

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN EFEK HEPATOPROTEKTIF DAUN BAKAU API-API PUTIH

Antioxidant Activity and Hepatoprotective Effect of Green Mangrove Leaves

Safrina Dyah Hardiningtyas^{1*}, Sri Purwaningsih¹, Ekowati Handharyani²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622909, 8622907, Faks. (0251) 8622907

²Departemen Klinik, Reproduksi, dan Patologi, Fakultas Kedokteran Hewan,
Institut Pertanian Bogor, Jalan Agatis Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8629469, 8629470, Faks. (0251) 8629459

*Korespondensi: saf.tyas@gmail.com

Diterima 21 Januari 2014/Disetujui 04 April 2014

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak kasar daun api-api putih yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik, menentukan kandungan fitokimia dan efek *Hepatoprotektif* ekstrak kasar yang dipilih secara *in vivo*. Daun api-api putih diekstrak menggunakan tiga jenis pelarut, yakni metanol, etil asetat dan n-heksana. Dalam uji *in vivo* dilakukan evaluasi terhadap kadar malondialdehid (MDA), enzim aspartat transaminase (AST), enzim alanin transaminase (ALT), dan histopatologi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstraksi daun api-api putih dengan pelarut etil asetat menghasilkan aktivitas antioksidan terbaik dengan kandungan fitokimia terdiri dari flavonoid dan steroid/triterpenoid. Pemberian ekstrak etil asetat daun api-api putih pada tikus yang telah diinduksi CCl₄ dapat menormalkan berbagai parameter biokimia stres oksidatif (kadar MDA, AST, dan ALT) dibandingkan dengan standar Silymarin. Ekstrak daun api-api putih berpotensi untuk melindungi hati tikus dari kerusakan oksidatif yang diinduksi CCl₄. Efek *Hepatoprotektif* ekstrak daun api-api putih berkorelasi dengan aktivitas antioksidannya.

Kata kunci: antioksidan, *Avicennia marina*, ekstrak, hepatoprotektor

Abstract

This research aimed to extract the antioxidant compound of green *Mangrove* (*Avicennia marina*) leaf and to test the effect hepato protective of crude extract selected *in vivo* model. *In vivo* test was performed by evaluated malondialdehyde (MDA) level, enzyme of aspartate transaminase (AST) dan alanine transaminase (ALT) level, and histopathology. The result showed that extraction *A. marina* leaf with ethyl acetate display the best antioxidant activity. Phytochemical of ethyl acetate extract of *A. marina* leaf contained flavonoid and steroid/triterpenoid. Treatment with ethyl acetate extract of *A. marina* leaves normalized various biochemical parameters of oxidative stress (MDA, AST, and ALT level) in compared to Silymarin standard. *A. marina* leaves extract could be proposed to protect the liver against CCl₄-induced oxidative damage in rats. The hepatoprotective effect might be correlated with its antioxidant and free radical scavenger effects.

Keyword: antioxidant, *Avicennia marina*, extract, hepatoprotective

PENDAHULUAN

Hati adalah organ tubuh yang berfungsi dalam menetralkan zat toksik yang masuk dalam tubuh, serta menjadi sasaran peningkatan konsentrasi radikal bebas. Radikal bebas merupakan sekelompok zat kimia yang

sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Halliwell dan Gutteridge 2007). Konsentrasi radikal bebas yang tidak seimbang dengan antioksidan dapat menimbulkan stres oksidatif pada tubuh. Stres oksidatif dapat menyebabkan peroksidasi

lipida sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel dan menimbulkan penyakit degeneratif, misalnya penyakit liver (Sen *et al.* 2010) sehingga perlindungan terhadap organ hati sangat diperlukan untuk mencegah kerusakan oksidatif yang berlanjut.

Kerusakan akibat radikal bebas dalam tubuh tersebut dapat diatasi dengan antioksidan. Antioksidan didefinisikan sebagai suatu substansi yang dapat menunda, mencegah, atau menghilangkan kerusakan oksidatif pada molekul target, contoh protein, lipida dan DNA (Halliwell dan Gutteridge 2007). Tubuh secara alami memproduksi zat antioksidan endogen yang mampu mengatasi efek radikal bebas, tetapi saat pasokan radikal bebas meningkat dibutuhkan pasokan zat antioksidan dari luar. Antioksidan dapat berasal dari bahan alami dan sintetik. Sumber antioksidan alami telah banyak dilaporkan berasal dari tanaman. Salah satu tanaman yang dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan alami adalah bakau jenis api-api putih (*Avicennia marina*).

Bakau api-api putih merupakan salah satu jenis bakau yang tersebar di seluruh Indonesia dengan kondisi yang melimpah (Noor *et al.* 2006). Daun api-api putih dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai bahan pangan dan obat-obatan. Pengalaman secara tradisional, bakau ini di beberapa daerah telah digunakan untuk sayuran serta mengobati berbagai jenis penyakit, contoh hepatitis, kusta, rematik, cacar, bisul, dan obat luka bakar (Bandaranayake 2002; Noor *et al.* 2006).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Bunyapraphatsara *et al.* (2004); Vadlapudi dan Naidu (2009) menunjukkan bahwa daun api-api putih memiliki aktivitas antioksidan. Berdasarkan pemahaman tersebut, diperoleh suatu pemikiran bahwa dengan memperoleh senyawa bioaktif ekstrak daun api-api putih yang memiliki aktivitas antioksidan, maka dapat berpotensi untuk menanggulangi kerusakan oksidatif pada hati. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak kasar daun api-api putih yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik, menentukan kandungan

fitokimia dan efek *Hepatoprotektif* ekstrak kasar yang dipilih secara *in vivo*.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah daun bakau api-api putih yang diambil di Kawasan Hutan *Mangrove* Blanakan, Subang, bahan kimia untuk ekstraksi daun api-api putih, pengujian antioksidan, antioksidasi lipida (kadar malondialdehida, enzim aspartat transaminase (AST), enzim alanin transaminase (ALT)), dan histopatologi hati hewan coba. Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (Max 410 g and HF400), vakum rotari evaporator (Buchi Rotavapor R-210), dan spektrofotometer (UV-Vis RS UV-2500).

Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap percobaan. Tahap pertama adalah preparasi, ekstraksi, dan analisis aktivitas antioksidan. Tahap dua adalah pengujian efek *Hepatoprotektif* daun api-api putih secara *in vivo*.

Preparasi Sampel Daun Api-api Putih

Sampel daun api-api putih dikumpulkan dan dibersihkan dari kotoran menggunakan akuades, kemudian dilakukan pengeringan. Proses pengeringan dilakukan menggunakan sinar matahari selama 4 hari. Daun api-api putih kering dijadikan serbuk halus menggunakan mesin penepung dengan saringan sebesar 100 *mesh*. Serbuk daun bakau api-api putih kering kemudian diekstraksi dengan perlakuan jenis pelarut.

Ekstraksi dan Pengujian Antioksidan

Ekstraksi secara tunggal dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol, etil asetat atau n-heksana p.a dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:5 (b/v) selama 24 jam. Tahap selanjutnya, dilakukan filtrasi untuk memisahkan pelarut dengan sampel. Filtrat yang terkumpul dipisahkan antara pelarut dan ekstrakny

menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 37°C hingga diperoleh ekstrak kasar berbentuk pasta. Ketiga sampel tersebut diuji aktivitas antioksidan dengan metode (DPPH) (Hanani *et al.* 2005). Ekstrak kasar daun api-api putih yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik dianalisis fitokimia menurut metode Harbone (1987), untuk mengetahui golongan senyawa bioaktif pada ekstrak tersebut.

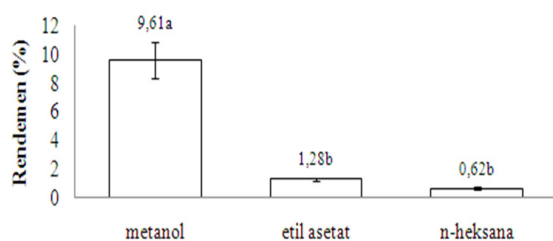
Pengujian Efek Hepatoprotektif secara *In Vivo*

Tikus putih Sprague Dawley berumur 8 minggu dengan berat badan (180-210) g yang digunakan pada percobaan terlebih dahulu diadaptasikan dalam kandang selama kurang lebih satu minggu sebelum digunakan untuk penelitian. Tikus diberi pakan standar dan minum *ad libitum* selama percobaan dilakukan. Tikus ditimbang dan dikelompokkan menjadi 4 kelompok (n=3) di dalam kandang secara terpisah pada hari terakhir adaptasi. Kelompok perlakuan adalah sebagai berikut:

Kelompok 1: Kontrol negatif (normal)

Kelompok 2: Kontrol positif, yaitu tikus diinduksi CCl₄ dengan dosis 0,5 mL/kg BB secara intraperitoneal (Sengupta *et al.* 2011) pada hari pertama.

Kelompok 3: Perlakuan ekstrak daun api-api terpilih. Tikus diinduksi pada hari pertama, kemudian diberikan ekstrak api-api terpilih (dilarutkan dalam 0,5% Tween 80) secara oral sebanyak 0,5 mL pada hari ke-2 sampai hari ke-8. Dosis ekstrak yang diberikan merupakan konversi dari nilai IC₅₀ pada uji *in vitro*.



Gambar 1 Rendemen hasil ekstraksi dengan jenis pelarut berbeda.

Kelompok 4: Perlakuan hepatoprotektor standar, yaitu silymarin. Tikus diinduksi pada hari pertama, kemudian diberikan silymarin (dilarutkan dalam 0,5% Tween 80) dosis 25 mg/kg BB secara oral pada hari ke-2 sampai hari ke-8.

Sampel darah digunakan untuk menganalisis kadar enzim AST dan enzim ALT (kit AMP diagnostic[®]), sedangkan hati untuk pengamatan preparat histopatologi hati (Kiernan 1990) dan analisis kadar MDA (Capeyron *et al.* 2002).

Analisis data

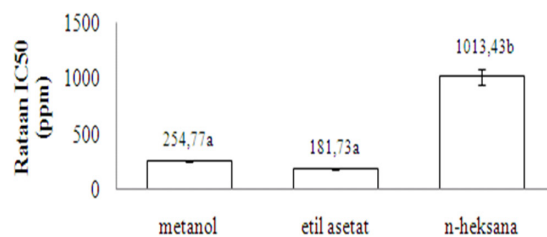
Data pengujian rendemen ekstrak, aktivitas antioksidan, kadar MDA, kadar enzim AST dan enzim ALT dianalisis dengan analisis ragam menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Untuk melihat perbedaan antar perlakuan dilakukan pengujian lanjut menggunakan uji *Tukey*. Data kandungan fitokimia dan gambaran histopatologi dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Api-api Putih

Jenis pelarut yang digunakan merupakan faktor utama yang menentukan hasil ekstraksi atau rendemen ekstrak. Rendemen hasil ekstraksi dengan jenis pelarut berbeda disajikan pada Gambar 1, sedangkan hubungan jenis pelarut dengan aktivitas antioksidan (rata-rata IC₅₀) ekstrak daun api-api putih disajikan pada Gambar 2.

Ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antioksidan terbaik, namun aktivitas



Gambar 1 Hubungan jenis pelarut dengan aktivitas antioksidan (nilai IC₅₀) ekstrak daun bakau api-api putih

antioksidan ekstrak kasar daun bakau api-api tersebut masih lebih rendah dibandingkan dengan aktivitas antioksidan BHT dan vitamin C dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 5,86 ppm dan 8,26 ppm. Perbedaan aktivitas antioksidan pada setiap ekstrak tersebut diduga berkaitan dengan tipe antioksidan yang terkandung di dalamnya. Menurut Yang *et al.* (2011), tipe antioksidan berdasarkan kelarutannya terdiri dari antioksidan lipofilik (larut dalam nonpolar) dan antioksidan hidrofilik (larut dalam polar).

Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak yang lain diduga disebabkan oleh pelarut etil asetat yang bersifat semipolar sehingga mengandung senyawa aktif antioksidan baik yang bersifat hidrofilik maupun lipofilik. Menurut Cano *et al.* (2003), etil asetat dapat digunakan untuk mengekstrak komponen lipofilik dari fase aqueous serta diduga mampu mengekstraksi beberapa komponen hidrofilik dari fase aqueous. Pelarut n-heksana digunakan untuk mengekstrak komponen lipofilik dari fase aqueous, sedangkan metanol mengekstrak komponen hidrofilik dari fase aqueous.

Yeum *et al.* (2004; 2009) menyatakan bahwa antioksidan hidrofilik dan lipofilik dapat bekerja secara sinergis sehingga memiliki kemampuan yang kuat dalam melindungi sistem biologis dan mengurangi kerusakan yang disebabkan oleh *reactive oxygen species* (ROS). Antioksidan lipofilik contoh tokoferol, sebagai penangkap radikal oksigen yang dapat menghambat inisiasi dan propagasi pada reaksi rantai oksidatif dalam sistem hidrofobik. Menurut Wu *et al.* (2004), antioksidan hidrofilik terutama komponen fenolik bekerja secara mudah dalam mendonorkan satu atom hidrogen pada $ROO\cdot$.

Kandungan Fitokimia Ekstrak Terpilih

Kandungan fitokimia ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih yang diduga berperan sebagai antioksidan adalah

flavonoid dan steroid atau triterpenoid (Tabel 1). Menurut Setzer (2008), triterpenoid atau steroid merupakan senyawa aktif yang termasuk dalam jenis antioksidan lipofilik. Menurut Middleton *et al.* (2000), flavonoid merupakan senyawa aktif yang termasuk dalam jenis intermediet antioksidan yang berperan sebagai antioksidan hidrofilik dan lipofilik. Flavonoid merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Mekanisme antioksidan dari flavonoid adalah menangkap ROS secara langsung, mencegah regenerasi ROS dan secara tidak langsung dapat meningkatkan aktivitas antioksidan enzim antioksidan seluler (Akhlaghi dan Bandy 2009). Flavonoid merupakan senyawa yang paling efektif sebagai scavenger spesies reaktif, misalnya super dioksida, radikal peroksil, dan peroksinitrit dengan cara mentransfer atom H^+ (Middleton *et al.* 2000; Akhlaghi dan Bandy 2009). Pencegahan terbentuknya ROS oleh flavonoid dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menghambat kerja enzim xantin oksidase dan Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) oksidase, serta mengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) sehingga dapat mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan radikal bebas (Akhlaghi dan Bandy 2009; Atmani *et al.* 2009).

Menurut Lotito dan Fraga (2000), flavonoid merupakan antioksidan yang berperan dalam melindungi antioksidan lipofilik sehingga dapat menguatkan

Tabel 1 Kandungan fitokimia ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih

Analisis Fitokimia	Hasil
a. Alkaloid	
- Wagner	-
- Meyer	-
- Dragendorf	-
b. Steroid/Triterpenoid	+
c. Flavonoid	+
d. Saponin (uji busa)	-

Keterangan: +: ada - : tidak ada

antioksidan seluler. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan flavonoid berkaitan erat dengan pencegahan timbulnya beberapa penyakit, misalnya penyakit kardiovaskular (Akhlaghi dan Bandy 2009), kanker/tumor (Brusselmans *et al.* 2004), dan penyakit liver (Jin *et al.* 2010; Pinzaru *et al.* 2011).

Tabel 1 menunjukkan bahwa kandungan fitokimia ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih yang diduga berperan sebagai antioksidan adalah flavonoid dan steroid atau triterpenoid. Menurut Setzer (2008), triterpenoid atau steroid merupakan senyawa aktif yang termasuk dalam jenis antioksidan lipofilik. Menurut Middleton *et al.* (2000), flavonoid merupakan senyawa aktif yang termasuk dalam jenis intermediet antioksidan yang berperan sebagai antioksidan hidrofilik dan lipofilik.

Flavonoid merupakan senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Mekanisme antioksidan dari flavonoid adalah menangkap ROS secara langsung, mencegah regenerasi ROS, dan secara tidak langsung dapat meningkatkan aktivitas antioksidan enzim antioksidan seluler (Akhlaghi dan Bandy 2009). Flavonoid merupakan senyawa yang paling efektif sebagai scavenger spesies reaktif, misalnya super dioksida, radikal peroksil, dan peroksinitrit dengan cara mentransfer atom H⁺ (Middleton *et al.* 2000; Akhlaghi dan Bandy 2009). Pencegahan terbentuknya ROS oleh flavonoid dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menghambat kerja enzim xantin oksidase dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH) oksidase, serta mengkelat logam (Fe²⁺ dan Cu²⁺) sehingga dapat mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan radikal bebas (Akhlaghi dan Bandy 2009; Atmani *et al.* 2009).

