1 Hasil Penelitian

Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar kolesterol total darah setelah dilakukan paparan, didapatkan hasil rata-rata kadar serum LDL pada K- adalah  $(10,78 \pm 1,871 \text{ mg/dl})$ , K+  $(20,42 \pm 7,334 \text{ mg/dl})$ , P1  $(14,1 \pm 2,713 \text{ mg/dl})$ , P2  $(13,34 \pm 2,259 \text{ mg/dl})$ , P3  $(10,72 \pm 1,094 \text{ mg/dl})$ . Hal ini menunjukkan bahwa terjadi penurunan kadar kolesterol LDL pada tikus bunting yang sudah diberi paparan asap rokok dengan pemberian ekstrak kulit apel. Berdasarkan hasil analisis data didapatkan bahwa dosis P3 yaitu 28 mg/KgBB yang mampu mencegah peningkatan kadar serum LDL tikus dengan signifikan setelah diberikan ekstrak etanol kulit apel selama 13 hari, sehingga hipotesis dalam penelitian ini dapat diterima yaitu ekstrak etanol kulit apel manalagi (*Malus sylvestris mill*) dapat mencegah peningkatan kadar LDL pada tikus (*Rattus novergicus*) bunting yang dipapar asap rokok.

### 6.2 Pengaruh Pemberian Asap Rokok terhadap Kadar Serum LDL Tikus Bunting

Radikal bebas dapat meningkatkan jumlah ROS (*Reactive Oxygen Species*) dalam tubuh. Tingginya jumlah ROS dalam tubuh yang tidak disertai dengan peningkatan antioksidan akan menimbulkan stres oksidatif (Scheibmeir et al, 2005). Stress oksidatif ini menyebabkan lipid mudah mengalami peroksidasi. Peroksidasi lipid terjadi apabila radikal bebas berikatan dengan lipid. Lipid memiliki banyak asam lemak tak jenuh ganda.

(PUFA) pada membran sel yang sangat mudah berikatan dengan radikal bebas. Ikatan PUFA dengan radikal bebas akan menghasilkan senyawa metabolit yaitu salah satunya MDA. Senyawa MDA ini mampu memodifikasi apoprotein B-100 yang terdapat pada LDL sehingga LDL tidak lagi mampu berikatan dengan reseptornya di membran-membran sel. LDL yang tidak dapat berikatan dengan reseptornya tidak mampu teregulasi masuk ke dalam jaringan sehingga LDL akan tetap berada dalam darah dan kadar LDL dalam serum darah akan meningkat (Yuslianti dkk., 2018; Niki, 2011; Sargowo, 2015).

### **6.3 Pengaruh Pemberian Ekstrak Kulit Apel Manalagi terhadap Kadar Serum LDL Tikus Bunting**

Dalam penelitian ini, terdapat 3 dosis ekstrak kulit apel yang berbeda yaitu 7 mg/KgBB, 14 mg/KgBB, 28 mg/KgBB. Berdasarkan hasil uji *Tukey* pada K+ jika dibandingkan dengan P1 (7 mg/KgBB) menunjukkan hasil  $p = 0,098$  ( $p > 0,05$ ) tidak signifikan, yang berarti bahwa dosis P1 belum mampu mencegah peningkatan kadar LDL secara efektif. Sama halnya jika K(+) dibandingkan dengan P2 menunjukkan hasil  $p = 0,052$  ( $p > 0,05$ ) tidak signifikan yang berarti bahwa dosis 2 belum mampu mencegah peningkatan kadar LDL dengan efektif. K(+) dibandingkan dengan P3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan nilai  $p = 0,005$  ( $p < 0,05$ ), oleh karena itu dosis 3 merupakan dosis yang efektif untuk mencegah peningkatan kadar serum LDL.

