

STUDI IN VIVO EKSTRAK ETANOL 96% DAUN ASAM JAWA (*Tamarindus indica* L.) TERHADAP KADAR MALONDIALDEHID (MDA) PADA HEWAN MENCIT JANTAN (*Mus musculus*) YANG TERPAPAR ASAP ROKOK

Nabila Istikomah¹, Gusti Ayu Rai Saputri^{2*}, Rachmi Nurkhalika³

¹⁻³Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Malahayati
Bandar Lampung, Indonesia

*)Email Korespondensi: gustifamasi@malahayati.ac.id

Abstract: In Vivo Study of 96% Ethanol Extract of Java Acid Leaves (*Tamarindus indica* L.) On Malondialdehyde (MDA) Levels In Male Mice (*Mus musculus*) Exposed To Cigarette Smoke. Antioxidants found in tamarind leaves make this plant a potential tool in the fight against oxidative stress brought on by free radicals. This research seeks to determine whether tamarind leaves' antioxidant content may effectively lower malondialdehyde (MDA) levels and protect male rats (*Mus musculus*) from oxidative stress caused by free radicals in cigarette smoke. Using a maceration technique with a 96% ethanol solvent, the tamarind leaves were extracted. After measuring MDA levels in mice, tamarind leaf extract was put through a phytochemical screening test. Animals were randomly assigned to one of six groups: I, the control group that did not receive any treatment, II, the negative control group that received only cigarette smoke exposure, III, the vitamin E group, and IV–VI, the groups that received tamarind leaf extract at doses of 20 mg/kgBB, 28 mg/kgBB, and 36 mg/kgBB, respectively. Blood samples were taken from male mice via the heart on the fifteenth day to measure their MDA levels. Effective reduction of MDA levels in mice was achieved at a dosage of 36 mg/kgBW of ethanol extract of tamarind leaves. Mice may have their plasma MDA levels reduced by administering an ethanol extract of tamarind leaves. The average plasma MDA levels in mice are different, as shown by the significant value of $p < 0.05$ in the ANOVA statistical test.

Keywords: ANOVA, Antioxidants, MDA levels

Abstrak: Studi In Vivo Ekstrak Etanol 96% Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Pada Hewan Mencit Jantan (*Mus musculus*) Yang Terpapar Asap Rokok. Antioksidan yang ditemukan dalam daun asam jawa menjadikan tanaman ini sebagai alat yang potensial dalam melawan stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan apakah kandungan antioksidan daun asam jawa dapat secara efektif menurunkan kadar malondialdehid (MDA) dan melindungi tikus jantan (*Mus musculus*) dari stres oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas dalam asap rokok. Menggunakan teknik maserasi dengan pelarut etanol 96%, daun asam jawa diekstraksi. Setelah mengukur kadar MDA pada tikus, ekstrak daun asam jawa dimasukkan ke dalam uji skrining fitokimia. Hewan secara acak dimasukkan ke dalam salah satu dari enam kelompok: I, kelompok kontrol yang tidak menerima pengobatan apa pun, II, kelompok kontrol negatif yang hanya menerima paparan asap rokok, III, kelompok vitamin E, dan IV–VI, kelompok yang menerima ekstrak daun asam jawa dengan dosis masing-masing 20 mg/kgBB, 28 mg/kgBB, dan 36 mg/kgBB. Pada hari kelima belas, sampel darah diambil dari tikus jantan melalui jantung untuk mengukur kadar MDA mereka. Penurunan kadar MDA yang efektif pada tikus dicapai pada dosis 36 mg/kgBB ekstrak etanol daun asam jawa. Kadar MDA plasma tikus dapat dikurangi dengan pemberian ekstrak etanol daun asam jawa.

Rata-rata kadar MDA plasma pada tikus berbeda, seperti yang ditunjukkan oleh nilai signifikan $p < 0,05$ dalam uji statistik ANOVA.

