

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BERUWAS LAUT
(*Scaevola taccada* (Gaertn.)Roxb) PADA TIKUS PUTIH DIABETES**

*THE ACTIVITIES OF THE ANTIOXIDANT EXTRACTED FROM THE
LEAVES OF THE SEA MANGOSTEEN (*Scaevola taccada* (Gaertn)
Roxb) IN DIABETES OF THE WHITE MOUSE.*

RAHMAWATI

P1503211401



**PROGRAM STUDI BIOMEDIK
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

2013

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BERUWAS LAUT
(*Scaevola taccada* (Gaertn.)Roxb) PADA TIKUS PUTIH DIABETES**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Master

Program Studi

Biomedik

Disusun dan diajukan oleh

RAHMAWATI

P1503211401

Kepada

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

2013

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Rahmawati
Nomor Mahasiswa : P1503211401
Program Studi : Biomedik

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 17 Juli 2013

Yang menyatakan

Rahmawati

PRAKATA

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

Alhamdulillah Rabbil Alamin, Puji syukur tak hentinya penulis ke hadirat Allah Rabbul Alamin, tugas akhir ini bisa selesai karena izin-Nya

Pembuatan tesis ini dimulai dengan ide untuk membuktikan penurunan glukosa darah dengan menggunakan daun beruwah laut yang biasa digunakan oleh masyarakat di desa Ujung Lero kabupaten Pinrang untuk mengobati diabetes, informasinya kami peroleh dari Prof. Hattah Fattah, dan hal ini juga dinyatakan oleh masyarakat setempat waktu kami mengambil sampel.

Banyak pelajaran dan pengalaman baru yang penulis peroleh dalam penyelesaian tesis ini, mulai dari pengambilan sampel di kabupaten Pinrang sampai pada *publish* naskah akhir ini, semua ini memperkaya ilmu dan wawasan penulis, olehnya itu penulis sangat berterima kasih kepada Prof. Dr. Peter Kabo Ph.D. SpJP, SpFK, FIHA dan DR. Pirman, AP, M.Si sebagai Komisi Penasehat, yang telah meluangkan waktu untuk memberikan perbaikan-perbaikan dan saran-saran untuk peningkatan kualitas tesis yang kami hasilkan. Terima kasih juga kami ucapkan kepada Prof. Hj Rosdiana Natsir, M.Sc selaku Ketua Program Studi dan penguji yang telah banyak membantu selesainya tugas akhir kami, juga kepada dr. Danny Suwandi Ph.D, Sp FK(K) dan

DR. dr. Burhanuddin Bahar M.S. yang telah meluangkan waktu memberi saran dan menguji kami.

Terima kasih juga kami sampaikan kepada sivitas akademik Fakultas Farmasi UMI, Wakil dekan I dan II yang selalu mendukung untuk penyelesaian tugas akhir ini. Terima kasih juga kami ucapkan kepada kepala laboratorium Kimia Farmasi, Fitokimia-Farmakognosi, Farmakologi dan Biofarmasi, Pebrianti Riska, Rahmawati, Aulan dan Adnan serta Sukriani yang telah bersama-sama membantu dengan penuh semangat untuk memperoleh hasil penelitian. Khusus kepada suami dan anak-anakku, Fira Fatir Anya, tante Nena terima kasih untuk ikut mendukung ibu mencapai gelar master, untuk bapakku, terima kasih untuk doanya, terima kasih juga kami ucapkan kepada mereka yang namanya tidak bisa saya sebutkan satu persatu, dari mulai pengambilan sampel, penjemputan tikus sampai ketikan akhir ini.

Akhirnya kami menyadari tesis ini tidak sempurna tapi semoga tesis ini dapat bermanfaat untuk keilmuan dan dapat menjadi bahan untuk penelitian selanjutnya.

Makassar, 17 Juli 2013

Rahmawati

ABSTRAK

Rahmawati. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Beruwas Laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) pada Tikus Putih Diabetes. (dibimbing oleh **Peter Kabo dan Pirman AP**)

Penelitian ini bertujuan menentukan aktivitas antioksidan ekstrak daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) pada tikus diabetes.

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan pendekatan *Pre and Post-Test Control Group Design*. Pengujian antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (2,2—difenil-1-pikrilhidrazil) dan dengan parameter Malondialdehid (MDA), digunakan 3 kelompok yaitu ekstrak etanol, n-heksan dan vitamin E, masing-masing 5 ekor tikus putih galur wistar.

Hasil Penelitian menggunakan DPPH, ekstrak etanol menghasilkan nilai ES_{50} sebesar 78.98 ppm, nilai ini dikategorikan “moderately active”, sedangkan pada ekstrak n-heksan nilai ES_{50} sebesar 240,00 ppm atau “weakly active” . Hasil pengujian dengan MDA, data diuji dengan Shapiro-wilk, dihasilkan nilai signifikan ($p>0.05$), artinya distribusinya normal, pada Uji t-berpasangan dihasilkan nilai signifikan ($p<0.05$) menunjukkan perbedaan MDA sebelum dan sesudah perlakuan signifikan. Uji dengan one way anova, dihasilkan nilai 0.00 ($p<0.05$). Nilai ini menunjukkan terdapat perbedaan penurunan nilai MDA antar kelompok perlakuan, uji kemudian dilanjutkan dengan post hoc. Hasil uji post hoc ekstrak etanol 5% dengan vitamin E adalah 0.475 ($p>0.05$), yang berarti nonsignifikan, sedangkan ekstrak n-heksan nilainya 0.00 ($p<0.05$) dengan vitamin E, artinya berbeda dengan vitamin E. Disimpulkan Ekstrak etanol daun Beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb) potensial sebagai antioksidan dengan nilai ES_{50} 78,98ppm dan aktivitas antioksidannya juga ada pada tikus diabetes dengan menurunkan nilai malondialdehid sebesar 58.98%, dan aktivitas ini sama dengan vitamin E, sedangkan ekstrak n- heksan tidak berpotensi sebagai antioksidan.

