

UJI EFEK PENGHAMBATAN OKSIDASI *LOW DENSITY LIPOPROTEIN* (LDL) DARI EKSTRAK ETANOL KLIKA ONGKEA (*Mezzettia parviflora* Becc.) MENGGUNAKAN ELEKTROFORESIS GEL.

BATARI TENRI

N111 06 054



**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**UJI EFEK PENGHAMBATAN OKSIDASI
LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) DARI EKSTRAK
ETANOL KLIKA ONGKEA (*Mezzettia parviflora* Becc.)
MENGUNAKAN ELEKTROFORESIS GEL**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

PERSETUJUAN

UJI EFEK PENGHAMBATAN OKSIDASI
LOW DENSITY LIPOPROTEIN (LDL) DARI EKSTRAK
ETANOL KLIKA ONGKEA (*Mezzettia parviflora* Becc.)
MENGUNAKAN ELEKTROFORESIS GEL



Muan

Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 19670319 199203 2 002

Pembimbing Pertama,

Mufidah

Mufidah, S.Si, M.Si, Apt
NIP. 19730309 199903 2 002

Pembimbing Kedua,

Rosany Tayeb

Dra. Rosany Tayeb, M.Si, Apt
NIP. 19561011 198603 2 002

Pada tanggal : Oktober 2010

PENGESAHAN

UJI EFEK PENGHAMBATAN OKSIDASI *LOW DENSITY LIPOPROTEIN* (LDL) EKSTRAK ETANOL KLIKA ONGKEA (*Mezzettia parviflora* Becc.) MENGUNAKAN ELEKTROFORESIS GEL

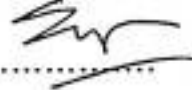
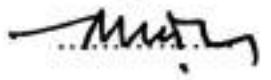

Oleh :

BATARI TENRI

No. Mahasiswa : N111 06 054

Dipertahankan dihadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
Pada tanggal : 29 Oktober 2010

Panitia Penguji Skripsi :

1. Ketua : Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. 
2. Sekretaris : Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. 
3. Anggota : Prof. Dr. H. M. Natsir Djide, MS., Apt. 
4. Anggota (Ex. Officio): Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt. 
5. Anggota (Ex. Officio): Mufidah, S.Si., M.Si., Apt. 
6. Anggota (Ex. Officio): Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. 

Mengetahui :

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt
NIP. 19560114 198601 2 001

PERNYATAAN

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

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh, batal demi hukum.

Makassar, 29 Oktober 2010

Penyusun,

BATARI TENRI

METERAI
TEMPEL
08F48AAF317493871
6000
BUP

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang senantiasa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Terima kasih yang tak terhingga penulis tujukan kepada kedua orang tua yang tercinta M. Zainal Arifin, S.Sos dan Asniaty Abdullah yang telah banyak berkorban baik secara moril maupun materil serta keluarga besar yang selalu memberikan semangat kepada penulis untuk mampu menyelesaikan skripsi ini.

Dengan segala kerendahan dan ketulusan hati penulis juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt sebagai pembimbing utama, ibu Mufidah, S.Si, M.Si, Apt selaku pembimbing pertama dan ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si, Apt selaku pembimbing kedua sekaligus selaku penasehat akademik penulis yang telah meluangkan waktu selama ini untuk memberikan petunjuk, membagi ilmu, dorongan moril, menyumbangkan pikiran dan tenaga dalam membimbing penulis selama melakukan penelitian hingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan ini pula penulis tak lupa menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA selaku Dekan Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Bapak-bapak dan Ibu dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang tidak bisa disebutkan satu persatu atas segala bantuan yang diberikan selama menempuh pendidikan, penelitian, hingga selesainya skripsi ini.
3. Sugiarti yang menjadi teman seperjuangan mulai dari awal penelitian hingga selesainya skripsi ini.
4. Kak Ikhsan Sidiq yang banyak memberikan semangat dan bantuannya.
5. Saudara - saudaraku ELIXIR'06 atas bantuan, dukungan dan doa, serta kebersamaannya selama ini.
6. Kepada seluruh pihak yang telah membantu selama penulis melaksanakan penelitian terutama kak Ahmad dan Anto di Lab. Bioteknologi Pertanian PKP Unhas.
7. Semua pihak yang tidak sempat disebutkan satu persatu mengingat keterbatasan yang dimiliki atas segala bantuannya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini sangat jauh dari kesempurnaan, namun besar harapan penulis kiranya skripsi ini dapat bermanfaat bagi yang membacanya dan memberikan sumber inspirasi baru untuk pengembangan ilmu pengetahuan ke depan. Amin

Makassar, Oktober 2010

Penulis

ABSTRAK

Penelitian tentang efek penghambatan oksidasi *Low Density Lipoprotein* ekstrak etanol klika onkea (*Mezzetia parviflora* Becc) secara *in vitro* menggunakan elektroforesis gel telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kemampuan ekstrak etanol *M. parviflora* untuk menghambat oksidasi-LDL yang diinisiasi dengan ion tembaga (Cu^{2+}). Peroksidasi lipid dimonitoring dengan metode SDS-PAGE. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki kemampuan untuk melindungi oksidasi LDL secara *in vitro*. Ekstrak pada konsentrasi 25 ppm memiliki kemampuan lebih kecil dibandingkan dengan quersetin pada konsentrasi yang sama, yaitu masing-masing 41,31% dan 86,42%.

ABSTRACT

A research about inhibition of oxidation effect of Low Density Lipoprotein in vitro from ethanol extract of Ongkea bark (*Mezzettia parviflora* Becc) using gel electrophoretic method had been conducted. The aim of this research was to detect ethanol extract *Mezzettia parviflora* Becc. ability to inhibit the LDL-oxidation that initiated by copper ion (Cu^{2+}). Lipid peroxidation was monitored by SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poliacrilamid Gel Electrophoresis) method. The result of this study showed that extract had capacity to protect oxidation of LDL invitro. The capacity of this extract at 25 ppm was lower than quercetin at the same concentration, i.e. 41.31% and 86.42%, respectively.

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
II.1 Uraian Tanaman <i>Mezzettia parviflora</i> Becc.	4
II.1.1 Klasifikasi.....	4
II.1.2 Nama Daerah	4
II.1.3 Morfologi.....	4
II.1.4 Kandungan Kimia.....	5
II.1.5 Kegunaan Tanaman	5
II.2 Uraian Umum.....	5
II.2.1 Kolesterol.....	5
II.2.2 Aterosklerosis	11
II.2.3 Mekanisme Oksidasi LDL	13
II.3 Antioksidan	18

II.3.1 Pengertian	18
II.3.2 Mekanisme Kerja Antioksidan.....	18
II.4 Metode Ekstraksi Bahan Alam.....	19
II.4.1 Pengertian Ekstrak.....	19
II.4.2 Ekstraksi	19
II.4.3 Tujuan Ekstraksi	20
II.4.4 Jenis-Jenis Ekstraksi	20
II.4.5 Ekstraksi Secara Maserasi	20
II.5 Elektroforesis Gel.....	21
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	26
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	26
III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian.....	26
III.2.1 Pengambilan Sampel.....	26
III.2.2 Pengolahan Sampel.....	26
III.3 Ekstraksi Sampel	27
III.4 Prosedur Uji Penghambatan Oksidasi LDL.....	27
III.4.1 Penyiapan Larutan Stok Sampel.....	27
III.4.2 Penyiapan Larutan Quersetin	27
III.4.3 Pembuatan Phospate-Buffered Saline (PBS) pH 7,4.....	28
III.4.4 Pembuatan Buffer Tris-Glisin.....	28
III.4.5 Pembuatan Larutan Penghilang Warna	28
III.4.6 Pembuatan larutan CuSO ₄ 1 mM.....	28
III.4.7 Pembuatan Larutan Pemberat Commassie Brilliant Blue	29

III.4.8 Pembuatan Larutan EDTA 10 mM.....	29
III.4.9 Pembuatan Larutan Stok Poliakrilamid.....	29
III.4.10 Pembuatan Larutan Tris-HCl 1,5 M pH 8,8.....	29
III.4.11 Pembuatan Larutan Tris-HCl 0,5 M pH 6,8.....	29
III.4.12 Pembuatan Larutan Amonium Persulfat.....	29
III.4.13 Pembuatan Gel Pemisah (<i>Separating Gel</i>) 12%.....	30
III.4.14 Pembuatan Gel Pengumpul (<i>Stacking Gel</i> 4%.....	30
III.4.15 Pembuatan Gel Poliakrilamid.....	30
III.4.16 Pengukuran Aktivitas Penghambatan Oksidasi LDL dengan Metode Elektroforesis Gel.....	31
III.5 Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
IV.1 Hasil Pengamatan.....	32
IV. 2 Pembahasan.....	33
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
V.1 Kesimpulan.....	35
V.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN-LAMPIRAN.....	38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Nilai AUC dan Persentase Penghambatan Oksidasi LDL dari Ekstrak Etanol Klika Ongkea (<i>Mezzettia parviflora</i> Becc.) pada Gel Poliakrilamid.....	32

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Kolesterol	5
2. Proses Terjadinya Aterosklerosis	12
3. Penghilangan Atom Hidrogen oleh ROS	15
4. Pembentukan Konjugat Dien.....	15
5. Terbentuknya Radikal Peroksil	16
6. Pembentukan Lipid Hidroperoksid	16
7. Proses Pembuatan Gel Poliakrilamid	24
8. Proses Elektroforesis.....	25
9. Foto Hasil Elektroforesis pada Gel Poliakrilamid	32
10. Histogram Persentase Penghambatan Oksidasi LDL dari Ekstrak Etanol Klika Ongkea (<i>Mezzettia parviflora</i> Becc.) yang Dibandingkan dengan Quersetin	33
11. Data Hasil Densitometri Gel Poliakrilamid yang menunjukkan nilai AUC (<i>Area Under Curve</i>)	40
12. Tumbuhan Ongkea (<i>Mezzettia parviflora</i> Becc.)	41
13. Gambar Klika Ongkea yang telah Dikeringkan.....	41
14. Rangkaian Alat Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	42

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Pengolahan Sampel.....	38
2. Prosedur Elektroforesis Fragmen ApoB-100	39
3. Data Hasil Densitometri.....	40
4. Tumbuhan Ongkea (<i>Mezzettia parviflora</i> Becc.).....	41
5. Klika Ongkea yang telah dikeringkan.....	41
6. Rangkaian Alat Elektroforesis Gel Poliakrilamid.....	42

BAB I

PENDAHULUAN

Aterosklerosis adalah suatu keadaan patologi yang mempengaruhi banyak orang dan dapat menyebabkan kematian atau ketidakmampuan yang berkaitan dengan infark miokard atau stroke. (1) Aterosklerosis ditandai dengan pengendapan LDL pada dinding arteri. Pengendapan LDL ini terutama terjadi di dalam makrofag membentuk sel busa dan akhirnya menghasilkan suatu lesi pada intima arteri.(2)

LDL dengan bobot molekul $2-3 \times 10^6$, memiliki komponen utama kolesterol dan dalam aliran darah terbentuk dari partikel VLDL. Secara patologis LDL mempunyai kandungan kolesterol tinggi dan karena itu mempunyai kerja aterogen yang sangat kuat. (3) LDL menjadi aterogenik jika mengalami modifikasi melalui oksidasi. (4)