Kata kunci: ANOVA, Antioksidan, Kadar MDA

PENDAHULUAN

Tumbuhan berdaun majemuk, seperti daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.), banyak ditemukan di Indonesia, khususnya di Pulau Jawa. Daun ini berwarna kecokelatan atau hijau muda dan berbentuk oval, berukuran panjang 1-2,5 cm dan lebar 4-8 mm. Ujung daun membulat, terkadang berlekuk, dan pangkalnya datar, dengan tepi hampir sejajar. Penelitian ini akan menggunakan ekstrak daun asam jawa karena mengandung banyak zat aktif yang terbukti dapat menghambat perkembangan bakteri. Zat-zat tersebut meliputi tanin, alkaloid, saponin, dan flavonoid (Utami, 2011). Aktivitas antioksidan yang signifikan pada daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) menunjukkan bahwa daun tersebut dapat membantu tubuh dalam memerangi stres oksidatif yang disebabkan oleh kelebihan radikal bebas. Nilai IC_{50} sebesar 20,05 $\mu\text{g/ml}$ semakin mendukung klaim ini (Megawasti, Sukmawati, dan Aminah, 2021).

Produksi Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan sumber umum stres oksidatif, yang terjadi ketika terdapat kelebihan pro-oksidan dibandingkan antioksidan. Asap rokok mengandung karsinogen dan zat berbahaya lainnya yang dapat meningkatkan kadar malondialdehid (MDA), menyebabkan peradangan, dan mengurangi manfaat antioksidan dari pertahanan alami tubuh. Salah satu indikator indeks oksidatif akhir tubuh adalah malondialdehid (MDA), produk sampingan dari oksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan langkah pertama dalam sintesis lipid monohidroksialifatik (MDA), yang terjadi ketika gugus radikal hidroksil (OH) melepaskan atom hidrogen (H) dari molekul lipid tak jenuh rantai panjang. Irawan. R. (2013) menyatakan bahwa MDA yang memiliki lebih dari tiga ikatan tak jenuh diproduksi ketika radikal lipid ini berikatan dengan atom oksigen untuk menghasilkan radikal peroksil.

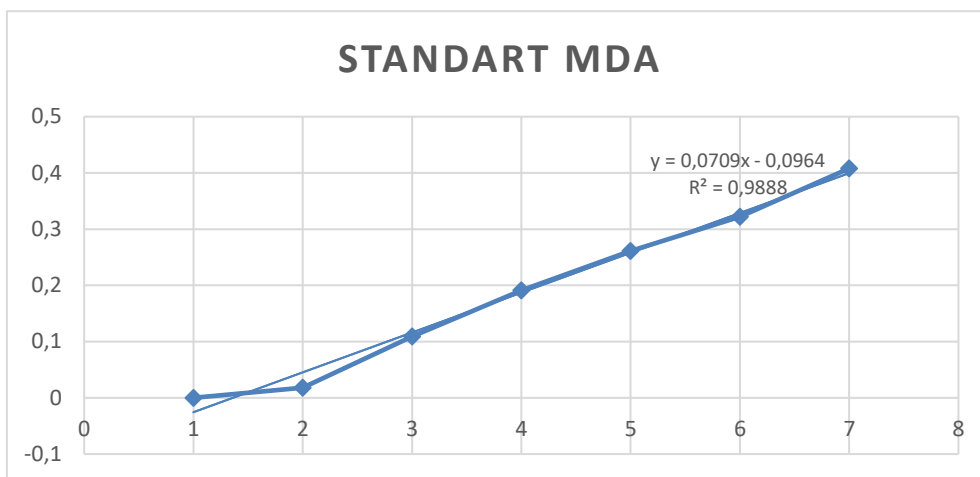
Salah satu cara terbaik untuk mengukur stres oksidatif adalah dengan melihat kadar malondialdehid (MDA), karena kadarnya meningkat dalam korelasi langsung dengan stres oksidatif total. Beberapa gangguan, termasuk diabetes, penyakit kardiovaskular, penyakit Parkinson, penyakit Alzheimer, dan kerusakan mitokondria, dapat disebabkan oleh MDA yang tinggi. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Sukalingan et al. (2016), tikus jantan yang terpapar asap rokok terbukti memiliki kadar malondialdehid (MDA) yang lebih rendah ketika diberi ekstrak etanol daun asam jawa pada dosis 150 mg/Kg BB, 200 mg/Kg BB, atau 250 mg/Kg BB.