Lotito dan Fraga (2000) menyatakan bahwa flavonoid merupakan antioksidan yang berperan dalam melindungi antioksidan lipofilik sehingga dapat menguatkan antioksidan seluler. Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan

flavonoid berkaitan erat dengan pencegahan timbulnya beberapa penyakit, misalnya penyakit kardiovaskular (Akhlaghi dan Bandy 2009), kanker atau tumor (Brusselmans *et al.* 2004), dan penyakit liver (Jin *et al.* 2010; Pinzaru *et al.* 2011).

Triterpenoid atau steroid merupakan senyawa yang memiliki peranan sebagai antioksidan. Menurut Topcu *et al.* (2007), mekanisme antioksidan dari triterpenoid adalah dengan cara menangkap/scavenging spesies reaktif, misalnya superoksida, dan mengkelat logam (Fe²⁺ dan Cu²⁺). Hasil penelitian Abrosca *et al.* (2006) menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid dari *Annurca aple* memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan dapat menghambat peroksidasi lipida. Aktivitas biologi dari triterpenoid/steroid selain antioksidan adalah sebagai hepatoprotektor dan analgesik (Fai dan Tao 2009), antitumor (Feng *et al.* 2006), antiproliferatif (Nugraheni *et al.* 2011), dan memberikan efek imunodulator (Martin 2006).

Analisis Efek Hepatoprotektor dari Ekstrak Etil Asetat Daun Bakau Api-api Putih

Hepatoprotektor adalah senyawa atau zat yang berkhasiat melindungi sel sekaligus memperbaiki jaringan hati yang rusak akibat pengaruh zat toksik (Panjaitan 2008). Pemberian hepatoprotektor dapat dilakukan untuk pencegahan (preventif) atau penyembuhan (kuratif) (Kumarappan *et al.* 2011). Penelitian ini mengamati efek hepatoprotektor ekstrak daun bakau api-api putih secara kuratif, hal ini berdasarkan pengetahuan masyarakat yang secara tradisional memanfaatkan bakau api-api putih sebagai obat hepatitis.

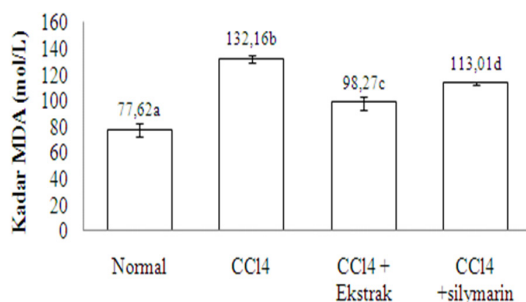
Karbon tetraklorida merupakan senyawa kimia yang digunakan dalam penelitian ini sebagai hepatotoksin. Menurut Al-Shabanah *et al.* (2000), karbon tetraklorida (CCl₄) adalah agen hepatotoksik yang menghasilkan radikal bebas triklorometil (CCl₃), yang ketika diinduksi pada hati tikus sangat mirip

dengan sirosis pada manusia. Suja *et al.* (2004) melaporkan bahwa perubahan yang berhubungan dengan kerusakan hati akibat induksi CCl_4 sangat mirip dengan perubahan pada pasien hepatitis virus akut. Beberapa parameter perubahan yang diamati pada penelitian ini adalah kadar malondialdehida (MDA) pada hati, kadar enzim serum AST dan (ALT) serta histopatologi hati.

Kadar MDA pada Hati

Malondialdehida (MDA) merupakan senyawa sitotoksik yang dihasilkan dari proses peroksidasi lipid, pada akhir tahapan peroksidasi (Huang *et al.* 2011). Pengukuran MDA digunakan sebagai indikator kerusakan oksidatif asam lemak tak jenuh pada sel yang menyebabkan langsung perubahan struktur dan fungsi (Klaunig *et al.* 2009). Kadar MDA pada hati dari kelompok tikus yang diberikan perlakuan disajikan pada Gambar 3.

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan pada tikus memberikan pengaruh yang nyata terhadap kadar MDA hati ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kadar MDA pada tikus yang diinduksi CCl_4 . Kadar MDA mengalami penurunan setelah diberikan ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih dan silymarin ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa ada indikasi perlindungan dan penghambatan peroksidasi lipida yang berlanjut oleh ekstrak etil asetat. Efek penghambatan peroksidasi lipida pada ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih



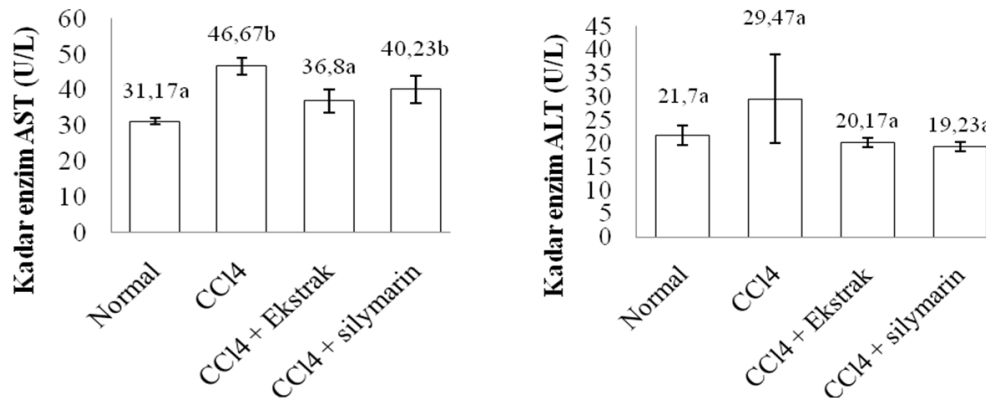
Gambar 3 Kadar MDA pada hati dari kelompok tikus yang diberikan perlakuan.

disebabkan oleh sifat antioksidan senyawa flavonoid dan steroid/triterpenoid yang terkandung didalamnya.