Kata kunci : Daun Beruwas laut , DPPH (2,2—difenil-1-pikrilhidrazil), malondialdehid (MDA)

ABSTRACT

RAHMAWATI. *The activities of the antioxidant extracted from the leaves of the Sea mangosteen (Scaevola taccada (Gaertn) Roxb) in diabetes of the white mouse. (supervised by Peter Kabo and Pirman AP)*

This research aim to determine the activities of the antioxidant extracted from the leaves of the Sea mangosteen (*Scaevola taccada* (Gaertn) Roxb) in diabetes of the mouse.

It was an experimental research using the design of the Pre- and Post- Test Control Group. The antioxidant test were carried out using with the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazyl) and with the parameter of Malondialdehyda (MDA). Then the three treatment groups of white groove whystar mice -each group consisting of five white mice- were treated with an ethanol extract, n-hexane and vitamin E respectively.

The research result indicated that when the antioxidant activity was tested using DPPH with the ethanol extract, the test yielded the value of $ES_{50} = 78.98\text{ppm}$, and that value was categorized as “moderately active”, while the n-hexane extract, the value of $ES_{50} = 240,00\text{ppm}$ or “weakly active”. The test resulting using MDA-the data were tested by using the Shapiro Wilk – a significant value ($p < 0.05$) meaning its distribution was normal; while the paired t-test yielded the significant value ($p < 0.05$) and showed a significant difference of MDA before and after treatment. The one way anova test produced in the value of 0.00 ($p < 0.05$). which showed that the decrease of the MDA values in each treatment group were varied. The result of the post hoc test with a 5% ethanol extract and vitamin E was 0.475 ($p < 0.05$), or insignificant. This mean that the decrease of the MDA value of the ethanol extract was equal to that of vitamin E, while the value 0.00 ($p < 0.005$) of the n-hexane was different from the value of vitamin E. Thus, the ethanol extract from the Beruwas Laut leaves is a potential antioxidant with the $ES_{50} = 78.98\text{ ppm}$, and the activity of the antioxidant in diabetes mice can reduce the MDA value by 58.98%; this activity is equal to that of vitamin E, while the n-hexane extract is not a potential antioxidant.

Keywords : sea mangosteen leaves, DPPH(2,2-diphenyl-1-picrilhidrazyl), malondialdehyda (MDA)

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	iv
ABSTRAK	vi
<i>ABSTRACT</i>	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
BAB I PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	4
C. Tujuan Penelitian	4
D. Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
A. Antioksidan	6
B. Radikal Bebas	9
C. Diabetes Mellitus	11
D. Metode Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas	13
E. Tumbuhan Beruwas Laut	14
F. Metode Ekstraksi Bahan Alam	16
G. Aloksan	18
H. DPPH	19

I. MDA	20
J. Spektrofotometer UV-Visible	21
K. Kerangka Teori	23
L. Hipotesis	24
M. Definisi Operasional	24
BAB III METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian	25
B. Lokasi dan Waktu Penelitian	25
C. Sampel Penelitian	25
D. Metode Pengukuran	26
E. Bahan dan Alat	31
F. Instrumen Pengumpulan Data	32
G. Rancangan dan Analisa Data	32
H. Etik Penelitian	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
A. Hasil Penelitian	34
B. Pembahasan	36
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
A. Kesimpulan	41
B. Saran	41
DAFTAR PUSTAKA	41

DAFTAR TABEL

TABEL	Halaman
1. Hubungan berbagai <i>reactive oxygen species</i> dengan netralisasi oleh antioksidan	8
2. Aktivitas antioksidan ekstrak daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.) dan Quarsetin	35
3. Kadar gula darah dan Malondialdehid Tikus	36
4. Peredaman Radikal bebas oleh ekstrak etanol daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb)	49
5. Peredaman Radikal bebas oleh ekstrak n-heksan daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb)	50
6. Hasil serapan dan besarnya peredaman radikal bebas Quarsetin	51
7. Nilai serapan dari seri konsentrasi sampel untuk pembuatan kurva baku	52
8. Uji Distribusi Data	53
9. Uji t berpasangan	53
10. Hasil Pengujian dengan menggunakan metode ANOVA	54
11. Uji lanjutan dengan metode Post Hoc	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kerangka Teori	23
2. Skema Kerja ekstraksi dan partisi daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.)	45
3. Skema Kerja pengukuran DPPH	46
4. Skema kerja pengukuran glukosa darah dan MDA	47
5. Skema kerja analisis MDA	48
6. Garis lurus hubungan konsentrasi DPPH dengan nilai peredaman radikal bebas ekstrak etanol daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb)	49
7. Garis hubungan konsentrasi DPPH dengan nilai peredaman radikal bebas ekstrak n-heksan daun Beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb)	50
8. Garis hubungan konsentrasi DPPH dengan nilai peredaman radikal bebas quersetin	51
9. Kurva baku Malondialdehid	52
10. Foto Daun beruwas laut (<i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.)	55
11. Foto alat Spektrofotometer	56