Berbagai upaya telah dilakukan untuk menjelaskan tentang kejadian kompleks yang berhubungan dengan perkembangan aterosklerosis. Terdapat tiga hipotesis berbeda mengenai perkembangan lesi aterosklerotik, yaitu respon terhadap luka, respon terhadap retensi, dan modifikasi oksidatif. (2)

Modifikasi oksidatif dari *Low Density Lipoprotein* (LDL) memainkan peranan yang penting dalam aterosklerosis. Oksidasi terhadap LDL juga telah mengakibatkan banyak perubahan dalam sifat biologisnya yang secara potensial dapat berefek proaterogenik. (5) LDL teroksidasi dapat terjadi di dalam ruang subendotelial dari dinding arteri. LDL dapat

mengalami modifikasi oksidatif pada dinding arteri atau pada beberapa tempat ekstraselular dan kemudian kembali ke kompartemen plasma. (6)

Sekumpulan bukti menunjukkan hubungan yang kuat antara asupan makanan yang mengandung nutrisi antioksidan seperti vitamin E dan C, karotenoid, dan flavonoid, dengan pengaruhnya terhadap metabolisme lipoprotein. Ada perkembangan menarik pada efek yang menguntungkan dari antioksidan alami dalam sayuran, buah, dan tanaman obat yang ditujukan untuk perlindungan melawan kerusakan oksidatif yang berkaitan dengan berbagai penyakit pada manusia termasuk aterosklerosis. (5)

Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) secara empirik digunakan oleh masyarakat Kabupaten Buton sebagai antitumor, antidiabetik, dan hipokolesterolemik, yang merupakan kerusakan yang berkaitan dengan aktivitas radikal bebas. (7)

Berdasarkan penelitian sebelumnya, ekstrak etanol klika ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) memiliki efek agregasi platelet dan penangkapan radikal bebas. (7) Selain itu, telah dilaporkan pula kemampuan ekstrak etanol dalam menghambat oksidasi LDL dengan metode pengukuran diena terkonjugasi. (8) Diena terkonjugasi merupakan produk awal dari oksidasi LDL dan jika proses ini berlanjut akan terbentuk malondialdehid. Penelitian ini dilakukan sebagai lanjutan dari penelitian tersebut di atas dengan metode elektroforesis gel yang akan mendeteksi produk akhir oksidasi LDL yaitu malondialdehid karena muatannya yang

lebih negatif dibandingkan dengan bentuk awal sehingga akan memiliki laju yang lebih cepat pada elektroforesis gel.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek penghambatan oksidasi LDL dari ekstrak etanol klika onkea secara in vitro dengan metode elektroforesis gel.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman *Mezzettia parviflora* Becc.

II.1.1 Klasifikasi

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Ranales
Suku	: Annonaceae
Marga	: Mezzettia
Jenis	: <i>Mezzettia parviflora</i> Becc. (9)

II.1.2 Nama Daerah

Buton	: Ongkea
Palembang	: Makai
Bangka	: Limang. (10)

II.1.3 Morfologi

Mezzettia sp. merupakan pohon, tinggi sampai 30 meter dan diameter batang 90 cm, di Sumatera Selatan sering ditemukan di daerah pantai.

Batangnya tumbuh tegak lurus, bulat, warna kayunya putih kotor, menghasilkan kayu yang agak berat tetapi mudah dibentuk, dari kayu tersebut dapat dibuat papan. Kulitnya juga mudah dikupas, tebal, dan dapat digunakan sebagai dinding rumah. Buahnya dapat menyebabkan pusing dan muntah. (10)

II.1.4 Kandungan Kimia

Telah dilaporkan bahwa sekitar 75 spesies yang termasuk 50 genus Annonaceae ternyata mengandung alkaloid. Hampir semua alkaloid yang terdapat pada Annonaceae adalah dari kelompok isokuinolin. Annonaceae juga menghasilkan berbagai senyawa non-alkaloid, seperti terpenoid dan flavonoid, disamping minyak atsiri, asam amino, protein, karbohidrat, dan lemak. (11)

II.1.5 Kegunaan Tanaman

Ongkea telah digunakan secara turun temurun oleh masyarakat kabupaten Buton sebagai obat diabetes, asma, kolesterol, tekanan darah tinggi, kanker, dan dapat menurunkan berat badan. (12)

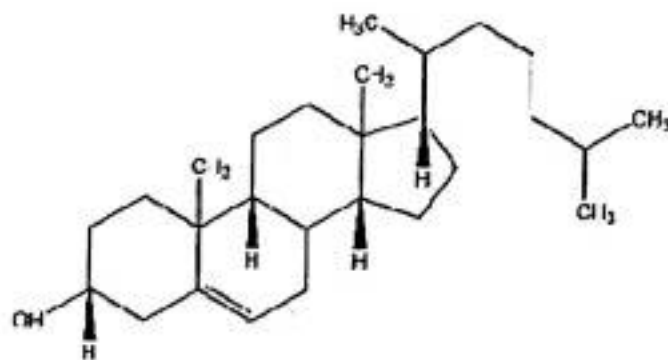
II.2 Uraian Umum

II.2.1 Kolesterol

Sejumlah besar lipid dalam darah adalah asam lemak, trigliserida, kolesterol, dan fosfolipid. Semua komponen tersebut sangat penting dalam

mempertahankan struktur membran sel (kolesterol, fosfolipid), sintesis hormon steroid (kolesterol), dan metabolisme energi (trigliserida, asam lemak). (6)

Kolesterol (bahasa Yunani : *Chole* = empedu ; *Streos* = padat) adalah salah satu diantara jenis-jenis lemak dalam aliran darah dan semua sel tubuh. Kolesterol tersebar luas dalam semua sel tubuh tetapi khususnya dalam jaringan saraf. (13)



Gambar 1. Struktur Kolesterol. (13)

Kolesterol sangat penting bagi tubuh terutama untuk memproduksi : Hormon seks (yang penting bagi perkembangan dan fungsi organ seksual), hormon korteks adrenal (sangat penting bagi metabolisme dan keseimbangan garam dalam tubuh), vitamin D (tanpa vitamin D kita tidak bisa menyerap kalsium untuk tubuh kita), garam empedu (yang membantu usus menyerap lemak), dan membentuk dinding sel dan berbagai jaringan tubuh.

Kolesterol dalam darah ditransportasikan sebagai lipoprotein. Lipoprotein adalah suatu kompleks molekul yang merupakan penggabungan lipid dan protein yang beredar dalam darah, berbentuk bola yang bagian

dalamnya terdiri dari trigliserida dan kolesterol ester, yang dikelilingi oleh permukaan hidrofilik dari kolesterol bebas, fosfolipid, dan apolipoprotein. Adanya komponen inilah yang menyebabkan lipoprotein dapat larut dalam plasma. Jadi lipoprotein bisa dianggap sebagai pembawa lemak dan kolesterol di dalam darah. (6)

Lipoprotein diklasifikasikan ke dalam 5 kelas berdasarkan densitasnya, yaitu: (6)

1. Kilomikron

Kilomikron diproduksi secara postprandial dalam sel epitel saluran cerna, dan mengangkut trigliserida dari makanan, kolesterol, dan vitamin larut lemak ke hati dan jaringan perifer. Trigliserida adalah komponen utama dari partikel kilomikron. ApoB-48 merupakan apolipoprotein spesifik penanda dari kilomikron, yang disintesis dalam usus seperti apoA. Trigliserida dalam kilomikron dihidrolisis oleh enzim lipoprotein lipase yang mengakibatkan pembentukan kilomikron remnan dan kemudian dibawa ke hati.

2. HDL (*High Density Lipoprotein*)

HDL utamanya disintesis dalam hati dan usus kecil. HDL terdiri dari partikel heterogen dengan berbagai densitas dan ukuran. HDL merupakan senyawa lipoprotein yang berat jenisnya tinggi. HDL memiliki kandungan lemak total rendah, protein tinggi, dan dibuat dari lemak endogen di hati. HDL ini digunakan untuk mengangkut kolesterol berlebihan dari seluruh jaringan tubuh untuk dibawa ke hati. Kalau kadar HDL dalam darah cukup tinggi,

terjadinya proses pengendapan lemak pada dinding pembuluh darah pun dapat dicegah.

HDL dalam plasma darah akan mengikat kolesterol bebas maupun ester kolesterol dan mengangkutnya kembali ke hati. Selanjutnya, kolesterol yang terikat akan mengalami perombakan menjadi cadangan kolesterol untuk sintesis VLDL. Tingginya kadar HDL dalam darah akan mempercepat proses pengangkutan kolesterol ke hati, sehingga mengurangi kemungkinan terjadinya penimbunan kolesterol dalam pembuluh darah.

3. IDL (*Intermediete Density Lipoprotein*)

IDL adalah zat perantara yang terbentuk sewaktu VLDL dikatabolisme menjadi LDL selama proses lipolisis.

4. LDL (*Low Density Lipoprotein*)

Partikel LDL adalah pembawa utama dari kolesterol dalam sirkulasi dan memainkan peranan yang penting dalam pengangkutan kolesterol dan metabolisme. Partikel LDL sebagian besar awalnya berasal dari metabolisme lipoprotein kaya trigliserida.

LDL adalah partikel bola dengan diameter 22-28 nm dan densitas 1,019-1,063 g/ml. Inti hidrofobik dari partikel LDL mengandung kira-kira 1600 molekul kolesterol ester dan 170 molekul trigliserida yang dikelilingi oleh lapisan tunggal sekitar 700 molekul fosfolipid, utamanya mengandung fosfatidilkolin, sejumlah kecil sfingomielin, liso-fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin dan fosfatidilinositol, dan 600 molekul

kolesterol bebas, dan satu molekul apoB-100. Sekitar setengah dari asam lemak dari LDL merupakan asam lemak tidak jenuh, utamanya asam linoleat dengan sejumlah kecil asam arakhidonat dan asam dokosaheksanoat.

LDL merupakan kolesterol jahat karena memiliki sifat aterogenik (mudah melekat pada dinding sebelah dalam pembuluh darah dan mengurangi pembentukan reseptor LDL). Hal ini akan menyebabkan terjadinya kenaikan kadar kolesterol LDL.

5. VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*)

VLDL merupakan senyawa lipoprotein yang berat jenisnya sangat rendah. Partikel VLDL disintesis di dalam hati. VLDL utamanya terdiri dari trigliserida, dan juga mengandung beberapa kolesterol, satu molekul apoB-100, apoCs dan apoE. Di dalam tubuh VLDL berfungsi sebagai pengangkut trigliserida dari hati ke seluruh jaringan tubuh. Sisa kolesterol yang tidak diekskresikan dalam empedu akan bersatu dengan VLDL sehingga menjadi LDL. VLDL berbagi jalur katabolik dengan kilomikron dalam sirkulasi dan bersaing untuk lipoprotein lipase.

Lipid darah diangkut dengan 2 cara:

1. Jalur Eksogen

Trigliserida dan kolesterol yang berasal dari makanan dalam usus dikemas sebagai kilomikron. Kilomikron ini akan diangkut dalam saluran limfe lalu ke dalam darah via duktus torasikus. Di dalam jaringan lemak, trigliserida dalam kilomikron mengalami hidrolisis oleh lipoprotein lipase yang terdapat

pada permukaan sel endotel. Akibat hidrolisis ini maka akan terbentuk asam lemak dan kilomikron remnan. Asam lemak bebas akan menembus endotel dan masuk ke dalam jaringan lemak atau sel otot untuk diubah menjadi trigliserida kembali (cadangan) atau dioksidasi (energi).

