

## BAB 4

### HASIL PENELITIAN

#### 4.1 Uji Fitokimia

Hasil uji fitokimia kualitatif terhadap buah *Aegle marmelos* menunjukkan bahwa buah *Aegle marmelos* memiliki kandungan senyawa aktif metabolit sekunder terdiri dari golongan flavonoid, fenolik, terpenoid dan alkaloid. (Tabel 4.1)

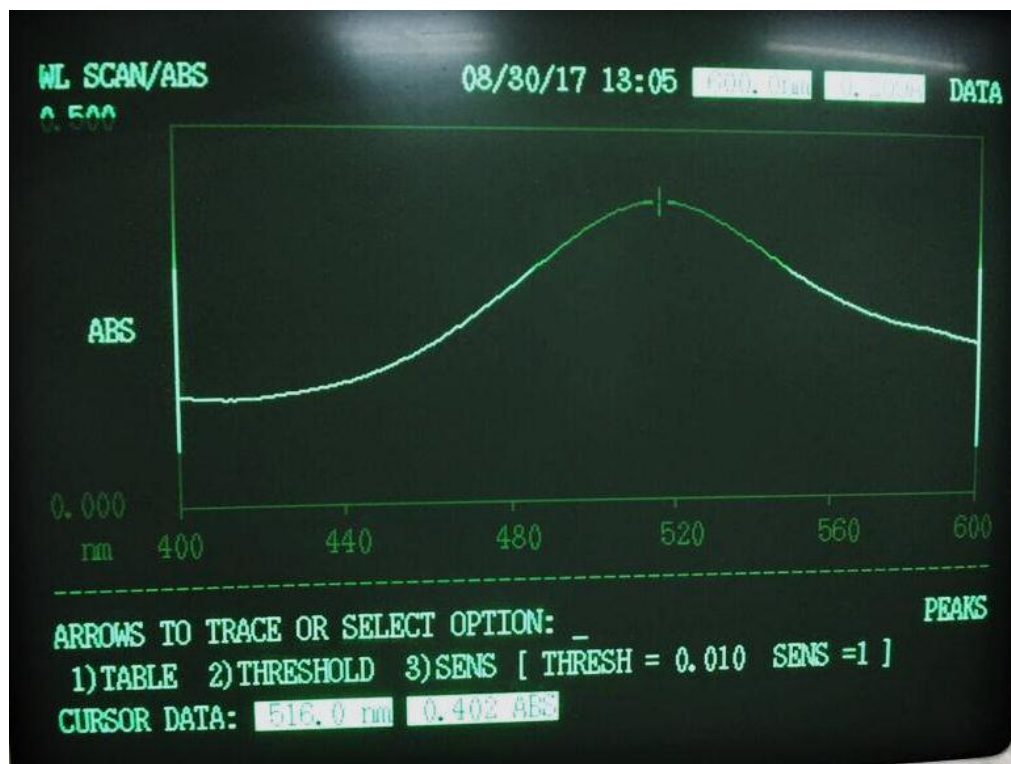
Tabel 4.1 Hasil Uji Fitokimia buah *Aegle marmelos*

Golongan senyawa	Hasil Uji	Keterangan
Flavonoid	+	Endapan merah
Fenolik	+	Endapan hijau
Steroid	-	Tidak terbentuk endapan atau warna
Terpenoid	+	Cincin warna coklat kemerahan
Alkaloid :		
Meyer	+	Endapan putih
Dragendoff	+	Endapan jingga

#### 4.2 Uji Kapasitas Total DPPH

##### 4.2.1 Panjang Gelombang Optimum DPPH

Penentuan panjang gelombang optimum DPPH dilakukan menggunakan spektrofotometer *double beam*. Didapatkan hasil optimum pada 516 nm dengan nilai absorbansi tertinggi sebesar 0.402 dan dipakai sebagai blanko (Gambar.4.1).



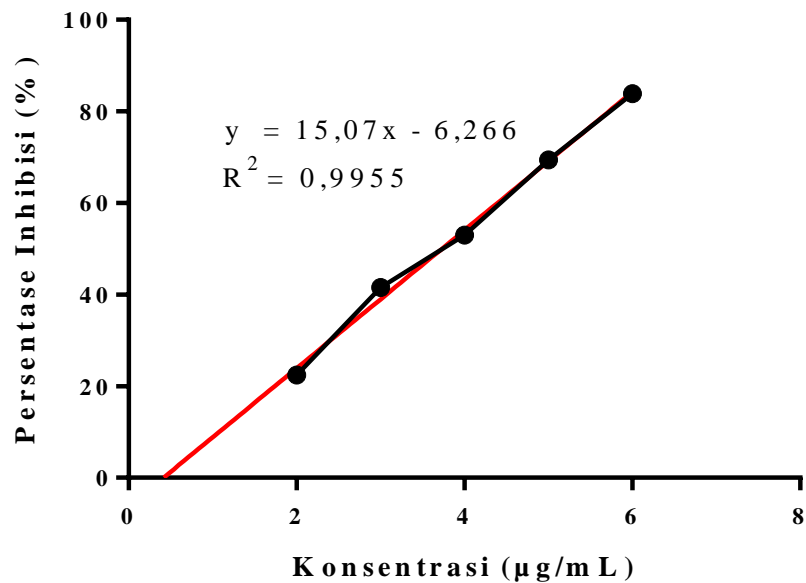
Gambar 4.1 Panjang Gelombang Optimum DPPH

#### 4.2.2 Uji Kapasitas Total DPPH Asam Askorbat

Aktivitas antioksidan pada asam askorbat diukur dengan cara menghitung  $IC_{50}$  pada asam askorbat.  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi asam askorbat yang dibutuhkan dalam menghambat sebanyak 50% oksidan pada DPPH. Dari hasil pemeriksaan standar asam askorbat berbagai konsentrasi, di dapatkan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari % inhibisi untuk membuat kurva standar (Gambar 4.2). Dari kurva standar di dapatkan persamaan garis linear  $y = 15,07x - 6,266$  dengan  $R^2 = 0,9955$ . Dari persamaan garis dicari nilai  $IC_{50}$  dan di dapatkan sebesar  $3,73 \mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.2).