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) adalah suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia. Penyebabnya antara lain adalah gangguan sekresi insulin, gangguan kerja insulin, atau keduanya. Saat ini penderita diabetes mellitus di Indonesia prevalensinya mencapai 1,5-2,3% dari jumlah penduduk Indonesia dan pada tahun 2020 diperkirakan angka tersebut akan menjadi 4% atau setara dengan 7 juta penderita (PERKENI 2002).

Keadaan hiperglikemia kronis yaitu nilai gula darah di dalam tubuh selalu berada di atas normal dapat mendorong terbentuknya radikal bebas. Radikal bebas ini terbentuk melalui proses fosforilasi oksidatif dan autooksidasi glukosa (Robertson, 2004). Radikal bebas bersifat sangat reaktif serta dapat berinteraksi dengan membran sel lipid, protein, dan asam nukleat yang selanjutnya dapat mengakibatkan kerusakan struktur dan fungsi sel. Keadaan hiperglikemia yang meningkat menyebabkan peningkatan aktivitas mitokondria. Mitokondria secara berkesinambungan akan menghasilkan radikal bebas dan menyebabkan keadaan stress oksidatif. Kelebihan produksi radikal bebas atau gagalannya sistem pertahanan enzim antioksidan

ekstraselular terhadap radikal bebas akan mengawali patogenesis penyakit degeneratif diantaranya diabetes (Newsholme, 2007).

Tubuh mengembangkan mekanisme perlindungan terhadap radikal bebas, yaitu antioksidan endogen yang berupa enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, glutathion peroksidase, dan enzim-enzim mitokondria seperti mangan superoksida dismutase. Menurut hasil penelitian bahwa diabetes dapat menyebabkan terjadinya penurunan sistem pertahanan antioksidan seluler dan peningkatan jumlah *reactive oxygen species* (ROS) (Rosen, 2002). Enzim antioksidan ini sebagai garis pertahanan pertama dan bekerja bersama-sama dengan antioksidan eksogen sebagai garis pertahanan kedua dalam melindungi sel dari pengaruh radikal bebas.

Kandungan antioksidan di dalam tubuh dipengaruhi oleh asupan dan tersedianya zat-zat gizi dan non-gizi yang berasal dari luar tubuh. Zat-zat non gizi tersebut meliputi senyawa-senyawa bioaktif yang berasal dari berbagai jenis tanaman seperti fenolik, flavonoid, karoten, eugenol, dan masih banyak lainnya. Komponen aktif tersebut telah banyak diteliti dari berbagai jenis tanaman dan dimanfaatkan untuk dijadikan acuan pengobatan berbagai penyakit degeneratif maupun penyakit infeksi.

Penggunaan obat-obat tradisional yang memanfaatkan bahan-bahan alami dalam penyembuhan berbagai penyakit lebih disenangi oleh masyarakat. Selain itu obat tradisional tersebut mudah didapat dan harganya tidak terlalu mahal dan penggunaannya juga dapat mengurangi efek samping yang mungkin ditimbulkan oleh obat sintetis. Hal ini sejalan dengan

rekomendasi dari WHO pada tahun 1980 yang menyarankan penggunaan bahan alami yang berasal dari tanaman untuk digunakan dalam pencegahan dan pengendalian penyakit diabetes mellitus.

Salah satu bahan alami yang diduga memiliki efek antidiabetes adalah daun Beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.). Masyarakat di kabupaten Pinrang, propinsi Sulawesi – Selatan menyebut tanaman ini dengan nama Sawi laut dan telah menggunakan daun ini untuk mengobati penyakit DM atau yang biasa disebut penyakit kencing manis.

Daerah Asia Tenggara dan Australia, beruwas laut biasa digunakan untuk menjernihkan mata buram dan menyembuhkan infeksi mata, cairan daun atau cairan buah matang yang telah diencerkan dari *Scaevola taccada*. Di Malaysia daun yang pahit dapat dimakan untuk menyembuhkan gangguan pencernaan, dan tapal daunnya untuk sakit kepala, di Indonesia, akarnya dimanfaatkan sebagai anti keracunan makan ikan atau kepiting. (Wardiyono, 2011)

Penelitian pendahuluan efek hipoglikemi atau penurunan kadar glukosa darah daun ini telah dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol beruwas laut dapat menurunkan kadar glukosa darah hewan coba. Pemberian ekstrak beruwas laut 0,5; 1 dan 1.5% dapat memberikan efek penurunan glukosa darah. (Pajriani, 2012).

Komponen atau kandungan kimia dari tanaman beruwas laut ini berupa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid dan glikosida. Kandungan kimia berupa flavanoid berpotensi sebagai antioksidan. Penurunan glukosa darah pada

diabetes dengan penggunaan tanaman beruwas laut ini bisa disebabkan oleh kandungan antioksidannya sehingga dapat meredam (scaevenger) atau menghambat radikal bebas penyebab stress oksidatif , sehingga penelitian aktivitas antioksidan daun beruwas laut pada tikus yang diinduksi diabetes perlu dilakukan.