Kilomikron remnan adalah kilomikron yang telah dihilangkan sebagian besar trigliseridanya sehingga ukurannya mengecil tetapi jumlah kolesterolnya tetap. Kilomikron remnan ini akan dibersihkan oleh hati dalam sirkulasi dengan mekanisme endositosis oleh lisosom. Hasil metabolisme ini berupa kolesterol bebas yang akan digunakan untuk sintesis berbagai struktur (membran plasma, mielin, hormon steroid dsb.), disimpan dalam hati sebagai kolesterol ester lagi atau diekskresi ke dalam empedu (sebagai kolesterol atau asam empedu) atau diubah menjadi lipoprotein endogen yang dikeluarkan ke dalam plasma. Kolesterol juga dapat disintesis dari asetat di bawah pengaruh enzim HMG-CoA reduktase yang menjadi aktif jika terdapat kekurangan kolesterol endogen. Asupan kolesterol dari darah juga diatur oleh jumlah reseptor LDL yang terdapat pada permukaan sel hati. (14)

2. Jalur Endogen

Trigliserida dan kolesterol yang disintesis oleh hati diangkut secara endogen dalam bentuk VLDL kaya trigliserida dan mengalami hidrolisis dalam sirkulasi oleh lipoprotein lipase yang juga menghidrolisis kilomikron menjadi partikel lipoprotein yang lebih kecil yaitu IDL dan LDL. LDL merupakan lipoprotein yang mengandung kolesterol paling banyak (60-70%).

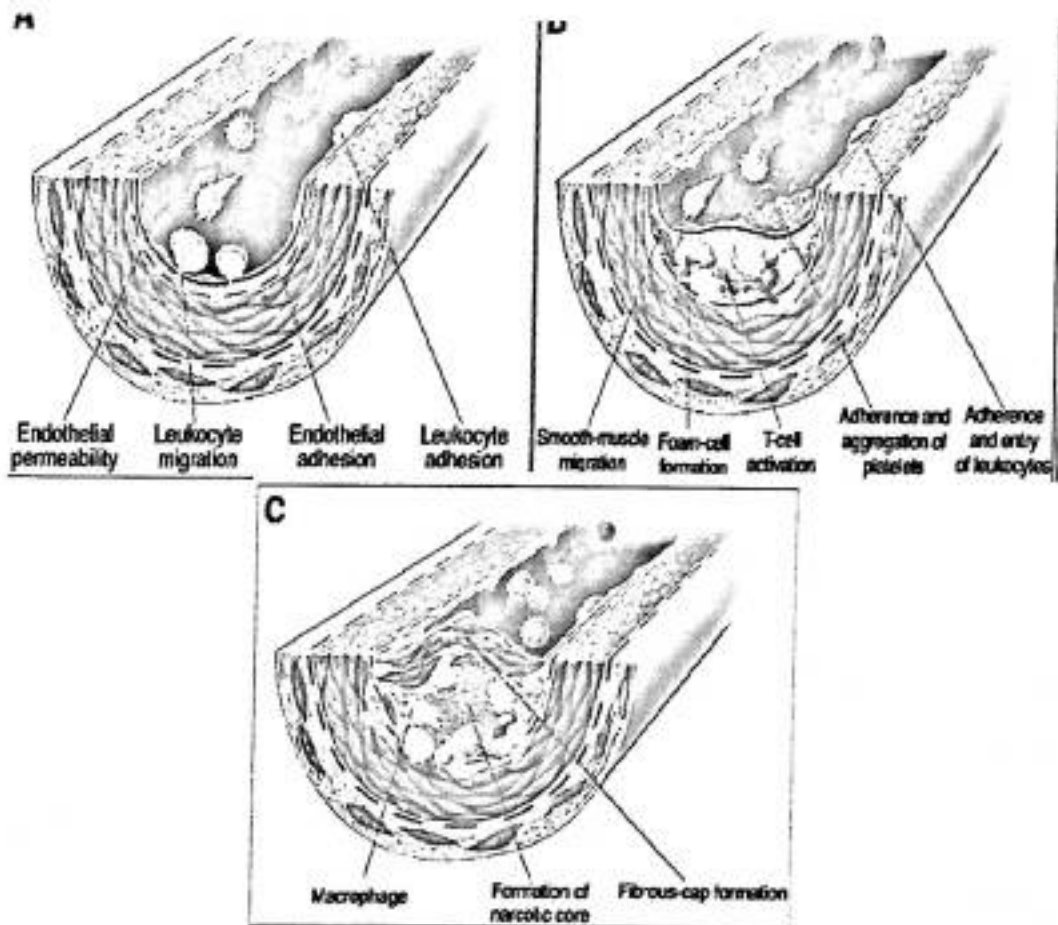
LDL mengalami katabolisme melalui reseptor seperti di atas dan jalur non reseptor. Jalur katabolisme reseptor dapat ditekan oleh produksi kolesterol endogen. HDL berasal dari hati dan usus sewaktu terjadi hidrolisis kilomikron dibawah pengaruh enzim *lecithin : cholesterol acyltransferase* (LCAT). Ester kolesterol ini akan mengalami perpindahan dari HDL kepada VLDL atau IDL sehingga dengan demikian terjadi kebalikan arah transpor kolesterol dari perifer menuju ke hati untuk dikatabolisme. Aktivitas ini mungkin berperan sebagai sifat aterogenik. (14)

II.2.2 Aterosklerosis

Aterosklerosis merupakan salah satu penyebab utama kematian di negara-negara berkembang. Aterosklerosis dikarakteristikan dengan terjadinya penimbunan sejumlah kolesterol (LDL) di dalam dinding arteri, yaitu suatu proses yang dipicu oleh faktor genetik dan lingkungan seperti merokok, diabetes mellitus, dan hipertensi. Penimbunan ini utamanya terjadi di dalam makrofag dan akhirnya akan membentuk suatu lesi di dalam intima arteri. Lesi ini kemudian akan berkembang dan cenderung menjadi pecah, dan konsekuensinya akan menimbulkan berbagai kejadian klinis, seperti serangan jantung dan strok. (2)

Disfungsi atau adanya luka pada endotel akan meningkatkan permeabilitas endotel dan penimbunan LDL dalam ruang subendotelial, keadaan ini juga diikuti dengan melekatnya leukosit dan kemudian

bertransmigrasi melewati endotel. Keberadaan leukosit ini akan melepaskan sitokin, agen vasoaktif, dan faktor tumbuh yang dapat meningkatkan respon inflamasi yang ditandai dengan perpindahan sel otot halus ke dalam intima dan proliferasinya akan membentuk lesi lanjutan. Komponen lain dari respon inflamasi tersebut adalah penarikan makrofag ke dinding arteri. Makrofag kemudian mengambil LDL yang tertimbun dan membentuk sel busa yang merupakan penanda awal dari suatu lesi aterosklerosis. Akhirnya terjadi akumulasi makrofag secara berkelanjutan, pembentukan balutan fibrous, dan nekrosis pada bagian inti dari lesi. (2)



Gambar 2. Proses Aterosklerosis (2)

Akumulasi kolesterol di dalam makrofag tidak akan terjadi bila kolesterol pada LDL masih dalam kondisi tidak teroksidasi. Banyaknya reseptor LDL pada makrofag dikendalikan oleh banyaknya LDL kolesterol. Bila kadar LDL kolesterol tinggi maka jumlah reseptor LDL pada makrofag akan berkurang dengan sendirinya (*down regulated*), sehingga tidak memungkinkan terjadinya akumulasi kolesterol dalam makrofag dan sel busa (*foam cell*) tidak akan terbentuk. (15)

II.2.3 Mekanisme Oksidasi LDL

Hasil oksidasi lipid dapat ditemukan di dalam ateroma, sehingga dapat diperkirakan bahwa oksidasi LDL dapat terjadi di dalam ruang subendotelial pada dinding arteri, yang merupakan lingkungan pro-oksidatif. LDL dapat mengalami modifikasi oksidatif pada dinding arteri ataupun pada beberapa bagian ekstraseluler dan kemudian kembali ke kompartemen plasma. (6)

Beberapa sel pada dinding arteri, yang meliputi makrofag, sel endothelial, dan sel otot halus, mengsekresikan produk oksidatif yang dapat memicu oksidasi lipid. Monosit yang berasal dari makrofag diketahui mampu menghasilkan spesies radikal pengoksidasi. Monosit/makrofag dapat berperan dalam proses oksidatif yang bergantung pada logam maupun yang tidak bergantung pada logam. Mekanisme oksidatif yang diperantai oleh sel endothelial dan sel otot halus membutuhkan logam dari luar. Meskipun begitu, masih belum jelas mekanisme oksidatif ataupun agen radikal yang

terlibat, kandidat yang berpotensi meliputi, seruloplasmin, 12/15-lipooksigenase (LO), mieloperoksidase, NADPH oksidase, spesies nitrogen reaktif, atau pengoksidasi lain yang dihasilkan oleh makrofag, dan sitokrom P450. Di samping itu, telah ditemukan perak dan besi aktif (Cu^{2+} atau Fe^{2+}) pada lesi aterosklerosis, protein pembawa perak di dalam plasma (seruloplasmin) dapat mengkatalisasi oksidasi LDL. (6)

Oksidasi LDL secara *in vitro* telah diteliti secara ekstensif menggunakan berbagai agen yang dapat memicu terjadinya reaksi oksidasi. Agen-agen tersebut, meliputi ion perak dan besi, seruloplasmin, 15-lipooksigenase, peroksinitrit, penggerak radikal bebas 2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) and 2,2'-azobis(2,4-dimetil-valeronitril) (AMVN), maupun sel endotelial, sel otot halus, dan makrofag. Metode yang paling umum digunakan untuk memicu terjadinya oksidasi LDL secara *in vitro* yaitu dengan inkubasi menggunakan ion perak. Pada oksidasi LDL yang diinduksi dengan logam, ion logam telah diperkirakan ikut serta dalam reaksi siklus redoks dengan mempengaruhi atau merubah bentuk dari lipid hidroperoksid endogen. (6)

Mekanisme oksidasi LDL terjadi melalui mekanisme peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid yang diperantarai ROS mempunyai tiga komponen utama reaksi, yaitu reaksi inisiasi, propagasi, dan terminasi (16)

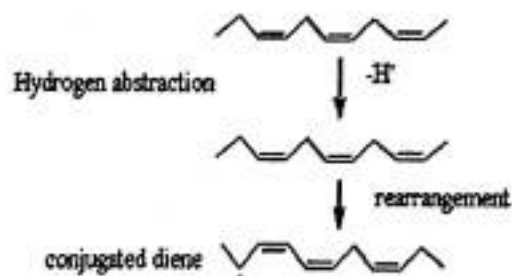
1. Tahap Inisiasi

Tahap inisiasi dari rangkaian peroksidasi mengacu pada penyerangan oleh ROS yang memungkinkan pemindahan atom hidrogen dari gugus metil (-CH₂-), dimana hidrogen ini memiliki mobilitas yang sangat tinggi. Penyerangan ini dengan mudah menghasilkan suatu radikal bebas dari asam lemak yang memiliki banyak ikatan tidak jenuh. OH merupakan ROS yang paling efisien untuk melakukan penyerangan tersebut. (16)



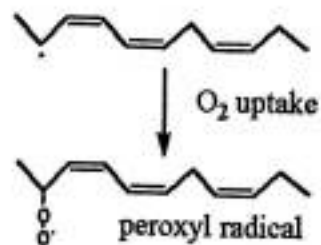
Gambar 3. Penghilangan atom hidrogen oleh ROS (16)

Adanya ikatan rangkap pada asam lemak memperlemah ikatan C-H pada atom karbon yang berdekatan dengan ikatan rangkap sehingga atom H dapat dengan mudah dihilangkan. Radikal karbon cenderung ke keadaan stabil dengan melakukan penyusunan struktur kembali membentuk suatu konjugat dien. (17)



Gambar 4. Pembentukan konjugat dien (16,17)

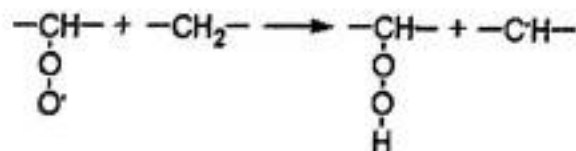
Di bawah kondisi aerobik, konjugat dien kemungkinan bergabung dengan O₂ yang kemudian berubah menjadi radikal peroxil ROO[·].