METODE

Penelitian ini adalah dilaksanakan di *Zoologi House* Gedung Meneng, Laboratorium Botani, Laboratorium Biologi Molekuler, Laboratorium Terpadu, Laboratorium Balai Veteriner di Universitas Malahayati, Universitas Lampung dan Balai Dokter Hewan Bandar Lampung.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik, oven, kotak pemaparan asap ukuran 52,5 x 41 x 31 cm, kandang, gelas ukur (pyrex), tabung reaksi (Pyrex), pipet tetes (IWAKI), pemanas air, spektrofotometer UV-Vis (*Thermo Scientific Genesys 50*), batang pengaduk (Pyrex), *waterbath*, blender, wadah peniris air, ayakan, *beaker glass* (Pyrex), rotary evaporator (Buchi), tampah, *handscoon* (Martex), 1 set alat bedah tikus, tabung vacutainer EDTA (Monotes), sentrifuse (Magal), spatula, pipet ukur (Pyrex), timbangan tikus, lilin, korek, bunsen (Pyrex), sonde mencit ukuran 5 ml, 4 botol kaca gelap, spluit 1 cc (Terumo), masker (Duckbill), sarung tangan motor 1 pasang.



Gambar 1. Standart MDA

Bahan yang digunakan adalah Daun asam jawa tua, rokok kretek (Sampoerna, Nayan, Sriwedari), etanol 96% (*Chemicleane* 96 teknis), hewan mencit jantan (*Muc musculus*) berumur 2,5-3 bulan (bb 25-35 gram), akuades (, eter alkohol (Indo reagen), *trichloroacetic acid* (TCA) 20%, CMC Na, kapas (selection), pakan standar tikus dan air mineral, *thiobarbituric acid* (TBA)

1% , FeCl_3 2% (Merck), kloroform (Merck), HgCl_2 (Merck), HCl pekat (Merck), FeCl_3 10% (Merck), H_2SO_4 pekat (Merck), CH_3COOH (Merck), asam asetat (Merck).

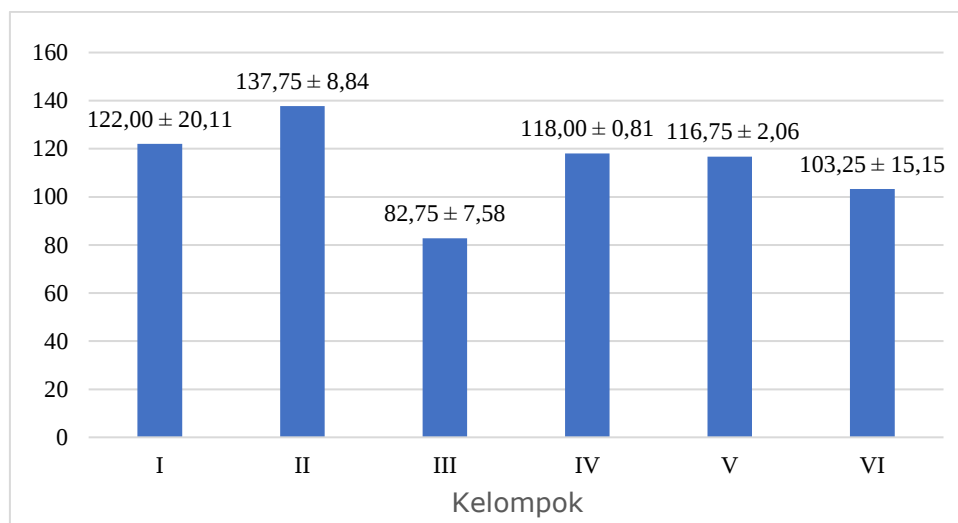
Setelah itu, spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk mendeteksi absorbansi plasma darah tikus pada 532 nm setelah diperlakukan dengan reagen tambahan mengandung 0,67% TBA dan 20% TCA.

Tabel 3. Hasil Pengukuran Kadar MDA Plasma (nmol/mL)

Kelompok	Rata-rata Absorbansi $\pm$ SD
Kelompok kontrol normal	122,00 $\pm$ 20,11
Kelompok 2 kontrol negatif	137,75 $\pm$ 8,84
Kelompok 3 kontrol dosis vitamin E 1,102 mg/gBB/hari	82,75 $\pm$ 7,58
Kelompok kontrol dosis ekstrak daun asam jawa 20 mg/kgBB	118,00 $\pm$ 0,81
Kelompok kontrol dosis ekstrak daun asam jawa 28 mg/kgBB	116,75 $\pm$ 2,06
Kelompok kontrol dosis ekstrak daun asam jawa 36 mg/kgBB	103,25 $\pm$ 15,15