Terjadinya penurunan kadar serum LDL pada tikus yang sudah dipapar ekstrak kulit apel dikarenakan adanya antioksidan yang lebih kuat pada kulit apel. Kulit apel memiliki semua komponen antioksidan dan zat lainnya yang terdapat dalam daging buahnya. Pada kulit apel juga terdapat senyawa flavonoid eksogen yang kadarnya lebih banyak pada kulitnya, yang berupa kuersetin glikosida (Burda



S *et al.*, 1990). Kuersetin merupakan salah satu senyawa flavonoid yang berfungsi dalam menurunkan kolesterol LDL darah yaitu melalui penghambatan *HMG-CoA Reduktase*. Terhambatnya *HMG-CoA Reduktase* menyebabkan terjadinya penurunan sintesis kolesterol dan meningkatnya jumlah reseptor LDL yang terdapat pada membran sel (Carjavall-Zarrabal, 2005). Kuersetin juga mampu mencegah terjadinya peroksidasi lipid serta mencegah terjadinya oksidasi LDL dengan cara menangkap radikal bebas (Waji dan Sugrani, 2009). Kuersetin sebagai antioksidan berperan melawan reaktif oksigen spesies (ROS) akibat paparan radikal bebas. Cara kerja antioksidan ini yaitu dengan dua cara: 1) mencegah terjadinya dan tertimbunnya senyawa oksidan (radikal bebas) secara berlebihan, 2) mencegah terjadinya reaksi rantai yang berkelanjutan, Oleh karena itu kuersetin digolongkan menjadi antioksidan pencegah dan antioksidan pemutus reaksi rantai (Kohen dan Nyska, 2002).

Hasil dalam penelitian ini didukung dengan penelitian yang dilakukan oleh (Anand *et al.*, 2016) yaitu individu yang mengkonsumsi kuersetin 150 mg/ hari mampu menurunkan tekanan darah sistol serta mengurangi jumlah LDL yang teroksidasi dalam 6 minggu percobaan secara klinik. Berdasarkan penelitian (Gonzalez *et al.*, 2015) pemberian ekstrak kulit apel pada mencit dengan model sindrom metabolit menunjukkan bahwa kulit apel mampu menurunkan kadar kolesterol LDL. Berdasarkan penjelasan hasil penelitian ini, maka hipotesis yang menyatakan bahwa ekstrak etanol kulit apel mampu mencegah peningkatan kadar serum LDL pada tikus *Rattus Norvegicus* bunting yang dipapar oleh asap rokok dapat diterima. Lebih lanjut mengenai manfaat kulit apel dalam bentuk sediaan lain seperti jus, saus, dan pasta belum diketahui apakah memiliki efek yang sama seperti bentuk ekstrak, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut. Agar





hasil penelitian ini bisa diterapkan pada manusia, maka perlu dilakukan uji toksisitas dan uji teratogenik.

#### 6.4 Keterbatasan Penelitian

Selama proses penelitian dilakukan, terdapat 2 tikus yang mati disebabkan karena faktor-faktor diluar kendali peneliti







## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. Pemberian paparan ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) mampu mencegah peningkatan kadar serum LDL tikus bunting yang sudah dipapar asap rokok.
2. Dosis efektif ekstrak kulit apel (*Malus sylvestris Mill*) dalam mencegah peningkatan kadar serum LDL tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar bunting yang dipapar asap rokok adalah dosis ke-3 yaitu 28 mg/KgBB.

#### 7.2 Saran

Beberapa hal yang perlu untuk dilakukan sebagai tindak lanjut penelitian ini adalah:

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kadar serum LDL tikus bunting yang dipapar asap rokok dengan pemberian paparan kulit apel dalam sediaan yang berbeda seperti jus, saus atau pasta.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada ekstrak kulit apel dengan dosis yang lebih tinggi untuk mengetahui efek toksisitas dan teratogenik dalam mencegah peningkatan kadar LDL tikus model bunting yang dipapar asap rokok.



## DAFTAR PUSTAKA

Adam J. M. F. Dislipidemia, Ilmu penyakit dalam, Jilid III, edisi IV, Jakarta. 2006; p. 1926 – 1932.