Gambar 5. Terbentuknya radikal peroksil (16, 17)

2. Tahap Propagasi

Dalam bentuk radikal peroksil memungkinkan terjadinya pemindahan atom H dari molekul lipid lain (asam lemak yang berdekatan), terutama dengan adanya logam, seperti tembaga dan besi, yang dapat menyebabkan autokatilik reaksi rantai. Radikal peroksil bergabung dengan H membentuk lipid hidroperoksida. Reaksi ini menandai tahap propagasi.



Gambar 6. Pembentukan lipid hidroperoksida (16)

Lipid hidroperoksida adalah produk primer peroksidasi yang bersifat sitotoksik. Melalui pemanasan atau reaksi yang melibatkan logam, lipid hidroperoksida akan dipecah menjadi produk peroksidasi lipid sekunder, yakni radikal lipid alkoksil dan peroksi lipid. Radikal lipid alkoksil dan lipid peroksil juga dapat menginisiasi reaksi rantai lipid selanjutnya. Aldehid reaktif (malonaldehid dan 4-hidroksinonenal) pada produk tersebut terlibat pada

sebagian besar patofisiologi terkait stres oksidatif pada sel maupun jaringan dan merupakan produk akhir peroksidasi lipid. Meskipun sebagai produk akhir, secara kimiawi aldehyd tersebut tetap aktif dan mempunyai kereaktifan terhadap berbagai biomolekul, termasuk protein dan fosfolipid.

3. Tahap Terminasi

Terminasi atau berakhirnya pembentukan hidroperoksida terjadi dengan bereaksinya radikal peroksil dengan antioksidan penangkapan radikal (misalnya: α -tokoferol) sebagai molekul yang menghentikan rantai reaksi pembentukan peroksida lemak. Selain itu reaksi radikal alkil atau radikal pada atom karbon asam lemak ($R\cdot$) dapat bereaksi dengan peroksida lemak $ROO\cdot$ menghasilkan produk senyawa seperti dimer $ROOR$ yang relatif stabil atau dua molekul peroksida bergabung membentuk turunan senyawa rantai yang bergugus hidroksi (ROH). Apabila proses tersebut tidak diredam oleh *scavenger* alamiah, kerusakan akan terjadi pada berbagai struktur penting asam lemak tak jenuh pada membran fosfolipid. Selain itu, kerusakan peroksidatif tersebut dapat dirambatkan oleh reaksi rantai berulang. (16)

Produk akhir dari peroksidasi lipid pada tahap propogasi yang berupa aldehyd reaktif ini kemudian akan mengikat gugus amino dari apoB-100 yang meningkatkan muatan negatif protein, sehingga pada elektroforesis laju LDL teroksidasi lebih cepat dibandingkan dengan native LDL. (17)

II.3 Antioksidan

II.3.1 Pengertian

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel akan dihambat. (18)

Berkaitan dengan reaksi oksidasi di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif (ROS) melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihanannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut stress oksidatif. (18)

II.3.2 Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan digolongkan menjadi tiga berdasarkan kerja dalam mencegah proses oksidasi yaitu: (19)

1. Antioksidan gugus fenol dan aminaromatik yang bereaksi dengan radikal bebas dari sistem membentuk produk substrat non radikal antioksidan

2. Antioksidan yang dapat menghilangkan molekul-molekul hidroksida dan substrat tetapi tanpa melibatkan radikal bebas
3. Antioksidan yang dapat menginaktivkan logam untuk mempercepat reaksi oksidasi

II.4 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.4.1 Pengertian Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengesktraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok diluar pengaruh cahaya matahari langsung, (20) kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (21)

II.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis hewan termasuk biota laut. Komponen kimia yang terdapat pada tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik. Pelarut organik yang paling umum digunakan untuk mengekstraksikan komponen kimia dari sel tanaman adalah metanol, etanol, kloroform, heksan, eter, aseton, benzen dan etil asetat. (21)

Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel

yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel. (21)

II.4.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat ini akan larut ke dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan antara konsentrasi di dalam dan diluar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan diluar sel. (21, 22)

II.4.4 Jenis-Jenis Ekstraksi

Proses ekstraksi dapat dilakukan dengan secara panas dan secara dingin. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi secara dingin yaitu dengan maserasi, perkolasi dan soxhletasi. (21)

II.4.5 Ekstraksi Secara Maserasi

Metode maserasi merupakan cara penyaringan yang sederhana, yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari

selama beberapa hari pada temperatur yang terlindung oleh cahaya. Keuntungan cara penyaringan dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah didapat. Maserasi dilakukan dengan cara memasukan 10 bagian simplisia atau dengan campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian penyari, dan ditutup, serta dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sekali-kali diaduk, dikerai dan peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya sampai diperoleh 100 bagian. Pindahkan kedalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk dan terlindung dari cahaya selama 2 hari. (21)

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol atau pelarut lain. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang sederhana. (21)

II. 5 Elektroforesis Gel

Elektroforesis adalah suatu teknik pemisahan komponen-komponen dengan pengaruh arus listrik sehingga terjadi laju perpindahan.(23) Elektroforesis juga dapat dikatakan suatu proses Bergeraknya molekul bermuatan pada suatu medan listrik. Posisi molekul yang terseparasi pada gel dapat dideteksi dengan pewarnaan atau autoradiografi, atau pun dilakukan kuantifikasi dengan densitometer. (24)

Subjek pada elektroforesis dikontrol oleh gerakan partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Protein merupakan molekul bermuatan yang dapat berpindah di bawah pengaruh medan listrik. Dari sudut pandang elektroforesis, dua sifat fisika dari protein yang paling penting adalah mobilitas elektroforesis dan titik isoelektriknya. Mobilitas elektroforesis dari protein tergantung pada muatan, ukuran, dan bentuk, sedangkan titik isoelektriknya hanya tergantung pada muatan secara keseluruhan. (24)

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan teknik yang luas digunakan bidang biokimia, genetika, maupun biologi molekuler untuk memisahkan protein. Gel poliakrilamid sangat cocok digunakan untuk elektroforesis protein karena gel poliakrilamid mampu membentuk ukuran pori yang sesuai untuk menyaring protein, reaksi polimerisasi dapat direproduksi dan mudah terjadi dan gel dapat dibuat menjadi berbagai bentuk, pada saat dibuat gel poliakrilamid bersifat hidrofilik dan bermuatan netral, dan gel poliakrilamid bersifat tembus cahaya pada panjang gelombang sekitar 250 nm dan tidak dapat mengikat pewarna protein. (24)

Protein merupakan molekul amfoter, yang dapat bermuatan positif, negatif, ataupun tidak bermuatan tergantung dari pH lingkungannya. Terdapat pH spesifik, di mana setiap protein dapat menjadi tidak bermuatan, pH ini disebut dengan titik isoelektrik protein. Protein akan bermuatan positif jika protein berada dalam larutan yang pH-nya berada di bawah titik

Subjek pada elektroforesis dikontrol oleh gerakan partikel bermuatan dalam suatu medan listrik. Protein merupakan molekul bermuatan yang dapat berpindah di bawah pengaruh medan listrik. Dari sudut pandang elektroforesis, dua sifat fisika dari protein yang paling penting adalah mobilitas elektroforesis dan titik isoelektriknya. Mobilitas elektroforesis dari protein tergantung pada muatan, ukuran, dan bentuk, sedangkan titik isoelektriknya hanya tergantung pada muatan secara keseluruhan. (24)

SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) merupakan teknik yang luas digunakan bidang biokimia, genetika, maupun biologi molekuler untuk memisahkan protein. Gel poliakrilamid sangat cocok digunakan untuk elektroforesis protein karena gel poliakrilamid mampu membentuk ukuran pori yang sesuai untuk menyaring protein, reaksi polimerisasi dapat direproduksi dan mudah terjadi dan gel dapat dibuat menjadi berbagai bentuk, pada saat dibuat gel poliakrilamid bersifat hidrofilik dan bermuatan netral, dan gel poliakrilamid bersifat tembus cahaya pada panjang gelombang sekitar 250 nm dan tidak dapat mengikat pewarna protein. (24)

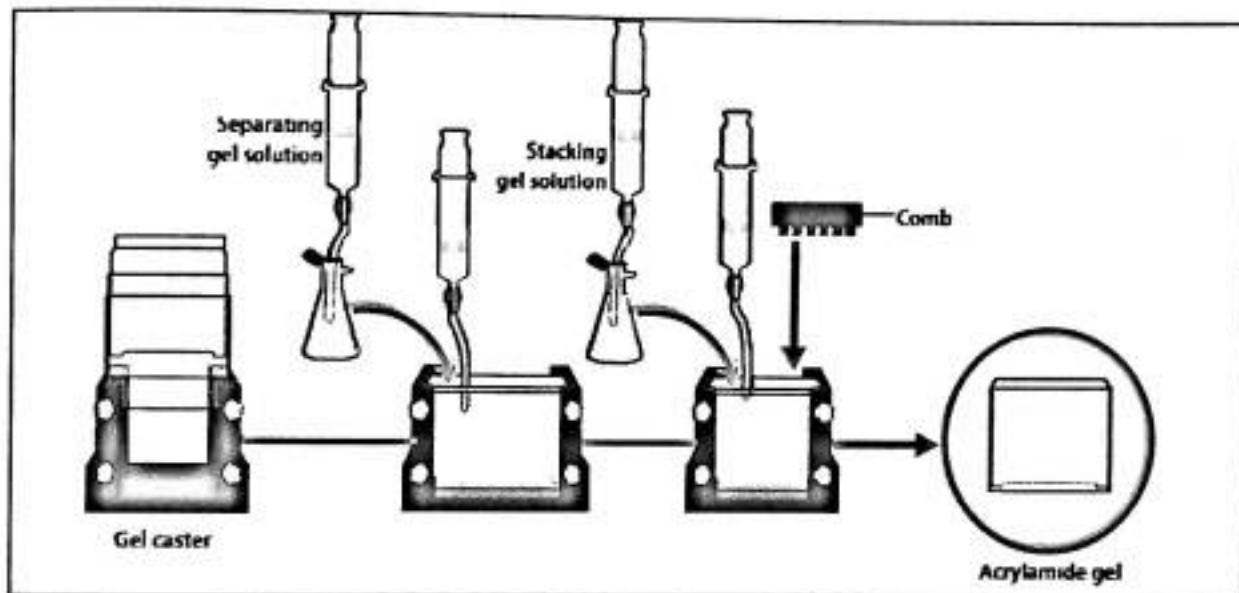
Protein merupakan molekul amfoter, yang dapat bermuatan positif, negatif, ataupun tidak bermuatan tergantung dari pH lingkungannya. Terdapat pH spesifik, di mana setiap protein dapat menjadi tidak bermuatan, pH ini disebut dengan titik isoelektrik protein. Protein akan bermuatan positif jika protein berada dalam larutan yang pH-nya berada di bawah titik

isoelektriknya dan bermuatan negatif jika pH-nya berada di atas titik isoelektriknya. Ketergantungan terhadap pH ini mempengaruhi mobilitas protein baik dalam kecepatan maupun arah perpindahannya. Mobilitas elektroforesis dari protein sangat berbeda dalam gel dengan larutan. Gel dapat bertindak sebagai molekul penyaring berbagai ukuran protein, dapat menentukan laju perpindahan protein, dan menahan protein pada tempatnya pada akhir elektroforesis hingga proses pewarnaan agar dapat dilihat. (24)

