

# UJI FITOKIMIA, KAPASITAS ANTIOKSIDAN DAN PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN BERENUK (*CRESCENTIA CUJETE*) TERHADAP KADAR MDA OTAK DAN DARAH TIKUS SPRAGUE- DAWLEY YANG DIINDUKSI HIPOKSIA NORMOBARIK SISTEMIK KRONIS

Helmi Rizal Helmi<sup>1</sup>, Grace Madeleine<sup>2</sup>, David Limanan<sup>3</sup>, Eny Yulianti<sup>4</sup>, Frans Ferdinal<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Dept. Biokimia dan Biologi Molekuler, Fakultas Kedokteran Universitas Tarumanagara  
Email: [helmi@fk.untar.ac.id](mailto:helmi@fk.untar.ac.id)

Masuk : 10-03-2021, revisi: 28-04-2021, diterima untuk diterbitkan : 29-05-2021

## ABSTRAK

Hipoksia adalah suatu kondisi ketika konsentrasi oksigen dalam sel rendah. Kondisi ini dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas yang mengarah ke keadaan stres oksidatif yang menghasilkan peroksidasi lipid yang mengakibatkan berbagai kerusakan makromolekul yang dapat merusak otak. Karena itu, tubuh membutuhkan antioksidan untuk mencegah kerusakan tersebut. Salah satu sumber antioksidan eksogen adalah daun Calabash. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kapasitas antioksidan serta konstituen fitokimia daun Berenuk dan menentukan pengaruh ekstrak daun Berenuk dalam menurunkan kadar MDA total dalam darah dan otak tikus Sprague-Dawley yang diinduksi oleh sistemik kronis hipoksia. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Kapasitas antioksidan dievaluasi dengan uji radikal bebas DPPH. 32 tikus Sprague-Dawley dibagi menjadi 4 kelompok (normoksia, hipoksia 3 hari, 7 hari dan 14 hari (O<sub>2</sub> 8%; N<sub>2</sub> 92%)). Setiap kelompok kemudian dibagi lagi menjadi 2 subkelompok (diberikan ekstrak daun dan tidak pemberian). Ekstrak diberikan 400 mg / kg berat badan selama 14 hari. Evaluasi kadar MDA di otak dan darah dilakukan dengan menggunakan metode Wills. Kapasitas Antioksidan Berenuk dengan IC<sub>50</sub> = 158,46 µg/mL Semakin lama tikus diinduksi oleh hipoksia sistemik kronis, semakin tinggi kadar MDA dalam darah dan otak. Ada penurunan yang signifikan kadar MDA otak dan darah tikus yang diberi ekstrak daun dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi. Ekstrak Berenuk menurunkan kadar MDA dalam darah dan otak yang disebabkan oleh hipoksia sistemik kronis.

**Kata Kunci:** Berenuk, DPPH, MDA, Hipoksia, Fitokimia

## ABSTRACT

Hypoxia is a condition when oxygen concentration in cell is low. This condition can increase free radical formation that leads to oxidative stress state and cause peroxidation of lipid resulting in various macromolecule damages that damage the brain. Thus, the body needs antioxidant to prevent those damage. One of the exogen antioxidant source is calabash leaf. This study aimed to determine the antioxidant capacity as well as the phytochemical constituent of Calabash leaves and determining the effect of Calabash leaves extract in decreasing total MDA levels in the blood and brain of the Sprague-Dawley rats that were induced by chronic systemic hypoxia. Extraction was performed by maceration method using ethanol solvent. Antioxidant capacity was evaluated by DPPH radical scavenging assay. 32 Sprague-Dawley rat were divided into 4 groups (normoxia, 3 days, 7 days and 14 days of hypoxia (O<sub>2</sub> 8%; N<sub>2</sub> 92%)). Each group then divided again into 2 subgroups (given leaves extract administration and not). The extract administrated 400 mg/kg body weight for 14 days. The evaluation of MDA levels in the brain and blood was performed by using Wills method. Antioxidant capacity Calabash with IC<sub>50</sub> = 158,46 µg/mL The longer the rats were induced by chronic systemic hypoxia, the higher MDA levels in the blood and brain. There was significant decreases in brain and blood MDA levels of rats given leaf compared with the group that was not given. The calabash leaves preventrise of MDA levels in the blood and brain induced by chronic systemic hypoxia.

