

**PENGARUH TERAPI REBUSAN AKAR GANTUNG
POHON BERINGIN (*Ficus benjamina L.*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN
PROFIL PITA PROTEIN SERUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) HASIL
PAPARAN ASAP
ROKOK**

SKRIPSI

Oleh :
RIMA MALYSA HARDI
105130101111030



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**PENGARUH TERAPI REBUSAN AKAR GANTUNG
POHON BERINGIN (*Ficus benjamina L.*) TERHADAP
KADAR MALONDIALDEHIDA (MDA) DAN
PROFIL PITA PROTEIN SERUM TIKUS
(*Rattus norvegicus*) HASIL
PAPARAN ASAP
ROKOK**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana
Kedokteran Hewan

Oleh :
RIMA MALYSA HARDI
105130101111030



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
PROGRAM KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin
(*Ficus benjamina L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida
(MDA) dan Profil Pita Protein Serum Tikus
(*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan
Asap Rokok**

Oleh :
RIMA MALYSA HARDI
105130101111030

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 15 Agustus 2014
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si.
NIP. 19650616 199111 1 001

Pembimbing II

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 1898802 2 001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran Hewan
Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES
NIP. 19600903 1898802 2 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : RIMA MALYSA HARDI

NIM : 105130101111030

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) dan Profil Pita Protein Serum Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 15 Agustus 2014

Yang menyatakan,

RIMA MALYSA HARDI

NIM. 105130101111030

**Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin
(*Ficus benjamina L.*) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA)
dan Profil Pita Protein Serum Tikus (*Rattus norvegicus*)
Hasil Paparan Asap Rokok**

ABSTRAK

Asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas yang dapat merusak sel, baik ekstraseluler maupun intraseluler. Radikal bebas yang bereaksi dengan lipid dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang menghasilkan produk akhir berupa malondialdehida. Kerusakan sel dapat ditandai dengan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) dan perubahan profil pita protein. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penurunan kadar MDA dan perubahan profil pita protein dalam serum setelah diterapi menggunakan rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*). Kadar malondialdehida ditentukan dengan uji TBA (*Thiobarbituric acid*), profil pita protein diamati menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*). Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan berumur 3 bulan yang dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok 1 yaitu kelompok tikus sehat (kontrol negatif), kelompok 2 yaitu kelompok kontrol positif yang dipaparkan asap rokok 2 batang per kelompok setiap hari selama 2 minggu, kelompok 3, 4, 5 adalah tikus yang dipapar asap rokok dan diberi terapi 10 mg/200 g BB, 15 mg/200 g BB dan 20mg/200 g BB. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terapi menggunakan rebusan akar gantung pohon beringin berpengaruh signifikan terhadap kadar MDA ($p < 0,05$), semakin tinggi dosis maka semakin tinggi penurunan kadar MDA. Paparan asap rokok menyebabkan adanya sintesis protein dengan berat molekul 151,4 kDa (diduga ORP-150) dan pada tikus terapi dengan dosis 20 mg/ 200 g BB tidak terjadi sintesis protein dengan berat molekul 151,4 kDa.

Kata kunci : asap rokok, akar gantung beringin, MDA, profil pita protein.

**Therapeutic Effect of Hanging Roots Banyan Tree (*Ficus benjamina L.*)
Against Malondialdehida levels (MDA) and protein bands Profile
Serum Rat (*Rattus norvegicus*) Exposure Results
Cigarette smoke**

ABSTRACT

Cigarette smoke is one source of free radicals that could damage cells both extracellular and intracellular elements. Free radicals react with lipids can cause lipid peroxidation which produces the end product is malondialdehida. Cell damage was able to be characterized by elevated levels of malondialdehyde (MDA) and alteration of protein profile. This research intended to find out the level of MDA and alteration of protein profile serum after therapy with water decoction hanging roots banyan tree. Malondialdehyde levels are tested through TBA (Thiobarbituric acid) and protein profile with SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis). The rats (*Rattus norvegicus*) that used in this research we divide on 5 groups. Group 1 was the healthy rats (negative control), group 2 was the positive control group which was exposure to cigarette smoke. Group 3 was exposure to cigarette smoke and got 10 mg/200 g BW of therapy. Group 4 exposure to cigarette smoke and got 15 mg/200 g BW of therapy. Group 5 were exposure to cigarette smoke and got 20 mg/200 g BW of therapy. The result showed that the water decoction hanging roots banyan tree significantly ($p < 0,05$) influenced the levels of MDA. Cigarette smoke induced synthesis protein 151,4 kDa of molecular weight that assumed as ORP-150 and dose therapy 20 mg/200 g BW inhibit synthesis protein of 151,4 kDa molecular weight.

Keywords : cigarette smoke, hanging roots banyan tree, MDA, protein profile.

KATA PENGANTAR

Puji Syukur kepada Allah S.W.T. yang telah memberikan berjuta energi positif sehingga penulis mampu menyelesaikan Tugas Sarjana ini dengan baik.

Tugas sarjana ini merupakan persyaratan terakhir bagi mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Universitas Brawijaya Malang untuk dapat meraih gelar sarjana strata satu. Penelitian ini adalah bagian dari penelitian tentang **“Pengaruh Terapi Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina L.*) terhadap Tikus (*Rattus norvegicus*) Hasil Paparan Asap Rokok”**. Penelitian ini diketuai oleh Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. Agung Pramana Warih Marhendra, M.Si sebagai Pembimbing I atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
2. Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES sebagai Pembimbing II atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
3. Dyah Kinasih Wuragil, S.Si., MP., M.Sc dan drh. Analis Wisnu Wardhana, M.Biomed atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, dan arahan yang diberikan tiada hentinya kepada penulis.
4. DIKTI yang telah memberikan bantuan dana penelitian melalui Program Kreativitas Mahasiswa- Penelitian (PKM-P) 2013.
5. Tari Cahyani , Azizah N.Aurizza, Andita A.Aryoko, Yohanna M.Karo selaku teman seperjuangan dalam menyelesaikan penelitian ini.
6. Pak Har, Mbak Ozi, Mbak Vivi, Mas Hilman, Mbak Anita dan seluruh Asisten Laboratorium Taksonomi, Laboratorium Fisiologi Reproduksi, Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya atas segala bantuan yang telah diberikan kepada penulis.
7. Alm Bapak Dukut Suhardi, Ibu Wiwik, Mbak Betik, Mas Heru, Om, Mbak Nanik, Ocha serta keluarga besar yang begitu ikhlas menyayangi serta begitu sabar menanti, mendorong, membantu penulis selama belajar di Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang

8. Mas Hanafi dan keluarga Madiun yang selalu memberi semangat dan doa kepada penulis selama penulisan ini.
9. Mbak Ayu, Biki, Amel, Wiwik, Winda, Likha, Ayun, Yuyun dan semua teman-teman kos kertosariro 68 atas dukungan dan motivasi sehingga penulis mampu menyelesaikan tulisan ini.
10. Bea, Anin, Tyas, Vinda, Anne dan seluruh sahabat VET-B 2010 Team , sahabat serta dosen Mikro-Imuno Vet Laboratorium.
11. Uak, Fatih, Widi, Anggis, Fahmi, Tulit serta sahabat lain yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas segala perhatian, dorongan, penghargaan, ajaran, dukungan dan doa yang telah diberikan.

Tugas sarjana ini masih jauh dari sempurna, saran – saran demi kebaikan dan pengembangan isi tugas sarjana ini akan diterima dengan senang hati.

Malang, Agustus 2014

Penulis

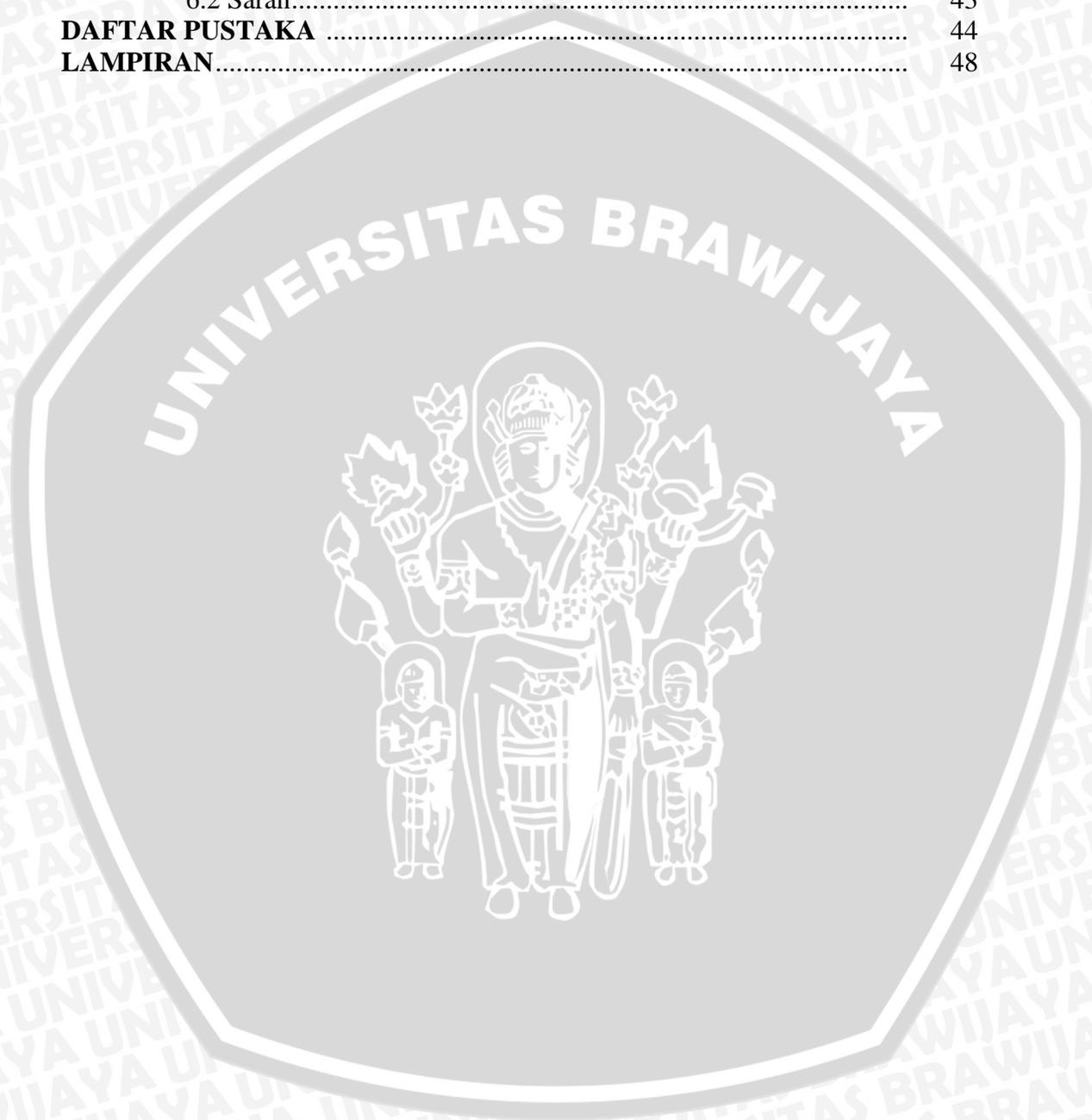


DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACK	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	xiii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan dan Batasan Masalah	3
1.3 Tujuan	4
1.4 Manfaat	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Paparan Asap Rokok	6
2.2 Radikal Bebas	7
2.3 Peroksidasi Lipid	9
2.4 Malondialdehid	11
2.5 Profil Pita Protein	12
2.6 Serum	14
2.7 Antioksidan	15
2.8 Pohon Beringin	16
2.9 Tikus Putih Jantan	18
BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	20
3.1 Kerangka Konsep	20
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN	24
4.1 Tempat dan Waktu Penelitian	24
4.2 Sampel Penelitian	24
4.3 Rancangan Penelitian	25
4.4 Variabel Penelitian	26
4.5 Alat dan Bahan Penelitian	26
4.6 Tahapan Penelitian	27
4.7 Prosedur Kerja	28
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
5.1 Pengaruh Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin terhadap Kadar MDA	36

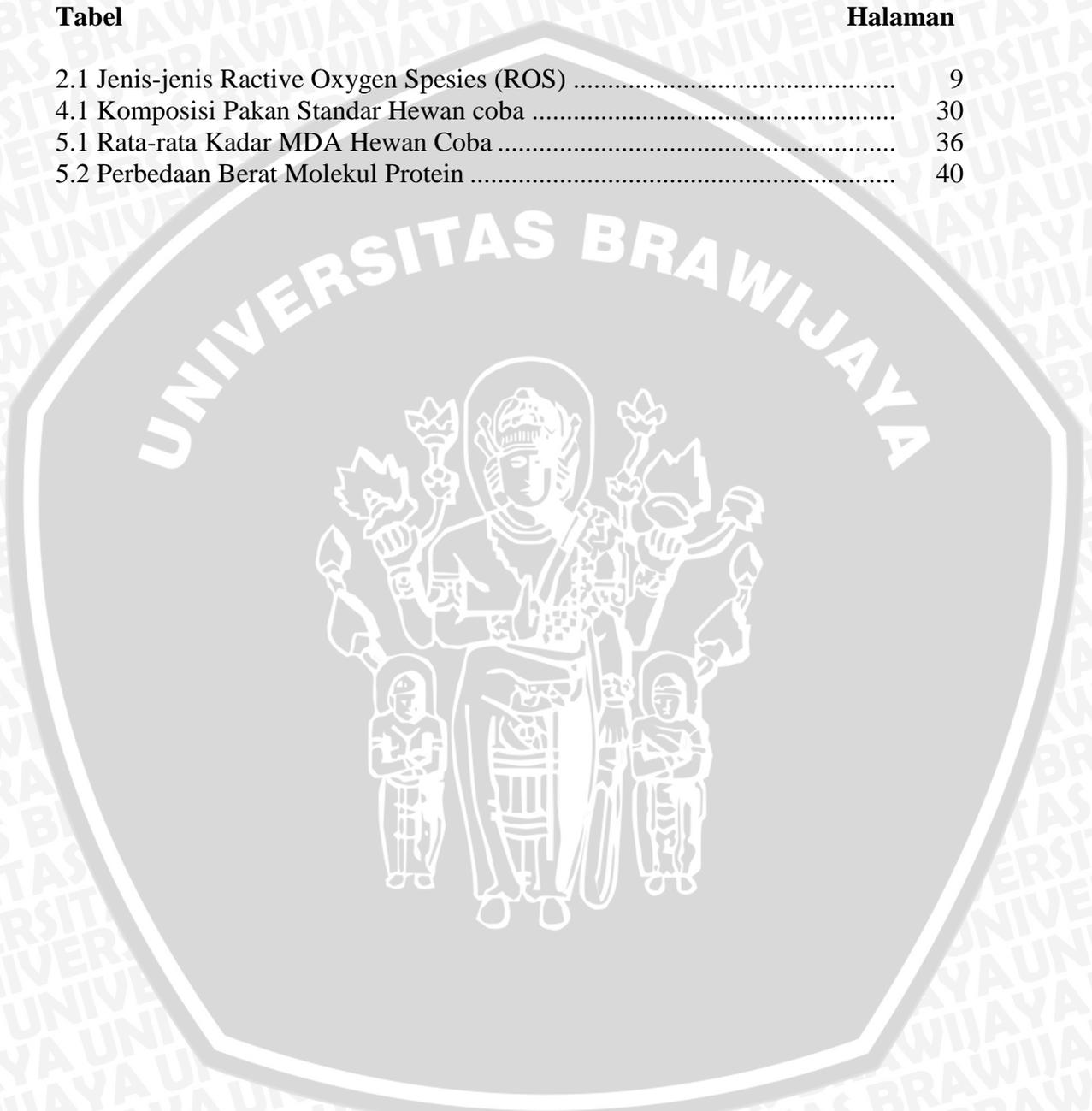


5.2 Pengaruh Rebusan Akar Gantung terhadap Gambaran Profil Pita Protein	39
BAB VI. KESIMPULAN	43
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	48



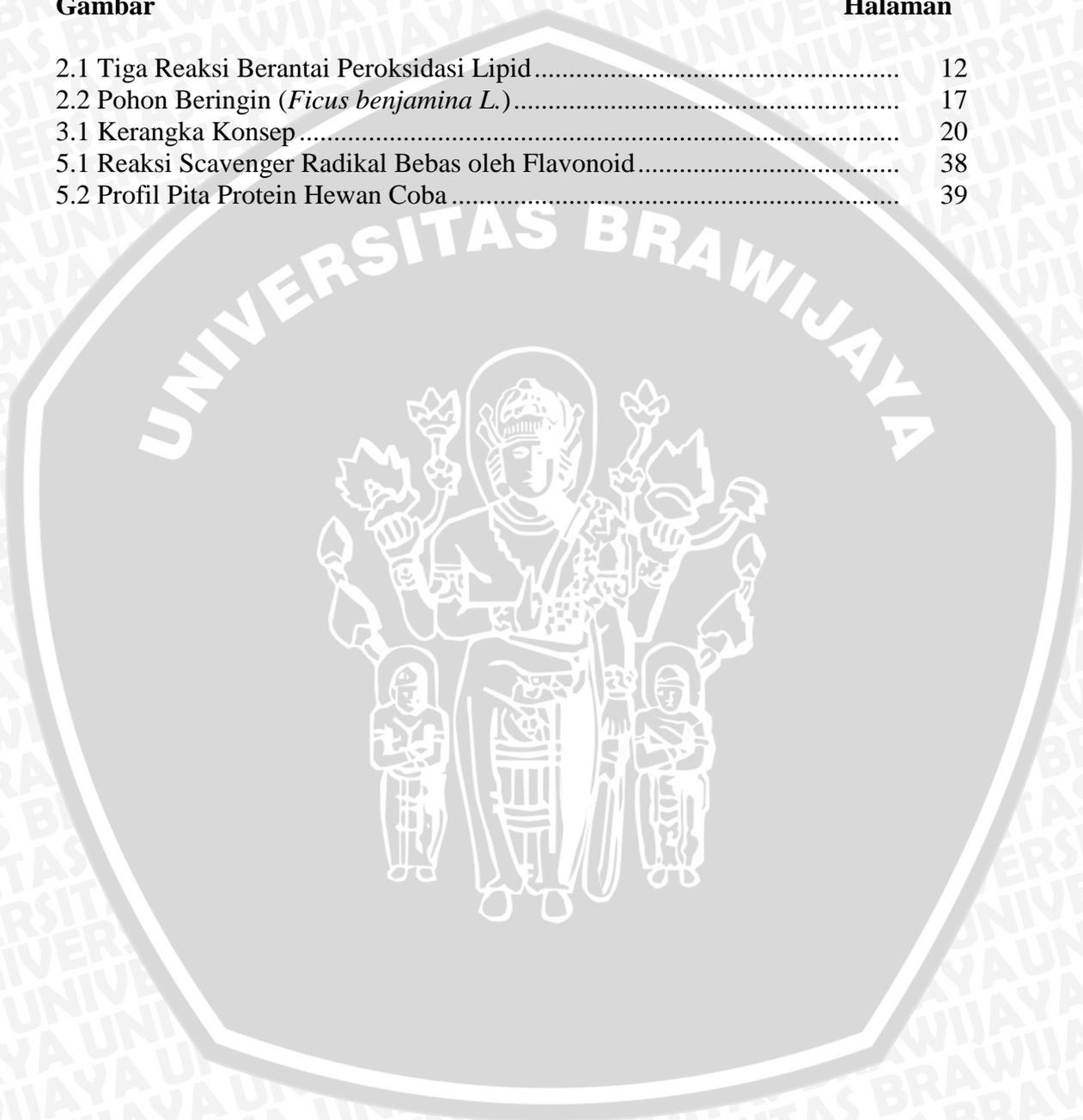
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Jenis-jenis Ractive Oxygen Spesies (ROS)	9
4.1 Komposisi Pakan Standar Hewan coba	30
5.1 Rata-rata Kadar MDA Hewan Coba	36
5.2 Perbedaan Berat Molekul Protein	40