Tabel 4.2 % Inhibisi dan IC<sub>50</sub> Standar Asam Askorbat

	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi	% Inhibisi (%)	IC 50 µg/mL
Standard Asam Askorbat	2	0,312	22,39	3,73
	3	0,235	41,54	
	4	0,189	52,99	
	5	0,123	69,40	
	6	0,065	83,83	



Gambar 4.2 Grafik % Inhibisi Terhadap Konsentrasi Standar Asam Askorbat

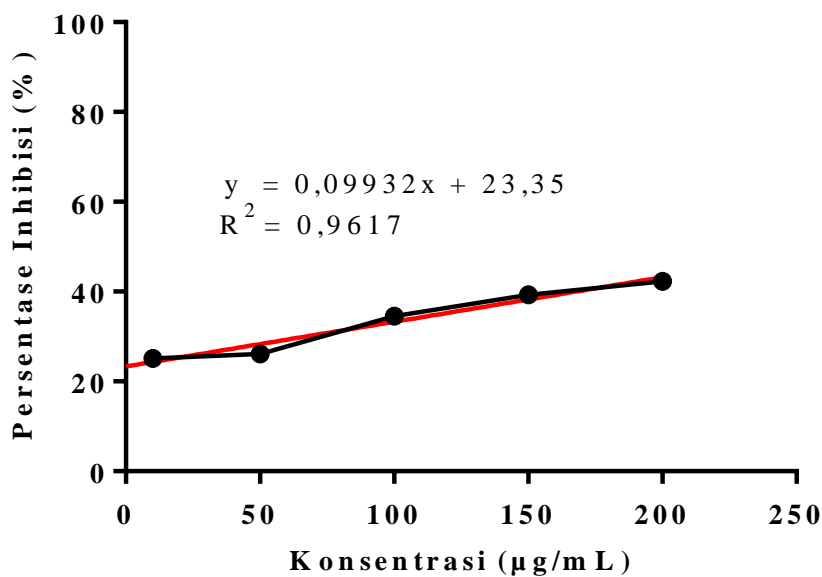
#### 4.2.3 Uji Kapasitas Total DPPH Sampel

Aktivitas dari antioksidan sampel diukur dengan cara menghitung nilai IC<sub>50</sub> sampel, IC<sub>50</sub> sampel adalah konsentrasi yang dibutuhkan sampel dalam menghambat oksidan yang dihasilkan oleh DPPH sebanyak 50%. Dari hasil pemeriksaan sampel pada berbagai konsentrasi, di dapatkan nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari % inhibisi untuk membuat kurva standar, didapatkan persamaan garis linear  $y = 0,09932x + 23,35$  dengan  $R^2 = 0,9617$  (Gambar 4.3).

Dari persamaan garis dicari nilai  $IC_{50}$  dan di dapatkan sebesar  $268,325\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.3).

Tabel 4.3 % Inhibisi dan  $IC_{50}$  Ekstrak buah Maja

	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi	% Inhibisi (%)	$IC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$
	10	0,301	25,12	
Uji Ekstrak	50	0,297	26,12	
Buah <i>Aegle</i>	100	0,263	34,58	268,325
<i>marmelos</i>	150	0,244	39,30	
	200	0,232	42,29	



Gambar 4.3 Grafik % Inhibisi Terhadap Konsentrasi Ekstrak buah Maja

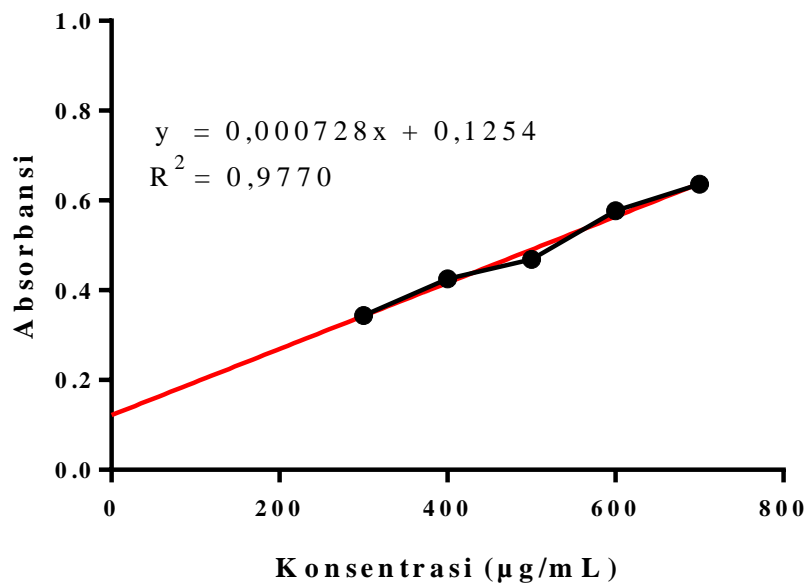
#### 4.3 Uji Fenolik Sampel

Kadar fenolik pada sampel dilakukan pengenceran 5x lalu diukur dengan menggunakan kurva standart tanin. Kurva standar tanin didapat dengan mencari rata-rata absorbansi dari tanin dengan berbagai konsentrasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Tabel 4.4). Dari kurva standart tanin didapatkan persamaan linear  $y = 0,000728x + 0,1254$  dengan  $R^2 = 0,9867$  (Gambar 4.4).

Lalu hasil dari persamaan linear digunakan untuk mencari kadar fenolik sampel dan didapatkan rata-rata absorbansi 0,590 sehingga di dapatkan kadar fenolik total yaitu  $3187,500 \pm 182\mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.5).

Tabel 4.4 Konsentrasi dan Absorbansi Larutan Standar Tanin

	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi I	Absorbansi II	Rata-rata Absorbansi
Standar Tanin	300	0.329	0.359	0.344
	400	0.423	0.427	0.425
	500	0.468	0.470	0.469
	600	0.584	0.570	0.577
	700	0.645	0.619	0.632



Gambar 4.4 Kurva kalibrasi Standar Tanin

Tabel 4.5 Rata-rata Kosentrasi Fenolik Ekstrak buah Maja

		Absorbansi	Konsentrasi ( $\mu\text{g/L}$ )	Rata-rata Konsentrasi ( $\mu\text{g/L}$ )
Uji	I	0,563	3005,495	3187,500 $\pm$ 182
Sampel	II	0,616	3369,506	