Adrianto H. *Biosistematika Varietas pada Apel (Malus sylvestris L.) di Kota Batu Berdasarkan Morfologi*. Jurnal Teknologi Pertanian. 2011; Vol. 3, No. 2: 1-9.

Agustina T. *Analisis Daya Saing Apel Tropis di Kota Batu*. J-SEP. 2008; Vol 2, No.2: 23-31.

Akbar, B. *Tumbuhan dengan Kandungan Senyawa Aktif yang Berpotensi Sebagai Bahan Antifertilitas*. Jakarta: Adabia Press. 2010.

Almatsier S. *Mengenal Lebih Dekat: Coconut Oil*. Jakarta: Agromedia Pustaka, 2002; Cet 1, hal 22.

Amit D. Sonagra, Shylaja T.V, Asmabi Makandar, Zahoorunissa Deba. *Study of Lipid Profile among Healthy Smokers and Non Smokers*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry. 2017. ISSN 0973 2691 Volume 13. pp. 87-94.

Anand David, A. V., Arulmoli, R., & Parasuraman, S. *Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid*. Pharmacognosy Reviews. 2016. 10(20), 84–89. <http://doi.org/10.4103/0973 7847.194044>.

Ballinger SW, Boudier TG, Davis GS, Judice SA, Nicklas JA, Albertini *Mitochondrial genome damage associated with cigarette smoking*. Cancer Res. 1996; 56:5692–5697. [PubMed: 8971177].

Barasi ME. *At a Glance Ilmu Gizi*. Jakarta: Erlangga. 2007; hal 139-144.

Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. *High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis*. The unanswered questions, Atherosclerosis. 2003; 168(2):195–211. [PubMed: 12801602].



Bartels, Ä., & O'Donoghue, K. *Cholesterol in pregnancy: a review of knowns and unknowns*. *Obstetric Medicine*. 2011; 4(4), 147–151. <http://doi.org/10.1258/om.2011.110003>.

Barry, Patrick. 2011. Cloudy Apple Juice. Available from: <http://news.bbc.co.uk>. Diakses pada tanggal 25 Juli 2018. Pukul 06.23.

Bast, A. 1993. *Oxidative Stress and Calcium Homeostasis, in DNA and Free Radicals*, edited by B. Halliwell and O.I. Aruoma, Ellis Horwood. London. 1993. pp. 95–108.

Bastian. 2004. *Mempelajari Pengaruh Suhu Penyimpanan Terhadap Mutu Buah Apel Varietas Red Delicious (Malus sylvestris)*. Seminar Hasil Penelitian. Jurusan Teknologi Pertanian Universitas Hasanudin. Available from: <http://www.unhas.ac.id>. Diakses pada tanggal 25 Juli 2018 pukul 18.32.

Benowitz, N. L., Bernert, J. T., Caraballo, R. S., Holiday, D. B., & Wang, J. *Optimal serum cotinine levels for distinguishing cigarette smokers and nonsmokers within difft racial/ethnic groups in the United States between 1999 and 2004*. *American Journal of Epidemiology*. 2009; 169, 236–248.

Boyer, J & Liu, R. H. *Apple phytochemicals and their health benefits*. *Nutrition journal*. 2004.

Brizzi P, Tonolo G, Esposito F, Puddu L, Dessole S, Maioli M, Milia S. *Lipoprotein metabolism during normal pregnancy*. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181(2):430-4. [PubMed].

Burda, S.; Oleszek, W.; Lee, C. Y. *Phenolic compounds and their changes in apples during maturation and cold storage*. *J. Agric. Food Chem*. 1990; 38, 945-948.

Carjavall-Zarrabal O, Waliszewski SM, Barradas-Dermitz DM, Orta-flores Z, Hayward-Jones PM, Nolasco-Hipolito C, et al. *The Consumption of Hibiscus Sabdariffa Dried Calyx Ethanolic Extract Reduced Lipid Profile in Rats*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2005; 60: 153-159.