Menurut Akhlaghi dan Bandy (2009); Topcu *et al.* (2007), triterpenoid dan flavonoid merupakan senyawa yang bersifat antioksidan yang dapat mengatasi dan mencegah radikal bebas. Hasil penelitian Nugraheni *et al.* (2011) menunjukkan bahwa triterpenoid dapat menghambat peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan menghambat radikal peroksil serta di tahap akhir dengan menghambat produk sekunder, misalnya malondialdehid. Bastona dan Leroux (2007); Ghosh *et al.* (2010) melaporkan triterpenoid dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P_{450} sehingga proses peroksidasi lipid akibat radikal bebas dapat dicegah. Hasil penelitian Androutsopoulos *et al.* (2010); Quintieri *et al.* (2011) juga menunjukkan bahwa flavonoid dapat menghambat aktivitas enzim sitokrom P_{450} .

Kadar AST dan ALT Darah Tikus

Kadar enzim serum AST dan ALT merupakan parameter klinis yang menggambarkan integritas sel hati (hepatosit) (Giannini *et al.* 2005). Hasil pengukuran kadar AST dan ALT darah tikus dalam serum tikus jantan strain Sprague Dawley ($n = 3$) disajikan pada Gambar 4. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan pada tikus berpengaruh nyata ($\alpha = 0,05$) pada kadar enzim AST serum. Hasil uji lanjut menunjukkan bahwa induksi CCl_4 sebanyak 0,5 mL/kg BB mengakibatkan terjadinya peningkatan kadar enzim AST serum. Kadar enzim AST serum pada kelompok tikus yang induksi CCl_4 dan kelompok normal berbeda secara nyata ($p < 0,05$). Peningkatan kadar enzim AST serum pada kelompok tikus yang induksi CCl_4 tersebut secara keseluruhan tidak terlalu mencolok, hanya satu kali lipat dari kelompok normal. Peningkatan tersebut masih dalam kategori “mild” atau ringan (kenaikan amino transferase 1-3 kali lipat) (Thapa dan Walia 2007).



Gambar 4 Rataan pengukuran kadar enzim AST (A) dan enzim ALT (B) dalam serum tikus jantan strain Sprague Dawley (n = 3).

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa perlakuan yang diberikan pada tikus tidak berpengaruh nyata, ($p < 0,05$) pada kadar enzim ALT serum, walaupun demikian ada indikasi perubahan kadar enzim ALT serum pada tikus yang telah diinduksi CCl_4 dan diberi ekstrak etil asetat daun api-api putih. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat mampu memberikan perlindungan atas kerusakan pada sel hati yang disebabkan oleh radikal bebas yang dihasilkan oleh metabolisme CCl_4 .

Menurut Giannini *et al.* (2005), kadar enzim ALT dan AST dalam darah tersebut mencerminkan kerusakan yang terjadi di dalam sel-sel hati. Enzim ALT dan AST merupakan enzim yang mengkatalis transfer grup α -amino dari alanin dan aspartat menuju grup asam α -ketogutarat untuk membentuk oksaloasetat dan asam piruvat. Enzim ini banyak terdapat dalam hati. Enzim ALT terdapat pada sitosol sedangkan enzim AST terdapat dalam sitosol dan mitokondria. Hasil penelitian Badria *et al.* (2011) menunjukkan bahwa tikus yang diinduksi CCl_4 akan mengalami peningkatan kadar enzim AST dan ALT serum. Kadar AST dan ALT serum berkorelasi dengan terjadinya inflamasi, steatosis, nekrosis, dan fibrosis pada hati tikus. Stockham dan Scott (2002) berpendapat bahwa kadar enzim AST di dalam darah akan meningkat bila terjadi kerusakan sel hati yang parah dan disertai nekrosis sehingga enzim

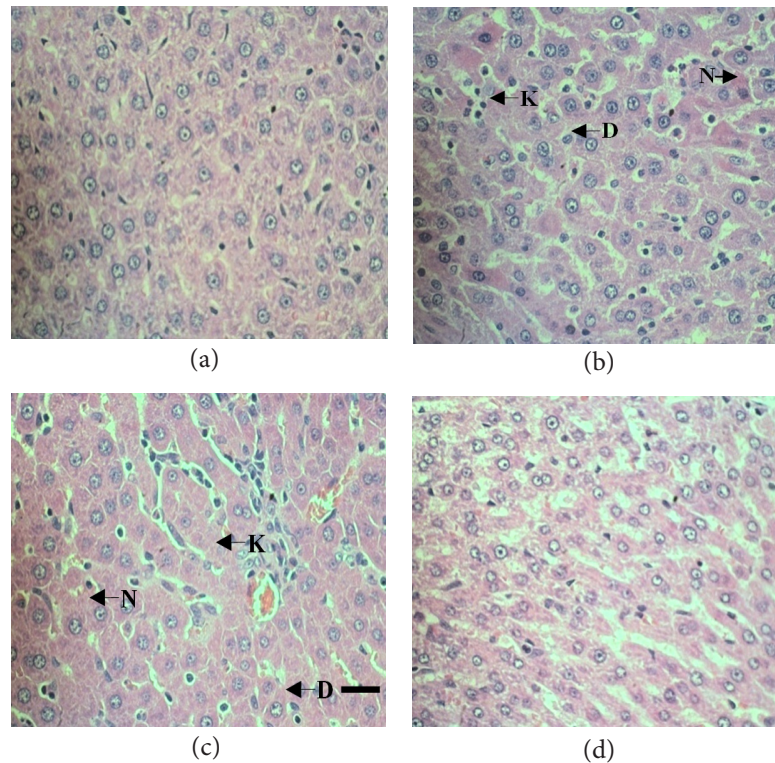
dari mitokondria juga ikut keluar sel.