**Keywords:** Calabash, DPPH, MDA, Hypoxia, Phytochemical

## 1. PENDAHULUAN

Seiring dengan perkembangan jaman, meningkatnya penyebab terbentuknya radikal bebas seperti gangguan gizi, peningkatan suhu, meningkatnya paparan radiasi, tingginya infeksi, dan

lain-lain<sup>1</sup> membuat masalah kesehatan menjadi salah satu hal yang memerlukan perhatian lebih. Berdasarkan data dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, pada tahun 2015, nilai klaim BPJS Kesehatan jauh lebih besar daripada total iuran yang diperoleh dan tercatat bahwa jumlah penduduk sakit di Indonesia mencapai 65% dari 250 juta penduduk. Di dalam tubuh, radikal bebas berfungsi sebagai neuromodulasi, imunomodulasi, apoptosis dan juga berperan dalam imunitas host.<sup>2</sup> Namun kadar radikal bebas yang terlalu tinggi hingga tidak dapat ditangani oleh antioksidan menyebabkan suatu keadaan yang disebut dengan stress oksidatif. Radikal bebas dapat merusak berbagai macam makromolekul seperti lipid, protein hingga asam nukleat dan menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit seperti penyakit neurodegeneratif seperti alzheimer dan parkinson, penyakit kardiovaskuler, diabetes hingga kanker.<sup>3-4</sup>

Peningkatan timbulnya radikal bebas tersebut menyebabkan tubuh memerlukan kadar antioksidan yang adekuat untuk memerangi radikal bebas yang ada. Antioksidan yang ada dalam tubuh harus juga didukung oleh asupan antioksidan dari luar.<sup>1</sup> Salah satu bahan yang kaya akan antioksidan adalah tumbuhan.<sup>5</sup> Indonesia sebagai habitat bagi 75% dari total 40.000 jenis tumbuh-tumbuhan obat yang telah dikenal di dunia memiliki sekitar 1.000 jenis tumbuhan yang sudah dimanfaatkan sebagai tumbuhan obat yang berkhasiat bagi kesehatan. Tanaman obat tersebut dapat dimanfaatkan sebagai sumber pengobatan, dan juga dimanfaatkan sebagai pencegahan dari suatu penyakit.<sup>6</sup>

Salah satu tanaman yang berkembang dengan baik di Indonesia adalah Berenuk (*Crescentia cujete*). Tanaman ini kaya akan protein, vitamin, bahkan antioksidan seperti fenolik dan flavonoid. Di negara lain, daun Berenuk sering dimanfaatkan sebagai bahan pengobatan tradisional seperti mengobati demam, asma maupun diare. Ekstrak daun ini juga dapat digunakan sebagai antibakterial. Beragam penelitian menunjukkan manfaat dari tanaman Berenuk, oleh karena itu peneliti ingin menganalisis pengaruh pemberian ekstrak *Crescentia cujete* terhadap kadar marker MDA pada organ otak tikus *Sprague-Dawley* yang diinduksi hipoksia.<sup>7-8</sup>