Cieślak-Pobuda, A., Yue, J., Lee, H.-C., Skonieczna, M., & Wei, Y.-H. *ROS and Oxidative Stress in Stem Cells*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017; 5047168. <http://doi.org/10.1155/2017/5047168>.

Conklin DJ, Barski OA, Lesgards JF, Juvan P, Rezen T, Rozman D, Prough RA, Vladykovskaya E, Liu S, Srivastava S, Bhatnagar A. *Acrolein consumption induces systemic dyslipidemia and lipoprotein modification*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 243:1–12.

Depkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Indonesia. RISKESDAS



Desai P, Rathod SP, Garge V. *Evaluation of pro-oxidants and antioxidants in pre eclampsia*. Journal of Obstetrics & Gynaecology of India. 2003; 53 (5)445-448.

Driscoll DM & Getz GS. *Molecular and cell biology of lipoprotein biosynthesis*. *Methods Enzymol*. 1986; 128:41–70. [PubMed: 3523142].

Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y.; Liu, R. H. *Antioxidant activity of fresh apples*. *Nature*. 2000; 405, 903-904.

Eriksen MM & Ross H. *The Tobacco Atlas, Fourth Edition*. Atlanta: the American Cancer Society. 2012.

European Commission. *Are mice relevant models for human disease?*. London, UK. 2010; hal. 1-2.

Goette, A., Lendeckel, U., Kuchenbecker, A., Bukowska, A., Peters, B., Klein, U.H., Huth, C. and Rocken, C. *Cigarette smoking induced atrial fibrosis in human via nicotine*. *Heart*. 2007; 93: 1056-1063.

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, Schneider WJ. *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system*. *Annu Rev Cell Biol*. 1985; 1:1–39. [PubMed: 2881559].

Goldstein JL, Brown MS. *The LDL receptor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29:431–8. [PubMed: 19299327].

Gonzalez, Jaime et al. "Apple Peel Supplemented Diet Reduces Parameters of Metabolic Syndrome and Atherogenic Progression in ApoE-/- Mice" *Evidence-based complementary and alternative medicine eCAM* vol. 2015 (2015): 918384.

Gupta S et al. *The role of oxidative stress in spontaneous abortion recurrent pregnancy loss*. A systemic review obstetrical and gynecological survey. 2007; 62 (5): 335-346.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press. Chap: what roles are played by ROS/RNS in atherosclerosis. 1994; hal 626-638.

Ikizler M, Erkasap N, Dernek S, Kural T, Kaygisiz Z. *Protects Rat Hearts during Reperfusion: Enhanced Antioxidants Capacity with Chronic Treatment*. *Anatolian Journal of Cardiology*. 2007; 7: 404-10.

Iswari, Retno Sri. *Perbaikan fraksi lipid serum tikus putih hiperkolesterolemi setelah pemberian jus dari berbagai olahan tomat*. 2009. Semarang: Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Semarang.

Kemenkes Ri. *Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS*. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI. 2013.

Kohen, R. and Nyska A. *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reaction and methods for their quantitation*. *Toxicologic Pathology*. 2002; 30: 620–50.