Perubahan kadar enzim AST dan ALT serum pada kelompok tikus yang diberikan ekstrak etil asetat daun api-api diduga berkaitan dengan kandungan senyawa ekstrak, yaitu flavonoid dan triterpenoid/steroid yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menetralkan suatu radikal bebas. Menurut Wang *et al.* (2004), bahwa senyawa-senyawa golongan triterpenoid bersifat antioksidan sehingga mampu mengurangi jumlah metabolit CCl_4 sehingga sel-sel hati dapat terlindungi dari kerusakan dan stabilitas membran sel hati serta aktivitasnya tetap terjaga. Sharma dan Shukla (2011) menyatakan bahwa efek antioksidan flavonoid adalah dapat meningkatkan proses regenerasi.

Gambaran Histopatologi Hati Tikus

Kerusakan oksidatif pada hati tikus dapat dilihat dengan gambaran histopatologinya. Gambaran keadaan histopatologis hati semua tikus pada setiap kelompok yang diamati dengan perbesaran 4000 kali dapat dilihat pada Gambar 4.

Gambar 4 menunjukkan bahwa ada perbedaan kondisi histopatologi hati pada setiap kelompok tikus. Hasil pengamatan mikroskopik sel hati pada kelompok normal (Gambar 4A) menunjukkan bahwa tidak ada perubahan yang spesifik;



Gambar 4 Histopatologi hati tikus pada kelompok normal (A), kelompok yang diberi CCl_4 (B), selanjutnya ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih (C), silymarin dosis 25 mg/kg BB (D). Pewarnaan H&E. Keterangan: degenerasi sel (D), sel nekrosis (N), sel Kupffer (K). (Bar = 30 μm).

sel hati memiliki inti dan sitoplasma yang jelas. Sel-sel hepatosit tersusun teratur dengan jarak yang sama. Gambaran histopatologi sel hati pada kelompok yang diinduksi CCl_4 0,5 mL/kg BB (Gambar 4B) menunjukkan banyak sel yang mengalami degenerasi, nekrosis (kematian sel), serta terjadi infiltrasi sel Kupffer yang aktif pada daerah sinusoid.

Degenerasi sel ditandai oleh bentuk sel yang abnormal yang ditunjukkan oleh sel yang membesar, inti sel membesar, inti sel mengecil, bahkan sitoplasma sudah tidak berinti. Nekrosis sel ditandai dengan terlihatnya inti sel yang mengalami penyusutan dan warna sitoplasma menjadi gelap. Sel Kupffer yang aktif menandakan adanya senyawa toksik yang masuk ke dalam jaringan, misalnya CCl_4 , kemudian ada usaha fagositosis oleh sel-sel pertahanan lokal. Menurut Jaeschke *et al.* (2002), sel Kupffer berfungsi dalam proses

fagositosis, selain itu sel ini berperan dalam menghasilkan mediator sitotoksik misalnya ROS dan mediator pro-inflamasi, misalnya sitokin dan kemokin.

Hasil dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa induksi CCl_4 dapat menyebabkan kerusakan sel yang ditandai dengan perubahan histopatologi sel. Muriel *et al.* (2001) berpendapat bahwa induksi CCl_4 menyebabkan aktifnya sel Kupffer, yang dapat memediasi kerusakan hati dan memicu terjadinya peroksidasi pada hati. Menurut Al-Shabanah *et al.* (2000), CCl_4 dapat menyebabkan peroksidasi lipid sehingga dapat menurunkan integritas sel sampai menyebabkan nekrosis sel. Hasil penelitian Panjaitan (2008) menunjukkan bahwa induksi CCl_4 0,1 mL/kg BB menyebabkan degenerasi sel-sel hati, bahkan pada kelompok yang mendapatkan CCl_4 (1 dan 10) mL/kg BB mengalami steatosis multifokal (akumulasi lemak

pada sel hati).

Hasil pengamatan mikroskopik kelompok yang diberi perlakuan ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih dosis 182 ppm sebanyak 0,5 mL (Gambar 4C) dan perlakuan silymarin dosis 25 mg/kg BB (Gambar 4D) menunjukkan adanya efek perlindungan dan pemulihan sel hati dari CCl_4 . Hasil tersebut ditandai oleh respon degenerasi dan nekrosis dalam jumlah yang sedikit. Degenerasi sel adalah penurunan fungsi sel yang bersifat *reversible* maupun *irreversible*. Pemberian ekstrak etil asetat dan silymarin tersebut diduga dapat mengembalikan fungsi sel hati sehingga peningkatan jumlah sel yang nekrosis atau sel *irreversible* dapat dicegah.

Efek perlindungan dan pemulihan pada tikus yang diberi ekstrak etil asetat daun bakau api-api putih diduga berkaitan dengan kandungan senyawa antioksidan yang terdapat pada ekstrak tersebut. Menurut Bastona dan Leroux (2007), senyawa golongan triterpenoid memiliki kemampuan dalam memelihara stabilitas membran sel hati sebagai antioksidan dan *scavenger* terhadap ROS. Menurut Sharma dan Shukla (2011), efek antioksidan flavonoid meningkatkan proses regenerasi dengan cara mendestruksi radikal bebas, menyediakan substrat kompetitif untuk lipid tak jenuh dalam membran dan atau mempercepat mekanisme perbaikan membran sel yang rusak.