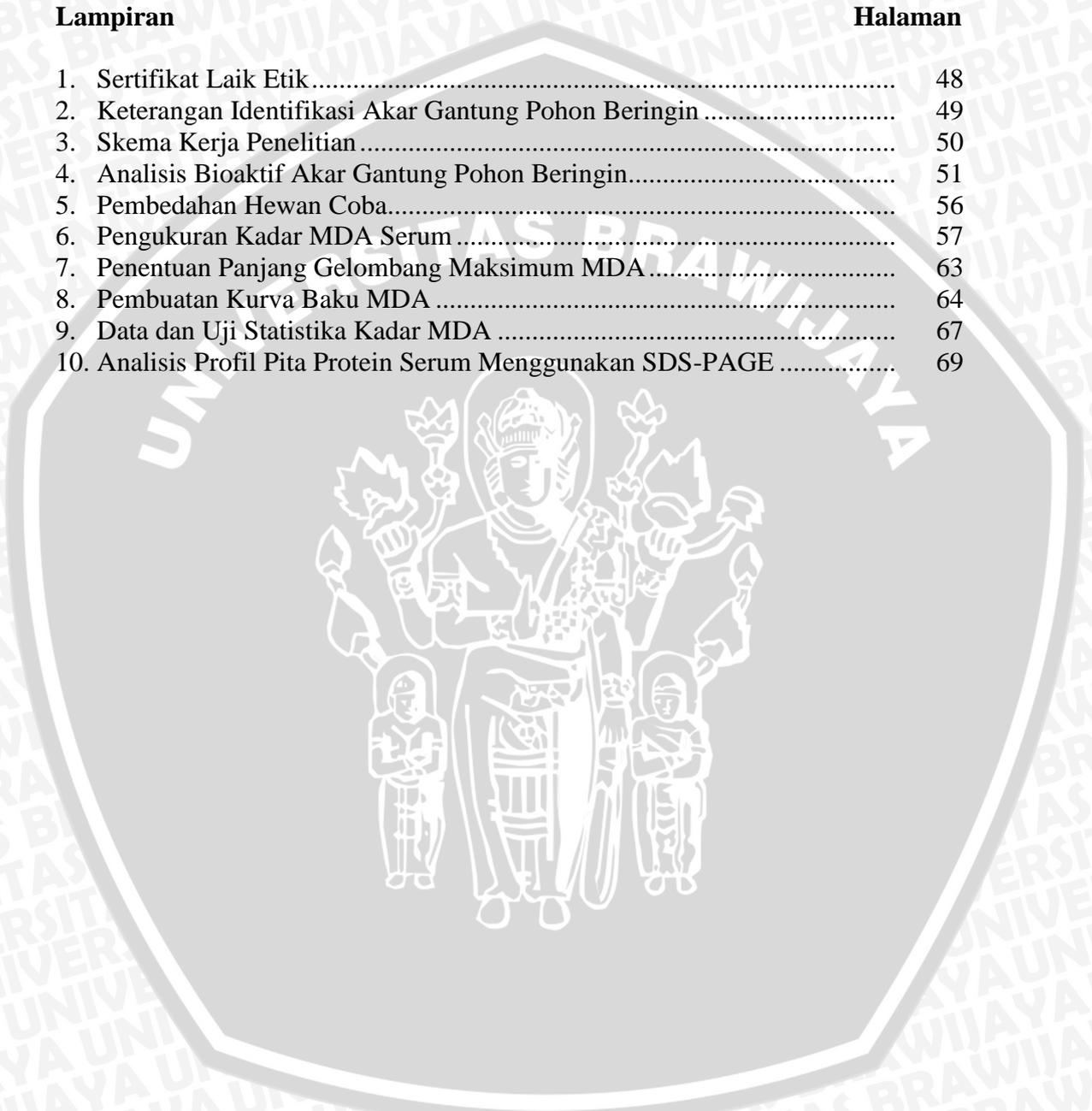
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tiga Reaksi Berantai Peroksidasi Lipid.....	12
2.2 Pohon Beringin (<i>Ficus benjamina L.</i>).....	17
3.1 Kerangka Konsep.....	20
5.1 Reaksi Scavenger Radikal Bebas oleh Flavonoid.....	38
5.2 Profil Pita Protein Hewan Coba.....	39



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	48
2. Keterangan Identifikasi Akar Gantung Pohon Beringin.....	49
3. Skema Kerja Penelitian.....	50
4. Analisis Bioaktif Akar Gantung Pohon Beringin.....	51
5. Pembedahan Hewan Coba.....	56
6. Pengukuran Kadar MDA Serum.....	57
7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA.....	63
8. Pembuatan Kurva Baku MDA.....	64
9. Data dan Uji Statistika Kadar MDA.....	67
10. Analisis Profil Pita Protein Serum Menggunakan SDS-PAGE.....	69



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

WHO	:	<i>World Health Organization</i>
DNA	:	<i>deoxyribose-nucleic acid</i>
MDA	:	<i>Malondialdehida</i>
SOD	:	<i>Superoksida dismutase</i>
GSH Px	:	<i>glutation peroksidase</i>
KLT	:	<i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
IR	:	<i>Infra Red</i>
SDS-PAGE	:	<i>Sodium Dodecyl Sulphat- Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i>
ETS	:	<i>Environmental Tobacco Smoke</i>
NO	:	<i>Nitric Oxide</i>
ROS	:	<i>Reactive Oxygen Species</i>
PUFA	:	<i>Poly Unsaturated Fatty Acid</i>
TBARS	:	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substance</i>
BHA	:	<i>Butil Hidroksi Anisol</i>
BHT	:	<i>Butil Hidroksi Toluen</i>
BM	:	<i>Berat Molekul</i>
g	:	<i>gram</i>
mg	:	<i>miligram</i>
BB	:	<i>Berat Badan</i>
kDa	:	<i>kilo Dalton</i>
ORP-150	:	<i>Oxygen-regulated protein 150</i>
Rf	:	<i>Retardation factor</i>
LGB	:	<i>Lower Gel Buffer</i>
UGB	:	<i>Upper Gel Buffer</i>
RSB	:	<i>Reducing Sampel Buffer</i>
ANOVA	:	<i>analysis of variance</i>

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Jumlah perokok di Indonesia dari tahun ketahun terus mengalami peningkatan. Menurut data WHO pada tahun 2008, Indonesia menempati urutan ketiga dengan jumlah perokok terbanyak di dunia setelah negara China dan India. Pada tahun 1995 jumlah perokok di Indonesia adalah 26,9 %, kemudian mengalami peningkatan pada tahun 2001 menjadi 31,5 %. Pada tahun 2007 mencapai 34,2 %. Peningkatan terus terjadi hingga pada tahun 2010 mencapai 34,7 % (Badan Penelitian Pengembangan Kesehatan, 2010).

Merokok dapat menyebabkan terjadinya masalah kesehatan baik untuk perokok aktif maupun perokok pasif. Paparan asap rokok yang terus menerus dapat meningkatkan resiko terkena penyakit paru-paru dan penyakit jantung sebesar 20-30 %. Asap rokok mengandung bahan kimia seperti nikotin, benzopyren dan karbon monoksida yang bersifat toksik, serta dalam asap rokok juga terkandung NO yang dapat menjadi radikal bebas jika teroksidasi. Radikal bebas yakni atom atau senyawa yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak bermuatan sehingga sangat reaktif (Andayani dkk., 2008). Radikal bebas dapat bereaksi dengan penyusun sel, baik ekstraseluler maupun intraseluler seperti protein, lipid dan DNA, sehingga dapat mengakibatkan kerusakan pada sel (Traber dkk., 2000). Radikal bebas yang bereaksi dengan lipid dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid yang menghasilkan produk-produk aldehid seperti malondialdehida (MDA). Malondialdehida mengindikasikan

adanya radikal bebas dalam tubuh, semakin tinggi kadar MDA dalam tubuh maka semakin tinggi pula radikal bebas dalam tubuh. Radikal bebas yang berikatan dengan protein dapat menyebabkan kerusakan protein karena menyebabkan terjadinya fragmentasi sehingga mempercepat proses proteolisis serta menyebabkan munculnya protein penanda inflamasi (Gitawati, 1995).

Peningkatan kadar MDA dalam tubuh dapat dikurangi dengan pemberian antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat mencegah dan menghambat terjadinya oksidasi pada bahan atau substrat yang dapat teroksidasi. Antioksidan dapat diperoleh dari luar tubuh atau disebut juga antioksidan eksogen. Sumber antioksidan eksogen berasal dari tanaman, salah satunya adalah berasal dari pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) yang banyak digunakan sebagai tanaman peneduh. Pohon beringin belum optimal dimanfaatkan sebagai sumber bioaktif yang potensial untuk obat herbal. Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) diketahui mengandung senyawa fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan (Hutapea, 1994). Sampai saat ini akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) belum banyak dimanfaatkan dan diteliti peran bioaktifnya (Kochar dan Rossell, 1990).

Berdasarkan uraian di atas, maka pada penelitian ini mempelajari efektifitas pada air rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) untuk menurunkan kadar MDA dan untuk melihat perubahan profil pita protein dari serum darah pada hewan coba yang terpapar asap rokok.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah pada skripsi ini antara lain:

1. Apakah terdapat penurunan kadar MDA pada serum darah tikus hasil paparan asap rokok pasca terapi rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*)?
2. Apakah terdapat perubahan profil pita protein pada serum darah tikus hasil paparan asap rokok pasca terapi rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah di atas, maka batasan penelitian adalah:

1. Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar sebanyak 20 ekor yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur sekitar 3 bulan dan berat badan rata-rata 200 gram. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini sudah mendapatkan laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 128-KEP-UB tahun 2013.
2. Hewan coba, dipapar asap rokok sebanyak 2 batang untuk 1 kelompok setiap hari selama 2 minggu dalam box pengasapan.
3. Ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) menggunakan pelarut air kemudian dipanaskan. Penggunaan dosis terapi ekstrak akar

gantung pohon beringin (*Ficus Benjamina L.*) diberikan secara variasi yaitu 10 mg/200 g BB, 15 mg/200 g BB dan 20 mg/200 g BB.

4. Pohon Beringin (*Ficus benjamina L.*) telah mendapatkan keterangan determinasi dari Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Brawijaya No. 0084/Takso.Identifikasi/03/2013.
5. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar Malondialdehida (MDA) yang diukur dengan menggunakan uji TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) dan gambaran profil pita protein serum dengan menggunakan metode SDS-PAGE.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui kemampuan terapi rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dalam menurunkan kadar MDA pada serum darah tikus hasil paparan asap rokok.
2. Mengetahui kemampuan terapi rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dalam memperbaiki profil pita protein pada serum darah tikus hasil paparan asap rokok.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar penelitian selanjutnya dalam pemanfaatan pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) terutama pada akar gantung pohon beringin untuk dosis yang sesuai dan dijadikan sebagai alternatif pengobatan herbal yang bernuansa kearifan lokal, aman dan ekonomis.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Paparan Asap Rokok

Rokok merupakan gulungan tembakau yang disalut dengan daun nipah untuk dihisap asapnya. Kegiatan menghisap rokok merupakan pengertian dari merokok serta orang yang merokok disebut sebagai perokok (Alwi, 2002). Merokok pada jaman dahulu diasosiasikan dengan kegiatan religius dan telah dimulai pada 5000 tahun sebelum masehi di dataran Amerika. Penyebaran rokok dimulai ketika bangsa Eropa menjajah dataran Amerika, semenjak saat itu pula kegiatan merokok mulai bergeser fungsinya dari kegiatan religius menjadi kegiatan rekreatif dan mulai menyebar ke seluruh dunia dibawa oleh bangsa Eropa. Merokok tidak hanya memberikan efek negatif bagi penghisapnya, tapi juga memberikan efek negatif bagi orang yang tidak merokok namun menghisap asap rokok atau disebut sebagai perokok pasif (Baroto, 2008).

Kegiatan merokok menghasilkan asap rokok, dimana dalam asap rokok memiliki berbagai komponen yang dapat merusak sel-sel dalam tubuh. Asap rokok disebut juga *Environmental Tobacco Smoke* (ETS) yang terdiri dari *mainstream smoke* dan *sidestream smoke*. *Mainstream smoke* adalah asap rokok yang dihembuskan oleh perokok. Pada *mainstream smoke* mengandung fase gas dan fase partikulat. Sedangkan *sidestream smoke* adalah asap yang dihasilkan pada ujung rokok dan mengandung hampir seluruh fase gas dan mengandung setengah dari total fase partikulat. Fase gas mengandung ribuan komponen

termasuk di dalamnya terdapat 1.051 spesies reaktif, khususnya *Nitric Oxide* (NO) (Baroto, 2008).

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu senyawa kimia/atom/gugus yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbitalnya sehingga bersifat sangat reaktif, tidak stabil dan mempunyai kemampuan untuk menarik elektron-elektron dari berbagai molekul serta berumur pendek. Radikal bebas dihasilkan dari proses pemutusan ikatan kovalen secara homolitik yang akan membentuk dua fragmen yang memiliki elektron tak berpasangan dan bersifat radikal. Menurut Winarsi (2011), reaksi pembentukan radikal bebas melalui tiga tahapan yakni tahapan inisiasi yang merupakan tahapan pembentukan radikal bebas. Kedua tahapan propagasi yakni pemanjangan rantai radikal dan yang ketiga yaitu tahapan terminasi dimana terjadi reaksi senyawa radikal bebas dengan radikal lain atau dengan penangkapan radikal sehingga potensi propagasinya rendah.

Radikal bebas dapat diperoleh secara endogen dari dalam tubuh sendiri maupun eksogen yang diperoleh dari luar tubuh. Radikal endogen bersumber dari autoksidasi, oksidasi enzimatis, dan *respiratory burst*. Autoksidasi merupakan produk dari hasil metabolisme aerobik, molekul yang mengalami autoksidasi menghasilkan kelompok reaktif oksigen. Autoksidasi berasal dari khemoglobin, mioglobin, sitokrom C yang tereduksi serta thiol. Oksidasi enzimatis mampu menghasilkan radikal bebas, sebagai contoh *myeloperoxidase* hasil aktivasi neutrofil. *Respiratory burst* merupakan proses dimana sel fagositik menggunakan

oksigen dalam jumlah besar pada saat proses fagositosis. Penggunaan oksigen ini akan menghasilkan superoksida. Selain itu transport elektron juga mampu menghasilkan superoksida (Albina dkk., 1998). Radikal endogen merupakan derivat oksigen atau oksid-radikal yang disebut *Reactive Oxygen Species* (ROS). Radikal ini dalam bentuk singlet oxygen (1O_2), anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH \cdot), nitrogen oksida (NO \cdot), peroksinitrit (ONOO \cdot), asam hipoklor (HOCl), hydrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal peroksil (LO $_2$ \cdot). Radikal eksogen juga dapat diperoleh dari lingkungan, misalnya asap rokok, asap kendaraan, pestisida dan racun serta dari sisa pembuangan (Dorge, 2002).

Berbagai jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang merupakan radikal endogen terdapat dalam **Tabel 2.1** (Kurnani, 2001):

Tabel 2.1 Jenis-jenis *Reactive Oxygen Species* (ROS)

ROS	Keterangan
Anion superoksida O_2^-	Merupakan ROS yang tidak terlalu bahaya, namun dapat membentuk radikal hidroksil
Radikal hidroksil OH \cdot	Radikal pengoksidasi yang sangat reaktif dan dapat bereaksi dengan hampir seluruh biomolekul
Radikal peroksil LO $_2$ \cdot	Dapat dihasilkan dalam proses peroksidasi lipid
Hydrogen Peroksida H_2O_2	Molekul ini merupakan sumber radikal hidroksil dalam kondisi jenuh ion logam transisi, juga terlibat dalam pembentukan HOCl
Oksigen singlet 1O_2	Molekul pengoksidasi yang kuat.
Nitrogen oksida NO \cdot	Radikal bebas dalam bentuk gas
Peroksinitrit ONOO \cdot	Terbentuk dari reaksi NO- dengan O $_2$ -
Asam hipoklor HOCl	Dihasilkan oleh netrofil pada proses inflamasi terbentuk dari H_2O_2 dan Cl $^-$ yang dikatalisis oleh <i>myeloperoxidase</i>

Radikal bebas di dalam tubuh memiliki fungsi yaitu untuk polimerisasi komponen dinding sel, detoksifikasi bahan kimia xenobiotik, membantu dalam proses sintesis organik kompleks dan untuk sistem pertahanan tubuh terhadap patogen. Radikal bebas yang terlalu banyak dalam tubuh dapat menyebabkan penarikan elektron molekul lain dan mengakibatkan terjadinya oksidasi dari molekul lain (Winarsi, 2007).