Kelompok II memiliki kadar MDA plasma rata-rata tertinggi sebesar 137,75 nmol/mL, sedangkan kelompok I memiliki kadar terendah sebesar 122,00 nmol/mL, seperti yang ditunjukkan pada tabel 3 dari hasil uji kadar MDA plasma. Kelompok IV, V, dan VI memiliki kadar MDA plasma rata-rata masing-masing sebesar 118,00, 116,00, dan 103,25

nmol/mL; kelompok III memiliki kadar MDA plasma rata-rata terendah sebesar 82,75 nmol/mL. Uji statistik ANOVA menghasilkan nilai p sebesar 0,0001 ($p < 0,05$), yang menunjukkan bahwa kadar MDA plasma rata-rata pada tikus dipengaruhi oleh masing-masing kelompok.



Gambar 2. Hasil Uji Statistik

PEMBAHASAN

Untuk menangkal efek buruk asap rokok terhadap sistem pertahanan antioksidan tubuh, penelitian ini menggunakan ekstrak daun asam jawa. Sebelum melakukan penelitian atau menggunakan daun sebagai sampel, penting untuk mengetahui kualitas daun asam jawa yang dipetik. Keputusan ini juga bertujuan untuk memastikan keabsahan tanaman yang akan digunakan dalam penelitian, dengan tujuan mencegah kesalahan sampel untuk analisis fitokimia. Analisis daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) dilakukan di Laboratorium Botani Departemen Biologi FMIPA Universitas Lampung. Komponen yang digunakan dalam penentuan adalah buah asam jawa, daun asam jawa, dan batang asam jawa. Hasil determinasi pada tanaman tersebut didapatkan bahan sampel yang digunakan dalam penelitian adalah positif benar yaitu sampel tanaman asam jawa (*Tamarindus indica* L.).

Hasil ekstraksi sebesar 10,5% diperoleh dengan cara memaserasi 750 g simplisia dengan 7,5 l pelarut etanol 96%. Hasilnya adalah berat ekstrak sebesar 78,78 g dan diperlukan rendemen ekstrak kental minimal 10% (Farmakope Herbal Indonesia, 2017). Nilai ekstrak semakin tinggi jika nilai yield semakin tinggi. Metabolit sekunder yang ditemukan dalam daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) meliputi tanin,

alkaloid, flavonoid, dan saponin. Setelah daun diekstrak, akan dilakukan uji skrining fitokimia. Flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid merupakan komponen antioksidan kuat yang ditemukan dalam tanaman, dan zat-zat ini telah menjadi subjek dari beberapa penelitian ilmiah. Flavonoid, yang dapat ditemukan dalam tanaman dalam bentuk glukosida (yang meliputi rantai samping glukosa) atau bentuk bebas (aglikon), patut diperhatikan karena berfungsi sebagai antioksidan dengan menyumbangkan atom hidrogen atau dengan mengkelat logam (Mabrurroh.A.I 2015).

Hewan yang digunakan pada penelitian kali ini yaitu hewan mencit jantan berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 25-35 gram dengan kapasitas lambung mencit yaitu 1 ml dan pada penelitian ini dibutuhkan mencit sebanyak 24 ekor dan cadangan atau drop out sebanyak 6 ekor yang dibagi menjadi 6 kelompok uji perlakuan, yang dimana dilakukan proses perlakuan tersebut terjadi selama 17 hari yaitu 3 hari untuk beradaptasi pada tempat baru dan 14 hari selanjutnya yaitu perlakuan uji hewan penelitian sesuai kelompok kontrol. pada penelitian kali ini stres oksidatif sendiri dipicu menggunakan paparan asap rokok yang dipaparkan pada hewan mencit selama 14 hari untuk menganalisis terjadinya peningkatan

kadar malondialdehid (MDA) yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif.