B. Rumusan Masalah

Apakah efek penurunan glukosa darah pada diabetes oleh ekstrak beruwas laut (*Scaevola taccada (Gaertn.) Roxb.*) disebabkan karena aktivitas antioksidannya.

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak daun beruwas laut (*Scaevola taccada (Gaertn.) Roxb.*) pada tikus diabetes

D. Manfaat Penelitian

1. Kegunaan teoritis

Sebagai sumber data ilmiah bagi mahasiswa dan peneliti lainnya tentang aktivitas antioksidan ekstrak daun beruwas laut (*Scaevola taccada (Gaertn.) Roxb.*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes

2. Kegunaan praktis

Sebagai rujukan untuk melakukan penelitian lebih lanjut tentang aktivitas antioksidan ekstrak daun beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) pada tikus (*Rattus norvegicus*) diabetes.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa dengan struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya dengan cuma-cuma kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas.

Lemak dan minyak mengalami kerusakan pada pemanasan dan penyimpanan yang lama. Perusakan utama disebabkan oleh reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi dapat dihambat dengan berbagai metode, misalnya dengan penambahan penghambat oksidasi yang sekarang disebut dengan antioksidan. (Pokorny, 2001).

Sejumlah tanaman yang disebut “fitonutrien” atau “fitokimia” diketahui mempunyai sifat antioksidan. Komponen fenolik seperti flavonoid yang merupakan ubiquitous dalam kerajaan tanaman, kurang lebih 3.000 flavonoid telah ditemukan. Flavonoid pada tanaman berfungsi melindungi tanaman dari berbagai stress lingkungan, pada manusia flavonoid memperlihatkan fungsi “biological response modifiers”.

Flavonoid menunjukkan aktivitas anti inflamasi, anti alergi, anti virus dan anti kanker. Efek luas flavonoid ini sebagian besar karna sifat antioksidannya. (Percival, 1998).

Atas dasar fungsinya antioksidan dapat dibedakan sebagai berikut (Kumalaningsih, 2006) :

a. Antioksidan Primer

Antioksidan ini berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru karena dapat merubah radikal bebas yang ada menjadi mekul yang berkurang dampak negatifnya, yaitu sebelum sempat bereaksi.

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan ini merupakan senyawa yang berfungsi menangkap radikal bebas serta mencegah terjadinya reaksi berantai sehingga tidak terjadi kerusakan yang lebih besar.

c. Antioksidan Tersier

Antioksidan ini merupakan senyawa yang memperbaiki sel-sel dan jaringan yang rusak karena serangan radikal bebas.

d. Oxygen Scavenger

Antioksidan yang mampu mengikat oksigen sehingga tidak mendukung reaksi oksidasi.

e. Chelators atau Sequestrants

Senyawa yang dapat mengikat logam sehingga logam tersebut tidak dapat mengkatalisis reaksi oksidasi, akibatnya kerusakan dapat dicegah.

Untuk melindungi sel dan sistem organ melawan *reactive oxygen species*, manusia harus mempunyai perlindungan dengan antioksidan

yang cukup baik endogen maupun eksogen yang dapat menetralkan radikal bebas. Komponen itu dapat berupa

1. Nutrien- turunan antioksidan seperti asam askorbat (vitamin C), tokoferol (vitamin E), karotenoid dan berbagai bahan dengan berat molekul rendah seperti glutathion.
2. Enzym antioksidan seperti superoksida dismutase, glutathion peroksidase dan glutathion reduktase.
3. *Metal binding protein* seperti ferritin, lactoferrin, albumin dan seruplasmin.
4. Antioksidan Fitonutrien yang ada di dalam berbagai tanaman

Hubungan berbagai *reactive oxygen species* dengan netralisasi oleh antioksidan dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini (Percival, 1998):

<i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i>	Antioksidan
Radikal Hidroksil	Vitamin C, glutathione, flavonoid, <i>lipoic acid</i>
Radikal Superoksida	Vitamin C, glutathione, flavonoid, superoksida dismutase
Hidrogen Peroksida	Vitamin C, glutathione, beta karoten, vitamin E, CoQ10, flavonoid, <i>lipoic acid</i>
Lipid Peroksidase	Beta karoten, vitamin E, Ubiquinon, flavonoid, glutathion peroksidase

B. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah partikel terkecil dari suatu molekul yang mengandung gugusan elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya. Radikal bebas memiliki reaktifitas yang tinggi dan cenderung membentuk radikal baru, yang pada gilirannya apabila menjumpai molekul lain akan membentuk radikal baru lagi, sehingga terjadilah reaksi rantai. Reaksi rantai tersebut baru berhenti apabila radikal bebas itu dapat diredam (Suryohudoyo, 2000).