Teknik elektroforesis mirip dengan kromatografi, yaitu memisahkan campuran senyawa berdasarkan perbedaan sifatnya. Dalam elektroforesis gel, pemisahan dilakukan terhadap campuran senyawa dengan muatan listrik yang berbeda-beda. Dalam elektroforesis gel terdapat dua material dasar yang disebut *fase diam* dan *fase bergerak*. Fase diam berfungsi sebagai penyaring, dimana ia "menyaring" senyawa yang akan dipisahkan, sementara fase bergerak berfungsi membawa senyawa yang akan dipisah. Larutan penyangga yang ditambahkan pada fase bergerak bertujuan untuk menjaga kestabilan eluen dari elektroforesis gel. (24)

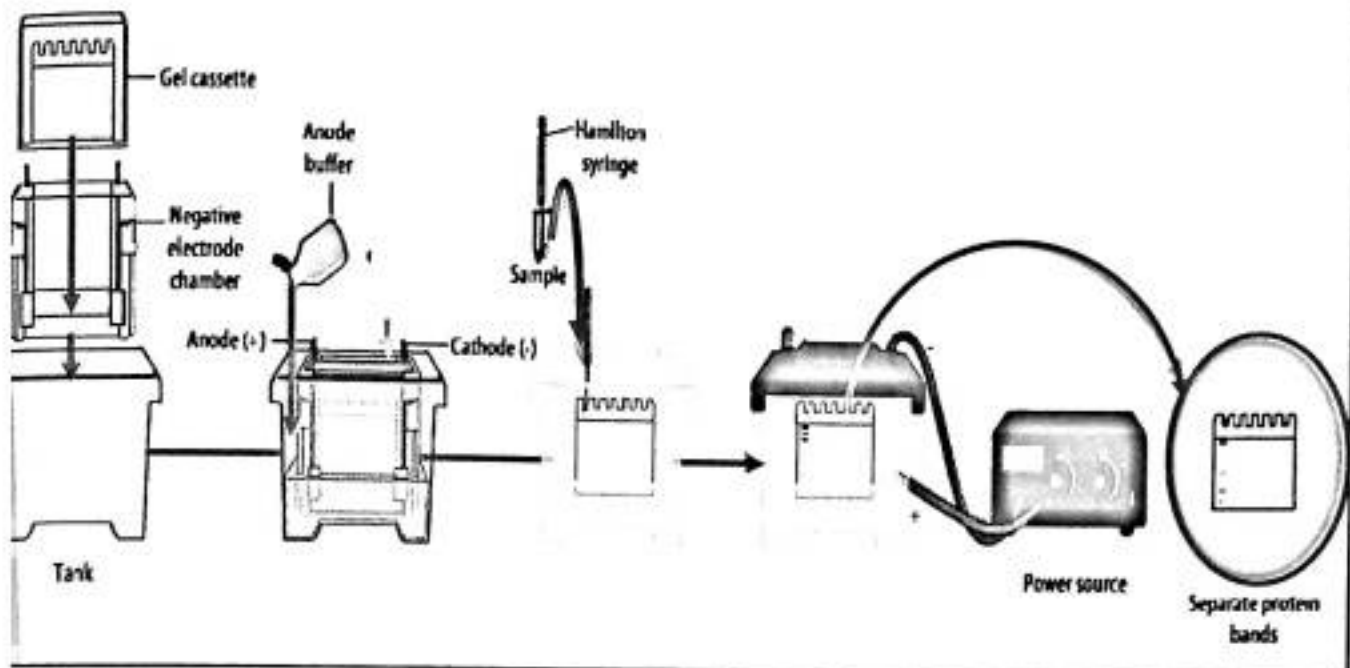
Gel poliakrilamid terdiri dari akrilamid, bisakrilamid, SDS, dan tris-Cl yang telah diatur pHnya. Amonium persulfat dan TEMED ditambahkan dalam larutan tersebut ketika larutan siap dipolimerisasikan. Gel poliakrilamid terdiri atas 2 lapis gel, yaitu *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* umumnya merupakan lapisan paling dasar dan mengandung poliakrilamid yang lebih besar dibandingkan dengan *stacking gel*. Gel dipolimerisasikan di

dalam penahan / pembentuk gel yang telah dipasang plat kaca. Pertama, *separating gel* dituang dan dibiarkan berpolimerisasi. Selanjutnya, *stacking gel* dituang di atasnya dan sisir dipasang untuk membentuk sumur. Setelah *stacking gel* berpolimerisasi, sisir dipindahkan dan gel telah siap untuk dielektroforesis. (24)



Gambar 7. Proses Pembuatan Gel Poliakrilamid (24)

Sebelum elektroferesis, terlebih dulu disiapkan buffer untuk elektroforesis.alat elektroforesis kemudian diatur, kemudian buffer dimasukkan hingga menutupi semua gel dalam penahan gel yang berelektroda. Selanjutnya, sampel dimasukkan ke dalam sumur satu per satu dengan menggunakan spoit atau mikropipet. Kemudian alat elektroforesis dihubungkan dengan sumber daya dan dijalankan dengan tegangan dan kuat arus yang sesuai hingga terjadi pemisahan protein.



Gambar 8. Proses Elektroforesis (24)

Pada saat elektroforesis berjalan, medan listrik mengalir ke sepanjang gel, menyebabkan protein yang bermuatan negatif akan berpindah melintasi gel menuju ke arah anoda. Berdasarkan ukurannya, tiap protein akan memiliki perbedaan perpindahan dalam matriks gel. Setelah proses elektroforesis selesai sesuai dengan waktu yang telah diatur, protein akan memiliki laju yang berbeda, protein yang berukuran kecil akan bergerak lebih jauh ke bagian bawah gel dan protein yang berukuran besar akan tertinggal lebih dekat pada posisi awal. (24)

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah elektroforesis (*BioRad*), gelas ukur (*Pyrex®*), inkubator (*Memmert*), lumpang dan alu, mikropipet (*Eppendorf*), plat kaca, timbangan analitik (*Sartorius*), tabung *effendorf*.

Bahan yang digunakan adalah air suling, akrilamid, amonium persulfat (APS), bisakrilamid, CuSO_4 (*E merck®*), Commassie Brilliant Blue R250, sampel klika onkea (*Mezzettia parviflora* Becc.), EDTA, etanol 70%, gliserol, glisin, HCl, LDL (*Human*), metanol, PBS pH 7.4, SDS, TEMED, Tris.

III.2 Pengambilan dan Penyiapan Sampel Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian yang digunakan berupa klika tanaman onkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) yang diambil dari wilayah hutan Kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara.

III.2.2 Pengolahan Sampel

Klika onkea diambil dari cabang pohon yang besar kemudian dibersihkan dan dikeringkan. Bahan kering lalu diserbukkan dan selanjutnya sampel siap untuk diekstraksi.

III.3 Ekstraksi Sampel

Sebanyak 1500 gram sampel yang telah diserbukkan dimasukkan ke dalam wadah maserasi lalu ditambahkan etanol 70% hingga seluruh sampel terendam. Wadah lalu ditutup rapat dan dibiarkan selama 1 hari sambil dilakukan pengadukan beberapa kali. Campuran kemudian disaring dan ampasnya ditambah lagi dengan pelarut etanol 70 %. Proses penyarian selanjutnya dilakukan sebanyak 4 kali. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak etanol kering sebanyak 282 g.

III.4 Prosedur Uji Penghambatan Oksidasi LDL

III.4.1 Penyiapan Larutan Stok Sampel

Larutan stok dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 mg digerus dan dilarutkan dengan 50 μ l DMSO kemudian dilarutkan dengan PBS hingga 1 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan stok dipipet sebanyak 50 μ l dan 25 μ l dan masing-masing ditambahkan PBS hingga 1 ml sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 500 ppm dan 250 bpj. Dari larutan ekstrak tersebut, masing-masing diambil 5 μ l kemudian ditambahkan 10 μ l LDL dan 5 μ l CuSO₄ dan ditambahkan PBS hingga volumenya 50 μ l.

III.4.2 Penyiapan Larutan Quersetin

Quersetin ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan dengan 1 ml PBS sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm sebagai larutan kontrol positif. Dari larutan stok dipipet 25 μ l dan ditambahkan PBS hingga 1 ml

sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak 250 ppm. Dari larutan ekstrak tersebut, masing-masing diambil 5 μ l kemudian ditambahkan 10 μ l LDL dan 5 μ l CuSO_4 dan ditambahkan PBS hingga volumenya 50 μ l.

III.4.3 Pembuatan Phospate-Buffered Saline (PBS) pH 7.4 (25)

Sebanyak 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na_2HPO_4 , dan 0.24 g KH_2PO_4 dilarutkan dalam 800 ml air suling, kemudian atur pH-nya hingga menjadi 7.4 dengan HCl, tambahkan sisa air suling hingga volume mencapai 1000 ml.

III.4.4 Pembuatan Buffer Tris-Glisin (25)

Tris base ditimbang sebanyak 3 g dan sebanyak 14.38 g glisin dilarutkan dalam 800 ml aquades sambil diaduk dan homogenkan. Selanjutnya, sisa air suling ditambahkan ke dalam larutan dan dicukupkan volumenya hingga 1000 ml.

III.4.5 Pembuatan Larutan CuSO_4 1 mM (25)

Larutan CuSO_4 dibuat dengan melarutkan 16 mg CuSO_4 ke dalam air suling dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml.

III.4.6 Pembuatan Larutan Pemberat Commassie Brilliant Blue (25)

Pembuatan larutan pemberat dilakukan dengan menimbang sebanyak 1 mg Commassie brilliant blue dalam 3 ml gliserol 1%.