Kerusakan sel akibat radikal bebas didahului oleh kerusakan membran sel yang memiliki komponen fosfolipid, kolesterol dan protein, adapun prosesnya yakni (Gitawati, 1995) :

1. Radikal bebas dan komponen membran akan membentuk ikatan kovalen sehingga terjadi perubahan struktur dan fungsi reseptor.
2. Proses transportasi lintas membran akan terganggu karena terjadi oksidasi gugus tiol pada komponen membran sel.
3. Radikal bebas akan berikatan dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA) yang berada di membran sehingga akan terjadi peroksidasi lipid dan LDL pada kolesterol akan teroksidasi.

Pada protein, radikal bebas dapat menyebabkan fragmentasi sehingga mempercepat terjadinya proteolisis serta pada nukleotida dapat menyebabkan perubahan struktur DNA dan RNA sehingga terjadi mutasi dan sitotoksisitas.

2.3 Peroksidasi Lipid

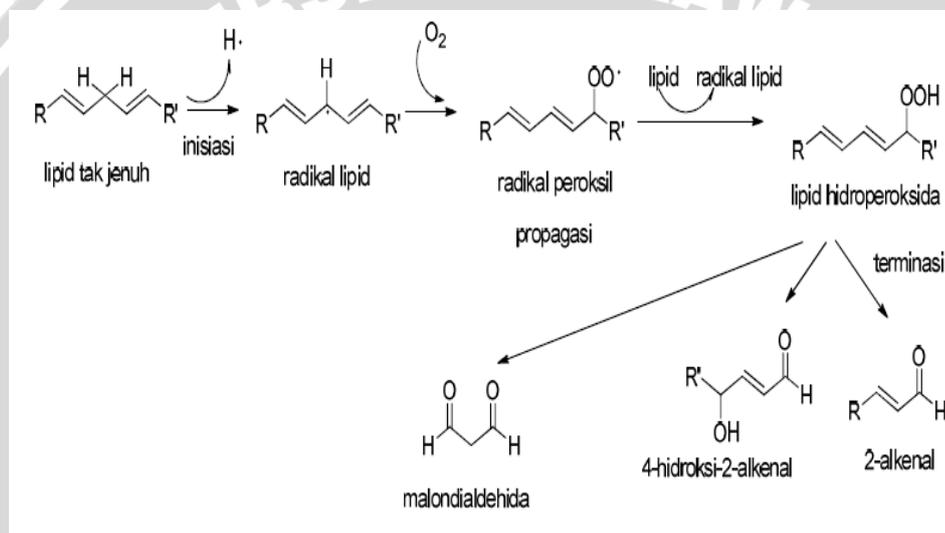
Lipid merupakan molekul yang tidak memiliki membran pelindung sehingga sangat mudah terdegradasi oleh radikal bebas. Berdasarkan ikatan

rangkanya lipid dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu asam lemak tak jenuh (memiliki ikatan rangkap ganda) dan asam lemak jenuh (tidak memiliki ikatan rangkap). Lemak tak jenuh (PUFA = *Poly Unsaturated Fatty Acid*) merupakan unsur utama dalam membran sel. Lemak tak jenuh memiliki ikatan atom karbon rangkap yang mudah terurai dan bereaksi dengan senyawa lain, sampai mendapatkan komposisi yang stabil berupa asam lemak jenuh. Jumlah ikatan rangkap (*poly-unsaturated*) yang semakin banyak, akan semakin mudah bereaksi/berubah minyak tersebut.

Proses peroksidasi lipid diawali dengan penarikan atom hidrogen yang mengandung ikatan rangkap PUFA membentuk radikal lipid. Penambahan oksigen akan menyebabkan terbentuknya radikal peroksil lipid yang selanjutnya akan menarik lagi atom hidrogen dari ikatan rangkap PUFA yang lain, sehingga terbentuk radikal lipid berikutnya. Radikal peroksil lipid akan mengalami dekomposisi menjadi peroksida lipid. Kadar peroksidasi lipid dapat digunakan untuk indikator terjadinya stress oksidatif pada jaringan. Peroksidasi lipid bersifat tidak stabil dan akan terurai menghasilkan sejumlah senyawa, antara lain MDA. Malondialdehida dapat diukur dan akan semakin tinggi jika radikal bebas juga semakin banyak dalam tubuh.

Terdapat 3 fase dalam proses peroksidasi lipid, dimulai dengan fase inisiasi, fase propagasi dan fase terminasi. Pada fase inisiasi terjadi penarikan ion H dari ikatan C-H lipid dengan oksidan dan akan terbentuk *carbon centred lipid radical*. Fase propagasi adalah fase setelah fase inisiasi, pada fase ini sangat kompleks (**Gambar 2.1**). Radikal lipid mengalami penggabungan dengan O₂ dan

terbentuk radikal peroksi. Radikal peroksil akan menyebabkan penarikan ion H meningkat dan akan terbentuk lipid hidroperoksida. Penggabungan O₂ dengan lipid radikal yang baru akan menambah jumlah peroksidasi membran lipid. Setelah terjadi proses yang kompleks maka akan terjadi fase yang ketiga yakni fase terminasi. Pada tahap terminasi akan terjadi dekomposisi peroksidasi lipid salah satunya menjadi malondialdehida (MDA) (Burcham, 1998).



Gambar 2.1 Tiga Fase Reaksi Berantai Peroksidasi Lipid (Burcham,1998).

2.4 Malondialdehida (MDA)

Malondialdehida merupakan produk akhir peroksidasi lemak tak jenuh dalam tubuh oleh radikal bebas. Senyawa ini memiliki tiga rantai karbon dengan rumus molekul C₃H₄O₂. Peningkatan kadar malondialdehida dipengaruhi oleh peningkatan ROS sehingga MDA merupakan marker untuk mengetahui stres

oksidatif dalam sel. Pembentukan MDA melibatkan radikal bebas dan asam lemak yang memiliki ikatan rangkap (PUFA) (Winarsi, 2011).

Menurut Helliwell dan Gutteridge (1999), MDA selain merupakan produk dari peroksidasi lipid juga merupakan metabolit komponen sel yang dihasilkan oleh radikal bebas. Konsentrasi MDA yang semakin tinggi maka akan berbanding lurus dengan kadar ROS, namun berbanding terbalik dengan kadar antioksidan. Kadar MDA dapat diukur dengan menggunakan uji TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*). Uji ini merupakan uji yang sering digunakan dan dapat menilai stres oksidatif berdasarkan reaksi asam tiobarbiturat dengan malondialdehida (MDA). Pembentukan MDA-TBA₂ terjadi melalui serangan nukleofilik, serangan ini melibatkan karbon-1 dari MDA dan karbon-5 dari TBA. Reaksi antara MDA dan TBA akan menghasilkan warna larutan menjadi merah muda-merah karena reaksi serangan nukleofilik yang diikuti adanya dehidrasi. Intensitas warna merah muda yang terbentuk dari kondensasi MDA-TBA mengindikasikan besarnya peroksidasi lipid dan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pada saat diukur dengan spektrofotometer UV-Vis akan memberikan panjang gelombang maksimum (Edyson, 2003).

2.5 Profil Pita Protein

Protein terdapat di dalam semua sistem kehidupan dan merupakan komponen seluler utama serta protein mencapai lebih dari separuh berat kering sel. Setiap jenis sel mengandung beberapa protein yang khas bagi sel tersebut. Sebagian besar protein disimpan di dalam jaringan otot, organ tubuh dan sisanya

terdapat di darah. Protein berperan dalam menentukan bentuk dan struktur sebuah sel serta bertindak sebagai alat untuk pengenalan antar molekul dan proses katalis (Sumardjo, 2009). Menurut Stryer (2002), fungsi protein yakni untuk katalis enzimatik, transport dan penyimpanan, koordinasi gerak, penunjang mekanis, proteksi imun, pembangkit dan penghantar impuls saraf serta pengatur pertumbuhan dan diferensiasi.

Protein mengandung unsur-unsur yang tidak dimiliki oleh karbohidrat atau lemak, unsur itu antara lain C, H, O dan N. Molekul protein mengandung fosfor, belerang serta mengandung besi dan tembaga. Molekul protein memiliki berat yang berbeda-beda berdasarkan jumlah asam amino yang menyusunnya. Berdasarkan perbedaan berat molekul ini, maka protein dapat dipisahkan satu dengan yang lainnya. Berat molekul protein dapat mengalami perubahan jika molekulnya ditarik oleh radikal bebas sehingga dapat menyebabkan perubahan pada sifat kimianya. Menurut Gitawati (1995), radikal bebas dapat menyebabkan terjadinya fragmentasi sehingga mempercepat proses proteolisis. Jaringan tertentu juga akan memproduksi protein tertentu ke dalam sel dan serum sebagai penanda adanya kelainan atau kerusakan. Protein-protein tersebut antara lain yaitu CRP (115 Kda) dan haptoglobin (40 Kda). Produksi protein ini diinduksi oleh sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α . Kerusakan dari protein juga dapat menyebabkan munculnya *heat shock protein* yang merupakan penanda adanya kerusakan pada sel akibat gangguan yang bersifat fisiologik dan gangguan yang berasal dari lingkungan. *Heat shock protein* memiliki fungsi untuk melindungi sel dari kerusakan (Snoeck dkk., 2011).

Perbedaan maupun munculnya protein penanda adanya kerusakan dapat diketahui dengan dilakukan pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya menggunakan teknik elektroforesis. Teknik elektroforesis menggunakan gel poliakrilamid sebagai medium pemisahannya. Pada teknik ini langkah awalnya yakni mendenaturasi protein dengan pemanasan dalam larutan datar yang mengandung *Sodium Dodesil Sulfat* (SDS). Denaturasi ini menyebabkan protein menjadi berkurang kelarutannya dan akan terjadi reaksi hidrofobik antara molekul protein dan molekul SDS sehingga protein akan bermuatan negatif. Molekul-molekul protein ini akan berjalan menuju ke kutub positif (anoda). Ukuran molekul protein yang semakin besar, maka akan semakin banyak muatan listriknya dan akan semakin dekat jarak yang bisa ditempuh. Teknik ini merupakan teknik pemisahan protein berdasarkan berat molekulnya (Kurniati, 2002).

2.6 Serum

Serum merupakan plasma darah tanpa faktor pembekuan darah, serum bukan sel darah maupun faktor pembeku darah. Serum mengandung semua protein yang tidak digunakan dalam mekanisme pembekuan darah. Serum disebut juga sebagai protein darah yang dapat juga ditemukan dalam plasma darah. Serum juga mengandung semua elektrolit, antibodi, antigen, hormon dan substansi eksogen (Kresno, 2003). Serum sering digunakan dalam pemeriksaan diagnostik karena pada serum tidak mengandung faktor pembekuan darah, dimana faktor

pembekuan darah dapat menarik air keluar dari sel sehingga dapat mengubah hasil.

2.7 Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memberikan elektronnya kepada radikal bebas tanpa terganggu fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai radikal bebas, sehingga radikal bebas menjadi non radikal (Kumalaningsih, 2007). Antioksidan juga diartikan sebagai senyawa yang dapat mencegah dan menghambat terjadinya oksidasi pada bahan atau substrat yang dapat teroksidasi. Antioksidan memiliki berat molekul kecil namun mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan disebut juga sebagai senyawa pendonor (*electron donor*) (Winarsi, 2007).

Antioksidan dibedakan menjadi tiga berdasarkan sumbernya, yakni antioksidan yang berasal dari dalam tubuh, antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan yang berasal dari dalam tubuh disebut juga sebagai antioksidan endogen yang berupa enzim seperti superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH Px) dan katalase. Antioksidan alami dapat diperoleh dari bahan alami misalnya tumbuh-tumbuhan seperti tokoferol, vitamin, flavonoid dan senyawa fenolik. Antioksidan sintetik merupakan hasil sintesa dari reaksi kimia seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat, dan tokoferol (Kumalaningsih, 2007).

2.8 Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.)

Klasifikasi *Ficus benjamina* L. adalah sebagai berikut (Hutapea, 1994) :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Class	: Dicotyledonae
Ordo	: Urticales
Famili	: Moraceae
Genus	: Ficus
Spesies	: <i>Ficus benjamina</i> L.

Pohon beringin memiliki beberapa nama daerah seperti waringin (Melayu dan Jawa), caringin (Sunda). Pohon beringin banyak ditemukan di tepi jalan dan tepi jurang. Karakteristiknya yakni pohon besar dengan tinggi 20-25 m, batang tegak, bulat, berwarna coklat kehitaman, permukaan kasar, berakar tunggang, percabangan simpodial, pada batang keluar akar gantung (**Gambar 2.2**). Memiliki daun tunggal, berbentuk lonjong, ujung runcing, tepi rata, pangkal tumpul, letak bersilang berhadapan, bertangkai pendek, memiliki panjang 3 – 6 cm dan lebar 2 – 4 cm, serta berwarna hijau. Buahnya bulat, berwarna hijau saat masih muda dan berwarna merah saat tua, panjang buah 0,5 – 1 cm. pohon beringin juga memiliki bunga tunggal yang keluar dari ketiak daun (Dalimartha, 1999).



Gambar 2.2 Pohon Beringin (*Ficus benjamina L.*)

Pohon beringin dapat digunakan sebagai antipiretik, antiinflamasi, dan sebagai diuretik. Pada daun, akar, dan kulit batang pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) mengandung flavonoid, saponin, dan polifenol (Hutapea, 1994). Flavonoid merupakan antioksidan yang potensial dan terdapat pada tumbuhan herbal karena kandungan kuersetin, antosianidin, dan prosianidin. Flavonoid dapat mengurangi adanya radikal bebas dalam tubuh dengan cara bertindak sebagai agen/reduksi dengan menangkap radikal bebas, mereduksi, mendonorkan atom hidrogen dan meredam oksigen singlet (Kumaran dan Karunakaran 2007). Bioaktif dari rebusan akar gantung pohon beringin terdiri dari senyawa fenolik yang dapat menurunkan jumlah sel nekrosis dan memperbaiki kerusakan sel epitel pada penyakit bronkitis kronis (Aurizza dkk., 2013). Flavonoid juga dapat mengurangi ion metal sehingga mengurangi adanya radikal

bebas dan menahan vitamin E pada partikel LDL sehingga melindungi oksidasi LDL (Soeharto, 2004).

2.8 Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) Strain Wistar

Hewan coba merupakan hewan yang memiliki peranan besar dalam sebuah penelitian. Hewan coba yang sering digunakan adalah tikus, hal ini dikarenakan tikus merupakan mamalia, mudah berkembang biak, harganya relatif murah dan mudah untuk didapatkan. Tikus putih memiliki sifat yang tidak dapat muntah karena struktur anatomi yang tidak lazim pada tempat bermuara esophagus ke dalam lambung sehingga mempermudah saat pemberian terapi menggunakan sonde, dan tikus putih tidak memiliki kandung empedu. Tikus putih hanya mempunyai kelenjar keringat di telapak kaki, sehingga tikus putih memiliki beberapa mekanisme untuk mengurangi panas tubuh, yaitu dengan menggunakan ekornya untuk mengurangi panas tubuh dan mengeluarkan banyak ludah dan menutupi bulunya dengan ludah tersebut.

Klasifikasi dari hewan model coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Myers, 2007):

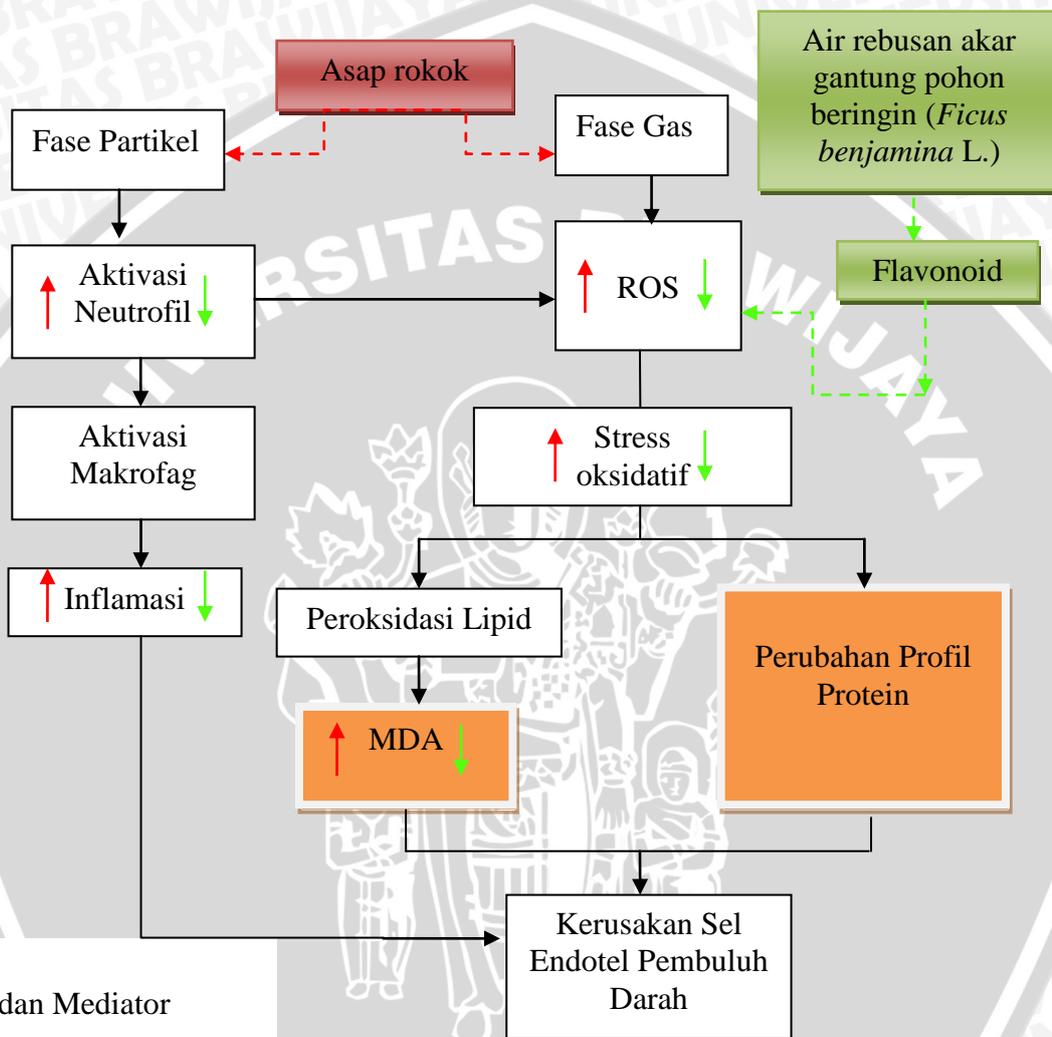
Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Subfilum	: Vertebrata
Kelas	: Mamalia
Subkelas	: Theria
Ordo	: Rodensia
Subordo	: Sciurognathi
Famili	: Muridae
Subfamili	: Murinae
Genus	: Rattus
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Tikus putih memiliki ciri-ciri yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, memiliki mata berwarna merah. Telinga tikus pendek dan tebal dengan rambut halus. Ciri yang paling menonjol yakni ekornya yang panjang (Sirois, 2005). Percobaan ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar dan berjenis kelamin jantan dengan berat rata-rata 200 gram dan berumur sekitar 3 bulan. Tikus jantan digunakan karena kondisi hormonalnya lebih stabil, berbeda dengan tikus betina yang kondisi hormonalnya sangat berfluktuasi sehingga dapat memberikan respon yang berbeda dan dapat mempengaruhi hasil penelitian.