Tubuh manusia mempunyai kemampuan menggunakan oksigen untuk memetabolisme lemak, protein dan karbohidrat untuk energi, tetapi oksigen merupakan atom yang sangat reaktif yang dapat menjadi bagian dari molekul yang merusak yang biasa disebut "radikal bebas". Radikal bebas mempunyai kemampuan menyerang sel sehat dan menyebabkan sel tersebut kehilangan struktur dan fungsinya. (Percival, 1998)

Radikal bebas dapat masuk dan terbentuk di dalam tubuh melalui :

- a. Pernafasan pada kondisi lingkungan tidak sehat. Saat melakukan pernafasan akan masuk oksigen (O_2) yang sangat dibutuhkan oleh tubuh untuk proses metabolisme dengan mengoksidasi zat-zat makanan, seperti karbohidrat, lemak dan protein. Zat-zat ini akan dikonversi menjadi senyawa pengikat energi atau adenosin triphosfat (ATP). Tetapi oksigen yang berlebihan saat olahraga yang kompleks

dalam tubuh menghasilkan produk-produk sampingan berupa radikal bebas.

- b. Makanan berlemak. Lemak sangat bermanfaat bagi tubuh, tetapi mengkonsumsi lemak berlebihan khususnya lemak polyunsaturated dan lemak hidrogenasi sangat berpotensi menghasilkan radikal bebas. Lemak polysaturated disebut juga lemak tidak jenuh artinya yang mempunyai ikatan rangkap pada atom C-nya. Adanya ikatan rangkap tersebut mudah sekali dioksidasi atau terserang peroksidasi lipid membentuk radikal peroksidasi lipid. Lemak ini banyak terdapat dalam mayones dan saos salad. Sedangkan lemak hidrogenasi adalah lemak yang ikatan rangkap tak jenuhnya telah disubstitusi dengan hidrogen, lemak ini disebut margarine atau mentega tiruan. Selain mudah terserang oleh radikal bebas, lemak ini sangat berbahaya karena dapat mengubah kemampuan serap selaput sel sehingga mengakibatkan fungsi selaput sel sebagai pelindung menjadi tidak berarti.
- c. Kondisi lingkungan yang tidak sehat. Polusi udara yang disebabkan oleh proses pembakaran bahan bakar pada mesin dan kendaraan bermotor dapat membentuk radikal bebas.

Senyawa oksigen reaktif sebagian diantaranya berbetuk radikal seperti radikal hidroksil, radikal peroksil, dan ion superoksida dan sebagian yang lain bukan radikal singlet oksigen, hidrogen peroksida, dan ion hiperklorit. Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif lainnya yang diproduksi dalam

jumlah normal sangat penting untuk menjaga fungsi biologis, seperti halnya sel darah putih menghasilkan hidrogenperoksida untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan fungi. Namun, jika jumlahnya berlebihan akan mencari pasangan elektronnya dengan merampas secara radikal dari molekul lain yang mengakibatkan kerusakan oksidatif jaringan yang sering dikenal sebagai stress oksidatif (Muhilal,1991).

Kebanyakan oksidan yang dihasilkan oleh sel terjadi karena:

1. Hasil metabolisme aerob, kurang lebih 90% oksigen digunakan oleh sel pada sistem transport elektron mitokondria
2. Pemecahan oleh fagosit (sel darah putih) sebagai bagian dari mekanisme membunuh bakteri dan denaturasi antigen sebagai protein asing.
3. Metabolisme xenobiotik, misalnya detoksifikasi bahan-bahan toksik (Percival, 1998).

C. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus adalah suatu keadaan gangguan metabolisme karbohidrat yang ditandai dengan kadar gula darah yang tinggi dan terdapat glukosa dalam urin (*Glukosuria*). Hiperglikemia ini dapat menyebabkan produksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas yang berlebihan dan akan memicu terjadinya stress oksidatif, yaitu suatu keadaan dimana jumlah radikal bebas yang diproduksi melebihi kapasitas tubuh untuk menangkalnya (Wiryana, 2008). Dengan adanya paparan stress oksidatif,

enzim Superoksida Dismutase (SOD) sebagai antioksidan endogen akan meningkat aktivitasnya untuk meredam stress oksidatif tersebut, yaitu dengan merubah anion superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2), sehingga dapat melindungi sel-sel β pankreas. Kerusakan oksidatif dapat juga diredam dengan menggunakan antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh baik yang berbahan dasar kimia sintetik maupun bahan alam.

Diabetes dan komplikasinya merupakan satu dari penyakit utama di seluruh dunia, dan angka penderitanya meningkat di seluruh dunia. Muncul bukti bahwa diabetes diakibatkan oleh deplesi dari system pertahanan antioksidan selular dan meningkatnya "*reactive oxygen species*(ROS)". Konsep baru bahwa stress oksidatif merupakan pencetus dari awal dan berkembangnya diabetes dapat menjadi pilihan terapi baru untuk pengobatan penyakit dan komplikasinya dengan menggunakan antioksidan atau nutrient yang mengandung antioksidan tinggi

Istilah stress oksidatif digunakan luas dalam literatur yang berarti ketidakseimbangan produksi radikal bebas dengan kekuatan antioksidan tubuh yang menghasilkan dapat mengakibatkan kerusakan jaringan. Stress oksidatif meningkat pada pasien diabetes. Studi klinik memperlihatkan peningkatan penanda stress oksidatif seperti lipid peroksidasi, kerusakan oksidatif DNA dan penurunan level antioksidan.