III.4.7 Pembuatan Larutan EDTA 10 mMol (25)

Pembuatan larutan EDTA dilakukan dengan melarutkan 0,226 gram EDTA dalam 10 ml air suling.

III.4.8 Pembuatan Larutan Stok Poliakrilamid (25)

Larutan stok poliakrilamid mengandung 19 g akrilamid dan 1 g N',N-metilen-bis-akrilamid yang dilarutkan dalam air suling dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml. Larutan disimpan pada botol gelap dan suhu kamar.

III.4.9 Pembuatan Larutan Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (25)

Larutan dibuat dengan melarutkan 9,085 g tris base dengan air suling dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml. kemudian diatur pHnya hingga mencapai 8,8 dengan penambahan HCl.

III.4.10 Pembuatan Larutan Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 (25)

Larutan dibuat dengan melarutkan 3,028 g tris base dengan air suling dan dicukupkan volumenya hingga 50 ml. kemudian diatur pHnya hingga mencapai 6,8 dengan penambahan HCl.

III.4.11 Pembuatan Larutan Amonium Persulfat (APS) (25)

Larutan amonium persulfat dibuat dengan melarutkan 0,1 g amonium persulfat dalam 1 ml air suling. Larutan ini harus dibuat segar.

III.4.12 Pembuatan Gel Pemisah (*Separating gel*) 12% (25)

Gel pemisah dibuat dengan mencampurkan 4 ml larutan stok poliakrilamid, 3,35 ml air suling, 2,5 ml Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, dan 0,1 ml SDS 10%, kemudian distirer agar homogen dan ditambahkan 50 μ l APS 10% dan 5 μ l TEMED.

III.4.13 Pembuatan Gel Pengumpul (*Stacking gel*) 4% (25)

Gel pengumpul dibuat dengan mencampurkan 1,30 ml larutan stok poliakrilamid, 6,1 ml air suling, 2,5 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, dan 100 μ l SDS 10% kemudian distirer agar homogen dan tambahkan 50 μ l APS 10% dan 10 μ l TEMED.

III.4.14 Pembuatan Gel Poliakrilamid (25)

Gel poliakrilamid terdiri dari gel pemisah dan gel pengumpul. Gel pemisah yang telah dibuat, dimasukkan ke dalam plat kaca pembentuk gel sampai kurang lebih setengahnya dengan menggunakan mikropipet dan dijaga agar tidak terbentuk gelembung udara. Air suling ditambahkan secara perlahan-lahan di atas larutan gel pemisah dalam plat kaca agar permukaan gel tidak bergelombang. Gel dibiarkan memadat selama kurang lebih 30 menit (ditandai dengan terbentuknya garis transparan diantara batas air dan gel), setelah itu, air yang menutup gel pemisah dibuang. Kemudian gel pengumpul dituang di atas gel pemisah yang telah memadat. Sisir dipasang, kemudian dibiarkan beberapa lama hingga gel memadat dan sisirnya dilepaskan. Gel dalam plat kaca dipasang pada alat elektroforesis dan dimasukkan ke dalam tangki elektroforesis. Kemudian buffernya dituang hingga seluruh bagian gel terendam.

III.4.15 Pengukuran Aktivitas Penghambatan Oksidasi LDL dengan Metode Elektroforesis Gel

Aktivitas penghambatan oksidasi LDL diukur berdasarkan penghambatan terbentuknya produk oksidasi LDL, yaitu malondialdehid

berantai pendek. LDL dipipet sebanyak 10 μ l lalu dimasukkan ke dalam tabung effendorf selanjutnya ditambahkan 5 μ l larutan stok sampel. Oksidasi diinisiasi dengan penambahan CuSO_4 sebanyak 5 μ l ke dalam tabung effendorf dan volume dicukupkan hingga 50 μ l dengan PBS 7,4. Campuran diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}\text{C}$ selama 1 jam. Kemudian campuran sampel tersebut diambil sebanyak 7 μ l dan dimasukkan ke dalam sumur menggunakan mikropipet, elektroforesis dijalankan pada tegangan 130 volt dan kuat arus 200 mA. Kemudian hasil elektroforesis di densitometri.

III.5 Analisis Data

Data dikumpulkan dari pengukuran untuk masing-masing ekstrak. Besarnya persentase penghambatan oksidasi LDL dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{AUC LDL-teroksidasi} - \text{AUC sampel}}{\text{AUC LDL-teroksidasi} - \text{AUC LDL}} \times 100\%$$

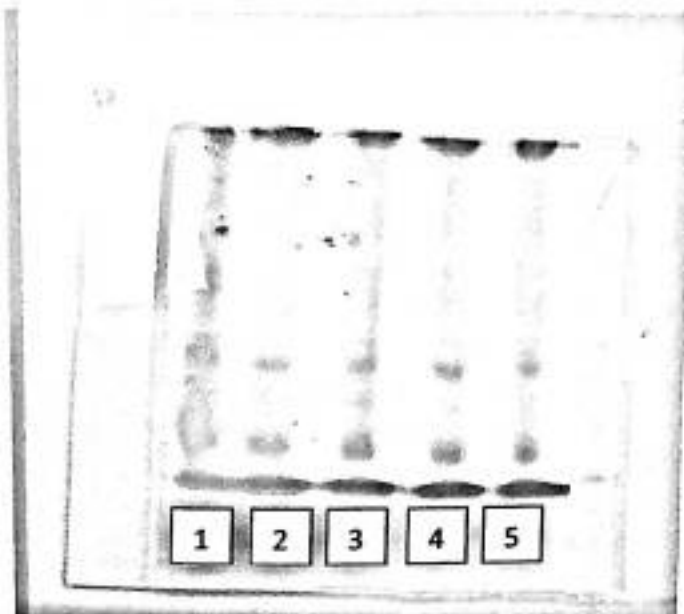
BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Tabel 1. Nilai AUC dan Persentase Penghambatan Oksidasi LDL dari Ekstrak Etanol Klika Ongkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) pada Gel Poliakrilamid

Sampel	Nilai AUC (<i>Area Under Curve</i>)	Persentase Penghambatan Oksidasi LDL (%)
LDL	21544,77	100
LDL-teroksidasi	30442,21	0
LDL-teroksidasi + Quersetin 25 ppm	22752,96	86,42
LDL-teroksidasi +Ekstrak etanol 25 ppm	26766,51	41,31
LDL-teroksidasi +Ekstrak etanol 50 ppm	25974,33	50,21



Keterangan :

1. LDL
2. LDL-teroksidasi
3. LDL-teroksidasi + Quersetin 25 ppm
4. LDL-teroksidasi + Ekstrak etanol 25ppm
5. LDL-teroksidasi + Ekstrak etanol 50 ppm

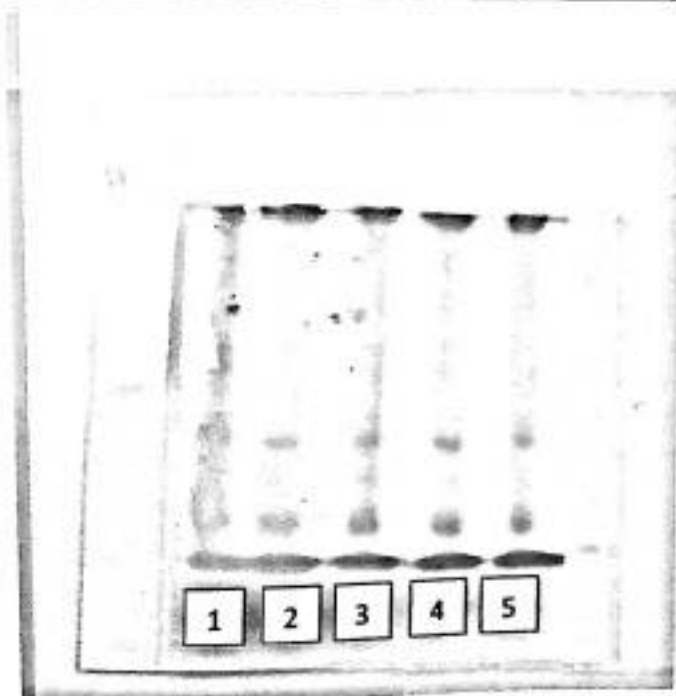
Gambar 9. Foto Hasil Elektroforesis pada Gel Poliakrilamid

BAB IV
HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

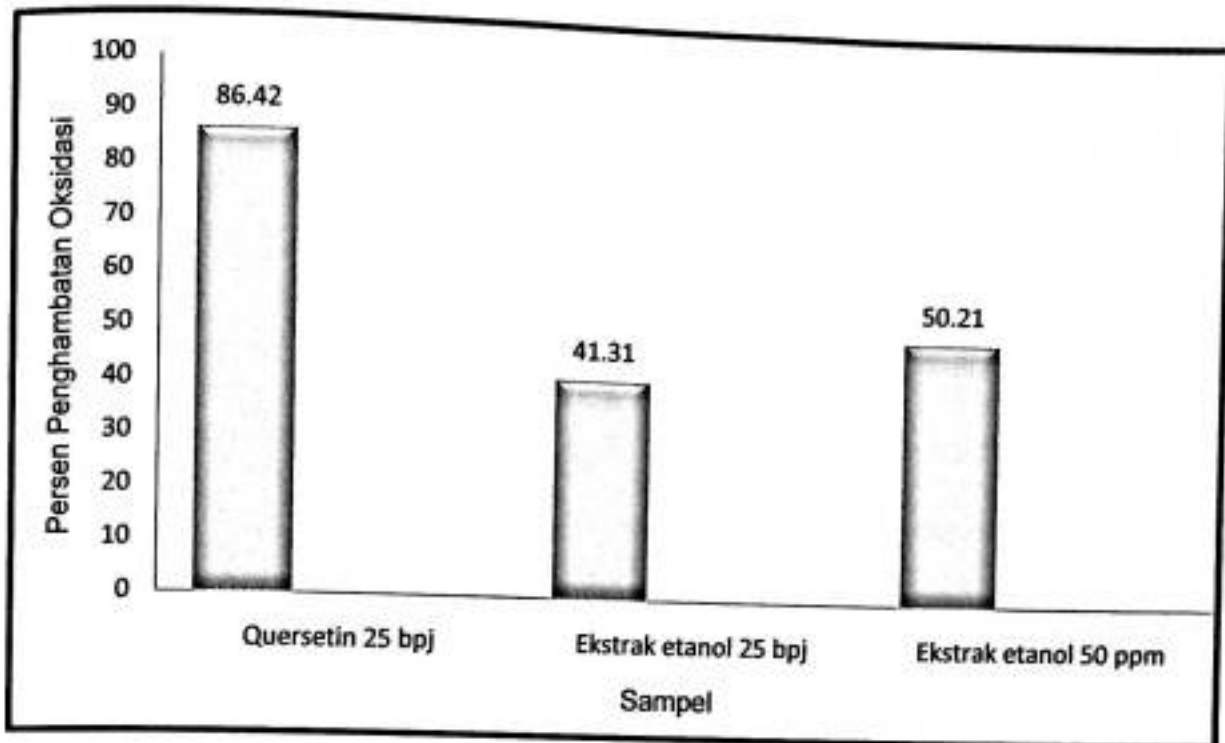
Tabel 1. Nilai AUC dan Persentase Penghambatan Oksidasi LDL dari Ekstrak Etanol Klika Ongkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) pada Gel Poliakrilamid

Sampel	Nilai AUC (<i>Area Under Curve</i>)	Persentase Penghambatan Oksidasi LDL (%)
LDL	21544,77	100
LDL-teroksidasi	30442,25	
LDL-teroksidasi + Quersetin 25 ppm	22752,96	
LDL-teroksidasi +Ekstrak etanol 25 ppm	26766,51	
LDL-teroksidasi +Ekstrak etanol 50 ppm	25974,33	



- Keterangan
1. LDL
 2. LDL-teroksidasi
 3. LDL-teroksidasi + Quersetin 25 ppm
 4. LDL-teroksidasi + Ekstrak etanol 25ppm
 5. LDL-teroksidasi + Ekstrak etanol 50 ppm

Gambar 9. Foto Hasil Elektroforesis pada Gel Poliakrilamid



Gambar 10. Histogram Persentase Penghambatan Oksidasi LDL dari Ekstrak Etanol Klika Ongkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) yang Dibandingkan dengan Quersetin.