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : Sel dan Mediator
- : Variabel yang diamati
- ↑ : Peningkatan
- ↓ : Penurunan
- : Terapi
- : Induksi

Gambar 3.1 Kerangka konsep



Hewan coba dipapar dengan induksi asap rokok sebanyak 2 batang untuk 5 hewan coba selama 2 minggu. Asap rokok dibedakan menjadi dua fase yakni fase gas dan fase partikel. Fase gas merupakan bagian yang dapat melewati filter fibre glass, yang termasuk dalam fase ini adalah nitrogen monoksida atau *Nitric Oxide* (NO), yang dapat menjadi radikal bebas jika teroksidasi. Fase partikulat terdiri atas nikotin, tar, logam, benzipren dan dibensokarbasol. Fase partikel masuk ke dalam paru-paru dan ikut peredaran darah serta akan dikenali oleh sel inflamasi sebagai benda asing yang akan difagosit. Diawali dengan bertemunya fase partikel dengan neutrofil, maka neutrofil akan memfagosit benda asing dari fase partikel, selain memfagosit, neutrofil juga melepaskan leukotrien, leukotrien merupakan faktor kemotaksis untuk eosinofil dan makrofag serta faktor kemotaksis untuk PMN, makrofag yang teraktivasi akan membantu proses fagositosis.

Enzim *myeloperoxidase* hasil aktifasi dari neutrofil mampu menghasilkan radikal bebas sehingga mampu meningkatkan radikal endogen. Radikal yang jumlahnya meningkat menyebabkan stres oksidatif. Radikal bebas dapat masuk ke dalam pembuluh darah dan merusak endotel. Endotel merupakan lapisan terdalam dari pembuluh darah yang sangat rentan jika terkena radikal bebas. Menurut Widodo 1996, dalam endotel pembuluh darah banyak mengandung ion ferum yang mampu memicu terbentuknya radikal hidroksil (OH) yang reaktif dan jika berikatan dengan lemak tak jenuh yang terdapat pada membran sel dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Proses peroksidasi lipid diawali dengan penarikan atom hidrogen yang mengandung ikatan rangkap PUFA membentuk

radikal lipid. Penambahan oksigen menyebabkan terbentuknya radikal peroksil lipid yang dapat menarik lagi atom hidrogen dari ikatan rangkap PUFA yang lain, sehingga terbentuk radikal lipid berikutnya. Radikal peroksil lipid tersebut mengalami dekomposisi menjadi peroksida lipid. Kadar peroksidasi lipid dapat digunakan sebagai indikator terjadinya stres oksidatif pada jaringan. Peroksida lipid bersifat tidak stabil dan terurai menghasilkan sejumlah senyawa, antara lain MDA (Pendit, 1996). Kadar MDA dapat diukur dengan menggunakan uji TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*).

Radikal bebas dapat berikatan dengan protein yang menyebabkan perubahan dari profil pita protein. Perubahan profil pita protein terjadi karena adanya fragmentasi sehingga mempercepat proteolisis (Gitawati, 1995). Perubahan profil pita protein juga dapat terjadi dengan adanya produksi protein penanda inflamasi yang diinduksi oleh sitokin pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6 dan TNF- α serta dapat menyebabkan sel mensintesis *heat shock protein* untuk melindungi sel dari kerusakan. Perubahan profil pita protein dianalisis menggunakan metode *Sodium Dodecyl Sulphat- Polyacrylamid Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) berdasarkan berat molekul. Terjadinya peningkatan kadar MDA dan perubahan profil pita protein dapat dijadikan indikator kerusakan sel endotel. Rebusan akar gantung pohon beringin digunakan sebagai terapi, diharapkan mampu menurunkan ROS karena adanya kandungan antioksidan flavonoid.

3.2 Hipotesis Penelitian

Rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dapat menurunkan kadar MDA dan menyebabkan perbaikan profil pita protein pada serum darah tikus (*Rattus norvegicus*) hasil paparan asap rokok.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia Jurusan Kimia, Laboratorium Biologi Sel dan Molekuler, Laboratorium Fisiologi Hewan, dan Laboratorium Taksonomi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang pada bulan Desember 2013 sampai dengan Juni 2014.

4.2 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba hewan coba (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur sekitar 3 bulan dan memiliki berat badan rata-rata 200 gram. Hewan coba diaklimatisasi selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Besar sampel dihitung dengan menggunakan rumus (Kusriningum, 2008):

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 20/4$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk 5 perlakuan diperlukan jumlah sampel atau ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga penelitian ini menggunakan 4 ulangan.

4.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol hewan coba sehat (-), kelompok kontrol hewan coba yang dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 1 kelompok setiap hari selama 2 minggu (kontrol +) di dalam box pengasapan, kelompok terapi 1 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 1 kelompok setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 10 mg/200 g BB selama 2 minggu setelah pengasapan, kelompok terapi 2 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 1 kelompok setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 15 mg/200 g BB selama 2 minggu setelah pengasapan, dan kelompok terapi 3 dipapar dengan asap rokok 2 batang untuk 1 kelompok setiap hari selama 2 minggu di dalam box pengasapan kemudian diterapi dengan dosis 20 mg/200 g BB selama 2 minggu setelah pengasapan. Pada hari ke-15 hewan coba kontrol sehat dan hewan coba kontrol yang dipapar asap rokok dibedah dan dikoleksi serumnya. Hewan coba terapi 1, 2, dan 3 dibedah pada hari ke-29 serta dikoleksi serumnya (**Lampiran 3**).

Kelompok kontrol hewan coba sehat merupakan hewan coba tanpa perlakuan. Masing-masing kelompok perlakuan terdiri dari empat ekor hewan coba sebagai ulangan.

4.4 Variabel Penelitian

Adapun variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah :

Variabel bebas : Pemberian asap rokok dan pemberian terapi bioaktif air rebusan akar gantung pohong beringin (*Ficus benjamina L.*)

Variabel tergantung : Kadar MDA (Malondialdehida) dan profil pita protein serum

Variabel kendali : Hewan coba strain Wistar jantan, berat badan, umur, pakan, minum, suhu kandang, kelembaban kandang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini ialah bak plastik berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm yang ditutup dengan bahan kawat untuk tempat tinggal hewan coba, seperangkat alat gelas (cawan petri, labu ukur (10mL, 100mL, 500mL, 1000mL), spatula, pipet tetes, gelas ukur 100 mL, tabung reaksi, corong gelas), mikro pipet, stirrer, seperangkat kandang hewan coba, box pengasapan,

gunting, pinset, spuit, *vortex*, *ependorf*, sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis, plastik, spektrofotometer IR, freezer -20 °C, kulkas 4 °C, *waterbath*, pisau, sarung tangan, masker, tisu, sonikator, *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, timbangan, alat elektroforesis, sisir, tabung polipropilen.

4.5.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain hewan coba tikus putih (*Ratus norvegicus*) jantan, makanan dan air minum hewan coba, akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*), serum, alkohol 70%, pelarut organik untuk KLT, HCl encer, NaOH, kloroform (CHCl₃), asam sulfat (H₂SO₄), amonia (NH₃), pereaksi Wagner, akuades, akuabides, TCA 10 %, HCN 1 N, Na-Thio 1%, etanol absolute, Tris-HCl, LGB, UGB, T-akril, ddH₂O, APS 10%, TEMED, larutan *running buffer*, larutan pewarna, larutan penghilang warna.

4.6 Tahapan Penelitian

Penelitian dimulai dari minggu pertama Desember 2013 dengan tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamin L*)
2. Analisa kandungan bioaktif akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamin L*)
3. Perlakuan hewan coba
4. Penyiapan hewan coba
5. Terapi hewan coba dengan rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamin L*)
6. Koleksi serum darah

7. Pengukuran kadar MDA
8. Pengamatan profil pita protein dengan SDS-PAGE
9. Analisa Data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Pembuatan ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*)

Akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dengan diameter antara 3-5 cm diambil dari pohon dan diiris tipis-tipis kemudian dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan. Setelah kering dilakukan pembuatan ekstrak akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) sesuai dosis masing-masing terapi. Dimasukkan aquadest sebanyak 100 ml dan direbus pada suhu 79°C sampai air menyusut hingga 10 ml.

4.7.2 Analisa kandungan bioaktif akar gantung pohon beringin

(*Ficus benjamina L.*)

Kandungan bioaktif akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) dianalisis dengan uji fitokimia. Uji fitokimia merupakan uji untuk mengetahui golongan senyawa dalam ekstrak akar gantung pohon beringin. Uji fitokimia meliputi uji flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Uji flavonoid dilakukan dengan mereaksikan 2 ml ekstrak dengan 1 ml larutan NaOH 10% dan ditambahkan 1 ml larutan HCl encer. Hasil positif jika berubah menjadi kuning coklat setelah penambahan NaOH dan berubah menjadi lebih bening setelah penambahan HCl encer. Untuk uji terpenoid, dilakukan dengan cara 0,5 ml ekstrak ditambah 2 ml kloroform (CHCl_3) dan 2 ml asam sulfat (H_2SO_4) pekat. Hasil positif ditunjukkan

dengan terbentuknya warna merah kecoklatan pada antar muka 2 lapisan larutan. Dan untuk uji terpenoid ekstrak sebanyak 0,5 ml ditambah 10 ml CHCl_3 dan 1 ml amonia (NH_3) 0,05 M serta H_2SO_4 2 M sebanyak 1 ml, dikocok dan terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam sulfat diambil dan ditambahkan pereaksi Wagner. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan coklat pada larutan (Harborne, 1987).

Untuk mendukung hasil uji fitokimia, dilakukan pemisahan senyawa dalam ekstrak menggunakan KLT (Kromatografi Lapis Tipis) dan dianalisis dengan menggunakan IR. Pelarut campuran yang digunakan dalam KLT yaitu asam asetat: dietil eter: etil asetat (3:4:4). Hasil KLT menunjukkan terbentuknya noda pada plat yang selanjutnya diamati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Tiap-tiap noda dihitung harga R_f (*retardation factor*) dengan rumus:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan noda dari tempat awal}}{\text{jarak pergerakan eluen dari tempat awal}}$$

Setiap noda pada silika dikerok dan dianalisis dengan spektrofotometer IR yang bertujuan untuk mengetahui gugus-gugus fungsi senyawa yang terkandung dalam ekstrak akar gantung pohon beringin (Shofia, 2013).

4.7.3 Perlakuan hewan coba

Hewan yang digunakan yakni hewan coba putih (*Rattus norvegicus*) jantan strain Wistar yang diperoleh dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP) UGM Yogyakarta dengan umur sekitar 3 bulan dan berat badan rata-rata 200

gram serta sebanyak 20 ekor. Hewan coba diadaptasikan selama 7 hari dan diberi pakan berupa ransum basal yang komposisinya telah disusun berdasarkan *association of official analytical chemist* (AOAC) (2005) (**Tabel 4.1**).

Tabel 4.1. Komposisi Pakan Standar Hewan coba

Bahan-bahan Campuran	Jumlah (%)
Protein	10
Minyak	8
Campuran garam mineral	5
Campuran vitamin	1
Selulosa	1
Air	5

Hewan coba telah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya No. 128-KEP-UB.

Kandang hewan coba berukuran 17,5 x 23,75 x 17,5 cm berupa bak plastik dan diberi penutup dari kawat. Kandang diletakkan pada suhu 22-24°C dan dengan kelembaban udara 50-60 %. Kandang diletakkan dalam ruangan yang bebas kegaduhan, polutan serta berventilasi cukup.

4.7.4 Persiapan hewan coba

20 ekor hewan coba (*Rattus norvegicus*) strain wistar dikelompokkan menjadi 5 kelompok. 4 ekor hewan coba dijadikan kontrol negatif, 16 ekor hewan coba dibuat sakit sesuai dengan model penelitian Arkeman dan David (2006) yang telah dimodifikasi yaitu melalui paparan asap rokok 2 batang untuk 5 ekor hewan coba setiap hari selama 2 minggu dalam box pengasapan.

4.7.5 Terapi hewan coba dengan rebusan akar gantung pohon beringin

(*Ficus benjamina L.*)

Hewan coba yang digunakan untuk penelitian dikelompokkan menjadi 5 kelompok yaitu:

- K (-) (Kontrol negatif / kelompok hewan coba sehat)
- K (+) (Kontrol positif / kelompok hewan coba yang dipapar asap rokok)
- T1 (Kelompok hewan coba yang dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan air rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) sebanyak 10 mg/200 g BB menggunakan sonde sebanyak 2 ml per ekor per hari selama 2 minggu)
- T2 (Kelompok hewan coba yang dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan air rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) sebanyak 15 mg/200 g BB menggunakan sonde sebanyak 2 ml per ekor per hari selama 2 minggu)
- T3 (Kelompok hewan coba yang dipapar asap rokok dan diberi terapi dengan air rebusan akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) sebanyak 20 mg/200 g BB menggunakan sonde sebanyak 2 ml per ekor per hari selama 2 minggu).

4.7.6 Koleksi serum darah

Pengambilan darah dilakukan langsung pada jantung menggunakan alat yang aseptik. Darah yang telah diperoleh dimasukkan dalam *vacutainer* dan dimiringkan pada sudut 45° selama kurang lebih tiga jam sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan paling atas yang berwarna kuning kecoklatan diambil dan

disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang terbentuk dipisahkan dan dilakukan sentrifugasi lagi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Supernatan (serum) diambil dan dipindahkan ke tabung ependorf baru dan disimpan di dalam *freezer* (Ganong, 2008).

4.7.7 Pengukuran kadar MDA

Produk dari peroksidasi lemak yakni MDA dapat digunakan sebagai marker adanya ROS dalam tubuh. Kadar MDA jaringan dapat diukur dengan metode TBA (*Thiobarbituric Acid*). Langkah pertama untuk mengukur MDA, yakni menentukan panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometri UV-Vis dan didapatkan hasil sebesar 535 nm. Serum dari masing-masing perlakuan ditambahkan 1 ml NaCl 0,9%. Homogenat disentrifugasi pada kecepatan 8000rpm selama 20 menit, diambil supernatan dan ditambah 550 μ L akuades, 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1N, serta 100 μ L Na-Thio. Setiap penambahan reagen, larutan campuran tersebut dihomogenkan dengan vortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Supernatan dipisahkan dan dipindahkan pada tabung reaksi baru, dan larutan diinkubasi dalam waterbath. Sampel diukur absorbansinya dan diplotkan pada kurva baku yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel (Shofia, 2013).

4.7.8 Pengamatan profil pita protein dengan SDS-PAGE

4.7.8.1 Isolasi Protein

Serum yang telah diperoleh dilakukan isolasi protein, serum dimasukkan ke dalam tabung polipropilen steril dan disonifikasi selama 10 menit pada sonikator. Sonikasi merupakan suatu proses pengubahan sinyal listrik menjadi

getaran mekanis yang dapat diarahkan menuju suatu zat yang dilakukan untuk memecahkan ikatan antar molekul atau untuk merusak sel. Supernatan diambil dan ditambah dengan etanol absolut dingin dengan perbandingan 1:1, dibiarkan selama semalam hingga terbentuk endapan. Kemudian supernatan disentrifugasi selama 15 menit (10.000 rpm), endapan diambil dan dikeringkan hingga bau etanol menghilang. Endapan yang diperoleh ditambah dengan larutan 0,02 M Tris-HCl pH 6,5 dingin dengan perbandingan 1:1 (Walter, 1984).

4.7.8.2 Persiapan Separating dan Stacking Gel

Separating gel merupakan gel sebagai media untuk pemisahan protein. *Separating* gel dibuat dari *Lower Gel Buffer* (LGB), T-Acryl atau akrilamid, ddH₂O, ammonium persulphate (APS) dan *t*-tetramethyl ethylene diamine (TEMED). Bahan-bahan tersebut dimasukkan dalam tabung dan dituang ke dalam *casting gel* pembentuk gel dengan menggunakan mikropipet secara perlahan supaya tidak terbentuk gelembung udara sampai batas. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit. Sisir dipasang saat pemberian gel yang kedua yakni *stacking gel*. *Stacking gel* dibuat dari *Upper Gel Buffer* (UGB), T-Acryl, APS, TEMED dan dilarutkan pada akuades atau ddH₂O. Dituang secara perlahan diatas *separating gel* dan dibiarkan menjadi gel. Sisir diambil dengan perlahan dan *casting gel* dipasang pada alat elektroforesis serta dituangkan larutan *running buffer* (Fatchiyah, dkk, 2012).

4.7.8.3 Injeksi Sampel dan *Running*

Sampel isolasi protein dari serum diambil sebanyak 15 μ l dan ditambah *Reducing Sampel Buffer* (RBS) dengan perbandingan 1 : 1, dimasukkan ke dalam *microtube* dan dimasukkan ke dalam penangas air pada suhu 100°C selama 5 menit. Sampel didinginkan dan ditambah dengan sukrosa atau gliserol 20 % dan *bromophenol blue* sebagai *tracking dye*. Sampel dimasukkan dalam sumuran, dimana salah satu sumuran diisi dengan protein standar marker. Kemudian anoda dihubungkan pada reservoir bawah dan katoda dihubungkan pada reservoir atas dan dihubungkan *power supply* dengan arus listrik sebesar 30 mA dan 130 V selama 1-2 jam. Proses running dihentikan jika warna penanda (*tracking dye*) berada pada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah *casting gel* (Fatchiyah, dkk, 2012).