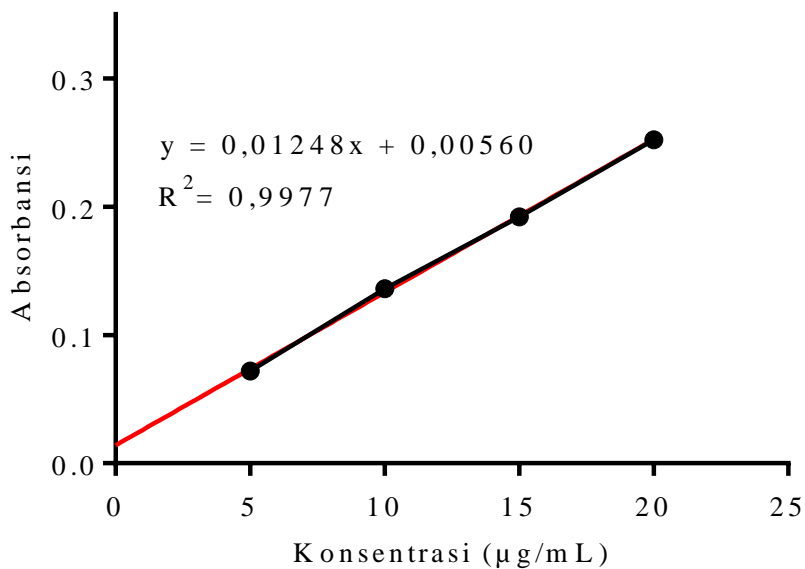
Nilai rata-rata  $\pm$ SEM

#### 4.4 Uji Flavonoid Sampel

Kadar flavonoid pada sampel diukur dengan menggunakan kurva standart kuersetin. Kurva standar kuersetin didapat dengan mencari rata-rata absorbansi dari tanin dengan berbagai konsentrasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Tabel 4.6). Dari kurva standart kuersetin didapatkan persamaan linear  $y = 0,01248x + 0,0056$  dengan  $R^2 = 0,9977$  (Gambar 4.5). Lalu hasil dari persamaan linear digunakan untuk mencari kadar flavonoid sampel. Hasil pengukuran di dapatkan kadar fenolik total yaitu  $8,926 \pm 0,3205 \mu\text{g/mL}$  (Tabel 4.7).

Tabel 4.6 Konsentrasi dan Absorbansi Larutan Standar Kuersetin

	Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbansi I	Absorbansi II	Absorbansi III	Rata-rata Absorbansi
Standar Kuersetin	5	0,072	0,073	0,072	0,072
	10	0,137	0,136	0,135	0,136
	15	0,191	0,193	0,192	0,192
	20	0,254	0,253	0,251	0,252



Gambar 4.5 Kurva Kalibrasi Standar Kuersetin

Tabel 4.7 Rata-Rata Kosentrasi Flavonoid Ekstrak Buah Maja

		Absorbansi	Konsentrasi (µg/L)	Rata-rata Konsentrasi (µg/L)
Uji	I	0,113	8,606	8,926 ± 0,3205
Sampel	II	0,121	9,247	

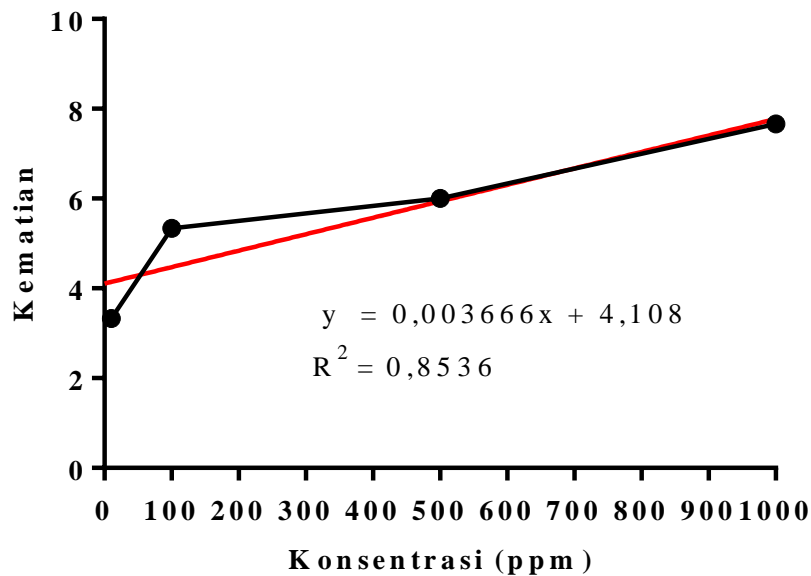
Nilai rata-rata ±SEM

#### 4.5 Uji Toksisitas Sampel

Hasil berupa data presentase kematian diperoleh dari probit (Tabel 4.8), data presentase kematian diolah untuk memperoleh nilai toksisitas dari ekstrak buah Maja. Data konsentrasi dan persentase kematian kemudian dibuat ke dalam bentuk kurva korelasi sehingga diperoleh persamaan linear  $y = 0,00366x + 4,108$  (Gambar 4.6). Dari persamaan linear tersebut diperoleh  $LC_{50}$  adalah 243,316 ppm.

Tabel 4.8 Data *Brine Shrimp Lethality Test*

Konsentrasi (ppm)	Angka Kematian
1000	7,67
500	6,00
100	5,33
10	3,33



Gambar 4.6 Grafik Hasil Uji Toksisitas Sampel Ekstrak Buah Maja

#### 4.6 Hasil Pengukuran Aktivitas Spesifik Enzim Katalase

##### 4.6.1 Penghitungan Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dengan konsentrasi 27.203 mM dibuat dengan menggunakan perbandingan 1:4000 dari stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Konsentrasi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> didapatkan dari perhitungan sebagai berikut :

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% diencerkan dalam perbandingan 1 : 4000:

$$V_{H_2O_2} = \frac{1}{4000} \times 1000 = 0,25 \text{ mL/L}$$

$$\text{Berat Molekul (BM)} = 34 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa Jenis } (\rho) = 1,1 \text{ g/mL}$$

$$n = 1 \text{ mol}$$

$$V = \frac{\text{g/mol}}{\text{g/mL}} = \text{mL/mol}$$



$$V = \frac{34 \times 30\%}{1.11} = 9,19 \text{ mL/mol}$$

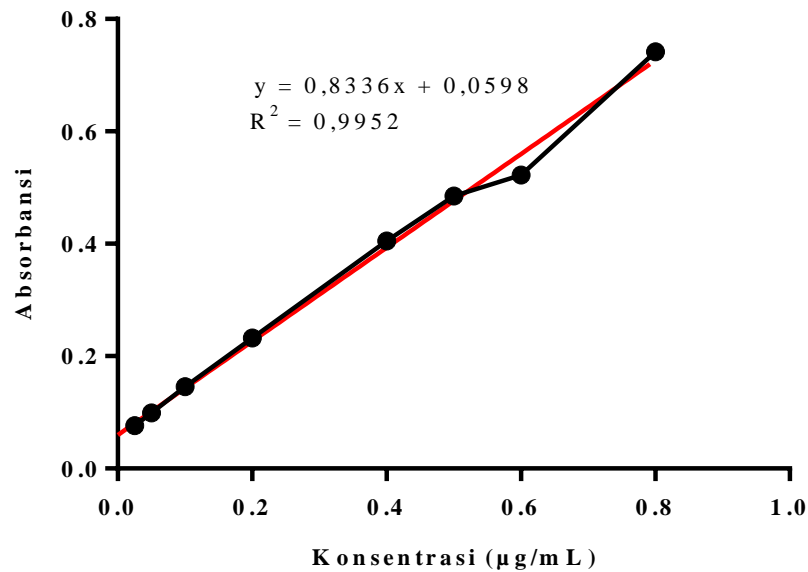
$$M = \frac{n}{v} = \frac{0,25 \text{ mL/L}}{9,19 \text{ mL/mol}} = 0,027203 \text{ M} = 27,203 \text{ mM}$$

#### 4.6.2 Pengukuran Standar Protein

Pengukuran kadar protein sampel (lisat dan supernatan) dilakukan dengan menggunakan metode Christian-Warburg<sup>32</sup>, yaitu dilakukan pemeriksaan standar *Bovine Serum Albumin* (BSA) di berbagai konsentrasi dan di dapatkan absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Tabel 4.9). Data konsentrasi dan absorbansi digunakan untuk mencari kurva standart BSA (Gambar 4.7). Dari kurva standar di dapatkan persamaan garis linear  $y = 0,8335x + 0,05981$  dengan  $R^2 = 0,9951$ . Lalu hasil dari persamaan linear digunakan untuk menghitung kadar protein sampel (lisat dan supernatan). Kadar protein sampel yang didapat akan digunakan untuk menghitung aktivitas spesifik dari enzim katalase.