IV.2 Pembahasan

Kemampuan ekstrak etanol klika ongkea dalam menghambat oksidasi LDL ini ditentukan dengan menggunakan metode elektroforesis gel. LDL merupakan molekul berbentuk bola yang terdiri dari: kolesterol ester 37-45 %, kolesterol bebas 9-11 %, trigliserida 5-11 %, fosfolipid 18-24 %, dan apolipoprotein B-100 20-24 %

Mekanisme oksidasi LDL melalui peroksidasi lipid dibagi menjadi tiga fase yaitu fase inisiasi, fase propagasi, dan fase terminasi. Reaksi peroksidasi lipid yang lebih lanjut ini kemudian akan menghasilkan produk akhir berupa aldehid rantai pendek yang reaktif, yaitu malondialdehid.

Pada gambar hasil elektroforesis (Gambar 9) dapat dilihat terdapat 4 pita protein yang dapat terukur pada densitometer untuk memperoleh

nilai AUC, tapi pada penelitian ini yang diukur adalah pita yang paling tebal yang berada pada bagian bawah. Hal ini disebabkan karena penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi produk akhir dari oksidasi LDL yaitu malondialdehid yang kemudian dapat berikatan dengan gugus amino dari apoB-100 sehingga dapat meningkatkan muatan negatif dari protein pada LDL, maka pada elektroforesis, laju LDL teroksidasi lebih cepat dibandingkan dengan native LDL. (17) Nilai AUC (*Area Under Curve*) yang diperoleh dari hasil densitometri menunjukkan seberapa banyak LDL-teroksidasi dari hasil reaksi oksidasi. Berdasarkan pengukuran AUC dapat dihitung persentase penghambatan oksidasi LDL.

Data hasil perhitungan di atas menunjukkan bahwa ekstrak etanol klika onkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) memiliki kemampuan untuk menghambat oksidasi LDL pada konsentrasi 25 ppm sebesar 41,31% dan pada konsentrasi 50 ppm sebesar 50,21%. Kemampuan ekstrak etanol onkea ini dalam menghambat oksidasi LDL diduga disebabkan oleh adanya senyawa kimia polar khususnya polifenol yang terakumulasi di dalam ekstrak etanol. Walaupun, kemampuan penghambatan oksidasi LDL dari ekstrak etanol lebih kecil dibandingkan dengan kemampuan penghambatan oksidasi LDL oleh quersetin. Hal ini dapat disebabkan oleh quersetin yang digunakan merupakan senyawa murni sedangkan sampel yang digunakan berupa ekstrak sehingga memungkinkan terdapat senyawa lain yang dapat mempengaruhi kemampuan ekstrak dalam menghambat oksidasi LDL.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol klika onkea (*Mezzettia parviflora* Becc) memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas oksidasi LDL.

V.2 Saran

Sebaiknya dilakukan isolasi senyawa aktif dari Klika Ongkea (*Mezzettia parviflora* Becc.) yang dapat berperan sebagai penghambat aktivitas oksidasi LDL.

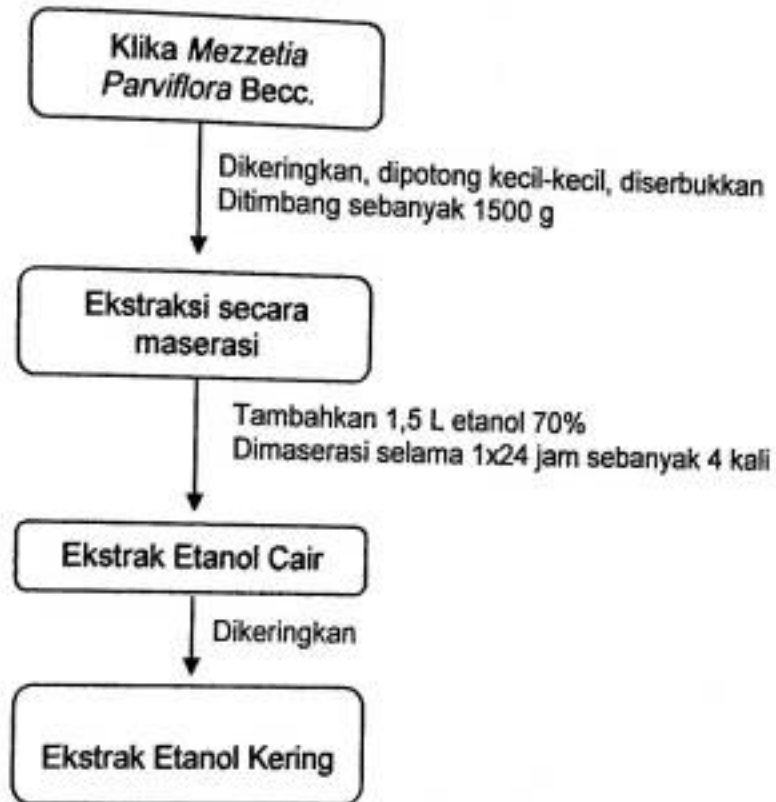
DAFTAR PUSTAKA

1. Scoccia A, Molinuevo MS, McCharty AD, dan Chortizo AM. *A simple method to assess the oxidative susceptibility of low density lipoproteins*. BioMed Central Ltd. 2001. Hal. 1
2. Stocker R. dan Keaney JF. *Role of Oxidative Modification in Atherosclerosis*. The American Physiological Society. 2004. Hal. 1385, 1387
3. Mutschler E. *Dinamika Obat Farmakologi dan Toksikologi*. Penerbit ITB. Bandung. 1999. Hal. 435
4. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology 10th Edition*. The McGraw-Hill Companies Inc. New York. 2007. Hal. 1848, 1859, 1867-1868, dan 2012-2019.
5. Sorrenti V., Di Giacomo C., Russo A., Acquaviva R., Barcellona ML., dan Vanella A. *Inhibition of LDL Oxidation by Red Orange (Citrus sinensis) Extract and Its Active Components*. Institute of Food Technologist. 2004. Vol. 69 No. 6. Hal. 480
6. Liu ML. *LDL Oxidation and LDL Particle Size In The Development of Atherosclerosis*. Department of Medicine University of Helsinki, Finland. 2002. Hal. 10-12, 16
7. Mufidah, Manggau MA, Bariun H, dan Alam G. *Anti Platelet Aggregation and Free Radical Scavenging Activities of Mezzettia parviflora Becc. Woodbark Ethanol Extract*. Makassar International Symposium on Pharmaceutical Science (MIPS). 2009. Hal 199
8. Sumanti, E. *Aktivitas Penghambatan Oksidasi Kolesterol LDL dari Ekstrak Etanol dan Ekstrak Tidak Larut Aseton Klika Ongkea (Mezzettia parviflora Becc.) Secara In Vitro dengan Metode Dena Terkonjugasi*. Fakultas Farmasi Unhas. Makassar. 2010
9. Keng, H. *Order and Families of Malayan Seed Plants*. Singapore University Press. Singapore. 1978.
10. Heyne, K. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid II. Cetakan ke-1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Jakarta. 1987. Hal. 771
11. Hakim, E.H., Achmad, S.A., Makmur, L., Mujahidin, D., & Syah, Y.m., 2001. *Profil kimia Annonaceae, Bull Soc. Nat. Prod. Chem.*, Vol. 1, No. 1, Januari-Juni 2001.

12. Abdul, Rahman. *Fraksinasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Ekstrak Aktif Klika Ongkea (Mezzetia parviflora Becc.) Secara In Vitro*. Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 2008. Hal. 5-6
13. Tan HT, dan Rahardja K. *Obat-obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek Sampingnya*. Edisi IV. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 2002. Hal. 420-421
14. Mayes PA. *Harper Biokimia*. Ed 20 EGC. Jakarta. 1987. Hal. 216-230
15. Raharjo S. *Kerusakan Oksidatif Pada Makanan*. Gajah Mada University Press. 2006. Hal. 46-52
16. Chevreur M. *Peroxidation of Fatty Acid*. Cyberlipid Centre-Resource. 2010.
17. Young, S.I. dan McEneny J. *Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis*. Biochemical Society Transaction. 2001. Vol. 29. Part. 2. Hal. 360
18. Winarsi, Hery. *Antioksidan alami dan Radikal Bebas; Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Kanisius: Yogyakarta. 2002
19. Percival, Mark. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights, Advanced Nutrition Publications, Inc.*, NUT031 1/96, Rev. 10/98
20. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Departemen kesehatan RI. Jakarta. 1995. Hal. 7
21. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1986
22. Harborne JB. *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Bandung: Penerbit ITB
23. Khopkar, S.M. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI-Press. Jakarta 1990. Hal. 182
24. Garfin, D.E. *Essential Cell Biology, Vol. 1 : Cell Structure, A Practical Approach*. Oxford University Press. UK. 2003. Hal. 197-199
25. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual Third Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 2001