Hasil penelitian Sahreen *et al.* (2011) menunjukkan bahwa efek *Hepatoprotektif* ekstrak metanol daun *Carissa opaca* pada tikus yang diinduksi CCl_4 secara signifikan disebabkan oleh kandungan antioksidan dan kandungan penstabil membran sel pada ekstrak tersebut. Menurut Karthikeyan *et al.* (2008), efek hepatoprotektor ekstrak alga coklat *Padina boergesenii* ditunjukkan oleh kemampuan ekstrak tersebut dalam menghambat peroksidasi lipid dan menurunkan kadar

enzim amino transferase (AST dan ALT). Punitha dan Rajasekaran (2011) melaporkan bahwa hepatoprotektor dapat memperbaiki integritas sel dan menstimulus aktivitas antioksidan enzim (superoksida dismutase, katalase, dan glutation peroksidase).

KESIMPULAN

Kondisi ekstraksi terbaik untuk mendapatkan aktivitas antioksidan daun bakau api-api putih menggunakan pelarut etil asetat selama 24 jam memiliki potensi sebagai hepatoprotektor, karena dapat menurunkan kadar MDA hati, kadar enzim AST dan ALT darah, serta mengurangi lesio histopatologi jaringan hati.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrosca BD, Fiorentino A, Monaco P, Oriano P, Pacifico S. 2006. Annurcoic acid: a new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple. *Food Chemistry* 98: 285–290.
- Achiliya GS, Wadodkar SO, Dorle AK. 2004. Evaluation of hepatoprotective effect of Amakadi ghrita against carbon tetrachloride induced hepatic damage in rats. *Journal Ethnopharmacology* 90: 229-232.
- Akhlaghi M, Bandy B. 2009. Review article: mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal Moleculular and Cellular Cardiology* 46: 309–317.
- Al-Shabanah OA, Alam K, Nagi MN, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. 2000. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor against CCl_4 -induced hepatotoxicity in mice. *Life Science* 66: 265-270.
- Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Tsatsakis AM, Spandidos DA. 2010. Dietary flavonoids in cancer therapy and prevention: substrates and inhibitors of cytochrome P₄₅₀ CYP1 enzymes. *Pharmacology and Theraphy*

- 126:9-20.
- Atmani D, Chaher N, Atmani D, Berboucha M, Debbache N, Boudaoud H. 2009. Flavonoids in human health: from structure to biological activity. *Current Nutrition and Food Science* 5:225-237.
- Badria AF, El-Belbasi HI, Sobh MM, Badria FA. 2011. Parallelism study between biochemical, immunological and histochemical parameters of liver injury induced by carbon tetrachloride on rats. *Journal American Science* 7(5): 581-591.
- Bandarnayake WM. 2002. Bioactivities, bioactive compounds and chemical constituents of mangrove plants. *Wetlands Ecology Management* 10: 421-452
- Bastona E, Leroux FR. 2007. Inhibitors of steroidal cytochrome P₄₅₀ enzymes as targets for drug development. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2:31-58.
- Bunyaphatsara N, Jutiviboonsuk A, Sornlek P, Therathanathorn W, Aksornkaew S, Fong HHS, Pezzuto JM, Kosmeder J. 2004. Pharmacological studies of plants in the mangrove forest. *Thai Journal Phytopharmacy* 10(2):1-12.
- Brusselmans K, Vrolix R, Verhoeven G, Swinnen JV. 2004. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. *The Journal Biology Chemistry* 280(7):5636-5645.
- Cano A, Acosta M, Arnao MB. 2003. Hydrophilic and lipophilic antioxidant activity changes during on-vine ripening of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Postharvest Biology and Technology* 28: 59-65.
- Capeyron, Julie C, Eric B, Jean P, Piere MR, Claude LL, Benard D. 2002 A diet cholesterol and defcient in vite incudes lipid peroxidation but does not enhance antioxidant enzyme expression in rat liver. *Biochemisrtry* 13: 296-301.
- Fai YM, Tao CC. 2009. Literature review onpharmacological activities of oleanolic acid. *Natural Product Medica* 2: 291-298.
- Feng Y, Li XM, Duan XJ, Wang BG. 2006. A new acylated iridoid glucoside from *Avicennia marina*. *Chinese Chemical Letters* 17(9): 1201-1204.
- Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC. 2010. Arjunolic acid, a triterpenoid saponin, prevents acetaminophen (APAP)-induced liver and hepatocyte injury via the inhibition of APAP bioactivation and JNK-mediated mitochondrial protection. *Free Radical Biology Medicine* 48(4): 535-553.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V. 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ* 172(3): 367-379.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. 2007. *Free Radicals In Biology And Medicine*. Ed ke-4. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Hanani E, Mun'im A, Sekarini R. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian* 2(3): 127-133.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods*.
- Huang B, Ban X, He J, Tong J, Tian J, Wang Y. 2011. Hepatoprotective and antioxidant activity of ethanolic extracts of edible lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) leaves. *Food Chem*. 120: 873-878.
- Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. 2002. *Mechanisms of hepatotoxicity*. *Toxicol.l Scie*. 65: 166-176.
- Jin YKJ, Russell RM, Aldini G. 2010. Antioxidant activity and oxidative stress: an overview. Di dalam: Aldini