Tabel 4.9 Absorbansi Bovine Serum Albumin

Konsentrasi	Absorbansi
0,025	0,076
0,05	0,099
0,1	0,146
0,2	0,233
0,4	0,404
0,5	0,486
0,6	0,522
0,8	0,742



Gambar 4.7 Grafik Absorbansi Terhadap Konsentrasi Standar BSA

#### 4.6.3 Waktu dan Pengenceran Optimal

##### 4.6.3.1 Waktu dan Pengenceran Optimal Darah

Optimasi waktu dan pengenceran darah dicari terlebih dahulu agar diperoleh kerja enzim pada konsentrasi dan waktu yang optimal. Hasil optimasi ditandai pada saat kecepatan reaksi ( $\Delta V$ ) mencapai kecepatan tertinggi yaitu pada waktu optimal di menit ke-4, pada pengenceran 5x, dengan hasil kecepatan optimum 0,143 (Tabel 4.10). Optimasi waktu dan pengenceran darah digunakan untuk memperoleh aktivitas spesifik enzim katalase. Aktivitas enzim spesifik katalase optimal ditunjukkan dengan  $\Delta V$  tertinggi diikuti dengan penurunan  $\Delta V$ .

Tabel 4.10 Hasil Optimasi Pengenceran dan Waktu Darah

T	Blanko	Uji	$\Delta$ Abs Blanko	$\Delta$ Abs Uji	$\Delta$ Abs (AbsU - AbsB)	$\Delta$ V
1	0,41	0,504	0,000	0,000	0,000	0,0000
2	0,41	0,495	0,000	0,009	0,009	0,0090
3	0,409	0,475	0,001	0,029	0,028	0,0140
4	0,409	0,460	0,001	0,044	0,043	0,0143
5	0,409	0,451	0,001	0,053	0,052	0,0130
6	0,408	0,436	0,002	0,068	0,066	0,0132
7	0,408	0,425	0,002	0,079	0,077	0,0128
8	0,408	0,415	0,002	0,089	0,087	0,0124
9	0,408	0,406	0,002	0,098	0,096	0,0120
10	0,408	0,395	0,002	0,109	0,107	0,0119

#### 4.6.3.2 Waktu dan Pengenceran Optimal Otak

Optimasi waktu dan pengenceran sampel otak dicari terlebih dahulu agar diperoleh kerja enzim pada konsentrasi dan waktu yang optimal. Hasil optimasi diperoleh pada pengenceran 5x dan waktu optimal di menit ke-2, dengan hasil kecepatan optimum 0,0110 (Tabel 4.11). Hasil optimasi ditandai pada saat kecepatan reaksi ( $\Delta$ V) mencapai kecepatan paling tinggi.

Tabel 4.11 Hasil Optimasi Pengenceran dan Waktu Otak

T	Blanko	Uji	$\Delta$ Abs Blanko	$\Delta$ Abs Uji	$\Delta$ Abs (AbsU - AbsB)	$\Delta$ V
1	0,41	1,022	0,000	0,000	0,000	0,0000
2	0,41	1,011	0,000	0,011	0,011	0,0110
3	0,409	1,000	0,001	0,022	0,021	0,0105
4	0,409	0,991	0,001	0,031	0,030	0,0085
5	0,409	0,987	0,001	0,035	0,034	0,0054

#### 4.6.4 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase

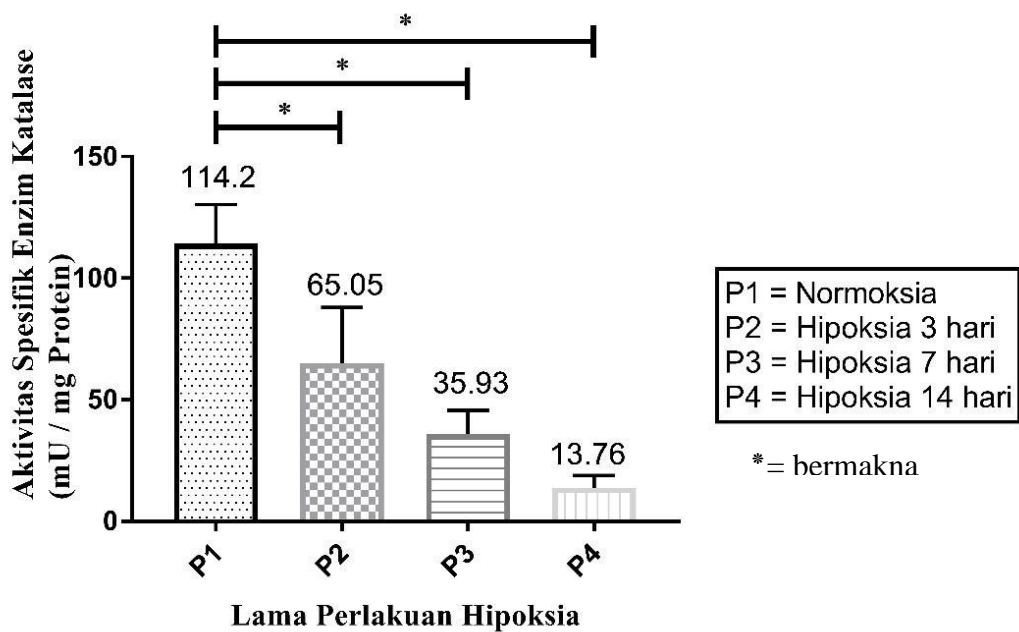
##### 4.6.4.1 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah

Hasil pemeriksaan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia (Tabel 4.12). Uji statistik aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok tikus yang tidak dicekok dengan menggunakan Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia 3 hari ( $p = 0,0286$ ), 7 hari ( $p = 0,0286$ ) dan 14 hari ( $p = 0,0286$ ) bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang normoksia. (Gambar 4.8).