## 2. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara in vivo dan in vitro. Penelitian ini telah disetujui oleh Komisi Etik Riset Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti. Uji in vitro yang dilakukan antara lain: uji fitokimia dan uji kapasitas antioksidan (DPPH – metode Blois). Sedangkan untuk in vivo diterapkan hipoksia pada hewan coba. Hewan coba yang digunakan adalah tikus *Sprague-Dawley* jantan dengan umur 10 - 12 minggu dengan berat berkisar antara 200 – 250 gram. Tikus dibagi menjadi kelompok yang tidak dicekok dan diberi cekokan (400 mg/kgBB), setiap kelompok dibagi menjadi 4 subkelompok yaitu normoksia, hipoksia 3, 7 dan 14 hari. Setiap subkelompok terdiri dari 4 ekor tikus berdasarkan rumus Federrer. Tikus diinduksi hipoksia menggunakan *hypoxic chamber* dengan kadar O<sub>2</sub> 8% dan N<sub>2</sub> 92%. Setelah dihipoksia dan dikorbankan hewan coba diperiksa kadar MDA darah dan organ otak.

### Pembuatan Ekstrak Daun Berenuk

Simplisia daun Berenuk dibuat dalam bentuk serbuk halus. Serbuk dimasukkan ke dalam tabung maserasi dan dicampur dengan etanol hingga seluruh bagian daun terendam. Maserasi dilakukan selama 2 hari dengan 3 kali pengulangan, ekstrak ditampung dan dievaporasi hingga diperoleh hasil ekstraksi berupa pasta.

### Pembuatan Lisat Darah

Darah dalam tabung EDTA disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 20 menit. Pencucian dilakukan dengan dapar fosfat pH 7,2. Lisat yang diperoleh disimpan di dalam kulkas.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Fitokimia

Hasil uji fitokimia ditampilkan pada tabel 1.1

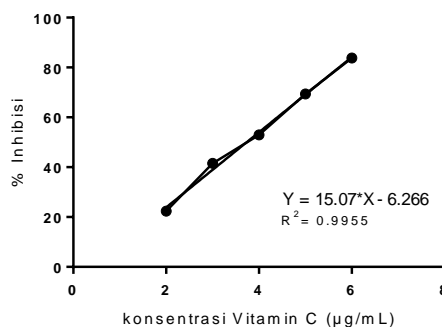
Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Berenuk

Uji Fitokimia Kualitatif	Hasil Uji
Alkaloid	-
Steroid	+++
Terpenoid	+
Fenolik	++
Flavonoid	+

Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Billacura et al<sup>9</sup> yang juga memperoleh hasil yang serupa namun menggunakan pelarut yang berbeda yaitu dengan menggunakan heksan dan air.

#### Uji kapasitas antioksidan (DPPH-Blois)

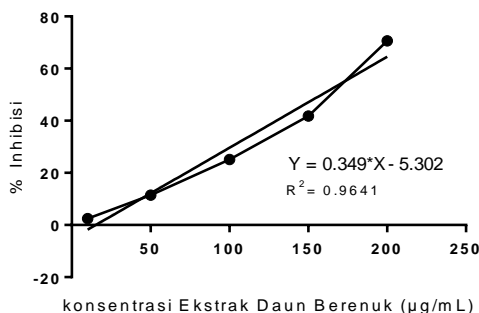
Kapasitas antioksidan pembanding dilakukan terhadap vitamin C yang sudah diketahui sebagai antioksidan yang paling kuat, seperti ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Kurva IC<sub>50</sub> Vitamin C

Vitamin C digunakan sebagai pembanding kapasitas antioksidan. Tiap konsentrasi vitamin C yang sudah dicampurkan dengan DPPH dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-vis menggunakan panjang gelombang 515 nm. Berdasarkan persamaan regresi linier tersebut didapatkan nilai IC<sub>50</sub> dari vitamin C sebesar 3,73 µg/mL.

Kapasitas antioksidan daun Beranuk ditunjukkan pada gambar 2.