Setelah dilakukan perlakuan selama 14 hari langkah selanjutnya yaitu pengambilan sampel darah pada setiap ekor mencit yaitu melalui jantung dengan langkah awal setiap kelompok mencit dimasukkan kedalam toples plastik sebagai ruang eter yang sudah diberi kapas dan dituang eter dengan tujuan untuk pembiusan agar mencit tidak sadarkan diri, setelah mencit tidak sadarkan diri langkah selanjutnya yaitu menusuk bagian jantung menggunakan spuit 1 cc dan mengambil sampel darah yang dibutuhkan lalu dimasukkan kedalam tabung vakutainer ungu E-katalom 4 ml dan diberikan nama kode perekor dan perkelompok guna memastikan agar tidak terjadinya pertukaran sampel, semua dilakukan hingga selesai.

Setelah pengambilan sampel darah selesai, sampel plasma akan dipisahkan menggunakan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Lapisan atas, yang dikenal sebagai plasma, berwarna kekuningan. Sampel kemudian diambil menggunakan mikropipet 10-100 μ L dan ditempatkan ke dalam cawan sampel 2 ml yang telah diberi kode sesuai dengan sampel yang dimasukkan. Proses ini diulang hingga semua sampel telah diambil. Langkah selanjutnya adalah menguji aktivitas antioksidan secara *in vivo* dengan mengukur kadar MDA plasma. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan langkah awal yaitu menyiapkan tube sampel 1,5 ml lalu masukan 20 μ L plasma yang sudah di sentrifuse lalu tambahkan dengan 500 μ L TCA 20% (pembuatan larutan TCA 20% yaitu timbang 80 mg serbuk TCA 20% lalu tambahkan dengan 40 ml aquadest) dan kemudian di vortex agar campuran tersebut terpecah atau tersebar, dan kemudian disentrifuse kembali dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah semua sudah tercampur, maka langkah selanjutnya yaitu diambil semua supernatan tersebut lalu dipindahkan ke mikrotube baru sebanyak 500 μ L lalu ditambahkan TBA 0,6% (pembuatan larutan TBA 0,6% yaitu timbang serbuk

TBA 0,6% sebanyak 0,67 mg lalu tambahkan dengan 50 ml aquadest) sebanyak 500 μ L, setelah dilakukan pencampuran tersebut maka dilakukan kembali pencampuran dengan vortex hingga sampel benar-benar tercampur sempurna. Dan langkah selanjutnya yaitu dipanaskan dalam penangas air dengan suhu 95°C selama 15 menit, lalu setelah dipanaskan kemudian dikeluarkan dari penangas tersebut dan biarkan mendingin terlebih dahulu pada suhu ruang, dan ketika sudah dingin langkah terakhir yaitu pengukuran kadar MDA dengan panjang gelombang 530 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Erma Mexcorry *et al*, 2018).

Setelah mengumpulkan kadar MDA plasma pada tikus yang diobati, hasilnya diperiksa kenormalannya menggunakan uji ANOVA parametrik. Analisis statistik menunjukkan bahwa data mengikuti distribusi normal, dengan nilai p sebesar 0,143 pada tingkat signifikansi 0,05 ($p > 0,05$). Tujuan uji ANOVA parametrik ini adalah untuk membandingkan kadar MDA plasma tikus di setiap kelompok pengobatan. Hal ini dikarenakan data yang diperoleh mengikuti distribusi normal. Terakhir, pada ambang signifikansi 0,05 ($p < 0,05$), analisis menghasilkan nilai p sebesar 0,0001, Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun asam jawa (*Tamarindus indica* L.) kepada tikus memengaruhi kadar MDA plasma mereka. Temuan ANOVA menunjukkan bahwa daun asam jawa merupakan antioksidan, yang berarti dapat melindungi tikus dari stres oksidatif dan menurunkan kadar MDA plasma mereka. Enam kelompok yang termasuk dalam penelitian ini adalah standar, kontrol negatif, kontrol positif, dosis kecil (20 mg/kgBB), dosis (28 mg/kgBB), dan dosis super (36 mg/kgBB).