Tabel 4.12 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah Tikus Yang Tidak Dicekok

Kelompok Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase ( mU/ mg Protein)
Normoksia	114,2± 16,11
Hipoksia 3 Hari	65,05± 22,87
Hipoksia 7 Hari	35,93± 9,719
Hipoksia 14 Hari	13,76±5,006

Nilai rata-rata ±SD

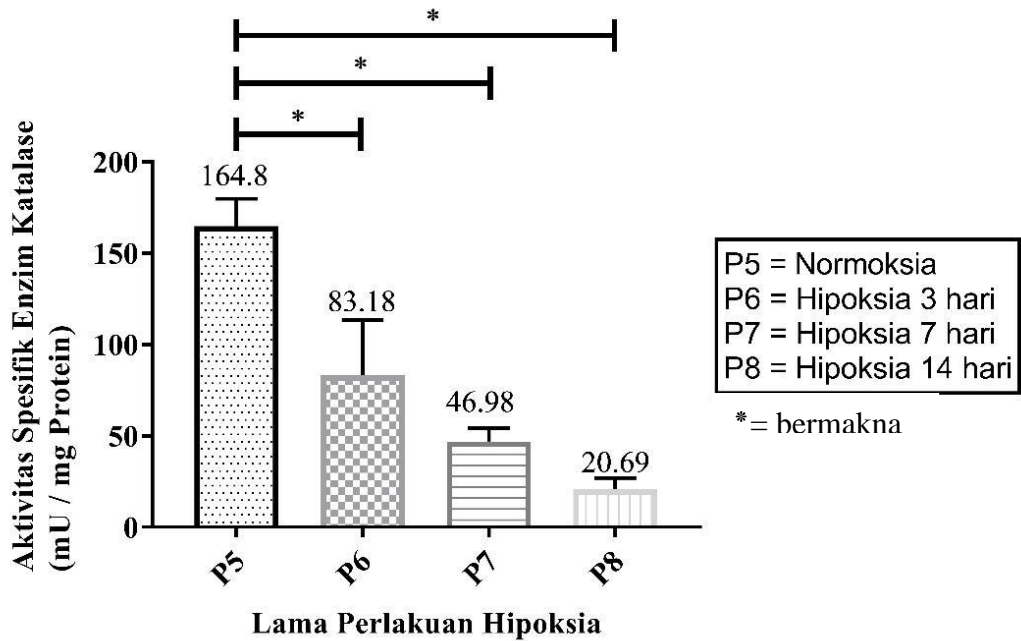


Gambar 4.8 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah Tikus Yang Tidak Dicekok.

Hasil pemeriksaan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada darah tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia (Tabel 4.13). Uji statistik aktivitas spesifik enzim katalase darah kelompok tikus yang dicekok dengan menggunakan Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia 3 hari ( $p = 0,0286$ ), 7 hari ( $p = 0,0286$ ) dan 14 hari ( $p = 0,0286$ ) bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang normoksia. (Gambar 4.9).

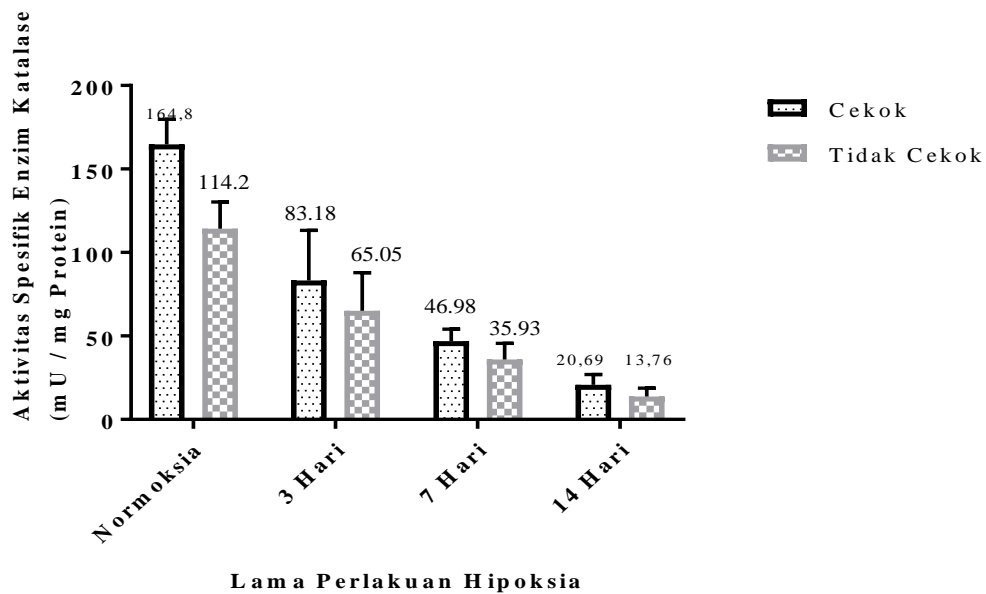
Tabel 4.13 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah Tikus Yang Dicekok.

Kelompok Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/ mg Protein)
Normoksia	164,8± 15,03
Hipoksia 3 Hari	83,18± 30,04
Hipoksia 7 Hari	46,98± 39,4
Hipoksia 14 Hari	20,69± 15,34
Nilai rata-rata ±SD	



Gambar 4.9 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah Tikus Yang Dicekok.

Pada hasil uji statistik ditemukan perbedaan bermakna (Mann-Whitney.  $p < 0,05$ ) antara darah kelompok tikus yang normoksia dan dicekok ( $p = 0,0286$ ), di hipoksia 14 hari dan dicekok ( $p = 0,0421$ ) dengan kelompok tikus yang tidak dicekok dan terdapat perbedaan tidak bermakna (Mann-Whitney.  $p > 0,05$ ) antara darah kelompok tikus yang tidak dicekok dan di hipoksia selama 3 hari ( $p = 0,3429$ ) dan 7 hari ( $p = 0,2000$ ) dengan kelompok tikus yang dicekok. (Gambar 4.10).



Gambar 4.10 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Darah Tikus Yang Dicekok dan Tidak Dicekok

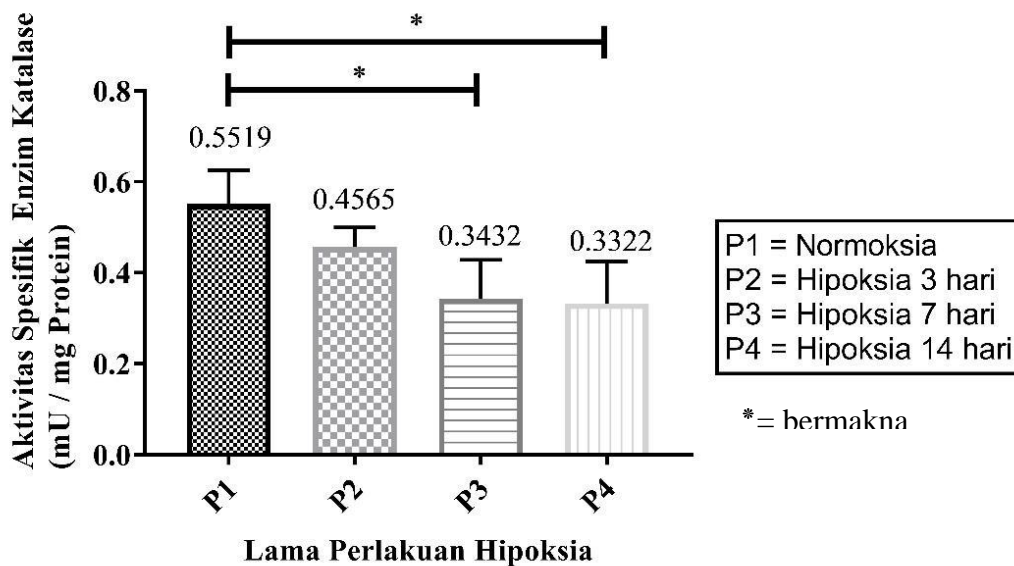
#### 4.6.4.2 Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak

Hasil pemeriksaan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada otak tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia (Tabel 4.14). Uji statistik aktivitas spesifik enzim katalase otak kelompok tikus yang tidak dicekok dengan menggunakan Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia 7 hari ( $p = 0,0286$ ) dan 14 hari ( $p = 0,0286$ ) bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang normoksia. Dan adanya perbedaan tidak bermakna (Mann-Whitney  $p > 0,05$ ) antara kelompok hipoksia 3 hari yang tidak dicekok dengan kelompok normoksia ( $p = 0,1143$ ) (Gambar 4.11)

Tabel 4.14 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak Tikus Yang Tidak Dicekok

Kelompok Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/ mg Protein)
Normoksia	0,5519 ± 0,07332
Hipoksia 3 Hari	0,4565± 0,04325
Hipoksia 7 Hari	0,3432± 0,08503
Hipoksia 14 Hari	0,3322± 0,09197

Nilai rata-rata ±SD



Gambar 4.11 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak Tikus Yang Tidak Dicekok.

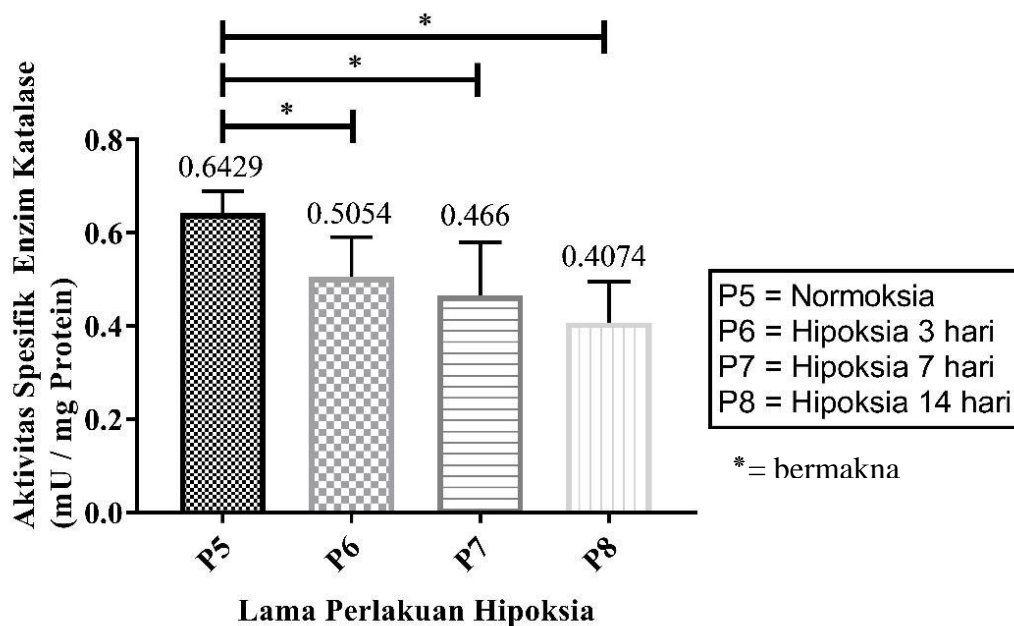
Hasil pemeriksaan menunjukkan penurunan aktivitas spesifik enzim katalase pada otak tikus seiring bertambah lamanya perlakuan hipoksia (Tabel 4.15). Uji statistik aktivitas spesifik enzim katalase otak kelompok tikus yang dicekok dengan menggunakan Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara kelompok hipoksia 3 hari ( $p = 0,0286$ ), 7 hari ( $p = 0,0286$ ) dan 14 hari ( $p = 0,0286$ ) bila dibandingkan dengan kelompok tikus yang normoksia. (Gambar 4.12).



Tabel 4.15 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak Tikus Yang Dicekok

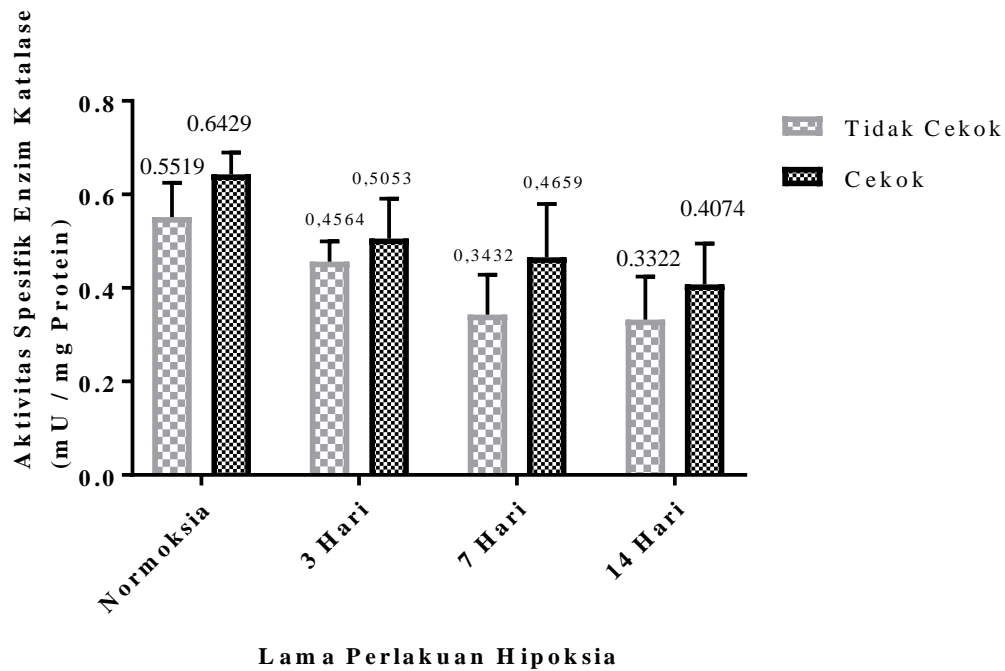
Kelompok Hipoksia	Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase (mU/ mg Protein)
Normoksia	0,6429 ±0,04676
Hipoksia 3 Hari	0,5054±0,08563
Hipoksia 7 Hari	0,466±0,1138
Hipoksia 14 Hari	0,4074± 0,08774

Nilai rata-rata ±SD



Gambar 4.12 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak Tikus Yang Dicekok

Uji statistik aktivitas spesifik enzim katalase otak antara kelompok tikus yang dicekok dan tidak dicekok dengan menggunakan Mann-Whitney ( $p > 0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan tidak bermakna antara kelompok tikus normoksia ( $p=0,3429$ ), hipoksia 3 hari ( $p=0,4857$ ), 7 hari ( $p=0,1429$ ) dan 14 hari ( $p=0,3429$ ) (Gambar 4.13).