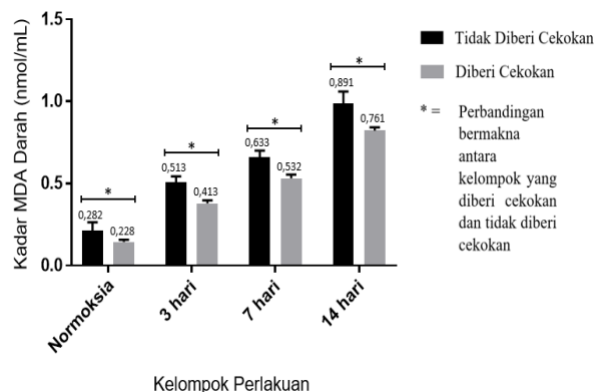


Gambar 2. Kurva IC<sub>50</sub> daun Berenuk

Berdasarkan persamaan regresi linier tersebut didapatkan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak daun berenuk sebesar 158,46 µg/mL (Gambar 2). Penyebab kapasitas antioksidan vitamin C jauh lebih tinggi karena ekstrak daun berenuk tidak hanya mengandung antioksidan, namun juga mengandung hal lain seperti saponin, tannin dan lain-lain. Seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Nwogwugwu NU et al<sup>10</sup> yang mendapatkan bahwa kandungan tannin dalam daun berenuk lebih tinggi daripada kadar fenoliknya.

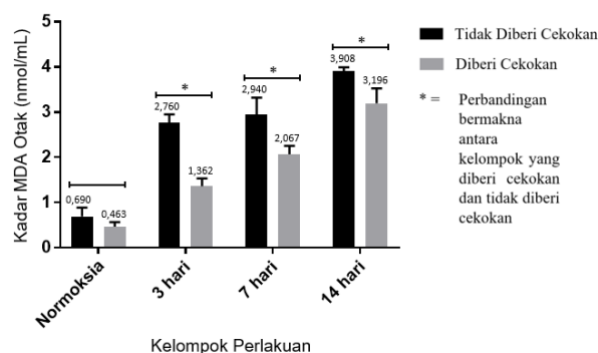
### Uji MDA Hewan Coba

Nilai absorbansi standar MDA dibaca dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 530 nm, diperoleh kurva regresi linier dengan persamaan  $y = 0,1191x + 0,005342$  dan nilai R<sup>2</sup> (koefisien determinasi) = 0,9992. Kadar MDA darah tikus uji menunjukkan adanya peningkatan baik pada kelompok yang diberi cekokan maupun tidak. Kadar MDA darah pada kelompok yang diberi cekokan selalu lebih rendah dibanding kelompok yang tidak diberi cekokan. Penurunan bermakna antara kelompok yang diberi cekokan dengan tidak didapatkan pada semua kelompok perlakuan.



Gambar 3. Kadar MDA Darah pada Hewan Coba yang Tidak Diberi Cekokan dan Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk

Kadar MDA otak tikus uji menunjukkan adanya peningkatan baik pada kelompok yang diberi cekokan maupun tidak. Kadar MDA otak pada kelompok yang diberi cekokan selalu lebih rendah dibanding kelompok yang tidak diberi cekokan. Penurunan bermakna antara kelompok yang diberi cekokan dengan tidak dimulai pada kelompok yang diinduksi hipoksia selama 3 hari hingga 14 hari.