- Kosasih, E.N., Tony S. dan Hendro H. *Peran Antioksidan pada Lanjut Usia*. Pusat Kajian Nasional Masalah Lanjut Usia. Jakarta. 2006.
- Krinke, G.J. *The Laboratory Cat*. San Diego, CA: Academic Press. 2000; 150-152.
- Kumalaningsih, Sri. *Antioksidan Alami: Penangkal Radikal Bebas, Sumber, Manfaat, Cara Penyediaan dan Pengolahan*, Trubus Agrisarana, Surabaya. 2000.
- Kusuma, Jaya. *Peranan Peroksidasi Lipid Pada Patogenesis Preeklamsia*. Obstetri Dan Ginekologi. Fk Unud/Rsup Sanglah Denpasar. 2010.
- Laurence, D.R., and A.L., Bacharach. 1964. Evaluation of Drug activities: pharmacometrics, 1<sup>th</sup> ed. Academic Press. London
- Liu Z, Jia L, Sun L, Miller SS, Ames BN, Cotman CW, Liu J. *Acrolein, a toxicant in cigarette smoke, causes oxidative damage and mitochondrial dysfunction in RPE cells: protection by (R)-alpha-lipoic acid*. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007; 48:339–348. [PubMed: 17197552].
- Liu R H., & He X. *Triterpenoids Isolated from Apple Peels Have Potent Antiproliferative Activity and May Be Partially Responsible for Apple's Anticancer Activity*. 2007; J. Agric Food Chem. 55, 4366-4370.
- Lister, C. E.; Lancaster, J. E.; Sutton, K. H. *Developmental changes in the concentration and composition of flavonoids in skin of a red and a green apple cultivar*. J.Sci.Food Agric. 1994; 64, 155-161.
- Mendelson JH, Sholar MB, Mutschler NH, Jaszyna-Gasior M, Goletiani NV, Siegel AJ, Mello NK. *Effects of intravenous cocaine and cigarette smoking on luteinizing hormone, testosterone, and prolactin in men*. J Pharmacol. 2003; 307:339–348. [PubMed: 12893845].
- Merchant AT, Anand S, Kelemen L, Vlad Vuksan. *Carbohydrate Intake and HDL in A Multiethnic Population*. Am J Clin Nutr: 2008; 85:225-30.
- Malole, M.B.M., Pramono C.S.U. *Penggunaan Hewan-hewan Percobaan di Laboratorium*. Bogor : PAU Pangan dan Gizi, IPB. 1989.
- Ngelsson E, Schaefer EJ, Contois JH, McNamara JR, Sullivan L, Keyes MJ, Pencina MJ, Schoonmaker C, Wilson PW, D'Agostino RB, Vasan RS. *Clinical utility of different lipid measures for prediction of coronary heart disease in men and women*. JAMA. 2007; 298:776-785.
- Niki, E. Do free radicals play causal role in atherosclerosis? Low density lipoprotein oxidation and vitamin E revisited. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 2011; 48(1), 3–7. <http://doi.org/10.3164/jcnn.11007FR>.
- Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. and Zhivotovsky B. *Mitochondria, oxidative stress and cell death*. Apoptosis. 2007; 2(5): 913–922.



Pallav Sengupta. *The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's*. Mahsa University College. 2010.

Pappas, R.S. Toxic Elements in Tobacco and in Cigarette Smoke: Inflammation and Sensitization. HHS Public Access. 2011; 3(11): 11811198.

Pasupathi, P., Chinnaswamy, P. and Bakthavathsalam, G. *Effect Of Cigarette Smoking On Lipid Peroxidation And Protective Role Of Antioxidants: A Review*. Journal Of Cell And Tissue Research Vol. 2009. 9(1) 1717-1726 (2009) issn: 0974 0910 (available online at [www.tcrjournals.com](http://www.tcrjournals.com)).

Pearson, D.A., Tan, C.H., German, B., Davis, P.A., and Gershwin, E.M. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci*. 1999; 64, 1913-1920.

Pérez-Matute P, Zulet MÁ, Martínez JA. *Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health*. *Curr Opin Pharmacol*. 2009; 9:771-779.

Preedy v.r. *Aging: Oxidatives Stress And Dietary Antioxidants*. 7th Ed., Academic Press/Elsevier, San Diego. 2004; CA 225-227.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. *Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids*. *Fitoterapia*. 2011; 82(4):513-23. [PubMed].

Pudjiadi, Anna. *Dasar-Dasar Biokimia*. Jakarta: UI-Press. 1994.

Qiu, C *et al*. *Oxidized Low-Density Lipoprotein (Oxidized LDL) and the risk of Preeclampsia*. USA: Swedish Medical Center (Center for Perinatal Studies). 2005.