Penanda stress oksidatif pada pasien diabetes mellitus:

- Peningkatan pembentukan isoprostan
- Peningkatan pembentukan lipidhidroperosidase
- Pembentukan Malondialdehid
- Perubahan pada enzim antioksidasi
- Perubahan dalam pembentukan redoks
- Peningkatan oksidasi DNA (Rosen, 2002)

D. Metode Pengujian Aktivitas Anti Radikal Bebas

Pengujian efek antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Molekul DPPH merupakan radikal bebas yang stabil akibat delokalisasi elektron pada keseluruhan molekul, sehingga molekul DPPH tersebut tidak dimerisasi. Delokalisasi elektron ini akan memberikan warna ungu dalam larutan etanol yang terukur pada panjang gelombang 520 nm (Molyneux, 2004).

Ketika larutan DPPH dicampur dengan bahan antioksidan maka akan terjadi reaksi penangkapan hidrogen yang berasal dari antioksidan oleh DPPH dan diubah menjadi 1,1 difenil-pikrilhidrazin yang ditandai perubahan warna dari ungu gelap ke kuning terang.

Reaksi diatas menggambarkan sistem oksidasi, sama seperti reaksi autooksidasi dari lipid atau asam lemak tak jenuh lainnya. Molekul

DPPH menggantikan radikal bebas pada sistem oksidasi ini yang aktivitasnya akan dikurangi oleh bahan antioksidan (Molyneux, 2004).

E. Tumbuhan Beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.)

1. Klasifikasi Tanaman (Plantamor, 2008; IPB, 2011.)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Family	: Goodeniaceae
Genus	: Scaevola
Spesies	: <i>Scaevola taccada</i> (Gaertn.) Roxb.

1. Morfologi (Maysatria, 2011)

Tumbuhan ini dapat mencapai ketinggian hingga 3 meter, daunnya melebar ke arah atas, berwarna hijau kekuningan dan mengkilat, tepinya melengkung dan permukaan daun seperti berlapis lilin, unit dan letaknya sederhana dan bersilangan.

Bentuknya bulat telur terbalik hingga elips, ujungnya membulat, berukuran 16,5 - 30 x 7,5 - 9,5 cm. Letak bunganya di ketiak daun, formasi mengelompok. Daun mahkota putih bersih, sering pada bagian dalamnya terdapat strip/garis berwarna jingga, tangkai putik membengkok. Buahnya berbentuk kapsul, bulat, ketika muda berwarna hijau muda, lalu menjadi putih ketika sudah matang, diameter

buah 8-12 mm, dijumpai secara soliter di bagian tepi daratan dari mangrove, pada tepi pematang yang tidak terkena pengaruh pasang surut atau di daerah yang sistem drainasenya baik dan lokasinya terbuka terhadap cahaya, ditemukan di beberapa garis pantai sebagian daerah Indonesia.

2. Nama Daerah (Plantamor, 2008)

Nama Indonesia : Batang lampung, babakoan lalaki, bawuntulon,
beruwas laut, boppo ceda, bukolako

Nama lokal : Sawi laut (Pinrang-Sulawesi Selatan)

3. Kandungan senyawa (Ong, 2004)

Kandungan dari tumbuhan beruwas laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) adalah alkaloid, fenolik, saponin, glikosid jenis skaevolin, genus *Scaevola* juga mengandung steroid(Ong, 2004) (Soo, 2009).

4. Manfaat Secara Empiris (Wardiyono, 2011)

Daerah Asia Tenggara dan Australia, beruwas laut biasa digunakan untuk menjernihkan mata buram dan menyembuhkan infeksi mata, cairan daun atau cairan buah yang matang yang telah diencerkan dari *Scaevola taccada*, di Malaysia, daun yang pahit dapat dimakan untuk menyembuhkan gangguan pencernaan, dan tapal daunnya untuk sakit kepala, di Indonesia, akarnya dimanfaatkan sebagai anti keracunan makan ikan atau kepiting.

Penduduk daerah Pilipina Rebusan akar dipakai untuk beri-beri dan untuk infeksi siphilis dan untuk disentri, di Thailand, akar dan

daunnya digunakan penyakit kulit, di Finschafen (Papua Nugini), daun mudanya dikunyah dan direbus untuk teh atau jus dari daun yang telah dipanaskan dicampur dengan air untuk menyembuhkan batuk. Air dari daun dapat dipakai langsung untuk pegal-pegal. Daun mudanya juga dikunyah untuk meredakan batuk di pulau New Hanover, dan untuk mengobati tuberkulosis di pulau Karkar. Setelah lapisan epidermalnya dihilangkan, daun dapat dikunyah untuk mengobati malaria. Begitu pula di beberapa pulau di utara Nugini, daun digunakan untuk mengobati batuk atau flu, di Australia utara jus yang diperas dari batang muda dan buah matang diusapkan langsung pada bekas gigitan atau sengatan.

F. Metode Ekstraksi Bahan Alam

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan mengekstraksi simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok di luar pengaruh cahaya matahari langsung (Dirjen POM, 1997)

Ekstraksi adalah penyaringan 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, benzene, dan etil asetat (Dirjen POM 1997).

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 konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel (Dirjen POM 1997).