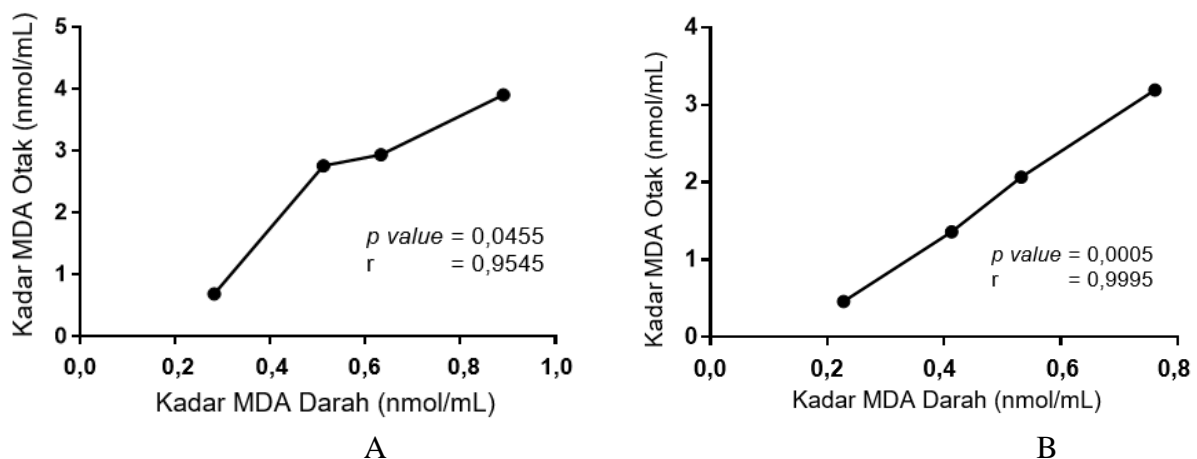
Gambar 4. Perbandingan Kadar MDA Otak pada Hewan Coba yang Tidak Diberi Cekokan dan Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk

Hasil kadar MDA pada otak dan darah tikus baik yang diberi cekokan maupun kelompok yang tidak diberi cekokan terus meningkat, berbanding lurus dengan jangka waktu perlakuan hipoksia dan kadar puncaknya berada pada kelompok dengan perlakuan hipoksia selama 14 hari. Hal ini disebabkan oleh adanya peningkatan jumlah asam lemak tak jenuh rantai ganda seiring dengan lamanya hipoksia yang mengakibatkan kadar MDA meningkat. Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Kirimi et al<sup>12</sup> dan Toader et al<sup>13</sup> yang juga menyatakan bahwa ada peningkatan kadar MDA pada otak yang berbanding lurus dengan lamanya hipoksia serta kadar MDA dalam darah selalu lebih rendah dibanding otak karena PUFA lebih banyak ditemukan pada otak dibanding darah.

Hasil penelitian ini juga sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Anwuchaepe AU et al<sup>15</sup> yang memperoleh hasil bahwa organ dari tikus yang diberi cekokan ekstrak daun berenuk memiliki kadar MDA yang lebih rendah jika dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberi cekokan.

### Korelasi MDA Darah dan Otak pada Kelompok yang Diberi Cekokan maupun Tidak Diberi Cekokan

Korelasi antara kadar MDA darah dan organ otak tikus pada kelompok yang tidak diberi cekokan diperoleh menggunakan uji *Pearson* ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Kurva Korelasi Kadar MDA Darah dan Kadar MDA Otak

A. Kelompok Tikus yang Tidak Diberi Cekokan

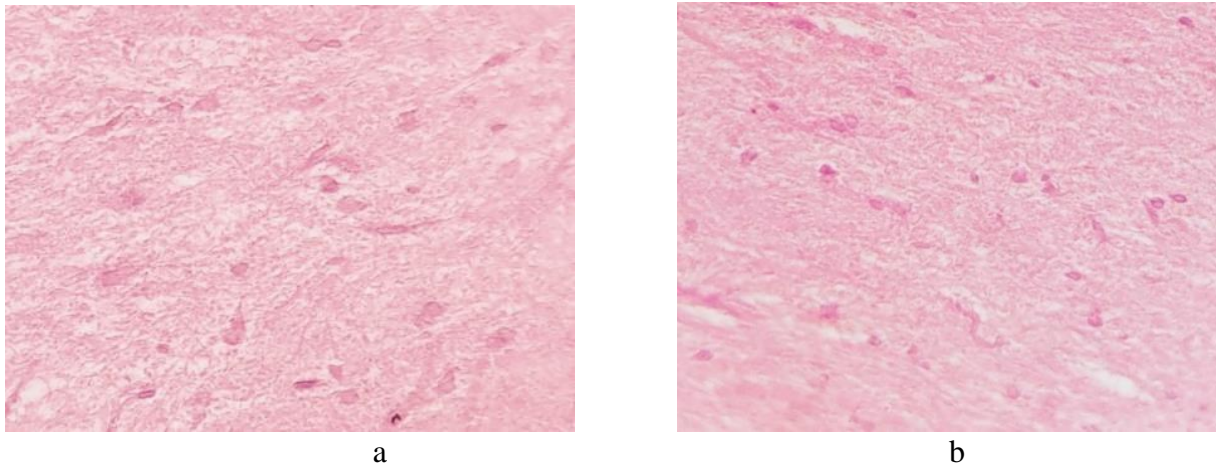
B. Kelompok Tikus yang Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk

Diperoleh korelasi yang sangat kuat dan signifikan antara kadar MDA darah dan otak tikus baik pada kelompok yang tidak diberi cekokan (*p* value = 0,0455) dan nilai *r* = 0,9545, maupun kelompok yang tidak diberi cekokan (*p* value sebesar 0,0005) dan nilai *r* = 0,9995.

Korelasi yang sangat kuat antara kadar MDA pada darah dan otak disebabkan karena di dalam otak dan darah ditemukan adanya PUFA yang dapat rusak oleh radikal bebas. Selain itu hasil dari peroksidasi lipid yang terjadi di otak kemudian akan disalurkan ke dalam darah, sehingga jika kerusakan lipid di otak semakin banyak, maka semakin banyak juga MDA yang dikeluarkan ke dalam darah. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Aydemir et al<sup>15</sup> serta Lazzarino et al<sup>16</sup> yang memperoleh hal serupa.

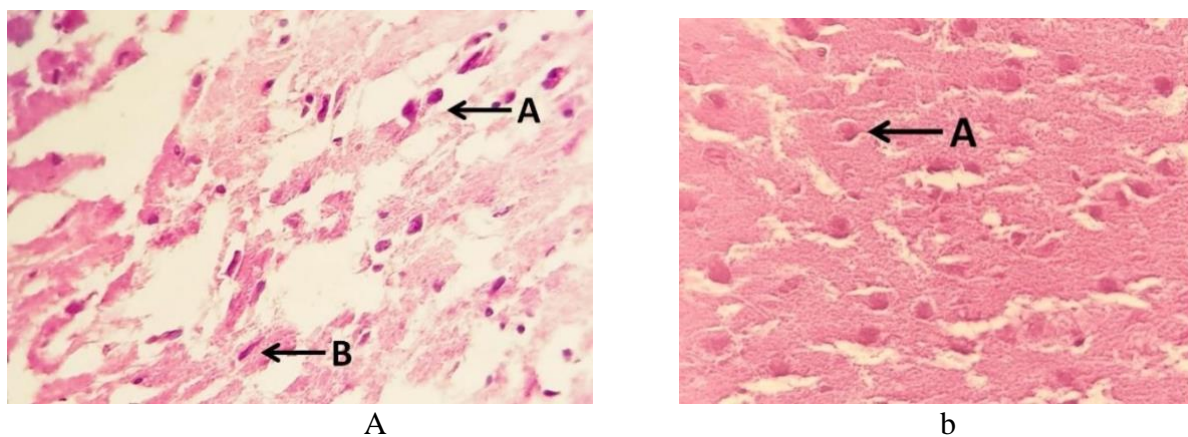
### Hasil Pemeriksaan Patologi Anatomi Otak Tikus

Pemeriksaan patologi anatomi otak tikus dilakukan dengan metode pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE). Preparat yang ada dilihat menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400x. Gambaran histopatologi jaringan otak tikus yang diberi cekokan ekstrak daun Berenuk tanpa diinduksi hipoksia sistemik kronik ditemukan sel otak normal dengan inti sel jelas dan tanpa edema sel (Gambar 6 a). Gambaran histopatologi jaringan otak yang diberi cekokan ekstrak daun Berenuk dan diinduksi hipoksia sistemik kronik selama 14 hari ditemukan adanya sel-sel otak yang mengalami edema dan nekrosis (Gambar 6 b).