4.7.8.4 Pewarnaan

Pewarnaan gel dilakukan dengan merendam gel dalam larutan *staining* sambil digoyang selama 30-60 menit. Setelah 30-60 menit dibuang larutan *staining* dan gel dicuci dengan aquades beberapa kali hingga bersih. Selanjutnya gel direndam dalam larutan *destaining* selama 30 menit atau hingga band terlihat sambil digoyang, saat perendaman ini, gel dilapisi dengan kertas saring. Selanjutnya gel dicuci dengan aquades beberapa kali hingga bersih (Fatchiyah dkk, 2012).

4.7.8.5 Penentuan Berat Molekul

Berat Molekul hasil SDS-PAGE dibandingkan dengan marker protein sehingga dapat diketahui jenis-jenis protein dalam sampel. Penentuan berat

molekul dilakukan dengan menghitung nilai R_f (*Retardation factor*) dari masing-masing pita. Adapun rumus R_f yaitu:

$$R_f = \frac{\text{jarak pergerakan protein dari tempat awal (cm)}}{\text{jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Kemudian dibuat kurva standar dengan harga R_f sebagai sumbu X dan harga logaritma berat molekul sebagai sumbu Y, sehingga diperoleh persamaan regresi linier $Y = ax + b$. Persamaan ini digunakan untuk menghitung massa molekul relatif dari protein sampel. Berat molekul protein sampel didapatkan dengan menggunakan rumus $BM = \text{antilog } Mr \text{ protein sampel}$.

4.7.9 Analisa Data

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan uji ANOVA untuk analisis kadar MDA dan jika terdapat perbedaan nyata hasil antar perlakuan, maka dilakukan uji perbandingan berganda dengan uji Tukey. Sedangkan untuk gambaran profil pita protein dianalisis secara kualitatif deskriptif.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina* L.) Terhadap Kadar Malondialdehida (MDA) pada Hewan coba (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar dengan Asap Rokok.

Radikal bebas yang tinggi dalam tubuh dapat menyebabkan proses peroksidasi lipid pada membran sel sehingga terjadi kerusakan membran sel. Peroksida lipid bersifat tidak stabil dan akan terurai menghasilkan sejumlah senyawa, antara lain MDA (Pendit, 1996). Kadar MDA dapat diukur dengan menggunakan uji TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*), semakin tinggi kadar MDA maka semakin tinggi juga ROS yang ada dalam tubuh. Hasil penelitian menunjukkan bahwa rebusan akar gantung pohon beringin dapat menurunkan kadar malondialdehida. Dosis terapi tertinggi menunjukkan penurunan kadar MDA paling besar (**Tabel 5.1**).

Tabel 5.1 Rata-rata kadar malondialdehida pada hewan coba

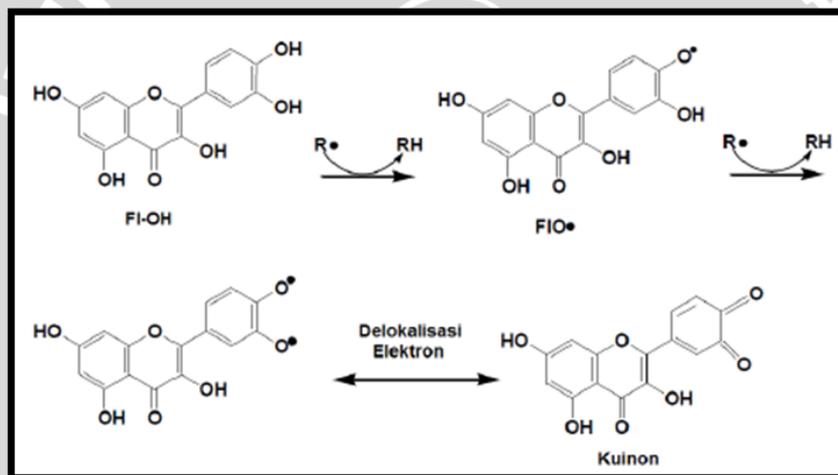
Kelompok	Rata-rata kadar MDA ($\mu\text{g/ml}$)	Peningkatan kadar MDA (%)	Penurunan kadar MDA (%)
Sehat	$0,323 \pm 0,0046^a$	0	0
Paparan asap rokok	$0,556 \pm 0,011^e$	41,9	-
Terapi dengan dosis 10 mg/200 g BB	$0,481 \pm 0,0099^d$	-	13,48
Terapi dengan dosis 15 mg/ 200 g BB	$0,430 \pm 0,011^c$	-	22,66
Terapi dengan dosis 20mg/200 g BB	$0,372 \pm 0,01^b$	-	33,09

Ket : Notasi yang berbeda menunjukkan adanya pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$).

Pengujian ANOVA (**Lampiran 9**) dilakukan untuk mengetahui hipotesis nol (H_0) diterima atau ditolak. Dari hasil perhitungan uji ANOVA menunjukkan nilai signifikan kurang dari nilai alpha ($p < 0,05$), sehingga dapat dikatakan terima H_0 dan dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh terapi terhadap penurunan kadar MDA. Pada hewan coba kelompok paparan asap rokok menunjukkan kadar MDA tertinggi yakni sebesar 41,9 %, hal ini sesuai dengan penelitian Yueniwati dan Ali (2004) bahwa asap rokok merupakan salah satu sumber radikal bebas serta dapat meningkatkan kadar MDA dalam tubuh. Radikal bebas adalah molekul oksigen yang memiliki elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya sehingga bersifat tidak stabil dan selalu mencari pasangan elektron supaya menjadi stabil. Asap rokok dibedakan menjadi dua fase, yakni fase gas dan fase partikel. Fase gas dari asap rokok dapat menyebabkan peningkatan ROS dalam tubuh. Sedangkan fase partikel akan masuk ke dalam paru-paru serta bisa langsung ikut peredaran darah dan akan dikenali oleh sel inflamasi sebagai benda asing yang akan difagosit oleh neutrofil dan makrofag. Proses fagositosis yang dilakukan oleh neutrofil secara enzimatik yakni *myeloperoxidase* mampu menghasilkan radikal bebas sehingga mampu meningkatkan radikal endogen (Widodo, 1995). Radikal bebas yang diperoleh secara eksogen serta endogen ini jika tidak diimbangi dengan antioksidan dalam tubuh yang cukup maka akan menyebabkan terjadinya stres oksidatif.

Penurunan kadar MDA terjadi pada kelompok terapi dengan dosis 10 mg/200 g BB sebesar 13,48 %, pada kelompok terapi dengan dosis 15 mg/200 g BB mengalami penurunan sebesar 22,66 % dan pada kelompok terapi dengan

dosis 20 mg/200 g BB mengalami penurunan paling besar yakni 33,09 %. Penurunan kadar MDA diyakini karena peran dari bioaktif flavonoid. Flavonoid ini terdapat dalam akar gantung pohon beringin (**Lampiran 4**). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam akar gantung pohon beringin berperan dalam penghambatan peroksidasi lipid karena mampu menangkap radikal bebas dengan menyumbangkan atom hidrogennya dari gugus OH kepada radikal bebas (**Gambar 5.1**).

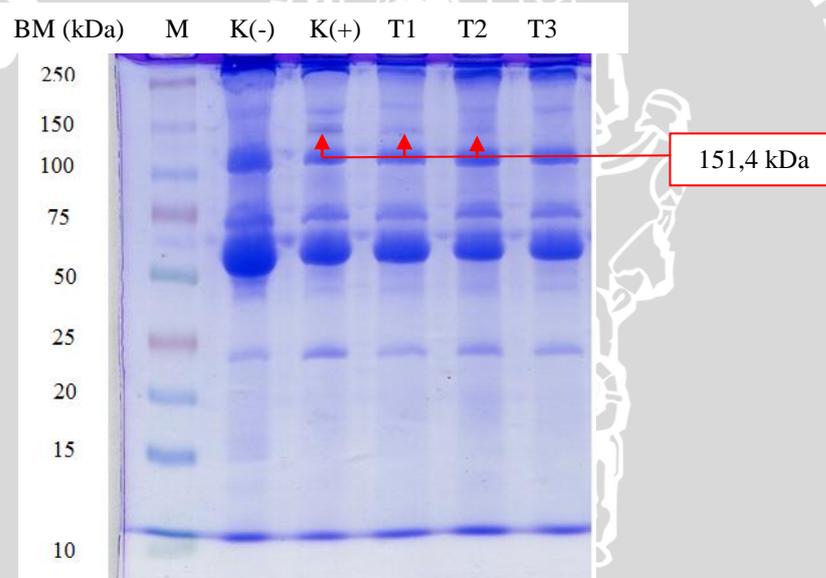


Gambar 5.1 Reaksi *scavenging* radikal bebas oleh flavonoid (Rahmah, 2012)

Flavonoid berubah menjadi radikal fenoksil flavonoid (FIO•) saat menyumbangkan atom hidrogennya. Radikal bebas akan menyerang radikal fenoksil flavonoid yang pertama sehingga akan terbentuk radikal fenoksil flavonoid yang kedua. Radikal fenoksil flavonoid yang kedua dapat menstabilkan strukturnya dengan delokalisasi karena memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga efek radikal menjadi hilang (Rahmah, 2012).

5.2 Pengaruh Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (*Ficus benjamina L.*) Terhadap Gambaran Profil Pita Protein pada Hewan coba (*Rattus norvegicus*) yang Dipapar dengan Asap Rokok

Hasil penelitian menunjukkan bahwa hewan coba yang dipapar asap rokok menyebabkan terjadinya sintesis protein dengan berat molekul 151,4 kDa. Pita protein ini tidak ditemukan pada hewan coba sehat dan yang mendapat terapi 20 mg/200 g BB. Kelompok hewan coba yang mendapat terapi dengan dosis 10 mg/200 g BB dan 15 mg/ 200 g BB masih terdapat pita protein dengan berat molekul 151,4 kDa (**Gambar 5.2**) (**Tabel 5.2**).



Gambar 5.2 Profil Protein Serum Hewan Coba (*Rattus norvegicus*) sehat, dipapar asap rokok dan diterapi dengan rebusan akar gantung pohon beringin.

Keterangan :

- M = Marker
- K(-) = Kontrol Sehat
- K(+)

= Kontrol yang dipapar asap rokok

T1 = Terapi 10 mg/200 g BB

T2 = Terapi 15 mg/200 g BB

T3 = Terapi 20 mg/200 g BB

Tabel 5.2 Perbedaan Berat Molekul (BM) Protein pada Serum

Perlakuan	Berat Molekul (kDa)								
	197,4	165,8	151,4	118,4	83,0	67,0	47,9	43,5	25,3
Kontrol (-)	√	√	-	√	√	√	√	√	√
Kontrol (+)	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Terapi 1	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Terapi 2	√	√	√	√	√	√	√	√	√
Terapi 3	√	√	-	√	√	√	√	√	√

Keterangan :
 K(-) = Kontrol Sehat
 K(+) = Kontrol yang dipapar asap rokok
 T1 = Terapi 10 mg/200 g BB
 T2 = Terapi 15 mg/200 g BB
 T3 = Terapi 20 mg/200 g BB

Pita protein yang menjadi pembeda adalah pita protein dengan berat 151,4 kDa yang terdapat pada serum hewan coba yang dipapar asap rokok atau kontrol positif, serum hewan coba yang diberikan terapi dengan rebusan akar gantung pohon beringin dengan dosis 10 mg/200 g BB serta pada serum hewan coba yang diberikan terapi dengan rebusan akar gantung pohon beringin dengan dosis 15 mg/200 g BB. Protein dengan berat molekul 151,4 kDa diduga sebagai *heat shock protein*. *Heat shock protein* merupakan protein yang disintesis untuk melindungi sel dari kerusakan. Menurut Park dkk., (2003) *heat shock protein* dengan berat 151,4 kDa merupakan *oxygen-regulated protein 150* (ORP-150), protein ini memiliki berat molekul berkisar antara 150-170 kDa jika dianalisa dengan menggunakan SDS-PAGE. *Oxygen-regulated protein 150* (ORP-150) dikenal juga sebagai *glucose-regulated protein* (GRP170) dan Hyou1 yang merupakan anggota dari family protein *heat shock 70* yang pembentukannya di retikulo endoplasma dan mitokondria. *Heat shock protein* adalah suatu protein yang dihasilkan karena adanya *heat shock response*. *Heat shock respon* berfungsi

sebagai tanggapan sel terhadap gangguan yang bersifat fisiologik dan gangguan yang berasal dari lingkungan (Snoeck dkk., 2011).

Menurut Kaneda dkk., (2000), sintesis protein ORP-150 terjadi akibat adanya stres pada sel. Hewan coba kontrol positif yang diberi paparan asap rokok menunjukkan adanya protein yang diduga sebagai ORP-150. Hal ini diyakini karena asap rokok mampu menyebabkan kenaikan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menyebabkan stres pada sel. Menurut Snoeck dkk., (2001) ROS merupakan salah satu stressor, ROS merupakan radikal bebas yang bersifat reaktif, tidak stabil dan memiliki kemampuan untuk menarik elektron-elektron dari berbagai molekul seperti lemak tak jenuh yang dapat menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid, karbohidrat, protein dan DNA. Terjadinya peroksidasi lipid dan adanya penarikan elektron-elektron dari penyusun membran sel lainnya menyebabkan stres pada sel dan jika berlanjut dapat menyebabkan kerusakan sel. Kerusakan sel oleh radikal bebas dapat menjadi penyebab munculnya ORP-150. Keberadaan ORP-150 memiliki peran penting dalam memilih protein dan mengontrol kualitas protein dengan memilih dan mengarahkan protein yang rusak ke proteasome untuk didegradasi, sedangkan untuk protein yang masih bisa diselamatkan akan dilakukan *folding* untuk mencegah kerusakan.

Pemberian terapi akar gantung pohon beringin dengan dosis 20 mg/200 g BB menunjukkan bahwa tidak terdapat protein dengan berat 151,4 kDa, sedangkan pada terapi dengan dosis 10 mg/200 g BB dan 15 mg/200 g BB menunjukkan masih terdapat protein dengan berat 151,4 kDa. Tidak munculnya protein dengan berat 151,4 kDa pada terapi dengan dosis 20 mg/200 g BB diduga

karena adanya kandungan flavonoid pada rebusan akar gantung pohon beringin yang berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron yang dimilikinya kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas dapat diredam (Kumalaningsih, 2007). Antioksidan dari flavonoid ini dapat menangkap radikal bebas pada kelompok tikus pasca dipapar asap rokok. Flavonoid pada akar gantung pohon beringin bertindak sebagai donor dengan menyumbangkan atom hidrogennya dari gugus OH kepada radikal bebas (Rahmah, 2012). Dosis yang makin tinggi maka semakin banyak juga kandungan antioksidannya sehingga mampu menangkap radikal bebas lebih banyak. Kandungan flavonoid dalam akar gantung pohon beringin diyakini memiliki peran dalam meredam radikal bebas dalam tubuh hewan coba pasca paparan asap rokok. Radikal bebas bersifat reaktif yang dapat menarik elektron-elektron pada penyusun membran sel seperti lemak tak jenuh, karbohidrat dan protein yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel. Sel mampu mensintesis *heat shock protein* untuk mencegah kerusakan sel, salah satu *heat shock protein* yang disintesis yakni ORP-150. Flavonoid mampu meredam radikal bebas sehingga radikal bebas tidak lagi menarik elektron-elektron dari membran sel sehingga kerusakan sel dapat diminimalisir dan sel tidak akan mensintesis *heat shock protein*.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

- 1) Bioaktif akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*) menurunkan kadar malondialdehida (MDA) pada serum tikus (*Rattus norvegicus*) yang dipapar asap rokok 2 batang/hari/kelompok. Semakin tinggi dosis terapi akar gantung pohon beringin, maka semakin tinggi pula penurunan kadar MDA.
- 2) Terapi dengan dosis 20 mg/200 g BB menghentikan sintesis protein dengan berat 151,4 kDa yang diduga sebagai protein ORP-150, protein ini disintesis akibat paparan asap rokok.

6.2 Saran

Perlu dikaji tentang dosis yang lebih baik serta LD 50 dari akar gantung pohon beringin (*Ficus benjamina L.*). Perlu pengujian lebih lanjut dengan metode *immunoblotting* untuk membuktikan protein 151,4 kDa adalah protein ORP-150.