Rajalakshmi, D dan S. Narasimhan. *Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation*. Dalam D.L. Madhavi, *Food Antioxidant, Technological, Toxilogical and Health Perspectives*. Marcel Dekker Inc., Hongkong. 1985.

Robert K. Murray, Daryl K. Granner & Victor W. Rodwell. *Bokimia Harper*. Alih bahasa, Brahma U. Pendif; editor bahasa indonesia, Nanda Wulandari. (Ed.27). Jakarta: EGC. 2009

Rupasinghe HPV, Priya K, Gwendolyn MH. *Ultrasonicatio Assisted Solvent Extraction of Quercetin Glycoside from Isolated Apple Peels*. *Moleculs*. 2011; Vol. 16: 9788-9791.

Rufaridah, A. *The Effect of Passive Smokers to The Placenta, Birth Weight, Apgar Score at The Regency of Padang Pariaman on 2011*. Study Program of Biomedical Science Graduate of Andalas University. Thesis. 2012.

Sargowo Djanggan. *Patogenesis Aterosklerosis*. UB Press: Malang. 2012.



Scheibmeir Heath D, et al. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive and Critical Care Nursing*, 2005; (21): 24-28.

Sebrie, E.M & Glantz, SA. "Accommodating" smoke-free policies: Tobacco industry's Courtesy of Choice programme in Latin America. *Tobacco Control*. 2007; 16.

Sies H. *Biochemis try of oxidative stress*. *Angewandte Chemie*. 1986; 25: 1058 1071.

Smith, J.B. dan S. Mangkoewidjojo. *Pemeliharaan, Pembiakan dan Penggunaan Hewan Percobaan Di Daerah Tropis*. UI Press. Jakarta. 1988; hlm. 3757.

Sukma. *Pengaruh Pemberian Seduhan Kelopak Kering Rosela Ungu (Hibiscus Sabdariffa) Terhadap Kadar Kolesterol LDL Serum Tikus Hiperkolesterolemia*. Artikel Penelitian. Diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. 2011.

Sultana B, Anwar F. *Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants*. *Food Chem*. 2008; 108(3):879-84. [PubMed].

Suparmi, Khusnul K., Amal F. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kulit Buah Apel (*Pylus malus*, L) terhadap Penurunan Permeabilitas Vaskuler pada Mencit Putih Jantan Strain Balb/C. Eksakta: *Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA*, 2014,14.

Takashi. Miyake and Takayuki Shibamoto. *Antioxidant Activities of Natural Compound Found in Plants*. *J. Agric Food Chem*. 1997; 45. 1819 1822.

Titisari BR. *Pengaruh Ibu Hamil Sebagai Perokok Pasif Dengan Bayi Berat Badan Lahir Rendah Di Surakarta*. Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret Surakarta. Skripsi. 1997.

*The Tobacco Atlas. The Tobacco Atlas Indonesia Country*. 2018. Tersedia dalam <https://tobaccoatlas.org/country/indonesia/> [ diakses pada 28 april 2018]

Twisk J, Gillian-Daniel DL, Tebon A, Wang L, Barrett PH, Attie AD. *The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion*. *The Journal of clinical investigation*. 2000; 105(4):521– 532. [PubMed: 10683382].

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39(1):44-84. [PubMed].

Varsha shete., et al. *Low-Density Lipoprotein Receptor Contributes to  $\beta$  Carotene Uptake in the Maternal Liver*. Usa: Department of Food Science and Rutgers Center for Lipid Research and New Jersey Institute



of Food Nutrition and Health, Rutgers University, New Brunswick, NJ.  
2016; 08901.

Vinson, J. A.; Su, X.; Zubik, L.; Bose, P. *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits*. J.Agric.Food Chem. 2002; 49, 5315-5321.