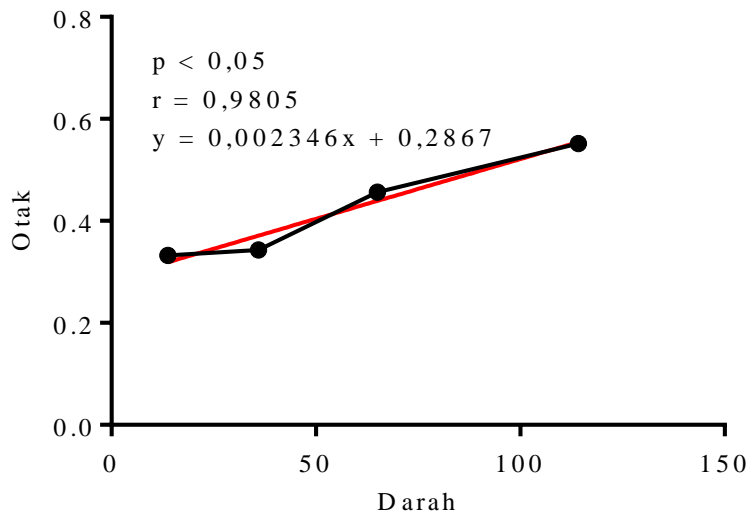


Gambar 4.13 Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase Otak Tikus Yang Diberi Ekstrak dan Tidak Diberi Ekstrak

#### 4.6.5 Hubungan Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Otak dan Darah

##### 4.6.5.1 Hubungan Antara Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Otak dan Darah Tikus Yang Tidak Dicekok

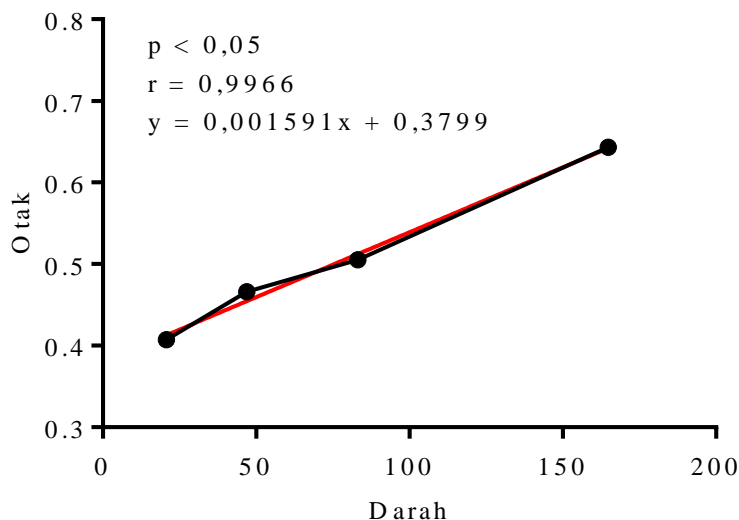
Pola aktivitas spesifik enzim katalase pada otak dan darah tikus yang tidak dicekok memiliki pola yang sama yaitu terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase seiring bertambah lamanya hipoksia. Aktivitas spesifik enzim katalase pada otak lebih rendah dibandingkan dengan darah, baik pada tikus yang diberi perlakuan hipoksia dan normoksia. Hasil uji statistik aktivitas enzim spesifik katalase antara otak dan darah menunjukkan adanya hubungan bermakna (Pearson,  $p=0,0195$ ) (Gambar 4.14)



Gambar 4.14 Grafik Hubungan Antara Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Otak dan Darah Tikus Yang Tidak Dicekok

#### 4.6.5.2 Hubungan Antara Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Otak dan Darah Tikus Yang Dicekok

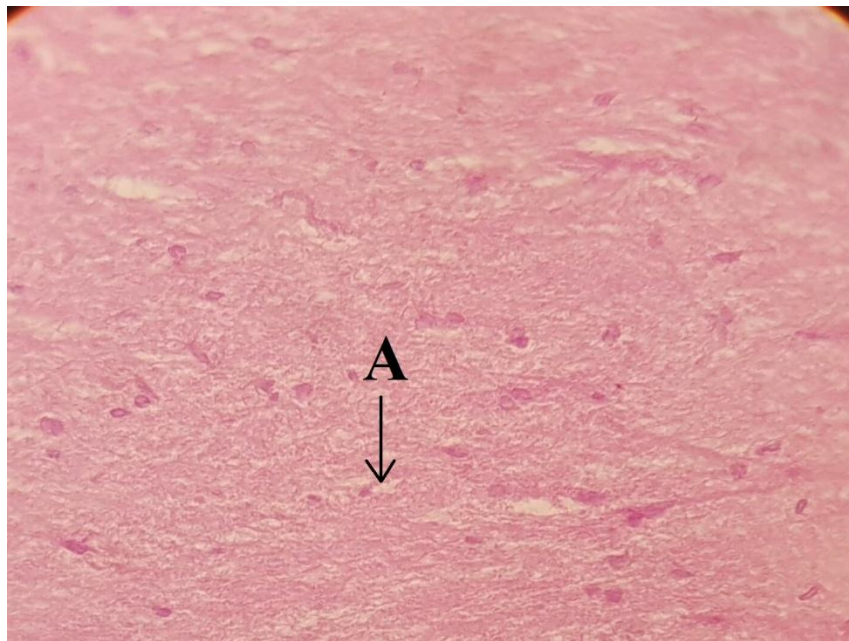
Pola aktivitas spesifik enzim katalase pada otak dan darah tikus yang dicekok memiliki pola yang sama yaitu terjadi penurunan aktivitas spesifik enzim katalase seiring bertambah lamanya hipoksia. Aktivitas spesifik enzim katalase pada otak lebih rendah dibandingkan dengan darah, baik pada tikus yang diberi perlakuan hipoksia dan normoksia. Hasil uji statistik aktivitas enzim spesifik katalase antara otak dan darah menunjukkan adanya hubungan bermakna Pearson,  $p=0,0034$ ) (Gambar 4.15)