Gambar 6. Histopatologi Jaringan Otak Tikus dengan Pewarnaan HE Pembesaran 400x

- a. Tidak Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk Tanpa Diinduksi Hipoksia dan  
Keterangan: Sel otak tampak normal. Inti sel jelas. Ukuran Sel Normal
- b. Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk tanpa Diinduksi Hipoksia  
Keterangan: Sel otak tampak normal. Inti sel jelas. Ukuran Sel Normal



Gambar 7. Patologi Anatomi Jaringan Otak Tikus yang Diinduksi Hipoksia selama 14 hari dengan Pewarnaan HE dan Pembesaran 400x.

1. Tidak Diberi Cekokan Ekstrak Daun Berenuk  
Keterangan: Sel otak yang edema (A) dan sel otak yang mengalami nekrosis (B).
2. Jaringan Otak Tikus yang Diberi Cekokan Ekstrak Daun  
Keterangan: Sel otak yang edema (A).

Hasil pemeriksaan histopatologi otak tikus normoksia didapatkan hasil dalam batas normal, inti sel normal, dan tidak ada nekrosis, berbeda dengan yang diberi perlakuan hipoksia selama 14 hari. Pada otak tikus yang dihipoksia selama 14 hari ditemukan adanya edema pada sel-sel otak, inti piknotik serta nekrosis dan kelompok yang tidak diberi cekokan mengalami kerusakan yang lebih parah dibandingkan dengan yang diberi cekokan. Hasil pemeriksaan histopatologi ini sejalan dengan penelitian Nazmi A et al<sup>17</sup> dan Albertsson et al<sup>18</sup> yang menyatakan bahwa kerusakan pada jaringan otak yang hipoksia disebabkan oleh karena adanya peningkatan dari jumlah sel-sel imunitas dan proinflamasi seperti limfosit T, limfosit B. Sitokin yang dihasilkan oleh sel-sel tersebut secara langsung merusak neuron otak serta memperberat kerusakan karena mengaktivasi mikroglia, neutrofil dan sel-sel endotel.

#### 4. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil uji fitokimia didapatkan bahwa ekstrak daun Berenuk memiliki kandungan steroid, terpenoid, flavonoid dan fenolik. Daun berenuk memiliki kapasitas total antioksidan, IC<sub>50</sub> 158,46 µg/mL. Didapatkan peningkatan kadar MDA darah dan otak yang bermakna pada kelompok tikus yang diberi cekokan terhadap kelompok yang tidak diberi cekokan serta hubungan bermakna antara kadar MDA darah dengan otak tikus pada masing-masing kelompok. Didapatkan kerusakan organ otak yang lebih ringan pada tikus yang diberi cekokan jika dibandingkan dengan yang tidak.