Waji RA dan Sugrains A. *Flavonoid(Quercetin)*. Universitas Hasanuddin. 2009.  
Availabel online at [www.strukturkimiaquercetin.com](http://www.strukturkimiaquercetin.com), diakses pada 18 Juli 2018, pukul 08.57.

Warintek. 2010. Apel. <http://www.warintek2010.com>, diakses 18 Juli 2018 pukul 08.42.

Wolfe, K.; Wu, X. Z.; Liu, R. H. *Antioxidant activity of apple peels*. J. Agric. Food Chem. 2003; 51, 609-614.18.

Winarsi, H. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas*. Yogyakarta: KANISIUS. 2007.

World Health Organization. WHO: Tobacco Facts. <[http://www.who.int/tobacco/mpower/tobacco\\_facts/en/](http://www.who.int/tobacco/mpower/tobacco_facts/en/)> [accessed 19 Jul 2018].

Yulianti S. *Khasiat dan Manfaat Apel*. Jakarta. AgroMedia Pustaka. 2007; hal. 24-31.

Yuslianti, Eus Reni. *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish. 2018.

Yuningtyaswari. *Pengaruh asap berbagai jenis rokok terhadap peroksidasi lipid plasma tikus putih (Rattus norvegicus, L)*. Tesis. Fakultas Kedokteran. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 2001.

Yudi, Parakkasi A. *Pengaruh Level Protein Vitamin A & Vitamin E terhadap Pertambahan Bobot Badan dan Beberapa Fungsi Reproduksi Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Departemen Klinik Reproduksi & Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan IPB. 2005; Vol. 28 no.2.

Zevin S, Jacob P, Benowitz NL. *Dose-related cardiovascular and endocrine effects of transdermal nicotine*. Clin Pharmacol Ther. 1998; 64:8795. [PubMed: 9695723].





Lampiran 1.

**SURAT KETERANGAN LAIK ETIK**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia  
 Telp. (62) (0341) 551631 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755  
 http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK**  
**("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 235 / EC / KEPK – S1– KB / 10 / 2018

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,  
 SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,  
 DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*) dalam Mencegah Peningkatan Jumlah Leukosit, Kadar Serum LDL (*Low Density Lipoprotein*), Kadar *Malondialdehyde* (MDA) Plasenta, Mencegah Penurunan Berat Plasenta, Hemoglobin (Hb), Aktivitas SOD (*Superoksida Dismute*) Plasenta, dan terhadap Berat Badan Bayi Baru Lahir (BBL) Tikus (*Rattus norvegicus*) Bunting akibat Paparan Asap Rokok.

**PENELITI** : 1. Ziana Zain Nurfadhilah 5. Retno Rahma Dila  
 2. Nadya Mufty Ramadhani 6. Nova Dewi Kusuma Hapsari  
 3. Fathan Hayati 7. Meiristya Abir Putri Kharima  
 4. Khalisa Erwanto

**UNIT / LEMBAGA** : S1 Kebidanan – Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**

Prof. Dr. dr. Moch Istiadjud ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(HK)  
 NIK. 160746683

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan  
 Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Soft Copy.  
 Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).





Lampiran 2.

**ANALISIS DATA**

1. Uji Normalitas

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
LDL	,118	25	,200*	,963	25	,479

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

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas Data

**Test of Homogeneity of Variances**

LDL

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,571	4	20	,221

3. Uji One Way ANOVA

**Descriptives**

LDL

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
K Neg	5	10,7800	1,87136	,83690	8,4564	13,1036	7,60	12,20
K Pos	5	20,4200	7,33362	3,27970	11,3141	29,5259	13,00	31,80
1.4	5	14,1000	2,71293	1,21326	10,7315	17,4685	11,10	16,70
2.8	5	13,3400	2,25898	1,01025	10,5351	16,1449	9,80	15,30
5.6	5	10,7200	1,09407	,48929	9,3615	12,0785	9,00	11,70
Total	25	13,8720	4,98878	,99776	11,8127	15,9313	7,60	31,80