KESIMPULAN

Pada penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa : Mengurangi kadar malondialdehid (MDA) dalam plasma tikus jantan, yang merupakan indikator radikal bebas akibat paparan asap rokok, dapat

dilakukan dengan bantuan ekstrak tanaman daun asam jawa tua, yang memiliki aktivitas antioksidan yang bermanfaat. Jumlah malondialdehid (MDA) dan pencegahan stres oksidatif keduanya ditingkatkan dengan meningkatkan dosis ekstrak daun asam jawa. Hasil uji statistik ANOVA mempunyai nilai signifikansi yaitu $p < 0,05$ artinya kadar MDA plasma pada mencit memiliki nilai rata-rata yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Andri, M.A. (2022) *Sintesis Senyawa Aurivillius Srbi2nb2o9 Yang Tersubstitusi Kation La3+: Struktur Dan Sifat Dielektriknya*. Universitas Andalas.
- Anggraini, W. et al. (2019) 'Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Buah Blewah (Cucumis Melo L. Var. Cantalupensis) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia Coli', *Pharmaceutical journal of Indonesia*, 5(1), pp. 61–66.
- Bhawani, S.A. et al. (2010) 'Thin-Layer Chromatographic Analysis Of Steroids: A Review', *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 9(3), pp. 301–313
- Campbell, D. (2001) *Efek Mozart: Memanfaatkan Kekuatan Musik Untuk Mempertajam Pikiran, Meningkatkan Kreativitas Dan Menyehatkan Tubuh*. Edited by T. Hermaya. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.
- Choi, J. et al. (2007) 'Identification Of Campesterol From Chrysanthemum Coronarium L. and Its Antiangiogenic Activities', *Phytotherapy Research*, 21(10), pp. 954–959.
- Cook, N.C. and Samman, S. (1996) 'Flavonoids—Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources', *The Journal of nutritional biochemistry*, 7(2), pp. 66–76.
- Dalimartha, S. (2006) *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. 8th edn. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- Depkes RI (2000) *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Dan Makanan.
- Dewi, S.U. and Wuryandari, W. (2019) *Aktivitas Antifungi Rebusan Daun Pandan Wangi (Pandanus amaryllifolius Roxb.) Terhadap Pertumbuhan Candida Albicans dengan Variasi Lama Waktu Rebusan*. Akademi Farmasi Putera Indonesia Malang.
- Erma Mexcorry., Anna Maria Dewajanti. (2018). Uji Aktivitas Infusa Biji Kopi Arabika (*Coffe arabica* L): Prngukuran Kadar Malondialdehid (MDA) pada Tikus Wistar (*Rattus novergicus*) Hiperurisemia, 24(68). Farmakope Herbal Indonesia. 2017. *Edisi II*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia.
- Irawan, R. (2013) *Hubungan Obesitas terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Plasma pada Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter UIN Syarif Hidayatullah Jakarta 2013*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Megawasti, M., Sukmawati, S. and Aminah, A. (2021) 'Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Asam Jawa (Tamarindus Indica L) Dengan Metode DPPH (1, 1 Diphenyl-2-Picrylhydrazil)', *Wal'afiat Hospital Journal*, 2(2), pp. 95–102.
- Mabrurroh, A.I. (2015) *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanin Dari Daun Rumpun Bambu (Lopatherum Gracile Brongn) Dan Identifikasinya*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Novitasari, A. (2016) 'Isolasi Dan Identifikasi Saponin Pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa Dengan Ekstraksi Maserasi', *Jurnal sains*, 6(12), pp. 10–14.
- Nugraha, A.C., Prasetya, A.T. and Mursiti, S. (2017) 'Isolasi, Identifikasi, Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Sebagai Antibakteri Dari Daun Mangga',
- Puspitasari, M.L. et al. (2016) 'Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (Annona muricata L.) Dan Kulit Manggis (Garcinia

- mangostana L.): Kajian Pustaka [In Press Januari 2016]', *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 4(1), pp. 283–290.
- Rahayu, W., Lisdiyanti, P. and Pratama, R.E. (2015) 'Tanah Gambut Melalui Uji Triaksial Consolidated Undrained dan Unconsolidated Undrained', *Jurnal Teknik Sipil Itb*, 22(3), pp. 201–208.
- Sukalingam, K. et al. (2016) 'Effect of Rutacea Plant Extract (ADD-X) on Inflammatory Biomarkers, Cardiac LDL, Troponin T and Histological Changes in Ovariectomized Rats Fed with Heated Palm Oil', *International Journal of Toxicological and Pharmacological Research*, 8(4), pp. 223–231.
- Utami, C.T. (2011) *Daya Hambat Ekstrak Daun Asam Jawa (Tamarindus Indica Linn) Terhadap Pertumbuhan Salmonella Enteritidis Secara In Vitro*. Universitas Syiah Kuala.