Jenis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan adalah :

- a. Secara panas seperti refluks dan destilasi uap air karena sampel langsung dipanaskan dengan pelarut, umumnya digunakan untuk sampel yang mempunyai bentuk dan dinding sel yang tebal. Metode ekstraksi secara panas digunakan untuk sampel yang tahan panas dan mempunyai tekstur yang keras seperti batang, akar dan biji.
- b. Secara dingin misalnya maserasi, perkolasi, dan sokletasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia, sedangkan soklet dengan cara cairan penyaring dipanaskan dan uap cairan penyaring naik ke kondensor kemudian terjadi konsensasi dan turun menyaring simplisia. Ekstraksi secara dingin digunakan untuk sampel yang lunak, tidak tahan panas, dan tidak mudah mengembang dalam cairan penyari (Dirjen POM 1997)

Metode maserasi merupakan cara penyari yang sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Metode ini dilakukan untuk menyaring simplisia yang mengandung komponen kimia

yang mudah larut dalam cairan penyaring dan tidak mengandung zat yang mudah mengembang seperti benzoin, tiraks, dan lilin (Dirjen POM 1997).

G. Aloksan

Aloksan adalah suatu agen diabetogenik yang bersifat tidak stabil. Dalam bentuk padat aloksan berbentuk anhidrat, monohidrat, atau polihidrat, semuanya berupa kristal. Kristal aloksan tidak stabil pada temperatur ruangan dan akan terurai perlahan membentuk aloksantin, oksalat, urea, dan CO₂. Untuk menghasilkan daya kerja yang akurat disarankan untuk mempersiapkan aloksan dalam bentuk segar dari pabrik dan disimpan dalam suhu 0°C serta dalam keadaan gelap.

Penyuntikan aloksan pada hewan menyebabkan degenerasi dan resorpsi sel-sel dalam pulau Langerhans pankreas, sedangkan sel α dan jaringan lain dari pankreas tidak terpengaruh. Sejak sel β diketahui sebagai penghasil hormon insulin, aloksan sering dipakai sebagai indikator diabetes pada hewan model (Kim *et al*, 1994).

Setelah dilarutkan dalam NaCl fisiologi aloksan, akan segera mengalami oksidasi reduksi menjadi asam dialurik dengan reduksi 2 elektron. Asam dialurik dalam larutan bersifat tidak stabil dan segera membentuk O₂⁻, hidrogen peroksida, dan radikal hidroksil. Segera setelah disuntik, aloksan akan mengumpul di dalam pulau Langerhans pankreas dan dalam hati, akan tetapi karena hati mempunyai aktivitas superoksida dismutase, katalase, dan

glutathione peroxidase sebagai *scavenger* radikal bebas maka hati bisa menetralkan kerja aloksan sedangkan sel β pulau Langerhans pankreas akan mengalami kerusakan membran dan kematian sel. Mekanisme aloksan dalam perusakan sel β dalam pankreas adalah aloksan menstimulasi pembentukan H_2O_2 yang selanjutnya menyebabkan terjadinya fragmentasi DNA sehingga sel β mengalami kerusakan (Halliwell dan Guttridge, 1999).

H. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Metode uji aktivitas antiradikal yang paling umum digunakan adalah metode DPPH. DPPH adalah radikal bebas stabil berwarna ungu yang digunakan secara luas untuk pengujian kemampuan penangkapan radikal bebas dari beberapa komponen alam seperti komponen fenolik, antosianin atau ekstrak kasar. Metode DPPH berfungsi untuk mengukur elektron tunggal seperti transfer hidrogen sekaligus juga untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Metode ini sangat cocok untuk skrining awal berbagai sampel terutama ekstrak tumbuhan (Yuswantina, 2009).

Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan peredaman warna ungu, dimana ketika larutan DPPH dicampur dengan bahan antioksidan maka akan terjadi reaksi penangkapan hidrogen yang berasal dari antioksidan oleh DPPH yang akan diubah menjadi *1,1 difenil-pikrilhidrazin* dan ditandai dengan perubahan warna dari ungu gelap ke kuning. Reaksi diatas menggambarkan system oksidasi, sama seperti reaksi autooksidasi dari lipid

atau asam tak jenuh lainnya. Molekul DPPH menggantikan radikal bebas pada sistem oksidasi ini aktivitasnya akan dikurangi oleh bahan antioksidan adalah nilai ES50 (*50% Effective Scavenging*) yang diperoleh dari persamaan regresi (Molyneux, 2004).

I. MDA (*Malondialdehid*)

Malondialdehid (MDA) merupakan produk hasil peroksidasi lipid dalam tubuh dan terdapat dalam bentuk bebas atau kompleks dengan jaringan di dalam tubuh. Reaksi ionisasi senyawa-senyawa radikal bebas juga dapat membentuk MDA dan MDA juga merupakan produk samping biosintesis prostaglandin (Bird dan Drapper, 1984).

Senyawa-senyawa aldehida dan keton seperti hidroksialkenal termasuk MDA terbentuk dari bereaksinya molekul lemak dengan asam lemak tak jenuh yang karbonmetilennya telah teroksidasi, selanjutnya senyawa-senyawa ini telah diketahui bersifat toksik terhadap sel. Konsentrasi MDA dalam material biologi telah digunakan secara luas sebagai indikator dan kerusakan oksidatif pada lemak tak jenuh sekaligus merupakan indikator keberadaan radikal bebas (Zakaria, 1996).

Analisis MDA merupakan analisis radikal bebas secara tidak langsung dan mudah dalam menentukan jumlah radikal bebas yang terbentuk. Analisis radikal bebas secara langsung sangat sulit dilakukan karena senyawa radikal

sangat tidak stabil dan bersifat elektrofil dan reaksinya berlangsung sangat cepat (Gutteridge, 1983).