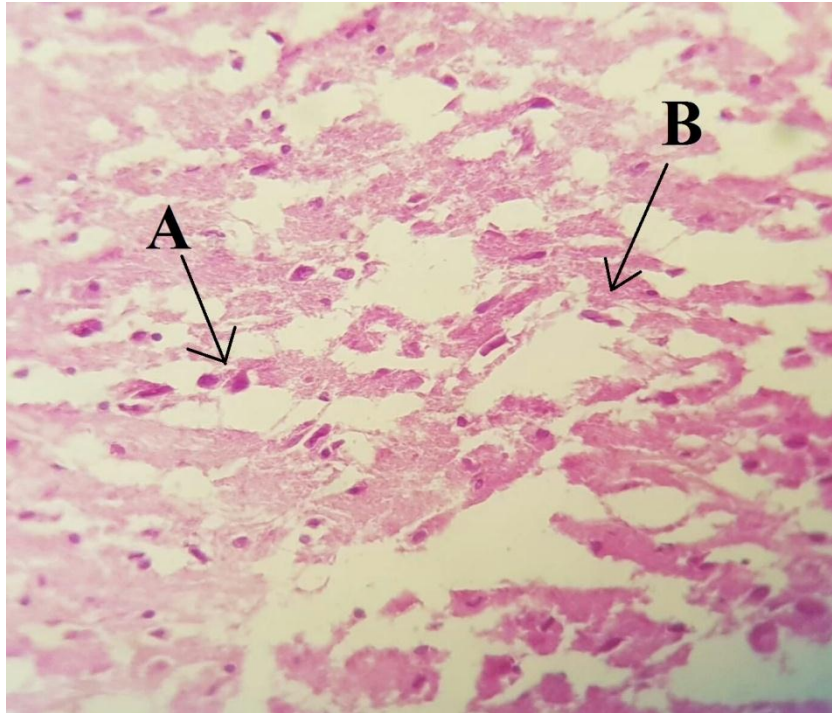
Gambar 4.15 Grafik Hubungan Antara Rata-rata Aktivitas Spesifik Enzim Katalase pada Otak dan Darah Tikus Yang Dicekok

#### 4.7 Hasil Pemeriksaan Patologi Anatomi

Dilakukan pemeriksaan secara mikroskopis menggunakan pewarnaan Hematoxylin Eosin (HE) pada jaringan otak dari kelompok tikus yang tidak dicekok dan normoksia (P1) dibandingkan dengan yang di hipoksia selama 14 hari (P4) serta tikus yang dicekok ekstrak *Aegle marmelos* dan normoksia (P5) dibandingkan dengan yang di hipoksia 14 hari (P8). Pemeriksaan dilakukan pada pembesaran 400x pada kelompok tikus P1, hasil pemeriksaan terlihat inti sel neuronal terlihat jelas dan tidak ditemukan adanya kerusakan jaringan (Gambar 4.16). Pada kelompok tikus P4 hasil pemeriksaan terlihat sel yang nekrosis dengan inti piknotik dan disertai edema pada sel (Gambar 4.17). Pada kelompok tikus P5 terlihat inti sel jelas dan tidak ditemukan kerusakan jaringan (Gambar 4.18). Pada kelompok tikus P8 hasil pemeriksaan terlihat edema pada sel (Gambar 4.19).



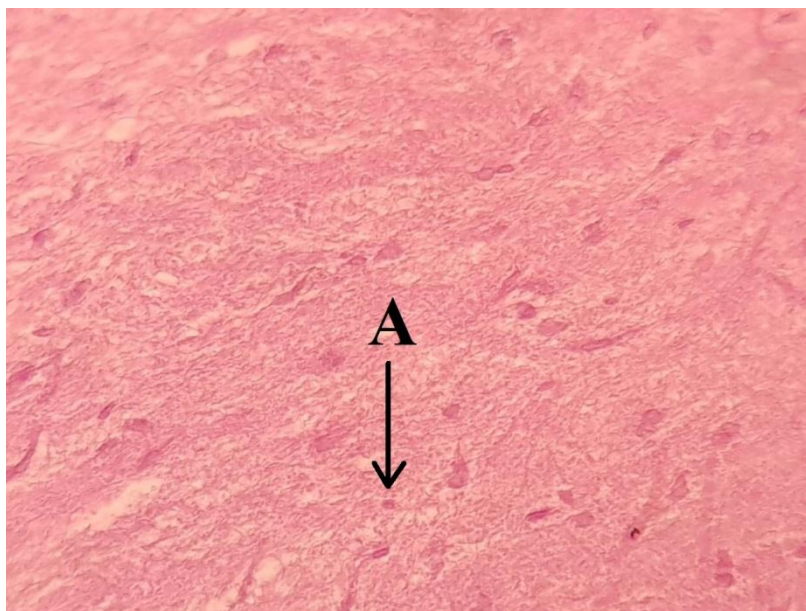
Gambar 4.16 Otak P1 pembesaran 400x  
(A) inti sel neuronal.



Gambar 4.17 Otak P4 pembesaran 400x

(A) Edema sel

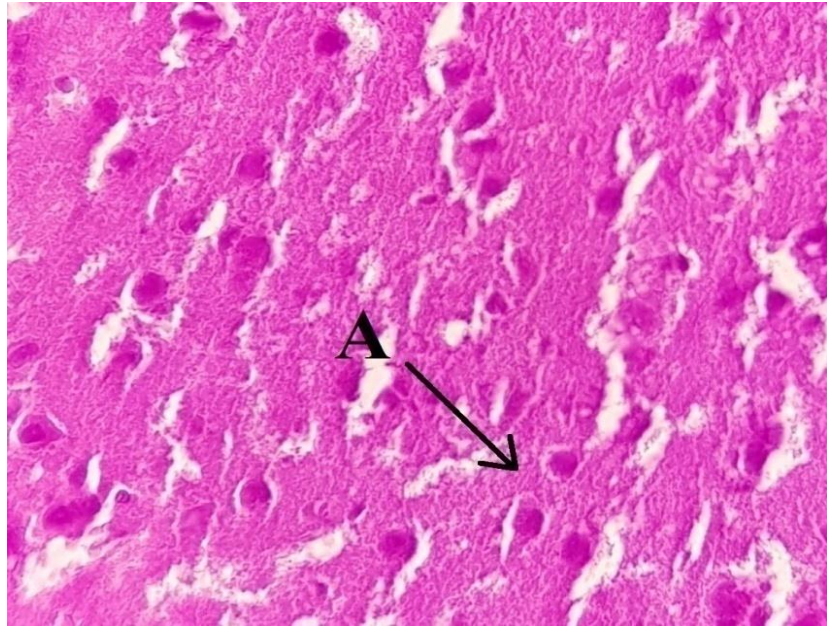
(B) Nekrosis pada sel



Gambar 4.18 Otak P5 pembesaran 400x

(A) inti sel neuronal.





Gambar 4.19 Otak P8 pembesaran 400x

(A) Edema sel