- G, Yeum KJ, Niki E, Russell RM, editor. *Biomarkers for Antioxidant Defense and Oxidative Damage: Principles and Practical Applications*. Iowa, USA: Blackwell Publishing.
- Karthikeyan DR, Manivasagam T, Subramanian P, Somasundaram ST, Anantharaman P, Balasubramanian T. 2008. Antioxidant activity of brown alga *Padina boergeresii* against carbon tetrachloride induced liver fibrosis in rats. *Seaweed Res. Util.* 30: 157-163.
- Kiernan JA. 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. Ed ke-2. Kanada: Pergamon Press.
- Klaunig JE, Corthals SM, Kamendulis LM, Philip BK. 2009. *Role of The Kupffer Cell in Hepatotoxicity and Hepatocarcinogenesis*. Di dalam: Sahu SC, editor. *Hepatotoxicity from Genomics to in vitro and in vivo Models*. West Sussex, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Kumarappan C, Vijayakumar M, Thilagam E, Balamurugan M, Thiagarajan M, Senthil S, Das SC, Mandal SC. 2011. Protective and curative effect of polyphenolic extract from *Ichnocarpus frutescense* leaves on experimental hepatotoxicity by carbon tetrachloride and tamoxifen. *Ann. of Hepat.*10(1): 63-72.
- Lotito SB, Fraga CG. 2000. Catechins delay lipid oxidation and alpha-tocopherol and beta-carotene depletion following ascorbate depletion in human plasma. *Proceeding of The Society for Experimental Biology and Medicine* 225: 32-38.
- Martin KR. 2006. Targeting apoptosis with dietary bioactive agents. *Experimental Biology and Medicine* 231: 117-129.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacology Review* 52: 673-751.
- Muriel P, Alba N, Perez-Alvarez VM, Shibayama M, Tsutsumi VK. 2001. Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Toxicology and Pharmacology* 130:219-226.
- Noor YR, Khazali M, Syadipura INN. 2006. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. Bogor: Wetlands Internatinal.
- Nugraheni M, Santoso U, Suparmo, Wuryastuti H. 2011. Potential of *Coleus tuberosus* as an antioxidant and cancer chemoprevention agent. *International Food Research Journal* 18(4): 1471-1480.
- Panjaitan RGP. 2008. Pengujian aktivitas hepatoprotektor akar pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.). [disertasi]. Bogor (ID): Sekolah Pasca Sarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Pinzaru IA, Hădărugă DI, Hădărugă NG, Corpaș L, Grozescu I, Peter F. 2011. Hepatoprotective flavonoid bioconjugate/ β -cyclodextrin nanoparticles:dsc-molecular modeling correlation. *Digest Journal of Nanomaterial and Biostructure* 6(4): 1605-1617.
- Punitha SC, Rajasekaran M. 2011. Antioxidant mediated defense role of *Wedelia calendulacea* herbal extract against CCl_4 induced toxic hepatitis. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(9): 111-115.
- Quintieri L, Palatini P, Moro S, Floreani M. 2011. Inhibition of cytochrome P450 2c8-mediated drug metabolism by the flavonoid diosmetin. *Drug Metabolism Pharmacokinetics* 26(6): 559-568.
- Sahreen S, Khan MR, Khan RA. 2011. Hepatoprotective effects of methanol extract of *Carissa opaca* leaves on CCl_4 -induced damage in rats. *BMC*

- Complement Alternative Medicine* 11(48): 1-9.
- Sen S, Chakraborty R, Sridharl C, Reddy YSR, De B. 2010. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research* 3(1): 91-100.
- Sengupta M, Sharma GD, Chakraborty B. 2011. Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 1: 193-199.
- Setzer WN. 2008. Non-intercalative triterpenoid inhibitors of topoisomerase ii: a molecular docking study. *Compounds Journal* 1: 13-17.
- Sharma N, Shukla S. 2011. Hepatoprotective potential of aqueous extract of *Butea monosperma* against CCl_4 induced damage in rats. *In press*: 1-11.
- Stockham SL, Scott MA. 2002. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Ed ke-1. Iowa state Pr. Blackwell Publishing Co. hlm. 433-486.
- Suja SR, Latha PG, Pushpangadan P, Rajasekharan S. 2004. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 92(1): 61-66.
- Thapa BR, Walia A. 2007. Liver function tests and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics* 74(7):663-671.
- Topcua T, Ertasb A, Kolakb U, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. *ARKIVOC* 7: 195-208.
- Vadlapudi V, Naidu KC. 2009. Evaluation of antioxidant potential of selected mangrove plants. *Journal of Pharmaceutical Research* 2(11): 1742-1745.
- Wang BJ, Liu CT, Tseng CP, Yu ZR. 2004. Hepatoprotective and antioxidant effects of *Bupleurum kaoi* Liu (Chao et Chuang) extract and its fractions fractionated using supercritical CO_2 on CCl_4 -induced liver damage. *Food and Chemical Toxicology* 42(4): 609-617.
- Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 52: 4026-4037
- Yang J, Kim JS, Sa YJ, Kim MO, Jeong HJ, Yu CY, Kim MJ. 2011. Antioxidant, antibacterial and α -glucosidase inhibitory activities of different extracts of *Cortex moutan*. *African Journal of Biotechnology* 10(46): 9438-9444.
- Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. 2004. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives. Biochemistry Biophysics* 430: 97-10.
- Yeum KJ, Beretta G, Krinsky NI, Russell RM, Aldini. 2009. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 25(7-8): 839-846.
- Zhang ZS, Li D, Wang LJ, Ozkan N, Chen XD, Mao ZH, Yang HZ. 2007. Optimisation of ethanol-water extraction of lignans from flaxseed. *Journal of Separation and Purification Technology* 57: 17-24.