#### REFERENSI

- <sup>1</sup>Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YSR, De B. Free Radical, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2010;3(1):91-100.
- <sup>2</sup>Gupta RK, Patel AK, Shah N, Choudhary AK, Jha UK, Yadav UC, et al. Oxidative Stress and Antioxidants in Disease and Cancer: A Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15:4405-9.
- <sup>3</sup>Borra SK, Gurumurthy P, Mahendra J, Jayamathi KM, Cherian CN, Chand R. Antioxidant And Free Radical Scavenging Activity of Curcumin Determined by Using Different In Vitro and Ex Vivo Models. *J Med Plants Res.* 2013;7(36):2680-90.
- <sup>4</sup>Poljsak B, Milisav I. Aging, Oxidative Stress and Antioxidants. *Licensee InTech.* 2013:331-53.
- <sup>5</sup>Shebis Y, Iluz D, Kinel-Tahan Y, Dubinsky Z, Yehoshua Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food Nutr Sci.* 2014;4:643-9.
- <sup>6</sup>Gloria S. Indonesia Gudangnya Tanaman Obat Dunia [internet]. 2013 [cited 2017 Aug 12]. Available from: <http://nationalgeographic.co.id/berita/2013/09/indonesia-gudangnya-habitat-tanaman-obat-dunia>
- <sup>7</sup>Dawodu OA, Lawal OA, Ogunwande IA, Giwa AA. Volatile constituents of *Crescentia cujete* L. *Am J Essent Oil Nat Prod.* 2016;4(4):1-3.
- <sup>8</sup>Parente FGG, Oliveira AP, Rodrigues CMSC, Junior RGO, Paulo IMM, Nunes XP et al. Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic fraction from the leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *J chem pharm res.* 2016;8(2):231-6.
- <sup>9</sup>Billacura MP, Pangcoga KKJ. Phytochemical Screening, Cytotoxicity, Mutagenicity, Antimutagenicity, and Protective Potentials of The Different Solvent Extracts from The Air-Dried Leaves of *Crescentia cujete* Linn. *International Journal of Advanced and Applied Sciences.* 2017;4(4):118-26.
- <sup>10</sup>Nwogwugwu NU, Abu GO, Akaranta O. Chemical Composition of Calabash (*Crescentia cujete*) and Fluted Pumpkin (*Telfaria occidentalis* Hook. f) Pulp and Their Potential for Use in the Industry. *Arch. Appl. Sci. Res.* 2016;8(8):24-30.



- <sup>11</sup>Parente FGG, Oliveira AP, Rodrigues CMSC, Junior RGO, Paulo IMM, et al. Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Methanolic Fraction from The Leaves of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). J. Chem. Pharm. Res. 2016;8(2):231-6.
- <sup>12</sup>Kirimi E, Peker E, Tuncer O, Yapicioglu H, Narli N, Satar M. Increased Serum Malondialdehyde Level in Neonates with Hypoxic–Ischaemic Encephalopathy: Prediction of Disease Severity. The Journal of International Medical Research. 2010;38:2002-6.
- <sup>13</sup>Toader A, Filip A, Decea N, Muresan A. Neuroprotective Strategy in An Experimental Newborn Rat Model of Brain Ischemia and Hypoxia: Effects of Resveratrol and Hypothermia. Clujul Medical. 2013;86:3.
- <sup>14</sup>Anwuchaepe AU, Onyegbule FA, Ajaghaku DL, Nwafor FI, Okoye FBC. Evaluation of the In Vivo Antioxidant, Toxicological and Chromatographical Profiling of Leaf Extract and Fractions of *Crescentia cujete* Linn. (Bignoniaceae). Asian Pac. J. Health Sci. 2017;4(3):43-54.
- <sup>15</sup>Aydemir EO, Duman C, Celik HA, Turgan N, Uysal A, Mutaf I, et al. Effects of Defibrotide on Aorta and Brain Malondialdehyde and Antioxidants in Cholesterol-induced Atherosclerotic Rabbits. Int. J. Clin. Lab. Res. 2000;30:101-7.
- <sup>16</sup>Lazzarino G, Tavazzi B, Pierro DD, Vagnozzi R, Penco M, Giardina B. The Relevance of Malondialdehyde as a Biochemical Index of Lipid Peroxidation of Postischemic Tissues in the Rat and Human Beings. Biological Trace Element Research. 1995;47:165-9.
- <sup>17</sup>Nazmi A, Albertsson AM, Ferreira ER, Zhang X, Vontell R, Zelco A, et al. Lymphocytes Contribute to the Pathophysiology of Neonatal Brain Injury. Front. Neurol. 2018;9:159.
- <sup>18</sup>Albertsson AM, Zhang X, Vontell R, Bi D, Bronson R, Supramaniam V, et al.  $\gamma\delta$  T Cells Contribute to Injury in The Developing Brain. The American journal of pathology. 2018;188(3):757-767.