Untuk menentukan radikal bebas secara langsung sangat sulit, hal ini disebabkan karena waktu paruhnya sangat rendah dan reaktifitasnya sangat tinggi. Penentuan radikal bebas dilakukan dengan “footprint”, setelah radikal bebas menyerang komponen sel, misalnya lemak, protein dan DNA. Peroksidasi lipid merupakan radikal bebas rantai reaksi yang dihasilkan pada oksidasi asam lemak tidak jenuh. (Suha, 2010)

Pengukuran MDA banyak dilakukan oleh para peneliti sebagai indeks tidak langsung dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Prinsip pengukuran MDA adalah reaksi satu molekul MDA dengan dua molekul asam tiobarbiturat (TBA) membentuk kompleks senyawa MDA-TBA yang berwarna pink dan kuantitasnya dapat dibaca dengan spektrofotometer.

J. Spektrofotometer *UV-Visible*

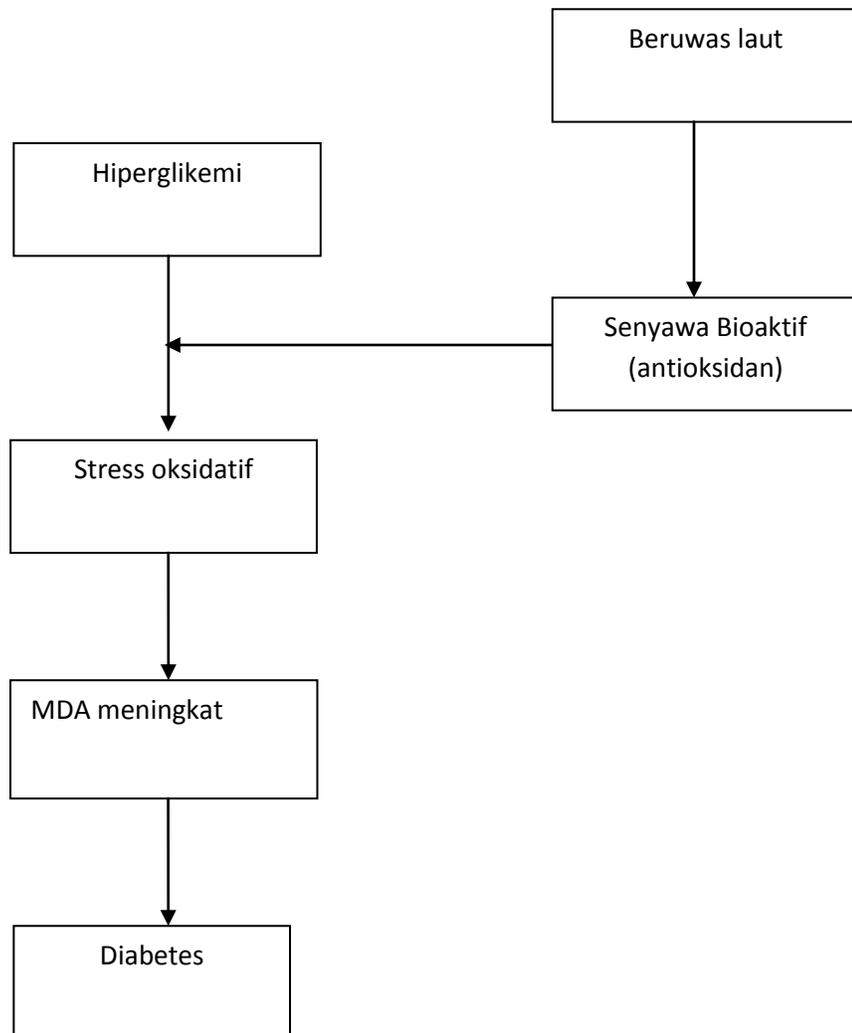
Spektrofotometri UV-visible adalah anggota teknik analisis spektroskopis yang memakai sumber radiasi elektromagnetik ultra violet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan memakai instrument spektrofotometer (Mulja, 1995).

Dalam analisis spektrofotometri digunakan suatu sumber radiasi yang berada dalam daerah ultraviolet spektrum ini, dipilih panjang gelombang tertentu dengan lebar pita kurang dari 1 nm. Proses ini memerlukan

penggunaan instrumen yang lebih rumit dan karenanya lebih mahal. Instrumen yang digunakan untuk maksud ini adalah spektrofotometer, instrumen ini terdiri dari dua instrumen dalam satu kotak sebuah spektrometer dan sebuah fotometer (Bassett, 1994).

Spektrofotometri UV-visible melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometri UV-visible lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan analisis kualitatif (Mulja, 1995).

K. Kerangka Teori



Gambar 1. Kerangka Teori

L. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah ekstrak daun beruwis laut (*Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb.) mempunyai aktivitas antioksidan sehingga dapat menurunkan nilai glukosa darah pada tikus diabetes

M. Definisi Operasional

1. Glukosa darah adalah nilai gula darah hewan coba dalam mg/dL
2. Aktivitas antioksidan adalah efektifitas penangkapan radikal bebas (ES_{50}), diukur dari serapan DPPH dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm
3. Malondialdehid adalah senyawa yang dihasilkan dari peroksidasi lipid dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 532 nm