DAFTAR PUSTAKA

- Abate, C., L. Patel., and Raucher. 1990. *Redox Regulation of Fos and Jun DNA-Binding Activity in Vitro*. Science. 249: 1157-1161.
- Albina J. E., and J. S. Reichner. 1998. *Role of Nitric Oxide in Mediation of Macrophage Cytotoxicity and Apoptosis*. Cancer metastasis rev. 17: 38-53
- Alwi, H. 2002. *Kamus Besar Bahasa Indonesia Edisi ketiga*. Balai Pustaka: Jakarta.
- Andayani, R., Lisawati., dan Y. Maimunah. 2008. *Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenol Total dan Likopen pada Buah Tomat (Solanum lycopersicum L)*. Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol 13, No.1.
- Anzueto, A. R., and T. Schaberg. 2003. *Acute Exacerbation of Chronic Bronchitis*. Science Press Ltd. London.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemist). 2005. *Official Methods of Analysis*. Washington DC.
- Arkeman dan David. 2006. *Efek Vitamin C Dan E Terhadap Sel Goblet Saluran Nafas Pada Tikus Akibat Paparan Asap Rokok*. Fakultas Kedokteran, Universitas Trisakti. Jakarta.
- Aurizza, A.N., A. A. Aryoko., Y. M. Karo., R. M. Hardi., dan T. Cahyani. 2013. *Bioaktif Air Rebusan Akar Gantung Pohon Beringin (Ficus benjamina L.) Untuk Terapi Penyakit Bronkitis Kronik Pada Pet Animals*. <http://simlitabmas.dikti.go.id/>. Malang. Diakses 5 September 2013. 14.00 WIB.
- Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. 2010. *Riset Kesehatan Dasar 2010*. <http://www.diskes.jabarprov.go.id/download.php?title=RISKESDAS%202010&source=data/download/201121152334.pdf> diakses 11 November 2013.
- Baroto, A, A. 2008. *Perancangan Cigarette Smoke Filter Berbasis Thermophoretic, Karbon Aktif dan Filter Udara Konvensional* (Skripsi). Fakultas Teknik. Universitas Indonesia.
- Barry, S. L. 2005. *Preventing Occupational and Injury*. Washington DC. APHA.
- Basset, J., R. C. Denney, G. H. Jeffrey., dan J. Mendhom. 1994. *Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

- Brunner, L dan Suddarth. 2002. *Buku Ajar Keperawatan Medical Bedah*. Ed. 8. H. Kuncara, *Buku Saku Patofisiologi* A. Hartono, M. Ester, Y. Asih penerjemah. Jakarta: EGC.
- Burcham, P.C. 1998. *Genotoxic lipid peroxidation products : their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts*. *Mutagenesis*, 13 : 287 – 305.
- Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Ed. 1. Trubus Agriwidya. Jakarta. hlm 22-24.
- Fatchiyah,. S. Widyarti, E. L. Arumningtyas., dan S. Permana. 2012. *Buku Praktikum Teknik Analisis Biologi Molekuler*. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.
- Ganong W. F. 2008. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed. 20. Andrianto P penerjemah. Jakarta. EGC. Terjemahan dari: *Review of Medical Physiology* hlm 486-507.
- Gitawati R. 1995. *Radikal Bebas, Sifat dan Peran dalam Menimbulkan Kerusakan / Kematian Sel*. Cermin Dunia Kedokteran. Pusat Penelitian dan Pengembangan Farmasi. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 102:33-36.
- Global Initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD). 2006. *Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD*.
- Hostettmann, K. 1986. *Cara Kromatografi Preparatif*. ITB. Bandung.
- Hutapea, J. R. 1994. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jilid III*. Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.
- Kaneda. S., T. Yura., and H. Yanagi. 2000. *Production of Three Distinct mRNAs of 150 kDa Oxygen-Regulated Protein (ORP150) by Alternative Promoters: Preferential Induction of One Species Under Stress Conditions*. *J Biochem(Tokyo)*128: 529 –538.
- Kochhar, S. P. and S. B. Rossel. 1990. *Detection, Estimation, and Evaluation of Antioxidant in Food System, Food Antioxidant*. Elsevier Sci Publ Ltd. London. New York.
- Kresno dan Siti. 2003. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Balai Penerbit FKUI : Jakarta.
- Kumalaningsih S. 2007 *Antioksidan, Sumber dan Manfaat*. Artikel Antioksidan Center

- Kumaran, A., and R. J. Karunakaran. 2007. *In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five Phyllanthus species from India*. LWT 40. hlm 344–352.
- Kurnani, B. A. 2001. *Radikal Bebas Dalam Polutan Lingkungan*. Seminar Nasional dan Lokakarya: Pemahaman Konsep Radikal Bebas Dalam Meningkatkan Kesehatan Menuju Indonesia Sehat 2010. Pusat Penelitian Kesehatan UNPAD Bandung. 29-30 September 2001.
- Kusriningrum. 2008. *Dasar Perancangan Percobaan*. Universitas Airlangga. Surabaya. Hal 14 - 20.
- Mangunegoro H. 2003. *PPOK, Pedoman Diagnosis dan Penatalaksanaan di Indonesia*. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. hlm 1-56.
- Myers, R. L. 2007. *The 100 Most Important Chemical Compounds*. Greenwood Press, Conn.
- Nur, M. A., dan H. Adjuwana. 1989. *Teknik Pemisahan dalam Analisis Biologi*. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Ilmu Hayat Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Park, J., D. P. Easton., X. Chen., I. J. MacDonald., X. Y. Wang., and J. R. Subjeck. 2003. *The Chaperoning Properties of Mouse grp170 , A Member of The Third Family of hsp70 Related Proteins*. Biochemistry 42: 14893-14902.
- Pendit, B. U. 1996. *Metabolisme Oksigen dan Toksisitas Oksigen*. Dalam Marks DB, Marks AD, Smith CM. Biokimia Kedokteran Dasar. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC: 321-333.
- Rahmah, Nur L., 2012, *The Potency of Sargassum duplicatum Bory Extract on Inflammatory Bowel Disease Therapy in Rattus norvegicus*, Journal of Life Sciences 6, pp.144-154.
- Shofia, V. 2013. *Studi Pemberian Ekstrak Rumput Laut Coklat (Sargassum prismaticum) terhadap Profil Malondialdehid dan Gambaran Histologis Ginjal pada Tikus (Rattus novergicus) Diabetes Militus Tipe I (SKRIPSI)*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Malang.
- Snoeck, L. H. E. H., R. N. Cornelussen., Van Nieuwenhoven, R. S. Reneman., and Van der Vusse. 2001. *Heat Shock Protein and Cardiovascular Pathophysiology*. Physiological Rev ; 81(4): 1461-85.
- Sirois. 2005. *Laboratory Animal Medicine: Principles and Procedures*. Elsevier. USA.
- Soeharto, I. 2004. *Penyakit jantung Koroner dan Serangan Jantung*. Ed. 2. Gramedia. Jakarta. hlm 279.

- Sofia, D. 2005. *Antioksidan dan radikal bebas*. http://www.chemistry.org/artikel_kimia/berita/antioksidan_dan_radikal_bebas/ diakses 11 November 2013.
- Stahl, E. 1984. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. ITB. Bandung.
- Styrer, L. 2002. *Biokimia Edisi 4, Volume 1*. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Sumardjo, D. 2009. *Pengantar Kimia: Buku Panduan Kuliah Mahasiswa Kedokteran dan Program Strata I Fakultas Bioeksakta*. Ed. 1. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. hlm 161-186.
- Traber, M. G. 2000. *Tobacco Related Disease is a Role For Antioxidant Micronutrient Supplementation*. Science-Direct 21:173-187.
- Widodo, M. A. 1995. *Efek Pemicu Radikal Bebas dan Vitamin E pada Diabetes Komplikasi Pembuluh Darah Tikus Diabetes*. Laporan Penelitian Hibah Bersaing 1992-1995 ; Malang. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas*. Ed. 1. Kanikus. Yogyakarta. hlm 278-281.
- Winarsi, H. 2011. *Pembentukan Senyawa Oksigen Reaktif dan Radikal Bebas, Antioksidan Alami*. Yogyakarta. Kanisius.
- World Health Organization. 2008. *WHO Report on the Global Tobacco Epidemic ,2008 The Power Package*. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/mpower_report_full_2008/en_full.pdf diakses 10 November 2013.
- Yueniwati, Y., dan M. Ali. 2004. *Pengaruh Paparan Asap Rokok Kretek Terhadap Peroksidasi Lemak dan System Proteksi Superoksid Dismutase Hepar Tikus wistar*. Jurnal kedokteran YARSI; 2(1): 85-92.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 128-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : BIOAKTIF AIR REBUSAN AKAR GANTUNG POHON
BERINGIN (*Ficus benjamina* L) UNTUK TERAPI
PENYAKIT BRONKITIS KRONIK PADA PET ANIMALS

PENELITI : AZIZAH NOYA AURIZZA

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 8 April 2013
Ketua Komisi Etik Penelitian
Universitas Brawijaya



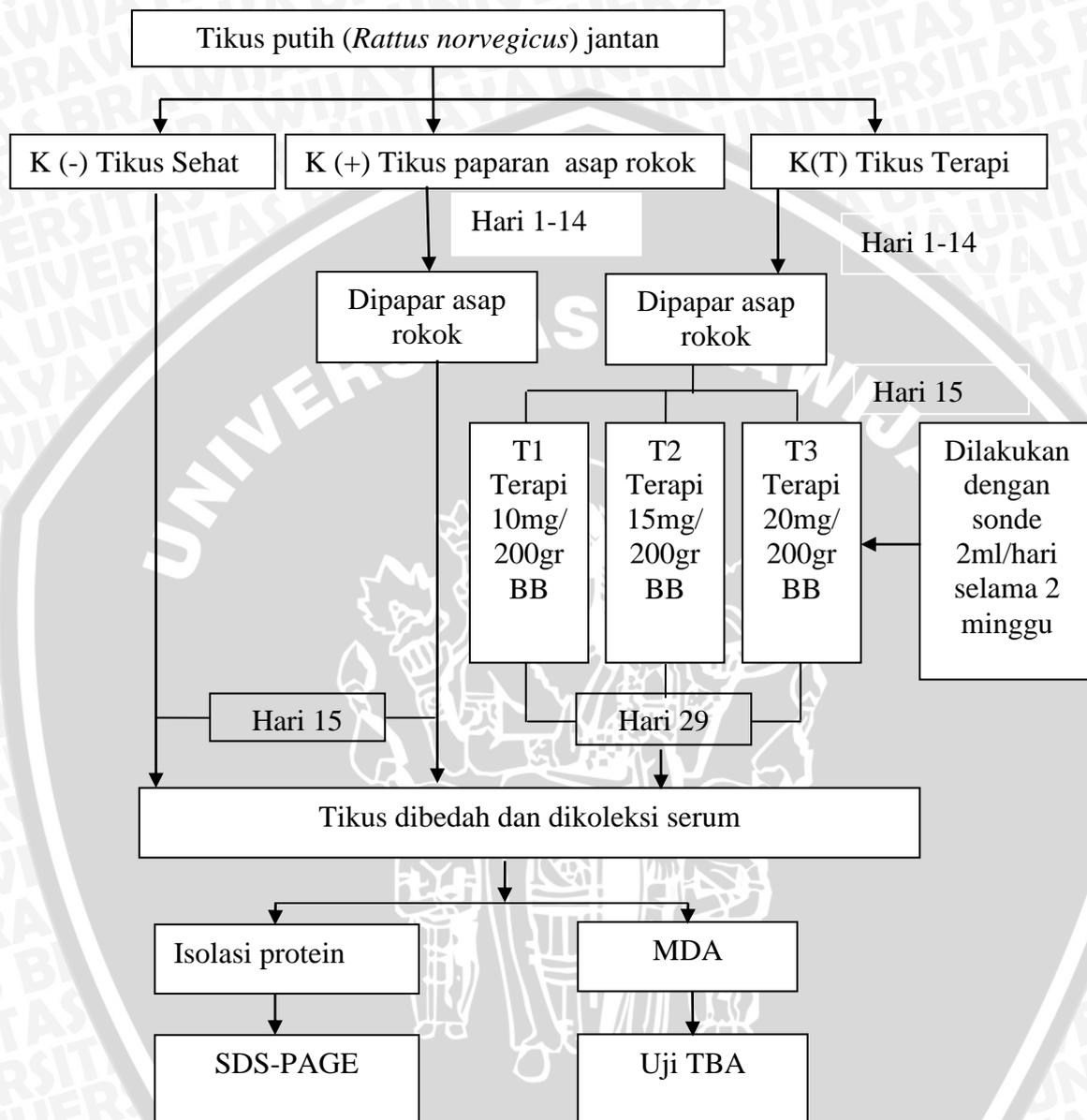
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Lampiran 2. Keterangan Identifikasi Akar Gantung Pohon Beringin

(*Ficus benjamina L.*)

	<p>LABORATORIUM TAKSONOMI, STRUKTUR DAN PERKEMBANGAN TUMBUHAN JURUSAN BIOLOGI, FAKULTAS MIPA UNIVERSITAS BRAWIJAYA JALAN VETERAN, MALANG 65145 Telepon/faks: 0341-575841</p>
	<p>KETERANGAN IDENTIFIKASI</p> <p>No. 0084/Takso.Identifikasi/03/2013</p>
<p>Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, menerangkan bahwa spesimen yang dibawa oleh:</p>	
<p>Nama :</p>	<p>Azizah Noya Aurizza (NIM. 115130101111061) Rima Malysa Hardi (NIM. 105130101111030) Tari Cahyani (NIM. 105130101111014) Andita Ariestika A (NIM. 105130101111047) Yohana Maria Karo (NIM. 1151301001111047)</p>
<p>Instansi :</p>	<p>Program Kedokteran Hewan, Universitas Brawijaya</p>
<p>Berdasarkan deskripsi karakter dan kunci identifikasi pada Flora of Java (Backer dan Van den Brink, 1968), volume II, halaman 24, diidentifikasi sebagai:</p>	
<p>Familia</p>	<p>: Moraceae</p>
<p>Genus</p>	<p>: <i>Ficus</i></p>
<p>Species</p>	<p>: <i>Ficus benjamina L.</i></p>
<p>Demikian surat keterangan identifikasi ini dibuat untuk digunakan seperlunya.</p>	
<p>Malang, 27 Maret 2013</p>	
<p>Kepala Laboratorium Taksonomi, Struktur dan Perkembangan Tumbuhan,</p>	
<p>  Dr. Serafin Indriyani, M.Si. NIP. 19630909 198802 2 001</p>	

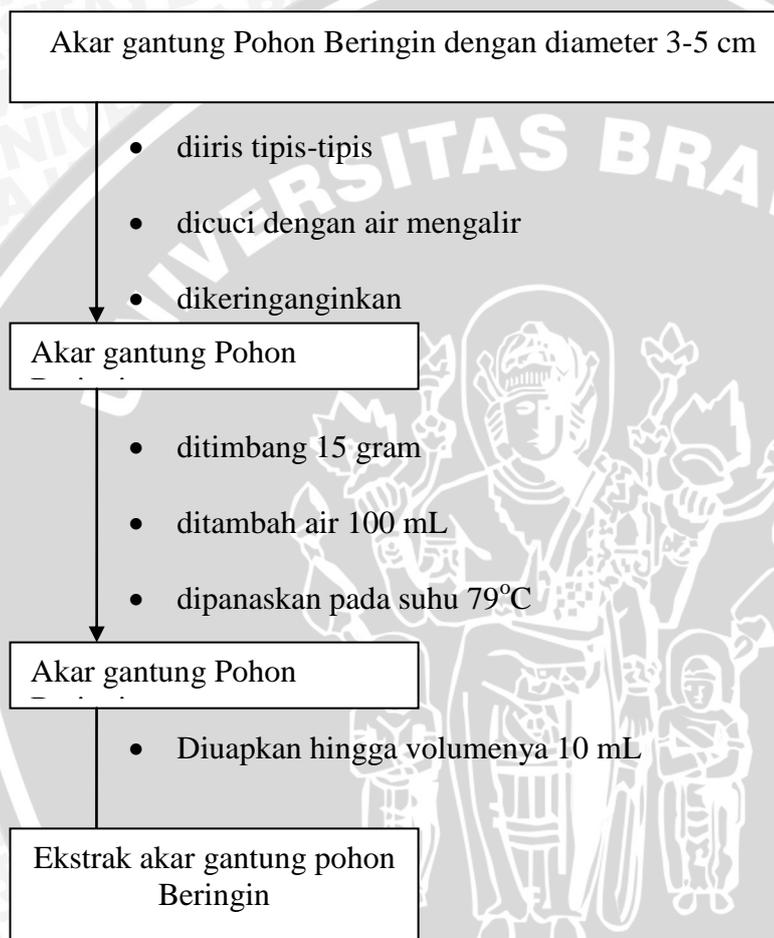
Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian



Lampiran 4. Analisis Bioaktif Akar Gantung Pohon Beringin

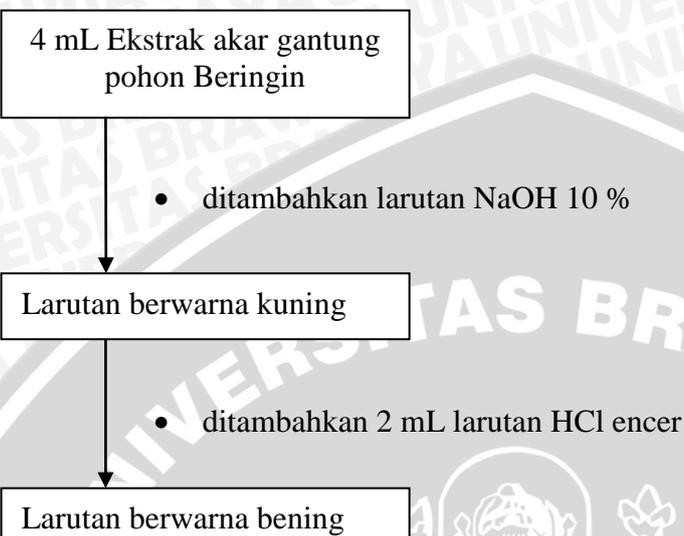
(*Ficus benjamina L.*)

4.1 Pembuatan ekstrak akar gantung pohon beringin

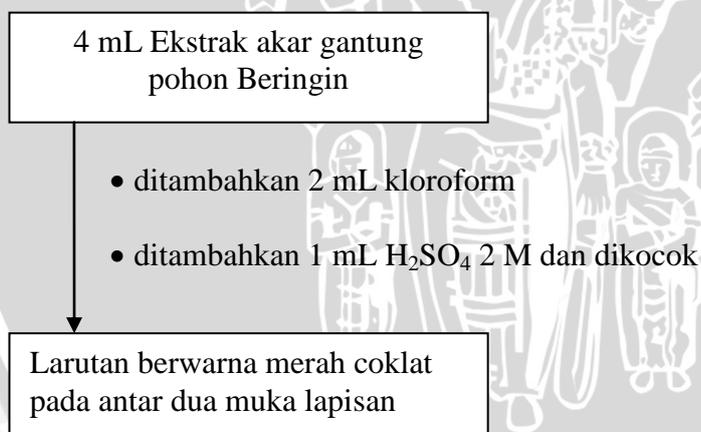


4.2 Uji Fitokimia Ekstrak Akar Gantung Pohon Beringin

A. Uji Flavonoid



B. Uji Terpenoid



C. Uji Alkaloid

4 mL Ekstrak akar gantung
pohon Beringin

- ditambahkan 10 mL kloroform dan ammonia 0,05 M
- ditambahkan 1 mL H₂SO₄ 2 M dan dikocok

Terbentuk 2 lapisan, lapisan
asam sulfat diatas

- ditambah pereaksi Wagner

Terbentuk endapan alkaloid coklat
pada larutan

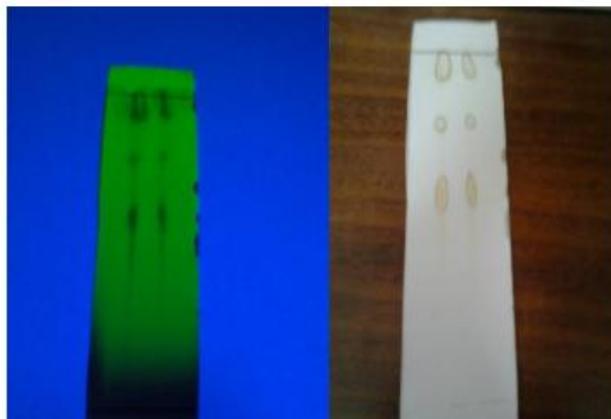
D. Uji KLT (Kromatografi lapis Tipis)

Ekstrak

- diteteskan pada plate silika sebanyak 1 µL
- dicelupkan ke dalam eluen
- didiamkan
- diamati pergerakan ekstrak dan eluen naik ke atas sampai batas
- diangkat
- dikeringkan
- dilihat menggunakan sinar UV
- diamati
- jika terdapat spot dilihat dengan spektrofotometri IR

Hasil

Hasil Uji KLT



Gambar 4.1 Hasil Uji KLT

Dari hasil KLT terbentuk 3 noda pada plat yang dibagi menjadi spot A, B dan C. Kemudian ketiga spot tersebut dikerok dan dianalisis menggunakan spektrofotometer infra red (IR). Nilai Rf dari spot A, B, C berturut-turut yakni 0,56; 0,77; 0,95. Untuk mengkonfirmasi gugus-gugus fungsi dari senyawa flavonoid digunakan spektrum standar asam galat karena asam galat memiliki kerangka dasar sama dengan senyawa polifenol.