**ANOVA**

LDL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	313,534	4	78,384	5,524	,004
Within Groups	283,776	20	14,189		
Total	597,310	24			



4. Uji Perbandingan Berganda Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: LDL  
Tukey HSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K Neg	K Pos	-9,6400*	2,38233	,005	-16,7688	-2,5112
	1.4	-3,3200	2,38233	,639	-10,4488	3,8088
	2.8	-2,5600	2,38233	,817	-9,6888	4,5688
K Pos	5.6	,0600	2,38233	1,000	-7,0688	7,1888
	K Neg	9,6400*	2,38233	,005	2,5112	16,7688
	1.4	6,3200	2,38233	,098	-,8088	13,4488
1.4	2.8	7,0800	2,38233	,052	-,0488	14,2088
	5.6	9,7000*	2,38233	,005	2,5712	16,8288
	K Neg	3,3200	2,38233	,639	-3,8088	10,4488
2.8	K Pos	-6,3200	2,38233	,098	-13,4488	,8088
	5.6	,7600	2,38233	,998	-6,3688	7,8888
	K Neg	3,3800	2,38233	,623	-3,7488	10,5088
5.6	K Pos	2,5600	2,38233	,817	-4,5688	9,6888
	1.4	-7,0800	2,38233	,052	-14,2088	,0488
	2.8	2,6200	2,38233	,805	-4,5088	9,7488
K Neg	K Pos	-9,7000*	2,38233	,005	-16,8288	-2,5712
	1.4	-3,3800	2,38233	,623	-10,5088	3,7488
	2.8	-2,6200	2,38233	,805	-9,7488	4,5088

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

5. Homogeneous Subsets

LDL

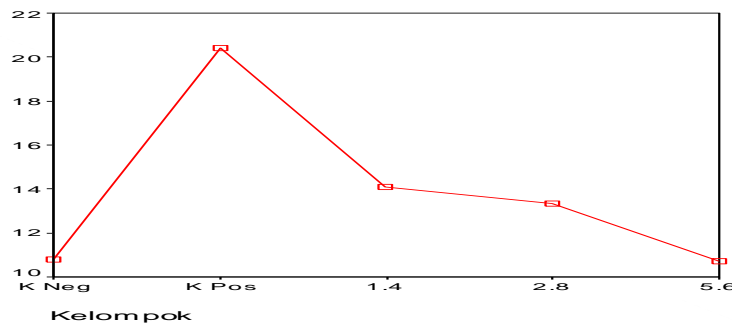
Tukey HSD<sup>a</sup>

Kelompok	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
5.6	5	10,7200	
K Neg	5	10,7800	
2.8	5	13,3400	13,3400
1.4	5	14,1000	14,1000
K Pos	5		20,4200
Sig.		,623	,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 5,000.

6. Means Plots





## 7. Correlations

### Correlations

		Konsentrasi	LDL
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	-,623**
	Sig. (2-tailed)	,	,003
	N	20	20
LDL	Pearson Correlation	-,623**	1
	Sig. (2-tailed)	,003	,
	N	20	20

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

## 8. Regression

### Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,623 <sup>a</sup>	,388	,354	4,21901

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

### ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	203,149	1	203,149	11,413	,003 <sup>a</sup>
	Residual	320,400	18	17,800		
	Total	523,549	19			

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

b. Dependent Variable: LDL

### Coefficients<sup>c</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	18,416	1,462		12,601	,000
	Konsentrasi	-1,539	,456	-,623	-3,378	,003

a. Dependent Variable: LDL



## Lampiran 3.

## DOKUMENTASI PENELITIAN



Gambar 1. Ekstrak Etanol Kulit Apel



Gambar 2. Sonde Lambung



Gambar 3. Kandang dan Air Minum Tikus



Gambar 4. Timbangan BB Tikus



Gambar 5. Sample Darah Tikus



Gambar 6. Smoking Pump



Gambar 7. Alat Ekstrak