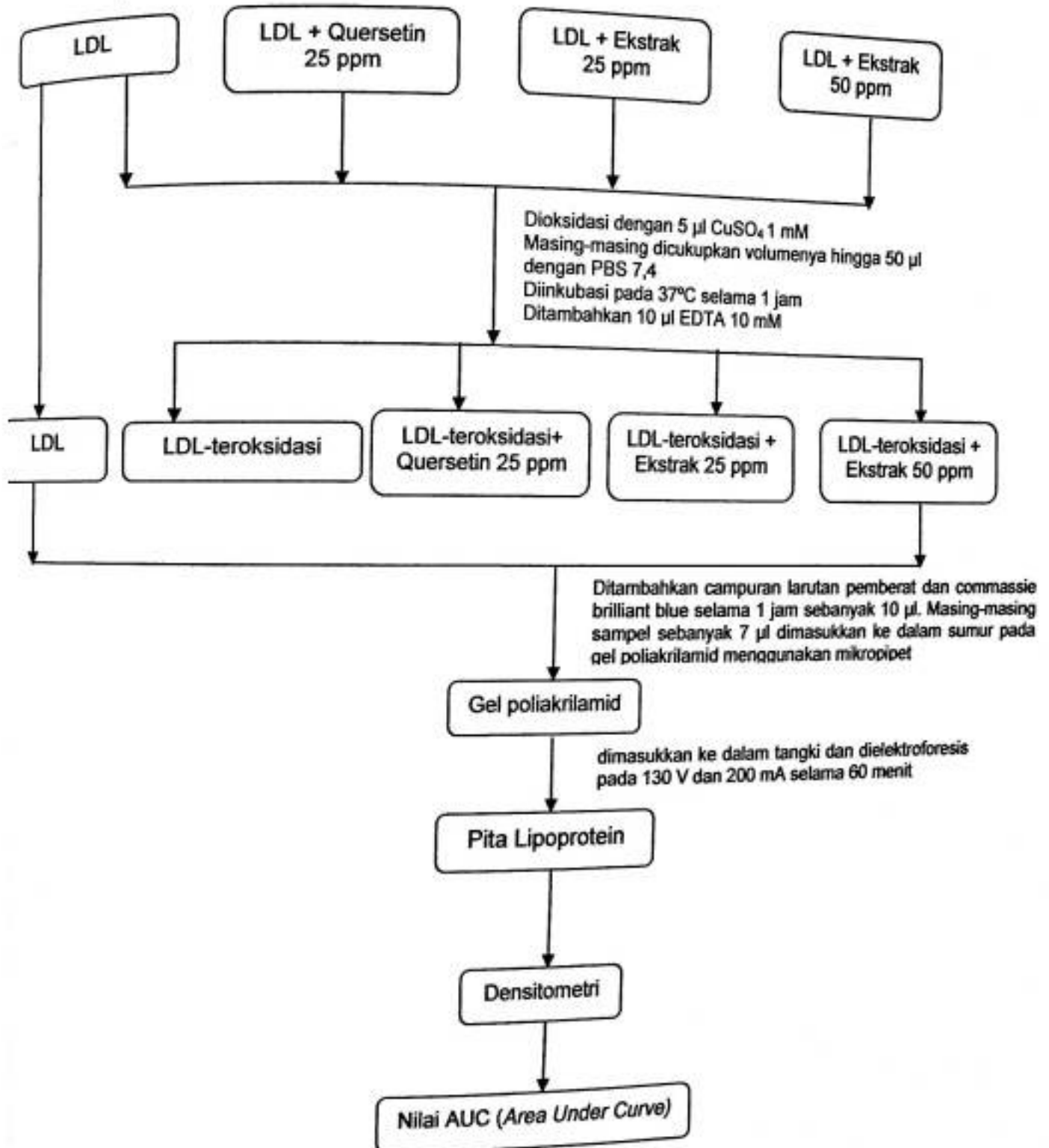
Lampiran I

Skema Kerja Pengolahan Sampel



LAMPIRAN II

Prosedur Elektroforesis Fragmen ApoB-100



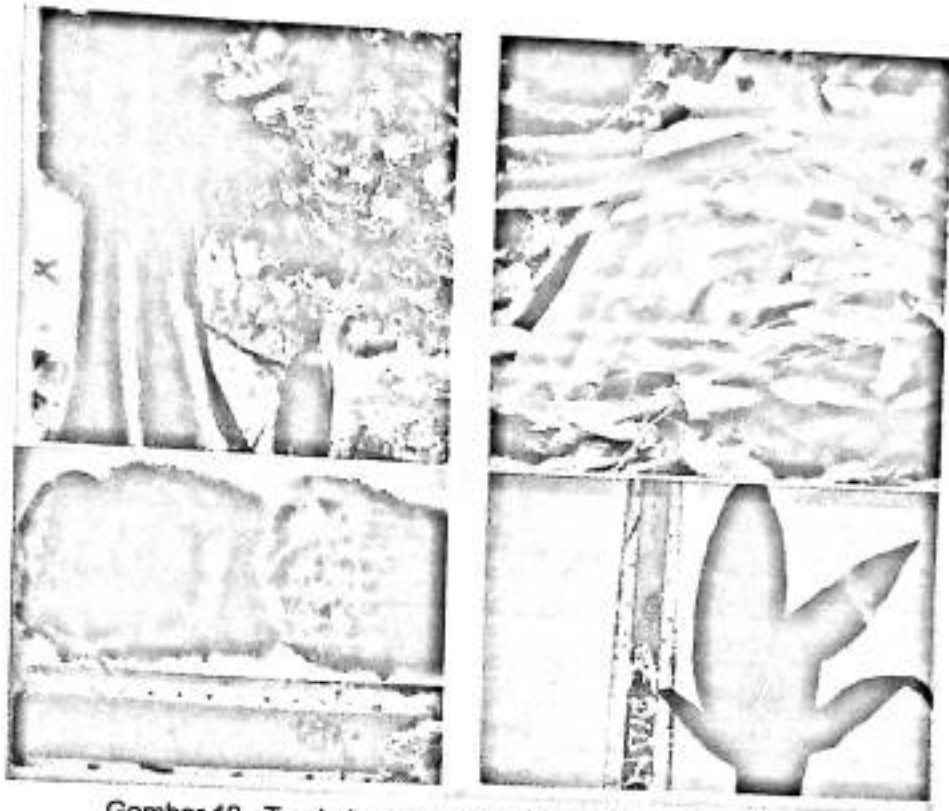
LAMPIRAN III
DATA HASIL DENSITOMETRI

Substance: LDL @ 563 nm		Regression mode: Single Level	
Regression via height	$Y = 0 + 49.42 * X$	$r = 0.00000$	sdv = 0.00 %
area	$Y = 0 + 2154 * X$	$r = 0.00000$	sdv = 0.00 %

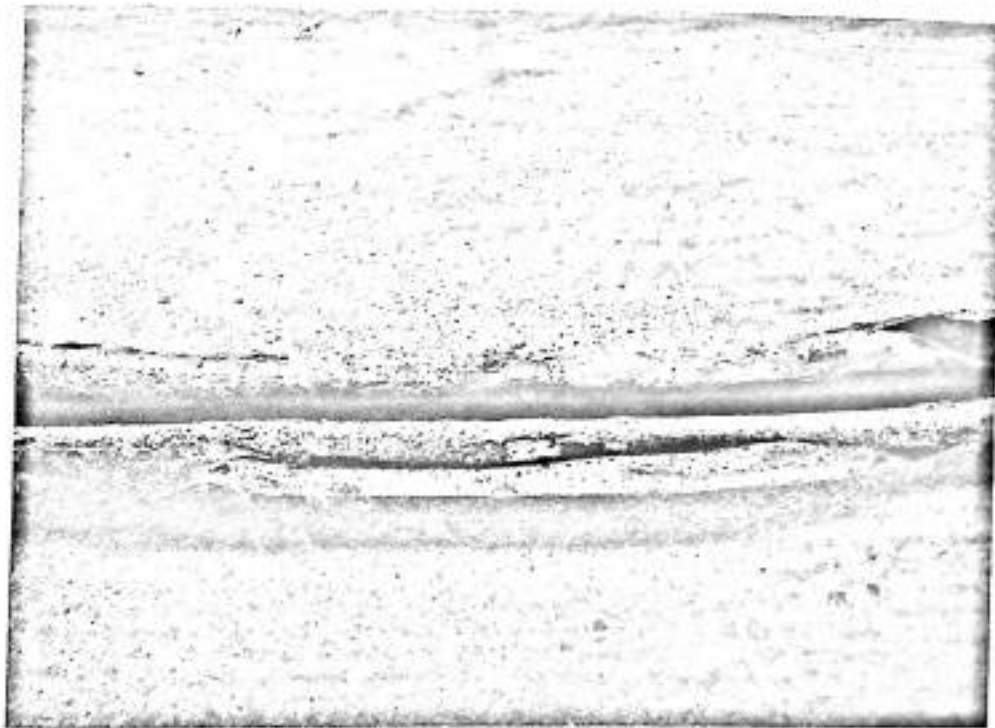
Track	Vial	Rf	Amount Fraction	Height	X(calc)	Area	X(calc)	Remark
1	1	0.83	10.000 µg	494.17		21544.77		Std Level 1
2	1	0.84		671.33	13.58 µg	30442.21	14.13 µg	Sample LDL-ox
3	1	0.84		670.36	13.57 µg	22752.96	12.36 µg	Sample Quercetin 25 ppm
4	1	0.84		660.47	13.37 µg	26766.51	12.42 µg	Sample Ex 25 ppm
5	1	0.84		648.72	13.13 µg	25974.33	12.06 µg	Sample Ex 50 ppm

Gambar. 11 Data Hasil Densitometri Gel Poliakrilamid yang menunjukkan nilai AUC (Area Under Curve)

LAMPIRAN IV
GAMBAR SAMPEL

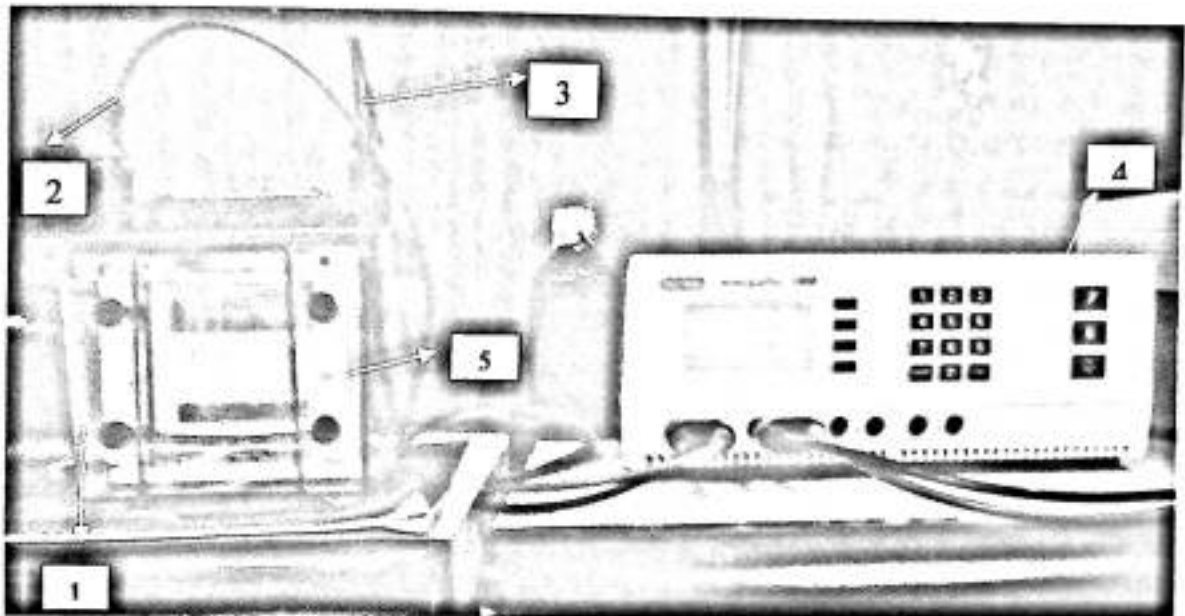


Gambar 12. Tumbuhan Ongkea (*Mezzettia parviflora* Becc.)



Gambar 13. Gambar Klika Ongkea yang telah dikeringkan

LAMPIRAN V
GAMBAR ALAT ELEKTROFORESIS



Gambar 14. Rangkaian Alat Elektroforesis Poliakrilamid

Keterangan :

1. Tangki Elektroforesis
2. Kabel Anoda
3. Kabel Katoda
4. Pemberi Daya (*Power Supply*)
5. Penahan Plat Kaca