Tabel 4.1 Interpretasi Serapan Infra Merah (IR) Sampel dan Standar

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)					Interpretasi
	Spot A	Spot B	Spot C	Standar Asam Galat	Referensi	
1.	3.436,91	3.495,86	3.481,27	3.407,05 3.554,50	3200-365	O-H (alkohol, fenol)
2.	-	-	-	2.960,40 2.931,51 2.865,75	2.850-3.000	C-H alifatic
3.	1.731,96	1.733,89	1.731,96	-	1.705-1.750	C=O aldehyd, keton, asam karboksilat dan ester
4.	1.631,67		1.650,95	1.639,70	1.600-1.680	C=C alkena
5.		1.635,52	1.636,52	1.509,58	1.475-1.600	C=C aromatik
6.		1.558,38	1.566,09	1.420,99	1.370-1.465	C-H alifatik
7.	1.099,35	1.095,49	1.417,58 1.091,63	1.153,78 1.097,08	1.000-1.300 1020-1150	C-O (alkohol, eter, ester, dan asam karboksilat) C-N amina
8.	806,19	806,19	804,26	777,58 763,13	690-900	C-H aromatik

Dari tabel 4.1 dapat diketahui bahwa akar gantung pohon beringin mengandung senyawa fenolik berupa flavonoid yang ditandai dengan adanya gugus OH.

Lampiran 5. Pembedahan Hewan Coba

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 3 bulan

- didislokasi bagian leher
- diletakkan pada papan bedah dengan posisi rebah dorsal
- dilakukan pembedahan pada daerah inguinal membentuk huruf V menggunakan gunting bedah diambil darah dari jantung

Darah untuk diambil serum



Lampiran 6. Pengukuran Kadar MDA Serum

6.1 Pembuatan Kurva Baku MDA

Larutan Standar MDA konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 $\mu\text{g/mL}$

- dipipet 100 μL
- dimasukkan dalam mikrotube
- ditambahkan 550 μL akuades steril
- ditambah 100 μL TCA 10 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 250 μL HCl 1 N dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 100 μL Na-Thio 1% dan dihomogenkan dengan *vortex*
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit
- dipanaskan dalam *waterbath* 100 $^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit
- dibiarkan pada suhu ruang
- diukur λ_{maks} menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada $\lambda = 500\text{-}600\text{ nm}$
- diukur absorbansi tiap-tiap larutan standar menggunakan λ_{maks}

Absorbansi MDA larutan baku dan kurva

6.2 Pengukuran Kadar MDA Serum Menggunakan Uji TBA

100 μ L sampel serum

- dimasukkan dalam mikrotube
- ditambahkan 550 μ L akuades steril
- ditambah 100 μ L TCA 10 % dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 250 μ L HCl 1 N dan dihomogenkan dengan *vortex*
- ditambah 100 μ L Na-Thio 1% dan dihomogenkan dengan *vortex*
- disentrifugasi 500 rpm selama 10 menit
- dipanaskan dalam *waterbath* 100 °C selama 30 menit
- dibiarkan pada suhu ruang
- diukur absorbansinya pada λ_{maks}

Absorbansi MDA serum

6.3 Pembuatan TCA

Membuat TCA 100mL yaitu dengan menggunakan padatan TCA sebanyak 10 gram dan dilarutkan dalam akuabides dalam labu ukur 100 mL.

6.4 Pembuatan HCl 1 N

$$N = M e$$

$$\text{Mol} = M \times V$$

$$= 1 \times V$$

$$= 0,1 \text{ mol}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Berat} &= \text{mol} \times \text{BM} \\
 &= 0,1 \text{ mol} \times 36,5 \text{ gr/mol} \\
 &= 3,65 \text{ gram} \\
 \rho &= 1,268 \text{ gr/mL} \\
 V &= \frac{3,65 \text{ gram}}{1,268 \text{ gram/mL}} = 2,878 \text{ mL} \\
 V &= \frac{100}{37} \times 2,878 \\
 &= 7,780 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Dipipet 7,780 mL atau 7780 μL HCl 37% dengan mikropipet, kemudian dimasukkan labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades hingga tanda batas.

6.5 Pembuatan Na-Thiobarbituric

Pembuatan Na-thiobarbituric acid dan 0,241 gram NaOH, kemudian dilarutkan dalam akuabidest dan diencerkan dalam labu ukur 100 mL.

6.6 Preparasi Larutan Stok MDA

Stok kit MDA:

$$\begin{aligned}
 \text{Densitas} &= 0,997 \text{ gr/L} \\
 &= 0,997 \cdot 10^3 \mu\text{gr/mL}
 \end{aligned}$$

Stok larutan MDA konsentrasi 8 $\mu\text{gr/mL}$

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 0,997 \cdot 10^3 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 8 \mu\text{gr/mL}$$

$$\begin{aligned}V_1 &= 0,08 \text{ mL} \\ &= 80 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Diambil stok kit MDA 80 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 7 $\mu\text{gr/mL}$

$$\begin{aligned}V_1M_1 &= V_2M_2 \\ V_1 \times 8 \mu\text{gr/mL} &= 10 \text{ mL} \times 7 \mu\text{gr/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 &= 8,75 \text{ mL} \\ &= 8750 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 8 $\mu\text{gr/mL}$ sebanyak 8750 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 6 $\mu\text{gr/mL}$

$$\begin{aligned}V_1M_1 &= V_2M_2 \\ V_1 \times 7 \mu\text{gr/mL} &= 10 \text{ mL} \times 6 \mu\text{gr/mL}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V_1 &= 8,571 \text{ mL} \\ &= 8571 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 7 $\mu\text{gr/mL}$ sebanyak 8571 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 5 $\mu\text{gr/mL}$

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1 \times 6 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 5 \mu\text{gr/mL}$$

$$V_1 = 8,333 \text{ mL}$$

$$= 8333 \mu\text{L}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 6 $\mu\text{gr/mL}$ sebanyak 8333 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 4 $\mu\text{gr/mL}$

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 5 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 4 \mu\text{gr/mL}$$

$$V_1 = 8 \text{ mL}$$

$$= 8000 \mu\text{L}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 5 $\mu\text{gr/mL}$ sebanyak 8000 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 3 $\mu\text{gr/mL}$

$$V_1 M_1 = V_2 M_2$$

$$V_1 \times 4 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \mu\text{gr/mL}$$

$$V_1 = 7,5 \text{ mL}$$

$$= 7500 \mu\text{L}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 4 $\mu\text{gr/mL}$ sebanyak 7500 μL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 2 µgr/mL

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1 \times 3 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 2 \mu\text{gr/mL}$$

$$V_1 = 6,667 \text{ mL}$$

$$= 6667 \mu\text{L}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 3 µgr/mL sebanyak 6667 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL.

Stok larutan MDA konsentrasi 1 µgr/mL

$$V_1M_1 = V_2M_2$$

$$V_1 \times 2 \mu\text{gr/mL} = 10 \text{ mL} \times 3 \mu\text{gr/mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

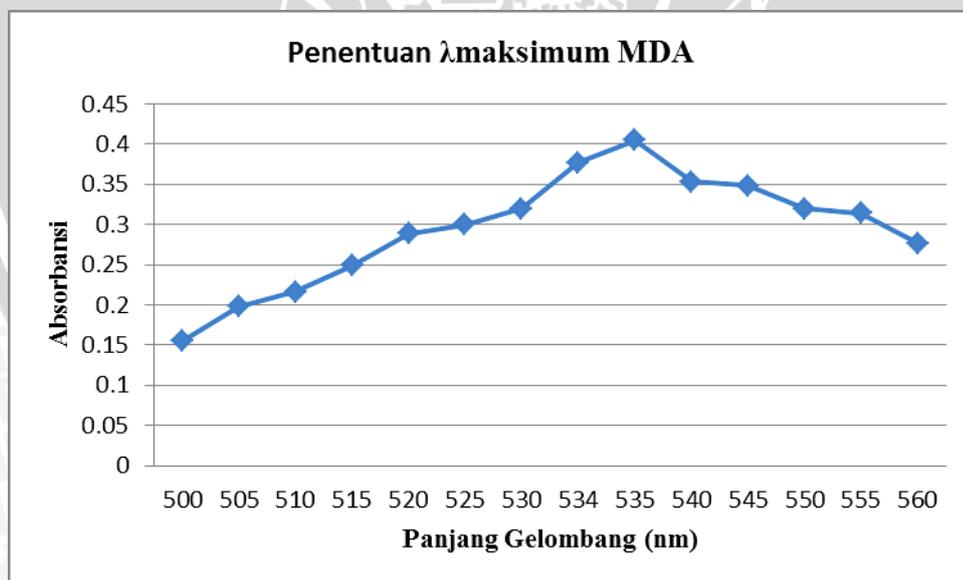
$$= 5000 \mu\text{L}$$

Diambil stok kit MDA konsentrasi 2 µgr/mL sebanyak 5000 µL dengan mikropipet dan diencerkan dengan akuades dalam labu ukur 10 mL

Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

Tabel 7.1 Absorbansi larutan baku MDA 4 µg/mL

λ (nm)	Absorbansi
500	0,155
505	0,198
510	0,216
515	0,249
520	0,289
525	0,3
530	0,32
534	0,377
535	0,405
540	0,353
545	0,348
550	0,32
555	0,314
560	0,277

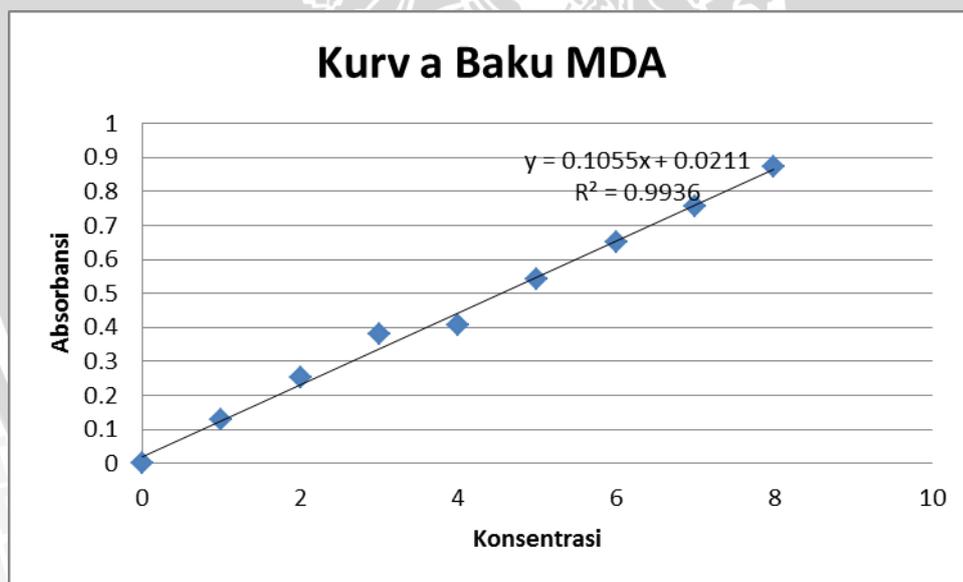


Gambar 7.1 Kurva serapan MDA

Lampiran 8. Pembuatan Kurva Baku MDA

Tabel 8.1 Absorbansi larutan baku MDA λ 535 nm

Konsentrasi MDA ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0
1	0,128
2	0,253
3	0,381
4	0,405
5	0,541
6	0,65
7	0,758
8	0,872



Gambar 8.1 Kurva baku MDA

Tabel 8.2 Data absorbansi MDA

Perlakuan	U1	U2	U3	U4
Sehat (K-)	0,055071	0,056021	0,054755	0,054966
Paparan asap rokok (K+)	0,08018	0,078281	0,079125	0,081341
Terapi 1	0,072584	0,071213	0,073112	0,070474
Terapi 2	0,06541	0,065199	0,068048	0,067098
Terapi 3	0,058975	0,061718	0,059608	0,060979

Tabel 8.3 Data MDA

Perlakuan	U1	U2	U3	U4	Rata-rata
Sehat (K-)	0,322	0,311	0,319	0,321	0,323
Paparan asap rokok (K+)	0,56	0,542	0,55	0,571	0,556
Terapi 1	0,488	0,475	0,493	0,468	0,481
Terapi 2	0,42	0,418	0,445	0,436	0,430
Terapi 3	0,359	0,385	0,365	0,378	0,372

Presentasi penurunan dan kenaikan kadar MDA pada serum hewan coba yang di paparkan dan diterapi dengan rebusan akar gantung pohon beringin sebagai berikut:

Kelompok Positif

$$\begin{aligned} \text{Kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Negatif}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,556 - 0,323}{0,556} \times 100\% \\ &= 41,9\% \end{aligned}$$

Terapi I

$$\begin{aligned} \text{Kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi I}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,556 - 0,481}{0,556} \times 100\% \\ &= 13,48\% \end{aligned}$$

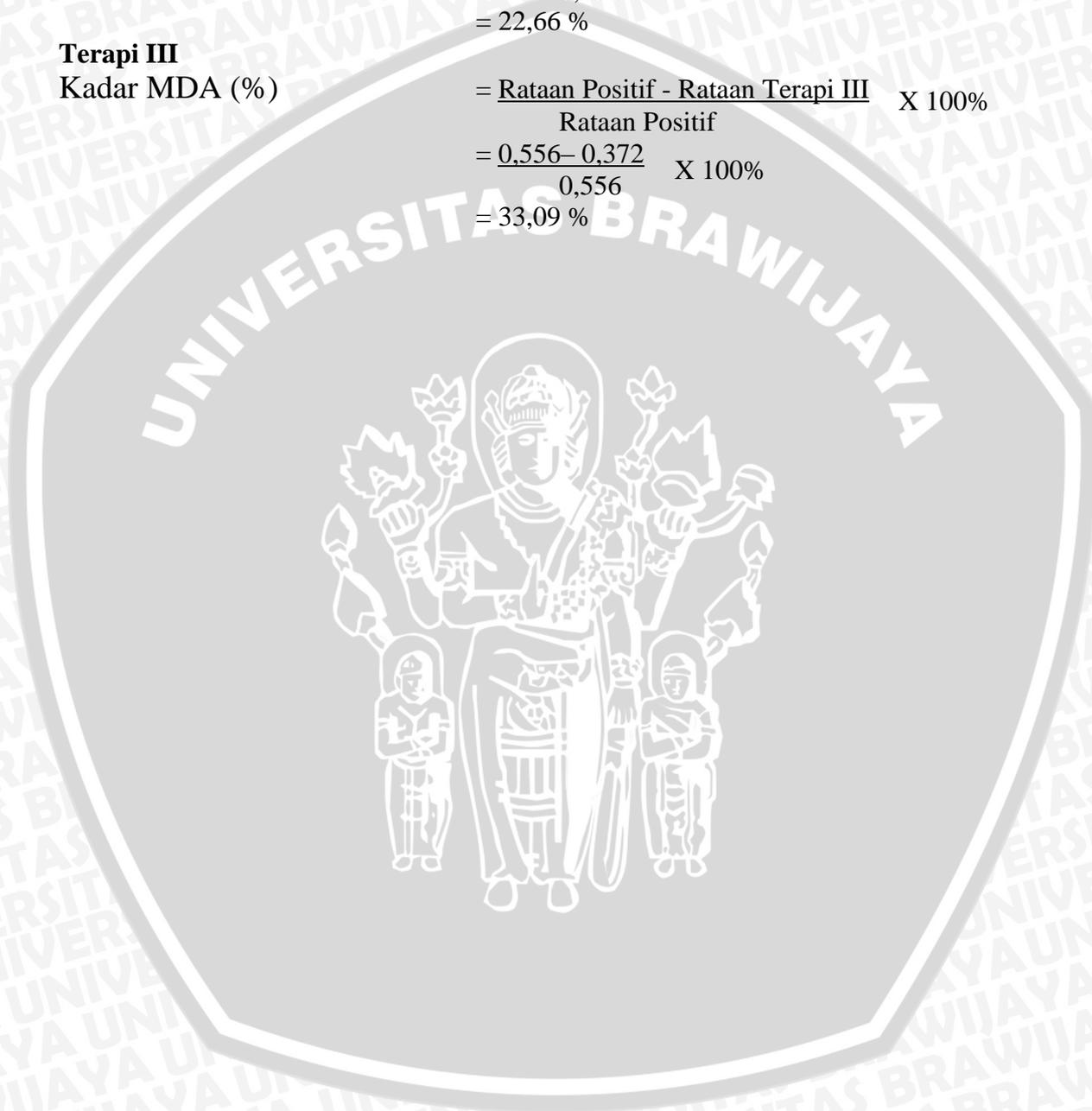


Terapi II

$$\begin{aligned} \text{Kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi II}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,556 - 0,430}{0,556} \times 100\% \\ &= 22,66\% \end{aligned}$$

Terapi III

$$\begin{aligned} \text{Kadar MDA (\%)} &= \frac{\text{Rataan Positif} - \text{Rataan Terapi III}}{\text{Rataan Positif}} \times 100\% \\ &= \frac{0,556 - 0,372}{0,556} \times 100\% \\ &= 33,09\% \end{aligned}$$



Lampiran 9. Data dan Uji Statistika Kadar MDA

9.1 Uji Normalitas Data

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perlakuan	,155	20	,200*	,896	20	,035
KadarMDA	,113	20	,200*	,934	20	,186

a. Test distribution is Normal

9.2 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

KadarMDA

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,902	4	15	,163

Pengujian dapat menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi

9.3 Uji One Way ANOVA

ANOVA

Kadar MDA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,133	4	,033	264,283	,000
Within Groups	,002	15	,000		
Total	,135	19			



Kadar MDA

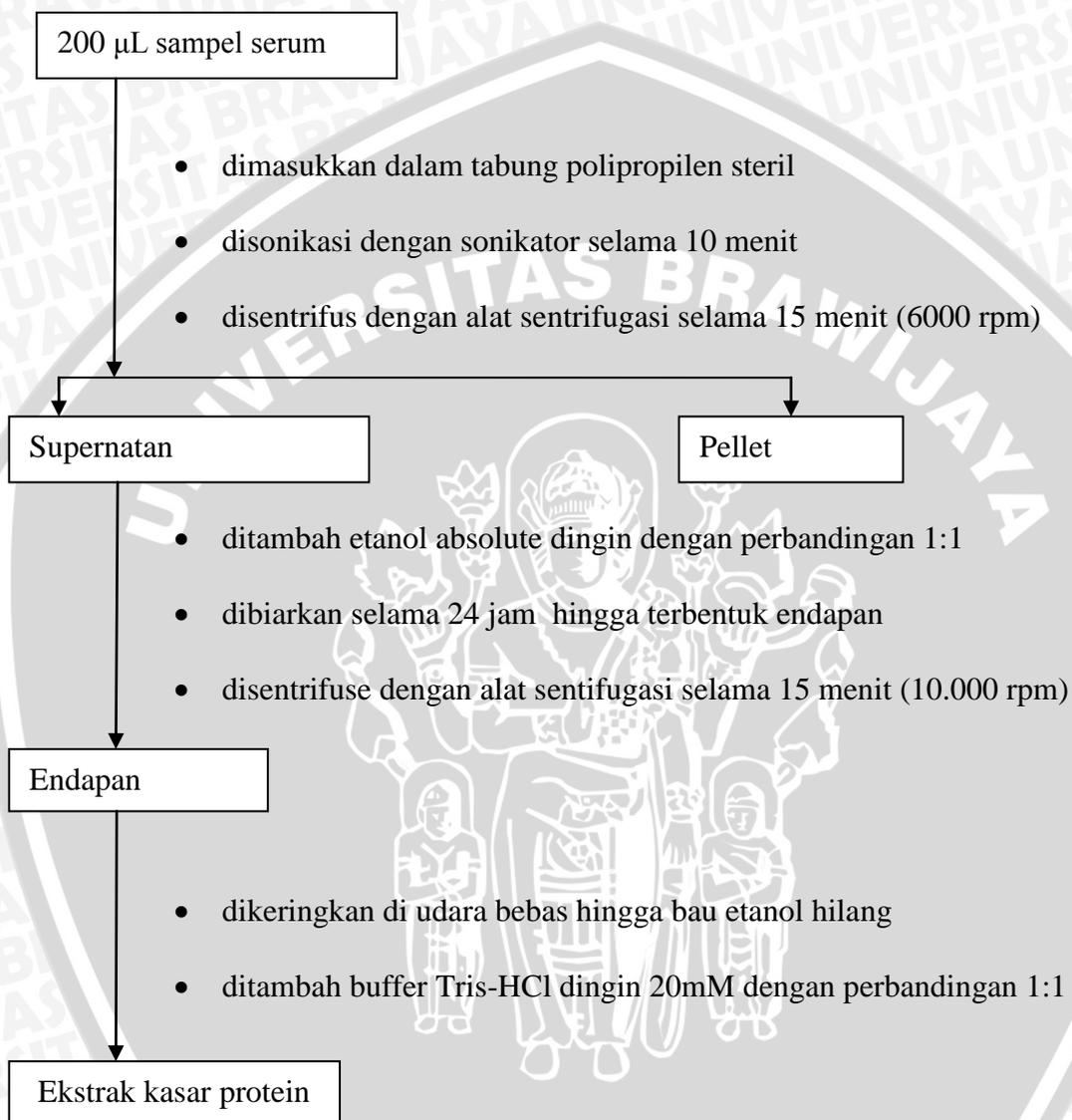
Tukey HSD^a

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
Kontrol	4	,323250				
Terapi 3	4		,371750			
Terapi 2	4			,429750		
Terapi 1	4				,481000	
Sakit	4					,555750
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

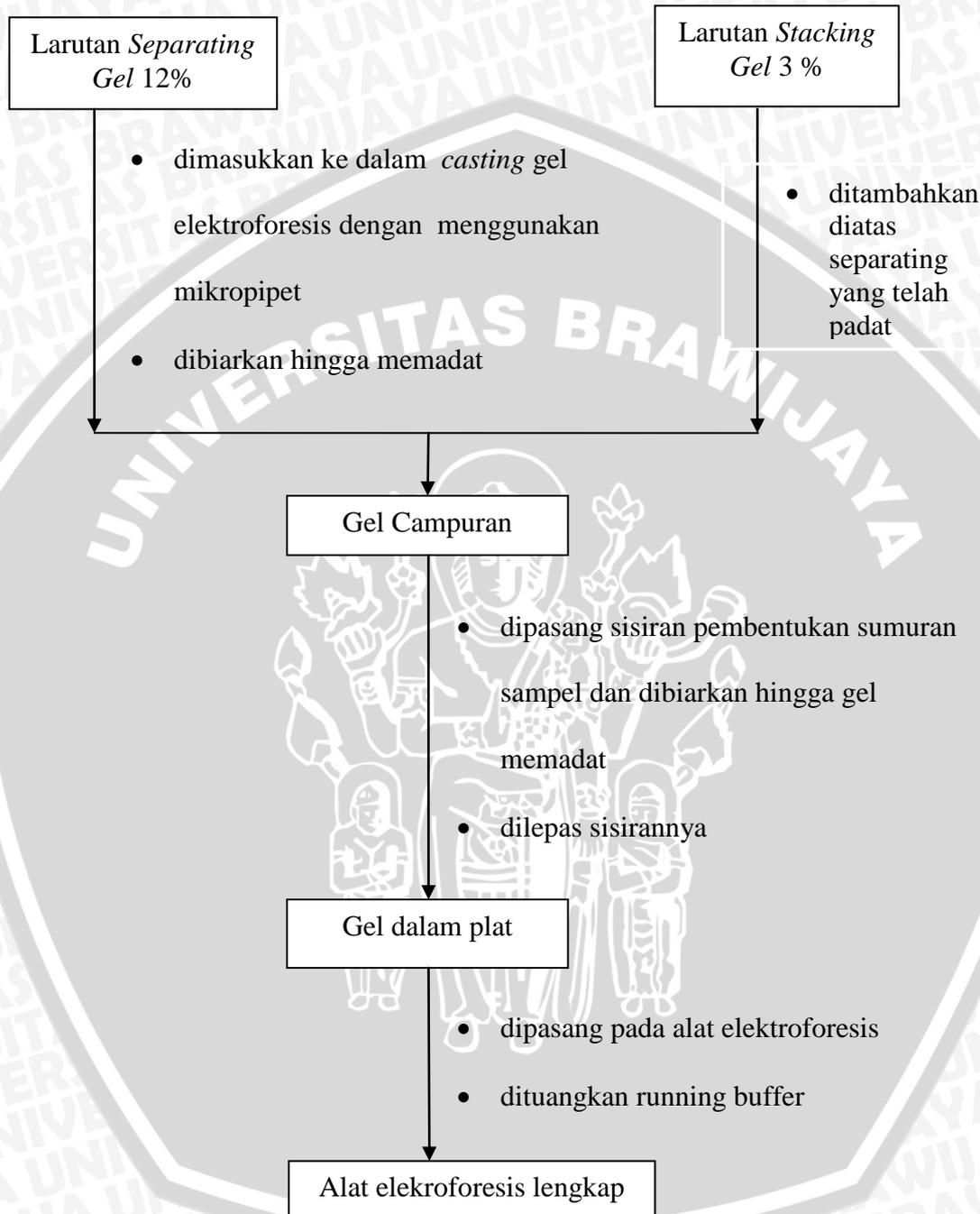
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4,000.



Lampiran 10. Analisis Profil Pita Protein Serum Menggunakan SDS-PAGE**10.1 Isolasi Protein Serum**

10.2 Persiapan Gel



10.3 Injeksi Sampel dan Running

15 μ L Isolat sampel + Tris-HCl

- dimasukkan dalam tabung mikro
- ditambah dengan RSB (perbandingan volume 1:1)
- dipanaskan pada suhu 100°C selama 5 menit pada waterbath
- didinginkan pada suhu ruang dan ditambah dengan sucrose atau gliserol 20% serta bromophenol blue
- disuntikkan ke dalam sumuran
- dilakukan running dengan arus 30 mA, 130 V hingga warna biru berada kurang lebih 0,5 cm dari batas bawah plat gel

Gel hasil running

- direndam dalam larutan staining sambil dikocok menggunakan *shaker* selama 45 menit
- direndam dalam larutan destaining sambil dikocok menggunakan *shaker* hingga pita pada gel tampak jelas

Pita-pita pada gel hasil elektroforesis

- ditentukan harga R_f dan massa molekul relatifnya masing-masing

Data

10.4 Penentuan Berat Molekul

Penentuan berat molekul dilakukan dengan menghitung nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing profil pita dimana:

$$R_f = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

10.5 Komposisi Larutan Separating Gel 12 %

Bahan	Volume (μL)
LGB	415
T-akril	2000
ddH ₂ O	1700
APS 10%	70
TEMED	7

10.6 Komposisi Larutan Stacking Gel 3%

Bahan	Volume(μL)
UGB	415
T-akril	267
ddH ₂ O	975
APS 10%	20
TEMED	2

10.7 Pembuatan Larutan Poliakrilamida (T-Akril)

Langkah awal yang harus dilakukan adalah ditimbang 2,92 gram akrilamida dan 0,0801 gram bisakrilamida, lalu dilarutkan dengan 7 mL akuades steril dengan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

10.8 Pembuatan Larutan Lower Gel Buffer (LGB) pH 8,8

Tahapan yang harus dilakukan pertama kali adalah menimbang 1,32 gram Tris-base dan 0,0401 gram SDS, lalu dilarutkan dengan 5 mL akuades steril dengan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer serta diatur pHnya hingga 8,8. Kemudian, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

10.9 Pembuatan Larutan Upper Gel Buffer (UGB) pH 6,8

Larutan UGB dapat dibuat dengan mula-mula menimbang 0,75 gram Tri-base dan 0,0401 gram SDS, kemudian dilarutkan dengan 5 mL akuades steril. Lalu, diatur pHnya hingga 6,8. Selanjutnya, dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

10.10 Pembuatan *Running Buffer*

Larutan running buffer dibuat dengan mula-mula menimbang 3,03 gram Tri-base, 14,40 gram glisin dan 1,00 gram SDS kemudian dilarutkan dalam 1 liter akuades steril.

10.11 Pembuatan Larutan Pewarna (Staining)

Langkah awal yang harus dilakukan adalah ditimbang 0,2501 gram Commaive Brilliant Blue R-250, dilarutkan dengan 45,4 mL methanol 99,9% dan 9,2 mL asam asetat glasial. Lalu ditambah dengan akuades steril hingga volumenya mencapai 100 mL.

10.11 Pembuatan Larutan Penghilang Warna (Destaining)

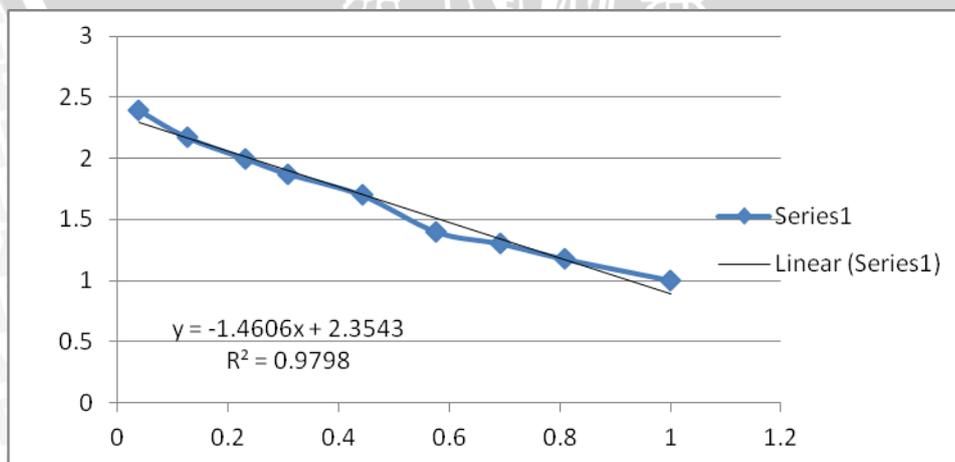
Larutan destaining dapat dibuat dengan terlebih dahulu dipipet 7 mL asam asetat glasial dan 7 mL methanol 99,9%, lalu dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan akuades steril hingga tanda batas.

10.12 Perhitungan Berat Molekul

Kurva baku terlebih dahulu dibuat untuk mengetahui berat molekul protein sampel. Berikut adalah kurva protein standar yang diperoleh.

Tabel 10.1 Berat Molekul Marker

BM	Log BM	a	b	Rf
250	2.39794	0,2	5,2	0,038462
150	2,176091	0,65	5,2	0,125
100	2	1,2	5,2	0,230769
75	1,875061	1,6	5,2	0,307692
50	1,69897	2,3	5,2	0,442308
25	1,39794	3	5,2	0,576923
20	1,30103	3,6	5,2	0,692308
15	1,176091	4,2	5,2	0,807692
10	1	5,2	5,2	1



Gambar 10.1 Kurva baku marker

Cara menghitung berat molekul yakni:

Misal a=0,62 ; b= 5,2

$$Rf \text{ diperoleh dengan cara : } Rf(x) = \frac{a}{b} = \frac{0,62}{5,2} = 0,119$$

Kemudian nilai Rf (x) dimasukkan ke dalam persamaan linier kurva baku standar

$$\text{marker, } Mr(y) = -1,4606(0,119) + 2,3543 = 2,0735$$

Nilai y ini digunakan untuk menghitung nilai BM yakni dengan cara :

$$BM = \text{antilog } Mr(y)$$

$$BM = \text{antilog } 2,0735$$

$$BM = 151,4 \text{ kDa}$$

Tabel 10.2 Berat molekul protein hewan coba sehat

Pita ke-	a	b	Rf (x)	y	BM (kDa)
1	0,21	5,2	0,040385	2.295338	197.3961
2	0,48	5,2	0,092308	2,219531	165.7795
3	1	5,2	0,192308	2,07351	118.4488
4	1,55	5,2	0,298077	1.919108	83.00566
5	1,88	5,2	0,361538	1.826454	67.0585
6	2,4	5,2	0,461538	1.680454	47.91305
7	2,55	5,2	0,490385	1.638338	43.4849
8	3,12	5,2	0,6	1.402492	25.26343

Tabel 10.3 Berat molekul protein hewan coba yang dipapar asap rokok

Pita ke-	a	b	Rf (x)	y	BM (kDa)
1	0,21	5,2	0,040385	2.295338	197.3961
2	0,48	5,2	0,092308	2,219531	165.7795
3	0,62	5,2	0,119231	2,180223	151,4339
4	1	5,2	0,192308	2,07351	118.4488
5	1,55	5,2	0,298077	1.919108	83.00566
6	1,88	5,2	0,361538	1.826454	67.0585
7	2,4	5,2	0,461538	1.680454	47.91305
8	2,55	5,2	0,490385	1.638338	43.4849
9	3,12	5,2	0,6	1.402492	25.26343

Tabel 10.4 Berat molekul protein hewan terapi 1

Pita ke-	a	b	Rf (x)	y	BM (kDa)
1	0,21	5,2	0,040385	2.295338	197.3961
2	0,48	5,2	0,092308	2,219531	165.7795
3	0,62	5,2	0,119231	2,180223	151,4339
4	1	5,2	0,192308	2,07351	118.4488
5	1,55	5,2	0,298077	1.919108	83.00566
6	1,88	5,2	0,361538	1.826454	67.0585
7	2,4	5,2	0,461538	1.680454	47.91305
8	2,55	5,2	0,490385	1.638338	43.4849
9	3,12	5,2	0,6	1.402492	25.26343

Tabel 10.4 Berat molekul protein hewan terapi 2

Pita ke-	a	b	Rf (x)	y	BM (kDa)
1	0,21	5,2	0,040385	2.295338	197.3961
2	0,48	5,2	0,092308	2,219531	165.7795
3	0,62	5,2	0,119231	2,180223	151,4339
4	1	5,2	0,192308	2,07351	118.4488
5	1,55	5,2	0,298077	1.919108	83.00566
6	1,88	5,2	0,361538	1.826454	67.0585
7	2,4	5,2	0,461538	1.680454	47.91305
8	2,55	5,2	0,490385	1.638338	43.4849
9	3,12	5,2	0,6	1.402492	25.26343

Tabel 10.2 Berat molekul protein hewan coba terapi 3

Pita ke-	a	b	Rf (x)	y	BM (kDa)
1	0,21	5,2	0,040385	2.295338	197.3961
2	0,48	5,2	0,092308	2,219531	165.7795
3	1	5,2	0,192308	2,07351	118.4488
4	1,55	5,2	0,298077	1.919108	83.00566
5	1,88	5,2	0,361538	1.826454	67.0585
6	2,4	5,2	0,461538	1.680454	47.91305
7	2,55	5,2	0,490385	1.638338	43.4849
8	3,12	5,2	0,6	1.402492	25.26343